

**ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA**

---

**FACOLTA' DI INGEGNERIA**

**CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA PER L'AMBIENTE E IL TERRITORIO LS**

**Dipartimento di Ingegneria Chimica, Mineraria e  
delle Tecnologie Ambientali**

**TESI DI LAUREA**

in

Tecnologie di risanamento del suolo e del sottosuolo

**BIODEGRADAZIONE AEROBICA COMETABOLICA DI  
SOLVENTI CLORURATI**

CANDIDATO

Pasquale Pagliara

RELATORE:

Chiar.mo Prof.

Dario Frascari

CORRELATORI

Prof. Davide Pinelli

Ing. Roberta Ciavarelli

Anno Accademico 2009/10

Sessione III

1

*“L’abbondanza d’acqua fa ormai parte delle nostre vite,  
facendoci dimenticare quanto siamo privilegiati”.*

<Frederic Lasserre>.

## INDICE

Capitolo 1 - INTRODUZIONE .....	6
1.1    Introduzione alla tesi .....	6
1.2    Introduzione al progetto .....	7
Capitolo 2 - I SOLVENTI CLORURATI.....	14
2.1    Proprietà chimico-fisiche .....	14
2.2    Campi di utilizzo.....	15
2.3    Diffusione del contaminante .....	18
2.3.1    Dinamica dei DNAPL nella zona non satura .....	19
2.3.2    Dinamica dei DNAPL nella zona satura .....	20
2.4    Caratteristiche tossicologiche e limiti di legge per la bonifica .....	21
Capitolo 3 - BIODEGRADAZIONE DI SOLVENTI CLORURATI .....	24
3.1    Reazioni di degradazione dei solventi clorurati.....	25
3.1.1    Reazioni senza scambio di elettroni .....	27
3.1.2    Reazioni con trasferimento di elettroni .....	28
3.1.3    Reazioni di ossidazione.....	29
3.1.4    Reazioni di riduzione .....	30
3.2    Biodegradazione aerobica cometabolica .....	34
Capitolo 4 - TECNOLOGIE APPLICATE AL TRATTAMENTO DI <i>BIOREMEDIATION</i> IN SITU .....	37
4.1    Tecniche di trattamento – parametri di processo.....	37
4.2    Configurazione dei sistemi di trattamento .....	39
4.3    Risultati della biodegradazione ottenuti su scala di laboratorio e problemi di scale up 40	
4.4    Valutazione della potenzialità biodegradativa della biomassa presente nel sito .....	41
4.5    Fenomeni di inibizione competitiva tra substrato di crescita e inquinante e inibizione dovuta ad alta concentrazione dell'inquinante .....	43
4.6    Valutazione del tipo e quantità di nutrienti necessari.....	44
4.7    Completezza della mineralizzazione dei solventi clorurati .....	44

4.8	Valutazione dell'efficacia di eventuali inoculi microbici .....	46
4.9	Sperimentazioni in reattori pilota e problemi di scale up.....	46
4.10	Implementazione a scala reale.....	48
Capitolo 5 - IL MODELLO FLUIDODINAMICO E CINETICO .....		50
5.1	Trasporto di soluti in un mezzo poroso .....	50
5.1.1	Trasporto di materia .....	50
5.1.2	Il fenomeno dell'assorbimento – Il fattore di ritardo .....	53
5.1.3	Reazioni chimiche biologiche.....	55
5.2	Il modello cinetico .....	56
5.2.1	Velocità di reazione del substrato di crescita primario e del substrato cometabolico .....	56
5.2.2	Velocità di reazione dell'ossigeno.....	59
5.2.3	Velocità di reazione della biomassa .....	60
Capitolo 6 - METODICHE ANALITICHE E SPERIMENTALI.....		63
6.1	Analisi gas-cromatografiche: iniezione manuale del campione.....	63
6.1.1	Analisi del substrato di crescita (metano, pentano) .....	64
6.1.2	Analisi dei solventi clorurati .....	66
6.2	Analisi gascromatografica: iniezione automatizzata del campione con auto campionatore spazio di testa Agilent 7694E .....	68
6.3	Analisi di ossigeno in fase liquida .....	71
7.1	Descrizione del reattore.....	76
7.2	Caratteristiche del riempimento .....	78
7.3	Sistema di alimentazione .....	78
7.4	Il polmone ed il filtro a carboni attivi.....	82
Capitolo 8 - RIATTIVAZIONE E SELEZIONE MICROCOSMI BATTERICI .....		84
8.1	Preparazione dei microcosmi.....	85
8.2	Prove di degradazione TCE e TeCA da parte di microcosmi contenuti in acqua di falda. 86	
8.2.1	Velocità di degradazione A-M, A-PE.....	88

8.3	Riattivazione batteri metanotrofi.....	91
8.3.1	Prove di degradazione cis-DCE e Cloruro di Vinile.....	95
8.3.2	Velocità di degradazione B1,B2,B3,B5 .....	98
Capitolo 9 - ORC – Oxygen Release Compound.....		104
9.1	Preparazione ORC.....	105
9.2	Stechiometria dei composti ORC.....	106
9.3	Impianto prova ORC.....	107
9.4	Prove ORC_Ca.....	109
9.5	Prove ORC_Na .....	111
Capitolo 10 – CONCLUSIONI .....		114
BIBLIOGRAFIA .....		116
Ringraziamenti.....		118

# Capitolo 1 - INTRODUZIONE

## 1.1 Introduzione alla tesi

Il presente studio descrive il progetto inerente la bonifica di acque di falda e di suoli contaminati da solventi clorurati. L'attività di ricerca, durata 6 mesi, è stata svolta presso il Dipartimento di Ingegneria Chimica, Mineraria e delle tecnologie Ambientali (DICMA) dell'Università di Bologna. Nell'ambito del progetto riguardante la bonifica di acque di falda e suoli contaminati da idrocarburi alifatici clorurati, particolare attenzione è stata posta alle tecniche di *Bioremediation* – biorisanamento - e allo studio del processo cometabolico aerobico di cloroformio in un reattore a flusso da parte di un biofilm batterico.

Tale progetto e' stato iniziato nei primi anni del 2000, ed e' ancora oggetto di studi da parte del prof. Dario Frascari e del prof. Davide Pinelli, i quali ricercano delle innovazioni che potrebbero rendere questa tecnica, di risanamento biologico delle acque di falda, competitiva se non addirittura sostitutiva rispetto alle altre tecniche tradizionali che sono impiegate oggi nelle operazioni di decontaminazione.

La seguente tesi di laurea, con impostazione tipica di un articolo, sviluppa alcuni aspetti del progetto sopra citato. In particolare sono stati approfonditi gli studi e le metodologie di realizzazione e conduzione dell'impianto, cercando di apportare modifiche alle precedenti prove di laboratorio per aumentare l'efficienza e l'affidabilità'.

La ricerca e' stata indirizzata sullo studio e sulla sperimentazione di tecniche innovative applicate a diversi aspetti dell'impianto, quali:

- riattivazione e selezione di specifiche colture batteriche, e relativa scelta del substrato di crescita, da far aderire all'interno del reattore;
- introduzione nel sistema di alimentazione della tecnica degli ORC (Oxygen Release Compound – Regenesis), e realizzazione di un bottiglione a tenuta per lo stoccaggio di acqua satura del substrato di crescita.

## 1.2 Introduzione al progetto

Con il termine *bonifica* si intende l'insieme di interventi atti alla rimozione della fonte di inquinamento, alla riduzione dell'agente inquinante nei suoli e nelle acque sotterranee e superficiali ad un livello inferiore ai limiti di accettabilità previsti dalla normativa, in funzione della destinazione d'uso dei suoli stessi, nonché dell'esigenza di assicurare la salvaguardia della qualità delle diverse matrici ambientali.

Negli ultimi anni, in particolare dall'emanazione del “*TESTO UNICO AMBIENTALE*” D.Lgs 152/2006 e s.m.i. (D.Lgs 4/08) – *TITOLO V* -, nuovi concetti sono stati introdotti in materia di bonifiche. Si passa da un rigido approccio tabellare del precedente decreto, il D.M. 471/99, ad un approccio misto (limiti tabellari + analisi di rischio). I limiti tabellari rappresentano i valori soglia (concentrazioni soglia di contaminazione - CSC), superati i quali è necessaria la caratterizzazione di un sito e l'analisi di rischio sito specifica.

Il sito è definito contaminato al superamento dei valori soglia di rischio (concentrazioni soglia di rischio CSR) individuati con l'analisi, i quali vanno a costituire anche l'obiettivo da raggiungere in fase di bonifica.

Quindi un sito non è contaminato quando la contaminazione risulti inferiore ai valori delle concentrazioni soglia di contaminazione (CSC) oppure, se superiore, risulti comunque inferiore ai valori di concentrazione soglia di rischio (CSR).

Tra le tecnologie per la bonifica dei siti inquinati hanno avuto un rapido sviluppo quelle, indicate con il termine inglese *bioremediation*, che fanno ricorso a processi biologici di degradazione che si basano sulla capacità di alcuni microrganismi, autoctoni o meno, di trasformare sostanze ritenute pericolose in sostanze innocue o meno nocive. Rispetto a tecnologie più tradizionali, come il *pump & treat* o la *vapor extraction*, la *bioremediation* presenta numerosi vantaggi tra i cui i più rilevanti sono:

- l'eliminazione dei composti inquinanti (mentre la maggior parte delle tecnologie di bonifica degli acquiferi si limita a trasferirli ad un'altra matrice, ad esempio filtri a carboni attivi);

- il contenimento dei costi;
- la possibilità di completare il trattamento di disinquinamento in tempi relativamente brevi;
- l'impatto relativamente basso sulla natura del sito, non necessitando di estrazioni o escavazioni;
- l'accettazione di buona parte dell'opinione pubblica, essendo un trattamento che utilizza processi naturali di decontaminazione.

L'oggetto di studio di questa tesi di laurea è l'applicazione della *bioremediation* ai siti contaminati da solventi clorurati. Essi sono idrocarburi alifatici clorurati (CAHs categoria di idrocarburi appartenenti ai composti volatili VOCs), che trovano ampia applicazione in numerosi settori; in particolare, vengono utilizzati come sgrassanti per la pulizia di parti metalliche e per il lavaggio a secco degli abiti e come solventi in numerosi processi industriali.

Il problema della contaminazione da solventi clorurati è aggravato sia dalla tossicità e cancerogenicità che caratterizzano la maggior parte di tali idrocarburi, sia dalle loro proprietà chimico-fisiche: spesso sono più pesanti dell'acqua – caratteristica che comporta una stratificazione nelle zone più profonde degli acquiferi, quando presenti come fase libera. Inoltre, i solventi clorurati sono particolarmente solubili e scarsamente adsorbiti dai diversi tipi di suolo, quindi possono generare pennacchi di contaminazione che si spostano in falda con particolare rapidità.

La possibilità di degradare solventi clorurati per via biologica è stata scoperta soltanto nel corso degli anni '80; ne consegue che non sono stati ancora chiariti tutti gli aspetti del processo biodegradativo e della sua applicabilità in campo. È stato comunque evidenziato che, nella maggior parte dei casi, i batteri non sono in grado di utilizzare i solventi clorurati come substrati di crescita: alcuni solventi risultano recalcitranti, pertanto non possono essere utilizzati direttamente come fonte di carbonio e di energia dai microrganismi. Per questo si deve ricorrere a processi alternativi chiamati *cometabolici*, in cui gli enzimi espressi dai batteri nell'ambito del metabolismo di un substrato di crescita permettono la degradazione del clorurato, da cui la biomassa non trae alcun vantaggio. Recenti studi dimostrano come alcuni ceppi microbici aerobici riescono,

attraverso il cometabolismo, a degradare idrocarburi alifatici clorurati con 4 atomi di cloro, come ad esempio l'1,1,2,2-tetracloroetano.

Di frequente nelle falde sono presenti composti idrocarburi clorurati e fra questi, come anzidetto, particolarmente diffusi sono gli alifatici clorurati. Per questa categoria di sostanze chimiche la biodegradazione aerobica non è sempre possibile; in particolare la sua efficacia dipende dal grado di clorurazione della molecola da trattare: per bassi gradi di clorurazione il trattamento può essere efficace, ma per gli elevati gradi, la biodegradazione anaerobica si rileva più idonea. I processi anaerobici, a differenza degli aerobici, sono più difficilmente controllabili, sono processi lenti ed in alcune situazioni di difficile applicazione.

Al fine di poter accrescere il campo d'azione dei processi aerobici anche a sostanze con grado di clorurazione intermedio e a quelle non degradabili con meccanismo aerobico diretto, una valida alternativa è offerta dai processi cometabolici. In tali processi, la biomassa cresciuta su un opportuno substrato (aggiunto al sistema) è in grado di degradare le sostanze clorurate di interesse che altrimenti tenderebbero a persistere a lungo nelle falde in condizioni aerobiche.

Tuttavia, per l'applicazione in campo di tali metodologie, si richiedono conoscenze approfondite su vari aspetti del processo, tra cui la conoscenza di tipo e dosi di impiego del substrato da somministrare (che non dovrà costituire un' ulteriore fonte di inquinamento), la conoscenza dei tempi necessari allo sviluppo della biomassa idonea a realizzare la degradazione degli CAHs, la capacità della biomassa di colonizzare la zona di acquifero che si intende trattare e la persistenza nel tempo della sua attività degradativa (biosostenibilità), gli intervalli possibili di concentrazione dell'inquinante, le velocità di degradazione ottenibili, l'efficacia nel portare a termine la degradazione, la completezza della mineralizzazione delle sostanze inquinanti ed i rischi connessi alla formazione di metaboliti pericolosi.

Per poter quindi condurre in sito un processo di biodegradazione cometabolica di solventi clorurati in condizioni aerobiche è necessario introdurre nella zona contaminata il substrato di crescita, l'ossigeno ed i nutrienti, ed eventualmente, qualora la biomassa autoctona non mostri una cinetica apprezzabile nella

degradazione del clorurato, un inoculo microbico specifico già capace di degradare il contaminante.

Aspetti critici legati all'applicabilità di questo sistema sono: la difficoltà di isolare direttamente nel sito da bonificare consorzi o ceppi batterici capaci di degradare la sostanza clorurata con lag-times non eccessivamente elevati e con una cinetica cometabolica di sviluppo costante.

Bisogna inoltre considerare le problematiche connesse alla elevata complessità del sistema di alimentazione (legata allo stato di aggregazione gassoso in cui spesso è presente il substrato primario) e alla biosostenibilità del processo nel tempo.

Le metodologie applicabili per sistemi di trattamento biologico in sito sono:

- l'aspirazione di acqua che viene arricchita di sostanze nutrienti e poi reimpressa nel sottosuolo, generando una sorta di *loop*;
- l'introduzione in falda di barriere biologicamente attive;
- l'iniezione diretta delle sostanze necessarie allo sviluppo batterico nelle aree di suolo contaminate.

Le applicazioni a scala reale, cioè in sito, del processo cometabolico di solventi clorurati sono ancora rare, non essendo queste tecnologie esenti da aspetti critici. Le criticità che ad oggi hanno costituito un limite applicativo di tale tecnologia su scala reale possono essere riassunte come segue:

- rischio di intasamento delle porosità del terreno in prossimità dei pozzi di iniezione, a causa di una elevata crescita della biomassa (per la presenza di condizioni particolarmente favorevoli);
- rischio connesso al completo consumo del substrato di crescita ad una breve distanza dal pozzo di iniezione con conseguente limitazione della lunghezza della zona bioreattiva;
- rischio legato alla biosostenibilità del processo (che accomuna tutti i processi di biodegradazione);
- la possibilità di avere *lag-times* nella degradazione del contaminante o del substrato molto lunghi a causa della bassa affinità della coltura microbica autoctona.

Per poter studiare l'applicabilità in campo di un qualsiasi sistema di biodegradazione, è necessario anteporre delle sperimentazioni in laboratorio, al fine di ottenere informazioni sulla fattibilità del processo; sebbene siano una riproduzione della realtà molto semplificata e in scala ridotta, possono offrire informazioni molto utili. Ovviamente le condizioni del processo in scala reale sono molto diverse da quelle usualmente adottate nelle sperimentazioni in microcosmi. Differenze dettate dall'assenza nel caso reale di un sistema di miscelazione gas-liquido-solido, presente invece nei microcosmi slurry, dalla presenza in questi ultimi dello spazio di testa, assente in un trattamento in falda in cui si possono immettere solo sostanze in soluzione, e dalla uniforme concentrazione del contaminante nel liquido mentre in falda la sorgente di contaminazione è spesso presente come *DNAPL (Dense Non-Aqueous Phase Liquid)*. Alla base del presente studio, tali test sono stati precedentemente effettuati ed i risultati più volte presi in considerazione, ma si rimanda agli stessi per specifiche informazioni, in quanto essi non costituiscono personale argomento di ricerca.

Lo studio in esame, mira ad analizzare modalità e tecniche innovative da apportare alla realizzazione di un processo aerobico cometabolico per la biodegradazione di cloroformio (CF) tramite microorganismi autoctoni utilizzatori di metano (M) quale substrato di crescita. Esso è realizzato in un apparato sperimentale costituito da una colonna a flusso impaccata da materiale di riempimento, costituito da cilindretti porosi, in cui si riproduce una porzione di acquifero saturo reale a partire dal pozzo di iniezione.

In realtà sarebbe più idoneo realizzare dei test pilota direttamente in campo così da ottenere una diretta indicazione dell'efficacia della tecnologia; questo però presenta anche alcuni aspetti delicati quali la necessità di un'approfondita caratterizzazione dei contaminanti tramite un adeguato numero di pozzi di monitoraggio al fine di poter effettuare, se pure in modo approssimato, dei bilanci di materia sui contaminanti. Inoltre, per dimostrare che il fenomeno riscontrato è dovuto effettivamente al cometabolismo aerobico, dovrebbe essere verificata l'esistenza di una correlazione fra l'abbattimento del contaminante e quello del substrato.

Le prove in laboratorio sono state incentrate sull'esecuzione e sull'interpretazione di una serie di esperimenti finalizzati ad indagare aspetti diversi e specifici di un processo di biodegradazione cometabolica da parte di diversi consorzi batterici, provenienti da falde contaminate da idrocarburi alifatici clorurati, alimentati da diversi substrati, quali pentano e metano, e sono state introdotte nuove tecniche di alimentazione per reattore a colonna che simula una porzione di un acquifero.

Il primo obiettivo perseguito nel progetto è stato quello di riuscire ad riattivare microcosmi batterici utilizzati nelle precedenti sperimentazioni e confrontare il loro rendimento sulla base della degradazione di cis-DCE e cloruro di vinile, in concomitanza con l'attivazione di altri consorzi batterici, recapitati al laboratorio durante la mia permanenza, con i quali si sono fatte prove di degradazione di TCE e TeCA, alimentando i microcosmi con differenti substrati, metano e pentano. Dopodiché lo studio è stato incentrato sull'impianto di alimentazione sperimentando la tecnica degli ORC (Oxygen Release Compound)..

Il *sistema di alimentazione* è stato progettato al fine di evitare sia il fenomeno del *clogging*, la crescita abnorme di biomassa nei pressi del pozzo di iniezione, che il repentino consumo del substrato di crescita a breve distanza da tale punto. Il sistema di alimentazione deve evitare anche la copresenza di metano ed ossigeno prima dell'ingresso in colonna, che porterebbe altrimenti alla crescita di biomassa fuori dal reattore.

Allo scopo di soddisfare tali obiettivi si è pensato di realizzare un sistema di alimentazione a pulsanti alternati che consiste nell'iniettare un pulso di substrato primario (metano) ed un pulso di ossigeno separati da uno di acqua pura esente da tali composti. Per pulso si intende l'alimentazione al reattore a colonna di una soluzione acquosa contenente un generico soluto *i* per un fissato tempo, ad una fissata concentrazione.

L'alimentazione continua del metabolita è stata realizzata cercando di utilizzare acque contaminate provenienti da falde, ma quando ciò non è stato possibile si è arricchita la soluzione acquosa in ingresso con una concentrazione costante di solvente clorurato.

Il lavoro descritto nella presente tesi fornisce incoraggianti sviluppi per una futura applicazione del cometabolismo aerobico nella bonifica di acque di falda contaminate da solventi clorurati.

## Capitolo 2 - I SOLVENTI CLORURATI

### 2.1 Proprietà chimico-fisiche

I solventi clorurati sono composti organici artificiali. Essi sono tipicamente derivati da un idrocarburo (metano, etano ed etilene) per successive sostituzioni di uno o più atomi di idrogeno con atomi di cloro oppure dalla dechlorurazione di composti clorurati a minor stato di clorurazione.

Le proprietà chimico-fisiche dei solventi clorurati ne determinano il destino e il trasporto nell'ambiente. Esse possono essere schematicamente riassunte come segue:

- il numero di atomi di cloro presenti nel solvente clorurato ne influenza il comportamento fisico e il comportamento chimico: all'aumentare degli atomi di cloro presenti, il peso molecolare e la densità genericamente aumentano, mentre la tensione di vapore e la solubilità in acqua diminuiscono;
- con l'eccezione del cloroetano e del cloruro di vinile (gassosi a temperatura e pressione ambiente), sono tutti composti più densi dell'acqua (la densità a 4 °C varia fra 1,18 e 1,60 g/mL); ciò ha importanti ripercussioni sulle caratteristiche dei siti contaminati da solventi clorurati, in quanto tali contaminanti, in caso di presenza di fase liquida libera, tendono a penetrare l'acquifero fino al raggiungimento di strati impermeabili, rendendo più difficoltosi l'individuazione ed il trattamento;
- si tratta di composti caratterizzati da solubilità in acqua dell'ordine delle migliaia di mg/L a 25 °C (con un massimo di 20 g/L per il diclorometano), quindi, in una fase acquosa si può trovare una quantità disciolta di solventi clorurati piuttosto elevata. Inoltre, per i limiti imposti dal D.M. 471/99, le concentrazioni limite accettate negli acquiferi sono di molti ordini di grandezza inferiori alla solubilità, per cui i processi di trattamento delle falde devono abbattere i solventi clorurati fino a livelli molto bassi di concentrazione, spesso inferiori a 1 µg/L;
- la tensione di vapore varia fra un minimo di 30 mmHg a 25 °C (1,1,2-tricloroetano) ad un massimo di 600 mmHg a 25 °C (1,1-dicloroetilene), impedendo la semplice volatilizzazione dell'acqua di falda;

- il  $\text{Log}_{10}$  del coefficiente di ripartizione n-ottanolo/acqua varia entro un intervallo (0,48 – 2,64): ciò significa che, con riferimento ad un acquifero contaminato, i solventi clorurati sono caratterizzati da una bassa frazione adsorbita nel terreno e quindi da una elevata mobilità negli acquiferi.

In Tab. 1 sono riportate alcune caratteristiche chimico-fisiche dei principali solventi clorurati.

## 2.2 Campi di utilizzo

Gli idrocarburi alifatici clorurati sono utilizzati in numerose applicazioni come solventi e sgrassatori, e vengono impiegati nella lavorazione dei materiali grezzi in diversi settori industriali.

I solventi clorurati di più ampio utilizzo sono il cloruro di metilene (MC), il cloroformio (CF), il tetracloruro di carbonio (CT), il tricloroetilene (TCE) ed il percloroetilene (PCE). Le principali applicazioni di tali prodotti sono riassunte nel seguente elenco:

- *cloruro di metilene (MC)*: prodotti farmaceutici, aerosol, estrazioni nel settore alimentare, trattamenti delle superfici, produzione di componenti dell'industria elettronica;
- *cloroformio (CF)*: produzione di fluorocarbon-22 (utilizzato principalmente come fluido refrigerante), estrazione e purificazione di farmaci, stadio intermedio nella produzione di coloranti e pesticidi;
- *tetracloruro di carbonio (CT)*: solvente;
- *tricloroetilene (TCE)*: pulizia (sgrassatura) di parti metalliche, produzione di adesivi, produzione di sostituti dei CFC, solvente;
- *percloroetilene (PCE)*: pulizia (sgrassatura) di parti metalliche, lavaggio a secco, produzione di sostituti dei CFC, lavorazioni nel settore tessile.

Durante gli anni '80, numerosi erano anche i settori di utilizzo del tricloroetano (1,1,1-TCA). Tuttavia nel 1987 la produzione di questo solvente è stata vietata dal protocollo di Montreal, in quanto esso è stato riconosciuto come uno dei responsabili dell'assottigliamento dello strato di ozono. Pertanto la produzione

di tale solvente è gradualmente diminuita durante la prima metà degli anni '90, per poi arrestarsi nel 1995.

Composto	Formula	Abbreviazione	Peso molecolare (g/mole)	Densità (g/ml a 4°C)	Solubilità in acqua (mg/l a 25°C)	Tensione di vapore (mmHg a 25°C) (acqua = 23,8)	Costante di Henry (*) (atm·m <sup>3</sup> / mol a 20°C)	Coefficiente di ripartizione n-octano/acqua: Log <sub>10</sub> K <sub>ow</sub>
Tetracloruro di C	CCl <sub>4</sub>	CT	153,8	1,595	757	90	0.0304	2,64
Cloroformio	CHCl <sub>3</sub>	CF	119,4	1,485	8200	151	0.00435	1,95
Diclorometano	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	DM	84,9	1,325	20000	362	0.00268	1,30
1,1,1 - Tricloroetano	CH <sub>3</sub> CCl <sub>3</sub>	1,1,1-TCA	133,4	1,325	1500	123	0.008	2,49
1,1,2 - Tricloroetano	CHCl <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Cl	1,1,2-TCA	133,4	1,44	4500	30	0.0012	2,47
1,1 - Dicloroetano	CH <sub>3</sub> CHCl <sub>2</sub>	1,1-DCA	99,0	1,175	5500	182	0.0059	1,79
1,2 - Dicloroetano	CH <sub>2</sub> ClCH <sub>2</sub> Cl	1,2-DCA	99,0	1,253	8520	64	0.00098	1,48
Cloroetano	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> Cl	CA	64,5	Gas	5700	1064	0.0085	da 1,52 a 2,16

Tab. 1 – Proprietà chimico-fisiche dei principali solventi clorurati – prima parte.

Composto	Formula	Abbreviazione	Peso molecolare (g/mole)	Densità (g/ml a 4°C)	Solubilità in acqua (mg/l a 25°C)	Tensione di vapore (mmHg a 25°C) (acqua = 23.8)	Costante di Henry (*) (atm·m <sup>3</sup> / mol a 20°C)	Coefficiente di ripartizione n-ottano/ acqua: Log <sub>10</sub> K <sub>ow</sub>
Tetracloroetilene	CCl <sub>2</sub> =CCl <sub>2</sub>	PCE	165,8	1,62	150	17,8	0,0153	2,60
Tricloroetilene	CHCl=CCl <sub>2</sub>	TCE	131,4	1,46	1100	57,9	0,0091	2,38
Cis-1,2-Dicloroetilene	CHCl=CHCl	Cis-1,2-DCE	96,9	1,28	3500	208	0,0037	0,70
Trans-1,2-Dicloroetilene	CHCl=CHCl	Trans-1,2-DCE	96,9	1,28	6300	324	0,0072	0,48
1,1-Dicloroetilene	CH <sub>2</sub> =CCl <sub>2</sub>	1,1-DCE	96,9	1,21	2250	600	0,018	1,84
Cloruro di vinile	CH <sub>2</sub> =CHCl	VC	62,5	gas	2670	2660	0,315	1,38

Tab. 1 – Proprietà chimico-fisiche dei principali solventi clorurati – seconda parte.

(\*) La costante di Henry espressa in questa unità si riferisce all'equilibrio liquido-gas espresso tramite la seguente equazione:

$$P_i = H_i c_i$$

dove  $P_i$  è la pressione del componente  $i$  in fase gas (atm),  $c_i$  la sua concentrazione in fase liquida (mol/m<sup>3</sup>) e  $H_i$  la sua costante di Henry alla temperatura indicata (atm m<sup>3</sup>/mol).

## 2.3 Diffusione del contaminante

L'entità della diffusione del contaminante nell'ambiente dipende dalle proprietà chimico-fisiche del contaminante stesso. Il contaminante normalmente viene rilasciato nel sottosuolo come liquido organico puro, indicato con l'acronimo *NAPL (No Aqueous Phase Liquid)* e si può presentare ripartito in quattro fasi: in parte può essere presente come liquido puro (*NAPL*), in parte viene adsorbito nel terreno, in parte si dissolve nell'acqua sotterranea e in parte volatilizzata nei gas presenti nel sottosuolo (nel caso di acquifero non saturo). La situazione indicata può essere descritta mediante la figura Fig. 1, in cui si fornisce una rappresentazione schematica dell'equilibrio fra le quattro fasi in cui i solventi clorurati possono essere presenti nel sottosuolo.

La ripartizione del contaminante e l'equilibrio tra le quattro fasi dipendono dalle caratteristiche chimico-fisiche del contaminante stesso. Infatti, l'equilibrio tra le fasi liquida, di adsorbimento nel terreno e di dissoluzione in acqua è determinato dalla solubilità del contaminante in acqua e dal coefficiente di ripartizione tra terreno e acqua. La tensione di vapore definisce la ripartizione del contaminante tra la fase di liquido puro o la fase adsorbita nel terreno e la fase gas presente nel sottosuolo.

L'equilibrio tra la fase dissolta in acqua e la fase gas è stabilito dalla costante di Henry.

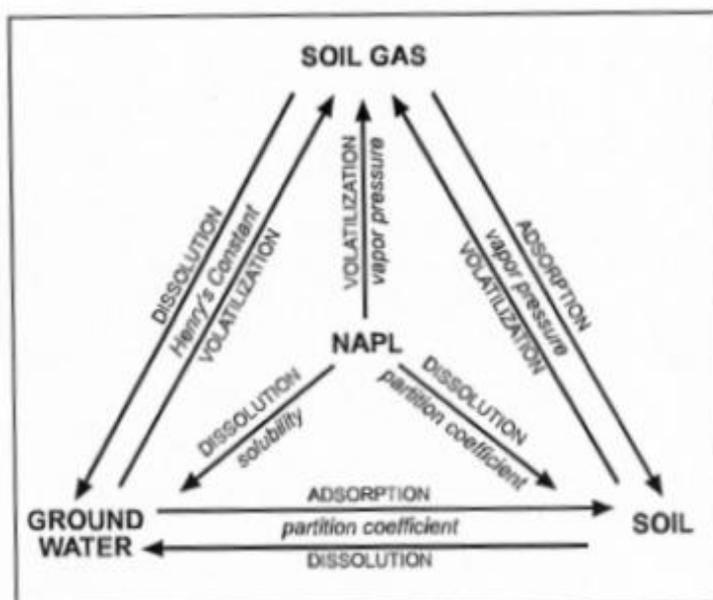


Fig.1 – Rappresentazione schematica dell'equilibrio fra le quattro fasi in cui i solventi clorurati possono ripartirsi nel sottosuolo.

Il trasporto del contaminante attraverso il suolo fino alle falde è un processo complesso e fortemente dipendente dalle caratteristiche idrogeologiche del sito interessato, che può essere descritto con la coesistenza di vari meccanismi (convezione, dispersione, adsorbimento, trasporto di sostanze immiscibili e diffusione).

Gli idrocarburi alogenati alifatici hanno densità nettamente maggiore di quella dell'acqua, mentre la loro viscosità è considerevolmente minore. Entrambe queste proprietà favoriscono una veloce migrazione attraverso il suolo con il conseguente raggiungimento delle falde acquifere. Una volta raggiunta la falda, a causa della maggiore densità rispetto all'acqua, tali composti continuano a migrare verso il fondo dell'acquifero dove tendono a stratificare sul più profondo strato impermeabile, formando una "piscina" di fase separata. Inoltre, durante la migrazione verso il basso, una porzione di fase separata viene intrappolata nelle porosità della fase solida a causa di forze capillari, creando una contaminazione lungo tutta la verticale.

### **2.3.1 Dinamica dei DNAPL nella zona non satura**

Quando un DNAPL viene rilasciato nel suolo, esso tende a seguire un movimento di infiltrazione che presenta, teoricamente, una componente verticale predominante. Tuttavia, l'eterogeneità del mezzo geologico, la differente alterazione e la diversa percentuale di acqua presente nei singoli livelli, possono provocare un progressivo allargamento della zona contaminata ed un suo cambiamento di forma.

In un mezzo omogeneo, si ha una profondità di penetrazione superiore a quella che si verifica in presenza di eterogeneità, in quanto si formano orizzonti preferenziali di concentrazione dei composti considerati. In tale regione il DNAPL potrà essere trattenuto nelle porosità del suolo, rivestendo la matrice solida e potendo andare incontro a dissoluzione in presenza di flussi idrici dovuti all'infiltrazione delle precipitazioni meteoriche. Per le sostanze volatili, come molti dei composti clorurati, c'è inoltre la possibilità di migrazione in fase vapore. Essendo i DNAPL altamente idrofobici si creano delle significative tensioni all'interfaccia fra il DNAPL e l'acqua. Pertanto, quando per effetto del loro moto migratorio verso le regioni profonde del suolo, tali sostanze

raggiungono la superficie libera dell'acquifero si possono creare delle resistenze al superamento della frangia capillare, che ne rallentano il contatto con l'acqua.

Ne consegue che la massa di contaminante tenderà a stagnare formando una colonna che si estende in verticale. Se la sorgente non si esaurisce, la colonna tenderà ad aumentare di dimensioni fino a raggiungere un'altezza tale da rendere gli effetti legati alla gravità sufficienti a vincere la resistenza esercitata dalla pressione capillare, consentendo al DNAPL di raggiungere l'acqua. Eterogeneità nella matrice del suolo, legate a variazioni spaziali della porosità, della permeabilità e della dimensione dei grani, possono variare l'altezza della colonna di DNAPL richiesta per vincere la resistenza della frangia capillare. Si può dedurre che la possibilità che questi composti possano raggiungere la falda è legata ai seguenti fattori:

- volume di contaminante immesso nel suolo;
- tipologia della fonte inquinante;
- entità dell'infiltrazione;
- capacità di ritenzione del terreno.

La conoscenza della struttura e del grado di umidità del non saturo possono consentire una stima della possibilità di intercettazione dell'inquinante prima che raggiunga la falda, una volta superata la capacità di ritenzione del terreno.

### **2.3.2 Dinamica dei DNAPL nella zona satura**

Quando gli idrocarburi clorurati raggiungono la superficie della falda, si verifica un flusso lento verso il basso poiché devono riuscire a spiazzare l'acqua presente nei pori del mezzo saturo. La componente laterale del moto non influisce sulla discesa ed il fluido tende ad approfondirsi nella zona satura, fino a raggiungere un livello a bassa permeabilità che può essere costituito dal substrato impermeabile della falda o da letti di materiali poco trasmissivi.

Nel caso in cui si superi la capacità di ritenzione del mezzo che dipende, come nel caso del non saturo, dalla saturazione residua, si assiste ad una migrazione laterale del contaminante, al di sopra del livello impermeabile.

La pressione, dovuta al peso della colonna di idrocarburi, spinge la massa di inquinante al di sopra del substrato, inducendo una migrazione anche in senso

contrario alla direzione di flusso della falda fino a quando la pressione del fluido ed il carico idraulico si equilibrano. Ai fini pratici, la forma assunta degli idrocarburi al contatto con il substrato è di difficile perimetrazione. Può inoltre capitare, che la piscina di contaminante si raccolga in depressioni del substrato che sono parzialmente al di fuori del flusso idrico sotterraneo.

## **2.4 Caratteristiche tossicologiche e limiti di legge per la bonifica**

Alcuni dei composti organo-clorurati pongono in serio pericolo la salute dell'uomo. Da qui derivano i limiti di concentrazione massima ammissibile (CMA) per le acque destinate ai consumi umani, fissati dai maggiori paesi industrializzati del mondo. Già nel 1982 la CEE compilò una lista di 129 sostanze potenzialmente nocive per l'ambiente acquatico e la salute dell'uomo. Tra queste ben 118 sono composti organo-alogenati.

In Italia, la presenza di composti organo-clorurati nei suoli e nelle acque (sotterranee o superficiali) e i valori limite accettabili negli scarichi, sono regolamentati dal D.Lgs. N° 152 del 03/04/2006 e s.m.i..

Per quanto riguarda la presenza di composti corurati nelle acque superficiali, la Tabella 1/A dell'Allegato 1 del D.Lgs. 152/2006- parte III -fissa gli standard di qualità da conseguire in corpi idrici significativi (Tab. 2.5). La Tabella 3 dell'Allegato 5, sempre della del D.lgs. 152/2006 - parte III - fissa ad 1 mg/l (come sommatoria) il valore limite di concentrazione di solventi clorurati e a 2 mg/l il valore limite di concentrazione per scarichi in rete fognaria.

Tali valori possono essere resi più restrittivi dalla Regione di competenza, sulla base dei piani di tutela delle acque, tenendo conto dei su menzionati obiettivi di qualità. I composti clorurati, inoltre, rientrano tra le sostanze pericolose (elencate in Tabella 5 dell'Allegato 5 parametro 15), per le quali i limiti regionali non possono essere meno restrittivi di quelli nazionali.

I livelli accettabili nei suoli e nelle acque sotterranee sono normati nell'Allegato 5 - parte IV - del D.Lgs. 152/2006, rispettivamente nelle Tabelle Tab.1 e Tab.2 . Rispetto ai corrispondenti obiettivi di qualità per le acque superficiali, le tabelle suddette presentano una lista più estesa di composti clorurati. Ove è possibile fare un confronto, i valori accettabili in acque sotterranee sono generalmente

simili agli obiettivi di qualità in acque superficiali o leggermente più bassi. Infine è evidente la grande differenza tra il valore massimo accettabile in acque sotterranee per la sommatoria dei composti organo clorurati cancerogeni (10 µg/l) ed i limiti per scarichi di acque industriali (rispettivamente 1 o 2 mg/l, citata Tabella 3 Allegato 5 alla parte III D.Lgs. 152/2006).

La necessità di una bonifica dei siti inquinati da solventi clorurati è giustificata dalle loro caratteristiche tossicologiche e di cancerogenicità (Triclorometano, 1,2-Dicloroetano, Cloruro di Vinile).

N° d'ordine	Sostanza	Siti ad uso Verde pubblico, privato e residenziale (mg/Kg espressi come ss)	Siti ad uso Commerciale e Industriale (mg/Kg espressi come ss)
<b>ALIFICATI CLORURATI CANCEROGENI (*)</b>			
39	Clorometano	0,1	5
40	Diclorometano	0,1	5
41	Triclorometano	0,1	5
42	Cloruro di Vinile	0,01	0,1
43	1,2-Dicloroetano	0,2	5
44	1,1-Dicloroetilene	0,1	1
45	Tricloroetilene	1	10
46	Tetracloroetilene (PCE)	0,5	20
<b>ALIFICATI CLORURATI NON CANCEROGENI (*)</b>			
47	1,1-Dicloroetano	0,5	30
48	1,2-Dicloroetilene	0,3	15
49	1,1,1-Tricloroetano	0,5	50
50	1,2-Dicloropropano	0,3	5
51	1,1,2-Tricloroetano	0,5	15
52	1,2,3-Tricloropropano	1	10
53	1,1,2,2-Tetracloroetano	0,5	10

Tab.2 – Valori di concentrazione limite accettabili nel suolo e sottosuolo in riferimento alla specifica destinazione d'uso.

(\*) – In Tab.2 sono selezionate, per ogni categoria chimica, alcune sostanze frequentemente rilevate nei siti contaminati. Per le sostanze non esplicitamente indicate in Tab.2 i valori di concentrazione limite accettabile sono ricavati adottando quelli indicati per la sostanza tossicologicamente più affine.

<b>N° d'ordine</b>	<b>Sostanza</b>	<b>Acque sotterranee Valori limite (µg/l)</b>
<b>ALIFICATI CLORURATI CANCEROGENI (*)</b>		
39	Clorometano	1,5
40	Triclorometano	0,15
41	Cloruro di Vinile	0,5
42	1,2-Dicloroetano	3
43	1,1-Dicloroetilene	0,05
44	Tricloroetilene	1,5
45	Tetracloroetilene (PCE)	1,1
46	Esaclorobutadiene	0,15
47	Sommatoria organoalogenati	10
<b>ALIFICATI CLORURATI NON CANCEROGENI (*)</b>		
48	1,1-Dicloroetano	810
49	1,2-Dicloroetilene	60
50	1,2-Dicloropropano	0,15
51	1,1,2-Tricloroetano	0,2
52	1,2,3-Tricloropropano	0,001
53	1,1,2,2-Tetracloroetano	0,05

Tab.3 – *Valori di concentrazione limite accettabile in acque sotterranee.*

(\*) – In Tab.3 sono selezionate, per ogni categoria chimica, alcune sostanze frequentemente rilevate nei siti contaminati. Per le sostanze non esplicitamente indicate in tabella i valori di concentrazione limite accettabile sono ricavati adottando quelli indicati per la sostanza tossicologicamente più affine.

## Capitolo 3 - BIODEGRADAZIONE DI SOLVENTI CLORURATI

Come già visto nel precedente capitolo, l'inquinamento da solventi clorurati di falde e suoli, assume sempre più rilevanza, sia per la frequenza e gli alti livelli di inquinamento rilevati che per l'elevata persistenza e tossicità di tali composti.

Solo a partire dalla metà degli anni ottanta, la ricerca relativa all'uso della biodegradazione per la bonifica dei siti contaminati, ha dimostrato che è possibile trasformare i solventi clorurati mediante processi degradativi mediati da organismi. Questa scoperta, ha permesso di applicare i principi della *bioremediation* alla decontaminazione di siti inquinati da idrocarburi alifatici clorurati. Si osservi che i processi di biodegradazione sono da preferirsi ai trattamenti tradizionali, poiché consentono di trasformare il contaminante da una matrice ambientale all'altra.

Per i solventi clorurati, con grado di clorurazione medio/alto, i processi efficaci risultano essere quelli che si realizzano in condizioni anaerobiche.

I processi anaerobici, oltre ad essere lenti e, in alcuni casi, di difficile attuazione, non sono facilmente controllabili. Inoltre, a volte, non è possibile raggiungere la completa dechlorurazione dei composti; come nel caso del cloroetene (cloruro di vinile). una possibilità potrebbe essere quella di affiancare alla riduzione anaerobica, un processo di ossidazione per via microbica, sempre in condizioni anaerobiche.

L'alternativa reale rimane quella di realizzare processi aerobici. Tuttavia, in base a quanto è stato stabilito finora dalla ricerca, quasi tutti i solventi clorurati sono biodegradabili, ma la maggior parte dei ceppi batterici non è in grado di trarre beneficio energetico dalla loro degradazione, la quale si svolge quindi secondo un processo *cometabolico*.

In particolare nell'ambito di questa tesi è stato indagato il processo cometabolico di degradazione di cloroformio in condizioni aerobiche, uno dei solventi clorurati più utilizzati.

Di seguito si illustrano le principali reazioni di trasformazione biologica e non biologica dei solventi clorurati, focalizzando l'attenzione sui processi di degradazione aerobica cometabolica.

### **3.1 Reazioni di degradazione dei solventi clorurati**

La degradazione dei solventi clorurati può avvenire in assenza di microrganismi (degradazione abiotica) oppure mediata da processi biologici (degradazione biotica).

In generale, le reazioni di degradazione dei solventi clorurati possono essere classificate in due categorie:

- reazioni senza scambio di elettroni con una molecola diversa dal solvente clorurato oggetto della degradazione;
- reazioni con trasferimento di elettroni con una molecola diversa dal solvente clorurato oggetto della degradazione.

In Tab.4 si riporta uno schema riassuntivo delle principali reazioni di degradazione dei solventi clorurati, in cui si illustrano, mantenendo la separazione tra le due categorie indicate, il tipo e il meccanismo di reazione e si fornisce una rappresentazione della reazione.

	Tipo di reazione	Meccanismo di reazione	Rappresentazione della reazione
Reazioni senza scambio di elettroni	Sostituzione	Idrolisi	$RX + H_2O \Rightarrow ROH + HX$
	Eliminazione e	Deidroalogenazione e (CAH saturi)	$\begin{array}{c}   \quad   \quad \backslash \quad / \\ -C - C - \Rightarrow C = C + HX \\   \quad   \quad / \quad \backslash \\ X \quad H \end{array}$
Reazioni con trasferimento di elettroni		$\alpha$ -idrossilazione	$\begin{array}{c}   \\ -C - X + H_2O \Rightarrow -C - X + 2H^+ + 2e^- \\   \quad \quad \quad   \\ H \quad \quad \quad OH \end{array}$
	Ossidazione	Alo-ossidazione	$\begin{array}{c}   \\ -C - X + H_2O \Rightarrow -C - X^+ O^- \\   \quad \quad \quad   \end{array}$
		Epossidazione (CAH insaturi)	$\begin{array}{c} X \quad \quad \quad O \quad X \\ \backslash \quad / \quad \quad \backslash \quad / \\ C = C + H_2O \Rightarrow C - C + 2H^+ + 2e^- \\ / \quad \backslash \quad \quad / \quad \backslash \end{array}$
		Idrogenolisi	$RX + H^+ + 2e^- \Rightarrow RH + X^-$
	Riduzione	Accoppiamento	$2 RX + 2e^- \Rightarrow R - R + 2X^-$
		Dialoeliminazione (CAH saturi)	$\begin{array}{c}   \quad   \quad \quad \backslash \quad / \\ -C - C - + 2e^- \Rightarrow C = C + 2X^- \\   \quad   \quad \quad / \quad \backslash \\ X \quad X \end{array}$

Tab.4 – Principali reazioni di degradazione dei solventi clorurati.

### 3.1.1 Reazioni senza scambio di elettroni

Le reazioni di degradazione appartenenti alla prima categoria si verificano prevalentemente nei sistemi *abiotici*. Non necessitano di catalizzatori organici o biochimici e avvengono in acqua con *sostituzione* del cloro con un altro sostituente o con *eliminazione* di un cloro e di un idrogeno legati a due atomi di carbonio adiacenti, tra cui di conseguenza si forma un doppio legame. In entrambi i casi si tratta di reazioni tipicamente lente, come risulta dai valori dei tempi di dimezzamento riportati in tabella Tab.5, ma che però non sono trascurabili se paragonate ai tempi caratteristici del moto dell'acqua nel sottosuolo.

La più comune reazione di sostituzione è l'idrolisi, nella quale un atomo di cloro viene sostituito da un gruppo ossidrilico, con conseguente formazione di un alcol. La cinetica dell'idrolisi dei solventi clorurati è tipicamente di pseudo primo ordine.

<b>Composto</b>	<b>Tempo di dimezzamento (anni)</b>
<b>Metani</b>	
Diclorometano	1,5
Triclorometano	1,3
Tetraclorometano	7000
<b>Etani</b>	
Cloroetano	0,12
1,2-Dicloroetano	50
1,1,1-Tricloroetano	0,5 – 2,5
1,1,2-Tricloroetano	170
1,1,1,2-Tetracloroetano	384
<b>Eteni</b>	
Tricloroetilene	0,9 – 2,5
Tetracloroetilene	0,7 – 6

Tab.5 – *Tempi di dimezzamento nelle reazioni abiotiche di idrolisi o di deidroalogenazione a 20°C per alcuni solventi clorurati.*

La reazione di eliminazione consiste nella deidroalogenazione in soluzione acquosa del solvente clorurato e trasforma gli alcani clorurati in alcheni.

Nella deidroalogenazione lo stato di ossidazione della molecola diminuisce a seguito della rimozione dell'atomo di cloro, ma aumenta a causa della rimozione dell'atomo di idrogeno: quindi, nel complesso non si verifica alcuna variazione dello stato di ossidazione della molecola e non risulta necessario alcuno scambio di elettroni con agenti esterni.

### **3.1.2 Reazioni con trasferimento di elettroni**

Le reazioni appartenenti alla seconda categoria si svolgono prevalentemente nei sistemi *biologici* (microrganismi) e possono essere di ossidazione o di riduzione.

A differenza della sostituzione o dell'eliminazione, le reazioni di ossidazione e di riduzione richiedono la presenza rispettivamente di accettori e donatori esterni di elettroni. Generalmente i composti organici agiscono da donatori di elettroni, venendo ossidati. Tuttavia, a causa del carattere elettronegativo dell'atomo di cloro, i composti alifatici clorurati possono comportarsi anche come accettori di elettroni venendo ridotti. Quindi, i composti alifatici clorurati si comportano da donatori o da accettori di elettroni venendo, rispettivamente, ossidati o ridotti, a seconda del numero di atomi di cloro presenti nella molecola: più è alto tale numero, più il carbonio organico risulta ossidato e maggiore è la probabilità che esso venga ridotto piuttosto che ossidato. Di conseguenza, è più probabile che i composti poli-clorurati siano degradati mediante reazioni di riduzione, piuttosto che mediante reazioni di ossidazione. Al contrario, i composti basso-clorurati possono essere più facilmente ossidati, piuttosto che ridotti.

Oltre alla struttura della molecola, influiscono sulla reazione di degradazione le condizioni ambientali.

### 3.1.3 Reazioni di ossidazione

Le reazioni di ossidazione avvengono tramite metabolismo aerobico dei microrganismi. Il composto clorurato funge da donatore di elettroni, mentre l'ossigeno è l'accettore di elettroni.

La maggior parte delle reazioni di ossidazione di solventi clorurati biologicamente mediate, coinvolge l'enzima monossigenasi, che contiene il citocromo P450. Le reazioni catalizzate dalle isoforme del citocromo P450 sono svariate; la più comune è una classica reazione da monossigenasi: il trasferimento di un atomo di ossigeno dall'ossigeno molecolare ad un substrato organico, con riduzione del secondo atomo di ossigeno ad acqua - ossidazione cometabolica. Il citocromo P450 è una proteina che può mediare reazioni sia di ossidazione che di riduzione. Il citocromo P450 contenuto nell'enzima monossigenasi è in grado di mediare la reazione di ossidazione dei solventi clorurati tramite tre meccanismi:

- meccanismo di  $\alpha$ -idrossilazione, che consiste nell'incorporazione dell'ossigeno nel legame carbonio-idrogeno, con conseguente trasformazione del solvente clorurato in un alcol clorurato. In seguito, l'idrogeno del gruppo ossidrilico e un atomo di cloro vengono eliminati dalla molecola, entrando in soluzione come ioni  $H^+$  e  $Cl^-$ , con conseguente formazione di un'aldeide instabile che può successivamente essere trasformata chimicamente (ad esempio, mediante idrolisi) in monossido di carbonio;
- meccanismo di  $\alpha$ -ossidazione, che consiste nell'ossidazione di un atomo di cloro; porta alla formazione di un composto intermedio ( $-CH_2Cl^+=O^-$ ) molto instabile, che viene rapidamente idrolizzato, dando origine a un alcol e ad uno ione ipoclorito;
- meccanismo di epossidazione, che consiste nell'ossidazione di un doppio legame carbonio-carbonio (si può verificare nel caso di idrocarburi alifatici clorurati insaturi)- L'eossidazione è il primo passo nell'ossidazione degli alcheni mediata dal citocromo P450 presente nell'enzima monossigenasi e porta alla formazione di un epossido, che, essendo un composto molto instabile, si trasforma in aldeidi alogenate che a loro volta si decompongono in acidi o alcol.

L'enzima monossigenasi viene normalmente prodotto nei microrganismi durante il metabolismo di un composto, da cui ricavano energia e materiale di crescita, diverso dal contaminante da degradare. Infatti, la maggior parte dei ceppi batterici non trae nessun beneficio energetico dalla degradazione dei composti clorurati. Quindi, l'ossidazione aerobica dei composti alifatici clorurati mediata dall'enzima monossigenasi avviene generalmente per via *cometabolica*.

Nelle ricerche condotte negli ultimi anni si è scoperto che alcuni ceppi batterici sono in grado di degradare i composti alifatici clorurati mediante un processo ossidativo diretto (EPA 2000). Il composto clorurato funge da donatore di elettroni e dalla sua degradazione i microrganismi ricavano energia per il mantenimento delle cellule e per la crescita (*ossidazione diretta*). L'ossidazione diretta presenta significativi vantaggi rispetto all'ossidazione cometabolica:

- non è necessario introdurre nell'acquifero contaminato un substrato di crescita, evitando, quindi, di immettere nell'ambiente un altro potenziale inquinante e ricavando evidenti benefici economici;
- non presenta il problema della competizione inibitiva fra il substrato di crescita e il contaminante.

Tuttavia, allo stato attuale delle conoscenze, l'ossidazione *diretta* dei composti clorurati viene attuata da un numero molto limitato di ceppi batterici, e risulta efficace soltanto con i composti alifatici clorurati con uno o al più due atomi di cloro (CM, CA, VC, DCE e DCA).

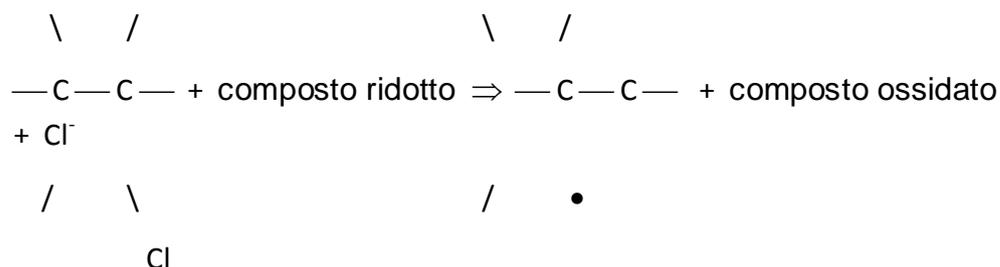
### **3.1.4 Reazioni di riduzione**

Le reazioni di riduzione di composti organici mediate da microrganismi si verificano principalmente in condizioni anaerobiche. In questo gruppo di reazioni, il composto clorurato agisce da accettore di elettroni, mentre il donatore di elettroni può essere uno dei composti riportati in tabella Tab.6, in cui si fornisce un elenco dei più diffusi agenti riducenti presenti nei sistemi biologici.

Agente riducente	Potenziale standard (V)
Vitamina B <sub>12</sub>	da -0,59 a -0,8
<b>Co (I) tetrafenilporfina</b>	-0,56
Ferredoxina (ridotta)	-0,43
H <sub>2</sub>	-0,42
Cr (II)	-0,41
NADH + H <sup>+</sup>	-0,32
Citocromo P450 (inattivato)	-0,30
Glutathione (ridotto)	-0,23
Citocromo P450 (attivato)	-0,17
Fe (II) deuteroporfina IX	0,00
Ubiquinone (ridotto)	0,10
Citocromo c (+2)	0,22
Fe (II)	0,77
H <sub>2</sub> O	0,82

Tab.6 – *Potenziali standard dei più significativi agenti riducenti, o donatori di elettroni, presenti nei sistemi biotici – pH = 7.*

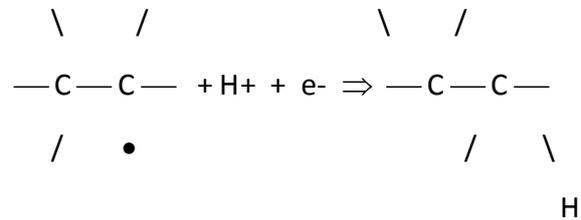
Il meccanismo di riduzione di un composto alifatico alogenato si articola in due stadi. Il primo stadio consiste nel trasferimento di un solo elettrone dalla specie riducente al composto alifatico alogenato con formazione di un radicale alchilico in seguito alla rimozione di un atomo di cloro:



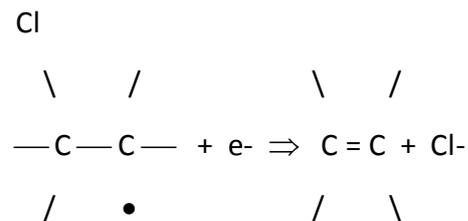
Il processo di formazione del radicale alchilico, nella maggior parte dei casi, è il processo limitante nella trasformazione complessiva.

Il secondo stadio consiste nella trasformazione del radicale alchilico secondo uno dei seguenti meccanismi:

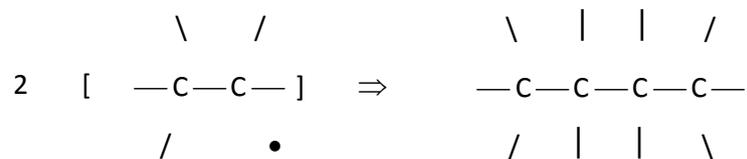
- Meccanismo di *idrogenolisi*, in cui il radicale alchilico lega a sé uno ione idrogeno:



- Meccanismo di *dialo-eliminazione*, che consiste nella rimozione di un secondo atomo di cloro dall'atomo di carbonio adiacente al carbonio radicale con formazione di un doppio legame tra i due atomi di carbonio:



- Meccanismo di *accoppiamento*, che consiste nella dimerizzazione dei radicali:



Quindi, in condizioni anaerobiche, i meccanismi di dechlorurazione riduttiva determinano la degradazione di un composto alifatico clorurato, sostituendo sequenzialmente ogni atomo di cloro presente nella molecola con un atomo di idrogeno.

La dechlorurazione anaerobica riduttiva della maggior parte dei solventi clorurati mediata da microrganismi avviene per via *cometabolica*, ossia il composto clorurato è casualmente degradato da un enzima o un cofattore prodotto durante il metabolismo di un altro composto. I microrganismi non traggono benefici energetici o di crescita dalla biodegradazione dei composti clorurati e, quindi, devono utilizzare per generare energia un altro composto come accettore di elettroni.

Oltre a una dechlorurazione riduttiva cometabolica, è stata individuata dalla ricerca effettuata negli ultimi anni una dechlorurazione riduttiva *diretta*. Infatti, si è osservato che alcuni ceppi batterici utilizzano il composto alifatico clorurato come accettore di elettroni nelle reazioni di ossidoriduzione per produrre energia. Quindi, la dechlorurazione riduttiva diretta in condizioni anaerobiche è una biodegradazione in cui dalla sostituzione di ogni atomo di cloro con un atomo di idrogeno i batteri ricavano energia e materiale di crescita. Il composto clorurato è l'accettore di elettroni, mentre l'idrogeno funge da diretto donatore di elettroni. L'idrogeno che viene utilizzato è generalmente fornito attraverso la fermentazione di substrati organici (quali lattato, butirato, metanolo, etanolo e benzoato), ad opera di microrganismi che sono diversi da quelli che degradano i composti alifatici clorurati.

Attraverso questo processo i composti molto clorurati (PCE e TCE) vengono degradati più rapidamente dei composti che sono già in parte ridotti (DCE e VC).

Il processo riduttivo diretto e il processo riduttivo cometabolico sono difficilmente distinguibili, perché entrambi necessitano di un substrato diverso dal composto clorurato: infatti, nella degradazione diretta bisogna fornire un substrato dalla cui fermentazione si ottenga l'idrogeno necessario alla riduzione; mentre in quella cometabolica si deve fornire un substrato di crescita il cui metabolismo venga mediato dallo stesso enzima che permette la degradazione del composto clorurato. In laboratorio è possibile stabilire se la riduzione avviene per via diretta o per via cometabolica, ma in impianti pilota o in applicazioni in campo non si è in grado di individuare quale dei due processi intervenga.

Si osservi che il processo di riduzione anaerobica diretta è molto più rapido che il processo di riduzione anaerobica cometabolica, perché nel caso diretto la degradazione del composto clorurato è necessaria per fornire energia e materiale di crescita a differenza del caso cometabolico in cui la degradazione avviene come conseguenza di un “legame casuale” tra il composto clorurato e un enzima prodotto per metabolizzare un altro substrato.

### **3.2 Biodegradazione aerobica cometabolica**

Molti composti alifatici clorurati vengono degradati cometabolicamente da microrganismi in condizioni aerobiche.

Nell'ossidazione aerobica cometabolica il composto clorurato viene “incidentalmente” ossidato da un enzima prodotto durante il metabolismo di un altro substrato. Infatti, i microrganismi ricavano energia e carbonio per la crescita dall'ossidazione di un substrato di crescita, condotta da un enzima monossigenasi che è anche in grado di catalizzare molte reazioni di ossidazione di composti clorurati.

In un'ossidazione catalizzata dall'enzima monossigenasi l'ossigeno funge da accettore di elettroni (si riduce), mentre il substrato di crescita o il composto clorurato sono donatori di elettroni (si ossidano). Per far avvenire il processo ossidativo sia del substrato di crescita che del substrato cometabolico serve NADH come fonte di energia riducente, che in entrambi i processi ossidativi si ossida dalla forma ridotta NADH alla forma ossidata  $\text{NAD}^+$ . Solo i prodotti derivanti dall'ossidazione del substrato di crescita consentono la rigenerazione dell'NADH. Quindi, il processo di riduzione che dalla forma ossidata  $\text{NAD}^+$  porta alla forma ridotta NADH si manifesta solo durante la trasformazione del substrato di crescita. Nell'ossidazione dei composti clorurati, non potendo l'NADH essere rigenerato, i microrganismi non ricavano energia e la degradazione può proseguire solo fino all'esaurimento delle scorte di energia riducente. Inoltre, i composti clorurati possono dare origine a prodotti intermedi molto tossici che determinano l'inattivazione dei microrganismi.

Una rappresentazione schematica per il processo di ossidazione del substrato di crescita mediato dall'enzima monossigenasi è fornita nella figura Fig.2;

mentre nella figura Fig.3 si riporta una rappresentazione schematica per il processo di ossidazione del substrato cometabolico mediato dall'enzima monossigenasi. Essendo lo stesso enzima responsabile dell'ossidazione sia del substrato di crescita che del cometabolita, si verifica un fenomeno di competizione inibitiva tra i due substrati.

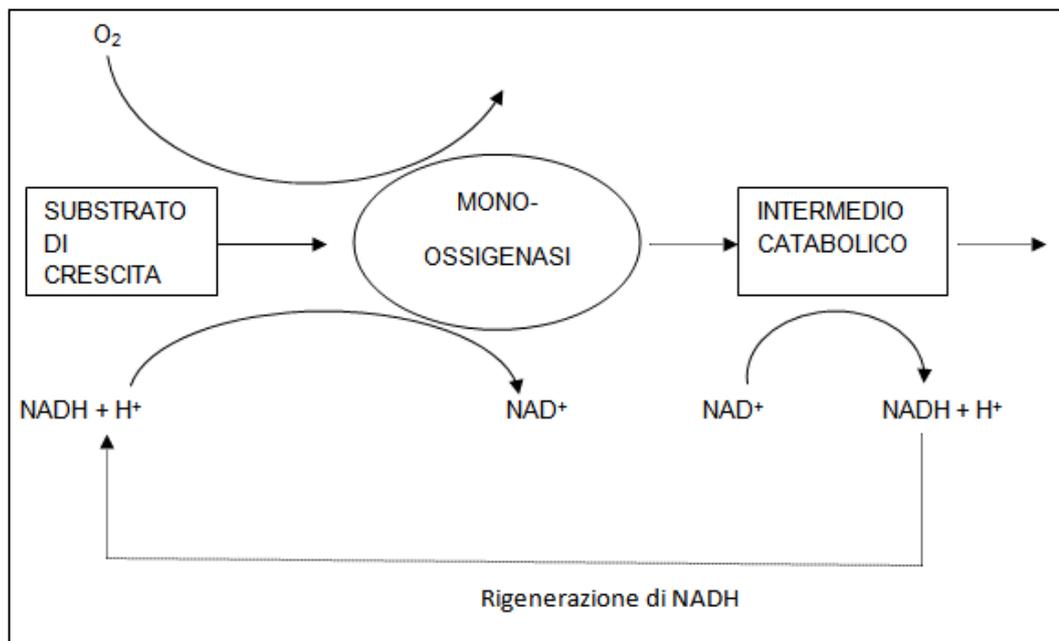


Fig.2 – Rappresentazione schematica dell'ossidazione del substrato di crescita mediata dall'enzima monossigenasi.

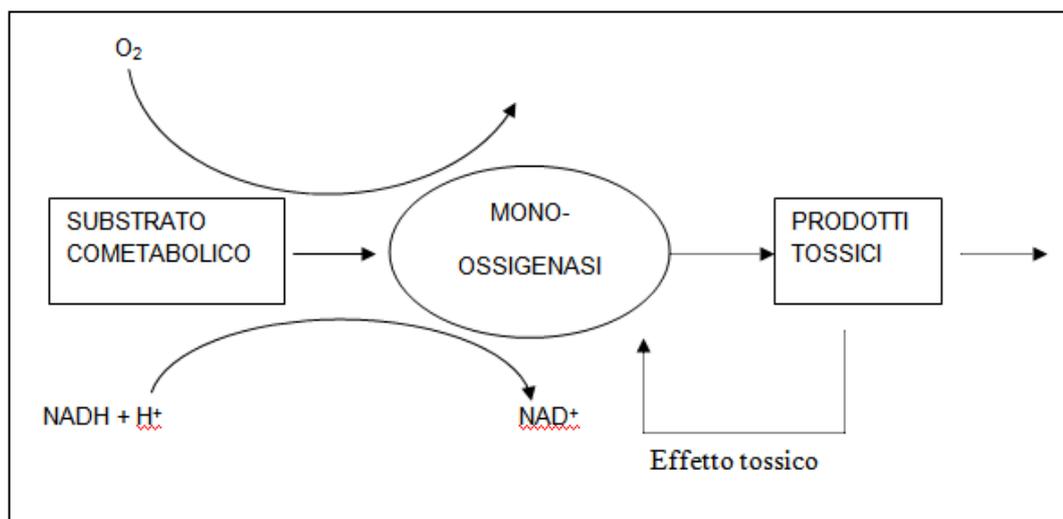


Fig.3 – Rappresentazione schematica dell'ossidazione del substrato cometabolico mediata dall'enzima monossigenasi.

Infatti, entrambi i substrati competono per legarsi allo stesso sito attivo presente sull'enzima monossigenasi, con il risultato che il substrato di crescita inibisce l'ossidazione del cometabolita e il cometabolita inibisce l'ossidazione del substrato di crescita. Ne consegue che è necessario fornire il substrato di crescita per avviare e sostenere il processo degradativo nel tempo, ma non deve essere alimentato in concentrazioni troppo elevate, perché altrimenti, a causa dell'inibizione competitiva, porta ad una minore velocità di degradazione del contaminante.

La scelta del substrato di crescita influisce sulla degradazione aerobica cometabolica del composto clorurato: è necessario, infatti, scegliere il substrato di crescita in modo che l'enzima prodotto durante il suo metabolismo presenti il sito attivo a cui è in grado di legarsi anche il composto clorurato. In letteratura si indica che i substrati saturi (alcani quali metano, propano e butano) in genere consentono di realizzare la degradazione cometabolica sia dei solventi clorurati saturi che di quelli insaturi, mentre i substrati aromatici (quali toluene e fenolo) consentono di realizzare la degradazione cometabolica solo dei solventi clorurati insaturi (i derivati dell'etilene).

## Capitolo 4 - TECNOLOGIE APPLICATE AL TRATTAMENTO DI *BIOREMEDIATION* IN SITU

Il trattamento in situ e' l'approccio preferibile per la bonifica di acquiferi e suoli contaminati, in quanto non richiede l'escavazione e la distruzione del materiale contaminato. Per ottenere la biodegradazione aerobica per via cometabolica di composti alifatici clorurati si prevede l'applicazione di opportune tecniche che favoriscano e accrescano i meccanismi di degradazione. Tali tecnologie includono la *bioaugmentation* e l'aggiunta nel suolo di nutrienti, di substrati donatori di elettroni (butano, toluene, propano, metano) e di substrati accettori di elettroni (ossigeno).

Il progetto del sistema di trattamento in situ viene fatto prevedendo l'applicazione delle tecniche indicate e include le seguenti configurazioni: iniezione diretta, ricircolazione dell'acqua di falda, installazione di barriere reattive permeabili (PRBs) e *bioventing*.

### 4.1 Tecniche di trattamento – parametri di processo

Le tecniche solitamente impiegate nel trattamento di *bioremediation* in situ servono ad avviare e a mantenere nel tempo il processo di degradazione dei composti clorurati mediato dai microrganismi presenti nel suolo. Di seguito si fornisce un elenco dei parametri fondamentali del processo per i quali si prevedono varianti:

- *aggiunta di nutrienti*

L'aggiunta di nutrienti consiste nell'alimentazione di sostanze necessarie alla crescita dei microrganismi, quali azoto e fosforo. L'introduzione dei nutrienti viene normalmente eseguita insieme all'alimentazione del substrato di crescita o dell'ossigeno, in modo che la bassa concentrazione di nutrienti non diventi un fattore limitante per la biodegradazione del contaminato.

- *aggiunta di donatori di elettroni (substrato di crescita)*

L'aggiunta di donatori di elettroni consiste nell'alimentazione di un substrato di crescita che funge da riducente nella reazione di ossidoriduzione utilizzata per produrre energia dai microrganismi in grado di degradare il composto clorurato.

Mediante tale operazione si fornisce ai microrganismi il substrato da cui ricavano energia e materiale per la crescita e dal cui metabolismo si produce l'enzima monossigenasi che catalizza anche la reazione di degradazione del solvente clorurato.

- aggiunta di accettori di elettroni (ossigeno)

Nei processi aerobici l'aggiunta di accettori di elettroni consiste nell'introduzione di ossigeno nella zona contaminata a cui si vuole applicare il trattamento di biodegradazione aerobica cometabolica. Si osservi che l'ossigeno presenta una solubilità in acqua molto bassa (8 mg/L nelle tipiche condizioni ambientali). Ne consegue che l'aggiunta di ossigeno deve essere eseguita in modo da evitare che la sua bassa concentrazione in acqua possa diventare un fattore limitante per la degradazione aerobica del contaminante.

- *bioaugmentation*

La tecnica di bioaugmentation consiste nell'introduzione di microrganismi in grado di effettuare la degradazione aerobica cometabolica del contaminante nel sottosuolo dove tali microrganismi sono deficienti. Tali microrganismi possono provenire dalle popolazioni batteriche presenti in sito e fatte sviluppare in un reattore biologico esterno oppure da ceppi coltivati di batteri noti per essere capaci di degradare il contaminante.

Questa tecnica, in genere, viene applicata in due situazioni: in primo luogo quando nel terreno del sito non sono presenti microrganismi che sono in grado di degradare il contaminante; in secondo luogo quando la quantità di microrganismi inizialmente presenti e efficaci nella degradazione è notevolmente diminuita a causa degli effetti di una prolungata attività di degradazione e degli effetti di tossicità dei prodotti di degradazione.

## 4.2 Configurazione dei sistemi di trattamento

Per condurre la biodegradazione cometabolica dei solventi clorurati in condizioni aerobiche è necessario introdurre nella zona contaminata il substrato di crescita, l'ossigeno e i nutrienti (eventualmente anche biomassa in grado di degradare il contaminante, qualora quella presente in sito non ne fosse capace). I sistemi di trattamento devono essere progettati in modo da permettere tali operazioni.

Alcuni possibili schemi di sistemi di trattamento sono riportati di seguito:

- *bioventing*

Il *bioventing* consiste nel processo di aerazione del suolo per stimolare l'attività biologica in sito e promuovere la biodegradazione. In questo processo, l'ossigeno è inviato nella zona insatura del suolo mediante ventilazione forzata dell'aria, in modo da aumentare le concentrazioni di ossigeno presente nel sottosuolo e ridurre il rischio che la mancanza di ossigeno diventi un agente limitante nella degradazione del contaminante. Considerata la volatilità non trascurabile di alcuni solventi clorurati, l'applicazione del *bioventing* deve essere accompagnata dall'aspirazione in superficie e dal successivo trattamento (adsorbimento su carbone attivo o combustione) dei gas che fuoriescono dal terreno.

- *sistemi a iniezione diretta*

L'introduzione nell'acquifero dei nutrienti, del substrato di crescita e dell'ossigeno avviene tramite iniezione in pozzi che collegano direttamente l'esterno con la zona nel sottosuolo contaminata. In questo sistema il flusso naturale della falda non viene impedito e viene monitorato per stabilire che la degradazione del contaminante e dei suoi prodotti di degradazione sia completata entro una distanza accettabile dalla sorgente di inquinamento.

- *ricircolazione dell'acqua di falda*

L'acqua di falda contaminata viene estratta dal sito mediante un opportuno sistema di pompaggio. In superficie viene condizionata mediante aggiunta di ossigeno, substrato di crescita ed eventuali nutrienti. Quindi, l'acqua condizionata viene riniettata nel sottosuolo.

Una possibile alternativa al condizionamento esterno dell'acqua di falda consiste nell'eseguire l'estrazione dell'acqua di falda e la successiva iniezione dell'acqua condizionata a differenti livelli dello stesso pozzo, in modo da ottenere una ricircolazione verticale dell'acqua direttamente nel sottosuolo.

- barriere reattive permeabili (PRBs)

Attraverso opportuni elementi verticali di contenimento il flusso dell'acqua contaminata viene incanalato verso una o più barriere permeabili, in cui viene creata una zona biologicamente attiva. Tuttavia, in questo modo viene trattata solo l'acqua di falda che attraversa la barriera.

### **4.3 Risultati della biodegradazione ottenuti su scala di laboratorio e problemi di scale up**

Per l'applicazione in campo di un qualsiasi processo di biodegradazione è di norma necessario effettuare alcuni test per la verifica della fattibilità del processo. Ciò è particolarmente vero nel caso di processi di biodegradazione cometabolica che, rispetto al processo diretto, presentano maggiore complessità, se non altro per il fatto di dovere scegliere ed utilizzare un idoneo substrato di crescita, il quale non deve persistere nell'ambiente ma deve essere completamente degradato, altrimenti si va ad aumentare lo stato di contaminazione del comparto ambientale, inoltre è necessario accertarsi della resa di abbattimento del composto organoclorurato. Tali verifiche di fattibilità riguardano vari aspetti alcuni dei quali possono essere affrontati efficacemente in laboratorio lavorando in apparati di piccola scala mentre per altri può essere richiesta la verifica in opportuni reattori pilota. I microcosmi slurry sono di norma più facili da gestire rispetto a quelli con fase solida fissa e, nonostante che le loro caratteristiche siano fisicamente molto diverse da quelle dell'acquifero, si prestano per valutare molti degli aspetti importanti ai fini della verifica della fattibilità del processo. Tali aspetti, per quanto riguarda il cometabolismo aerobico dei solventi clorurati, riguardano:

- la valutazione della potenzialità biodegradativa della biomassa presente nel sito e cioè la valutazione dei lag-times per l'inizio della degradazione del substrato e dell'inquinante, la valutazione delle rispettive velocità di

biodegradazione e la valutazione dei parametri di efficienza della biomassa sviluppatasi (capacità di trasformazione e resa di trasformazione);

- la valutazione di eventuali fenomeni di inibizione competitiva tra substrato di crescita e inquinanti;
- la valutazione del tipo e quantità di nutrienti necessari;
- la valutazione dell'efficacia di eventuali inoculi microbici;
- la verifica della completezza della mineralizzazione dei solventi clorurati.

Oltre a tali aspetti, per potere effettuare una progettazione razionale del trattamento a scala reale, può essere necessario valutarne altri quali:

- l'effettiva capacità di colonizzare la zona contaminata con biomassa specializzata,
- la possibilità di mantenere quest'ultima in condizioni di efficienza degradativa,
- le effettive velocità di biodegradazione ottenibili in campo,
- il rischio di intasamento dovuto a crescita eccessiva di biomassa, in particolar modo in prossimità della zona in cui il flusso di nutrienti è maggiore,
- la messa a punto di strategie di alimentazione del substrato, ossigeno e nutrienti al fine di controllare tale fenomeno etc.

Tali fenomeni sono in stretta relazione con la fluidodinamica del sistema quindi per la loro valutazione si richiede una sperimentazione in reattori pilota di laboratorio (nei quali saranno riprodotte condizioni fluidodinamiche simili a quelle esistenti o attuabili nell'acquifero da trattare) oppure in piloti allestiti direttamente in campo.

#### **4.4 Valutazione della potenzialità biodegradativa della biomassa presente nel sito**

Per la valutazione della potenzialità biodegradativa presente nel sito deve essere verificata la capacità di svilupparsi biomassa che cresca sul substrato fornito e accertata la sua potenzialità degradativa sui composti

clorurati che interessano. La sperimentazione può essere condotta in vari modi in funzione degli obiettivi specifici della ricerca, dal punto di vista applicativo le condizioni sperimentali più rappresentative sono ottenute allestendo microcosmi con materiale dell'acquifero contaminato da trattare. A volte, poiché può non essere agevole conservare a lungo l'acqua dell'acquifero di interesse preservandone tutte le caratteristiche, può essere più opportuno utilizzare soluzioni acquose preparate in laboratorio con caratteristiche simili a quella dell'acquifero contaminato o aggiungere pulsioni delle varie sostanze inquinanti direttamente nei microcosmi.

Per i parametri interessanti da determinare in tale sperimentazione si evidenziano:

- il *lag-time* per l'inizio della degradazione del substrato di crescita;
- il *lag-time* per l'inizio della degradazione del composto clorurato che interessa;
- la velocità di consumo del substrato e del composto clorurato;
- la valutazione dei parametri di efficienza della biomassa sviluppata (capacità di trasformazione e resa di trasformazione).

Il *lag-time* per l'inizio di un processo di biodegradazione rappresenta il tempo necessario alla biomassa presente per sviluppare il patrimonio enzimatico per attuare la degradazione della sostanza che interessa. Di norma, dal momento della immissione del substrato di crescita in un microcosmo, contenente il materiale dell'acquifero contaminato, si verificano due *lag-times*: si ha un ritardo nell'inizio della degradazione del substrato di crescita, e un ulteriore ritardo (misurato generalmente a partire dall'inizio della degradazione del substrato di crescita) prima che la biomassa formata possa iniziare la degradazione dell'idrocarburo clorurato. La conoscenza dei *lag-times* è di fondamentale importanza per la progettazione del trattamento in-situ, in particolare durante lo start-up del processo si dovrà cercare di limitare i quantitativi di substrato di crescita somministrati poiché fino a quando non inizierà la sua degradazione questo si diffonderà nella falda. I tempi di ritardo sono caratteristici dei sistemi (acquifero-substrato-inquinanti) ed in particolare dipendono dalle precedenti esposizioni della biomassa presente nell'acquifero alle sostanze inquinanti. Tali

tempi non sono prevedibili a priori quindi l'unico modo di ottenere queste informazioni è l'indagine sperimentale sul sistema che interessa.

Per quanto riguarda le velocità di consumo di substrato e inquinante è da notare che i valori ottenuti in microcosmi slurry sono fortemente dipendenti dalle caratteristiche del sistema e possono rappresentare solo indicativamente quelle ottenibili nel processo *in-situ*; queste rimangono comunque parametri importanti per confrontare tra loro microcosmi dello stesso tipo ma operanti in condizioni diverse. Ai fini della progettazione dell'impianto di trattamento è quindi importante conoscere i parametri di efficienza della biomassa e cioè la quantità di inquinante degradato per unità di biomassa e la quantità di biomassa formata per unità di substrato consumato.

La capacità di trasformazione (quantità di inquinante degradato per unità di biomassa), viene solitamente valutata aggiungendo il composto clorurato in un sistema con quantità nota di biomassa e misurando quanto idrocarburo clorurato viene degradato fino alla completa inattivazione della biomassa.

#### **4.5 Fenomeni di inibizione competitiva tra substrato di crescita e inquinante e inibizione dovuta ad alta concentrazione dell'inquinante**

La competizione fra substrato e inquinanti può essere studiata efficacemente nei microcosmi slurry verificando se le velocità di degradazione dell'inquinante sono o meno influenzate dalla presenza contemporanea del substrato di crescita. Se si dovessero verificare importanti fenomeni di competizione dovrebbero essere messe a punto opportune strategie di alimentazione del substrato (alimentazione pulsata o a concentrazione sufficientemente bassa). Per quanto riguarda il sistema cloroformio-butano non sono state osservate, almeno fino a concentrazioni dell'ordine di un milligrammo per litro (sia per il cloroformio che per il butano) diminuzioni delle velocità di degradazione tali da costituire problemi in eventuali applicazioni.

Oltre alla inibizione competitiva sarebbe anche da considerare l'inibizione nella degradazione dell'inquinante dovuta ad elevata concentrazione dell'inquinante

stesso. Tali valutazioni, sempre effettuabili efficacemente in microcosmi, potrebbero essere necessarie qualora si intenda intervenire nelle zone della sorgente della contaminazione dove, in aree ristrette in prossimità della fase organica libera (DNAPL), le concentrazioni potrebbero essere molto elevate essendo relativamente alte le solubilità in acqua di questi composti. Per quanto riguarda la degradazione cometabolica del cloroformio utilizzando butano non sono stati rilevati fenomeni di inibizione fino a concentrazioni dell'ordine di 10 mg/l.

#### **4.6 Valutazione del tipo e quantità di nutrienti necessari**

Nei terreni, di norma sono presenti tutti i micronutrienti necessari allo sviluppo della biomassa mentre si possono riscontrare carenze di azoto e, più raramente, di fosforo. Tali necessità possono essere valutate da una sperimentazione condotta in microcosmi. I consumi dei nutrienti, come quello dell'ossigeno, sono strettamente correlati alla quantità di substrato di crescita che viene metabolizzato quindi la loro somministrazione dovrà essere effettuata sulla base della quantità di substrato di crescita fornito (che, a sua volta dipende dalla quantità di inquinante da degradare). Per il consumo di azoto e fosforo, in mancanza di indicazioni più precise (derivanti da una specifica sperimentazione) si può fare riferimento ai rapporti C:N:P = 100:10:1 considerando come carbonio quello fornito come substrato di crescita. Per quanto riguarda l'ossigeno le quantità necessarie sono generalmente un po' inferiori a quelle valutabili dalla ossidazione completa del substrato (circa 3 kg di O<sub>2</sub> per kg di butano).

#### **4.7 Completezza della mineralizzazione dei solventi clorurati**

La tossicità e la potenziale cancerogenicità di alcuni dei prodotti delle reazioni di trasformazione (ossidazione e riduzione) dei solventi clorurati richiedono di porre particolare attenzione al monitoraggio dei prodotti che si formano durante un trattamento di *bioremediation* di un sito contaminato da solventi clorurati. Tuttavia nel caso dei processi aerobici il problema della

formazione dei metaboliti tossici non appare essere rilevante in quanto i composti con minore grado di clorurazione che si formano sono, in condizioni aerobiche, a loro volta degradati, inoltre, altri prodotti altamente pericolosi che possono formarsi (ad esempio, gli epossidi nella biodegradazione dei composti derivati dall'etilene, o il fosgene nella biodegradazione del cloroformio) risultano in molti casi difficili da identificare e misurare in quanto essendo altamente reattivi si decompongono rapidamente o si legano irreversibilmente alle proteine cellulari, ostacolandone tra l'altro lo svolgimento di specifiche funzioni cellulari. Diverso è il caso dei processi di riduzione dei solventi clorurati mediati da batteri anaerobici nei quali si ha la progressiva declorazione della molecola di partenza fino ad arrivare, teoricamente, all'idrocarburo non clorurato di origine (metano, etano, o etilene). In questi casi, essendo in genere le reazioni di declorazione riduttiva meno facili nei composti basso clorurati rispetto a quelli alto clorurati, esiste un significativo rischio che i processi di trattamento anaerobici determinino la formazione di significative quantità di solventi basso-clorurati, in alcuni casi altamente tossici (ad esempio il cloruro di vinile se il contaminante di partenza è un derivato dell'etilene).

L'obiettivo di un trattamento di *bioremediation* di un sito contaminato da solventi clorurati dovrebbe essere la *completa mineralizzazione* degli inquinanti, vale a dire la loro completa trasformazione a CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O e ione cloruro. Un metodo frequentemente adottato per avere un'indicazione sulla mineralizzazione dell'inquinante è quello di quantificare la mineralizzazione del cloro organico. Ciò può essere fatto monitorando la concentrazione dello ione cloruro presente nell'acqua e verificare se l'incremento corrisponde a quanto si otterrebbe dalla trasformazione dell'idrocarburo clorurato. Tale metodo comunque non assicura la completa mineralizzazione degli inquinanti, inoltre i valori della sensibilità della misura dello ione cloruro nella soluzione non consentono di poter escludere la presenza di metaboliti clorurati in bassa concentrazione.

## **4.8 Valutazione dell'efficacia di eventuali inoculi microbici**

Talvolta si può verificare che la potenzialità biodegradativa della biomassa indigena presente nel sito non sia adeguata per la biodegradazione degli inquinanti. Per esempio, nei casi in cui la biomassa presente nel sito non è stata a contatto con gli inquinanti per un periodo di tempo sufficiente, si possono riscontrare tempi di ritardo molto lunghi prima dell'inizio della degradazione dell'inquinante (in un test effettuato su materiale di un acquifero non esposto all'inquinante, la degradazione del cloroformio non è iniziata neppure dopo 70 giorni nonostante si sia sviluppata biomassa in grado di metabolizzare butano). In situazioni di questo tipo il processo può essere efficacemente attivato ricorrendo alla introduzione di inoculi microbici attivi nella degradazione dell'inquinante. Tali inoculi possono essere preparati in laboratorio anche a partire dal materiale dello stesso acquifero che si intende trattare e il loro utilizzo potrebbe diminuire di molto i tempi operativi sul campo.

## **4.9 Sperimentazioni in reattori pilota e problemi di scale up**

L'applicazione della tecnica di biodegradazione cometabolica aerobica è possibile mediante vari tipi di processi sia *on-site* (realizzando impianti biologici di trattamento delle acque estratte dal sito) che *in-situ* (dove la zona reattiva viene realizzata direttamente nell'acquifero contaminato).

Ovviamente le condizioni del processo a scala reale sono molto diverse da quelle usualmente adottate nelle sperimentazioni in microcosmi, basti pensare che frequentemente la sperimentazione in microcosmi viene effettuata in condizioni slurry e che, comunque, anche quando questa viene effettuata in sistemi a fase solida fissa gli apparati di piccola scala sono di norma gestiti in condizioni batch o semibatch.

Date le condizioni operative necessariamente differenti da quelle attuabili in campo, l'utilizzo dei risultati della sperimentazione in microcosmi impone alcune cautele e, mentre alcuni parametri possono essere studiati efficacemente e con

un ridotto impiego di risorse nei microcosmi, per altri i risultati ottenuti sono da ritenere del tutto indicativi. Per questo motivo, dopo la sperimentazione in microcosmi, nella quale saranno individuate le condizioni migliori per ottenere lo sviluppo della biomassa attiva nella degradazione degli inquinanti di interesse, di solito si richiede di effettuare una sperimentazione in reattore pilota in laboratorio o direttamente in campo.

La sperimentazione in reattori pilota di laboratorio è senz'altro più agevole e rapida da condurre rispetto ai test pilota in campo. Nei reattori di laboratorio, usualmente reattori a colonna in cui si riproducono, per quanto possibile, le condizioni di una porzione dell'acquifero da trattare, i parametri di processo sono più facilmente controllabili ed è più semplice e meno dispendiosa l'interpretazione dei risultati ottenuti. D'altro canto la sperimentazione in reattori pilota di laboratorio presenta due tipi di problemi, uno legato alle eterogeneità spaziali presenti nell'acquifero, che potrebbero imporre di effettuare più test utilizzando le diverse tipologie di materiali presenti, e l'altro legato alle difficoltà di riprodurre in modo significativo la zona dell'acquifero in cui è stato prelevato il campione. A questo riguardo è infatti da considerare che di solito la "ricostruzione" della porzione di acquifero viene effettuata in laboratorio con il materiale rimaneggiato (date anche le difficoltà di effettuare campionamenti di materiale indisturbato negli acquiferi). Nonostante tali problemi questo tipo di sperimentazione può fornire utili indicazioni su importanti parametri del processo, quali la velocità di consumo di substrato e inquinanti e l'estensione della zona colonizzata dalla biomassa attiva. Possono inoltre essere valutati diversi regimi di alimentazione del substrato e dell'ossigeno ai fini di ridurre i fenomeni di intasamento delle porosità dell'acquifero dovuti a crescita eccessiva di biomassa in prossimità del punto di iniezione.

Un approccio alternativo consiste, dopo la conduzione delle prove nei microcosmi (nei quali è stato stabilito il substrato ottimale, quantità e tipo di nutrienti etc.), nella conduzione dei test pilota direttamente in campo. Tale approccio, anche se può essere ritenuto preferibile poiché dà una diretta indicazione dell'efficacia della tecnologia su una porzione dell'acquifero, presenta anch'esso alcuni aspetti delicati che riguardano proprio la valutazione dell'efficacia della tecnologia. Tale valutazione infatti richiede una approfondita caratterizzazione della porzione di acquifero da trattare e la valutazione della

diminuzione della concentrazione dei contaminanti in un adeguato numero di pozzi di monitoraggio al fine di poter effettuare, se pure in modo approssimato, dei bilanci di materia sui contaminanti. Inoltre per dimostrare che il fenomeno riscontrato è dovuto effettivamente al cometabolismo aerobico dovrebbe essere verificata l'esistenza di una correlazione fra l'abbattimento del contaminante e quello del substrato (US EPA, 2000).

#### **4.10 Implementazione a scala reale**

L'obiettivo dei test pilota (in laboratorio e/o in campo) e quello di ottenere tutte le informazioni necessarie alla progettazione del sistema di trattamento a scala reale. Se si sceglie di seguire l'approccio della conduzione di test pilota di laboratorio, in questi saranno determinati i parametri di processo per zone rappresentative dell'acquifero quindi nella progettazione del sistema a scala reale si dovrà fare in modo da realizzare in campo, mediante una opportuna disposizione di pozzi di ricircolo o sistemi di iniezione o allestimento di barriere reattive, condizioni simili a quelle già verificate in laboratorio assicurando anche una idonea captazione del plume della contaminazione. Tale metodo, di tipo "pratico", può essere integrato effettuando una modellazione del sistema a scala reale; il modello consentirebbe di prevedere in modo quantitativo le prestazioni della tecnologia da attuare in campo. Purtroppo però la realizzazione di modelli previsionali di tali processi si presenta assai difficoltosa in quanto, oltre alle problematiche tipiche che riguardano gli aspetti fluidodinamici ed in particolare la disponibilità di una adeguata caratterizzazione idrogeologica dell'acquifero, è particolarmente difficile la modellazione della cinetica del processo. In definitiva i modelli che possono essere elaborati sono, allo stato attuale delle conoscenze, modelli di tipo interpretativo dei risultati ottenuti e la loro estrapolazione ad altre situazioni appare di scarsa affidabilità. Seguendo invece l'approccio della realizzazione di test pilota in campo (dopo la sperimentazione in microcosmi), l'implementazione del sistema di trattamento a scala reale può essere relativamente semplice se risulta fattibile e idonea una "duplicazione" del sistema utilizzato per il test pilota. Se invece nel processo a scala reale si dovrà ricorrere a sistemi diversi (diverse spazature e portate dei

pozzi, schemi di flusso diversi etc.) o si è in presenza di significative eterogeneità, la previsione delle prestazioni può risultare più difficile rispetto al caso in cui sia stata realizzata una sperimentazione in reattori pilota di laboratorio. Infatti dai reattori pilota di laboratorio possono essere ottenute più facilmente informazioni sull'efficacia del processo in varie condizioni operative e su varie tipologie di materiali rispetto alla sperimentazione effettuata mediante test pilota in campo.

## Capitolo 5 - IL MODELLO FLUIDODINAMICO E CINETICO

Avere a disposizione un soddisfacente modello del comportamento fluidodinamico del sistema a flusso e' di fondamentale importanza al fine di poter interpretare ed analizzare i risultati delle successive prove di consumo del substrato primario e di biodegradazione dei solventi clorurati.

### 5.1 Trasporto di soluti in un mezzo poroso

La falda acquifera che si vuole studiare e' rappresentabile come un mezzo poroso saturo, in cui si muove un fluido (l'acqua) con moto che possiamo considerare laminare.

In tali condizioni vale la legge di Darcy, secondo cui:

$$u = k_c \frac{\Delta h}{\Delta l} = \frac{Q}{A} \quad 5.1$$

dove  $u$  e' la velocita' superficiale del fluido [m/s],  $k_c$  la conducibilita' del terreno

[m/s],  $\frac{\Delta h}{\Delta l}$  il rapporto tra le perdite di carico e la lunghezza del tratto in esame,

$Q$  la portata volumetrica del fluido [m<sup>3</sup>/s] e  $A$  la sezione di passaggio [m<sup>2</sup>].

Inoltre la velocita' superficiale non e' quella reale, poiche' occorre considerare l'effettiva sezione di passaggio che deve tener conto della porosita' del mezzo, secondo la relazione:

$$v = \frac{Q}{(\phi_e \cdot A)} = \frac{u}{\phi_e} \quad 5.2$$

con  $v$  velocita' interstiziale [m/s] e  $\phi_e$  porosita' efficace del mezzo poroso.

#### 5.1.1 Trasporto di materia

Il *contaminante* e' una sostanza disciolta in fase liquida che si muove in un mezzo poroso; essendo soggetto a diversi fenomeni, qui di seguito descritti.

### 1. Trasporto convettivo

Il trasporto convettivo avviene con la velocità del fluido e dipende dalla concentrazione locale del soluto in fase liquida  $C_i$  [mol/m<sup>3</sup>], vale quindi la relazione:

$$F = u \cdot C_i \quad 5.3$$

in cui  $F$  è il flusso convettivo specifico del componente  $i$  [mol/m<sup>2</sup>/s] e  $u$  la velocità superficiale del fluido [m/s].

### 2. Diffusione molecolare

Il meccanismo di diffusione molecolare risente del gradiente di concentrazione lungo lo spazio, quindi è presente anche se il fluido è in quiete. Applicando la 1<sup>a</sup> legge di Fick su una generica direzione  $k$  otteniamo un'espressione per il flusso diffusivo  $F_{ik}$  [mol/m<sup>2</sup>/s]:

$$F_{ik} = -D \cdot \frac{\partial C_i}{\partial x_k} \quad 5.4$$

dove  $D$  è il coefficiente di diffusione (o diffusività) del componente  $A_i$  nel fluido [m<sup>2</sup>/s]. In realtà considerando un mezzo poroso ( $pm$ ), bisogna tener conto che la diffusione è rallentata dalle tortuosità dei percorsi seguiti dalle molecole nel fluido, si arriva così alla relazione:

$$F_{ik} = -D_{pm} \cdot \frac{\partial C_i}{\partial x_k} \quad \text{con} \quad D_{pm} = \omega \cdot D \quad 5.5$$

Il fattore  $w$  rappresenta proprio un coefficiente di tortuosità variabile fra 0,01 e 0,5 a seconda delle caratteristiche del mezzo poroso.

### 3. Dispersione meccanica

Il terzo meccanismo di trasporto di materia è la dispersione meccanica, che è una miscelazione del soluto dovuta alla disomogeneità del mezzo in cui scorre il fluido; a causa di questa non tutte le particelle si muovono con la velocità media del fluido: alcune vengono a trovarsi in anticipo o in ritardo mentre altre sono deviate in direzione trasversale rispetto al moto principale. La dispersione meccanica tiene conto del fatto che il fluido si muove in un mezzo poroso, dove inevitabilmente si vengono a creare delle corsie preferenziali di passaggio. Lo si può quindi immaginare come un insieme di *pistoncini di fluido* che si muovono con fronti differenti.

L'effetto complessivo della dispersione meccanica e della diffusione molecolare, ambedue fenomeni diffusivi, viene descritto da un relazione tipo Fick. Lungo la direzione principale del flusso la diffusività è sostituita da un coefficiente  $D_L$  [m<sup>2</sup>/s] (detto di *diffusione idrodinamica* o *dispersione longitudinale*) che tiene conto di entrambi i meccanismi:

$$F_L = -D_L \cdot \frac{\partial C_i}{\partial x_L} \quad \text{con} \quad D_L = D_{pm} + \alpha_L \cdot v \quad 5.6$$

dove  $D_{pm}$  è la diffusività del composto nel mezzo poroso [m<sup>2</sup>/s],  $\alpha_L$  la dispersività longitudinale [m] e  $v$  la velocità interstiziale del soluto [m/s]. lungo una qualunque direzione perpendicolare a quella principale, invece, si definisce la dispersività trasversale  $\alpha_T$  [m], ottenendo la relazione:

$$F_T = -D_T \cdot \frac{\partial C_i}{\partial x_T} \quad \text{con} \quad D_T = D_{pm} + \alpha_T \cdot v \quad 5.7$$

In base alle relazioni precedenti si applica un bilancio di materia per il soluto  $A_i$  riferito ad un elemento di volume, ottenendo la seguente equazione differenziale alle derivate parziali:

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} = -v_x \cdot \frac{\partial C_i}{\partial x} + D_L \cdot \frac{\partial^2 C_i}{\partial x^2} + D_T \cdot \left( \frac{\partial^2 C_i}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 C_i}{\partial z^2} \right) \quad 5.8$$

valida nelle ipotesi seguenti:

- coefficienti di diffusione idrodinamica costanti;
- velocità interstiziale costante;
- direzione principale del moto coincidente con l'asse x;
- assenza del fenomeno di *adsorbimento* del soluto sulle particelle del mezzo,  
legato al trasferimento di materia dalla fase liquida a quella solida rappresentata dalle particelle del terreno, che determinerebbero un ulteriore termine di accumulo;
- assenza di *reazioni chimiche* o *biologiche*, le quali porterebbero ad una variazione ulteriore della concentrazione del soluto nel tempo.

Nel caso di trasporto unidimensionale nella direzione x, cioè quando siano nulle o trascurabili le variazioni della concentrazione del soluto nelle direzioni y e z, la 5.8 si riduce all'equazione:

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} = -v_x \cdot \frac{\partial C_i}{\partial x} + D_L \cdot \frac{\partial^2 C_i}{\partial x^2} \quad 5.9$$

detta anche equazione del flusso a pistone con dispersione assiale.

### 5.1.2 Il fenomeno dell'assorbimento – Il fattore di ritardo

Finora si è considerato il contaminante come una sostanza disciolta che si muove nella falda insieme al fluido. Tuttavia esso è soggetto a fenomeni di adsorbimento, per cui, in condizioni di equilibrio, si ripartisce tra fase solida e fase liquida secondo diversi modelli, noti come isoterme di adsorbimento. Come

risultato del processo di adsorbimento, alcuni soluti si muovono più lentamente dell'acqua che li trasporta.

Si consideri una sezione di terreno in cui valgono le seguenti ipotesi:

- flusso a pistone lungo  $x$ , per cui non valgono i fenomeni dispersivi prima descritti;
- assenza di fase oleosa;
- adsorbimento lineare, da cui deriva la relazione di equilibrio:

$$C_{i,s} = k_{di}^a \cdot C_i \quad \text{con} \quad k_{di}^a = k_d \cdot \rho_{as} \quad 5.10$$

Dove  $C_{i,s}$  e  $C_i$  sono le concentrazioni all'equilibrio di  $A_i$  rispettivamente nel solido e nel liquido,  $k_d$  e  $k_{di}^a$  coefficiente di adsorbimento dimensionale e adimensionale e  $\rho_{as}$  la densità apparente del terreno.

Applicando un bilancio di materia per il contaminante fra le sezioni  $x+\Delta x$ , dove  $x$  è la direzione del flusso, si ottiene:

$$C_{i,terr}^V \cdot A \cdot \Delta x \Big|_{t+\Delta t} - C_{i,terr}^V \cdot A \cdot \Delta x \Big|_t = v_x \cdot C_i \cdot A \cdot \phi_e \cdot \Delta t \Big|_x - v_x \cdot C_i \cdot A \cdot \phi_e \cdot \Delta t \Big|_{x+\Delta x}$$

da cui si ricava:

$$\frac{\partial C_{i,terr}^V}{\partial t} = -v_x \cdot \phi_e \frac{\partial C_i}{\partial x} \quad 5.11$$

Essendo nelle ipotesi di adsorbimento lineare si applica la relazione 4.10 alla precedente e considerando che la concentrazione di contaminante nel terreno è data da quella nella fase solida e quella nella fase liquida (non essendoci fasi oleose) si ottiene:

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} = -\frac{v_x \cdot \phi_e}{k_{di}^a + \phi_e} \frac{\partial C_i}{\partial x} \quad 5.12$$

Il termine  $\frac{v_x \cdot \phi_e}{k_{di}^a + \phi_e}$  rappresenta la velocità con cui si muove il contaminante  $v_i$ , si

può così ricavare un fattore correttivo rispetto alla velocità interstiziale propria del fluido  $v$ , definito *fattore di ritardo*  $\bar{\delta}_i$ :

$$\delta_i = \frac{v_x}{v_{cont}} = 1 + \frac{k_{di} \cdot \rho_{as}}{\phi_e} \quad 5.13$$

In definitiva, considerando i fenomeni di dispersione, convezione e adsorbimento il bilancio di materia per il contaminante, lungo la direzione del flusso  $x$  diventa:

$$\delta_i \cdot \frac{\partial C_i}{\partial t} = -v_x \cdot \frac{\partial C_i}{\partial x} + D_L \cdot \frac{\partial^2 C_i}{\partial x^2} \quad 5.14$$

### 5.1.3 Reazioni chimiche biologiche

Nello studio del trasporto di soluti nel mezzo poroso occorre considerare, oltre a quanto visto finora, gli effetti di eventuali reazioni chimiche e biologiche, le quali determinano una variazione della concentrazione del soluto, senza condizionarne il moto. Si viene così a definire un ulteriore termine di accumulo, che verrà esplicitato, per il caso in esame, nel paragrafo 5.2.

Le reazioni chimiche possono essere classificate in diverse classi: la prima distinzione è tra le reazioni *sufficientemente veloci* (reversibili) relativamente al flusso del terreno e quelle *insufficientemente veloci* (irreversibili). Nelle prime si può assumere che il soluto sia localmente all'equilibrio con ciò che lo circonda, al contrario di quelle irreversibili. Il secondo livello di distinzione considera le fasi in gioco: si possono avere reazioni *omogenee* (in cui è coinvolta una sola fase) e reazioni *eterogenee* (in cui sono coinvolte più fasi).

In conclusione, si può ricavare un bilancio di materia definitivo per un generico contaminante che si muove in una falda acquifera:

$$\delta_i \frac{\partial C_i}{\partial t} = -v_x \cdot \frac{\partial C_i}{\partial x} + D_L \cdot \frac{\partial^2 C_i}{\partial x^2} + R_i \quad 5.15$$

dove il primo termine del secondo membro rappresenta la convezione del soluto, il secondo la dispersione, il terzo termine il trasferimento di soluto dalla fase liquida alla fase solida del terreno per adsorbimento e l'ultimo termine

indica in termini generali la variazione di concentrazione del soluto dovuta a reazioni chimiche o biologiche.

## 5.2 Il modello cinetico

Il modello cinetico serve a comprendere come variano le velocità di reazione in funzione delle concentrazioni dei componenti in gioco. Come ampiamente descritto nel capitolo 3, il cloroformio può essere degradato in condizioni aerobiche sfruttando un processo cometabolico. È stato quindi scelto il butano come substrato di crescita primario, poiché diversi studi in microcosmi hanno confermato l'attività di degradazione di ceppi batterici butano-utilizzatori verso il cloroformio.

Il modello utilizzato parte da una cinetica tipo Monod per il caso di un singolo substrato cometabolico, in cui vengono considerati i fenomeni di inibizione competitiva fra butano e cloroformio, la limitazione legata alla presenza di particolari sostanze riducenti chiamate cofattori (NADH, NADPH, etc.) e l'effetto tossico dei prodotti di biodegradazione del cloroformio nei confronti della biomassa. Qui di seguito verrà descritto come questi fenomeni intervengono a modificare l'espressione della velocità di reazione dei diversi composti coinvolti nel processo biodegradativo.

### 5.2.1 Velocità di reazione del substrato di crescita primario e del substrato cometabolico

Il modello comunemente utilizzato per descrivere i processi di degradazione cometabolica deriva, originariamente, dalla cinetica enzimatica proposta da Michaelis-Menten; le equazioni di partenza sono:

$$R_S = -\frac{q_{\max,S} \cdot S}{K_{sS} + S} \cdot X \quad \text{e} \quad R_C = -\frac{q_{\max,C} \cdot C}{K_{sC} \cdot C} \cdot X \quad 5.16$$

dove  $R_S$  e  $R_C$  sono le velocità di reazione, rispettivamente, del substrato di crescita primario (butano) e di quello cometabolico (cloroformio);  $q_{\max S}$  e  $q_{\max C}$

le massime velocità specifiche di consumo del butano e del cloroformio [s<sup>-1</sup>],  $K_{sS}$  e  $K_{sC}$  le costanti di affinità [mol/m<sup>3</sup>],  $S$  e  $C$  le concentrazioni dei componenti in acqua [mg/l] e  $X$  è la concentrazione di biomassa in acqua [kg<sub>prot</sub>/m<sup>3</sup>]. Tuttavia i fenomeni che possono intervenire in tali reazioni sono numerosi e determinano una variazione delle espressioni 5.16. Qui di seguito verranno passati in rassegna i fenomeni coinvolti nella biodegradazione aerobica cometabolica del cloroformio, oggetto del presente studio.

### 1. Inibizione competitiva

Le reazioni di ossidazione, che sono alla base dei processi di biodegradazione cometabolica aerobica dei solventi clorurati alifatici, si realizzano grazie all'azione di particolari enzimi, in questo caso gli enzimi monossigenasi, i quali fungono da catalizzatori delle reazioni. La reazione si realizza su particolari siti attivi dell'enzima, ai quali il substrato primario e quello cometabolico si legano. Dal momento che i siti attivi degli enzimi possono reagire con un numero elevato di substrati, quando sono presenti più substrati di crescita si possono creare dei fenomeni competitivi, poiché i substrati presenti competono per legarsi allo stesso sito attivo. Questa situazione si traduce in una apparente diminuzione dell'affinità dell'enzima verso i diversi substrati, osservabile dalla diminuzione delle velocità di trasformazione di ogni substrato. Il fenomeno appena descritto prende il nome di *inibizione competitiva*.

Nell'espressione della velocità di reazione, questo effetto si traduce in un termine ulteriore, funzione della concentrazione del substrato inibitore e di un coefficiente misurato sperimentalmente ( $K_{iC}$  e  $K_{iS}$ ), ottenendo le seguenti espressioni:

$$R_S = - \frac{q_{\max,S} \cdot S}{K_{sS} \cdot \left(1 + \frac{C}{K_{iC}}\right) + S} \cdot X \quad \text{e} \quad R_C = - \frac{q_{\max,C} \cdot C}{K_{sC} \cdot \left(1 + \frac{S}{K_{iS}}\right) + C} \cdot X \quad 5.17$$

dove  $K_{iC}$  è il coefficiente di inibizione del cloroformio sul butano e  $K_{iS}$  il coefficiente di inibizione del butano sul cloroformio [mg/l].

## 2. Il consumo dei riduttori

I processi degradativi possono arrestarsi a causa dell'esaurimento di particolari sostanze riducenti chiamate cofattori (NADH, NADPH, etc.), che sono essenziali per il metabolismo cellulare e la biodegradazione ossidativa dell'inquinante clorurato. Nei normali processi di degradazione i cofattori sono rigenerati grazie ai prodotti intermedi delle reazioni di ossidazione del substrato primario. Nei processi cometabolici che intervengono nella riduzione dei composti clorurati, invece, non avviene la rigenerazione. Ne consegue che, in assenza di substrato primario, dopo un certo tempo di esposizione al solo solvente clorurato, il processo degradativo finisce per arrestarsi, a causa dell'esaurimento delle scorte di cofattori.

Per esprimere l'effetto che la carenza di cofattori può avere sulla velocità di degradazione del substrato primario e quello cometabolico, è stato introdotto un termine tipo Monod nell'espressioni 5.17, in accordo con il modello proposto da Chang e Alvarez-Cohen (Chang e Alvarez-Cohen, 1995). In genere questo

termine è esprimibile nella forma  $\frac{R}{(K_R + R)}$  : dove  $R$  rappresenta la disponibilità di cofattori (espressa come concentrazione di elettroni equivalente [mmol e<sup>-</sup>/l]) e  $K_R$  la costante di affinità dell'energia riducente. La disponibilità dei cofattori è funzione della concentrazione di ossigeno necessario alla degradazione del substrato primario e quindi al processo che porta alla rigenerazione dei cofattori. Tuttavia l'ossigeno subisce variazioni anche legate alla riduzione del cloroformio. È ovvio che, finché ci sarà ossigeno, si degraderà il butano, e quindi la rigenerazione dei NADH sarà assicurata dai prodotti intermedi di tale processo, parallelamente, però, la concentrazione di ossigeno diminuirà anche a causa della reazione di degradazione del cloroformio.

Le velocità vengono così ad essere modificate nel seguente modo:

$$R_S = - \frac{q_{\max,S} \cdot S}{K_{sS} \cdot \left(1 + \frac{C}{K_{iC}}\right) + S} \cdot X \cdot \frac{O}{K_{so,S} + O} \quad 5.18$$

$$R_C = - \frac{q_{\max,C} \cdot C}{K_{sC} \cdot \left(1 + \frac{S}{K_{iS}}\right) + C} \cdot X \cdot \frac{O}{K_{so,C} + O} \quad 5.19$$

dove  $K_{so,S}$  è la costante di affinità dell'ossigeno per il substrato primario e  $K_{so,C}$  la costante di affinità dell'ossigeno per il substrato cometabolico [mg/l].

### 5.2.2 Velocità di reazione dell'ossigeno

Nel reattore a colonna l'ossigeno è coinvolto in due tipologie di processi: le reazioni biotiche e quelle abiotiche.

Le reazioni biotiche sono quelle di degradazione del butano e del cloroformio, le quali determinano una velocità di reazione per l'ossigeno, esprimibile come:

$$R_{O,bio} = -R_S (6,5 \cdot f_w + 4/5 \cdot f_{biom}) - \alpha_C \cdot R_C \quad 4.20$$

Il fattore 6,5 rappresenta le moli di ossigeno che occorrono per trasformare una mole di butano in  $CO_2$  ed  $H_2O$ ,  $f_w$  indica la frazione di butano convertita in  $CO_2$  ed  $H_2O$ ,  $4/5$  rappresenta le moli di ossigeno che servono per trasformare una mole di butano in sostanze utilizzate dalla biomassa,  $f_{biom}$  indica la frazione di butano che viene utilizzato per la crescita ed il mantenimento della biomassa. Dai dati sperimentali si è ottenuto un coefficiente totale pari a 2,2  $mgO_2/mg_S$ , corrispondenti a 4  $molO_2/mol_S$ . Per il cloroformio invece, si è considerato un coefficiente  $\alpha_C=1,5 \text{ mol}O_2/mol_C$ .

Le reazioni abiotiche sono legate al fatto che in un suolo complesso, sono contenute numerose sostanze ossidabili, ad esempio metalli o ioni presenti in forma ridotta ed è inoltre presente una piccola quantità di biomassa indigena che riesce a metabolizzare la sostanza organica presente nel suolo stesso, riuscendo così a sopravvivere. Questo consumo è espresso con una reazione del primo ordine:

$$R_{O,abio} = -k_{Oabio} \cdot O \quad 5.21$$

dove  $k_{Oabio}$  è la costante cinetica della reazione abiotica [1/s], il cui valore è stato assunto, in conformità a precedenti valutazioni, pari a  $1,6 \cdot 10^{-06} \text{ 1/s}$ .

In definitiva, combinando le espressioni 5.20 e 5.21, la velocità di reazione dell'ossigeno è espressa come segue:

$$R_R = -4 \cdot R_S - 1,5 \cdot R_C - k_{O_{abio}} \cdot O \quad 5.22$$

### 5.2.3 Velocità di reazione della biomassa

La concentrazione di biomassa varia in funzione di diversi fenomeni. Nell'interpretazione dei processi di biodegradazione cometabolica di alifatici clorurati si considera dapprima l'assenza del substrato primario, quindi la morte della biomassa per metabolismo endogeno e la sua inattivazione dovuta a metaboliti intermedi che possiedono un'azione tossica sulla biomassa. Il metabolismo endogeno risulta proporzionale al coefficiente di respirazione endogena ( $b$ ), mentre l'azione tossica degli intermedi è considerato tramite un parametro, detto capacità di trasformazione  $T_C$ , che rappresenta la quantità di contaminante che viene degradato per unità di biomassa che viene inattivata. L'introduzione di questo parametro trae origine dall'osservazione sperimentale secondo la quale una certa quantità di biomassa può degradare una quantità finita di idrocarburo clorurato. Si fa notare anche che tale parametro  $T_C$  è funzione del substrato su cui è cresciuta la biomassa, nonché della composizione del consorzio batterico di biodegradazione e risulta inversamente proporzionale al rapporto tra atomi di cloro e atomi di carbonio nel solvente clorurato. Da quanto esposto è evidente la necessità, per prolungare l'attività degradativa della biomassa, di alimentare anche il substrato di crescita, in modo da sostituire la biomassa inattivata e in modo da evitare che la degradazione si arresti per esaurimento delle scorte di cofattori, quali NADH e NADPH, necessari per i processi di biodegradazione dei clorurati. L'accrescimento della biomassa dovuto alla presenza di substrato primario è direttamente proporzionale alla funzione della resa cellulare ( $Y$ ) cioè la resa di conversione del substrato in biomassa. Alla luce di queste osservazioni la velocità di reazione della biomassa è esprimibile dalla seguente equazione:

$$R_X = -Y \cdot R_S - b \cdot X - \frac{R_C}{T_C} \quad 5.23$$

dove  $Y$  è la resa cellulare, cioè la resa di conversione del substrato in biomassa [ $\text{kg}_{\text{prot}}/\text{mol}_S$ ],  $b$  è il fattore di morte della biomassa per metabolismo endogeno [ $\text{s}^{-1}$ ] e  $T_C$  è la capacità di trasformazione [ $\text{mol}_C/\text{kg}_{\text{prot}}$ ] cioè il rapporto tra la massa di contaminante degradato e la massa di microrganismi inattivata.

Componenti	Espressione della velocità di reazione
Substrato primario	$R_S = - \frac{q_{\max,S} \cdot S}{K_{sS} \cdot \left(1 + \frac{C}{K_{iC}}\right) + S} \cdot X \cdot \frac{R}{K_R + R}$
Substrato cometabolico	$R_C = - \frac{q_{\max,C} \cdot C}{K_{sC} \cdot \left(1 + \frac{S}{K_{iS}}\right) + C} \cdot X \cdot \frac{R}{K_R + R}$
Riducente	$R_R = -\alpha_S \cdot R_S - \alpha_C \cdot R_C - R_{O_{\text{abio}}}$
Biomassa	$R_X = -Y \cdot R_S - b \cdot X - \frac{R_C}{T_C}$

Tab.6 – Velocità di reazione dei diversi componenti in un processo di biodegradazione aerobica cometabolica

Parametri	Descrizione parametro	Unita' di misura
$u$	velocita' superficiale del fluido	[m/s]
$A$	sezione di passaggio	[m <sup>2</sup> ]
$k_c$	conducibilita' del terreno	[m/s]
$Q$	portata volumetrica del fluido	[m <sup>3</sup> /s]
$v$	velocita' interstiziale	[m/s]
$v_{cont}$	velocita' del contaminante	[m/s]
$\Phi_e$	porosita' efficace del mezzo poroso	[adi]
$D$	coefficiente di diffusione (o diffusivita')	[m <sup>2</sup> /s]
$\omega$	coefficiente legato alla tortuosita'	[adi]
$D_{pm}$	coefficiente di diffusione (o diffusivita') in mezzo poroso	[m <sup>2</sup> /s]
$\alpha_L$	dispersivita' longitudinale	[m]
$D_L$	diffusione idrodinamica o dispersione longitudinale	[m <sup>2</sup> /s]
$k_d$	coefficiente di adsorbimento dimensionale	[l/kg]
$k_{adi}$	coefficiente di adsorbimento adimensionale	[adi]
$\rho_d$	densita' apparente del terreno	[kg/dm <sup>3</sup> ]
$C_i$	concentrazione di soluto nel liquido in equilibrio con la massa adsorbita sul solido	[mg/l]
$C_i^*$	massa di soluto $i$ adsorbita per unita' di peso secco del mezzo poroso	[mg/kg]
$\delta_i$	fattorie di ritardo	[adi]
$R_i$	velocita' di reazione del composto $i$	[mg/l/s] o [mol/m <sup>3</sup> /s]
$q_{max,i}$	massime velocita' specifiche di consumo del composto $i$	[mg/(mg <sub>prot</sub> s)]
$K_{s,i}$	costate di affinita'	[mg/l]
$B$	concentrazione dei componenti in acqua	[mg/l]
$CF$	concentrazione dei componenti in acqua	[mg/l]
$X$	concentrazione di biomassa in acqua	[mg <sub>prot</sub> /l]
$K_{ICF}$	coefficiente di inibizione del cloroformio sul butano	[mg/l]
$K_{iB}$	coefficiente di inibizione del butano sul cloroformio	[mg/l]
$O$	concentrazione di ossigeno in fase liquida	[mg/l]
$K_{so,B}$	costante di affinita' dell'ossigeno per il substrato	[mg/l]
$K_{so,CF}$	costante di affinita' dell'ossigeno per il substrato cometabolico	[mg/l]
$k_{Oabio}$	costante cinetica della reazione abiotica	[s <sup>-1</sup> ]
$R_{O,abio}$	velocita' di consumo dell'ossigeno dovuto a processi abiotici	[mg/l/s] o [mol/m <sup>3</sup> /s]
$R_{O,bio}$	velocita' di consumo dell'ossigeno dovuto a processi biotici	[mg/l/s] o [mol/m <sup>3</sup> /s]
$Y$	resa cellulare	[mg <sub>prot</sub> /mg <sub>B</sub> ]
$B$	fattore di morte della biomassa per metabolismo endogeno	[s <sup>-1</sup> ]
$T_{CF}$	capacita' di trasformazione	[mg <sub>CF</sub> /mg <sub>prot</sub> ]

Tab.7 – Simbologia utilizzata nella descrizione del modello di biodegradazione aerobica cometabolica utilizzata.

## Capitolo 6 - METODICHE ANALITICHE E SPERIMENTALI

### 6.1 Analisi gas-cromatografiche: iniezione manuale del campione

La misura della concentrazione dei vari substrati di crescita (metano, pentano e butano etc.) e dei solventi clorurati (ci-DCE, VC, TCE, TeCA, etc.) presente nelle vials, e' stata eseguita tramite tecniche gascromatografiche, utilizzando rispettivamente un detector FID (*Flame Ionization Detector*) ed un detector ECD (*Electron Capture Detector*). La gascromatografia permette la misura della concentrazione di substrato e di solventi clorurati in fase gas. Tale misura e' effettuata nello spazio di testa di una vial da 119 ml all'interno della quale e' inserito il campione liquido. Alla concentrazione dei soluti in fase liquida ed alla massa totale di substrato e clorurati presente nella vial e' possibile risalire mediante le seguenti relazioni (valide nell'ipotesi di equilibrio tra le fasi):

$$C_G = H \cdot C_L \quad 6.1$$

$$m = C_L \cdot V_L + C_G \cdot V_G \quad 6.2$$

Dove:

$m$  = quantita' di substrato o solvente misurata [mg o mmol];

$C_L$  e  $C_G$  = rispettivamente concentrazione in fase liquida e in fase gassosa [mg/l o mmol/l];

$V_L$  e  $V_G$  = rispettivamente il volume della fase liquida e della fase gas [l];

$H$  = costante adimensionale di Henry a 30°C.

### 6.1.1 Analisi del substrato di crescita (metano, pentano)

La concentrazione del substrato di crescita è stata misurata mediante gascromatografo HP 6890 usando il rivelatore FID (Detector a Ionizzazione di Fiamma). Le caratteristiche dello strumento ed i valori di temperatura utilizzati per le analisi sono riportati nelle tabelle Tab.8 e Tab.9. Ad ogni analisi è stato iniettato un volume pari a 100 µl dello spazio di testa della vial tramite una siringa da 100 µL graduata, con ago side-port.

<b>Strumento</b>	HP 6890
<b>Colonna</b>	HP-VOC
<b>D.I.</b>	0.32 mm
<b>Lunghezza</b>	30 m
<b>Liner</b>	Split 30:1
<b>Detector</b>	FID
<b>Gas di Trasporto</b>	Elio
<b>Gas di Make-up</b>	Azoto
<b>Pressione all'iniettore</b>	405 Kpa
<b>Flusso</b>	165 mL/min
<b>Velocità</b>	59cm/s
<b>Volume di iniezione</b>	100 µl

Tab.8 – *Caratteristiche del gascromatografo HP 6890.*

<b>Iniettore</b>	135°C
<b>Detector</b>	250°C
<b>Colonna</b>	135°C

Tab.9 – *Specifiche di temperature per l'analisi del butano.*

La calibrazione dello strumento per le analisi di metano e pentano, usati nei nostri esperimenti, è stata effettuata utilizzando standard a concentrazione nota (in fase gassosa), stabilendo quindi una correlazione fra la risposta del rivelatore (area del “picco” sul cromatogramma) e la concentrazione nella fase gas del campione. Viene riportato un esempio di calibrazione effettuata secondo le modalità sopra descritte con il gascromatografo HP6890:

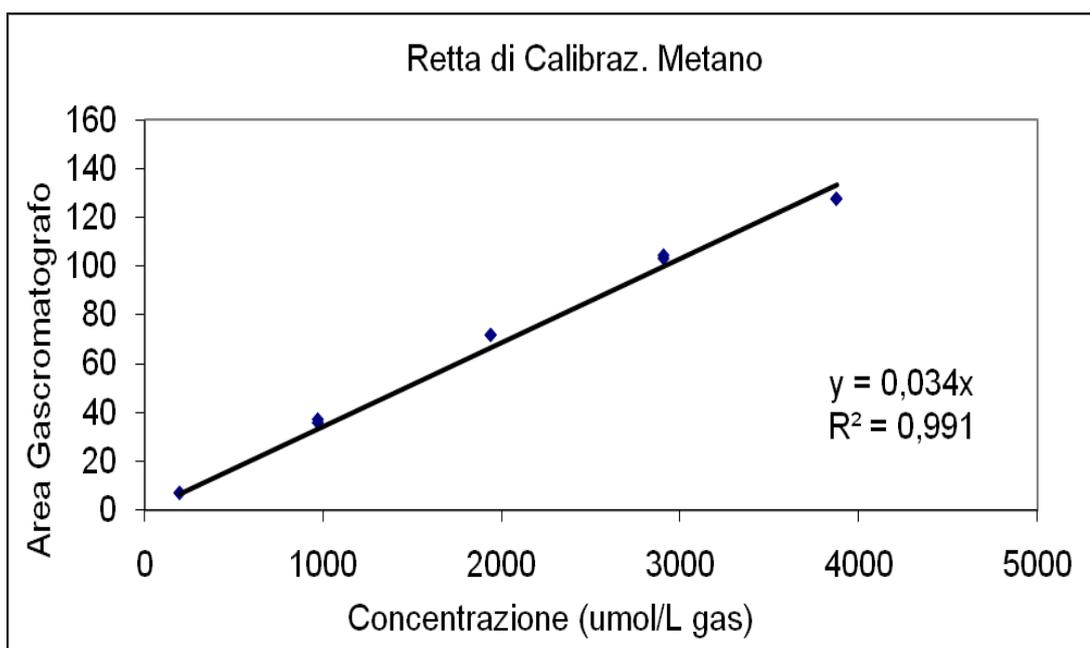


Fig.4 – Retta di calibrazione del metano.

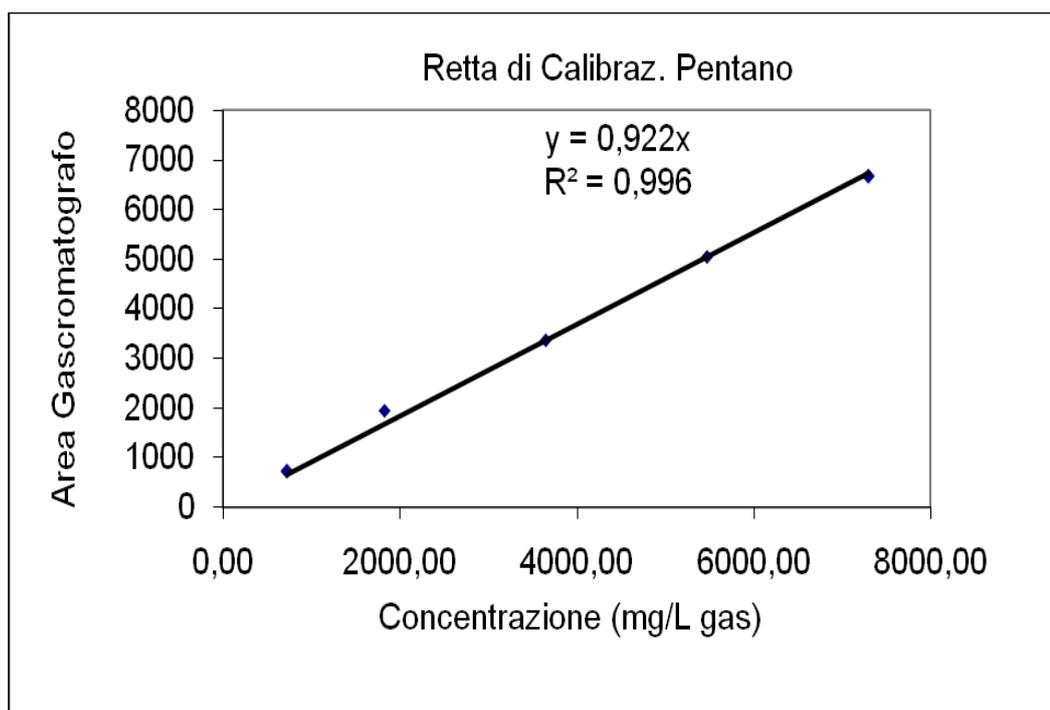


Fig.5 – Retta di calibrazione del metano.

La retta di calibrazione è stata ultimata ripetendo tre volte l'analisi di ogni standard a diversa concentrazione. Gli standard in fase gassosa sono stati realizzati con una bottiglietta da 119 ml contenente substrato in concentrazioni variabili tra 0,2 e 1,1 mg/l<sub>aq</sub>.

L'analisi in fase liquida è stata effettuata mettendo a punto una metodica che ci permette di effettuare l'analisi su un campione in fase gas, nonostante i campioni siano in fase liquida. Una volta che i substrati si sono ripartiti all'interno delle due fasi, è possibile, mediante gascromatografo, analizzarne lo spazio di testa e risalire quindi alla concentrazione del liquido presente nella bottiglietta. La concentrazione reale del liquido si può ottenere moltiplicando la risposta del gascromatografo per un opportuno fattore correttivo (coefficiente angolare delle rette di calibrazione: 0,034 per il metano e 0,922 per il pentano). Tale fattore correttivo sarà in funzione del volume di liquido prelevato e introdotto nella bottiglietta e del volume di gas nello spazio di testa rimasto. Una volta introdotto il campione da analizzare nella vial, infatti, la massa del substrato in esso contenuto si ripartisce tra fase liquida e fase gas della vial stessa: in questo modo si ottiene una diminuzione della concentrazione del metano e pentano nella fase liquida.

### 6.1.2 Analisi dei solventi clorurati

Per misurare la concentrazione dei solventi clorurati (cis-DCE, VC, TCE, TeCA) è stato utilizzato sempre il gascromatografo HP-6890 ma con rivelatore  $\mu$ -ECD (Detector a Cattura di Elettroni). Le caratteristiche del metodo e dello strumento sono riportate in tabella Tab.11.

Strumento	HP 6890
Colonna	HP-VOC
I.D.	0.53 mm
Lunghezza	30 m
Liner	Split 30:1
Detector	$\mu$ -ECD

Gas di Trasporto	Elio
Gas di Make-up	Azoto
Pressione all'iniettore	405 Kpa
Flusso	165 ml/min
Velocità	59 cm/s
Volume di iniezione	100 µl

Tab.11 – *Specifiche per l'analisi dei clorurati con gascromatografo HP 6890.*

Temperatura dell'iniettore	135°C
Temperatura del detector	250°C
Temperatura della colonna	135°C

Tab.12 – *Specifiche di temperature per l'analisi dei clorurati.*

Le calibrazioni sono state eseguite con standard di concentrazione compresa tra 0,16 e 0,75 mg/l in fase liquida. Gli standard sono stati realizzati in vial di vetro del volume di 119 ml e il solvente da aggiungere agli standard è stato prelevato da una stock-solutions in esano.

Prima di ogni serie di analisi, le calibrazioni sono state controllate tramite analisi di almeno uno standard e sono state eseguite nuovamente ogni volta che lo scostamento fra lo standard e la precedente curva di taratura risultava superiore al 10%. A titolo di esempio, in figura Fig.6 viene riportata una retta di calibrazione relativa al TCE. La risposta del detector µ-ECD, nel range di concentrazioni utilizzato, è risultata lineare rispetto al clorurato.

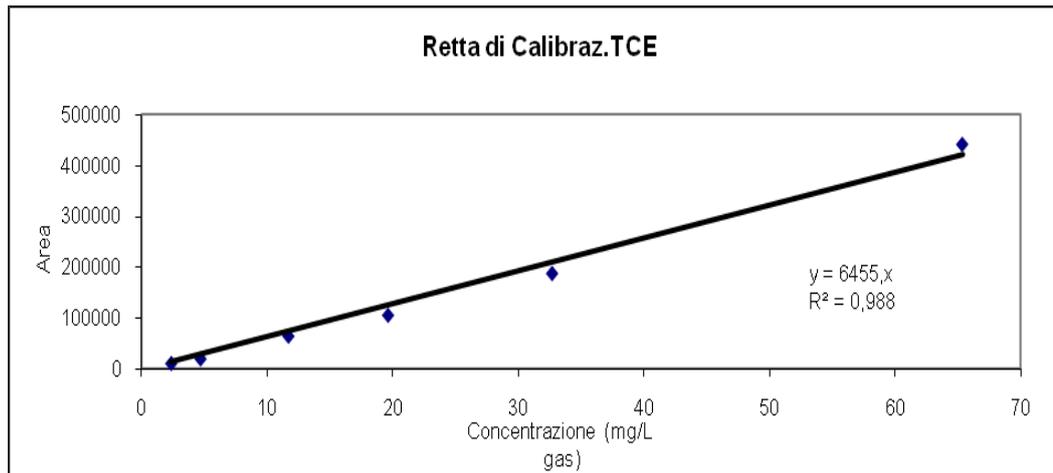


Fig.6 – *Retta di calibrazione TCE.*

## 6.2 **Analisi gascromatografica: iniezione automatizzata del campione con auto campionatore spazio di testa Agilent 7694E**

Con il termine analizzatore di spazio di testa, in seguito brevemente indicato come spazio di testa, si identifica uno strumento capace di iniettare campioni in fase gas destinati a successiva analisi gascromatografica. La tecnica analitica viene chiamata “static headspace gas chromatography”, dove il termine “headspace” (spazio di testa) si riferisce allo spazio creato al di sopra del liquido o del solido contenuto all’interno di fiale chiuse (chiamate tecnicamente vial), mentre il termine “static” identifica che le sostanze volatili contenute appunto nello spazio di testa sono in equilibrio con il liquido o con il solido. Lo strumento, estrae volumi riproducibili di gas e li inietta nel gascromatografo.

Nelle figure successive Fig.7 e Fig.8 viene mostrato lo spazio di testa da noi utilizzato.

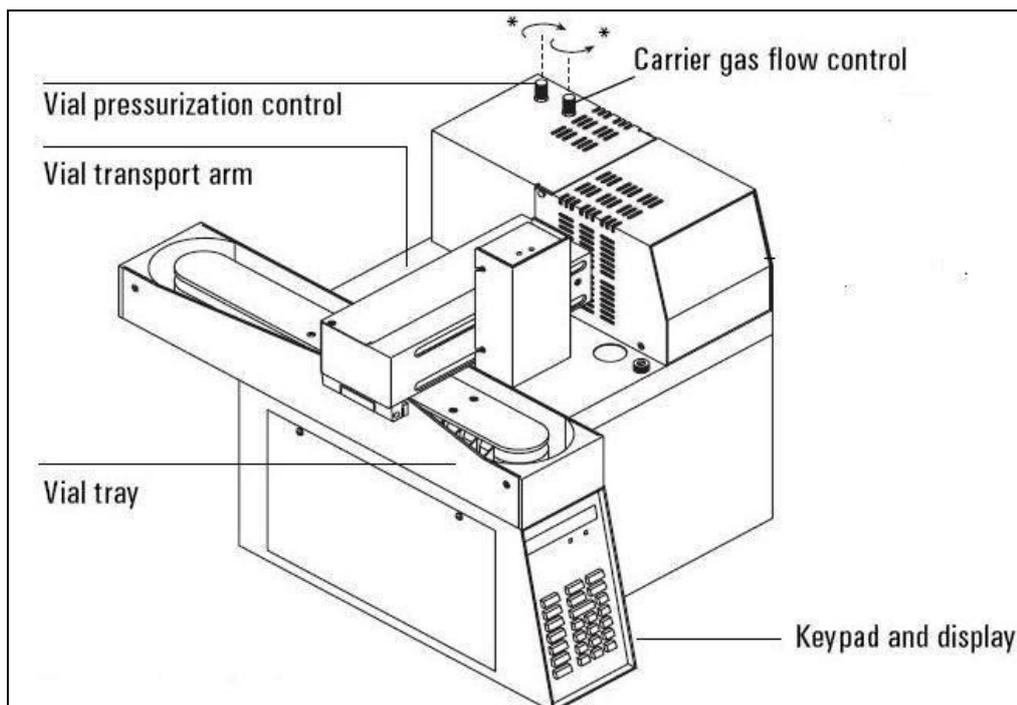


Fig.7 – Vista frontale dello spazio di testa Agilent 7694E.

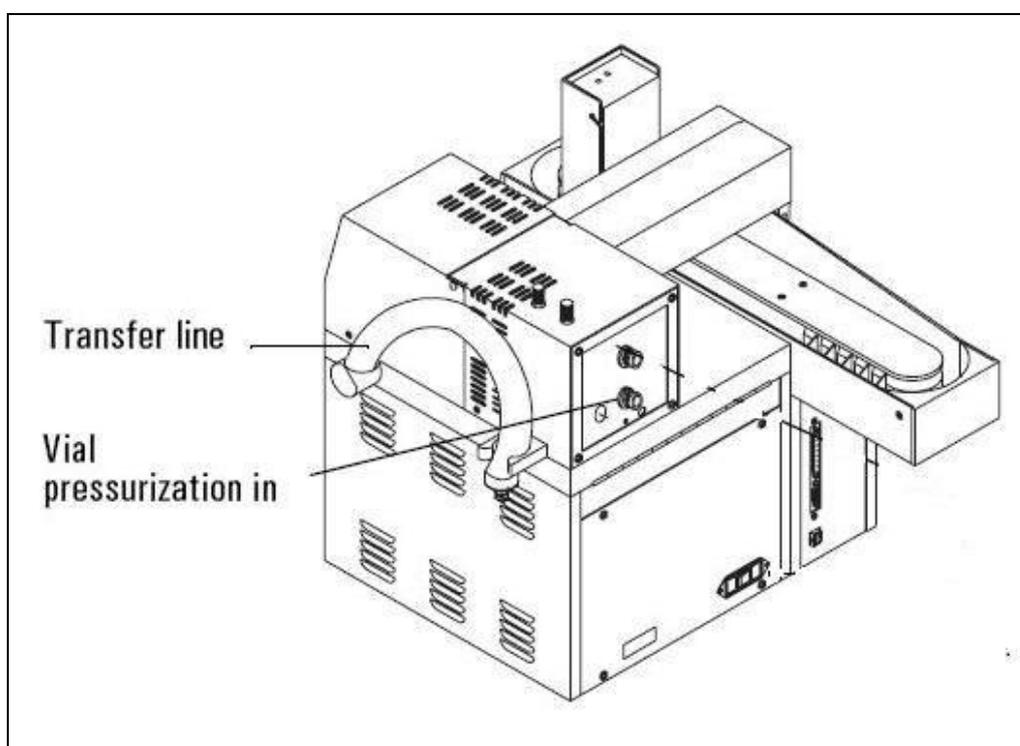


Fig.8 – Vista posteriore dello spazio di testa Agilent 7694E.

Le vial vengono posizionate nel carrello (*vial tray*), che nel nostro caso possiede 12 posizioni disponibili, in cui possono essere inserite sia vial da 20 ml, che da

10 ml tramite l'uso di un adattatore. Inserite le vial nel carrello, esse vengono spostate singolarmente dal *vial transport arm* verso una camera termostata alla temperatura desiderata (*Oven temperature*), nella quale permangono per un tempo prefissato (*Equilibration time*) sufficiente a stabilire l'equilibrio tra le fasi. Trascorso tale tempo, lo spazio di testa della vial viene pressurizzato, il campione in fase gas riempie una *valve loop* ed in seguito, attraverso la *transfer line* è effettuata l'iniezione nel gascromatografo in cui si ha l'analisi del campione (*Run time*).

Numerosi sono i parametri strumentali che possono incidere sulla sensibilità, sulla precisione e sulla accuratezza di una analisi. Il produttore, come dinnanzi avanzato, per alcuni di essi fissa dei valori di default "consigliati" (*Loop fill time*, *Vial pressurization and time*, *Carrier gas flow rate*, ecc), mentre per degli altri suggerisce di operare delle prove specifiche.

I parametri che richiedono una attenzione specifica sono: *Oven temperature* ed *Equilibration time*.

Durante la fase di standby, la valvola della linea di pressurizzazione *S1* è aperta, gas usiliario scorre attraverso la *valve loop* e l'ago. Gas di trasporto fluisce anche attraverso la porta di iniezione al GC. Trascorso il tempo di equilibrio (*Equilibration time*) alla temperatura desiderata (*Oven temperature*) e chiusa la valvola *S1*, la vial viene alzata in direzione di un ago che bucando il setto di gomma permette la pressurizzazione dello spazio di testa della vial. In tale fase la valvola *S1* viene aperta per un tempo prestabilito (*Vial pressurization time* = 0.2 minuti) e poi richiusa. Per quanto concerne la *Vial pressurization*, per molti liquidi la pressione sviluppatasi in seguito all'incremento della temperatura nella fase di riscaldamento è sufficiente ad assicurare il riempimento della *valve loop* senza l'utilizzo di pressurizzazione addizionale. In alternativa, il produttore consiglia di utilizzare lievi sovrappressioni, nel nostro caso pari a 13 psi.

Nella fase successiva a questo tempo, viene aperta la valvola *S2* per un tempo prestabilito (*Loop-fill time* = 0.2 minuti) per permettere il caricamento della *valvola loop*. La valvola *S2* si richiude.

Nella operazione di iniezione del campione, entrambe le valvole, quella di vent *S2* e quella di pressurizzazione *S1* sono chiuse. La *loop valve* viene girata in posizione di iniezione, permettendo il passaggio del gas di trasporto attraverso

il *sample loop* che, mediante la *transfer line* conduce il campione alla successiva analisi al GC.

Dopo la fase di iniezione del campione, la vial viene riabbassata nel carosello e le due valvole S1 ed S2 rimangono aperte per purificare la *vent line*.

Le fasi sopra descritte si ripetono  $n$  volte, dove  $n$  rappresenta il numero di vial da analizzare.

### 6.3 Analisi di ossigeno in fase liquida

Per l'analisi dell'ossigeno in fase acquosa è stata utilizzata una sonda OXIGEN modello DO-166FT costituita da una cella ed un elettrodo di misura in argento tipo Cark, in grado di monitorare in continuo l'ossigeno disciolto nel fluido che attraversa la cella stessa. L'elettrodo è separato dalla soluzione da analizzare tramite una membrana semipermeabile che consente il solo passaggio dell'ossigeno. Completa lo strumento di misura un indicatore analogico che converte il segnale dell'elettrodo in un segnale interpretabile attraverso una scala graduata in mg/L. In figura Fig.9 è rappresentato un esploso dell'apparecchiatura.

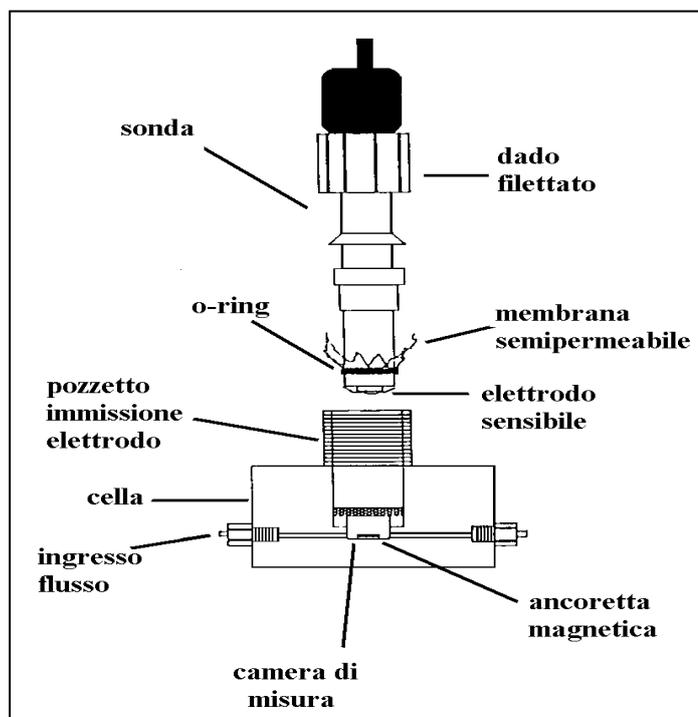


Fig.9 – Rappresentazione sonda e cella per analisi ossigeno.

L'assemblaggio dell'elettrodo prevede il riempimento delle camere intorno all'elettrodo stesso con una soluzione elettrolitica fornita dal costruttore. Successivamente si avvolge l'elettrodo con una membrana semipermeabile, fissandola tramite un anello di tenuta o-ring. Per migliorare la tenuta fra elettrodo e camera di misura si possono anche fare alcuni avvolgimenti attorno all'o-ring con del teflon in film.

Terminata questa fase si inserisce l'elettrodo nel cilindro in testa alla camera di misura facendo attenzione a non rompere la membrana e spingendo l'elettrodo fino sul fondo. Il fissaggio dell'elettrodo in tale posizione è ottenuto tramite un dado che va ad avvitarsi sulla parte esterna filettata del cilindro. Sul fondo della camera di misura può essere inserita una piccola ancorotta magnetica in modo da migliorare l'uniformità della soluzione all'interno della camera, aumentando la velocità di risposta dello strumento.

Tale accorgimento non si rende necessario se la velocità della corrente fluida da analizzare supera i 5 mL/min.

Per la calibrazione dello strumento occorre preparare una soluzione satura d'aria ed una soluzione contenente una concentrazione di ossigeno pari a zero. Entrambe sono ottenibili attraverso gorgogliamento di gas in soluzione acquosa. La soluzione esente da ossigeno può essere ottenuta gorgogliando azoto all'interno di una soluzione acquosa per un periodo sufficientemente lungo da permettere lo stripping di tutto l'ossigeno presente. Per la soluzione contenente ossigeno invece è possibile gorgogliare con aria compressa. Una rotella posta sul modulo permette di determinare il range di valori per le misure mentre due viti consentono di regolare la lettura effettuata sul valore massimo per quanto riguarda la soluzione satura di aria e sul valore zero per la soluzione in cui l'ossigeno è assente.

Una volta ultimata la calibrazione è possibile compiere le analisi, prestando attenzione ad eventuali bolle d'aria che possono rimanere intrappolate nella camera di misura, in corrispondenza dell'elettrodo, falsando la misura. Un accorgimento utile è tenere la cella in verticale, favorendone la fuoriuscita grazie al moto della corrente.

La cella si può utilizzare sia in condizioni di flusso che intrappolando un volume di soluzione da analizzare: questa seconda configurazione è stata quella maggiormente utilizzata.

Il fluido da analizzare viene prelevato con una siringa della capacità di 20 mL previa sostituzione dell'ago ipodermico con un segmento di tubo in gomma e un ago in acciaio uguale a quelli collegati alle porte della colonna ( $d_i = 1.2$  mm).

La siringa viene riempita di una prima aliquota di campione acquoso, il quale è scartato perché contenente parte della soluzione rimasta intrappolata negli aghi e nei raccordi.

E' bene lasciare acqua nella cella anche quando non viene utilizzata, per cui introducendo un campione da analizzare, va eliminata la soluzione già presente; la soluzione è intrappolata grazie a due stringi tubo, uno in ingresso ed uno in uscita dalla cella che devono essere asportati e dall'ingresso si inizia ad introdurre il campione, facendo fuoriuscire la soluzione e le bolle presenti nella cella. L'iniezione deve procedere lentamente poiché la lancetta dell'indicatore inizierà ad avvicinarsi alla concentrazione del campione sino a stabilizzarsi; a questo punto vanno reinseriti gli stringi tubo, prima quello in uscita lasciando collegata la siringa e successivamente quello in ingresso, cosicché non esca la soluzione e non entrino bolle nella cella.

La lancetta necessita di almeno 4-5 mL di soluzione prima di iniziare a rilevare la concentrazione, a questo proposito sono state compiute delle prove per avere una stima del volume minimo di soluzione e del tempo necessario per avere una buona stima della concentrazione di ossigeno disciolto, sia con una soluzione esente da ossigeno che con una saturata con aria. E' stato iniettato lentamente un volume di 10 mL, facendo letture durante lo spostamento della lancetta e una volta fermatasi, successivamente sono state introdotte tante altre aliquote da 10 mL, sino a raggiungimento del valore di saturazione con  $N_2$  o con aria. Sono riportati due schemi della lettura nel tempo e a volumi crescenti, sia per soluzioni esenti da ossigeno che per soluzioni saturate in aria.

Lo strumento presenta una buona stabilità della lettura degli standard, nonostante ciò va effettuata la calibrazione tutti i giorni, prima e dopo ogni serie di analisi; è dotato di due viti di regolazione che permettono di fissare sullo zero la lettura in mg/L fornita dallo standard in azoto e sul valore massimo quella

fornita dallo standard con aria. Va sottolineato che a seconda del campo di interesse e quindi di utilizzo gli standard possono variare da quelli utilizzati durante questa sperimentazione. Per esempio, per la concentrazione massima rilevabile, può essere utilizzato uno standard ottenuto con ossigeno puro anziché con aria, allargando il range di rilevabilità e allo stesso tempo la precisione dell'analisi.

La lettura in acqua satura di azoto permette di regolare lo strumento sullo zero e di portare l'indicatore a valori corrispondenti a basse concentrazioni di ossigeno; infatti si è notata nello strumento una maggiore rapidità di lettura e la necessità di un volume di iniezione minore, eseguendo le analisi su campioni via via a concentrazione maggiore. La lettura in acqua satura di aria va effettuata introducendo un'aliquota abbondante di soluzione in quanto fornisce indicazioni importanti sullo stato dello strumento: stato della membrana semipermeabile, condizione degli organi di tenuta dello strumento, etc. La lettura va effettuata quando il suo valore di risalita raggiunge un massimo e questo accade in tempi molto brevi, dell'ordine della decina di secondi rimanendo stabile per altrettanto tempo. Se la lettura avviene in fase di diminuzione di concentrazione invece, la ricerca del massimo avviene con un po' più di difficoltà ma rimane sempre individuabile e stabile per lo stesso arco di tempo. Alla fine della serie di misurazioni è bene ricontrollare ambedue gli standard.

La sonda sopra descritta e' stata utilizzata durante la preparazione della sacca di alimentazione del contaminante e per la preparazione del bottiglione di alimentazione substrato di crescita, per lo studio degli ORC, invece e' stata messa in opera una nuova sonda ossigeno: *ossimetro portatile OXI 45 P* auto calibrante. Questa sonda, che misura contemporaneamente all'ossigeno disciolto anche la temperatura, e' stata utilizzata seguendo le metodologie descritte per il precedente ossimetro.

## Capitolo 7 - DESCRIZIONE DELL'IMPIANTO

Per studiare gli aspetti relative ai trattamenti cometabolici in sito, e' stato progettato un impianto a flusso costituito da un reattore a colonna, di vetro, riempito con materiale poroso appositamente selezionato.

L'impianto, riportato in figura Fig.10, e' costituito da tre parti fondamentali:

- sistema di alimentazione;
- reattore a colonna contenente materiale poroso a cui aderirà la biomassa batterica;
- polmone e filtro a carboni attivi.

Il sistema di alimentazione e' collegato al reattore tramite tubi in acciaio ( $d_i = 4$  mm): questo materiale e' dotato di un'ottima compatibilità chimica nei confronti del substrato e del solvente clorurato; questo permette di ottenere un'alimentazione continua e a concentrazione costante dei soluti disciolti pari a quella presente nei sistemi di alimentazione. I collegamenti sono realizzati con rubinetteria in acciaio inox ed in prossimità' delle parti filettate si sono operati dei rivestimenti con film di Teflon per aumentarne la tenuta.

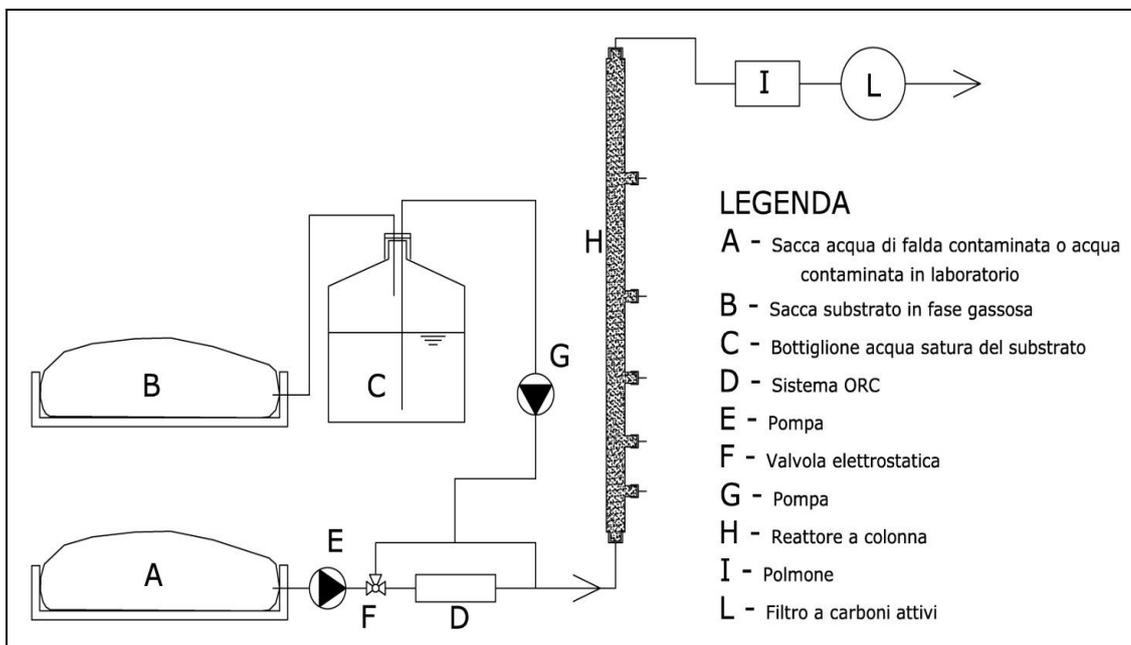


Fig.10 – Schema impianto di biodegradazione di solventi clorurati a colonna flussante.

## 7.1 Descrizione del reattore

Il reattore adoperato in questi studi e' rappresentato in figura, Fig.11: si tratta di un reattore a colonna di altezza complessiva pari a 52,2 cm e di diametro pari a 2 cm. Il materiale scelto per la sua realizzazione e' il vetro in modo da assicurare una totale inerzia chimica evitando il rischio di assorbimento del contaminante clorurato da parte delle pareti.

La parte iniziale e finale della colonna sono filettate per un'altezza pari a 2 cm, in maniera tale da poter chiudere le due estremità mediante l'impiego di appositi tappi. Questi contengono nella parte interna un setto "doppia faccia"- PTFE (Teflon, chimicamente inerte) verso l'interno e silicone verso l'esterno, e presentano entrambi un foro centrale in cui e' inserito il maschio di un rubinetto in acciaio inox che viene avvitato ad un dado.

Sulla parete del reattore, lungo la verticale, sono presenti 5 porte di campionamento costituite da attacchi filettati all'estremità esterna e collegati alla colonna mediante saldatura a caldo. L'interasse fra queste porte aumenta procedendo dal basso verso l'alto come mostrato in figura Fig.11. Le porte sono chiuse anch'esse da tappi filettati, forati in cui sono inseriti un setto a "doppia faccia" e un ago di acciaio di lunghezza pari ad 8 cm (4 cm risultano immersi nella colonna e 4 cm invece sono al suo esterno). L'ago a sua volta e' inserito in un tubicino in Norprene del diametro pari a 3 mm, lunghezza pari a 4cm e chiuso per mezzo di uno stringi tubo. L'ago di acciaio e il tubicino in Norprene consentono la realizzazione delle operazioni di immissione e prelievo dal reattore. Alcuni particolari sono mostrati in Fig.10. Per poter garantire una migliore tenuta della colonna si è deciso di ricoprire la parte filettata delle porte di campionamento nonché quella delle due estremità, con un sottile film di teflon su cui avviene poi l'avvitamento dei tappi.

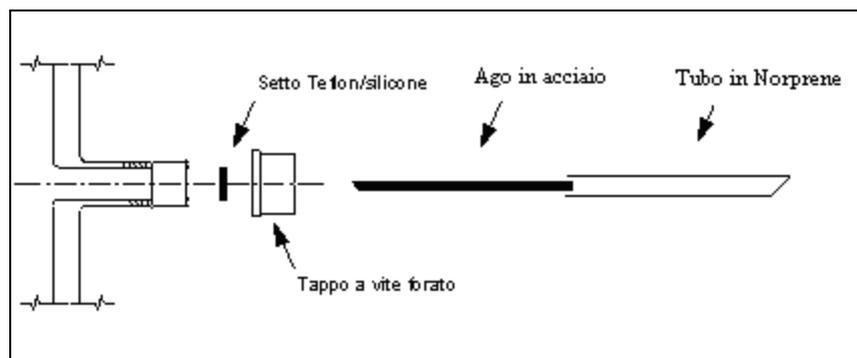


Fig.11 – Particolare porta di prelievo colonna.

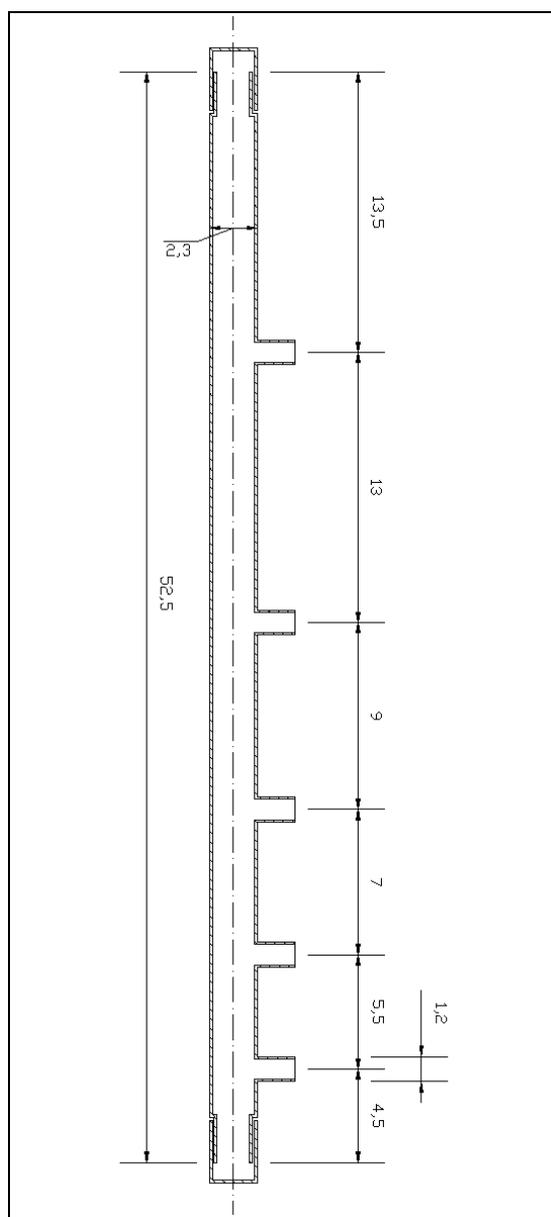


Fig.12 – Sezione reattore a colonna.

Per tutta l'altezza della colonna, è disposto un "riempimento", costituito da corpi solidi di geometria tale da consentire una elevata superficie per unità di volume e, al tempo stesso, basse perdite di carico.

Si tratta di riempimento alla rinfusa (random) perché sono disposti in maniera casuale all'interno del reattore. Il volume totale della colonna risulta pari a 164,73 mL ( $1,65 \cdot 10^{-4}$  m<sup>3</sup>).

## **7.2 Caratteristiche del riempimento**

Il materiale di riempimento scelto per far attecchire la biomassa batterica è composto da canalicchi ceramici di diametro di 8 mm, e altezza pari a 10 mm. Grazie al corpo cavo ed alla porosità dell'ordine di 55/60%, sono materiali filtranti dalle molteplici proprietà, utilizzabili sia per il filtraggio meccanico, sia per quello biologico. La forma particolare dei corpi cilindrici, non ostacola il passaggio dell'acqua affluente e la loro superficie, eccezionalmente porosa, assicura le condizioni ideali per un denso insediamento delle colonie di batteri selezionate. Il materiale è completamente atossico.

La colonna riesce a contenere un massimo di 756 canalicchi (numero determinato sperimentalmente).

## **7.3 Sistema di alimentazione**

Il reattore a colonna è collegato ad un insieme di apparati costituenti il sistema di alimentazione. Il reattore simula una porzione di acquifero a partire dal punto di iniezione in falda, mentre il sistema di alimentazione permette la realizzazione del moto al suo interno e le condizioni necessarie alla degradazione cometabolica del contaminante (l'alimentazione di ossigeno, del substrato primario e dei nutrienti con modalità a pulsanti).

Il sistema di alimentazione a pulsanti, richiede la preparazione e l'utilizzo di:

- sacca contenente acqua di falda contaminata o acqua contaminata in laboratorio;

- impianto alimentazione substrato sacca-bottiglione;
- sistema ORC (Oxygen Release Compound).

Il sistema di alimentazione consta di due sacche della capienza di 20 L ciascuna, a tenuta gas e liquidi, il cui involucro interno e' realizzato in LPDE (Polietilene a bassa densità) che risulta essere un materiale con discreta compatibilità chimica nei confronti del substrato di crescita in fase gas e del cloroformio. Le sacche sono dotate di tubi in C.FLEX muniti di clamp su ingresso ed uscita; le due aperture sono state munite di un tubo di Teflon rigido fissato su un porta tubo, a sua volta collegato ad una valvola a sfera. Si e' poi inserito, in una delle uscite, un piccolo tratto di tubo in Norprene del diametro di 1,6 mm per permettere il campionamento e per agevolarne le operazioni di riempimento. Mentre l'altra uscita e' di collegamento all'impianto.

L'intento principale di tale studio e' quello di utilizzare acque prelevate direttamente da falda contaminata e conservate in più sacche come sopra descritte.

Nel caso in cui sia impossibile avere campioni reali provenienti da acquiferi contaminati, si realizzano in laboratorio delle sacche con concentrazione di determinati solventi clorurati al di sopra della soglia di contaminazione, cercando di ricreare le condizioni più vicine alla realtà. Di seguito vengono descritte le procedure seguite per realizzare una tipologia di acqua di falda contaminata da cloroformio.

All'interno della sacca di cloroformio sono poste 2 ancorette magnetiche (5\*35 mm) al fine di realizzare l'agitazione necessaria per portare velocemente all'equilibrio la soluzione al suo interno e realizzarne una celere omogeneizzazione della concentrazione di cloroformio. La sacca e' stata e' stata poi adagiata in carrelli dotati di letto in gomma piuma allo scopo di evitare danni in seguito a movimenti bruschi, i relativi rischi di fessurazione del polimero e la conseguente perdita di tenuta.

L'acqua utilizzata per il riempimento della sacca e' acqua addolcita; si e' ricorsi ad essa in quanto utilizzando acqua di rubinetto, nel tempo, si notano residui calcarei.

Se l'acqua di riempimento della sacca deve essere esente da ossigeno, essa viene gorgogliata all'interno di un "vessel" mediante un flusso di  $N_2$  realizzando in tal modo lo stripping dell'ossigeno. Il vessel è un contenitore cilindrico chiuso sul fondo e comunicante con l'esterno tramite due valvole. Nella testa del cilindro è stata ottenuta una scalatura nella quale è inserito un anello di tenuta e l'insieme è mantenuto chiuso da un disco in PVC trasparente fissato con una serie di bulloni (questo per avere tenuta gas all'interno del contenitore). A partire dal fondo, verso l'interno del vessel, si prolunga un condotto rigido munito esternamente di valvola a sfera; al termine di tale condotto (quindi internamente al vessel) è stato fissato un dischetto di materiale sinterizzato che serve per disperdere in bolle il flusso continuo di  $N_2$  che viene alimentato. In questo modo si offre alla soluzione una maggiore superficie di scambio e si giunge alla scomparsa di ossigeno con consumo inferiore di  $N_2$ . La valvola a sfera presente sul condotto di alimentazione consente la regolazione del flusso di  $N_2$ , generalmente realizzata visionando l'abbondanza di bolle nella soluzione. Sul disco di PVC trasparente sono presenti una serie di valvole a sfera, una delle quali viene aperta per permettere l'uscita dei gas durante lo stripping. L'acqua viene introdotta nel vessel tramite una tubazione collegata in testa al contenitore; questo generalmente viene riempito al massimo fino a 2-3 cm dal bordo superiore per evitare fuoriuscite di liquido durante il gorgogliamento del gas. È stato misurato il tempo necessario a rendere l'acqua sufficientemente povera di ossigeno ( $[O_2] < 0,3$  mg/L): sono sufficienti 25 minuti ad una pressione di  $N_2$  di circa 0,2 bar.

Il riempimento della sacca avviene deviando il flusso di  $N_2$  in testa al vessel e chiudendo la valvola a disco per impedirne lo sfiato: si crea così una pressione che spinge l'acqua deossigenata nella sacca.

Il cloroformio, è prelevato da una stock solution in acqua, mantenuta a saturazione, ossia a 8 g/L a 25°C, e tenuta in agitazione. Il prelievo di questa soluzione satura di cloroformio è effettuata tramite siringhe in vetro graduate a tenuta liquida.

Successivamente all'iniezione, la sacca contenente le due ancorette magnetiche viene posta in agitazione sui due agitatori magnetici. Per ottenere

una concentrazione uniforme in sacca sono sufficienti 12 ore per 0,2-0,4 mg/L (concentrazione in ingresso colonna).

Per quanto riguarda l'altra sacca dell'impianto di alimentazione, essa e' riempita del substrato di crescita in fase gas. Collegata attraverso tubi in acciaio ad un bottiglione di 5L a tenuta, riempito con 3L di acqua addolcita satura del substrato, la sacca permette di avere la saturazione costante del liquido contenuto nel recipiente di vetro.

Infatti va ricordato che bisogna alimentare la colonna con soluzioni acquose non contenenti bolle, e siccome la maggior parte dei substrati sono in fase gas, a parte il pentano, questo sistema permette di rispettare i requisiti per la conduzione dell'impianto

La preparazione della soluzione satura contenuta nel bottiglione e' avvenuta, prima di essere collegato all'impianto, attraverso il flussaggio di substrato in fase gassosa all'interno della fase liquida per un periodo di circa 15 minuti.

Un sistema di tubi di acciaio con relative valvole e sistemi per la tenuta, montate sul tappo del bottiglione, assicurano una costante concentrazione di substrato ed un maneggevole impiego durante l'alimentazione in colonna.

Il sistema ORC (Oxygen Release Compound) costituisce un sistema innovativo per introdurre ossigeno in acqua. Tale prodotto e' una particolare formulazione di un perossido che a contatto con l'acqua si trasforma, lentamente, in idrossido con rilascio di ossigeno disciolto in acqua.

Questo argomento e' stato da me approfondito in laboratorio, per questo e' stato dedicato un capitolo a parte con la teoria sugli ORC e relativi risultati ottenuti nelle prove sperimentali.

L'impianto di alimentazione comprende inoltre:

- due pompe peristaltiche modello Masterflex l/s regolabile da 1 a 150 giri/min,
- tubi di raccordo in acciaio,
- sistema elettrovalvola collegata al timer.

Per quanto riguarda l'elettrovalvola, questa è costituita da un pistone con incisi due canali nei quali vengono fatti passare due tubi in gomma flessibile: il pistone può trovarsi in due posizioni, determinate dal passaggio o meno di corrente elettrica, in ognuna delle quali comprime un tubo diverso. La valvola regola il flusso che attraversa il sistema ORC, quindi andrà a determinare la pulsazione di O<sub>2</sub> nella colonna, mentre il pulso del substrato di crescita è regolato dalla seconda pompa peristaltica collegata ad un timer.

I due timer permettono di programmare, ora dopo ora, quale soluzione deve essere alimentata al reattore e consentono il funzionamento in continuo dell'impianto.

La scelta delle pompe è stata effettuata in base ai tempi di residenza che si volevano ottenere per il fluido in colonna; da questo è possibile risalire alla velocità interstiziale nel reattore e quindi alla portata di alimentazione [m<sup>3</sup>/s], conoscendo la porosità e la sezione del reattore. Analiticamente:

$$Q = A \cdot \phi_e \cdot v \quad 7.1$$

in cui  $A$  è la sezione della colonna [m<sup>2</sup>],  $\phi_e$  è la porosità e  $v$  è la velocità interstiziale [m/s].

#### **7.4 Il polmone ed il filtro a carboni attivi**

Durante la pulsazione in continuo sarà necessario effettuare numerosi prelievi dalle porte del reattore, per ottenere il maggior numero di campioni possibili. Durante queste operazioni la quantità di liquido prelevata deve essere pari a quella alimentata dalla pompa in ingresso alla colonna, altrimenti si può verificare la formazione di bolle d'aria all'interno della colonna.

Questa situazione deve essere scongiurata, poiché la presenza di bolle pregiudica il funzionamento dell'impianto, condizionando il normale moto dei composti in colonna: le bolle infatti, a contatto con le fasi liquide ricche di substrato di crescita, cloroformio o ossigeno, assorbono e rilasciano tali componenti in funzione, ovviamente, del gradiente di concentrazione. Per ovviare a tali inconvenienti si è scelto di installare un polmone in serie alla

colonna. Durante la fase di campionamento, l'abbassamento di tale serbatoio fornisce alla colonna la portata corrispondente alla differenza  $Q_{media,camp} - Q_{in}$ . Inoltre, eseguendo i campionamenti dall'alto al basso, si evita che questo apporto di acqua dall'alto alteri il profilo di concentrazione misurato.

Il filtro a carboni attivi è stato installato in uscita dal reattore allo scopo di trattare la corrente contenente cloroformio sino a che la biomassa non avesse iniziato l'attività cometabolico.

## Capitolo 8 - RIATTIVAZIONE E SELEZIONE MICROCOSMI BATTERICI

Il seguente capitolo descrive l'analisi di determinati consorzi batterici: la riattivazione e la selezione in base ai loro metabolismi e il grado di dechlorazione, di alcuni solventi clorurati, che essi possono raggiungere.

Questa fase preliminare, molto importante ai fini dell'avvio dell'impianto in quanto possiamo concepire il consorzio batterico all'interno del reattore come motore dell'impianto stesso, e' stata analizzata durante gli esperimenti in laboratorio in collaborazione con la laureanda, erasmus spagnola, Almudena Gonzalez.

Gli studi di microcosmo sono stati condotti per determinare la reattivit  biologica di un sito o di una falda contaminata, e forniscono indicazioni necessarie per la corretta progettazione di interventi di biorisanamento in situ.

In tali analisi, l'acqua di falda proveniente da un sito contaminato viene posta all'interno di bottiglie da siero, da 119 mL, in modo da riprodurre le condizioni naturalmente presenti nella falda o potenzialmente realizzabili attraverso l'aggiunta nell'acquifero di opportune sostanze ammendanti (nutrienti, donatori di elettroni etc...). In larga misura, la necessit  di condurre studi di microcosmo deriva dal fatto che acquiferi contaminati, cos  come nella maggior parte dei sistemi ambientali, differiscono in termini di composizione microbica. Di conseguenza non e' generalmente possibile prevedere, sulla sola base di dati analitici relativi alla composizione della falda e del sottosuolo, se in un determinato acquifero siano presenti i microrganismi e le condizioni ambientali potenzialmente favorevoli al procedere dei processi di biorisanamento.

In maniera pi  specifica, studi di microcosmo consentono di rispondere alle seguenti domande:

- sono attive nell'acquifero popolazioni microbiche native in grado di condurre la dechlorazione riduttiva dei contaminanti clorurati di interesse?
- E' possibile accelerare i processi di dechlorazione riduttiva mediante l'aggiunta nell'acquifero di un opportuno donatore di elettroni?

- La dechlorazione riduttiva dei contaminanti clorurati porta alla formazione di prodotti non-clorurati e non-tossici quali ad es. etano o etilene, o comporta soltanto ad un più basso grado di clorurazione?
- Quali sono (come ordine di grandezza) le velocità di dechlorazione riduttiva dei contaminanti?
- Quanto substrato donatore di elettroni è necessario per sostenere la dechlorazione riduttiva dei contaminanti clorurati, anche in presenza di metabolismi in competizione con la dechlorazione riduttiva per il consumo del donatore di elettroni?
- L'acqua di falda contiene sostanze tossiche o inibenti che reprimono l'attività biologica?

Le applicazioni eseguite in dipartimento, durante il periodo di ricerca in laboratorio, si sono concentrate su due principali studi:

- analisi di consorzi batterici con diversi substrati donatori di elettroni (metano e pentano), presenti in acque contenenti principalmente TCE e TeCA, provenienti da un sito contaminato (A-M, A-PE);
- riattivazione di consorzi batterici, conservati in laboratorio a 15°C perché utilizzati nei precedenti studi sulla biodegradazione, alimentati con metano e utilizzati per la dechlorazione di *cis-DCE* e *cloruro di vinile* (B1, B2, B3, B4, B5, B6).

## 8.1 Preparazione dei microcosmi

I microcosmi sono stati preparati in vials da 119 mL, sigillate mediante setti forabili in gomma butile rivestita in Teflon e ghiera di alluminio. Sia le bottiglie che i setti sono stati autoclavati, a 120°C per 20 min, prima dell'uso per evitare la contaminazione di altri microrganismi diversi da quelli nativi.

Per la fase di riattivazione dei batteri metanotrofi, B1-B2-B3-B4-B5-B6, le 6 vials sono state riempite con 60 mL di acqua arricchita, in modo tale da ricreare le condizioni reali, dove sono stati inoculati i batteri; mentre per la fase di analisi dei batteri presenti in falda contaminata, le vials, A-M e A-PE, sono state

riempite con 40 mL di acqua proveniente dal sito. Da notare che tutte le bottiglie preparate hanno uno spazio di testa in fase gas utile ai fini delle analisi al gascromatografo.

Le operazioni di preparazione dei microcosmi sono tutte state effettuate sotto cappa a flusso laminare, utilizzando tutti gli strumenti autoclavati al fine evitare la contaminazione dei consorzi batterici.

Una volta preparati i microcosmi, le vials sono state incubate a temperatura di laboratorio, 30°C, e mantenute sotto agitazione a 125 giri/min.

## **8.2 Prove di degradazione TCE e TeCA da parte di microcosmi contenuti in acqua di falda.**

Per la degradazione dei due solventi clorurati, TCE e TeCA, e' stato utilizzato un solo consorzio batterico, proveniente da una falda contaminata da clorurati, e lo studio non si e' ristretto ad un unico substrato, ma le acque sono state suddivise in 5 vials che sono state alimentate, oltre che dall'ossigeno, da 5 substrati differenti: metano, butano, pentano, propano e fenolo (A-M, A-B, A-PE, A-PR, A-FE).

Come detto, lo studio di microcosmo e' fondamentale per verificare la possibilità di ottenere la dechlorazione riduttiva completa fino a composti non tossici oppure la necessità di implementare un post-trattamento ossidativo degli intermedi a minor grado di clorurazione. Tale possibilità e' dipendente dal tipo di donatore di elettroni aggiunto e per questo che si e' organizzata la prova con differenti substrati solubili. Lo studio seguente si e' focalizzato solo al metabolismo dei batteri alimentati con metano (gas) e pentano (liquido) per motivi logistici di approvvigionamento.

Molto importante, al fine di ottenere una buona riuscita dell'esperimento in laboratorio e dei dati che rappresentano in modo veritiero la realtà, e' la fase di prelievo dei campioni di acqua di falda contaminata: durante le fasi di campionamento, il contatto dell'acqua con l'atmosfera deve essere minimizzato in modo da limitare le perdite dei contaminanti per volatilizzazione e l'ossigenazione del campione. Occorre quindi utilizzare un sistema in flusso con

possibilità di chiusura di ingresso ed uscita per il trasferimento successivo in laboratorio. L'acqua dovrà essere conservata in bottiglie con tenuta ermetica in vetro scuro, riempite fino all'orlo. Tali bottiglie dovranno essere conservate in frigorifero a 4°C, fino al momento dell'uso.

Sono state seguite le stesse procedure di alimentazione e analisi descritte nei capitoli precedenti (ossigenazione, iniezione del substrato e relative analisi gascromatografate effettuate dopo 15 minuti per avere l'equilibrio nelle vials). I quantitativi, del substrato da somministrare ai batteri, sono stati calcolati su basi di precedenti studi:

- 11 mL di metano in fase gas per il microsmo contenuto nella vial A-M;
- 11,2 µL di pentano in fase liquida per il microcosmo nella vial A-PE.

Anche l'attrezzatura utilizzata per la realizzazione delle seguenti prove e' la stessa descritta nei capitoli precedenti, per evitare la contaminazione di altri microrganismi diversi da quelli nativi.

Possiamo distinguere due fasi della prova di degradazione dei clorurati:

- FASE 1: si e' monitorata la riduzione della concentrazione degli inquinanti contenuti nelle acque di falda;
- FASE 2: una volta annullata la presenza dei contaminanti che caratterizzavano le acque di falda pervenute in laboratorio, si sono iniettati, nelle vials A-M e A-PE, i solventi TCE e TeCA in modo da avere delle concentrazioni pari a 1mg/L (32,26 µL di TCE e 13,32 µL di TeCA); e di seguito e' stata monitorata la loro degradazione nel tempo.

Dopodiché si e' iniettato nelle due vials i seguenti quantitativi: 32,26 µL di TCE e 13,32 µL di TeCA; per avere delle concentrazioni in acqua dell'ordine di 1 mg/L.

Di seguito sono riportati i grafici (concentrazione/tempo), le stime delle regressioni lineari, le velocità di degradazione e le costanti di pseudo-1°ordine ( $r/c_p$ ), ottenuti andando ad analizzare la più significativa e rappresentativa diminuzione di picco della concentrazione fino a valori prossimi allo zero, per ogni singolo caso utilizzando le formule riportate nel paragrafo precedente.

## 8.2.1 Velocità di degradazione A-M, A-PE

Calcolo della velocità di degradazione dell'i-esimo contaminante

$$r_i = \left| \frac{dm_i}{dt} \right| \cdot \frac{1}{V_L} \quad 8.1$$

$$m_i = V_L \cdot c_{Li} + V_G \cdot c_{Gi} \quad 8.2$$

$$c_{Gi} = H_{Ci} \cdot c_{Li} \quad 8.3$$

$$m_i = c_{Li} \cdot (V_L + H_{Ci} \cdot V_G) \quad 8.4$$

$$r_i = \frac{V_L + H_{Ci} V_G}{V_L} \times \left| \frac{dc_{Li}}{dt} \right| = \left( 1 + H_{Ci} \frac{V_G}{V_L} \right) \times \left| \frac{dc_{Li}}{dt} \right| \quad 8.5$$

Dove:

$r_i$  = velocità di degradazioni dell'i-esimo inquinante [mg/L/d];

$m_i$  = massa dell'i-esimo inquinante [mg];

$V_L$  e  $V_G$  = volume fase liquida e volume fase gassosa della vials [mL];

$c_{Li}$  e  $c_{Gi}$  = concentrazione in fase liquida ( $c_{Li}$ ) e in fase gassosa ( $c_{Gi}$ ) dell'i-esimo inquinante [mg/L];

$H_{Ci}$  = costante di Henry adimensionale, a 30°C, dell'i-esimo inquinante.

Il termine  $\frac{dc_{Li}}{dt}$  dell'equazione 8.5, rappresenta la *regressione lineare* dei punti presenti nel grafico che descrive la diminuzione dell'i-esimo inquinante in funzione del tempo.

Di seguito sono riportati i grafici (concentrazione/tempo), le stime delle regressioni lineari, le velocità di degradazione e le costanti di pseudo-1°ordine ( $r/c_p$ ), ottenuti andando ad analizzare una media rappresentativa della diminuzione di picco della concentrazione fino a valori prossimi allo zero, per ogni singolo caso utilizzando le formule di sopra riportate.

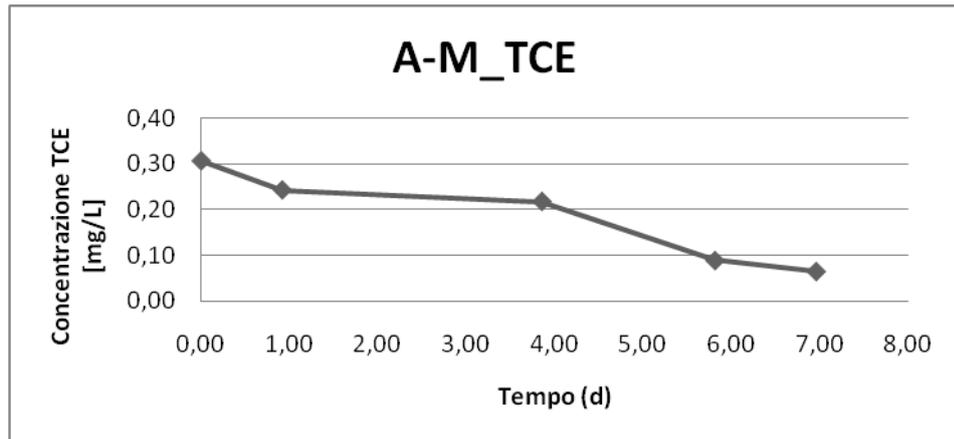


Fig.13 – Andamento della concentrazione del TCE nel tempo in A-M.

$$\frac{dc_{TCE}}{dt} = 0,03 \text{ [mg/L/d]}$$

$$r_{TCE\_A-M} = 0,05 \text{ [mg/L/d]}$$

$$r/c_p = 0,16 \text{ [1/d]}$$

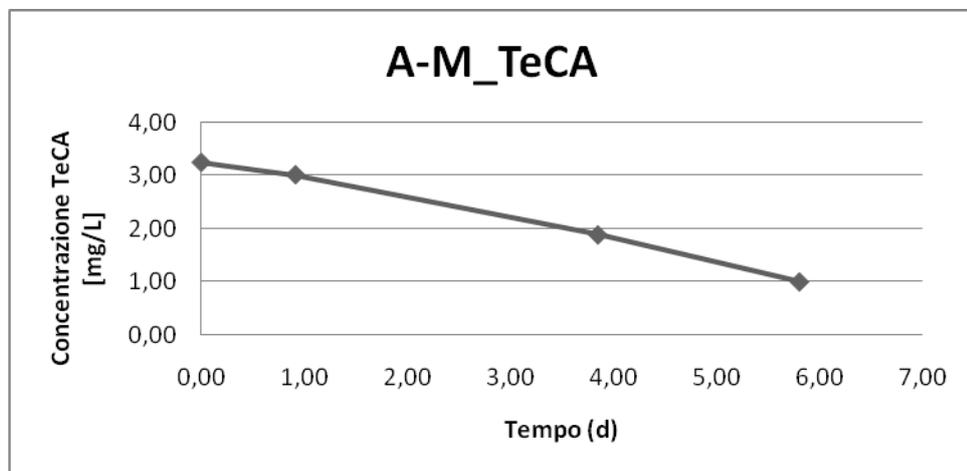


Fig.14 – Andamento della concentrazione del TeCA nel tempo in A-M.

$$\frac{dc_{TeCA}}{dt} = 0,39 \text{ [mg/L/d]}$$

$$r_{TeCA_{A-M}} = 0,40 \text{ [mg/L/d]}$$

$$r/c_p = 0,12 \text{ [1/d]}$$

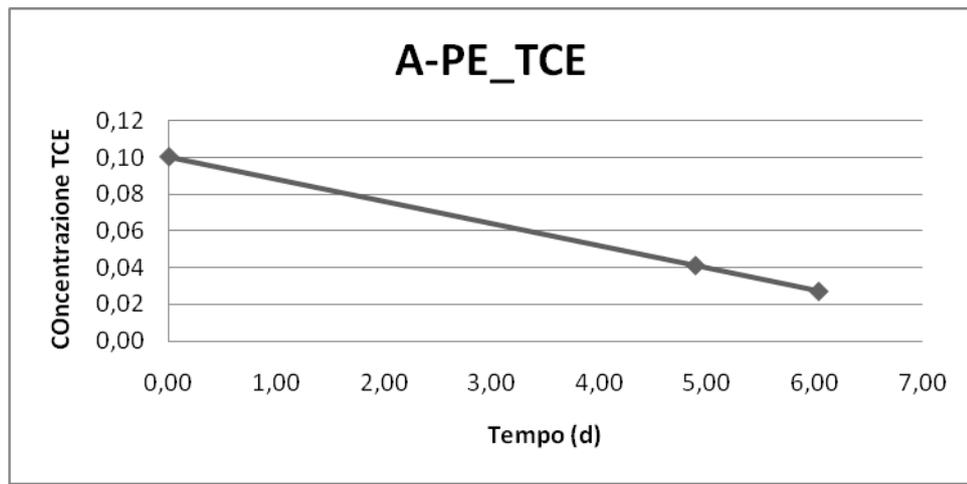


Fig.15– Andamento della concentrazione del TCE nel tempo in A-PE.

$$\frac{dc_{TCE}}{dt} = 0,01 \text{ [mg/L/d]}$$

$$r_{TCE_{A-PE}} = 0,02 \text{ [mg/L/d]}$$

$$r/c_p = 0,18 \text{ [1/d]}$$

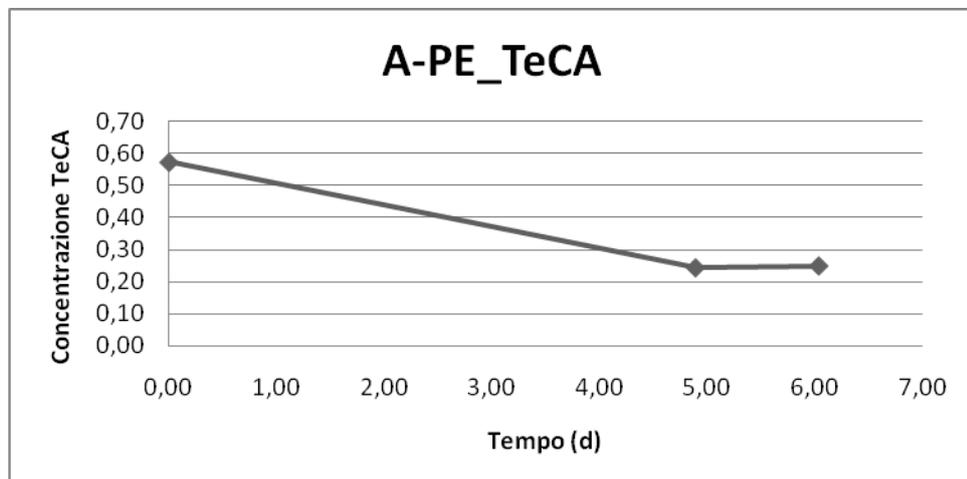


Fig.16 – *Andamento della concentrazione del TeCA nel tempo in A-PE.*

$$\frac{dc_{TeCA}}{dt} = 0,06 \text{ [mg/L/d]}$$

$$r_{TeCA_{A-PE}} = 0,06 \text{ [mg/L/d]}$$

$$r/c_p = 0,10 \text{ [1/d]}$$

“ $c_p$ ” e’ il valore della concentrazione del picco, cioè la concentrazione iniziale dell’ $i$ -esimo componente.

Per i calcoli delle velocità si sono usate le costanti di Henry, a 30°C, per i due contaminanti:

- per il TCE,  $H = 0,495$
- per il TeCA,  $H = 0,02$

Come possiamo notare dai grafici le concentrazioni iniziali,  $c_p$ , variano a seconda del contaminante e del substrato di crescita, che vengono degradate tutte con valori prossimi allo zero.

Se confrontiamo le *costanti di pseudo-1°ordine*, esse sono quasi uguali e sono dell’ordine dei 0,14 [1/d].

### **8.3 Riattivazione batteri metanotrofi**

I microcosmi di batteri metanotrofi, B1-B2-B3-B4-B5-B6, sono stati riattivati per lo studio della dechlorazione del cis-DCE e del Cloruro di Vinile,VC.

Per riattivare i batteri si e’ fatto riferimento a precedenti studi sui microcosmi metanotrofi e sono state eseguite le seguenti procedure per ogni vials:

1. iniezione di 12 mL di ossigeno puro, oppure, in sostituzione, le vials sono state flussate con aria compressa per un periodo di 5 minuti;
2. iniezione di 10 mL di metano in fase gas;

3. dopo 15 minuti di agitatore, dall'iniezione del substrato, sono state effettuate l'analisi al gascromatografo per misurare la concentrazione iniziale del metano, così da poter osservare con i dati di successive prove cromatografiche il metabolismo batteriologico, quest'intervallo di tempo è sufficiente per arrivare all'equilibrio di concentrazione del substrato tra le 2 fasi, acqua-gas, presenti nelle vials..

Il metano utilizzato è stato prelevato, attraverso una doppia beuta ed un ago con filtro, dall'impianto di alimentazione del laboratorio ed è stato iniettato utilizzando una siringa monouso da 5 mL per ogni consorzio batterico.

Una volta effettuate tutte le iniezioni si è lasciato agitare per 15 minuti le vials, tramite agitatore a 125 giri/min. a 30°C, per arrivare all'equilibrio tra le due fasi presenti nelle bottigliette, prima di analizzare le concentrazioni attraverso gascromatografo.

Al gascromatografo, usando il rivelatore FID (Detector a Ionizzazione di Fiamma), si è analizzato un volume pari a 100 µL di gas prelevato dallo spazio di testa di ogni vial per verificare la composizione di tale campione. Di seguito sono riportati i dati ottenuti in laboratorio durante la fase di riattivazione dei diversi microcosmi.

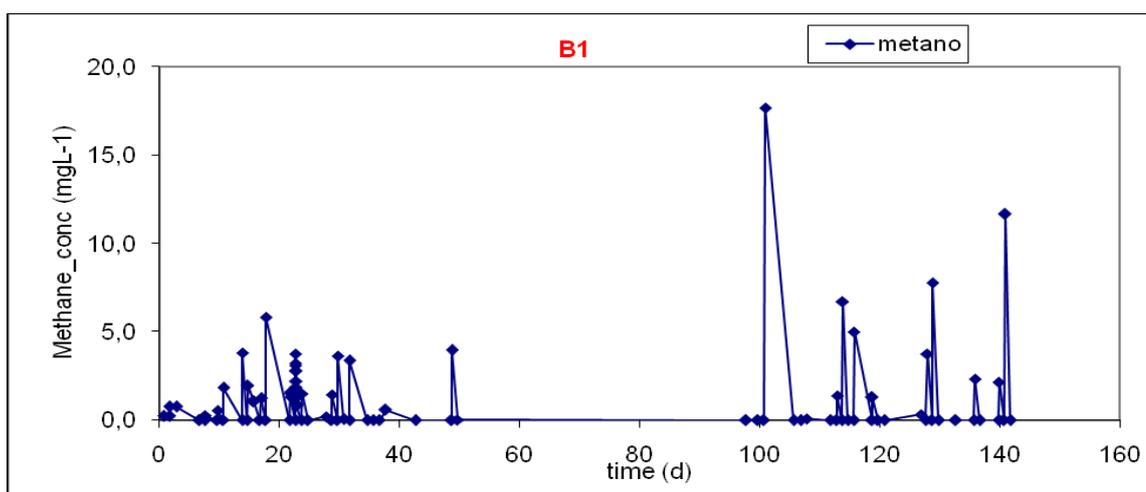


Fig.17 - Consumo metano da parte del consorzio batterico B1.

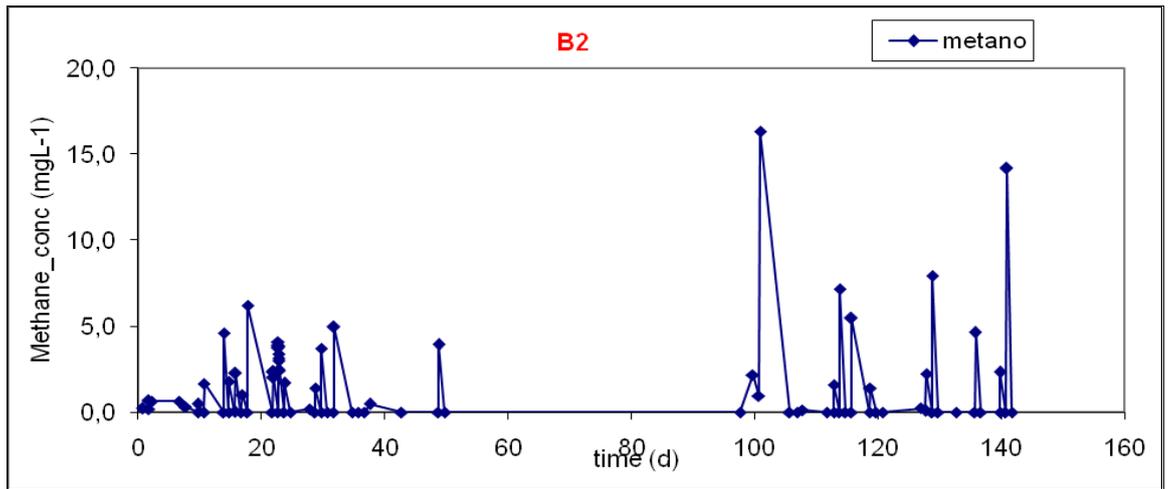


Fig.18 - Consumo metano da parte del consorzio batterico B2.

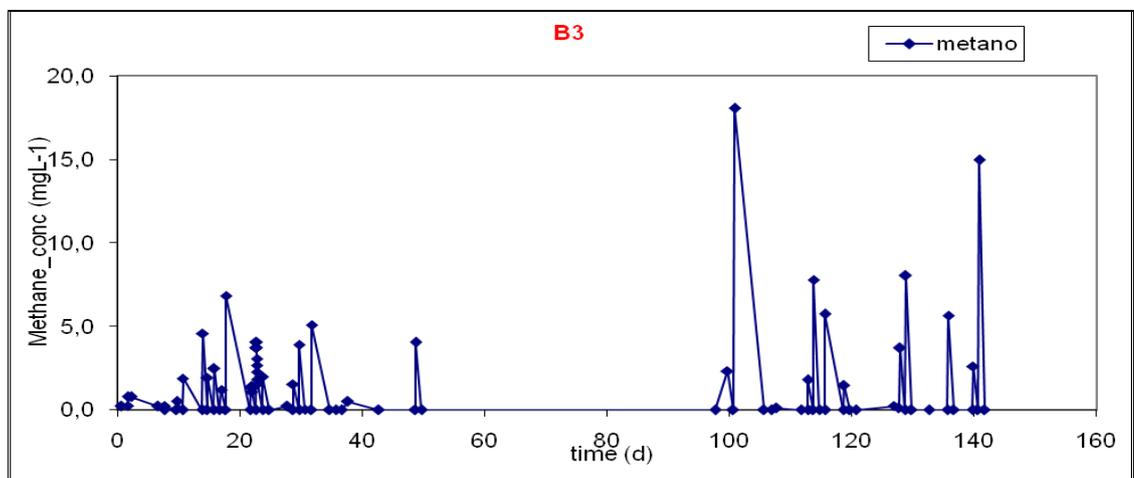


Fig.19 - Consumo metano da parte del consorzio batterico B3.

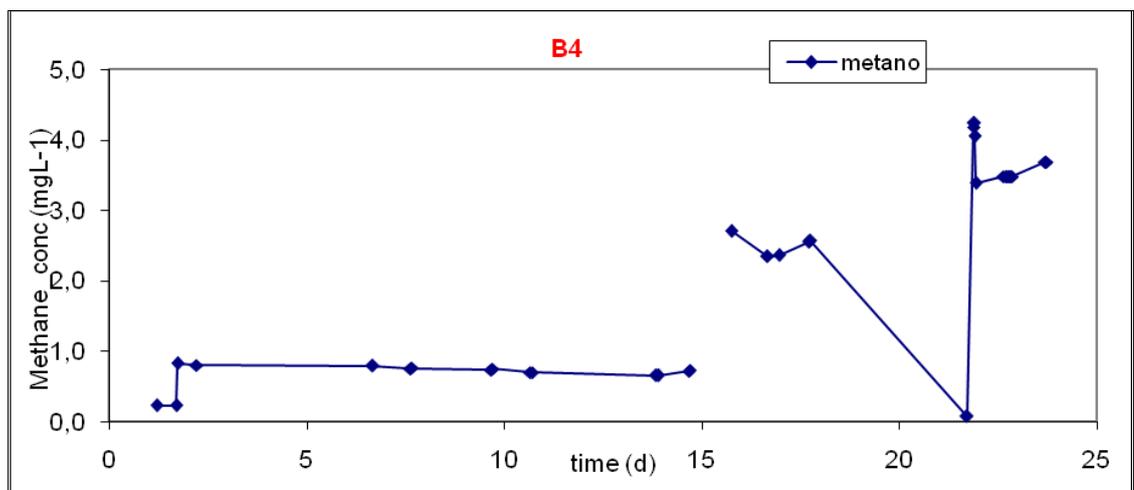


Fig.20 - Consumo metano da parte del consorzio batterico B4.

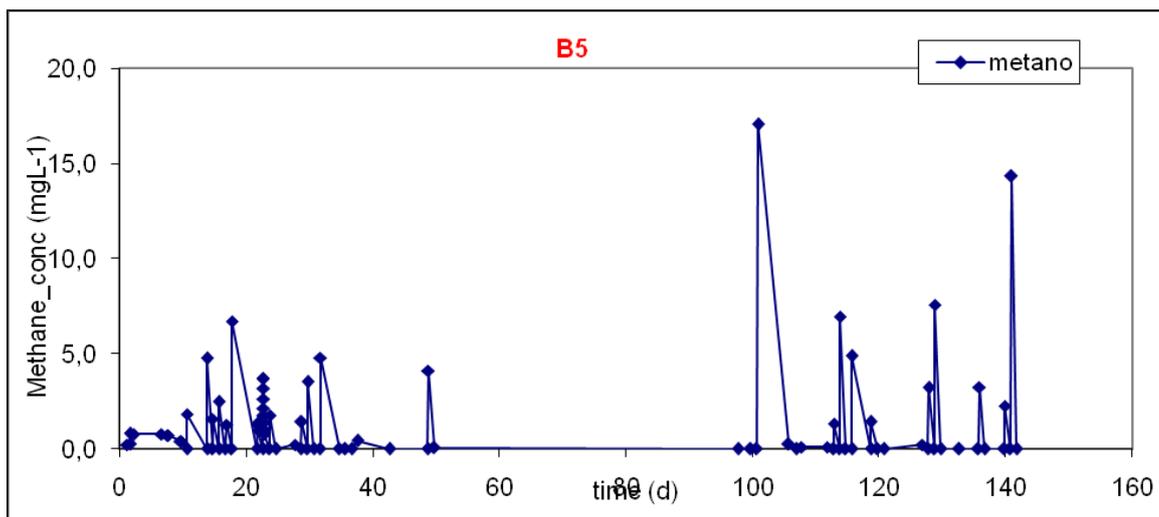


Fig.21 - Consumo metano da parte del consorzio batterico B5.

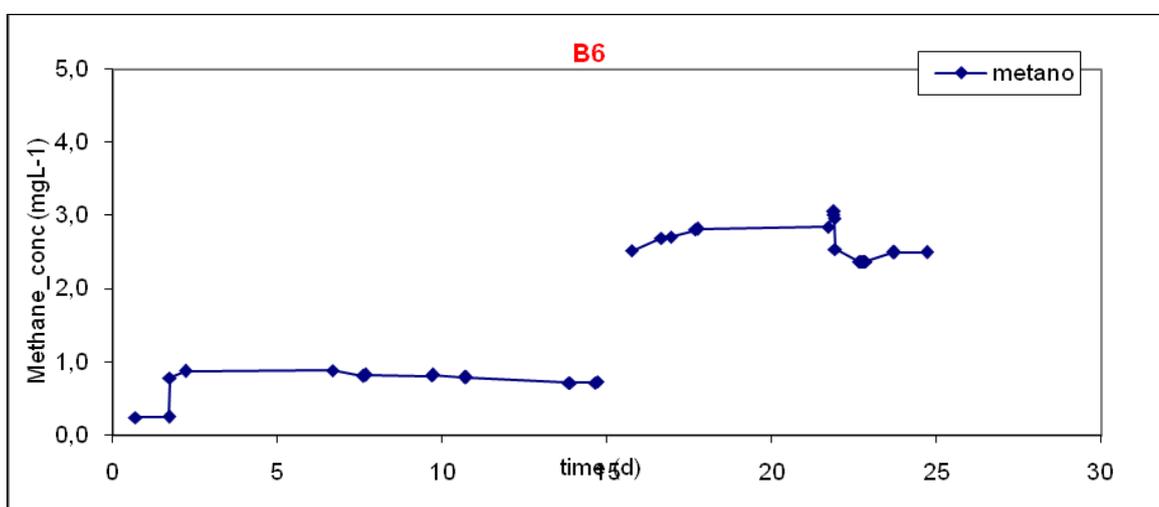


Fig.22 - Consumo metano da parte del consorzio batterico B6.

Come si può osservare dai diagrammi riportati i picchi dei grafici rappresentano le concentrazioni misurate a 15 minuti dall'iniezione di metano.

Le analisi gascromatografiche sono state eseguite con una cadenza media di due giorni, e quando la concentrazione del substrato era prossimo allo zero sono state effettuate di nuovo le procedura di riattivazione riportate precedentemente.

Dai grafici si può notare che:

- per i primi 50 giorni i picchi delle concentrazioni del substrato erano di ordine dei 5/6 mg/L e sono stati annullati con un intervallo di tempo in

media di 2 giorni, questa relazione ha confermato la riattivazione dei batteri;

- durante il periodo compreso tra 50 e 100 giorni non sono state effettuate analisi, le vials sono rimaste in agitazione a temperatura costante di 30°C;
- per il periodo tra 100 e 140 giorni, ripresa la procedura di attivazione, si sono registrati picchi più alti dell'ordine di 15 mg/L, comunque metabolizzati dai batteri sempre con intervalli temporali di 2 massimo 5 giorni.

Nel caso dei consorzi B4 e B6 si può notare che l'ascissa temporale è minore rispetto agli altri ceppi batterici e le concentrazioni di metano risultano quasi costanti, questo vuol dire che i batteri non si riattivano e quindi sono stati bloccati e riposti in frigo dopo il 25 giorno di prove.

### **8.3.1 Prove di degradazione cis-DCE e Cloruro di Vinile**

I consorzi di batteri riattivati (B1, B2, B3, B5), cioè quelli che hanno dimostrato una buona cinetica di consumo del substrato di crescita, metano, sono stati impiegati nelle prove di degradazione di due solventi clorurati quali: cis-DCE e Cloruro di Vinile.

Queste prove sono state eseguite in due momenti differenti come si può notare dai grafici:

- cis-DCE, tra il 20-esimo ed il 50-esimo giorno di riattivazione;
- VC, tra il 110-esimo ed il 120-esimo giorno di riattivazione.

Le prove consistono nell'iniezione di inquinanti nelle vials, con quantitativi che ci permettono di avere delle concentrazioni desiderate: 0,5 mg/L per il cis-DCE e 1 mg/L per il cloruro di vinile, ed i relativi valori risultanti dai calcoli sono rispettivamente 10,19 µL di cis-DCE e 53,73 µL di VC.

Dati i piccoli quantitativi da fornire che risultano anche difficili da gestire a mano e con gli strumenti in dotazione per la prova, si può osservare che non sempre le concentrazioni sono state quelle calcolate, anzi come nel caso del cloruro di

vinile si e' ecceduti nell'iniezione del contaminante proprio per vedere come reagivano i batteri.

Le concentrazioni dei solventi clorutati (cis-DCE e VC) sono state analizzate mediante gascromatografo, usando il rivelatore  $\mu$ -ECD (Detector a Cattura di Elettroni), sempre iniettando un'aliquota di 100  $\mu$ L della fase gassosa prelevata dallo spazio di testa di ogni singola vials.

Come già specificato nel capitolo 6 (Metodiche analitiche e sperimentali), la quantificazione del segnale cromatografico (area del picco) avviene tramite retta di calibrazione, ottenuta dalla regressione lineare delle aree dei picchi cromatografici registrati dall'analisi della fase gassosa di bottiglie standard a concentrazione nota ( e alla stessa temperatura dei microcosmi, cioè a 30°C).

Di seguito vengono riportati i grafici che riportano i risultati della degradazione dei solventi clorurati considerati.

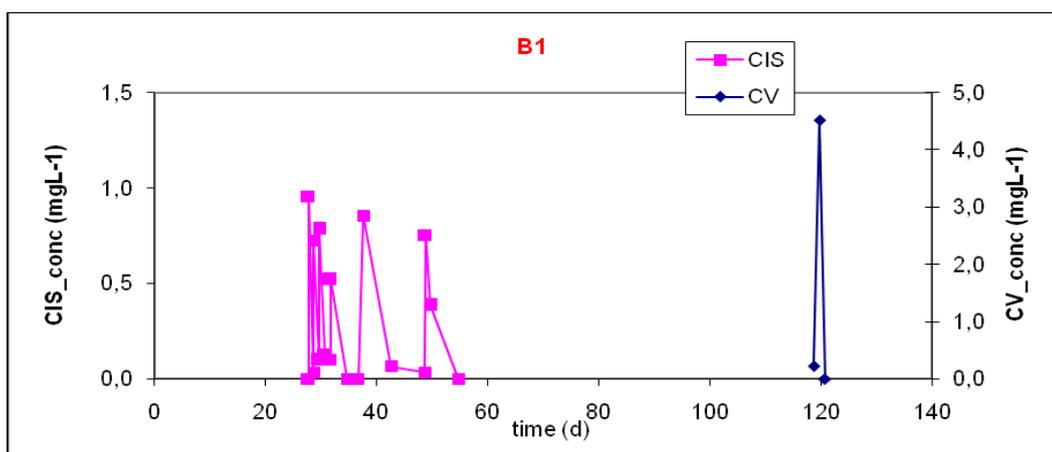


Fig.23 – Degradazione cis-DCE e VC da parte del consorzio batterico B1.

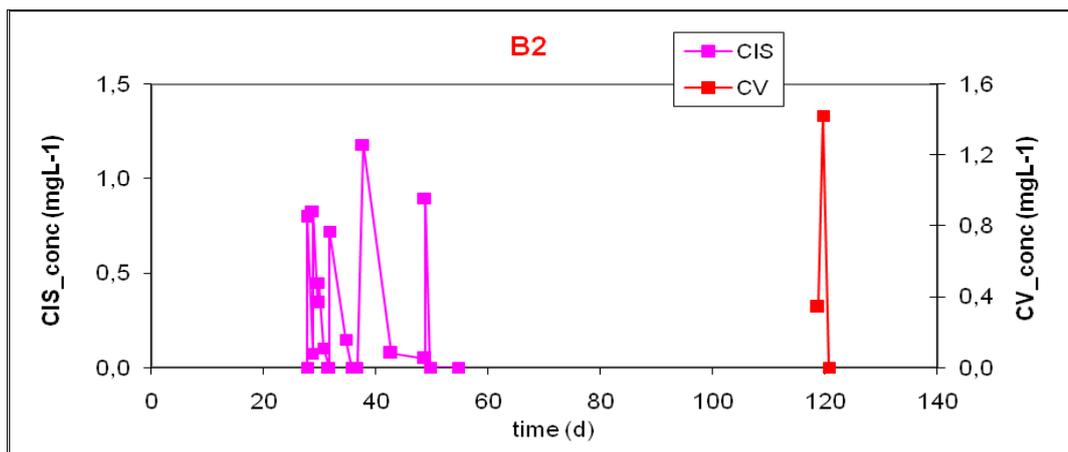


Fig.24 – Degradazione cis-DCE e VC da parte del consorzio batterico B2.

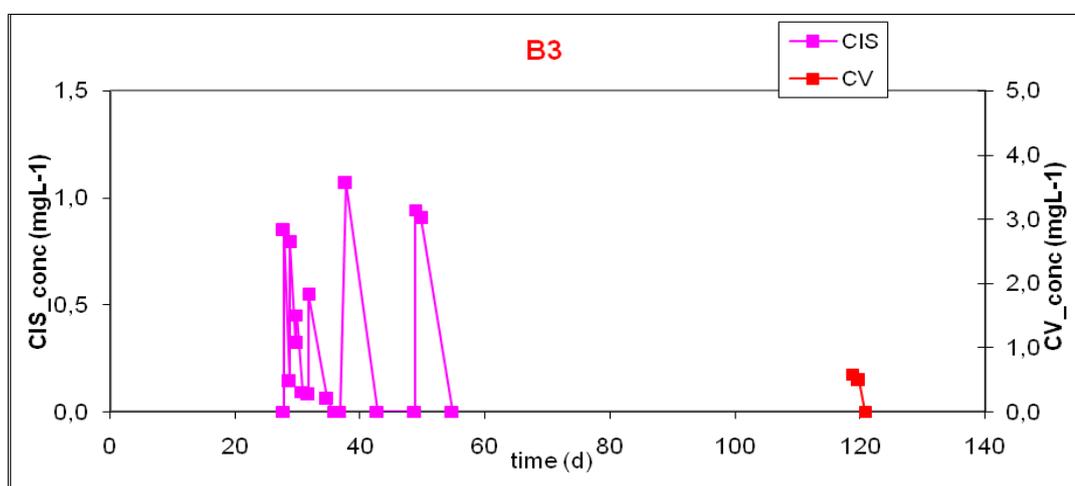


Fig.25 – Degradazione cis-DCE e VC da parte del consorzio batterico B3.

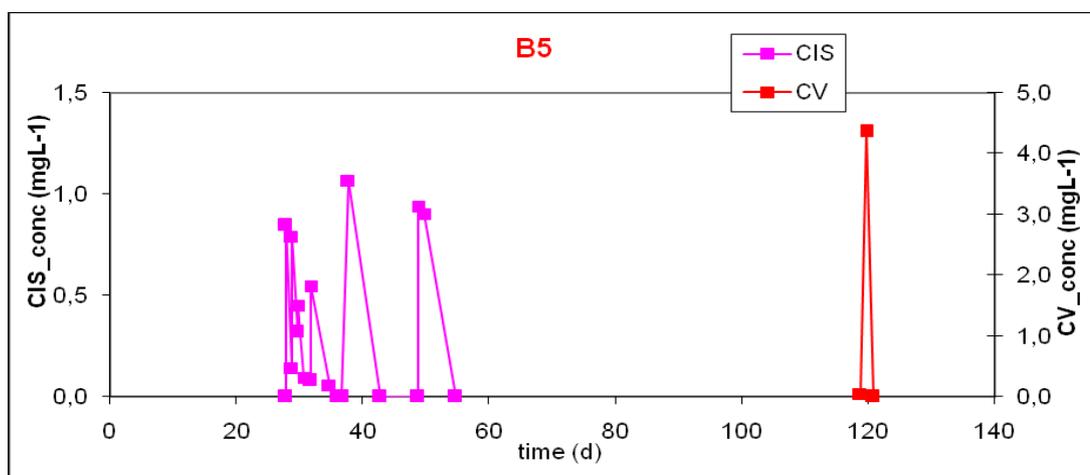


Fig.26 – Degradazione cis-DCE e VC da parte del consorzio batterico B5.

I picchi riportati nei grafici coincidono con le iniezioni dei clorurati nelle vials (per avere l'equilibrio tra le 2 fasi liquido-gas delle concentrazioni degli inquinanti, prima dell'analisi si sono aspettati i 15 minuti come riportato nelle procedure di analisi nel paragrafo precedente).

Dai grafici si può notare che:

- per le prove di degradazione del cis-DCE sono stati effettuati più puls, per poter avere più dati da utilizzare nell'analisi del cometablismo e studiare le velocità di degradazione;
- per le prove con il VC si e' effettuato un solo pulso per controllare se i batteri riescono a degradarlo e se non sono inibiti dalle caratteristiche tossicologiche del solvente clorurato iniettato;

i due contaminanti vengono degradati con tempi dello stesso ordine; per il cis-DCE i batteri impiegano dai 2 ai 5 giorni, mentre per il VC 2 giorni.

### 8.3.2 Velocità di degradazione B1,B2,B3,B5

Di seguito sono riportati i grafici (concentrazione/tempo), le stime delle regressioni lineari, le velocità di degradazione e le costanti di pseudo-1°ordine ( $r/c_p$ ), ottenuti andando ad analizzare una media rappresentativa della diminuzione di picco della concentrazione fino a valori prossimi allo zero, per ogni singolo caso precedentemente descritto.

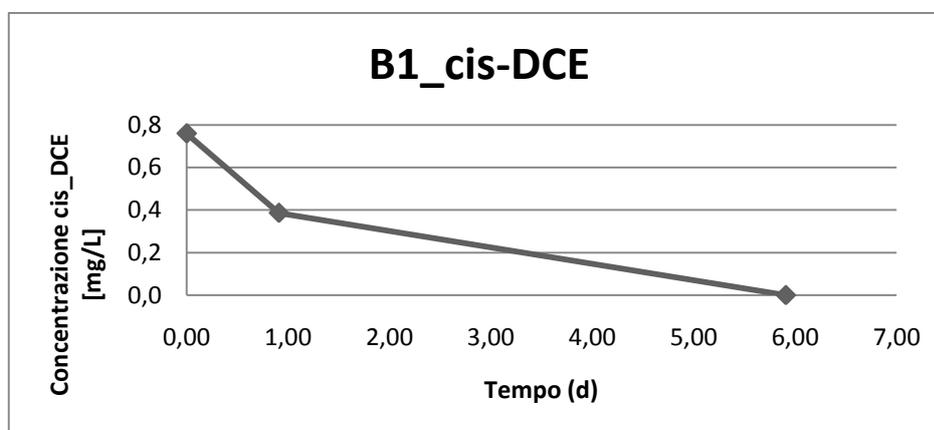


Fig.27 – Andamento della concentrazione del cis-DCE nel tempo in B1.

$$\frac{dc_{L,cis-DCE}}{dt} = 0,11 \text{ [mg/L/d]}$$

$$r_{cis-DCE\_B1} = 0,13 \text{ [mg/L/d]}$$

$$r/c_p = 0,17 \text{ [1/d]}$$

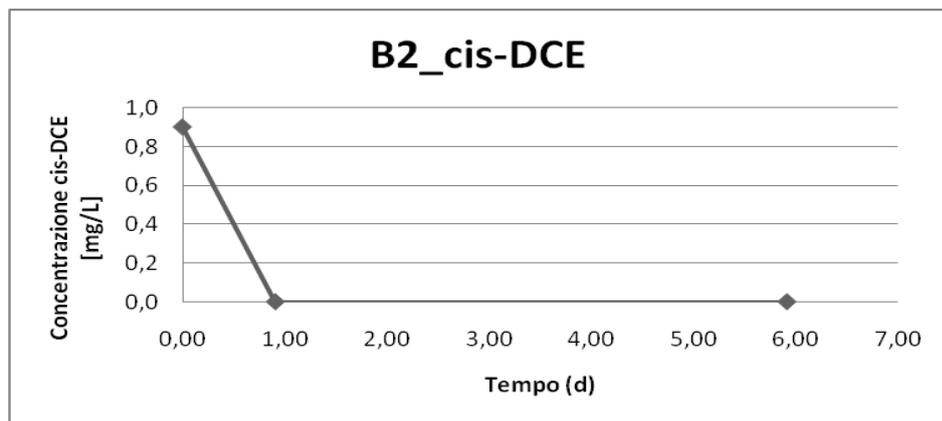


Fig.28 – Andamento della concentrazione del cis-DCE nel tempo in B2.

$$\frac{dc_{L,cis-DCE}}{dt} = 0,10 \text{ [mg/L/d]}$$

$$r_{cis-DCE\_B2} = 0,12 \text{ [mg/L/d]}$$

$$r/c_p = 0,13 \text{ [1/d]}$$

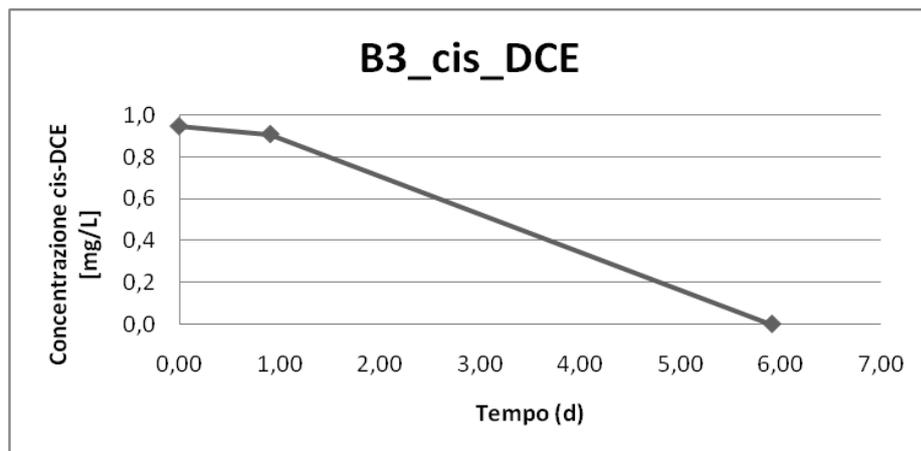


Fig.29 – Andamento della concentrazione del cis-DCE nel tempo in B3.

$$\frac{dc_{L,cis-DCE}}{dt} = 0,17 \text{ [mg/L/d]}$$

$$r_{cis-DCE\_B3} = 0,19 \text{ [mg/L/d]}$$

$$r/c_p = 0,21 \text{ [1/d]}$$

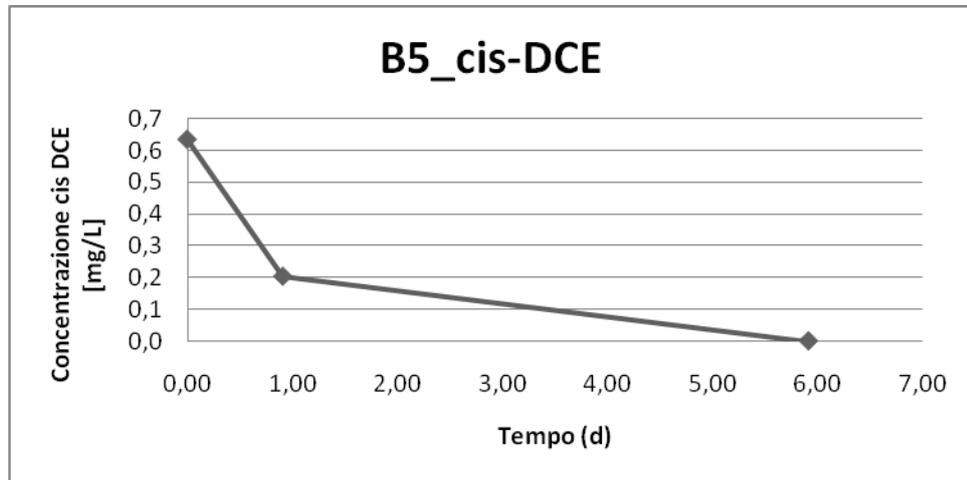


Fig.30 – Andamento della concentrazione del cis-DCE nel tempo in B5.

$$\frac{dc_{L,cis-DCE}}{dt} = 0,08 \text{ [mg/L/d]}$$

$$r_{cis-DCE\_B5} = 0,10 \text{ [mg/L/d]}$$

$$r/c_p = 0,16 \text{ [1/d]}$$

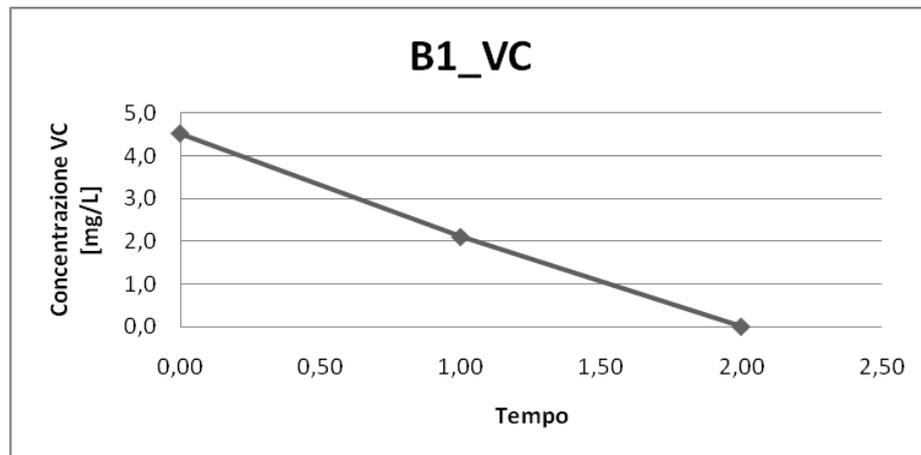


Fig.31 – Andamento della concentrazione del VC nel tempo in B1.

$$\frac{dc_{L,VC}}{dt} = 2,26 \text{ [mg/L/d]}$$

$$r_{VC\_B1} = 5,09 \text{ [mg/L/d]}$$

$$r/c_p = 1,14 \text{ [1/d]}$$

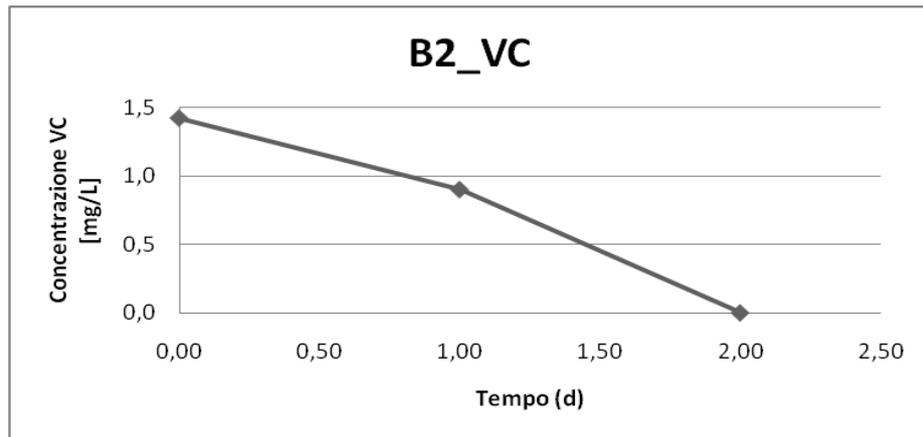


Fig.32 – Andamento della concentrazione del VC nel tempo in B2.

$$\frac{dc_{L,VC}}{dt} = 0,71 \text{ [mg/L/d]}$$

$$r_{VC\_B2} = 1,59 \text{ [mg/L/d]}$$

$$r/c_p = 1,13 \text{ [1/d]}$$

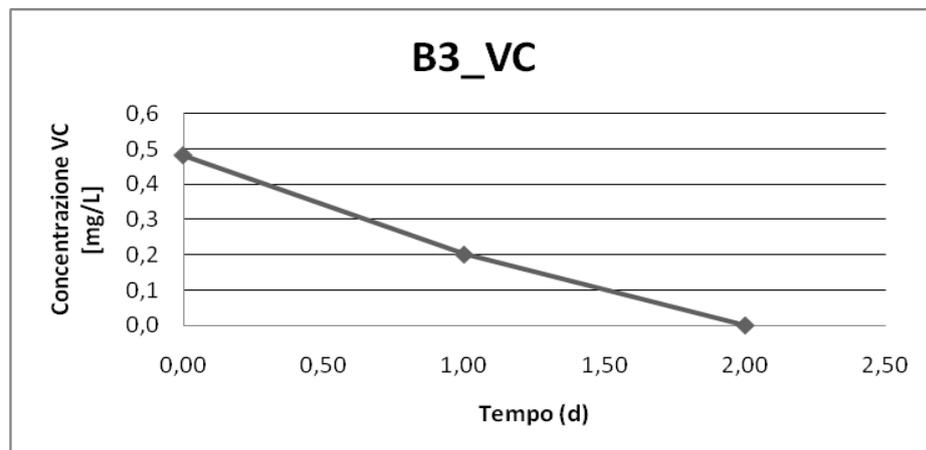


Fig.33 – Andamento della concentrazione del VC nel tempo in B3.

$$\frac{dc_{L,VC}}{dt} = 0,24 \text{ [mg/L/d]}$$

$$r_{VC\_B3} = 0,54 \text{ [mg/L/d]}$$

$$r/c_p = 1,08 \text{ [1/d]}$$

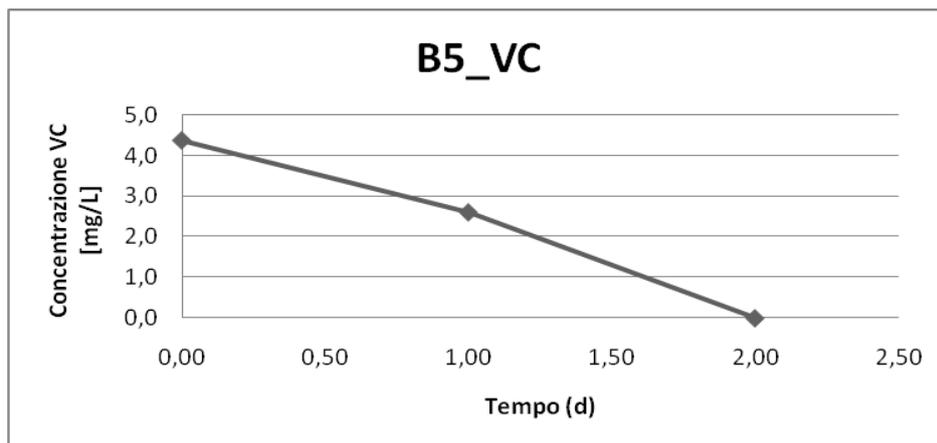


Fig.34 – Andamento della concentrazione del VC nel tempo in B4.

$$\frac{dc_{VC}}{dt} = 2,18 \text{ [mg/L/d]}$$

$$r_{VC\_B4} = 4,91 \text{ [mg/L/d]}$$

$$r/c_p = 1,11 \text{ [1/d]}$$

“ $c_p$ ” e’ il valore della concentrazione del picco, cioè la concentrazione iniziale dell’i-esimo componente.

Per i calcoli delle velocità si sono usate le costanti di Henry, a 30°C, per i due contaminanti:

- per il cis-DCE,  $H = 0,191$
- per il Cloruro di Vinile - VC,  $H = 1,271$

Confrontando i grafici di degradazione del cis-DCE dei 4 consorzi batterici selezionati possiamo notare che i valori delle concentrazioni iniziali,  $c_p$ , sono dello stesso ordine e sono comprese in un intervallo da 0,6 a circa 1 mg/L. Per quanto riguarda l’intervallo di tempo in cui le  $c_p$  sono degradate sino alla completa dechlorazione del contaminante, a parte il microcosmo B2 che in un giorno riesce ad abbattere una concentrazione pari 0,9 mg/L, il resto dei consorzi batterici impiegano mediamente 6 giorni. Le velocità di degradazione sono anch’esse dello stesso ordine, ma si può constatare che B3 ha costante di pseudo-1°ordine maggiore (0,21 [1/d]) rispetto agli altri. Invece, analizzando i grafici di degradazione del Cloruro di Vinile, VC, le concentrazioni iniziali non

sono dello stesso ordine, infatti a parte i microcosmi B1 e B5 che hanno una  $c_p$  di circa 4,5 mg/L, B3 e B2 hanno rispettivamente una  $c_p$  di 0,5 e 1,4 mg/L. Rispetto al cis-DCE, per quanto riguarda il tempo di degradazione del VC, esso e' più breve intorno ai 2 giorni, e i microcosmi hanno velocità degradazione dell'ordine di 1,1 mg/L/d.

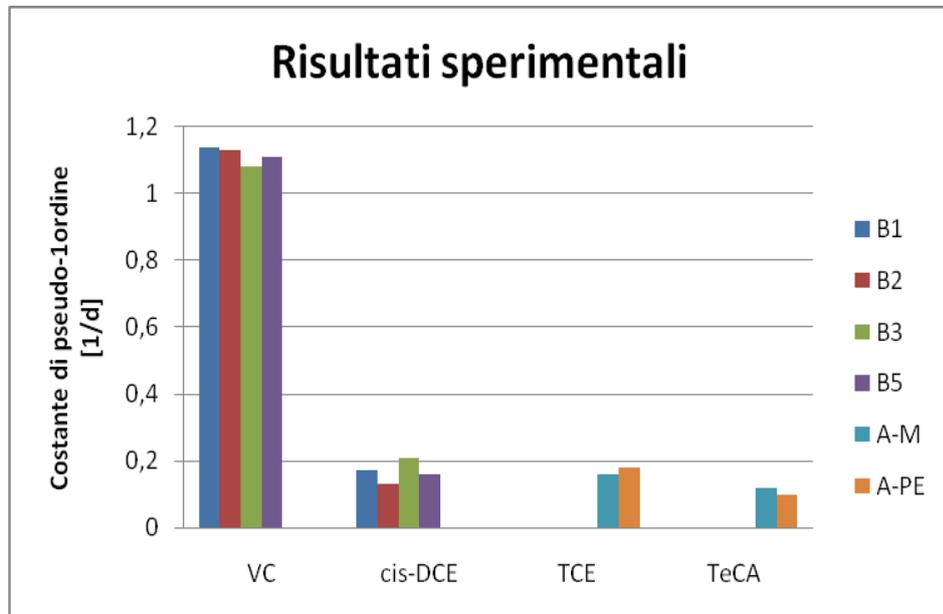


Fig.35 – Confronto risultati sperimentali della costante di pseudo-1°ordine.

## Capitolo 9 - ORC – Oxygen Release Compound

L'oggetto di studio di questa tesi, come riportato precedentemente, è la biodegradazione di solventi clorurati in ambiente aerobico, cioè in presenza di ossigeno.

Nelle reazioni di ossidazione dei clorurati, mediate da microcosmi batterici, il solvente funge da donatore di elettroni, mentre l'ossigeno è l'accettore di elettroni.

La disponibilità di accettori di elettroni è una delle maggiori limitazioni per la velocità di degradazione dei contaminanti e, la maggiore quantità di energia disponibile per i batteri deriva dalla riduzione dell'ossigeno.

Vista l'importanza della presenza di ossigeno durante i processi degradativi dei solventi alifatici clorurati, si è deciso di dedicare un intero capitolo alla descrizione delle prove effettuate in laboratorio sulla sperimentazione degli ORC (Oxygen Release Compound – composti che rilasciano ossigeno).

Gli ORC sono dei composti, a base di perossido, che a contatto con l'acqua si trasformano in idrossidi con conseguente rilascio di ossigeno disciolto. Questa tecnologia è utilizzata per introdurre ossigeno in un acquifero contaminato attraverso due modalità:

- iniezione a pressione (utilizzando una pompa) nella zona di contaminazione di una miscela di ORC e acqua;
- posizionamento di bio-barriere, cilindri permeabili costituiti da reti metalliche contenenti gli ORC, che intercettando il flusso delle acque di falda rilasciano ossigeno disciolto.

Tali metodologie stimolano l'attività naturale di autodepurazione del suolo favorendo la crescita di famiglie batteriche naturali che metabolizzano gli idrocarburi, una volta nella falda acquifera, minuscole particelle di ORC producono un lento rilascio controllato di ossigeno, per periodi fino a 12 mesi.

Per quanto riguarda i siti contaminati da solventi clorurati, il rilascio di ossigeno da parte di questo sistema è utile per accrescere l'ossidazione aerobica diretta dei composti meno sostituiti (DCE e VC). Tale tecnica ha ottenuto ottimi

successi in siti contaminati da altri composti organici quali i prodotti petroliferi e MTBE (metil ter-butil etere).

A differenza delle modalità sopra elencate, in laboratorio, l'ORC e' stato impiegato per fornire ossigeno al bioreattore a colonna, come mostrato in figura Fig.10 nel capitolo relativo alla descrizione dell'impianto.

Il sistema di alimentazione dell'ossigeno e' stato realizzato attraverso un tubo filtrante, di volume pari a circa 500 m, riempito da ORC preparati manualmente e collegato all'impianto attraverso tubi in acciaio.

Il flusso di acqua contaminata, proveniente dalla sacca, che attraversa il filtro appositamente progettato, e' regolato con una valvola elettrostatica che, collegata ad un timer, permette di avere, in ingresso alla colonna bioreattiva, concentrazioni di ossigeno disciolto idonee da permettere il cometabolismo da parte dei batteri dei solventi clorurati.

## 9.1 Preparazione ORC

Gli ORC sono stati preparati in laboratorio seguendo le indicazioni di una ricetta riportata nell'articolo della rivista *Water Research: "Remediation of PCE-contaminated aquifer by an in situ two-layer biobarrier: laborator batch and column studies"*.

Il composto e' stato realizzato miscelando i seguenti componenti elencati con rapporto in peso:

- cemento: 1,4;
- perossido: 1,5;
- sabbia: 0,7;
- acqua: 2.

Il cemento (25%) usato come legante appartiene alla classe di resistenza 32,5N, di quelle più comuni che si trovano in commercio; la sabbia (12,5%), vagliata al setaccio con diametro compreso tra 0,42-2 mm, serve per aumentare la permeabilità dell'impasto. Il perossido (27%) attribuisce alla miscela la caratteristica principale degli ORC, cioè quella di rilasciare ossigeno una volta che l'impasto viene a contatto con l'acqua: aspetto da non

sottovalutare durante la preparazione del composto, in quanto, il perossido essendo a contatto con l'acqua di miscela, rilascia una non sottovalutabile quantità di ossigeno.

Nelle prove, eseguite in laboratorio, sono stati utilizzati due diversi perossidi:

Perossido di calcio:  $\text{CaO}_2$

Percarbonato di sodio:  $4(\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 1,5\text{H}_2\text{O}_2)$

Dopo aver preparato le due diverse miscele, una per ogni perossido, i composti sono stati colati su una superficie piana per ottenere due lastre di spessore di qualche millimetro.

Dopo due giorni di essiccamento delle due malte cementizie, le due lastre sono state frantumate per ottenere dei dischetti delle dimensioni di qualche millimetro da poter inserire nel tubo filtrante nell'impianti di alimentazione.

Prima di procedere con gli esperimenti sulle quantità e modalità di rilascio dell'ossigeno, i due composti ORC, sono stati posti in forno a  $105^\circ\text{C}$  per mezza giornata in modo tale da assicurare che il contenuto di acqua interstiziale fosse pari a zero.

## 9.2 Stechiometria dei composti ORC

Perossido di calcio:  $\text{CaO}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Ca}(\text{OH})_2$

Percarbonato di sodio:  $4(\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 1,5\text{H}_2\text{O}_2) \leftrightarrow 8\text{Na}^+ + 4\text{CO}_3^- + 6\text{H}_2\text{O}_2$

sapendo che:  $2\text{H}_2\text{O}_2 \leftrightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$

Dai rapporti stechiometrici otteniamo che:

- con 1 mol di  $\text{CaO}_2$  [72 g] abbiamo il rilascio di 0,5 mol di  $\text{O}_2$ ;
- mentre con 4 mol di  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 1,5\text{H}_2\text{O}_2$  [628 g] si verifica un rilascio di 3 mol di  $\text{O}_2$ .

Quindi per avere 1 mol di O<sub>2</sub> occorrono 144 g di perossido di calcio e 208,8 g di percarbonato di sodio. Sapendo che il perossido compare nella miscela per l'ORC con un'aliquota del 27%, e' possibile calcolare il seguente rapporto:

$$1 \text{ g ORC\_Ca} : 1,38 \text{ g ORC\_Na};$$

per avere la stessa quantità di ossigeno rilasciata dai due diversi composti (es. per 1 mol di O<sub>2</sub> servono 533 g di ORC\_Ca e 773,4 g di ORC\_Na).

### **9.3 Impianto prova ORC**

Per testare i due composti ORC abbiamo realizzato un impianto sperimentale composto da:

- sacca di alimentazione della capienza di 20L, a tenuta gas e liquidi, il cui involucro interno e' realizzato in LPDE (polietilene a bassa densità) (A);
- pompa peristaltica (B);
- n.2 ossimetri (C e E);
- tubi e raccordi in acciaio;
- colonna impaccata in PVC, che contiene i composti ORC, con alle estremità una rete metallica che non permette la fuoriuscita dell'impasto (D).

Di seguito viene raffigurato uno schema dell'impianto sperimentale.

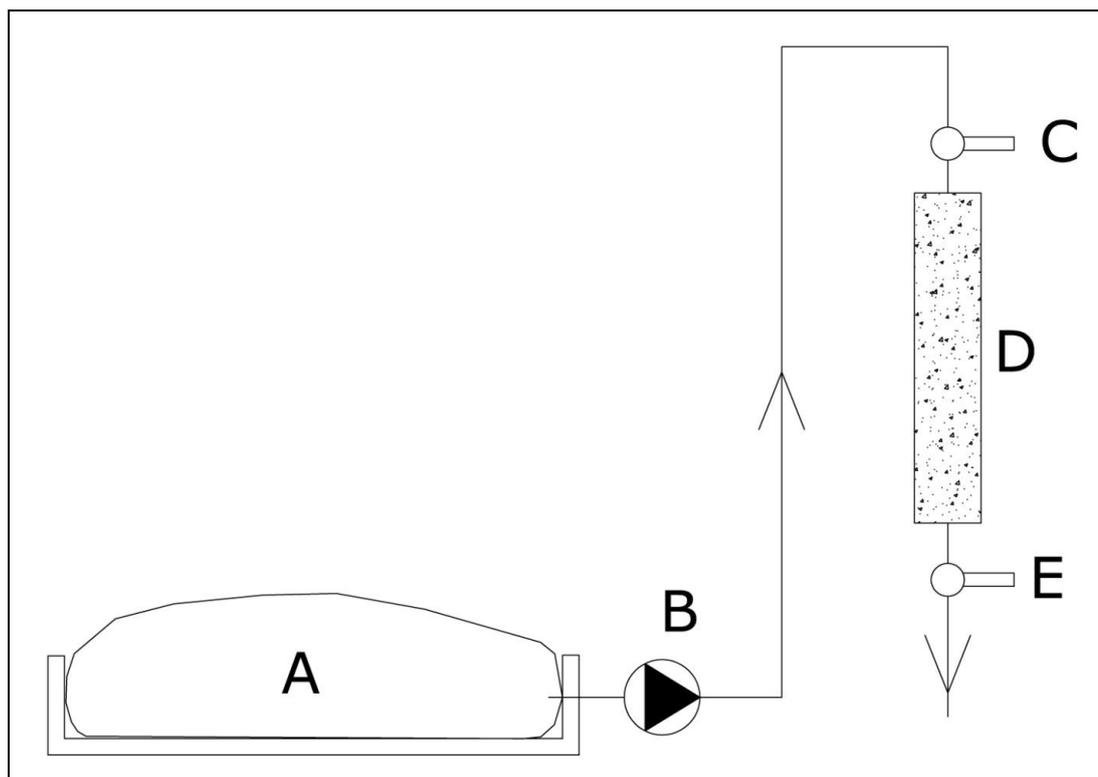


Fig.36 – Rappresentazione schematica impianto sperimentale ORC.

La sacca di alimentazione e' stata riempita con acqua deossigenata ottenuta tramite il gorgogliamento all'interno di un "vessel" mediante un flusso di  $N_2$ , come descritto nel capitolo 7, paragrafo 7.3 - Sistema di alimentazione. Subito a valle della sacca e' stata montata una pompa peristaltica che garantisce piccole portate dell'ordine di qualche mL/min, così da permettere al flusso di avere tempi di permanenza nella "provetta", colonna impaccata, che vanno all'incirca dai 20 ai 60 minuti.

La provetta o colonna impaccata e' realizzata in PVC trasparente per vedere se durante le prove si formino bolle all'interno del nostro impianto.

Per avere una buona conduzione dell'impianto di biodegradazione, e non avere problemi di intasamento all'interno della colonna bioreattiva, si e' deciso di far fluire la provetta dall'alto verso il basso, per assicurare che le eventuali bolle d'ossigeno che si formano all'interno della colonna impaccata, tendono ad andare verso l'alto così da non entrare in circolo nell'impianto principale.

I due ossimetri, descritti nel capitolo relativo a metodiche analitiche e sperimentali, sono posizionati a monte e a valle della provetta, e permettono un monitoraggio continuo della concentrazione dell'ossigeno disciolto:

a monte e' posizionata la sonda OXIGEN, modello DO-166FT, per controllare se l'acqua, durante il suo percorso dalla sacca alla provetta passando per la pompa, mantiene costante la sua concentrazione di ossigeno disciolto; mentre a valle del sistema ORC e' montata la sonda portatile **OXI 45 P** auto calibrante, per misurare la concentrazione di ossigeno rilasciata dagli ORC.

#### 9.4 Prove ORC\_Ca

Volume provetta	35,07	ml
Peso provetta	19,32	g
Peso ORC secco (a 105 gradi)	12,67	g
Peso provetta con ORC e acqua	59,20	g
Peso acqua interstiziale	27,21	g
Volume acqua interstiziale	27,21	ml
Porosita'	0,78	
Q	1,51	ml/min
O <sub>2</sub> in_start	0,40	mg/l
Tempo di permanenza nominale	23,23	min
Tempo di permanenza effettivo	18,02	min
pH_IN	8,50	
ph_OUT	9,00	

Tab.13 – *Dati prova ORC\_Ca.*

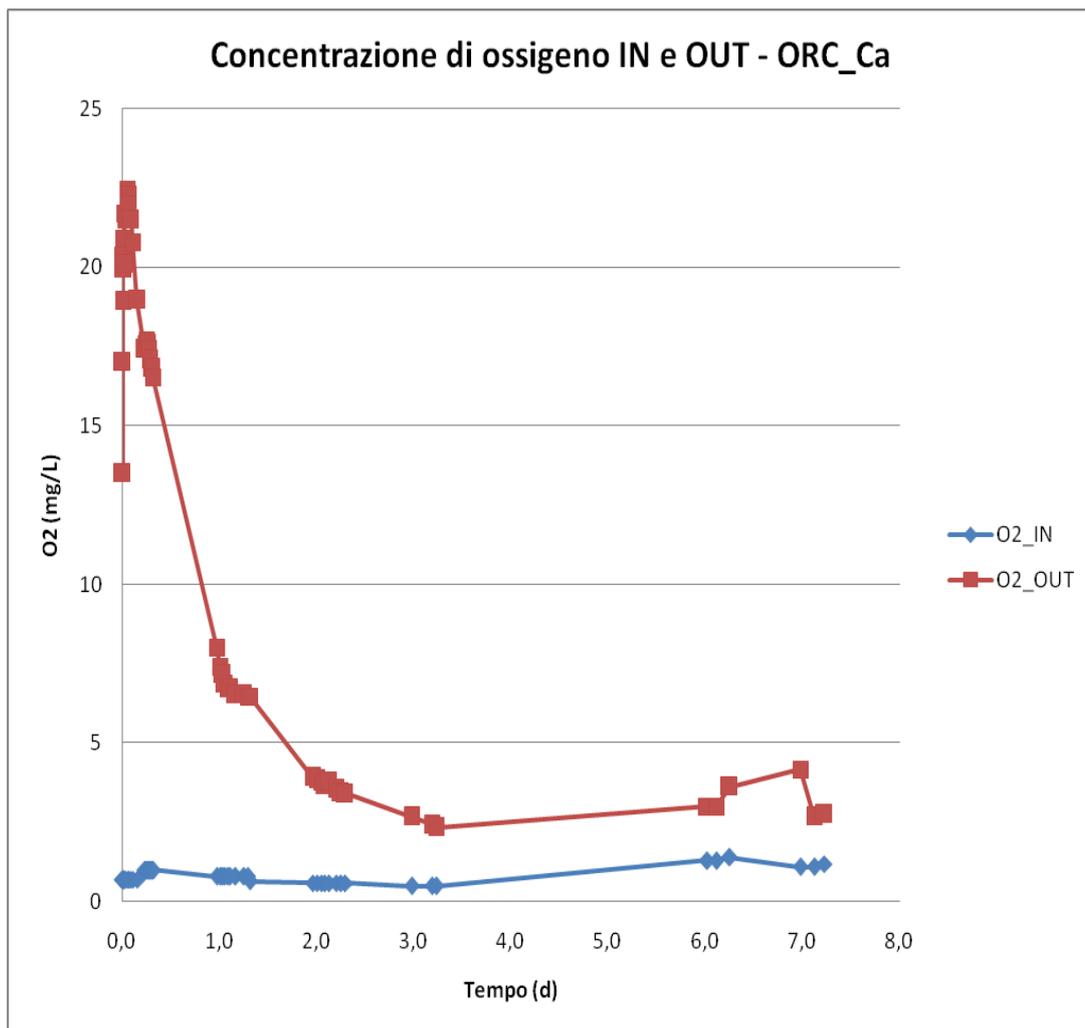


Fig.37 – Grafico valori di concentrazione  $O_2$  disciolto, prova ORC\_Ca.

Calcolo rilascio teorico  $O_2$

$$O_{2teo} [g] = \frac{P_{ORC} \times P_{1molO_2}}{[g]O_2 \text{ di } 1 \text{ mol ORC}} \quad 9.1$$

Dove:

- $P_{ORC}$  = peso ORC\_Ca caricato nella colonna impaccata [g];
- $P_{1molO_2}$  = peso di 1 mole di  $O_2$  [32 g];
- $[g]O_2$  di 1 mol ORC = peso ORC\_Ca che rilascia 1 mole di  $O_2$  [533 g].

In questo caso:

$$O_{2teo} = 0,76 \text{ g.}$$

### Calcolo rilascio sperimentale O<sub>2</sub>

$$O_{2spe} [g] = Q \cdot \sum(C_{out} - C_{in}) \cdot \Delta t \quad 9.2$$

Dove:

- Q = portata in ingresso [mL/min];
- C<sub>out</sub> = concentrazione O<sub>2</sub> a valle della colonna impaccata [mg/L];
- C<sub>in</sub> = concentrazione O<sub>2</sub> a monte della colonna impaccata [mg/L];
- Δt = intervallo di tempo tra le variazioni di concentrazione [d].

In questo caso:

$$O_{2spe} = 0,06 \text{ g.}$$

## 9.5 Prove ORC\_Na

Volume provetta	35,12	ml
Peso provetta	18,89	g
Peso ORC secco (a 105 gradi)	7,73	g
Peso provetta con ORC e acqua	55,65	g
Peso acqua interstiziale	29,03	g
Volume acqua interstiziale	29,03	ml
Porosita'	0,83	
Q	1,60	ml/min
O <sub>2in_start</sub>	0,76	mg/l
Tempo di permanenza nominale	21,95	min
Tempo di permanenza effettivo	18,14	min
pH_IN	8,00	
pH_OUT	9,00	

Tab.14 – Prova 1 ORC\_Na.

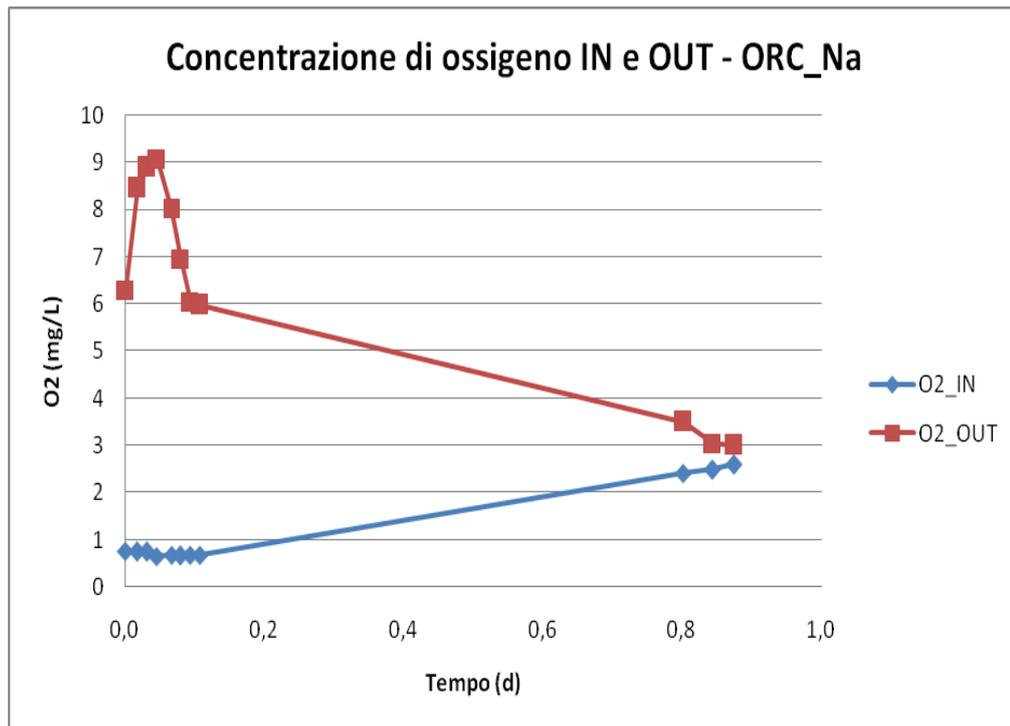


Fig.38 – Grafico valori di concentrazione  $O_2$  disciolto, prova 1 ORC\_Na.

$$O_{2teo} = 0,32 \text{ g.}$$

$$O_{2spe} = 0,01 \text{ g.}$$

Volume provetta	35,07	ml
Peso provetta	19,39	g
Peso ORC secco (a 105 gradi)	7,60	g
Peso provetta con ORC e acqua	55,12	g
Peso acqua interstiziale	28,13	g
Volume acqua interstiziale	28,13	ml
Porosita'	0,80	
Q	0,55	ml/min
$O_{2in\_start}$	0,65	mg/l
Tempo di permanenza nominale	63,76	min
Tempo di permanenza effettivo	51,15	min
pH_IN	8,00	
pH_OUT	9,00	

Tab.14 – Prova 2 ORC\_Na.

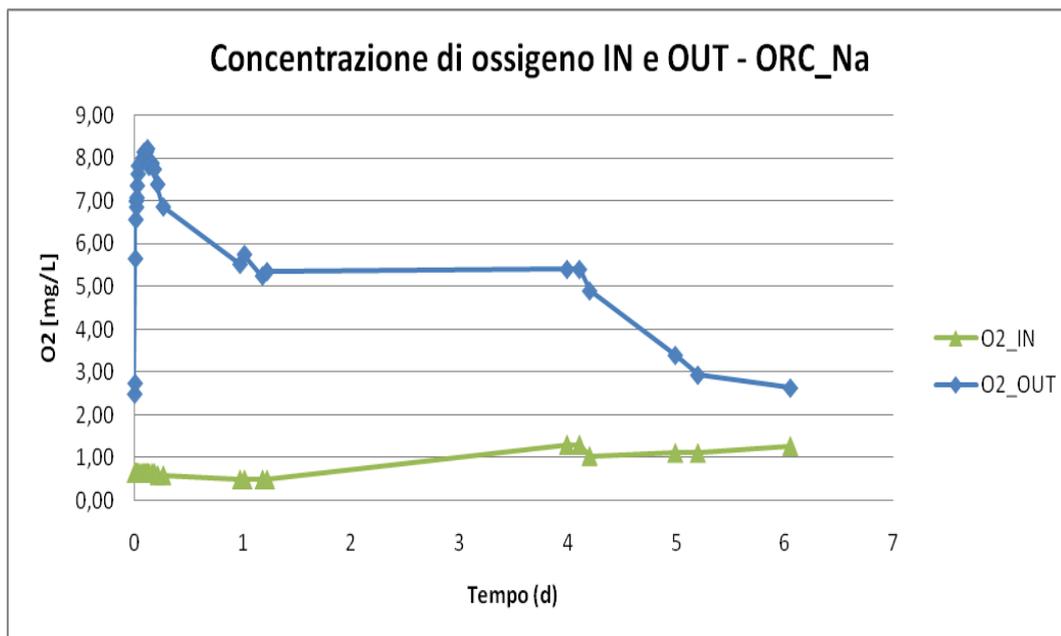


Fig.39– Grafico valori di concentrazione  $O_2$  disciolto, prova 2 ORC\_Na.

$O_{2teo} = 0,31$  g.

$O_{2spe} = 0,019$  g.

## Capitolo 10 – CONCLUSIONI

Nel presente lavoro è stato realizzato uno studio di biodegradazione aerobica cometabolica per alcuni solventi clorurati (TCE, TeCa, cis-DCE e VC), sperimentando quale substrato di crescita sia più idoneo per il metabolismo batterico, e riattivando alcuni consorzi batterici specializzati. Il lavoro è stato articolato in più stadi che hanno condotto all'ottenimento dei seguenti risultati:

- preparazione di consorzi batterici, alcuni già selezionati durante prove in microcosmi effettuate negli anni scorsi da questo stesso gruppo di ricerca, e fornita dal Dipartimento di Biologia Evoluzionistica Sperimentale (BES) dell'Università di Bologna, altri consorzi, provenienti dalle acque di falda contaminate, sono stati monitorati per vedere la loro efficienza nella dechlorazione di TCE e TeCA. Questa fase ha avuto una durata pari a 120 giorni;
- assemblaggio di un impianto di alimentazione in grado di mettere a disposizione della biomassa adesa presente nel reattore, l'ossigeno e il substrato primario di crescita (Fig.10);
- esperimenti su una nuova tecnica di rilascio ossigeno disciolto, ORC (Oxygen Release Compound), realizzati in laboratorio con due diversi componenti caratteristici: *perossido di calcio* e *percarbonato di sodio*. Questa fase ha rappresentato una delle maggiori difficoltà incontrate, in quanto come nuova tecnica adottata, e' stato impegnativo stabilire le modalità di analisi e realizzazione della tecnica ORC;
- assemblaggio di un impianto in grado di mettere a disposizione della biomassa adesa nel reattore, non solo il substrato primario di crescita e l'ossigeno ma anche il substrato cometabolico ovvero il cloroformio, ai fini di indagare il processo di biodegradazione cometabolica di un solvente clorurato;

I risultati ottenuti possono ritenersi soddisfacenti perché, soprattutto per i consorzi batterici che degradano gli inquinanti con circa le stesse

potenzialità, sono state realizzate con successo tutte le fasi e gli studi che permetteranno di ottenere un reattore a biomassa adesa capace di realizzare la degradazione cometabolica di solventi clorurati. L'abbattimento dell'inquinante conseguito è modesto, ma comunque rappresenta un risultato apprezzabile se consideriamo questo lavoro di tesi come l'avvio di una nuova sperimentazione nell'ambito del trattamento di acque reflue e acqua di falda contaminate da solventi clorurati.

Si rimanda alle sperimentazioni future :

- l'utilizzo del software di simulazione Comsol Multiphysics, per la progettazione dell'alimentazione pulsata delle soluzioni arricchite con butano ed ossigeno, per garantire uno sviluppo omogeneo ed esteso della biomassa adesa nel reattore a colonna;
- lo sviluppo di metodi specifici per la stima della biomassa in colonna, per poter valutare l'effettiva quantità di biomassa adesa e sospesa presente e l'eventuale crescita conseguente all'alimentazione del substrato primario e dell'ossigeno;
- l'ottimizzazione del monitoraggio delle concentrazioni di cloroformio in ingresso e in uscita, in modo da poter effettuare dei bilanci di materia specifici;
- lo sviluppo di un modello matematico per la descrizione dei fenomeni cinetici e di trasporto che caratterizzano il biofilm.

## BIBLIOGRAFIA

- Frascari D, Pinelli D, Nocentini M, Zannoni A, Fedi S, Baleani E, Zannoni D, Farneti A, Battistelli A. 2006. Long-term aerobic cometabolism of a chlorinated solvent mixture by vinyl chloride-, methane- and propane-utilizing biomasses. *J Hazard Mater*.
- Shim H, Ryoo D, Barbieri P, Wood TK. 2001. Aerobic degradation of mixtures of tetrachloroethylene, trichloroethylene, dichloroethylenes and vinyl chloride by toluene-*o*-xylene monooxygenase of *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Appl Microbiol Biotechnol*.
- Frascari D, Meniconi A, Nocentini M, Pinelli D. 2008. 1,1,2,2-tetrachloroethane aerobic cometabolic biodegradation by propane- and methane-utilizing consortia in slurry bioreactors. In: *Proceedings of the 10th International UFZ-Deltares/TNO Conference on Soil-Water Systems – ConSoil 2008 (Milano, June 3-6, 2008)*, F&U Confirm Publisher, Leipzig, Germany, pp E617-E626 (on CD).
- Arp DJ, Yeager CM, Hyman MR. 2001. Molecular and cellular fundamentals of aerobic cometabolism of trichloroethylene. *Biodegradation*.
- McCarty PL, Goltz MN, Hopkins GD, Allan JP, Dolan ME, Kawakami BT, Carrothers TJ. 1998. Full-scale evaluation of in-situ cometabolic degradation of trichloroethylene in groundwater through toluene injection. *Environ Sci Technol*.
- Massimo Nocentini e Dario Frascari, DICMA, Facoltà di Ingegneria, Università di Bologna – Degradazione in falda per meccanismi di cometabolismo.
- Frascari D, Zannoni A, Fedi S, Pii Y, Zannoni D, Pinelli D, Nocentini M. 2005. Aerobic cometabolism of chloroform by butane-grown

microorganisms: long-term monitoring of depletion rates and isolation of a high-performing strain. Biodegradation.

- Mauro Majone, Marco Petrangeli Papini, Federico Aulenta-Dipartimento di Chimica dell'Università "La Sapienza" di Roma; Paolo Viotti, Michele Leccese-Dipartimento di Idraulica, Trasporti e Strade dell'Università "La Sapienza" di Roma; Valter Tandoi, Simona Rossetti, Cinzia Cupo - Istituto di Ricerca sulle Acque, Consiglio Nazionale delle Ricerche; Biorisanamento anaerobico in situ di falde contaminate da solventi clorurati. Proposta di protocollo di indagine per la valutazione di fattibilità.
  
- Mauro Majone, Marco Petrangeli Papini, Federico Aulenta, Paolo Viotti, Michele Leccese, Valter Tandoi, Simona Rosetti, Cinzia Cupo 2006. Biorisanamento anaerobico in situ di falde contaminate da solventi clorurati. Proposta di protocollo di indagine per la valutazione di fattibilità'.
  
- Andrew James Waite, James S. Bonner, and Robin Autenrieth 1999. Kinetics and Stoichiometry of Oxygen Release from Solid Peroxides. Environmental Engineering Science.
  
- C.M. Kao, S.C. Chen, J.Y. Wang, Y.L. Chen, S.Z. Lee 2002. Remediation of PCE-contaminated aquifer by an in situ two-layer biobarrier: laboratory batch and column studies.

## Ringraziamenti.

Ringrazio la mia famiglia:

*i miei genitori* i quali hanno creduto in me e mi hanno sempre sorretto in tutti questi anni;

*i miei fratelli* che mi hanno ascoltato e confortato anche nei momenti piu' difficili.

Ringrazio tutti *i miei amici*, con i quali ho condiviso molte emozioni ed esperienze che ci hanno fatto crescere assieme e che rimarranno "imprese" nei nostri ricordi.

Ringrazio la *mia ragazza* Roberta, che mi ha trasmesso tanta carica per affrontare "parte" della mia avventura universitaria.

Ringrazio tutti quelli che mi sono stati vicini e con il loro affetto mi hanno aiutato ad arrivare a questo traguardo, che diventi trampolino di lancio per le prossime esperienze.

Vi ringrazio di cuore.

Pasquale.