
**ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI BOLOGNA**

FACOLTÀ DI CHIMICA INDUSTRIALE
Corso di Laurea magistrale in Chimica Industriale

*Dipartimento di Ingegneria Chimica Mineraria e delle Tecnologie Ambientali
"DICMA"*

**BIODEGRADAZIONE DI SOLVENTI
CLORURATI IN ACQUE CONTAMINATE
TRAMITE COMETABOLISMO AEROBICO:
Progettazione ed allestimento di prove in reattori a
biomassa adesa**

Tesi di Laurea in Impianti Chimici

TESI DI LAUREA

Presentata da:

Francesco Doria

Relatore:

Chiar.mo Prof. Davide Pinelli

Co-relatore:

Dott. Dario Frascari

Terza Sessione

Anno Accademico 2010-2011

Indice

1. Introduzione	1
2. I solventi clorurati	6
2.1. Struttura e proprietà chimico-fisiche	6
2.2. Utilizzi ed applicazioni	9
2.3. Diffusione dei solventi clorurati nell'ambiente	11
3. Meccanismi di biodegradazione	13
3.1. Tipologia di reazioni di degradazione	14
3.2. Il modello cinetico	22
4. Tecnologie di trattamento	27
4.1. Bioremediation on-site	27
4.2. Bioremediation in-situ	30
5. Obiettivi	34
5.1. I lavori pregressi	34
5.2. Lo sviluppo del progetto	35
6. Metodiche analitiche e strumentali	37
6.1. Analisi cromatografiche	37
6.2. Analisi dell'ossigeno disciolto	49
6.3. Analisi della biomassa	50

7. Sviluppo e selezione del consorzio	52
7.1. Caratterizzazione chimica delle acque campionate	52
7.2. Allestimento dei microcosmi	54
7.3. Coltivazione del consorzio per la colonizzazione delle colonne a letto impaccato	87
8. Conversione abiotica del TeCA in TCE	90
9. Allestimento di bioreattori a letto impaccato e prove fluidodinamiche	95
9.1. Allestimento dell'impianto	96
9.2. Il modello fluidodinamico	100
9.3. Stime delle incognite del modello fluidodinamico	104
10. Conclusioni	108
Bibliografia e sitografia	111

Capitolo 1

Introduzione

I “composti clorurati” sono alcuni tra i più diffusi composti della chimica moderna, hanno svariate applicazioni: vengono usati come insetticidi, farmaci, antisettici, solventi, etc.. Il loro intenso utilizzo (a partire dagli anni '80), ha portato ad un aumento della produzione, portando ad un accumulo di tali sostanze nell'ambiente. In particolar modo, i “solventi organici clorurati” appartenenti a questa classe sono considerati molto pericolosi e per questo devono essere adeguatamente trattati e non immessi nell'ambiente.

I composti clorurati sono in genere poco solubili in acqua ed hanno densità maggiore; ciò comporta la formazione di due fasi immiscibili con conseguente stratificazione nelle zone più profonde delle falde acquifere, che a contatto con un suolo impermeabile formano delle pozze di contaminazione (in genere questi composti vengono identificati con l'acronimo DNAPL Dense Non-Aqueous Phase Liquid). Tra i composti clorurati, i solventi clorurati sono, però, relativamente solubili in acqua e scarsamente adsorbiti dal suolo; questo provoca in caso di contaminazione la formazione di masse d'acqua contaminata che si spostano velocemente all'interno della falda (plume). Oltre a queste caratteristiche, vi è un aspetto problematico legato alla pericolosità per l'uomo: molti solventi clorurati, infatti, sono considerati cancerogeni o sospetti tali, e per questo motivo vanno opportunamente eliminati o confinati.

A livello normativo, esiste un disegno di legge¹ (revisione del più vecchio decreto D.M. 471/99²) emanato dal Ministero dell’Ambiente per la tutela del Territorio e del Mare, che esprime direttive e obblighi riguardo il trattamento di questo genere di composti. Nello specifico, la normativa definisce le analisi di rischio sanitario e ambientale specifiche: analisi degli effetti sulla salute umana derivanti dall’esposizione prolungata all’azione delle sostanze presenti nelle matrici ambientali contaminate, le concentrazioni soglia di contaminazione nel sottosuolo e nelle acque sotterranee (vedi Tabella 1. 1), introducendo inoltre il principio secondo il quale “chi inquina paga” ovvero la responsabilità di chi contamina il sito è quella di operare le dovute contromisure entro le ventiquattro ore dall’avvenuta contaminazione per non incorrere in sanzioni.

Tabella 1. 1 Concentrazioni soglia di contaminazione di alcuni composti clorurati

Composto	C_{suolo} (mg_{gss} Kg⁻¹)	C_{H₂O} (µg/L)
Clorometano	0,1	1,5
Diclorometano	0,1	-
Cloruro di vinile	0,01	0,5
Tricloroetilene	1	1,5
1,2 Dicloroetilene	0,3	60
1,1,2,2-Tetracloroetano	0,5	0,05

Vengono anche imposti limiti/vincoli nella scelta delle tecnologie da applicare per il trattamento di risanamento, che non solo devono essere le migliori possibili, ma anche le meno dispendiose. Le tecnologie di trattamento dei composti clorurati possono essere suddivise in tre classi:

- Trattamenti fisici;
- Trattamenti chimici;
- Trattamenti biologici.

I primi sono molto sviluppati e le loro tipologie molteplici. Le loro applicazioni vanno dall'asportazione del terreno e successivo lavaggio, fino all'estrazione dell'acqua di falda seguita dall'adsorbimento con carboni attivi. È evidente che con questi tipi di trattamenti, il solvente clorurato non viene eliminato, ma soltanto spostato in un'altra matrice che deve poi essere bonificata. I trattamenti chimici invece sono più all'avanguardia e consistono nell'utilizzo di reazioni chimiche (ossidazione spinta) che permettono la completa degradazione del clorurato, con formazione di altri composti aventi minore pericolosità. Esistono poi i trattamenti di tipo biologico, che sono studiati da alcuni decenni e rappresentano una valida alternativa alle tecnologie suddette. Questo genere di trattamento che consiste nell'utilizzo di batteri per l'abbattimento delle sostanze inquinanti, è piuttosto complesso perché viene influenzato da molti parametri quali i valori specifici di temperatura e pH, aggiunta di substrati particolari, condizioni ambientali, e bisogna tener conto anche delle caratteristiche del microrganismo.

La biodegradazione dei composti alifatici clorurati è particolarmente problematica perché, a seconda del tipo di inquinante, si possono avere diverse modalità di degradazione. Nel caso in cui un composto abbia un medio/alto grado di clorurazione, la degradazione aerobica fornisce scarsi risultati perché la biomassa adibita a tale processo non riesce a ripristinare energia riducente per il proseguo della degradazione, mentre quella anaerobica è migliore. In questi casi però si può sfruttare un altro processo: la degradazione aerobica cometabolica. Questo tipo di processo sfrutta il fatto che gli enzimi espressi durante il consumo del substrato di crescita (substrato primario), vengono usati per la degradazione del composto clorurato (substrato cometabolico), in cui la biomassa di fatto non cresce.

Un altro fattore che influisce sulla crescita cellulare è la tossicità dei prodotti di degradazione del composto alogenato in quanto inibiscono l'attività della biomassa. Un processo di questo genere, applicato ad un caso reale, deve essere durevole nel tempo e resistente alle variazioni delle condizioni operative (concentrazioni variabili, portate variabili etc.), cioè deve avere un'elevata robustezza.

Oltre al tipo di degradazione, bisogna anche focalizzare l'attenzione sul modo in cui i batteri operano per ottenere un più efficace trattamento. La biomassa può restare sospesa nel mezzo acquoso oppure può aderire ad un supporto. La biomassa adesa, rispetto a quella sospesa, presenta alcuni vantaggi che in genere ne aumentano le proprietà degradative. Infatti, generando un film sui supporti, può risultare meno esposta agli agenti tossici che diffondono all'interno di essa. Un altro aspetto riguarda l'elevata concentrazione cellulare favorita dalla elevata area superficiale dei supporti porosi che possono essere utilizzati. È importante che il flusso da trattare, passante all'interno del bioreattore, non stacchi il biofilm formato, in modo da evitare la perdita di biomassa e un successivo filtraggio dell'acqua.

Esistono però problematiche di tipo microbiologico e di tipo impiantistico che spesso limitano l'utilizzo di reattori a biomassa adesa. Un problema piuttosto frequente è l'eccessivo sviluppo cellulare nella parte iniziale del reattore che provoca due principali fattori negativi: impedimento della crescita da parte della biomassa sui supporti lungo la colonna ed intasamento del mezzo poroso. Nel primo caso si ottiene un calo di prestazioni del reattore perché si ha un grande volume di supporti non sfruttati, nel secondo caso si ottiene una fermata dell'impianto per un eccessivo aumento delle perdite di carico. Oltre a questo, in condizioni di alimentazione continua del substrato primario, si verrebbe a creare inevitabilmente un'inibizione competitiva da parte del substrato di crescita nei confronti del substrato cometabolico. Per ovviare a questo problema sono state messe a punto tecniche di alimentazione con pulsazione alternate tra substrato primario e solvente clorurato a concentrazione costante, in presenza costante di ossigeno. Questa tecnica permette una crescita più omogenea della biomassa lungo tutto il reattore, aumentando così l'efficienza di degradazione.

Nel trattamento di acque di falda contaminate esistono due principali metodologie di lavoro: in-situ e on-site. Nel primo caso il terreno stesso del sito viene gestito come un bioreattore immerso nella falda, mentre nel secondo il bioreattore è posto sopra di essa e l'acqua estratta viene trattata opportunamente in superficie e reimpressa in profondità o scaricata in un corpo idrico superficiale. A seconda del

metodo usato, ci sono molteplici soluzioni impiantistiche per la realizzazione di bioreattori, infatti esistono reattori a membrana, a letto impaccato, fluidizzati, etc.. Nei capitoli a seguire viene approfondito il trattamento di due composti organici clorurati: il tricloroetilene (TCE) e l'1,1,2,2-tetracloroetano (TeCA), tramite una biodegradazione aerobica cometabolica, al fine di progettare un impianto per la loro depurazione.

Capitolo 2

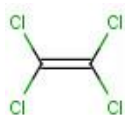
I solventi clorurati

2.1- Struttura e proprietà chimico-fisiche

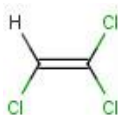
I solventi organici clorurati sono generalmente costituiti da una corta catena di atomi di carbonio (in genere da uno a tre), in cui almeno un cloro è legato ad essa. Nella maggior parte dei casi, si tratta di sostanze dotate di un ottimo potere solvente, propellente, refrigerante e di scarsa infiammabilità. I più comuni possono essere divisi in tre diverse classi: metani clorurati, etani clorurati ed eteni clorurati. La nomenclatura e la formula bruta sono evidenziate in Tabella 2. 1, di seguito invece sono riportate alcune formule di struttura dei principali solventi clorurati (Figura 2. 1).

Figura 2. 1 Formule di struttura dei principali solventi clorurati

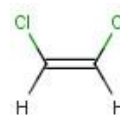
Eteni clorurati



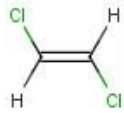
Tetracloroetene



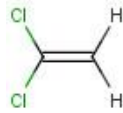
Tricloroetene



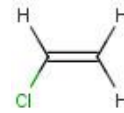
Cis-1,2-Dicloroetene



Trans-1,2-Dicloroetene

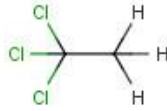


1,1-Dicloroetene

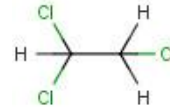


Cloroetene

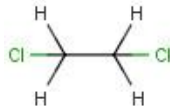
Etani clorurati



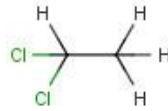
1,1,1-tricloroetano



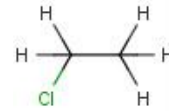
1,1,2-Tricloroetano



1,2-Dicloroetano



1,1-Dicloroetano

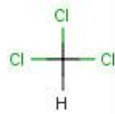


Cloroetano

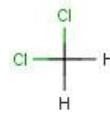
Metani clorurati



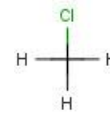
Tetraclorometano



Triclorometano



Diclorometano



Clorometano

Le proprietà chimico-fisiche dei solventi clorurati (elencate in Tabella 2. 2) influiscono sul comportamento che hanno nell'ambiente, e possono essere sintetizzate nel seguente elenco:

- generalmente, all'aumentare del numero di atomi di cloro, anche la densità aumenta, mentre la tensione di vapore e la solubilità in acqua diminuiscono.
- Tutti i composti sono liquidi e più densi dell'acqua (ad eccezione di cloroetano e cloruro di vinile che sono gassosi). In presenza di una fase acquosa, infatti, i solventi clorurati tendono a migrare verso il basso finché

non raggiungono strati di suolo impermeabili. Questo ovviamente rende più difficoltosa la loro individuazione ed il loro trattamento.

- Hanno una solubilità dell'ordine dei g/L a 25°C (il diclorometano ha la solubilità maggiore con 20 g/L) che risulta una quantità molto elevata, soprattutto dal punto di vista legislativo, che prevede una concentrazione massima pari a 1µg/L.

Tabella 2. 1- Nomenclature e formule brute dei principali solventi clorurati

Metani Clorurati			
Tetraclorometano	-	CT	CCl ₄
Triclorometano	cloroformio	CF	CHCl ₃
Diclorometano	-	DCM	CH ₂ Cl ₂
Clorometano	-	CM	CH ₃ Cl
Etani Clorurati			
Esacloroetano	Percloroetano	HCA	C ₂ Cl ₆
Pentacloroetano	-	PCA	C ₂ HCl ₅
1,1,1,2-tetracloroetano	-	1,1,1,2-TeCA	C ₂ H ₂ Cl ₄
1,1,2,2-tetracloroetano	-	1,1,2,2-TeCA	C ₂ H ₂ Cl ₄
1,1,2-tricloroetano	-	1,1,2-TCA	C ₂ H ₃ Cl ₃
1,1,1-tricloroetano	Metil cloroformio	1,1,1-TCA	C ₂ H ₃ Cl ₃
1,2-dicloroetano	-	1,2-DCA	C ₂ H ₄ Cl ₂
1,1-dicloroetano	-	1,1-DCA	C ₂ H ₄ Cl ₂
cloroetano	-	CA	C ₂ H ₅ Cl
Eteni Clorurati			
Tetracloroetene	Percloroetilene	PCE	C ₂ Cl ₄
Tricloroetene	-	TCE	C ₂ HCl ₃
<i>cis</i> -1,2-dicloroetene	-	<i>cis</i> -DCE	C ₂ H ₂ Cl ₂
<i>trans</i> -1,2-dicloroetene	-	<i>trans</i> -DCE	C ₂ H ₂ Cl ₂
1,1-dicloroetene	Vinilidene cloruro	1,1-DCE	C ₂ H ₂ Cl ₂
cloroetene	Vinil cloruro	VC	C ₂ H ₃ Cl

- Le tensioni di vapore a 25°C variano da un minimo di 30 mmHg per l'1,1,2-tricloroetano, ad un massimo di 600 mmHg per l'1,1-dicloroetilene.
- Il logaritmo in base dieci del coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua è in un range di 0.48-2.64. Questo significa che, all'interno della falda contaminata, il solvente clorurato sarà maggiormente presente nella fase acquosa piuttosto che nel terreno.

Tabella 2. 2 Proprietà chimico-fisiche di alcuni solventi clorurati a 25°C³.

Specie	PM (g/mol)	Densità (g/ml)	Solubilità (mg/L)	Tens. Vap. (mmHg)	Cost. Henry (atm·m ³ /mol)	Log K_{ow}
CT	153.8	1.595	757	90	0.0304	2.64
CF	119.4	1.485	8200	151	0.00435	1.95
DCM	84.9	1.325	20000	362	0.00268	1.30
TCA	133.4	1.325	1500	123	0.008	2.49
1,1,2-TCA	133.4	1.440	4500	30	0.0012	2.47
1,1-DCA	99.0	1.175	5500	182	0.0059	1.79
1,2-DCA	99.0	1.253	8520	64	0.00098	1.48
CA	64.5	Gas	5700	1064	0.0085	1.52
PCE	165.8	1.620	150	17.8	0.0153	2.60
TCE	131.4	1.460	1100	57.9	0.0091	2.38
c-DCE	96.9	1.280	3500	208	0.0037	0.70
t-DCE	96.9	1.280	6300	324	0.0072	0.48
1,1-DCE	96.9	1.210	2250	600	0.018	1.84
VC	62.5	Gas	2670	2660	0.315	1.38

2.2- Utilizzi ed applicazioni

I solventi clorurati sono usati in svariati processi, ad esempio vengono impiegati per la pulizia di materiali e prodotti grezzi in diversi settori industriali. Tra i più utilizzati possiamo evidenziare il cloruro di metilene (MC), il cloroformio (CF), il

tetracloruro di carbonio (CT), il tricloroetilene (TCE) ed il percloroetilene (PCE).
Le loro principali funzioni sono riassunte di seguito:

Cloruro di metilene: La sua volatilità e la capacità di sciogliere un ampio spettro di composti organici fanno sì che il diclorometano sia un ottimo solvente in molti processi chimici. Viene infatti usato nella rimozione di vernici e grassi, nel settore alimentare (estrazione della caffeina dal caffè, preparazione di estratti di luppolo etc.), e viene impiegato come “agente schiumogeno” nella produzione di poliuretani espansi e come propellente spray per aerosol.

Cloroformio: In passato veniva usato come anestetico in chirurgia e come sciroppo antitosse, ma è stato sostituito con sostanze meno tossiche. Il cloroformio viene principalmente utilizzato per la produzione di freon R-22 (fluido refrigerante); tuttavia è stato bandito e lo si è sostituito con altri meno pericolosi per via dell'effetto distruttivo sullo strato di ozono nella stratosfera. Viene anche usato come solvente da laboratorio, nell'estrazione e purificazione di farmaci, coloranti e pesticidi, nonché come collante nella produzione di alcune sostanze plastiche. Il cloroformio deuterato (CDCl_3) è usato come solvente nella spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR).

Tetracloruro di carbonio: In passato veniva usato per il lavaggio a secco, per la sintesi di fluidi refrigeranti (freon R-11 e freon R-12) e negli estintori. Adesso invece è usato come solvente su scala di laboratorio.

Tricloroetilene: Noto col nome commerciale di trielina, viene usato per estrarre oli vegetali in piante esotiche (cocco e palma), per pulire (sgrassatura) parti metalliche, nella produzione di adesivi e di sostituti ai CFC, nonché come solvente nel lavaggio a secco nelle industrie tessili.

Tetracloroetilene: Questo tipo di composto viene usato prevalentemente nel lavaggio a secco di indumenti nell'industria tessile. Può anche essere sfruttato come base di partenza per la sintesi di CFC meno distruttivi o per la pulizia (sgrassatura) di parti metalliche.

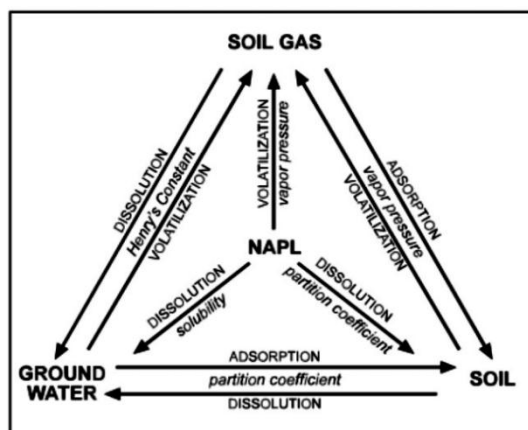
2.3 Diffusione dei solventi clorurati nell'ambiente

A causa di una mancata gestione dei rifiuti compiuta in passato, si è arrivati oggi ad avere un accumulo di solventi clorurati nelle falde e nei suoli. Questo problema è esteso in tutta Europa e negli Stati Uniti e si sta cercando di porre rimedio. Come precedentemente detto, l'entità della diffusione del contaminante dipende dalle sue proprietà chimico-fisiche.

In linea del tutto generale, un solvente contaminante normalmente viene rilasciato come liquido puro (indicato con l'acronimo NAPL, Non Aqueous Phase Liquid). Nel sottosuolo, una volta raggiunto l'equilibrio, può presentarsi ripartito in quattro fasi ben distinte: in parte può essere presente come liquido puro (NAPL), in parte si dissolve nell'acqua sotterranea, in parte viene adsorbito dal terreno ed in parte volatilizza nei gas presenti nel sottosuolo (nel caso in cui l'acquifero non sia saturo). Questa situazione è rappresentata dalla

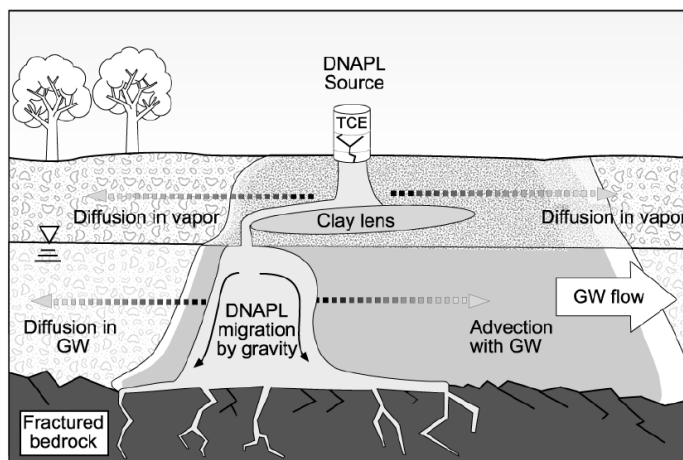
Figura 2. 2, in cui si fornisce una schematica spiegazione degli equilibri che si instaurano tra le quattro fasi. Come si può vedere dalla figura, l'equilibrio tra il liquido puro, la fase adsorbita sul terreno e la fase disciolta in acqua è determinato dalla solubilità in acqua e dal coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua specifica del contaminante. La tensione di vapore invece regola l'equilibrio tra la fase liquida pura, la fase adsorbita nel terreno e la fase gas presente nel sottosuolo. L'equilibrio che si instaura tra la fase disciolta in acqua e la fase gas presente nel sottosuolo è definito dalla costante di Henry.

Figura 2. 2 Equilibri tra le quattro fasi



Per quanto riguarda un solvente clorurato, essendo più denso dell'acqua, dà origine a fasi non acquose molto dense, indicate con l'acronimo DNAPL (Dense Non Aqueous Phase Liquid). Questi composti rispecchiano perfettamente gli equilibri sopra descritti, ma, a causa della loro densità, tendono a depositarsi sul fondo dell'acquifero, superando sia la zona insatura che quella saturata del sottosuolo, fino ad arrivare allo strato più impermeabile che delimita l'acquifero in altezza.

Figura 2.3 Esempio di trasporto dei solventi clorurati nel sottosuolo



Le fasi DNAPL, trovandosi nelle zone più profonde delle falde, sono molto difficili da riconoscere ed individuare; inoltre complicano le operazioni di bonifica sia perché si comportano come sorgenti di rilascio graduale di inquinante, sia perché, nel caso di bonifica biologica, le alte concentrazioni di inquinanti tendono ad inibire i batteri adibiti alla degradazione. Oltre che per i trasferimenti di materia visti precedentemente, i solventi clorurati possono muoversi nel sottosuolo sia per convezione che per diffusione grazie al flusso della falda acquifera stessa (vedi Figura 2.3).

Capitolo 3

Meccanismi di biodegradazione

Lo studio della degradazione mediata da microrganismi dei solventi clorurati è piuttosto recente, infatti prima degli anni '80 si pensava che i composti clorurati non potessero essere biodegradabili. Gli studi sono stati condotti in modo da sviluppare un processo di rimozione del contaminante (bioremediation) dai siti inquinati. Si può dire che i processi di biodegradazione (trattamenti biologici) sono da preferire rispetto ai trattamenti fisici, perché permettono di trasformare il contaminante e non di spostarlo in un'altra fase, che deve essere successivamente trattata per la definitiva eliminazione.

Esistono varie tipologie di degradazione ottimizzate per i diversi solventi clorurati. In generale, per solventi clorurati aventi un grado di clorurazione medio/alto, si sono sviluppati processi di degradazione in condizioni anaerobiche. I processi di degradazione anaerobica non sono facilmente controllabili, sono lenti, di difficile attuazione ed in alcuni casi non si può raggiungere la completa declorurazione, come ad esempio per la famiglia dei cloroeteni⁴.

Per solventi clorurati aventi grado di clorurazione medio/basso, si sono studiati processi di degradazione aerobica. Esiste però un problema: a quanto trovato finora, i ceppi batterici non riescono a trarre beneficio energetico dalla degradazione diretta dei contaminanti e quindi non risulta molto efficace. Un'alternativa alla degradazione diretta è quella cometabolica, che verrà approfondita in questo elaborato per la degradazione del tricloroetilene (TCE) e l'1,1,2,2-tetracloroetano (TeCA).

Di seguito verranno spiegate le principali reazioni di degradazione biologiche e non dei solventi clorurati.

3.1- Tipologie di reazioni di degradazione

Le reazioni di degradazione dei solventi clorurati possono avvenire in assenza di microrganismi (abiotica), oppure in presenza di essi (biotica). Generalmente vengono classificate in due principali categorie:

- Reazioni senza scambio di elettroni;
- Reazioni con scambio di elettroni.

In

Tabella **3. 1** vengono illustrati i diversi meccanismi di reazione di degradazione dei solventi clorurati.

3.1.1 Reazioni senza scambio di elettroni

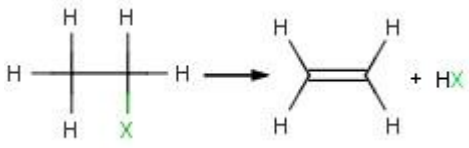
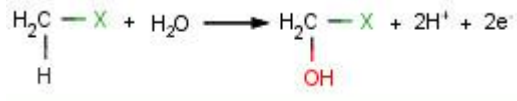
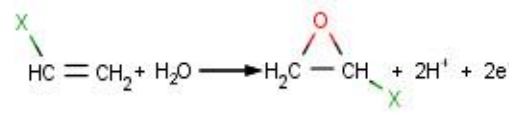
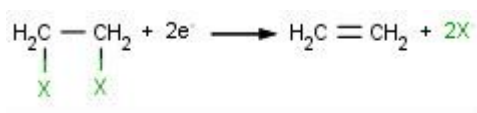
Questo genere di reazioni si svolgono quasi esclusivamente in sistemi abiotici e non hanno bisogno della presenza di catalizzatori organici o biochimici perché avvengano. Rispetto alle reazioni di ossidoriduzione, quelle in cui non avviene scambio di elettroni sono piuttosto lente, ma non trascurabili per quanto riguarda il moto nell'acqua del sottosuolo.

Come si può vedere, le reazioni senza scambio di elettroni sono caratterizzate da due classi principali: sostituzione ed eliminazione. Nella reazione di sostituzione il cloro viene rimpiazzato da un'altra funzionalità chimica per formare un composto meno pericoloso. La più comune reazione di sostituzione è l'idrolisi: il solvente clorurato sostituisce l'atomo di cloro con l'acqua, formando un alcool. Questa reazione è caratterizzata da una cinetica di pseudo primo ordine. La più comune reazione di eliminazione è la deidroalogenazione, in cui il cloro si lega con un idrogeno del carbonio adiacente facendo sì che si formi un doppio legame nel solvente e che venga eliminato acido cloridrico.

3.1.2 Reazioni con trasferimento di elettroni

Le reazioni di degradazione che avvengono prevalentemente nei sistemi biologici sono per trasferimento di elettroni, che si possono dividere in due categorie: ossidazioni e riduzioni.

Tabella 3. 1 Reazioni di degradazione dei composti clorurati

	Tipo di reazione	Classificazione della reazione	Meccanismo di reazione
Reazioni senza scambio di elettroni	Sostituzione	Idrolisi	$R - X + H_2O \longrightarrow ROH + HX$
	Eliminazione	Deidroalogenazione (CAH saturi)	
		α -idrossilazione	
Reazioni con trasferimento di elettroni	Ossidazione	Alo-ossidazione	$H_3C - X + H_2O \longrightarrow H_3C - X' O + 2H^+ + 2e^-$
		Eossidazione (CAH insaturi)	
		Idrogenolisi	$R - X + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow R - H + X^-$
	Riduzione	Accoppiamento	$2R - X + 2e^- \longrightarrow R - R + 2X^-$
		Dialoeliminazione (CAH saturi)	

A differenza delle reazioni viste precedentemente, le ossidoriduzioni esigono la presenza di un accettore o di un donatore di elettroni. In genere sono composti organici che svolgono questo compito riducendosi (accettore di elettroni) od ossidandosi (donatore di elettroni). Nel nostro caso, come fonte o lacuna di elettroni, vengono usati i composti clorurati.

I composti clorurati hanno delle particolari proprietà: grazie al carattere elettronegativo dell'atomo o degli atomi di cloro presenti, possono comportarsi come donatori o come accettori di elettroni. Sarà il numero di atomi di cloro a stabilire se il composto si comporterà come ossidante o riducente. Come regola generale si può dire che all'aumentare del numero di atomi di cloro, aumenta anche il carattere elettronegativo e quindi di accettore di elettroni (agente ossidante). Di conseguenza si può dire che per composti con molte sostituzioni clorate, la reazione di degradazione più probabile sarà una riduzione piuttosto che non un'ossidazione. Per composti con basso grado di sostituzione di atomi di cloro, la reazione di degradazione più facile può essere quella di ossidazione piuttosto che di riduzione.

Reazioni di ossidazione

Nei sistemi biologici, le reazioni di ossidazione avvengono tramite un metabolismo aerobico in cui il composto clorurato funge da donatore di elettroni. La maggior parte delle reazioni biologiche di ossidazione coinvolgono l'enzima monossigenasi, che contiene il citocromo P450, che è una proteina in grado di mediare sia l'ossidazione sia la riduzione. Il citocromo P450 può ossidare i solventi clorurati tramite tre meccanismi:

Meccanismo di α -idrossilazione: è la reazione di addizione del solvente clorurato con acqua per formare il derivato alcolico clorurato. Il prodotto formato elimina HCl (come ioni H^+ e Cl^-), generando così un'aldeide instabile che può essere ulteriormente trasformata per successiva ossidazione.

Meccanismo di alo-ossidazione: in questa reazione viene ossidato l'atomo di cloro per mezzo dell'ossigeno dell'acqua, a formare un intermedio instabile che viene idrolizzato producendo uno ione ipoclorito (ClO^-) e l'alcool.

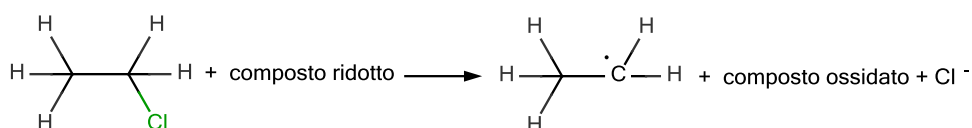
Meccanismo di epossidazione: questa reazione può avvenire solo per gli idrocarburi insaturi (eteni clorurati) e consiste nell'ossidazione del doppio legame per formare un epossido (viene inserito un atomo di ossigeno a ponte tra i due carboni). Gli epossidi, essendo composti piuttosto instabili, rapidamente vengono trasformati in aldeidi alogenate che, a loro volta, si possono trasformare in acidi o alcool.

L'enzima monossigenasi viene prodotto nei microrganismi durante il metabolismo di un composto da cui ricavano energia. In genere, il microrganismo non riesce a trarre alcun beneficio dal punto di vista energetico degradando un solvente clorurato. Ultimamente però si sono scoperti alcuni ceppi che sono in grado di degradare i composti clorurati tramite un'ossidazione diretta³. L'ossidazione diretta presenta notevoli vantaggi rispetto alla degradazione cometabolica: non è necessario inserire nell'acquifero contaminato il substrato di crescita che può essere anch'esso un inquinante, non presenta il problema della competizione inibitiva tra substrato di crescita ed inquinante. L'ossidazione diretta dei composti clorurati è svolta solo da pochi ceppi e per una ristretta cerchia di solventi che hanno uno o al massimo due atomi di cloro sostituiti (CM, CA, VC, DCE e DCA).

Reazioni di riduzione

Le reazioni di riduzione compiute da microrganismi si verificano principalmente in condizioni anaerobiche. In questo genere di reazioni, il clorurato rappresenta l'accettore di elettroni (agente ossidante), mentre il donatore di elettroni può essere uno dei composti riportati in Tabella 3. 2. Questi composti sono alcuni tra i più diffusi agenti riducenti che i sistemi biologici sfruttano.

La riduzione di un composto clorurato avviene in due fasi. Nella prima fase l'agente riducente dona un elettrone al cloro che viene eliminato come ione cloruro (Cl^-), mentre nell'idrocarburo si forma un radicale alchilico:



In genere questa fase è la più lenta nella trasformazione finale.

Nella seconda fase invece, avviene la trasformazione del radicale in base alle seguenti reazioni:

Tabella 3. 2 Potenziali di riduzione di alcuni agenti riducenti nei sistemi biologici

Agente riducente	Potenziale standard (V) a pH = 7.00
Vitamina B ₁₂	Da -0.59 a -0.8
Co (I) tetrafenilporfina	-0.56
Ferredoxina (ridotta)	-0.43
H ₂	-0.42
Cr (II)	-0.41
NADH+H ⁺	-0.32
Citocromo P450 (inattivato)	-0.30
Glutazione (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 ₂ O	0.82

- Meccanismo di idrogenolisi: è la reazione di uno ione idrogeno (H⁺) con il radicale alchilico a formare il derivato idrocarburo.
- Meccanismo di accoppiamento: in questa reazione due radicali alchilici si uniscono per formare l'addotto finale.
- Meccanismo di dialo-eliminazione: avviene quando nel composto clorurato è presente un secondo atomo di cloro adiacente al radicale, che elimina uno ione cloruro per formare un'insaturazione nell'inquinante.

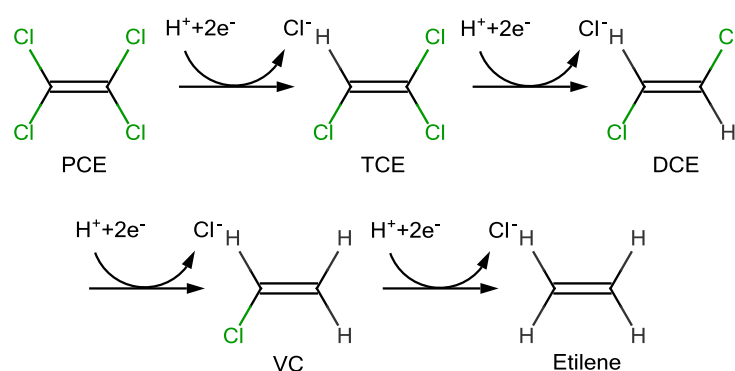
Le reazioni di dechlorazione riduttiva sono caratterizzate dal fatto che degradano l'inquinante clorurato sostituendo progressivamente ogni atomo di cloro con un

atomo di idrogeno. La Figura 3. 1 mostra il probabile meccanismo di degradazione riduttiva del percloroetilene (PCE).

Nella maggior parte delle dechlorurazioni riduttive, si ha una degradazione cometabolica: il composto clorurato viene casualmente degradato da un enzima o un cofattore prodotto durante il metabolismo di un altro composto. Come detto per qualsiasi degradazione cometabolica, anche in questo caso il microrganismo non trae beneficio energetico dalla degradazione dell'inquinante. Per generare energia devono metabolizzare un altro substrato che rappresenta l'agente ossidante (elettron accettore).

Negli ultimi anni però è stata individuata anche una tecnica di dechlorurazione riduttiva diretta. Si è trovato che alcuni ceppi utilizzano il composto clorurato come metabolita primario, traendo energia dalla sua degradazione. In questo caso il composto clorurato è l'accettore di elettroni, mentre l'idrogeno funge da donatore di elettroni. L'idrogeno è presente perché deriva dalla fermentazione di

Figura 3. 1 Possibile meccanismo di degradazione anaerobica riduttiva del PCE



substrati organici (lattato, butirato, metanolo, benzoato, etc.), per mezzo di batteri diversi da quelli adibiti alla degradazione dei solventi clorurati. Nella reazione di dechlorurazione riduttiva diretta, i microrganismi degradano molto più velocemente i composti molto clorurati (PCE e TCE) rispetto a quelli in parte ridotti (DCE e VC). Risulta utile precisare che anche in questo caso bisogna fornire ai microrganismi una fonte di atomi di idrogeno perché altrimenti la degradazione non avverrebbe.

I due tipi di dechlorurazione sono difficilmente distinguibili, soprattutto a livello di impianto pilota o nell'impianto vero e proprio. In laboratorio le due reazioni possono essere distinte perché la dechlorurazione diretta è molto più veloce rispetto a quella cometabolica. La seconda reazione è più lenta perché avviene come conseguenza di un legame casuale tra il composto clorurato e un enzima prodotto per metabolizzare un altro substrato.

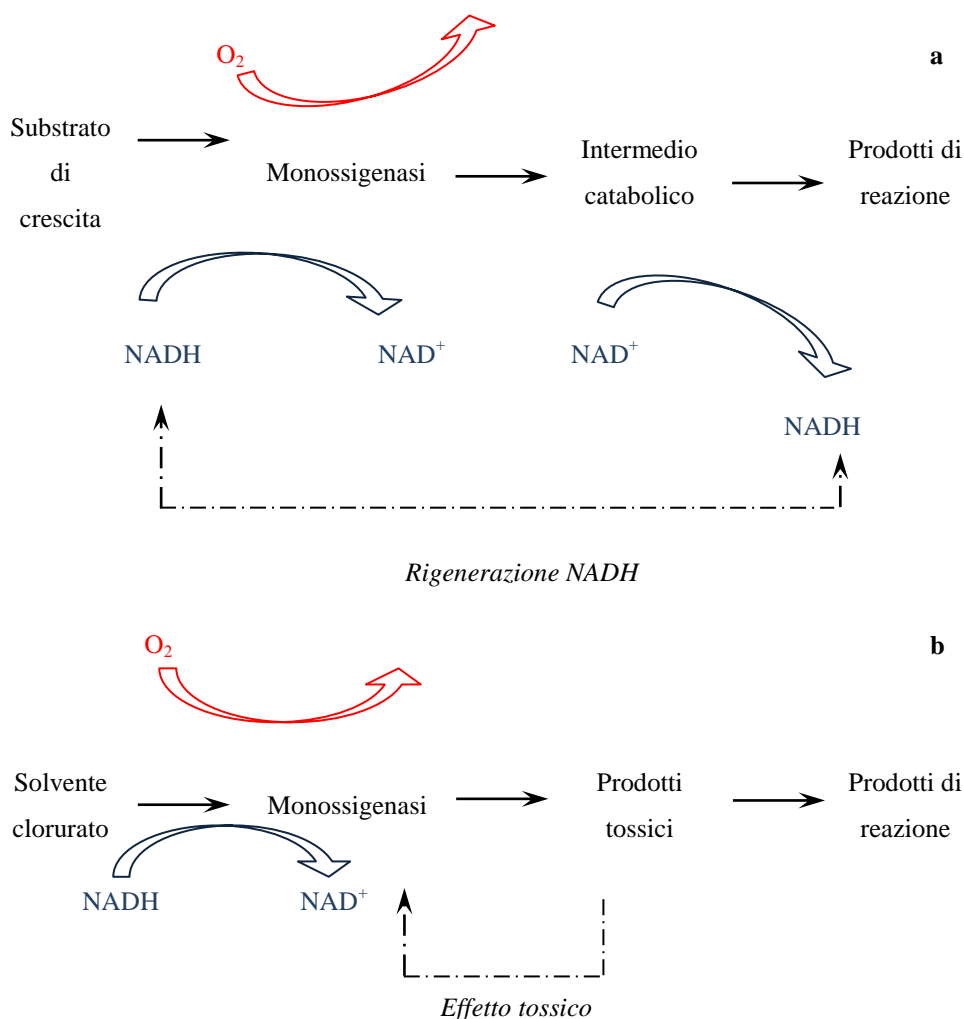
3.1.3 Biodegradazione aerobica cometabolica

La maggior parte dei composti clorurati possono essere degradati tramite reazione aerobica cometabolica. In questa reazione il composto clorurato viene casualmente ossidato da un enzima prodotto durante il metabolismo di un altro substrato, il metabolita primario (comportandosi pressochè come nella dechlorurazione riduttiva).

Come visto nelle reazioni di ossidazione precedenti, è l'enzima monossigenasi che permette la degradazione dei composti clorurati. In particolare 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 (Nicotinammide Adenina Dinucleotide) come agente riducente, che in entrambi i processi si ossida alla forma NAD⁺.

Nei normali processi di degradazione le sostanze riducenti sono rigenerate grazie ai prodotti intermedi delle reazioni di ossidazione del substrato primario (Figura 3. 2-a). Nei processi cometabolici che intervengono alla riduzione dei composti clorurati, invece, la rigenerazione non avviene. 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. Oltre a questo, i composti clorurati possono dar origine a prodotti di degradazione intermedi tossici, che inibiscono l'attività dei microrganismi. Nella Figura 3. 2-b, è riportata una rappresentazione schematica dell'ossidazione del composto clorurato da parte dell'enzima monossigenasi. Essendo lo stesso enzima

Figura 3. 2 Schema dell'ossidazione dei due substrati mediata dall'enzima monossigenasi.



responsabile dell'ossidazione sia del substrato primario che dell'inquinante, si verifica un fenomeno di competizione inibitiva tra i due substrati. Infatti entrambi 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 l'inquinante inibisce l'ossidazione del substrato di crescita.

Risulta quindi necessario fornire il substrato di crescita per avviare e sostenere il processo degradativo nel tempo, ma non deve essere alimentato in concentrazioni troppo alte, perchè altrimenti l'inibizione competitiva porterebbe 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 studi condotti precedentemente viene in genere riportato che i batteri alimentati con 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 quelli cresciuti con i substrati aromatici (quali toluene e fenolo) consentono di realizzare la degradazione cometabolica solo dei solventi clorurati insaturi⁵.

3.2 Il modello cinetico

Il modello cinetico serve a comprendere come variano le velocità di reazione in funzione delle concentrazioni dei componenti in gioco. Il modello è descritto da una cinetica tipo Monod per il caso di un singolo substrato cometabolico, in cui vengono inclusi fenomeni di inibizione competitiva fra substrato primario e substrati cometabolici, l'inattivazione del processo degradativo legato alla carenza di sostanze riducenti come NADH o NADPH e l'effetto tossico sulla biomassa dei prodotti di biodegradazione dei solventi clorurati nei confronti. Di seguito verranno descritte le espressioni della velocità di reazione per i composti coinvolti nel processo biodegradativo in funzione dei diversi fenomeni che entrano in gioco.

3.2.1 Velocità di reazione del substrato di crescita e del substrato cometabolico

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

$$R_S = -\frac{q_{max,S} \cdot S}{K_{S,S} + S} \cdot X \quad \text{e} \quad R_C = -\frac{q_{max,C} \cdot C}{K_{S,C} + C} \cdot X \quad [3.1]$$

dove:

R_S e R_C sono le velocità di reazione del substrato di crescita primario e di quello cometabolico

q_{maxS} e q_{maxC} le massime velocità specifiche di consumo

K_{SS} e K_{SC} le costanti di affinità

S e C le concentrazioni dei componenti in acqua

X è la concentrazione di biomassa in acqua

Tuttavia i fenomeni descritti precedentemente, intervengono a modificare tali espressioni. Di seguito si evidenzierà come questi fenomeni modificheranno le espressioni.

Inibizione competitiva

Le reazioni di ossidazione, che sono alla base dei processi di biodegradazione cometabolica aerobica, si realizzano grazie all'azione delle monossigenasi, i quali fungono da catalizzatori delle reazioni. La reazione avviene sui siti attivi dell'enzima, ai quali il substrato primario e quello cometabolico si legano. Dato che un enzima accoglie sul sito attivo uno svariato numero di substrati, è possibile che, in una matrice complessa come un'acqua di falda, si instaurino fenomeni competitivi. Questo comporta che i diversi substrati presentino una diminuzione della velocità di degradazione.

Questo fenomeno modifica l'espressione della velocità di reazione con l'inserimento di un'ulteriore termine, ottenendo le seguenti espressioni:

$$R_S = -\frac{q_{max,S} \cdot S}{K_{SS} \cdot \left(1 + \frac{C}{K_{iC}}\right) + S} \cdot X \quad \text{e} \quad R_C = -\frac{q_{max,C} \cdot C}{K_{SC} \cdot \left(1 + \frac{S}{K_{iS}}\right) + C} \cdot X \quad [3.2]$$

dove:

K_{iC} è il coefficiente di inibizione del cloroformio sul butano

K_{iS} è il coefficiente di inibizione del butano sul cloroformio.

Il consumo dei riduttori

Come detto precedentemente, in assenza di substrato di crescita, i processi biodegradativi dei composti clorurati possono arrestarsi a causa dell'esaurimento delle sostanze riducenti (NADH, NADPH, etc.). Per esprimere l'effetto che la carenza degli agenti riducenti può avere sulle velocità di degradazione viste finora, è stato introdotto un termine tipo Monod, 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 delle sostanze riducenti, espressa come concentrazione di elettroni equivalenti e K_R la costante di affinità dell'energia riducente. La disponibilità dei riducenti è funzione anche alla quantità 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 dei solventi clorurati, modificando le espressioni seguente modo:

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

e

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

[3.3]

dove:

$K_{so,S}$ è la costante di affinità dell'ossigeno per il substrato primario

$K_{so,C}$ è la costante di affinità dell'ossigeno per il substrato cometabolico.

3.2.2 Cinetica del consumo di ossigeno

Per quanto riguarda il consumo di ossigeno, la cinetica risulta proporzionale a quelle dei substrati secondo un rapporto stechiometrico, dato da:

$$R_R = \alpha_S \cdot R_S + \alpha_C \cdot R_C$$

[3.4]

dove:

α_s e α_c sono i rapporti stechiometrici rispettivamente tra ossigeno/substrato e ossigeno/clorurato. Questa relazione risulta valida se non intervengono fenomeni di trasporto che limitano la biodisponibilità dell'ossigeno molecolare alla cellula.

3.2.3 Effetto tossico dei CAH nei confronti della biomassa

Nella descrizione dell'espressione cinetica della biomassa nel processo degradativo, si deve tener di conto principalmente di due termini che influenzano la concentrazione cellulare. In generale, nell'espressione della velocità di reazione della biomassa, si può definire da una parte un termine positivo relativo alla crescita dovuta al consumo del substrato primario, dall'altra un fattore negativo dovuto alla morte cellulare per metabolismo endogeno dei clorurati.

La crescita della biomassa dovuto al consumo di substrato primario è direttamente proporzionale alla resa cellulare (Y) cioè la resa di conversione del substrato in biomassa. Il metabolismo endogeno viene espresso matematicamente⁶, invece, considerando che i prodotti tossici di degradazione inibiscono tutta l'attività microbica e che questa decresce proporzionalmente alla quantità di cometabolita degradato.

È stato quindi definito un coefficiente detto capacità di trasformazione (T_C), che rappresenta il rapporto tra quantità di composto degradato e quantità di cellule inattivate. Secondo questo approccio, l'espressione dell'effetto tossico sulla biomassa è dato dalla seguente relazione:

$$R_X = -Y \cdot R_S - b \cdot X + \frac{1}{T_C} \cdot R_C \quad [3.5]$$

dove:

Y è la resa cellulare

b è il fattore di morte della biomassa per metabolismo endogeno

T_C è la capacità di trasformazione

Nella tabella sottostante vengono riassunte le principali espressioni che vengono coinvolte nella cinetica della biodegradazione aerobica cometabolica dei solventi clorurati:

Componenti	Espressione della velocità di reazione
Substrato primario	$R_S = - \frac{q_{max,S} \cdot S}{K_{SS} \cdot \left(1 + \frac{C}{K_{iC}}\right) + S} \cdot X \cdot \frac{O}{K_{so,O} + O}$
Substrato cometabolico	$R_C = - \frac{q_{max,C} \cdot C}{K_{SC} \cdot \left(1 + \frac{C}{K_{iS}}\right) + C} \cdot X \cdot \frac{O}{K_{so,O} + O}$
Riducente	$R_R = \alpha_s \cdot R_S + \alpha_c \cdot R_C$
Biomassa	$R_X = -Y \cdot R_S - b \cdot X + \frac{1}{T_c} \cdot R_C$

Capitolo 4

Tecnologie di trattamento

Nell'applicazione in campo reale della degradazione dei composti clorurati, si sono sviluppate numerose tecnologie di trattamento. Esse possono essere suddivise in due classi: bioremediation on-site e bioremediation in-situ.

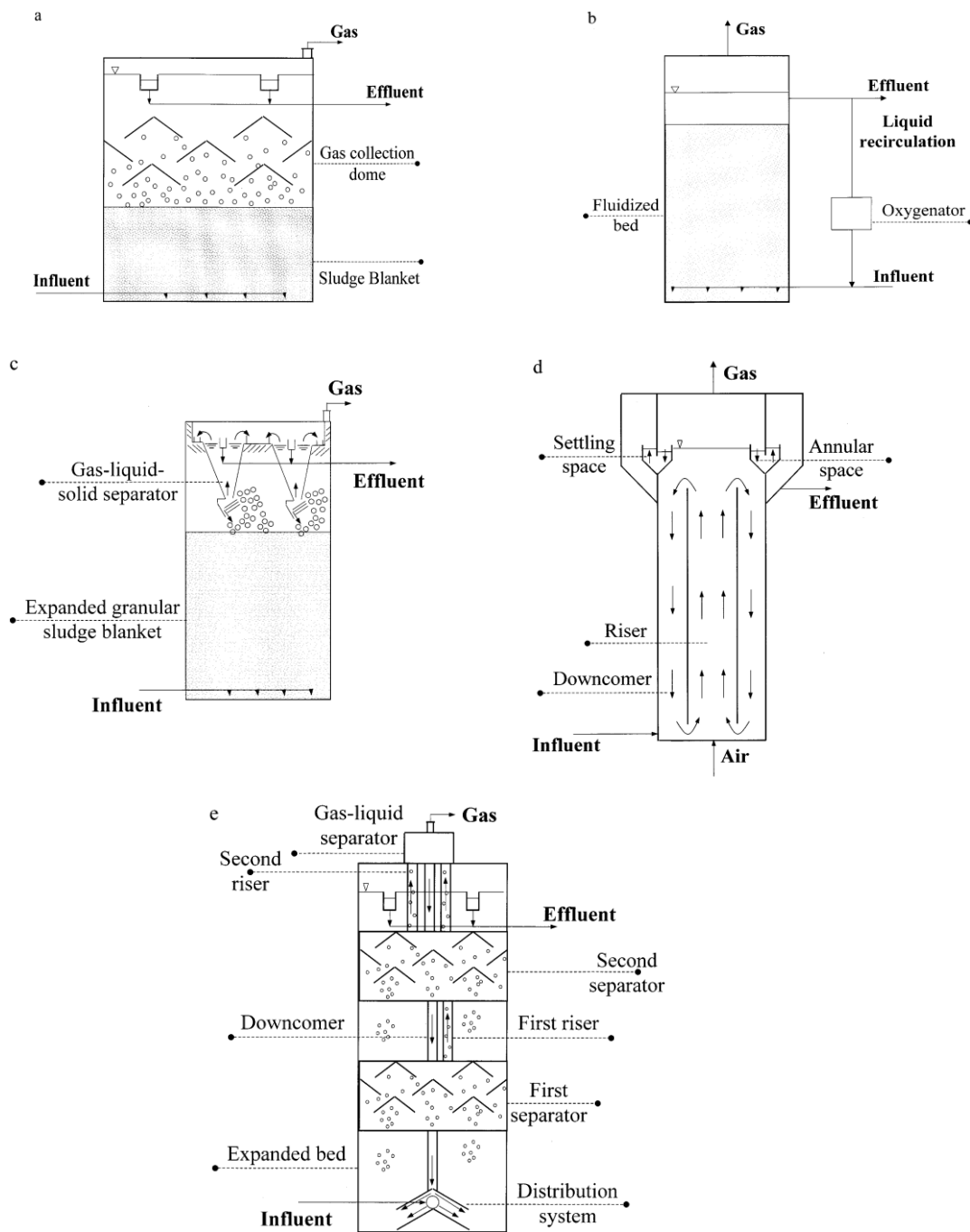
4.1- Bioremediation on-site

Questa tecnica consiste nel prelevare acqua contaminata dalla falda, farla passare attraverso un bioreattore (nel quale avviene la depurazione) e reimmetterla nel sottosuolo una volta pulita. Questo genere di reattori sono del tipo a biomassa adesa: vengono sfruttate le caratteristiche di determinati microrganismi in grado di aderire a delle superfici invece di rimanere in sospensione come cellule planctoniche⁷.

I reattori basati sul biofilm sono comunemente usati per trattare grandi volumi di soluzioni acquose diluite come acque di falda, acque municipali e acque industriali. Tra i principali reattori a biofilm possiamo individuare i sistemi a biomassa adesa convenzionali come filtri percolatori o i biodischi (RDC) e i sistemi a biomassa adesa innovativi come up-flow sludge blanket (USB), reattori a biofilm a letto fluidizzato (biofilm fluidized bed, BFB), expanded granular sludge blanket (EGSB), biofilm air lift suspension (BAS) o a circolazione interna (IC). Nei reattori USB, BFB ed EGSB le particelle che supportano il biofilm sono fluidizzate mediante una corrente di liquido che sale verso l'alto. Nei reattori BAS,

viene ottenuta una sospensione attraverso il pompaggio di aria nel sistema, nel reattore IC, il gas prodotto guida la circolazione e il miscelamento del liquido e solidi come in un reattore air-lifted infine nel filtro percolatore e nei biodischi (RDC) si ha una situazione di biofilms aderenti a materiali di supporto investiti dalla corrente di processo (biofilms statici)⁸.

Figura 4. 1 configurazioni di alcuni reattori a biofilms, a) USB, b) BFB, c) EGSB, d) BAS, e) IC.



4.1.1 Reattori a biofilm a letto fluidizzato (BFB)

Nei reattori a biofilm a letto fluidizzato (Figura 4. 1-b), il liquido è pompato lungo il letto contenente un mezzo particellare fine (tipicamente sabbia dell'ordine di 0.2-0.8 mm). Il liquido è pompato ad una velocità tale da mantenere una buona fluidizzazione del letto e non avere così sedimentazioni sul fondo⁹. Nello stato fluidizzato il mezzo fornisce una grande superficie specifica sulla quale può crescere la biomassa, permettendo concentrazioni dell'ordine di 10-40 Kg/m³. Nel caso di degradazioni aerobiche, il reattore deve essere aerato facendo ricircolare il liquido su un ossigenatore (si può gorgogliare con aria o ossigeno). Per grandi richieste di ossigeno, il reattore può essere aerato direttamente all'interno formando una miscela trifase. La tecnologia BFB viene spesso utilizzata per il trattamento di flussi contaminati da composti organici o inorganici, che richiedono lunghi tempi di permanenza (più di 15 giorni) per l'ossidazione o la riduzione biologica e per concentrazioni basse dei solidi sospesi (meno di 100 mg/L).

4.1.2 Reattore a Biofilm Airlift Suspension (BAS)

I reattori ad airlift (Figura 4. 1-d) consistono in due parti interconnesse, una sezione in cui il flusso sale (raiser) ed una in cui scende (downcomer). Esistono molteplici configurazioni per questo tipo di reattore, tra cui a loop interno ed a loop esterno ma comunque il principio di funzionamento non cambia. Un gas è iniettato dal basso che sale ed esce nella parte alta del raiser. Nei reattori a loop interno, l'aria può ricircolare nella sezione downcomer e fornisce l'aerazione su tutto il reattore. La differenza di densità nelle due sezioni, data da diversi valori di hold-up del gas, guidano il liquido a circolare tra riser e downcomer. Se la velocità del liquido è sufficientemente alta, si formerà una sospensione omogenea con le piccole particelle lungo tutto il reattore. La tecnologia BAS è stata sviluppata per la purificazione di acque reflue industriali tramite trattamenti aerobici ed anaerobici. Nel caso di trattamenti aerobici il gas che ricircola all'interno del reattore è aria, nel caso di trattamenti anaerobici si utilizzano i gas che si formano durante la degradazione.

4.1.3 Reattore a Circolazione Interna (IC)

I reattori a circolazione interna (Figura 4. 1-e) è formato da due compartimenti simili al reattore USB posti uno sull'altro. Nella parte inferiore del reattore la maggior parte dei componenti organici viene trasformata in metano e anidride carbonica. Il gas formatosi, raccolto dal primo sistema di separazione, risalendo, genera nel refluo presente nel reattore un flusso ascendente che giunge al separatore di gas, posto in cima al reattore. Il separatore di fasi, permette la fuoriuscita del biogas dalla sommità del reattore e contemporaneamente il riflusso del refluo nella parte bassa del sistema: da qui il nome Internal Circulation. Il biogas formatosi nella seconda zona del reattore viene raccolto nel secondo separatore di fase e da qui risale al degassing tank posto in cima al reattore, mentre l'effluente depurato esce dalla sommità dello stesso.

4.2- Bioremediation in-situ

Il trattamento in-situ è un approccio per la bonifica di acquiferi e suoli contaminati, che 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 ed accrescano i meccanismi di degradazione in molteplici configurazioni. Tali tecniche includono la bioaugmentation, 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.

4.2.1 Tecniche di implementazione della degradazione

Le tecniche solitamente impiegate nel trattamento di bioremediation in situ, servono ad avviare e a mantenere nel tempo il processo di degradazione

cometabolica degli inquinanti clorurati, tramite i microrganismi presenti nel suolo. Di seguito si fornisce un elenco delle tecniche adottate:

Aggiunta di nutrienti. L'aggiunta di nutrienti consiste nell'alimentazione di sostanze necessarie alla crescita dei microrganismi, quali azoto e fosforo, oltre che l'introduzione del substrato di crescita o dell'ossigeno. In questo modo si evita che la carenza di tali sostanze inattivi i microrganismi e quindi la degradazione stessa dei clorurati.

Aggiunta di donatori di elettroni. 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 dal cui metabolismo si produce l'enzima monossigenasi, che catalizza anche la reazione di degradazione del solvente clorurato.

Aggiunta di accettori di elettroni. 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): una sua aggiunta deve essere eseguita in modo tale da evitare che la sua bassa concentrazione in acqua diventi un fattore limitante per la degradazione aerobica del contaminante.

Bioaugmentation. La tecnica di bioaugmentation consiste nell'integrazione di microrganismi che siano in grado di degradare l'inquinante, in luoghi in cui sono carenti. Tali microrganismi possono provenire da popolazioni batteriche autoctone e fatte sviluppare in un reattore biologico esterno, oppure da ceppi batterici noti che sono 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 è notevolmente diminuita, a causa degli effetti di una prolungata attività di degradazione e degli effetti di tossicità dei prodotti di degradazione.

4.2.2 Configurazioni dei trattamenti

Come è stato detto precedentemente, 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). 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 aumentarne le concentrazioni nel sottosuolo e ridurre il rischio che la sua mancanza diventi un agente limitante nella degradazione del contaminante. Considerando il fatto che la volatilità di alcuni solventi clorurati non è trascurabile, 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 reiniettata 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.

Capitolo 5

Obiettivi

Il lavoro di tesi presentato, è stato svolto presso i laboratori del Lazzaretto del Dipartimento di Ingegneria Chimica Mineraria e delle Tecnologie Ambientali (DICMA) della Facoltà di Ingegneria presso l'Università di Bologna, nel laboratorio di ricerca del professore Pinelli Davide e del ricercatore Frascari Dario. Da anni in questo dipartimento si studia il trattamento di acque contaminate da solventi clorurati tramite degradazione batterica e vantano numerose pubblicazioni su varie riviste specializzate¹⁰.

5.1- I lavori pregressi

Negli ultimi anni è stata ottimizzata una tecnologia di trattamento per l'abbattimento del cloroformio tramite una degradazione aerobica cometabolica¹¹. Il sistema sfrutta un ceppo batterico butano-ossidante (*Rhodococcus aetherovorans BCPI*), il quale è stato inoculato in colonne impaccate con supporti sui quali è stato fatto crescere¹². Sono state testate tre diverse colonne a flusso, con due diversi riempimenti: la prima colonna dal volume di 0,165 L con supporti vetrosi, la seconda contenente gli stessi riempimenti di un volume maggiore pari a 1,772 L, la terza riempita in sabbia di un volume di circa 35 L. Le prime due colonne hanno simulato un biorisanamento (bioremediation) on-site, mentre il reattore da 35L ha simulato un bioarricchimento (bioaugmentation) in-situ di un acquifero contaminato. Delle tre colonne sono stati anche sviluppati

modelli matematici per la simulazione del profilo di concentrazione dei soluti lungo la colonna (butano, cloroformio ed ossigeno).

Un aspetto interessante da investigare è la valutazione dell'efficacia della degradazione del cloroformio con diversi tipi di supporti. L'utilizzo di supporti porosi infatti, data la loro più elevata area superficiale, permettono la creazione di un biofilm più esteso aumentando così l'efficacia del trattamento.

5.2- Lo sviluppo del progetto

Il progetto di ricerca in cui si è stato svolto il mio tirocinio, è parte di un più ampio progetto: Il progetto "Minotaurus"¹³. Il progetto Minotaurus è un progetto europeo che prevede la strutturazione di una serie innovativa di tecnologie ambientali, tutte basate sul concetto di immobilizzazione di biocatalizzatori, al fine di eliminare inquinanti organici. Le tecnologie proposte devono poter trovare applicazione in sistemi naturali (in situ) e meccanizzati (ex situ) per il biorisanamento di acque di falda, acque reflue e suolo.

L'obiettivo del progetto di ricerca riguarda l'intensificazione di tecnologie a bioreattori a biofilm per il trattamento di acque di falda e reflue. In particolare il gruppo di ricerca Pinelli-Frascari prevede lo studio, nonché lo sviluppo, di una tecnica di degradazione di due solventi clorurati presenti in acque di falda, il tricloroetilene (TCE) e l'1,1,2,2-tetracloroetano (TeCA), provenienti da un sito contaminato nei pressi di Rho (MI). Lo scopo ultimo è quello di costruire un reattore a biomassa adesa del volume di circa 10 L che sia in grado di trattare l'acqua di falda contaminata in quel sito, simulando in piccola scala un biorisanamento meccanizzato on-site. Del reattore verrà anche studiato ed implementato un modello fluidodinamico, che permetterà di ottimizzare la tecnica di alimentazione per una più efficace degradazione.

L'attività di ricerca effettuata durante il periodo del mio tirocinio, si è articolata in due parti ben distinte. La prima sezione è dedicata allo sviluppo ed alla selezione di un consorzio batterico capace di degradare i due composti alifatici clorurati target. La selezione del consorzio batterico, si è sviluppata preparando prove batch contenenti diversi tipi di acqua: alcune prove con acqua prelevata dal sito di

Rho, altre con acqua sintetica mimante quella campionata. Nelle prove batch i batteri sono stati selezionati somministrando vari substrati di crescita, mantenendo sempre la presenza dei composti clorurati. Una volta selezionato il consorzio si sono effettuate delle prove preliminari su supporti, allo scopo di determinare quale sia capace di far sviluppare al meglio la biomassa selezionata. Oltre a questo la biomassa è stata anche coltivata in un fermentatore automatico, in modo da produrne una quantità tale da colonizzare dei reattori a colonna, impaccati con la stessa tipologia di supporti utilizzati per le prove batch.

La seconda parte riguarda, come appena detto, la costruzione dell'impianto formato da quattro colonne impaccate contenenti i supporti da valutare. Questo impianto è stato strutturato per cercare di capire quale dei supporti testati esprima al meglio le potenzialità degradative della biomassa selezionata in condizioni di flusso continuo. Si cercherà inoltre di ricavare i parametri fluidodinamici che, una volta inseriti in un opportuno modello matematico, permetteranno di simulare le concentrazioni dei composti presi in esame lungo il profilo di ogni colonna.

Capitolo 6

Metodiche analitiche e sperimentali

Nel presente capitolo verranno descritte le metodiche utilizzate per monitorare le prove sperimentali presentate. Nella prima parte saranno descritte le procedure analitiche applicate per l'analisi dei substrati primari, dei solventi clorurati e dell'ossigeno in fase liquida. Nella parte a seguire sono invece riportate le metodiche per l'analisi della concentrazione della biomassa adesa e sospesa.

6.1- Analisi cromatografiche

Le concentrazioni dei substrati di crescita e dei solventi clorurati in fase liquida sono state misurate utilizzando il metodo della gascromatografia. Essendo composti di natura differente sono stati montati due rivelatori distinti nel gascromatografo HP 6890: un rivelatore FID (flame ionization detector) ed un rivelatore ECD (electron capture detector).

Il detector a ionizzazione di fiamma è applicato nelle misure dei composti in cui sono presenti legami carbonio-idrogeno. Il composto da analizzare viene sostanzialmente combusto grazie alla miscelazione con una corrente di idrogeno ed ossigeno e il passaggio su una fiamma. I vapori di combustione vengono caricati generando una corrente elettrica, traducibile in segnale allo strumento. Nel nostro caso è stato usato per le misurazioni dei substrati di crescita.

Per la determinazione dei solventi clorurati è stato utilizzato un rivelatore ECD (electron capture detector). Questo rivelatore utilizza un isotopo radioattivo del

nicel (Ni^{63}) depositato su una lamina d'oro, che emette radiazioni β ionizzando il gas di trasporto (N_2) e producendo elettroni, quindi corrente. Se sono presenti composti molto elettronegativi i quali assorbono la corrente generata, questo si traduce in una variazione del segnale allo strumento.

Le caratteristiche dello strumento ed i parametri impostati per le analisi sono riportati nella Tabella 6. 1.

Tabella 6. 1 Caratteristiche e parametri impostati al gascromatografo

	Modello	HP-VOC
Colonna	Diametro interno	0.32 mm
	Lunghezza	30 m
	Liner	Split 30:1
Detector	Front	ECD
	Back	FID
Parametri	Gas di trasporto	Elio
	Gas di make-up	Azoto
	Flusso	165 mL/min
	Velocità	59 cm/s
	Temp. Iniettore	135°C
	Temp. Detector	250°C
	Temp. Colonna	135°C

Per la determinazione dei vari composti, sono state effettuate due tipologie di analisi: una manuale ed una automatica, usando un analizzatore dello spazio di testa.

6.1.1 Modalità manuale

Le analisi nella modalità manuale sono state effettuate sullo spazio di testa delle vial preparate, andando così a determinare la concentrazione in fase gas. Per rendere l'analisi più precisa, si controllano le condizioni dell'equilibrio tra la fase liquida e la fase gas all'interno delle vial. L'equilibrio è stato ottenuto mettendo le

vial in agitazione e termostatate a circa 30°C per 15 minuti. Per ogni analisi è stato prelevato, tramite una siringa a tenuta di gas, un volume di 100 µL, quantità che risulta irrilevante nei confronti dello spazio di testa delle vial (50-60 mL circa).

6.1.2 Modalità automatica

La modalità automatica è stata sfruttata in tutte quelle prove in cui la concentrazione dei due solventi clorurati doveva essere determinata direttamente dalla fase liquida. Per far ciò si è usato un analizzatore di spazio di testa Agilent 7694E collegato al gas-cromatografo, il quale è in grado di prelevare volumi riproducibili del gas nello spazio di testa che viene a crearsi nelle vial di campionamento. Il funzionamento dell'analizzatore prevede la preparazione delle vial (da 20 o 10 mL) ed il loro posizionamento nel carrello posto al suo interno (vial tray). Una volta inserite nel carrello, le vial vengono spostate verso una camera riscaldante che si trova alla temperatura desiderata e vengono tenute all'interno di questa per un tempo fissato (tempo di equilibrio), sufficiente per stabilire l'equilibrio tra le fasi. In seguito avviene l'iniezione nel gascromatografo e per far questo, lo strumento deve pressurizzare la vial in modo tale da caricare successivamente una valvola di loop. Le condizioni di temperatura e il tempo di equilibrio sono parametri che devono essere impostati dall'operatore. Tali parametri risultano di fondamentale importanza poichè possono influenzare la sensibilità, la precisione e l'accuratezza dell'analisi. Ad esempio aumentando la temperatura della camera riscaldante in cui viene posta la vial prima dell'iniezione, si potrebbe aumentare la quantità di analita nello spazio di testa, la pressione all'interno della vial e quindi la quantità di analita iniettata. Questo aumenta la sensibilità dell'analisi. Ovviamente un'eccessiva temperatura può avere anche effetti negativi dovuti alla degradazione dell'analita o all'eccessivo aumento di pressione all'interno della vial che possono causare problemi di tenuta e di conseguente perdita di analita. Anche il tempo di equilibrio influenza la sensibilità dall'analisi. Un tempo troppo corto infatti non permette il raggiungimento della temperatura desiderata (impostata) o dell'equilibrio di

ripartizione, mentre se troppo lungo, potrebbe portare alla degradazione del prodotto o a perdite oltrechè rallentare inutilmente l'analisi. E' quindi evidente che le condizioni di temperatura e di tempo di equilibrio vanno scelte in maniera accurata in modo da ottenere una buona risposta da parte dello strumento (migliore sensibilità) ma di non allungare eccessivamente i tempi di analisi. Sulla base di diverse prove effettuate, si è riusciti ad ottimizzare la procedura di analisi, minimizzando sia i tempi di misura che i volumi prelevati. La procedura di analisi prevede il prelievo di 1 mL di campione tramite una siringa il quale, una volta assicurata l'assenza di bolle eventualmente formatesi nella fase di prelievo, viene iniettato in una vial da 10 mL preventivamente chiusa con un tappo in teflon. Per evitare di mandare la vial in pressione viene inserito un ulteriore ago nel setto e subito tolto una volta terminata l'iniezione del campione. La vial viene poi lasciata ad equilibrare in una camera termostata a 30°C per 15 minuti. A questo punto il campione viene posto nell'analizzatore di spazio di testa impostato ad una temperatura di 40°C e con un equilibration time pari a 30 s.

6.1.3 Calibrazione delle concentrazioni dei substrati di crescita e dei solventi clorurati.

Le calibrazioni permettono di associare ad un valore di area di picco una determinata concentrazione tramite un coefficiente di correlazione. Le calibrazioni sono state effettuate sia nella modalità manuale che nella modalità automatica, utilizzando un analizzatore dello spazio di testa.

Nel caso della modalità manuale sono stati calibrati sia i due inquinanti clorurati che quattro substrati di crescita: metano, propano, butano e pentano. Attraverso uno standard di controllo, i due solventi clorurati sono stati monitorati periodicamente costruendo due carte di controllo; queste analisi periodiche permettono di valutare la precisione e l'accuratezza del metodo, calcolando i valori di ripetibilità sulla base di diversi indici statistici.

Le analisi in modalità automatica hanno interessato solo la determinazione delle concentrazioni del TCE e del TeCA, quindi la calibrazione è stata effettuata solo per questi due composti.

Modalità manuale

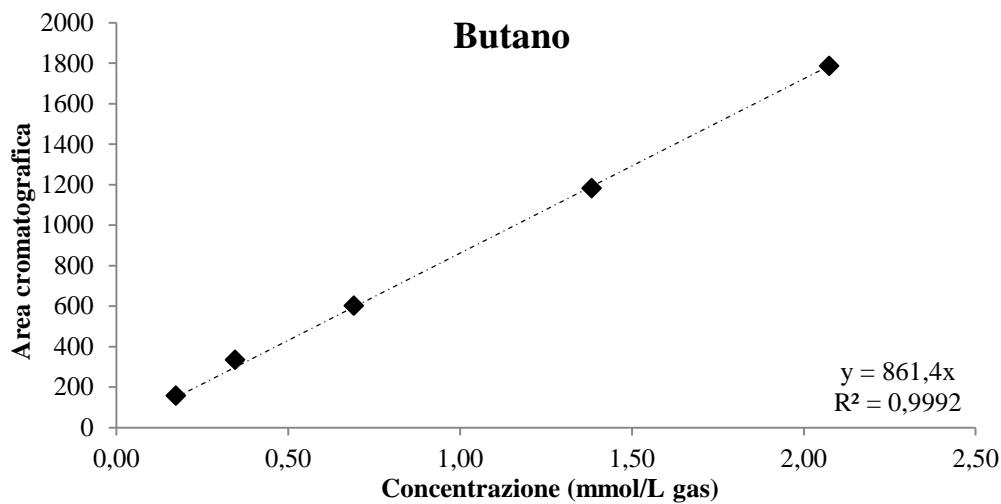
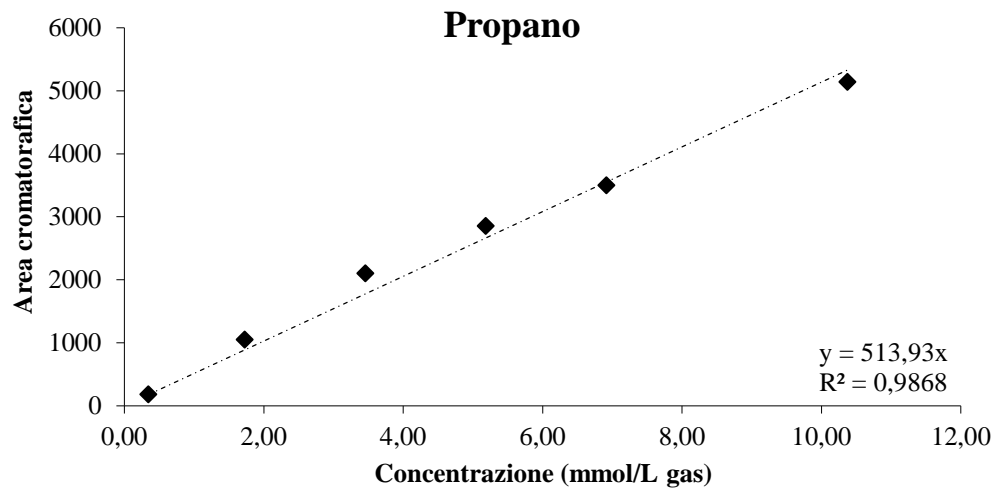
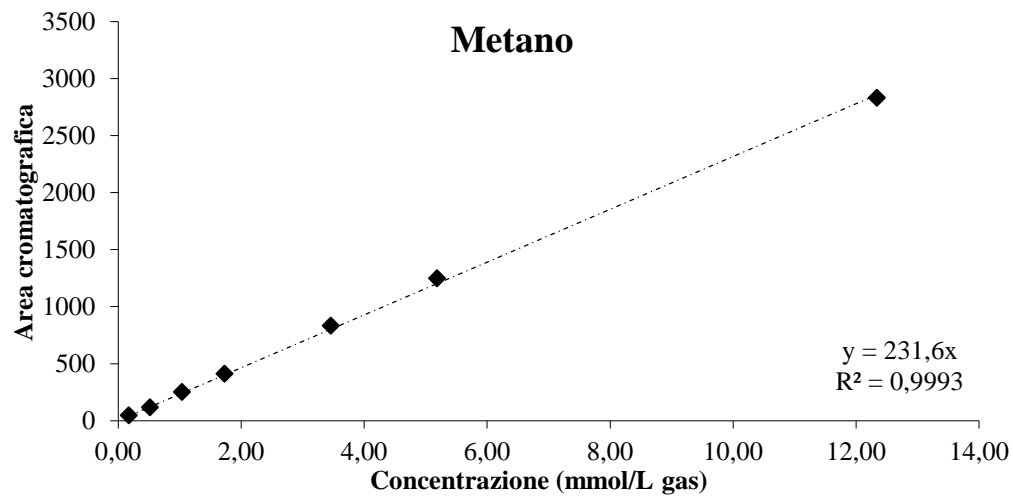
Per la calibrazione dei substrati di crescita, si sono preparati degli standard a concentrazione nota, inserendo differenti volumi di analita all'interno di vial da 119 mL chiuse ermeticamente. Le concentrazioni degli standard e le rispettive aree sono state riportate nella Tabella 6. 2.

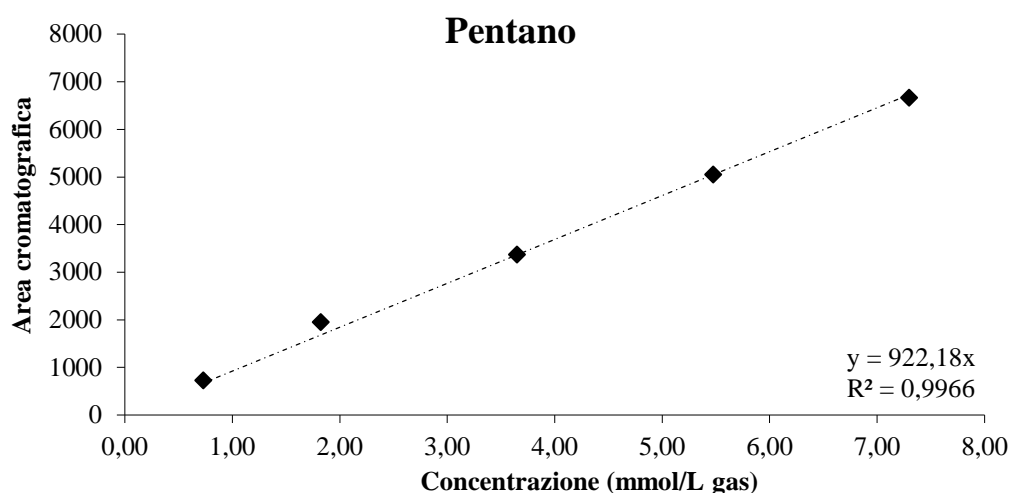
Tabella 6. 2 Standard dei substrati di crescita preparati per le calibrazioni

Standard Metano				Standard Propano			
	V _{metano} (mL)	C _{gas} (mmol/L)	Area		V _{propano} (mL)	C _{gas} (mmol/L)	Area
A	0,5	0,173	44,6	A	1	0,346	180,8
B	1,5	0,519	115,3	B	5	1,729	1048,8
C	3	1,037	249,5	C	10	3,458	2102,2
D	5	1,729	411,5	D	15	5,187	2854,6
E	10	3,458	831,2	E	20	6,916	3497,2
F	15	5,187	1246,4	F	30	10,374	5139,6
G	35,7	12,345	2829,4				

Standard Butano				Standard Pentano			
	V _{butano} (mL)	C _{gas} (mmol/L)	Area		V _{pentano} (μL)	C _{gas} (μmol/L)	Area
A	0,5	0,173	173	A	10	0,730	52,6
B	1	0,346	346	B	25	1,825	131,4
C	2	0,692	692	C	50	3,650	262,8
D	4	1,383	1383	D	75	5,475	394,2
E	6	2,075	2075	E	100	7,300	525,6

Nei grafici successivi vengono mostrate le relative rette di calibrazione, ottenute riportando le aree cromatografiche in funzione con le rispettive concentrazioni degli standard dei substrati di crescita.





Dalle regressioni lineari delle rette ottenute, si sono determinati i relativi coefficienti di calibrazione (espressi in $area\ L\ mmol^{-1}$). La Tabella 6. 3 mostra i valori dei coefficienti di calibrazione trovati in precedenza e li converte (tramite i pesi molecolari) in quelli espressi in $area\ L\ mg^{-1}$.

Tabella 6. 3 Valori dei coefficienti di calibrazione dei substrati di crescita usati

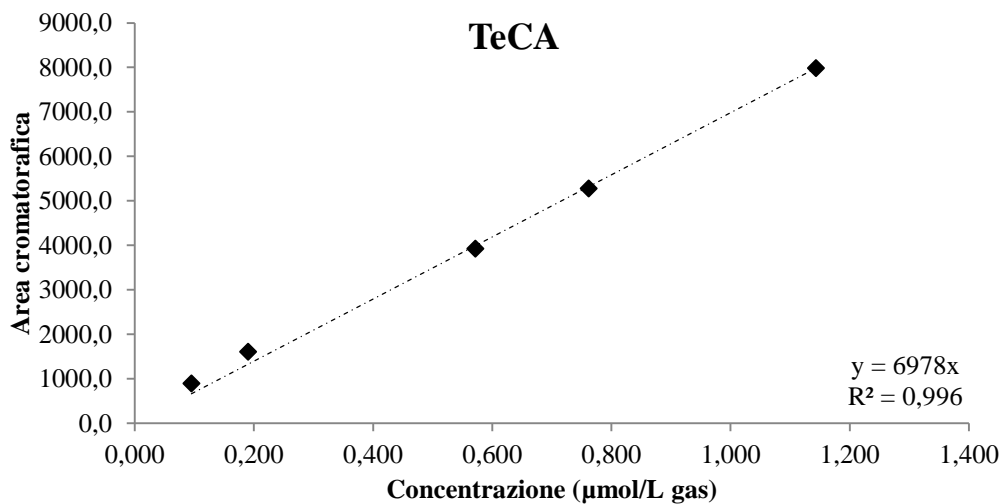
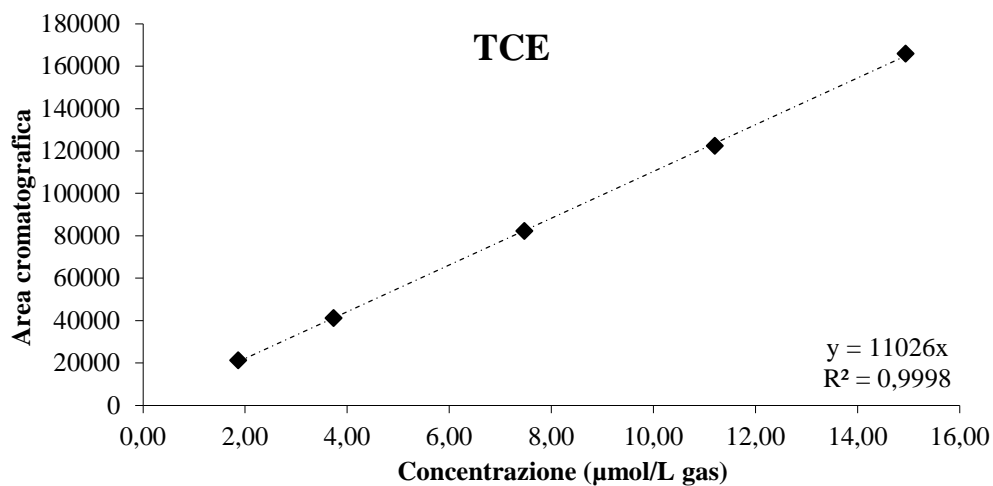
	PM (mg/mmol)	Coeff. Calib. (Area mmol/L)	Coeff. Calib. (Area mg/L)
Metano	16	232	14,47
Propano	44	514	11,68
Butano	58	861	14,85
Pentano	72	922	12,80

Per la calibrazione del tricloroetilene e del 1,1,2,2-tetracloroetano, sono state preparate delle soluzioni madre a concentrazione nota in esano. Per la preparazione della soluzione madre di TCE, si sono prelevati 500 μ L del solvente puro, li si sono inseriti in un pallone da 125 mL e si è portato a volume con esano. La soluzione formata, ha una concentrazione di $4,55 \cdot 10^{-2}$ mol/L. Per la preparazione della soluzione madre di TeCA, si sono prelevati 60 μ L di solvente puro, portandoli a volume in un pallone da 250 mL con esano. La soluzione risultante ha una concentrazione di $2,27 \cdot 10^{-3}$ mol/L. Dalle soluzioni madre si è proceduto alla preparazione degli standard, prelevando differenti volumi di tali

soluzioni ed inserendole nelle vial da 119 mL chiuse ermeticamente. I dati relativi alla preparazione degli standard per i due solventi clorurati, sono riportati nella Tabella 6. 4.

Tabella 6. 4 Standard dei solventi clorurati preparati per le calibrazioni

Standard TCE				Standard TeCA			
	V _{sol madre} (uL)	C _{gas} (µmol/L)	Area		V _{sol madre} (uL)	C _{gas} (µmol/L)	Area
A	5	1,87	21157	A	5	0,095	891,7
B	10	3,74	41167	B	10	0,191	1598,9
C	20	7,47	82101	C	30	0,572	3918,5
D	30	11,21	122398	D	40	0,762	5272,3
E	40	14,94	165770	E	60	1,143	7981,5



Dalla regressione lineare delle rette ottenute, si sono calcolati i relativi coefficienti di calibrazione (espressi in $area \mu mol L^{-1}$). La Tabella 6. 5 mostra i valori dei coefficienti di calibrazione trovati in precedenza e li converte (tramite i pesi molecolari) in quelli espressi in $area L mg^{-1}$.

Tabella 6. 5 Valori dei coefficienti di calibrazione dei solventi clorurati usati

	PM (g/mol)	Coeff. Calib. (Area/mmol/L)	Coeff. Calib. (Area/mg/L)
TCE	131,35	11026	83947
TeCA	167,85	6978,0	41573

L'accuratezza del metodo di analisi viene stimata in termini di errore medio percentuale, tramite la messa a punto di carte di controllo che, nel nostro caso, sono state costruite per i due solventi clorurati.

La carta di controllo viene costruita definendo innanzitutto un valore medio, al quale saranno associati dei limiti, detti di attenzione e di controllo. Questi limiti vengono calcolati, partendo dal valore medio dello standard di controllo, dalla deviazione standard dei dati storici su tali standard e dal coefficiente t di student (per $\alpha = 0,05$ e $\alpha = 0,01$ rispettivamente) per questi dati.

I valori delle misure effettuate sugli standard di controllo dovrebbero cadere entro tali parametri perchè la calibrazione possa essere considerata ancora valida. Se ciò non accadesse, significherebbe che le misure effettuate in queste condizioni dello strumento non sono compatibili dal punto di vista statistico con la taratura utilizzata. Lo standard di controllo è stato preparato in modo tale avere concentrazioni dei due analiti all'interno dell'intervallo delle rette di calibrazione. Le concentrazioni nominali scelte risultano pari a $2,97 \text{ mgL}^{-1}$ per il TCE e $5,64 \text{ mgL}^{-1}$ per il TeCA. Nei grafici 6. 1 e 6. 2 vengono riportate le carte di controllo per i due solventi clorurati. Come si può notare, esistono alcuni valori, sia per il TCE che per il TeCA che escono dai limiti preposti. Alcune indagini svolte hanno permesso di capire che questo non è da attribuirsi al fatto che l'accuratezza del metodo d'analisi utilizzato sia inadeguato, ma al fatto che la preparazione degli standard di controllo è stata condotta nel modo sbagliato.

Grafico 6. 1 Carta di controllo per variabili (o di Shewart) per il TCE

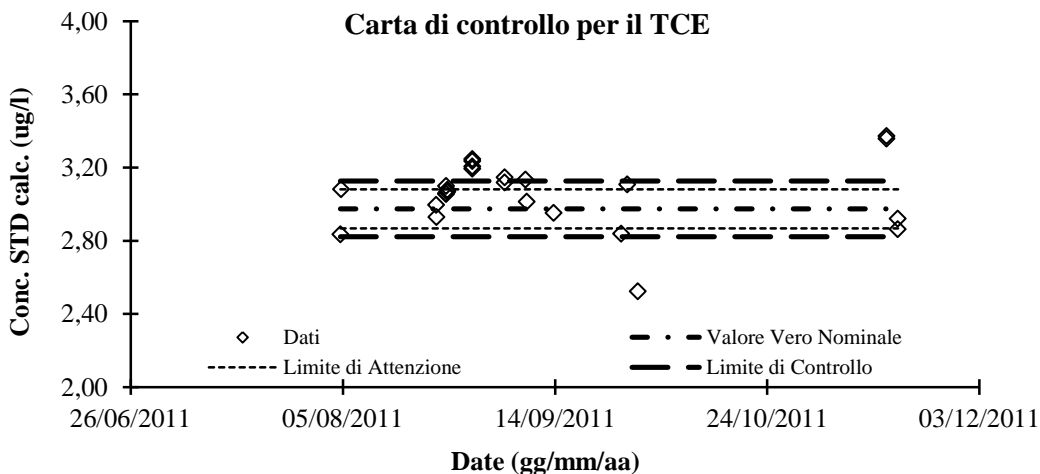
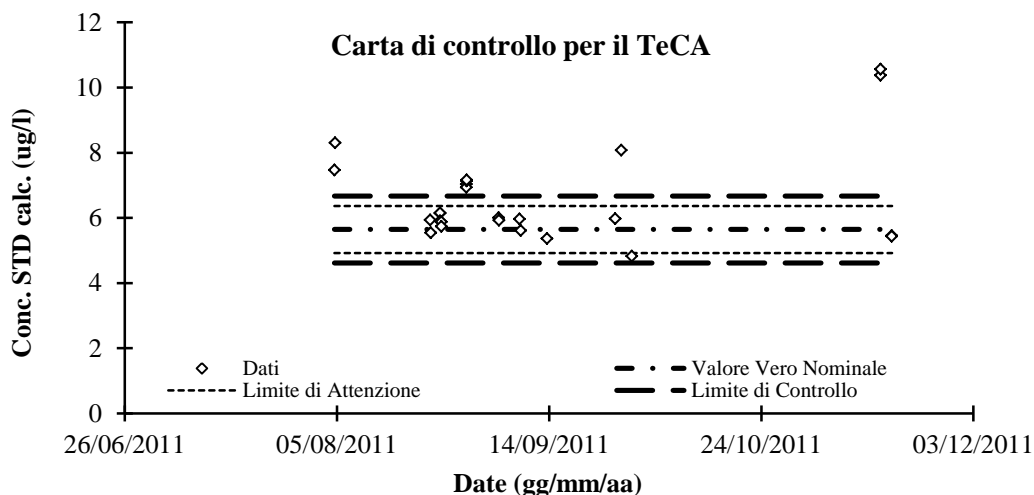


Grafico 6. 2 Carta di controllo per variabili (o di Shewart) per il TeCA



Modalità automatica

La calibrazione dei due solventi clorurati è stata effettuata preparando due soluzioni sature degli stessi. Le concentrazioni delle soluzioni sature di TCE e TeCA avevano rispettivamente una concentrazione di 1100 mg/L e 2970 m/L. Da queste si è proseguito con la preparazione di due soluzioni madre a concentrazione nota per ciascuna delle due soluzioni sature. La Tabella 6. 6 mostra le concentrazioni delle soluzioni madre preparate.

Tabella 6. 6 Concentrazioni delle soluzioni madre dei due solventi clorurati

	C_{TCE} (g/L)	C_{TeCA} (g/L)
Sol. madre 1	2,40	6,51
Sol. madre 2	9,59	25,92

Da queste soluzioni si sono ottenuti gli standard veri e propri, prelevando volumi crescenti delle soluzioni madre ed inserendoli nelle apposite vial da 10 mL. Una volta inserito l'analita si è aggiunta acqua per arrivare ad un volume finale di 1 mL. Gli standard vengono poi fatti agitare per 15 minuti in ambiente termostato a 30 °C ed infine si procede con l'analisi. La Tabella 6. 7 mostra le concentrazioni degli standard preparati e le rispettive aree cromatografiche. Interpolando i dati delle aree risultanti dall'analisi del GC con le concentrazioni degli standard è stato possibile ricavare il coefficiente di calibrazione per ogni solvente espresso come $Area L mg^{-1}$ (Tabella 6. 8).

Tabella 6. 7 Standard dei solventi clorurati preparati per le calibrazioni

Standard TCE

Sol. Madre 1			Sol. Madre 2				
V prelev.	C_{TCE}	Area	V prelev.	C_{TCE}	Area		
(μ L)	(mg/L)		(μ L)	(mg/L)			
A	80	0,192	6556,2	E	250	2,396	97491,2
B	100	0,240	7444,6	F	500	4,793	197274,2
C	250	0,599	20186,4	G	750	7,189	305657
D	500	1,198	41793,9	H	1000	9,585	421799,9

Standard TeCA

Sol. madre 1			Sol. madre 2				
V prelev.	C_{TeCA}	Area	V prelev.	C_{TeCA}	Area		
(μ L)	(mg/L)		(μ L)	(mg/L)			
A	50	0,325	2741	E	100	2,592	24663,9
B	80	0,518	5001,7	F	200	5,183	52769,5
C	100	0,651	5495	G	300	7,775	81992
D	150	0,976	8723,4	H	500	12,958	142089,8

Nei grafici successivi vengono mostrate le relative rette di calibrazione, ottenute le aree cromatografiche in relazione alle rispettive concentrazioni degli standard dei substrati di crescita.

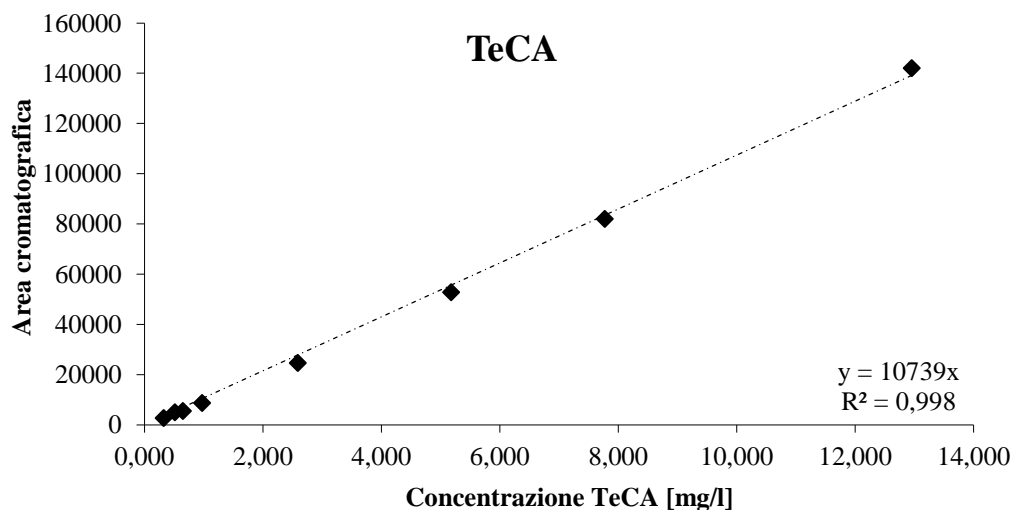
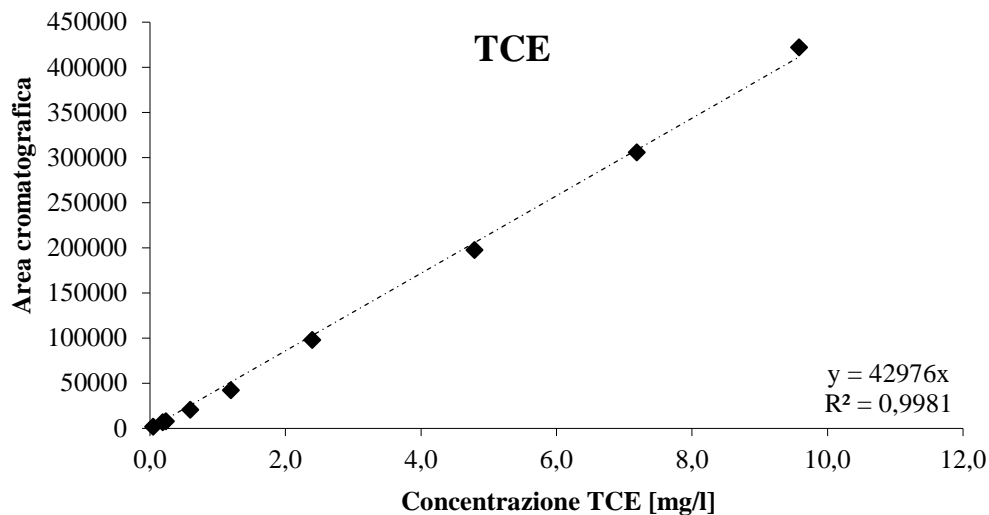


Tabella 6. 8 Coefficienti di calibrazione dei solventi clorurati usati

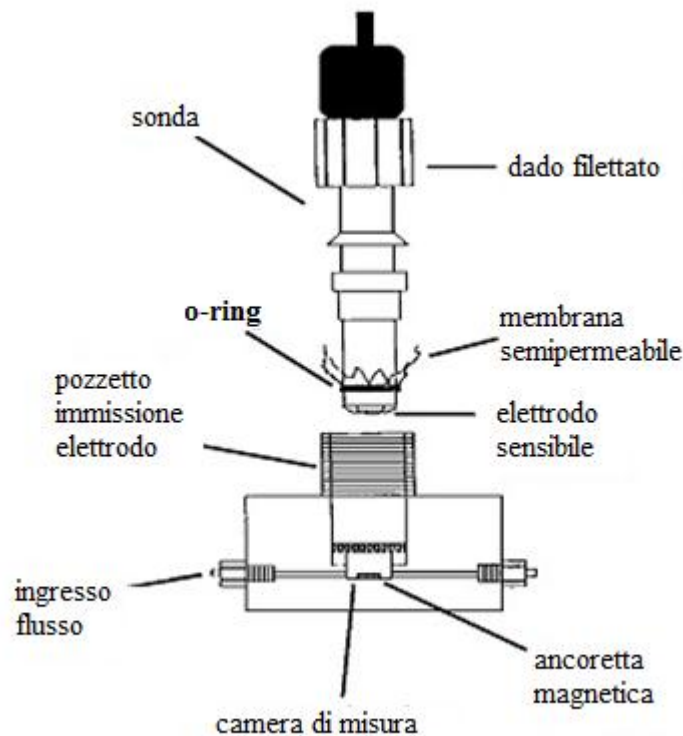
	Coeff. Calib. (Area/mg/L)
TCE	42976
TeCA	10738

I coefficienti di calibrazione così ottenuti possono essere utilizzati direttamente nel calcolo della concentrazione dei solventi clorurati in fase liquida.

6.2- Analisi dell'ossigeno disciolto

Per effettuare le misure dell'ossigeno disciolto in acqua si è usata una sonda OXIGEN modello DO-166FT (Figura 6. 3). Lo strumento è costituito da una cella ed un elettrodo di misura in argento tipo Clark, consentendo di monitorare in continuo l'ossigeno disciolto in un fluido che passa attraverso la cella stessa. L'elettrodo è separato dal fluido da monitorare tramite una membrana semipermeabile che permette il passaggio solo all'ossigeno. Lo strumento è anche dotato di un indicatore analogico che converte il segnale elettrico dell'elettrodo in un numero che esprime la concentrazione in mg/L.

Figura 6. 3 Schema di una sonda per ossigeno



Per la calibrazione dello strumento sono state preparate due soluzioni: una satura d'aria ed una senza ossigeno. Entrambe sono ottenibili attraverso gorgogliamento di gas in soluzione acquosa. La soluzione esente da ossigeno è ottenuta gorgogliando azoto per un periodo sufficientemente lungo, da permetterne il completo stripping. Per la soluzione contenente ossigeno invece, è stata gorgogliata 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 sui valori. Per quanto riguarda il valore massimo, si è usata la soluzione satura di aria, mentre sul valore zero, si è usata la soluzione ottenuta gorgogliando azoto e priva di ossigeno. Una volta ultimata la calibrazione, vengono effettuate le analisi, prestando attenzione alle eventuali bolle d'aria che possono intrappolarsi nella camera di misura, falsando la misura. È risultato utile tenere la cella in verticale, favorendo la fuoriuscita delle bolle grazie al moto della corrente. La cella è utilizzabile sia in condizioni di flusso, che intrappolando un volume di soluzione da analizzare. In questa seconda configurazione, fluido da analizzare è stato prelevato con una siringa, previa sostituzione dell'ago ipodermico con un segmento di tubo in gomma e un ago in acciaio ($d_{int} = 1,2 \text{ mm}$). L'iniezione è stata fatta lentamente poiché la lancetta dell'indicatore oscilla fino a stabilizzarsi alla concentrazione del campione; a questo punto sono stati inseriti degli stringi tubo, prima in uscita (lasciando collegata la siringa) e successivamente in ingresso, cosicché non esca la soluzione e non entrino bolle nella cella. Lo strumento, in genere, impiega circa 40 s prima di stabilizzarsi al valore corretto; inoltre presenta una buona stabilità della lettura degli standard, nonostante vada effettuata tutti i giorni, prima e dopo ogni serie di analisi. La scelta di lavorare con una sonda montata in una cella esterna, piuttosto che direttamente collegata all'impianto, è stata dettata dagli inevitabili problemi di sporco che ne sarebbero derivati. Infatti le soluzioni utilizzate presentano una carica batterica che può compromettere la membrana presente nella sonda, minandone il funzionamento.

6.3- Analisi della biomassa

Un dato molto importante ai fini degli studi cinetici, è la quantità di biomassa presente nel sistema preso in considerazione. Nel nostro caso si è dovuta determinare la quantità di biomassa presente sotto due forme: come biomassa sospesa e come biomassa adesa ai supporti. Per la determinazione della biomassa sospesa, si è deciso di sfruttare il dosaggio delle proteine totali, utilizzando il metodo di Lowry¹⁴. Le analisi sono state effettuate in collaborazione col Dipartimento di Ingegneria Civile, Ambientale e dei Minerali (DICAM). Questo,

è un metodo indiretto per la determinazione della concentrazione cellulare, infatti la quantità totale di proteine è riferita a tutte le cellule contenute nel campione, sia vive che morte. I dati ottenuti sono affetti da errore proprio perché questo metodo non è selettivo per le cellule vive, ma si è deciso di usarlo ugualmente per la fattibilità sperimentale e poiché si può assumere che la percentuale di batteri morti sia relativamente bassa visti i tempi brevi di conduzione delle prove.

Il dosaggio delle proteine di Lowry, consiste in una denaturazione delle cellule in ambiente basico, che porta alla rottura della membrana e conseguente rilascio del contenuto proteico. In presenza di rame bivalente (CuII), il legame peptidico delle proteine complessano lo ione, che viene ridotto a rame monovalente. Il rame monovalente formato reagisce con il reattivo di Folin-Ciocalteau (reattivo fosfotungstico-molibdico salificato con sodio e potassio di colore giallo, che in ambiente alcalino è capace di ossidare proteine solubili) per produrre un complesso instabile. Questo complesso colorato di blu viene analizzato allo spettrofotometro UV-Vis ($\lambda = 540 \text{ nm}$). Gli standard per la calibrazione dello strumento, devono essere preparati ogni volta che si effettua l'analisi e sono composti da diverse soluzioni a concentrazioni crescenti di BSA (Albumina di Siero Bovino).

Per la quantificazione della biomassa adesa invece, si stanno mettendo a punto metodiche per il distacco del biofilm dai supporti, che non siano però molto aggressivi ai fini della successiva analisi. Allo stato attuale, la metodica scelta prevede il prelievo di un determinato numero di supporti, un lavaggio in acqua demineralizzata con conseguente aggiunta di un ugual volume di una soluzione acquosa di NaOH 1M ed un'agitazione in uno shaker a 77°C per un'ora. Questo procedimento permette il distacco della biomassa dai supporti, dopodichè si procede con il dosaggio tramite il metodo di Lowry.

Capitolo 7

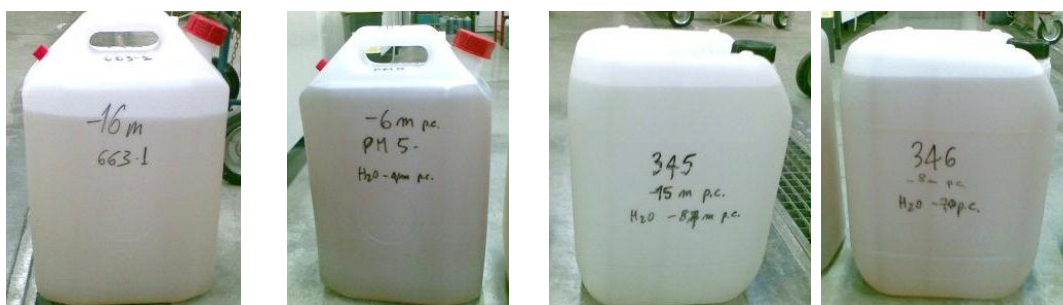
Sviluppo e selezione del consorzio

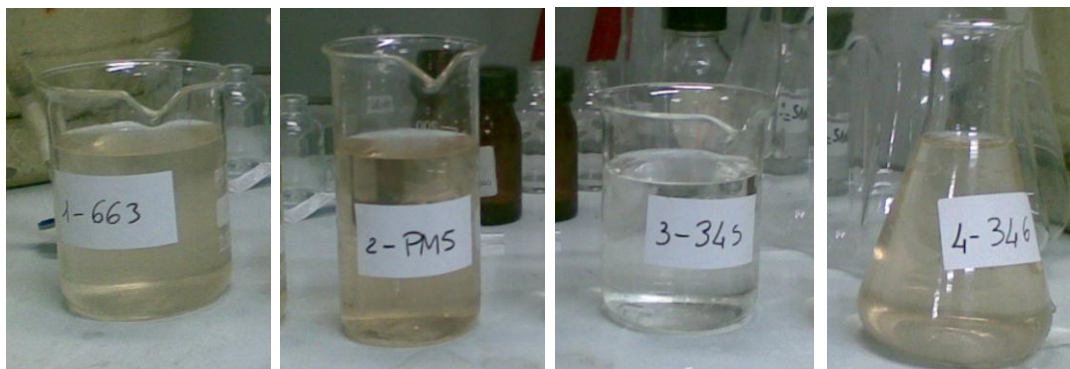
In questo capitolo, dopo aver descritto brevemente la caratterizzazione chimica dei campioni di acqua di falda giunti in laboratorio, si descriveranno gli aspetti relativi ai materiali impegnati per la realizzazione e la gestione dei microcosmi. Si descriveranno quindi le tappe che hanno portato alla selezione del consorzio avente migliori capacità degradative verso i due inquinanti clorurati oggetto del nostro studio. Infine si descriverà brevemente la tecnica utilizzata nella coltivazione di una quantità di biomassa necessaria per colonizzare i reattori a colonna impaccata.

7.1- Caratterizzazione chimica delle acque campionate

I campioni di acqua di falda a nostra disposizione, sono relativi a campionamenti eseguiti presso il sito inquinato di Rho (Mi). In particolare i campioni si riferiscono a quattro piezometri fenestrati a quattro differenti profondità.

Immagine 7.1 (di seguito) Tuniche delle 4 acque campionate con il nome e la profondità del piezometro (nella pagina successiva) aspetto ed etichettatura delle acque con i numeri da noi scelti





Dai piezometri denominati con le sigle PM5 e 346 il prelievo ha interessato la falda superficiale, rispettivamente a 6 ed 8 metri dal piano di campagna; mentre quelli denominati con le sigle 345 e 663, il prelievo ha interessato la falda profonda, rispettivamente a 15 e 16 metri.

L'analisi idrochimica per i quattro campioni ha fornito i seguenti risultati:

Tabella 7. 1 Caratteristiche delle acque campionate

Informazioni generali				
Sigla pozzo	663	PM5	345	346
Data campionamento	04/05/2010			
Numero identificativo di laboratorio	1	2	3	4
Profondità campionamento (m)	16	6	15	8
Concentrazione clorurati (mg/L)				
TCE	3,36	0,089	16,59	0,0045
TeCA	1,78	0,281	6,06	0,591
Concentrazione anioni (mg/L)				
Cloruro (Cl ⁻)	50.0	30.4	57.0	40.4
Nitrito (NO ₂ ⁻)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Nitrato (NO ₃ ⁻)	37.5	47.4	46.6	53.3
Fosfato (PO ₄ ³⁻)	1.3	1.7	n.d.	2.5
Solfato (SO ₄ ²⁻)	274.0	188.8	226.9	56.3
pH	8,052	7,167	7,135	7,315

La caratterizzazione e l'analisi delle concentrazioni dei solventi clorurati indica che il sito è senz'altro idoneo ad una sperimentazione di bioremediation aerobica cometabolica, finalizzata allo studio della biodegradazione di tali solventi. Sulla base della letteratura in materia, il TCE risulta essere infatti un solvente che ha una buona potenzialità di essere degradato attraverso un processo cometabolico aerobico, mentre il TeCA presenta più modeste potenzialità di essere degradato attraverso questo processo. Nell'ottica però di operare la conversione abiotica del

TeCA in TCE, l'inquinante target del processo biologico sarà soltanto il TCE; comunque la sperimentazione della possibilità di rimozione biologica aerobica cometabolica ha interessato anche il TeCA.

7.2- Allestimento dei microcosmi

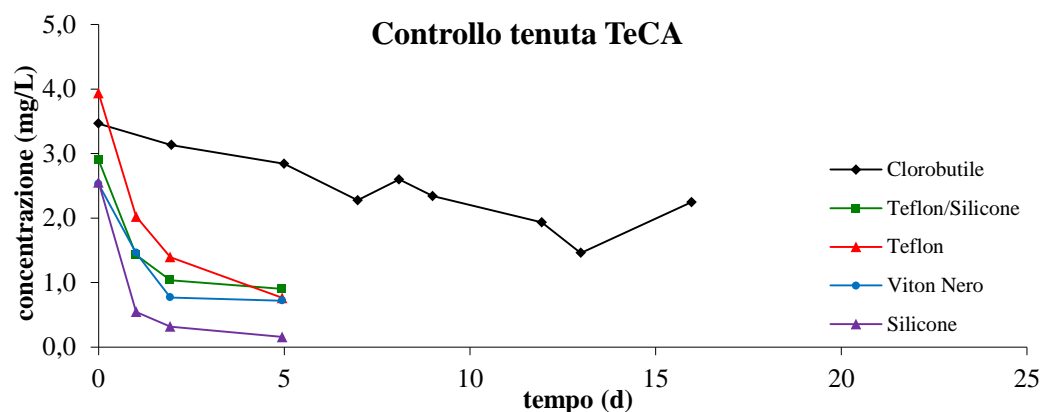
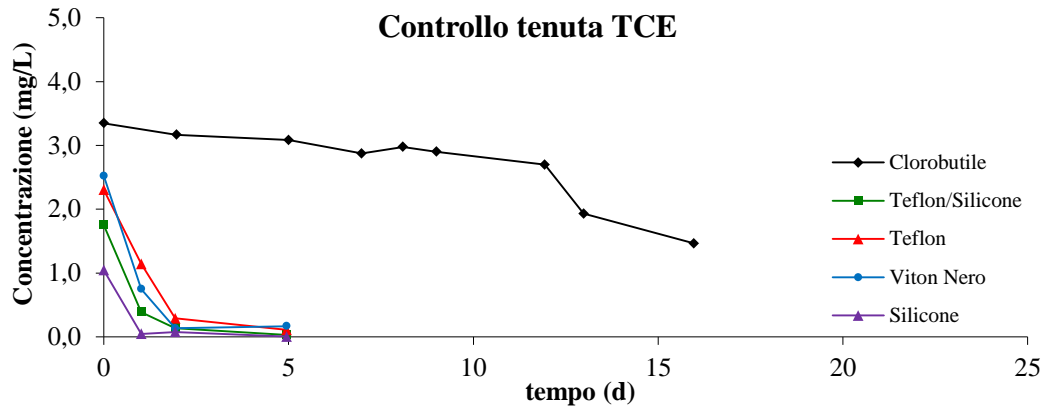
Obiettivo dell'allestimento e conduzione dei microcosmi è quello di individuare se all'interno della biomassa indigena del sito contaminato, esistono ceppi batterici (o più in generale consorzi batterici) aerobici capaci di degradare i substrati primari e la verifica che gli stessi riescano ad operare la degradazione cometabolica degli inquinanti clorurati.

Per microcosmo si intende un piccolo bioreattore fed-batch costituito da un recipiente (figura 7. 1), in cui viene inserito un volume noto di acqua di falda, tale da lasciare uno spazio di testa, che permetta l'inserimento di substrati e di micro e macro-nutrienti. L'obiettivo è quello di riprodurre le condizioni idrochimiche volute, tale da generare sulla biomassa naturalmente presente nell'acqua, una pressione selettiva per cui, all'interno della comunità microbica, sia favorito lo sviluppo di quei ceppi batterici capaci di metabolizzare il substrato fornito.

Nel nostro caso ogni microcosmo è stato allestito sterilizzando una vial in vetro della capacità complessiva di 119 mL, al cui interno sono stati inseriti 60 mL di acqua di falda tal quale, in modo da lasciare libero uno spazio di testa del volume di 59 mL. La vial è stata poi sigillata ermeticamente con un tappo in gomma cloro-butile e ghiera metallica. Il tappo in gomma cloro-butile è stato selezionato tra cinque tipologie sottoposte a prove di tenuta dei solventi clorurati, poichè si è dimostrato essere il migliore, come è evidenziato nei grafici sotto riportati:

Figura 7. 1 Schema di allestimento di un microcosmo
Tappo in gomma e ghiera metallica





La parte superiore della ghiera è forata e permette, attraverso il tappo, di effettuare prelievi ed iniezioni, senza richiedere l'apertura del microcosmo.

Le sostanze introdotte, o già presenti nel microcosmo, all'equilibrio si ripartiscono tra la fase acquosa e la fase gas. La massa totale di una generica sostanza i può essere quindi calcolata mediante la relazione:

$$m_i = m_{i,g} + m_{i,l} \quad [7.1]$$

dove:

m_i è la massa totale

$m_{i,g}$ è la massa nella fase gas

$m_{i,l}$ è la massa nella fase liquida

Le analisi cromatografiche forniscono le concentrazioni in fase gas, risulta più comodo però esprimere tutto in funzione della concentrazione del liquido.

Volendo quindi procedere alla determinazione della concentrazione in fase liquida, partendo dalla concentrazione in fase gas, ci si avvale delle relazioni:

$$m_{i,g} = c_{i,g} \cdot PM_i \cdot V_g \quad [7.2]$$

$$P_i = H_i \cdot c_{i,l} \quad [7.3]$$

$$P_i = \frac{n_{i,g}}{V_g} \cdot RT \quad [7.4]$$

$$c_{i,g} = \frac{H_i}{RT} \cdot c_{i,l} \quad [7.5]$$

$$c_{i,g} = \frac{Area}{f_{cal}} \quad [7.6]$$

da cui segue:

$$c_{i,l} = \frac{Area}{H_i^\circ \cdot f_{cal}} \quad [7.7]$$

dove:

$C_{i,g}$ è la concentrazione molare nella fase gas

V_g è il volume di gas

P_i è la pressione parziale

H_i è la costante di Henry

H_i° è la costante di Henry adimensionale

f_{cal} è il coefficiente di calibrazione

Prima di procedere all'allestimento, tutta la vetreria utilizzata è stata sterilizzata in autoclave a 121°C per 20 minuti e le operazioni sono state eseguite in ambiente sterile sotto cappa a flusso laminare.

7.2.1 Allestimento e monitoraggio delle colture primarie

Come riportato in letteratura¹⁵, i solventi alifatici clorurati possono essere ossidati da un'ampia gamma di microrganismi che esprimono nel proprio corredo

enzimatico delle ossigenasi. La sintesi di questi enzimi è indotta dalla presenza di un substrato di crescita. Tra questi, sono noti quelli che utilizzano come substrato primario il metano (Wilson e Wilson 1985)¹⁶, il propano (Fliermans et al. 1988)¹⁷, il butano (Wilson et al. 1988)¹⁸, l'ammoniaca (Arciero et al. 1989)¹⁹, il fenolo (Folsom et al. 1990)²⁰, il toluene (Nelson et al. 1986)²¹ etc.

Nel nostro caso, le sostanze scelte come substrati primari di crescita sono state: metano, propano, butano e pentano. Quindi per ogni substrato sono stati allestiti 5 microcosmi di cui, 4 contenenti le singole acque campionate e uno contenente una miscela equivolumetrica delle stesse. Il microcosmo contenente la miscela delle acque, è stato allestito nel tentativo di selezionare una biomassa batterica capace di svilupparsi in ognuna delle singole acque e quindi di poter disporre di un processo biologico più robusto. Come illustrato dalle immagini riportate qui di seguito, ogni microcosmo è stato etichettato con la sigla del substrato somministratogli e con l'identificativo dell'acqua campionata assegnatagli in laboratorio (vedi Immagine 7. 1). Per cui con le sigle M, PR, B e PE, si indicano rispettivamente i substrati Metano, Propano, Butano e Pentano; mentre con i numeri 1, 2, 3, 4 e 5, si indicano rispettivamente le acque 663, PM5, 345, 346 e la miscela delle quattro precedenti.

Immagine 7. 2 Consorzi Metano-ossidanti



Immagine 7. 3 Consorzi Propano-ossidanti



Immagine 7. 4 Consorzi Butano-ossidanti



Immagine 7. 5 Consorzi Pentano-ossidanti



A questi 20 microcosmi, allestiti ex-novo, si è deciso di aggiungere un ulteriore microcosmo fatto crescere su propano e frutto di una precedente selezione; a quest'ultimo è stata assegnata la sigla R-PR, che sta ad evidenziare il rilancio effettuato.

Nei microcosmi così ottenuti, sono state fatte delle aggiunte iniziali di macro-nutrienti, attraverso la somministrazione di 1 mL di una soluzione acquosa contenente nitrati e fosfati in concentrazioni rispettivamente di 8150 mg/l e 910,4 mg/L. Successivamente si sono somministrati i relativi substrati di crescita in uguali quantità in massa. Queste quantità determinano un certo volume di iniezione per ogni substrato ed una conseguente concentrazione attesa nel liquido, come viene riportato in Tabella 7. 2.

Tabella 7. 2 Masse, volumi e concentrazioni attese dei substrati iniettati

Substrato	V iniez. (ml)	H (30°C)	m iniez. (mg)	C_{aq} (mg/L)
Metano	8,7	31	5,66	2,996
Propano	3,0	31	5,40	2,849
Butano	2,3	44	5,46	2,054
Pentano	0,0085	60	5,36	1,488
Fenolo	1,04	n.d.	5,5	0,092

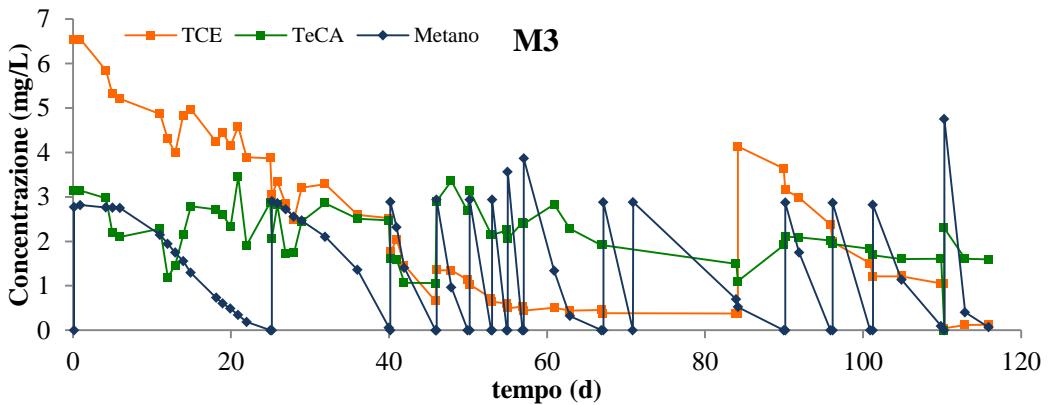
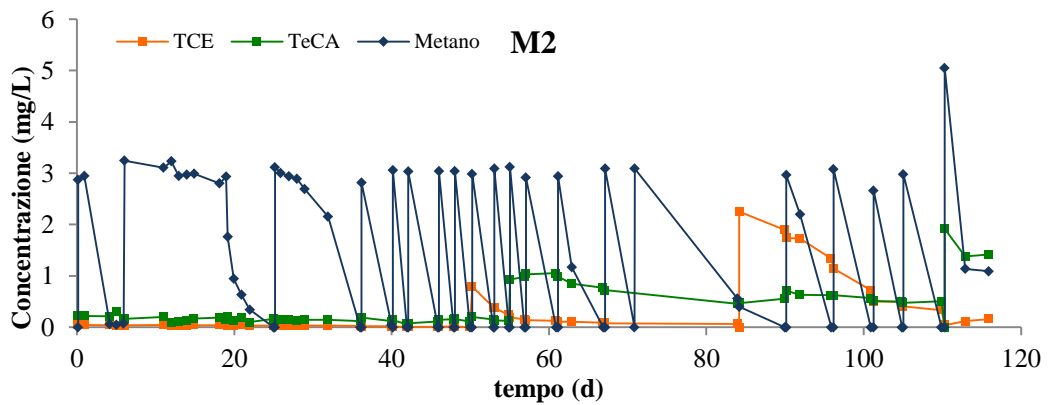
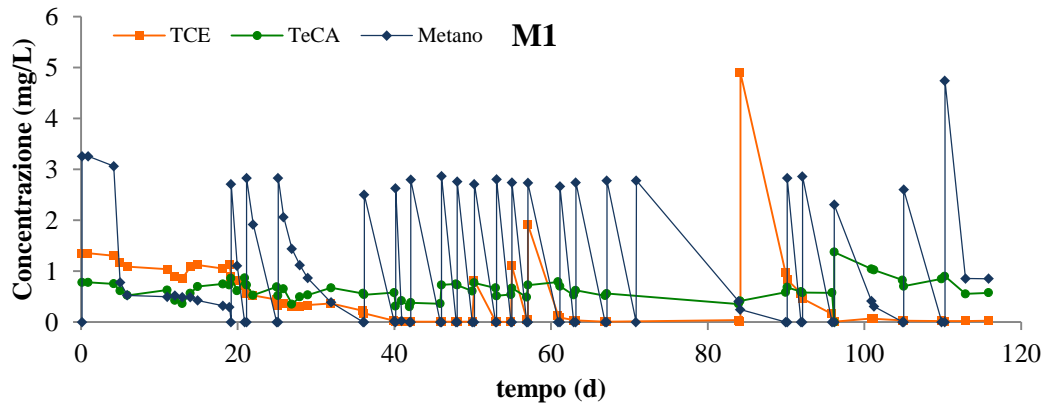
Ossigeno puro è stato poi addizionato in quantità tale da garantire il 20 % di eccesso rispetto alla quantità stechiometricamente necessaria alla completa degradazione del substrato.

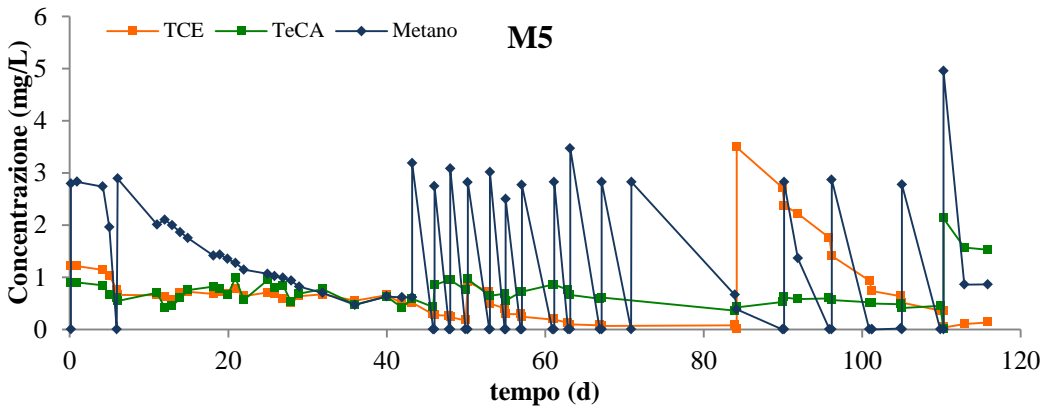
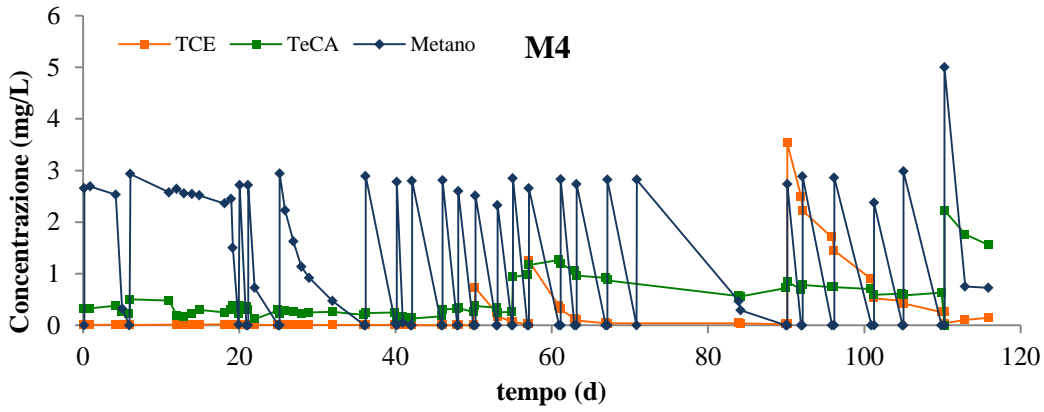
Per tutta la durata delle sperimentazioni, i microcosmi sono stati mantenuti in continua agitazione in uno shaker a 125 rpm e termostatati a 30 °C. Tale condizione di temperatura è stata scelta per rendere più evidenti le variazioni di concentrazione nel tempo dovute ai fenomeni degradativi, in modo da risultare più visibili agli strumenti di misura.

Il monitoraggio dei microcosmi è stato effettuato giornalmente, analizzando le quantità di substrato e le quantità dei solventi clorurati presenti originariamente nelle acque campionate. Ogni volta che si è verificata la totale rimozione del substrato se ne è operata la riaggiunta contestualmente a quella dell'ossigeno, in modo da ottenere quantità mai limitanti di questo elemento.

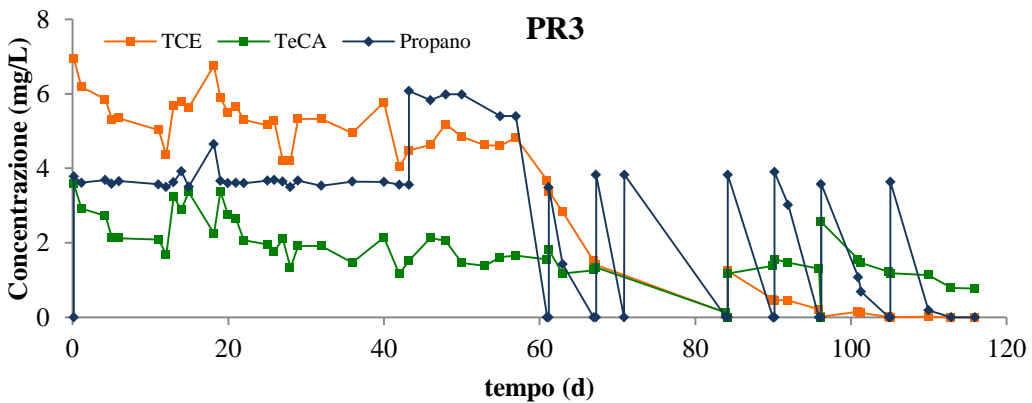
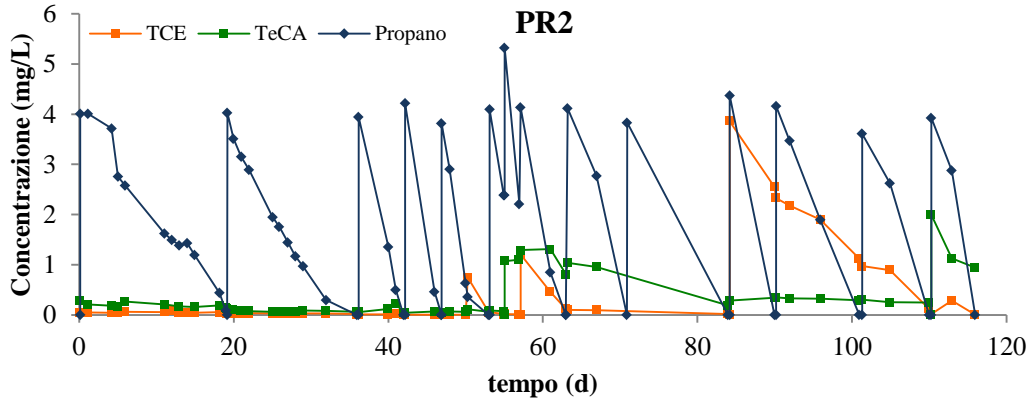
La rapida rimozione dei pulsi di substrato di crescita, è indice del fatto che i batteri metabolizzanti tali composti sono presenti in proporzioni significative all'interno del consorzio. In questo caso, allora, sono stati alimentati pulsi di TCE, per verificare la capacità di degradazione cometabolica dell'inquinante. Tali operazioni sono state effettuate, in ultima istanza, anche per verificare la capacità degradativa del consorzio verso il TeCA, ritenuto scarsamente degradabile tramite cometabolismo aerobico. Di seguito vengono riportati i grafici dei monitoraggi a lungo termine, su un periodo di circa 120 giorni, delle colture primarie preparate.

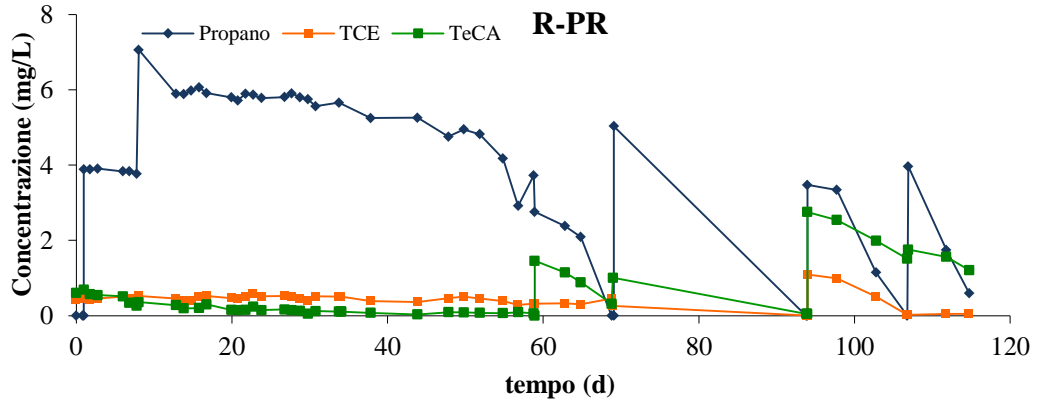
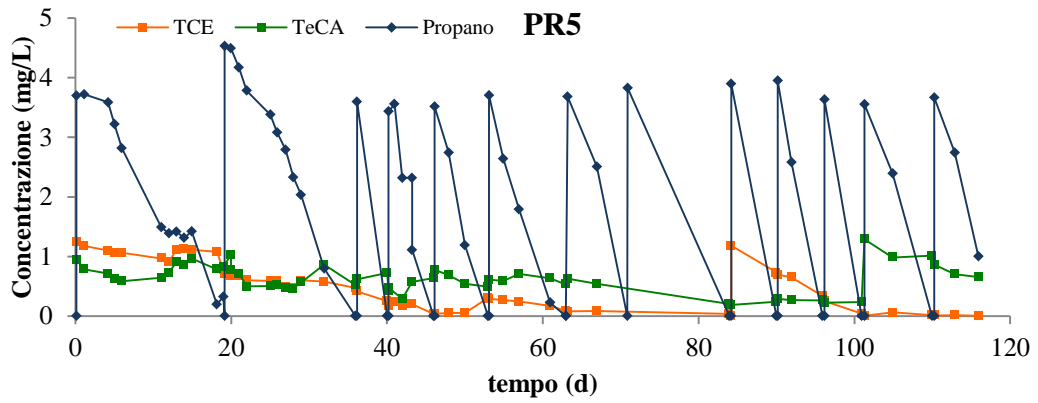
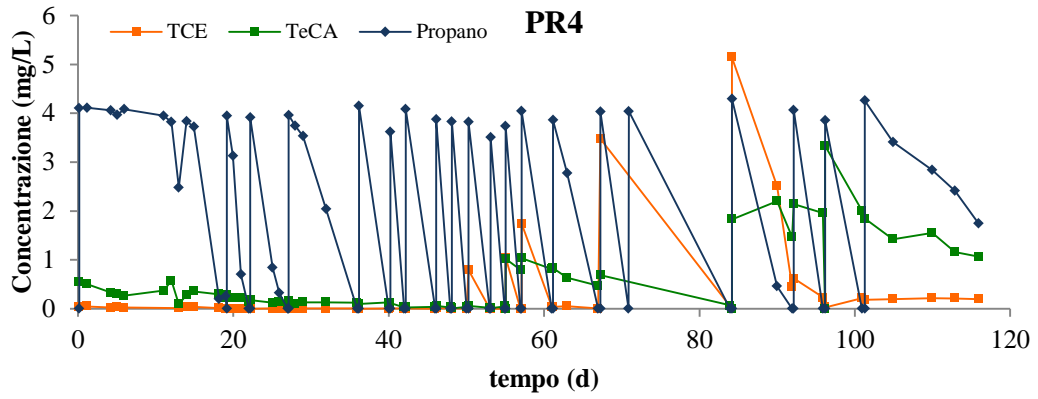
Consorzi Metano-ossidanti



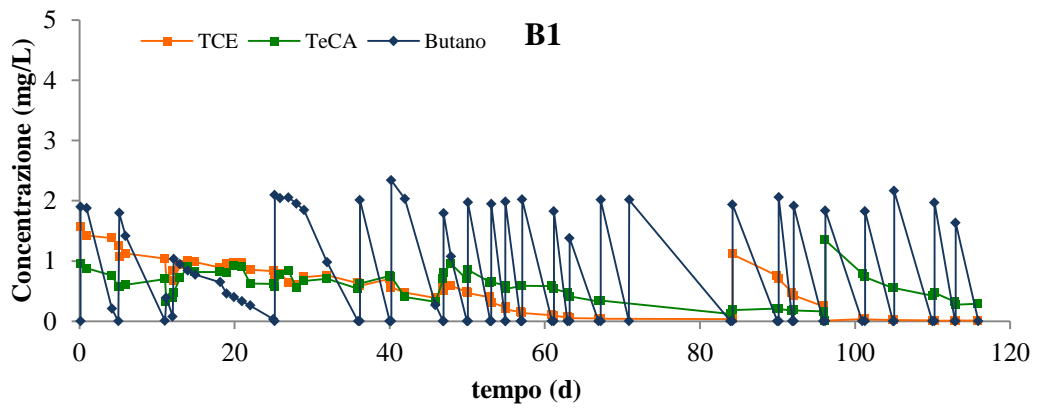


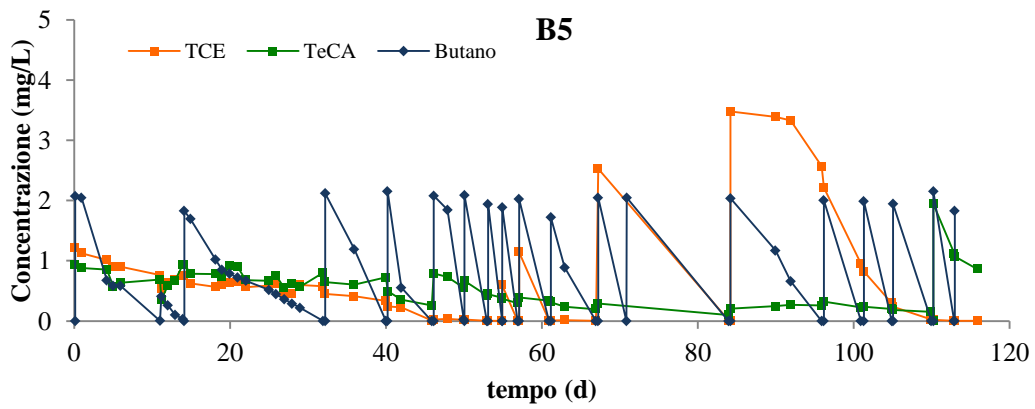
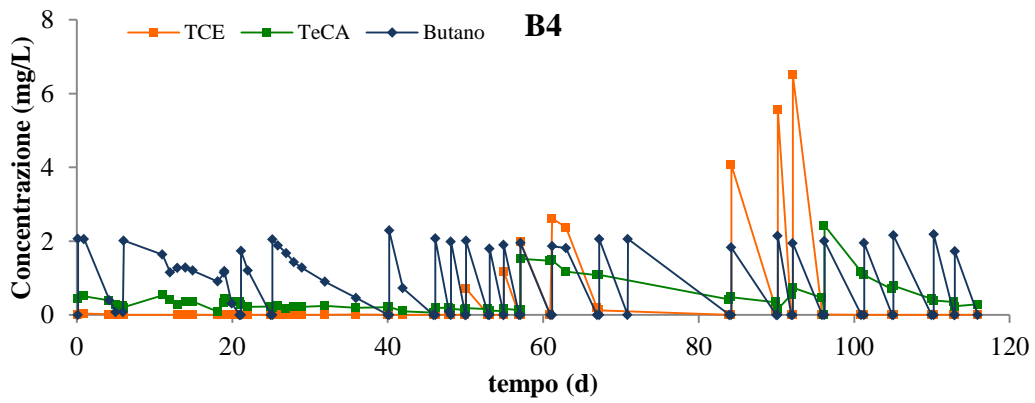
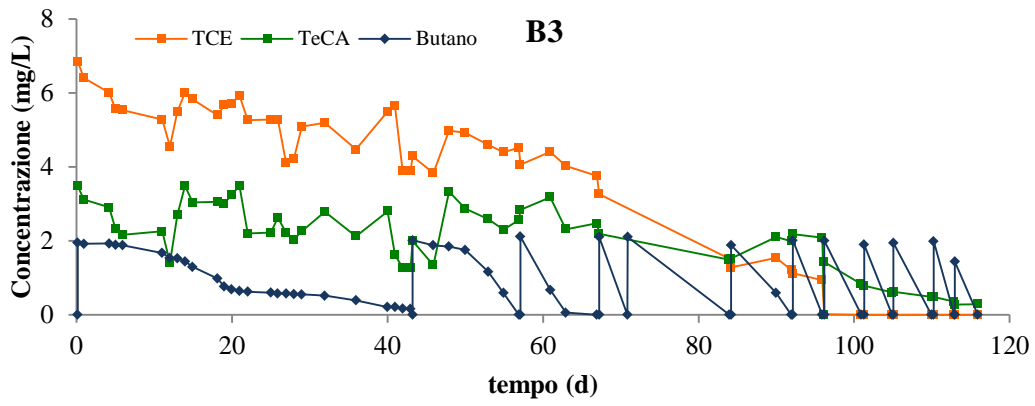
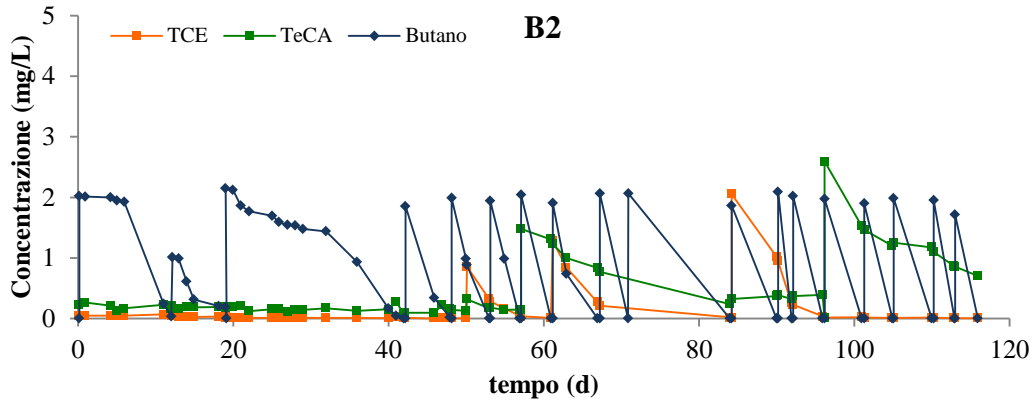
Consorti Propano-ossidanti



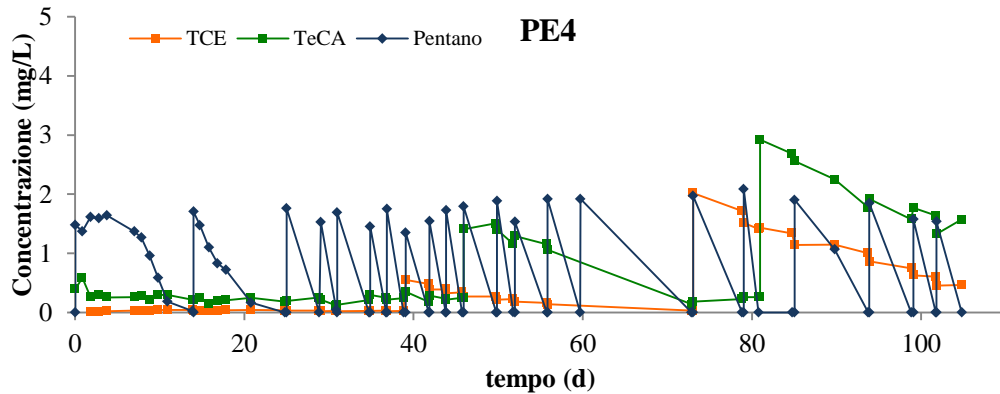
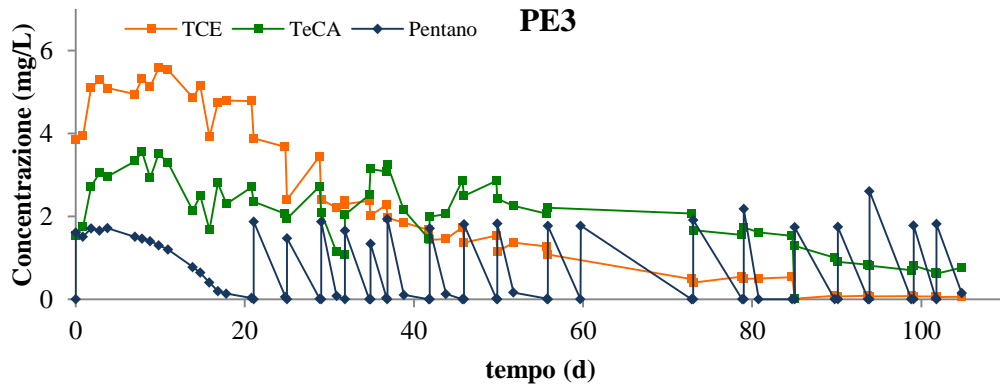
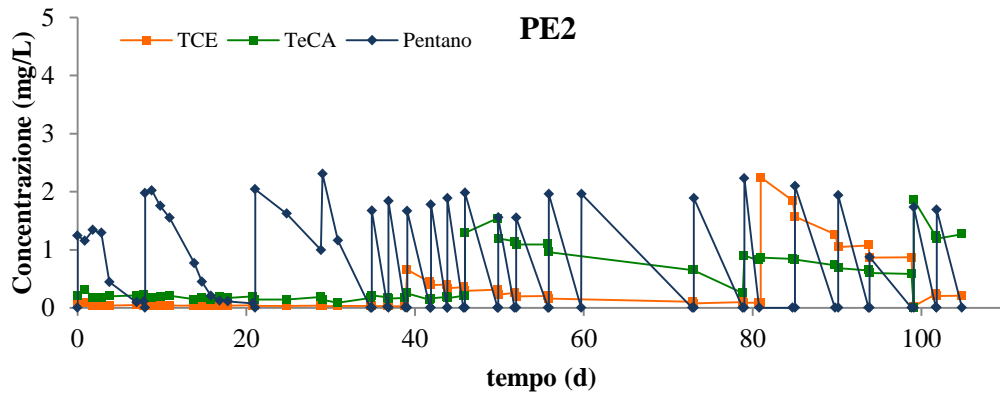
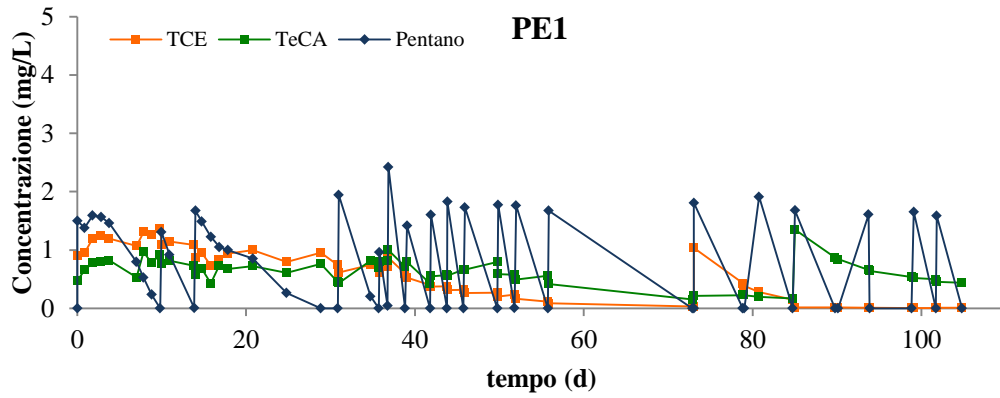


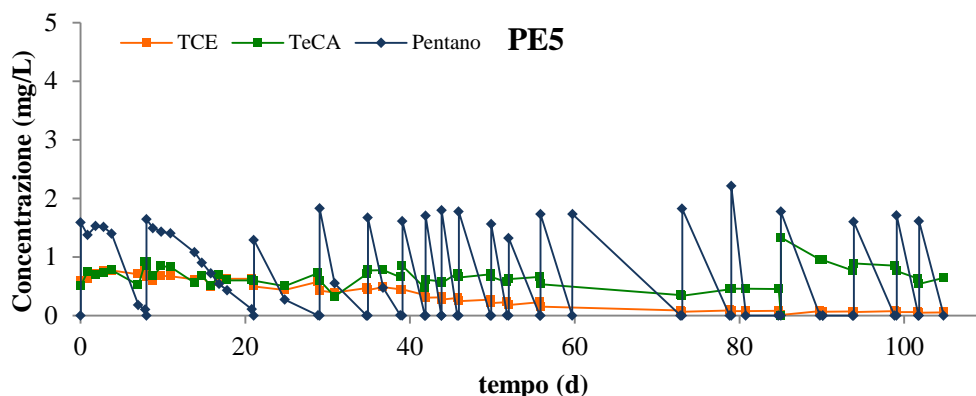
Consorzi Butano-ossidanti





Consorzi Pentano-ossidanti





Discussioni e commenti

Come si può notare per tutti i microcosmi, dopo una più o meno lunga fase di latenza, la velocità di consumo del substrato primario tende ad aumentare dopo i primi pulsii, per poi stabilizzarsi su un valore soglia. L'aumento della velocità è da attribuirsi, all'incremento della biomassa specializzata substrato-ossidante, ma anche alla progressiva selezione operata da questo all'interno del consorzio batterico. Lo stesso comportamento lo si riscontra anche nei primi pulsii dei solventi clorurati stessi, con delle evidenti distinzioni che andremo ora ad analizzare.

– Consorzi metano-ossidanti

Per quanto riguarda i microcosmi alimentati con Metano, quelli identificati con M3 e M5 presentano una lunga lag-phase sia per il substrato primario sia per i substrati cometabolici. Il microcosmo M2 presenta invece una lunga lag-phase per i soli substrati cometabolici. M1 e M4, invece, hanno più basse lag-phase sia per il substrato primario sia per i substrati cometabolici ed inoltre presentano una più alta velocità di rimozione del TCE, riuscendo così a rimuovere un numero maggiore di pulsii a concentrazioni crescenti. Per di più nella fase finale del monitoraggio, i microcosmi M1 e M4 mostrano un'attività cometabolica (seppur minima) anche per il TeCA. Dovendo selezionare i due migliori consorzi metano-ossidanti, la scelta è così caduta su M1 e M4.

– **ConSORZI Propano-ossidanti**

Per i propano-ossidanti, si osserva che il microcosmo PR3 ha una lunga lag-phase (circa 60 giorni) per il substrato primario e altrettanto lunga lag-phase per i due substrati cometabolici. Inoltre le performance di rimozione sia del TCE che del TeCA risultano essere scarse. Il microcosmo PR5 mostra una buona capacità degradativa per il substrato primario, ma mostra scarse performance sui substrati cometabolici. Per quanto riguarda il microcosmo PR2 si osserva una breve lag-phase per il substrato primario ed una buona capacità degradativa verso il TCE (infatti è riuscito a rimuovere 3 pulsanti del solvente a concentrazioni crescenti) ed in minor misura verso il TeCA. Simile comportamento, o addirittura migliore, sotto il profilo dell'efficienza degradativa verso i substrati cometabolici, mostra il consorzio PR4; infatti ha rimosso 5 pulsanti di TCE e 2 di TeCA a concentrazioni crescenti. RPR invece, mostra avere una più lunga lag-phase (circa 70 giorni) per il substrato primario, ma comunque, terminata la fase di latenza, mostra delle interessanti performance degradative verso ambedue i solventi.

Anche in questo caso, nell'ottica di selezionare i 2 migliori microcosmi propano-ossidanti, la scelta è caduta su PR2 e PR4; inoltre viste le performance degradative di RPR su ambedue i solventi, risulta interessante approfondire l'analisi anche di questo microcosmo. Il microcosmo PR1, invece, è stato incidentalmente danneggiato e quindi di esso non si dispongono di informazioni.

– **ConSORZI Butano-ossidanti**

Il microcosmo B3 presenta una lunga lag-phase sia per il substrato primario che per i substrati cometabolici. Tale consorzio inoltre mostra una scarsa performance degradativa verso ambedue i solventi, anche quando la metabolizzazione del substrato primario risulta ampiamente attiva. Il microcosmo B1 mostra una bassa lag-phase e una buona efficienza degradativa sul substrato primario a cui però non corrisponde un'altrettanta efficacia sui due substrati cometabolici. B2 e B5 mostrano comportamenti simili sia sul substrato primario che sui solventi clorurati, ma B5 è riuscito a rimuovere più pulsanti di TCE di cui l'ultimo a concentrazione di 3,48 mg/L. Per quanto riguarda il microcosmo B4, risulta essere palesemente il migliore della serie, in quanto, come si evince dal grafico, mostra

ottime performance degradative oltre che sul substrato primario, anche su ambedue i solventi. Nell'ottica di selezionare i 2 migliori consorzi batterici butano-ossidanti, la scelta è ovviamente caduta su B4 e B5.

– **Consorzi Pentano-ossidanti**

Il microcosmo PE3 mostra avere una lunga lag-phase sia per il substrato primario che per i solventi, e su quest'ultimi mostra avere scarse performance degradative. PE5 mostra un'evidente inefficacia verso la degradazione dei solventi, nonostante una buona efficacia verso il substrato primario. PE2 invece mostra delle discrete proprietà degradative del substrato primario, delle scarse capacità degradative del TCE e nessun effetto degradativo sul TeCA. PE4 mostra caratteristiche degradative simili al microcosmo PE2, anche se l'azione sul TeCA risulta essere nettamente superiore. PE1 è senz'altro quello che della serie dei pentano-ossidanti mostra le migliori performance, sia per il substrato primario che per i due solventi. Sulla base di queste considerazioni, in questo caso, la scelta dei 2 migliori consorzi è caduta su PE1 e PE4.

A conclusione di questa tappa di monitoraggio e prima selezione, sono state constatate le potenzialità biodegradative presenti nelle acque del sito, attraverso le prove sperimentali effettuate. Il prossimo passo del percorso di selezione è l'ulteriore verifica delle performance degradative sui solventi, attraverso un test cinetico "minimo" di rimozione, che permetta di arrivare alla scelta del migliore consorzio.

7.2.2 Prima selezione dei consorzi

Le colture primarie che hanno mostrato migliori potenzialità di degradazione verso il substrato primario e verso i solventi sono stati poi sottoposti ad una successiva indagine attraverso un test cinetico "minimo", il cui scopo è quello di operare un'ulteriore selezione. La prova ci ha fornito una velocità specifica di metabolizzazione r (velocità di rimozione normalizzata rispetto alla biomassa ed alla concentrazione di substrato), che ci ha permesso di confrontare le

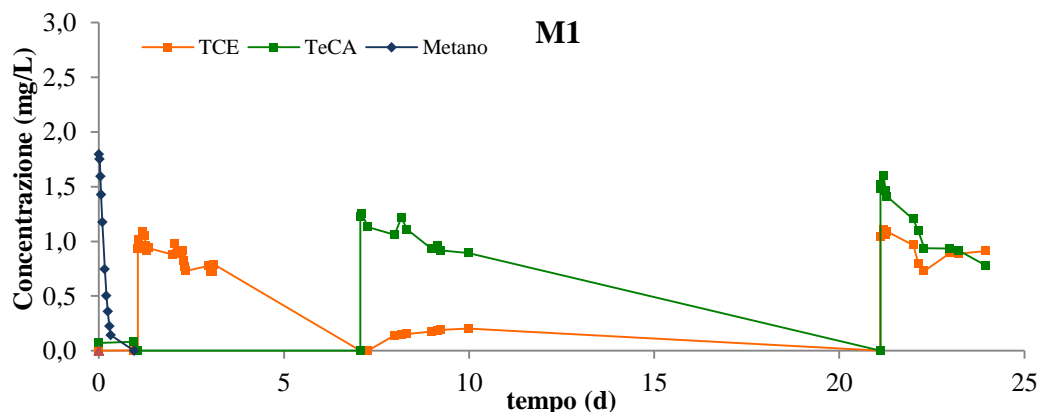
performance degradative delle biomasse sui substrati, focalizzando l'attenzione su quelli cometabolici.

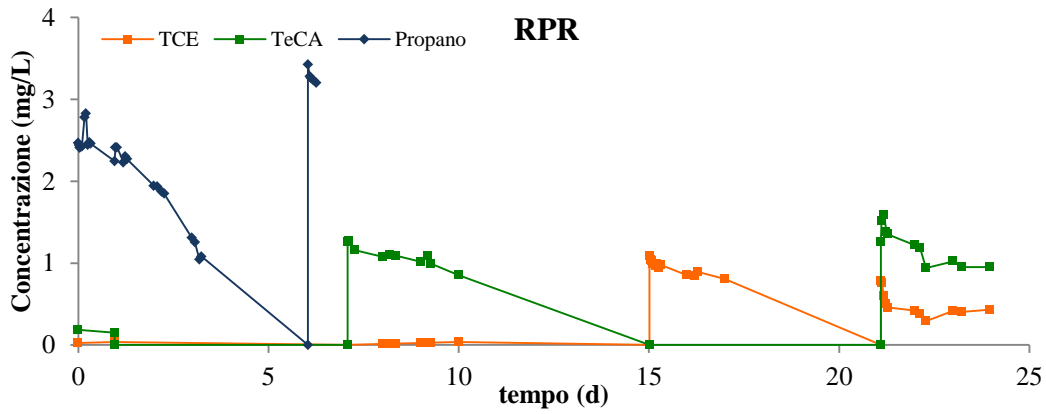
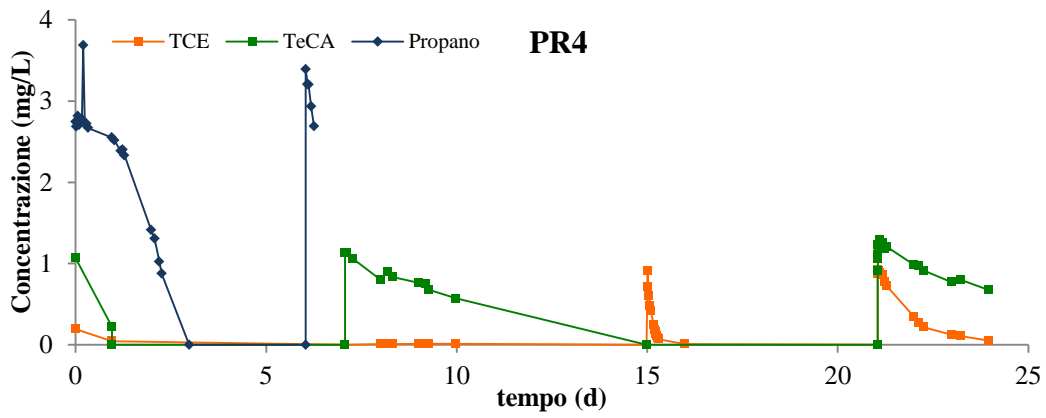
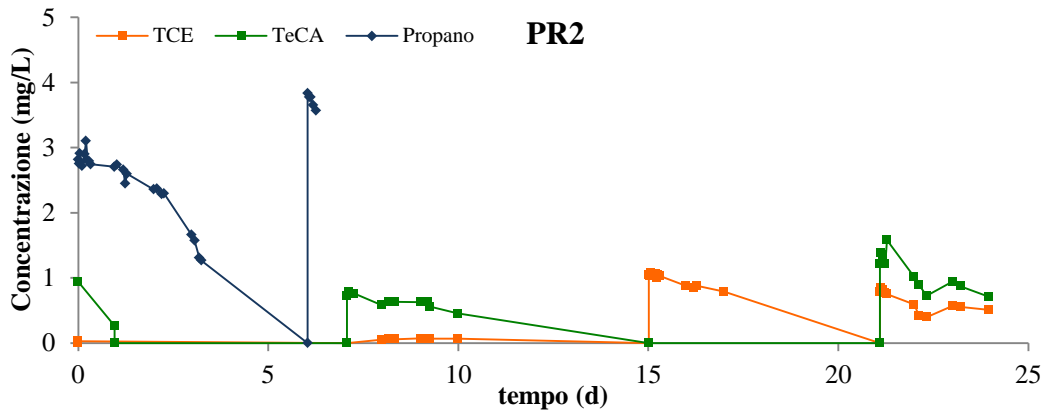
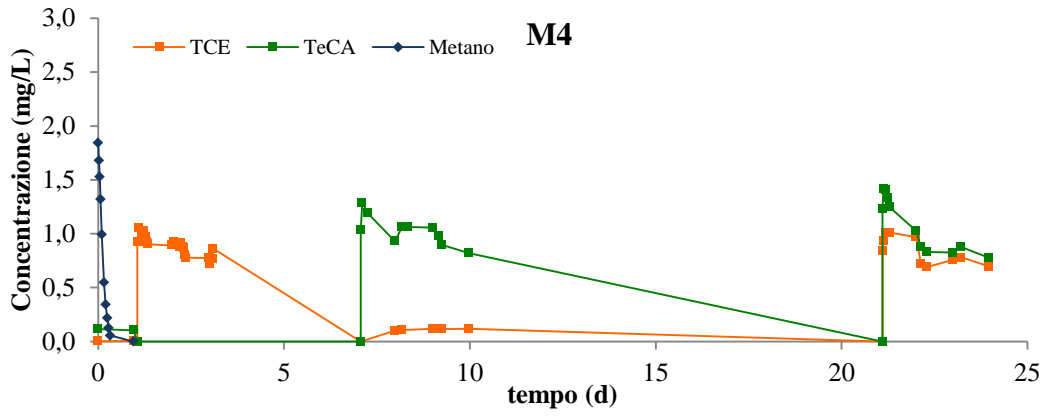
Il test cinetico della rimozione dei substrati ha riguardato tre fasi fondamentali: la prima è stata incentrata nel monitoraggio della rimozione del solo TCE in assenza di TeCA, la seconda nel monitoraggio della cinetica del solo TeCA in assenza di TCE e la terza nel monitoraggio delle cinetiche di rimozione dei due substrati cometabolici presenti contemporaneamente.

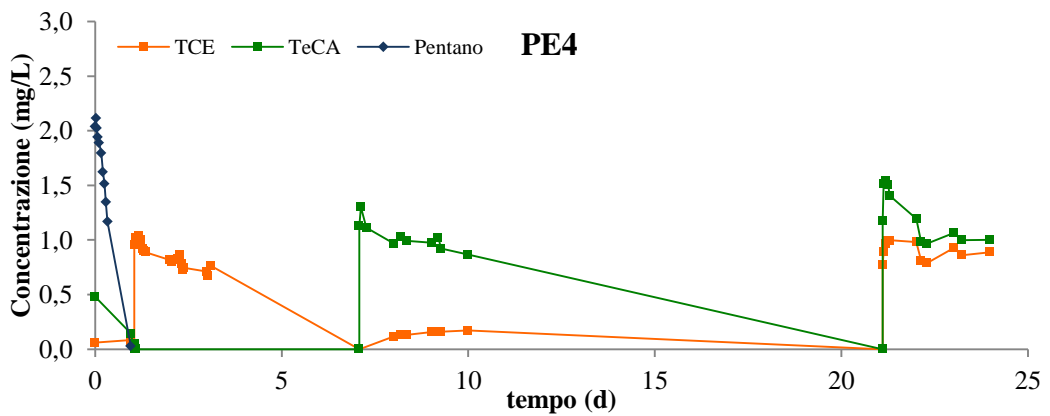
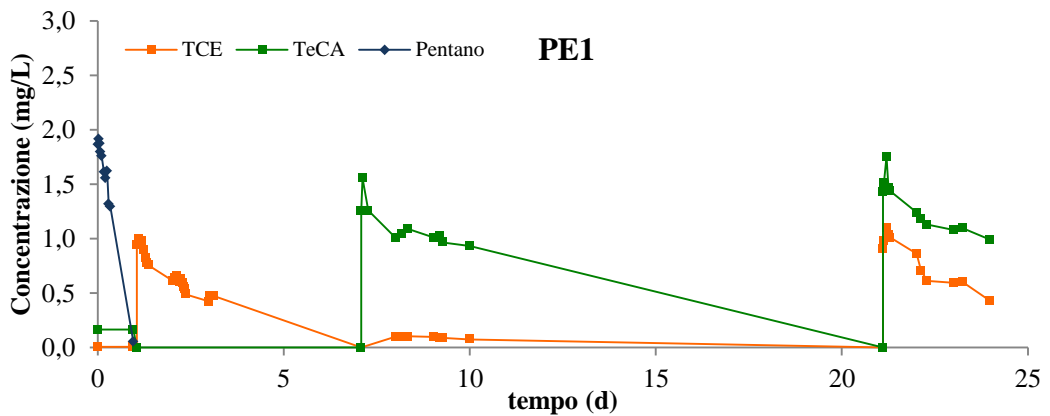
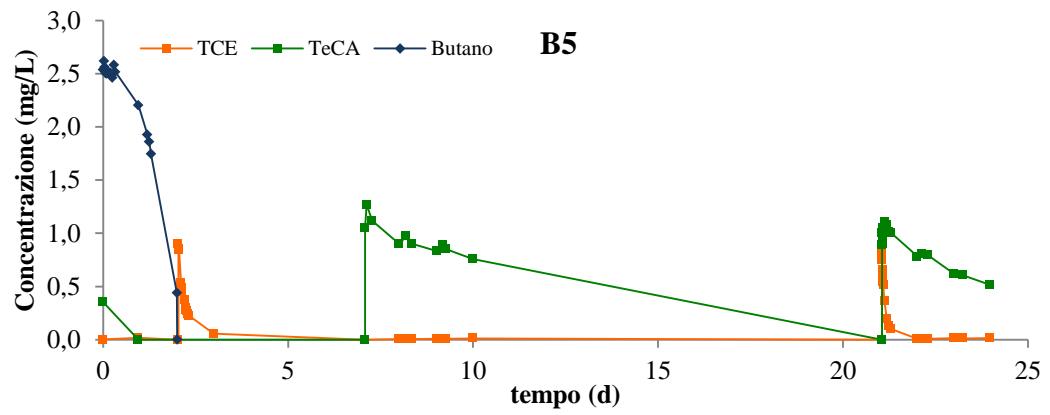
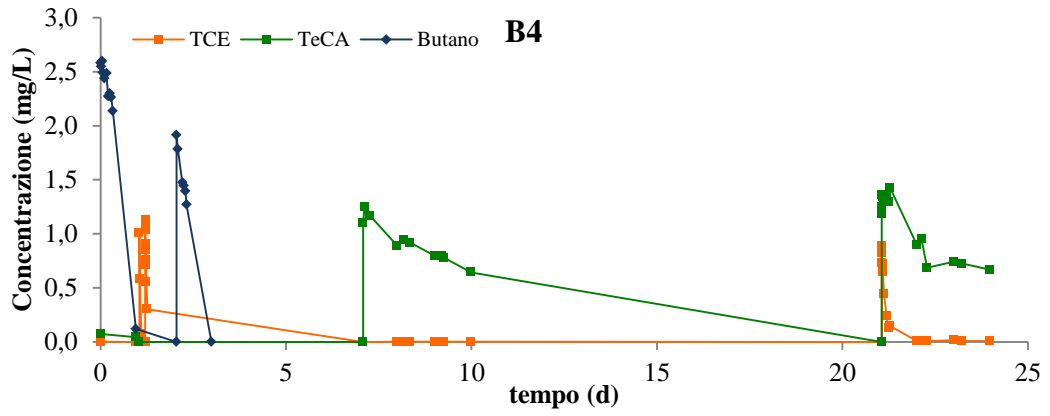
Per ogni monitoraggio si sono eseguite le seguenti operazioni:

- aggiunta di substrato primario in modo da avere una concentrazione in fase liquida di 2 mg/L, al fine di attivare l'apparato metabolico della biomassa (nel primo pulso se ne è seguita anche la cinetica di rimozione);
- prelievo di un'aliquota di fase liquida, pari a 200 μ L, per la determinazione della concentrazione della biomassa;
- pulso di substrato cometabolico in modo da avere una concentrazione in fase liquida pari a 1 mg/L;
- monitoraggio della cinetica di rimozione del substrato e calcolo della velocità iniziale specifica.

I grafici sotto riportati mostrano l'andamento delle concentrazioni in fase liquida dei substrati primari e cometabolici nelle 3 prove, rilevati ad intervalli di tempo di mezz'ora.







Dai grafici ottenuti sono state determinate le velocità specifiche iniziali, attraverso la regressione lineare dei punti più rappresentativi.

Nelle tabelle 7.3 e 7.4 si mostrano le velocità specifiche rispettivamente del TCE e del TeCA, in assenza di inibizione competitiva tra i due clorurati, mentre nelle tabelle 7.5 e 7.6, si riportano le velocità specifiche dei due substrati cometabolici in presenza di inibizione competitiva.

Tabella 7. 3 Velocità specifiche di degradazione del TCE in assenza di inibizione

DEGRADAZIONE TCE (assenza di inibizione)						
Substrato	Vial	R_{TCE} ($mg/L^{-1}d^{-1}$)	C_{TCE} (mgL^{-1})	R_{TCE}/C_{TCE} (d^{-1})	C_X ($g_{prot} L^{-1}$)	r_{TCE} ($Ld^{-1}g_{prot}^{-1}$)
Metano	M1	0,19	0,9	0,21	0,076	2,73
	M4	0,15	0,9	0,17	0,19	0,89
Butano	B4	19,84	1,1	17,51	0,18	96,00
	B5	4,78	0,9	5,29	0,13	41,83
Propano	PR2	0,22	1,0	0,21	0,15	1,35
	PR4	8,57	0,9	9,48	0,17	55,60
	RPR	0,19	1,1	0,18	0,04	4,78
Pentano	PE1	0,26	0,9	0,28	0,28	0,98
	PE4	0,15	1,0	0,15	0,26	0,60

Tabella 7. 4 Velocità specifiche di degradazione del TeCA in assenza di inibizione

DEGRADAZIONE TeCA (assenza di inibizione)						
Substrato	Vial	R_{TeCA} ($mg/L^{-1}d^{-1}$)	C_{TeCA} (mgL^{-1})	R_{TeCA}/C_{TeCA} (d^{-1})	C_X ($g_{prot} L^{-1}$)	r_{TeCA} ($Ld^{-1}g_{prot}^{-1}$)
Metano	M1	0,126	1,3	0,101	0,118	0,853
	M4	0,108	1,3	0,084	0,200	0,419
Butano	B4	0,186	1,2	0,149	0,189	0,790
	B5	0,137	1,3	0,108	0,150	0,717
Propano	PR2	0,089	0,8	0,112	0,093	1,207
	PR4	0,190	1,1	0,167	0,175	0,952
	RPR	0,115	1,3	0,091	0,029	3,111
Pentano	PE1	0,156	1,6	0,100	0,246	0,406
	PE4	0,104	1,3	0,080	0,224	0,358

Tabella 7. 5 Velocità specifiche di degradazione del TCE in presenza di inibizione

DEGRADAZIONE TCE (presenza di inibizione)						
Substrato	Vial	R_{TCE} ($\text{mg/L}^{-1}\text{d}^{-1}$)	C_{TCE} (mgL^{-1})	R_{TCE}/C_{TCE} (d^{-1})	C_X ($\text{g}_{\text{prot}} \text{L}^{-1}$)	r_{TCE} ($\text{Ld}^{-1}\text{g}_{\text{prot}}^{-1}$)
Metano	M1	0,113	1,1	0,107	0,136	0,786
	M4	0,178	1,0	0,177	0,073	2,417
Butano	B4	7,316	0,9	8,246	0,164	50,291
	B5	10,092	0,8	12,528	0,116	107,862
Propano	PR2	0,147	0,8	0,180	0,133	1,349
	PR4	0,874	0,9	0,955	0,182	5,235
	RPR	0,061	0,6	0,100	0,037	2,707
Pentano	PE1	0,232	1,1	0,212	0,309	0,686
	PE4	0,042	1,0	0,042	0,236	0,178

Tabella 7. 6 Velocità specifiche di degradazione del TeCA in presenza di inibizione

DEGRADAZIONE TeCA (presenza di inibizione)						
Substrato	Vial	R_{TeCA} ($\text{mg/L}^{-1}\text{d}^{-1}$)	C_{TeCA} (mgL^{-1})	R_{TeCA}/C_{TeCA} (d^{-1})	C_X ($\text{g}_{\text{prot}} \text{L}^{-1}$)	r_{TeCA} ($\text{Ld}^{-1}\text{g}_{\text{prot}}^{-1}$)
Metano	M1	0,280	1,6	0,176	0,136	1,289
	M4	0,240	1,4	0,169	0,073	2,304
Butano	B4	0,282	1,3	0,153	0,164	0,933
	B5	0,213	1,1	0,193	0,116	1,658
Propano	PR2	0,246	1,4	0,182	0,133	1,362
	PR4	0,221	1,3	0,172	0,182	0,942
	RPR	0,209	1,6	0,131	0,037	3,547
Pentano	PE1	0,221	1,1	0,202	0,309	0,652
	PE4	0,221	1,8	0,126	0,236	0,533

Di seguito vengono riportati gli istogrammi delle velocità di consumo dei substrati primari (Grafico 7. 1) e cometabolici (Grafico 7. 2 e 7. 3).

Grafico 7. 1 Istogrammi delle velocità di consumo dei substrati primari

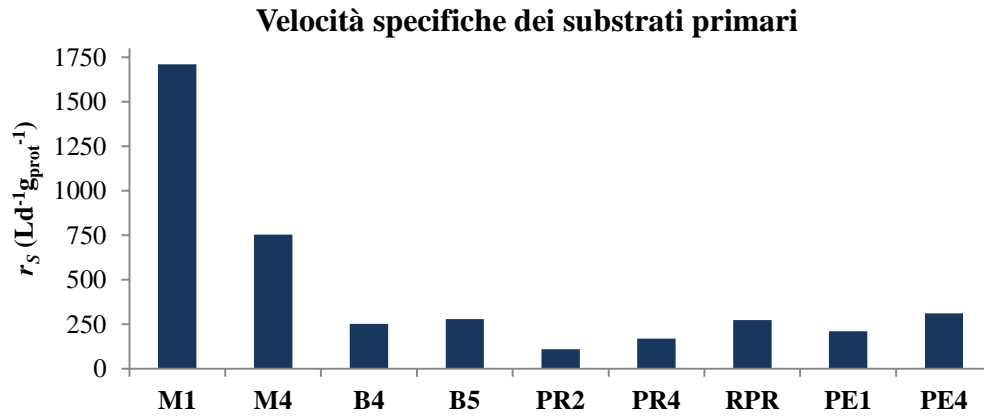


Grafico 7. 2 Istogrammi delle velocità di rimozione del TCE e del TeCA in assenza di inibizione

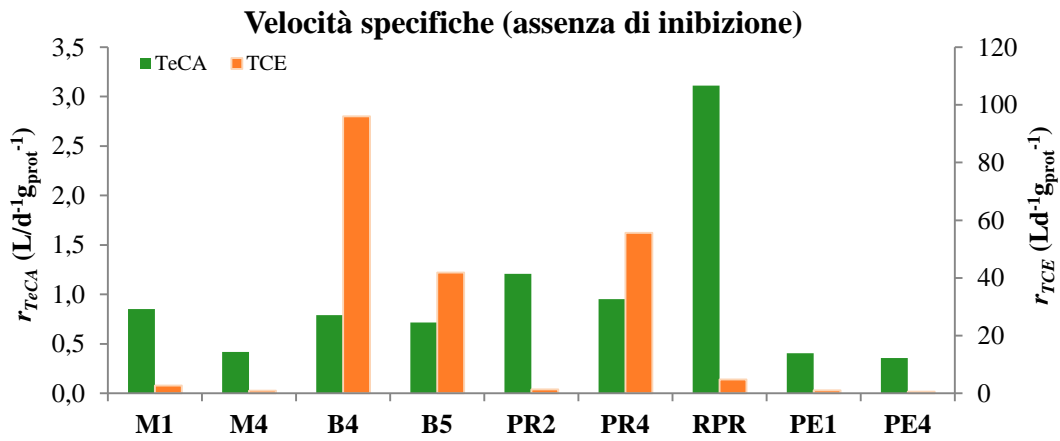
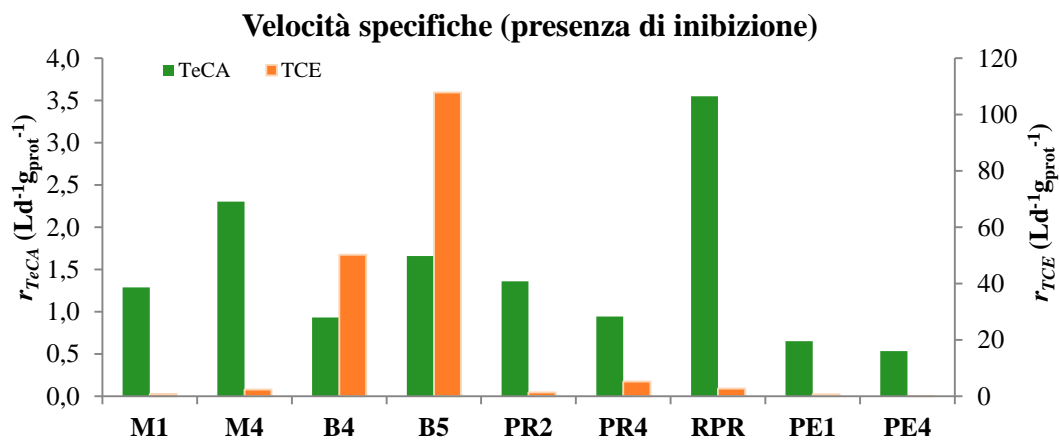


Grafico 7. 3 Istogrammi delle velocità di rimozione del TCE e del TeCA in presenza di inibizione



Dall'analisi degli istogrammi che riportano le velocità specifiche di rimozione dei substrati cometabolici, risulta evidente che i microcosmi alimentati con Metano e Pentano presentano, rispetto al TCE, cinetiche assolutamente inferiori e non confrontabili con quelle mostrate dai microcosmi alimentati con Butano e Propano. La cinetica di rimozione del TeCA invece, risulta essere paragonabile ai microcosmi della serie butanotrofa e propanotrofa. Nell'ottica di restringere il campo d'indagine a 2 substrati primari, risulta ovvia la scelta dei microcosmi Butano-ossidanti e Propano-ossidanti.

A conclusione di questa fase di analisi si fa notare che, dai grafici che riportano il monitoraggio della rimozione dei substrati cometabolici, si evince che, la dove la velocità di rimozione del TCE risulta paragonabile a quella del TeCA (vedi M1, M4, PE1 e PE4), durante il test di degradazione del TeCA in assenza di inibizione competitiva (quindi in assenza di TCE), si manifesta la comparsa di TCE. Questo fatto lascia pensare che, molto probabilmente, il primo step del pathway degradativo del TeCA ha come prodotto il TCE.

7.2.3 Selezione del substrato primario

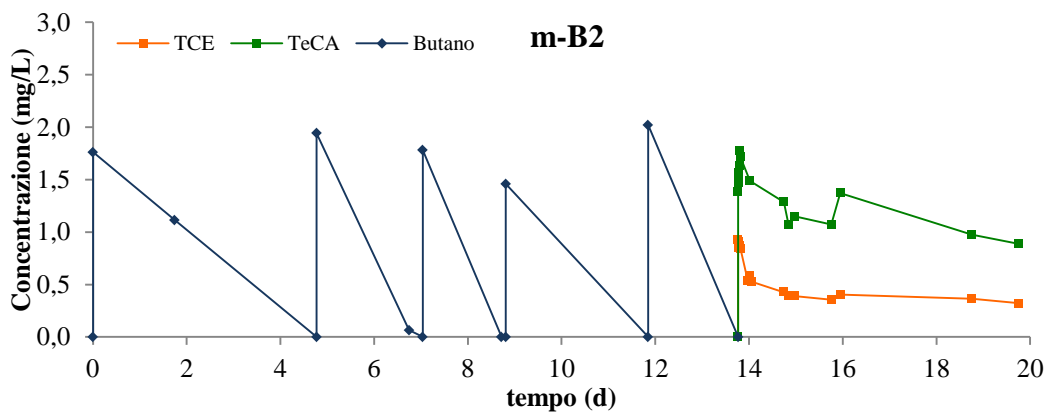
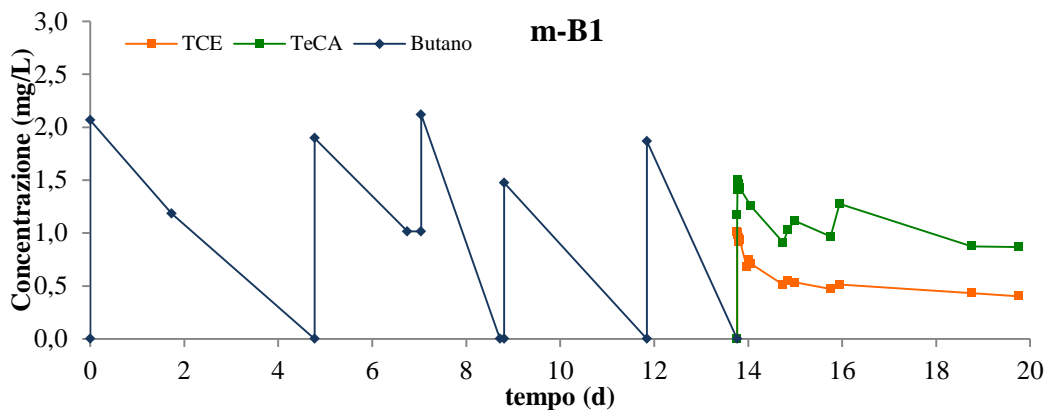
Al fine di verificare l'efficacia delle biomasse selezionate sulle quattro acque campionate, e per cercare di coniugarne le capacità degradative, sono state rilanciate tre serie di nuovi microcosmi. Le serie sono costituite rispettivamente dalla miscela dei due butanotrofi, dalla miscela dei tre propanotrofi e dalla miscela dei microcosmi butanotrofi e propanotrofi.

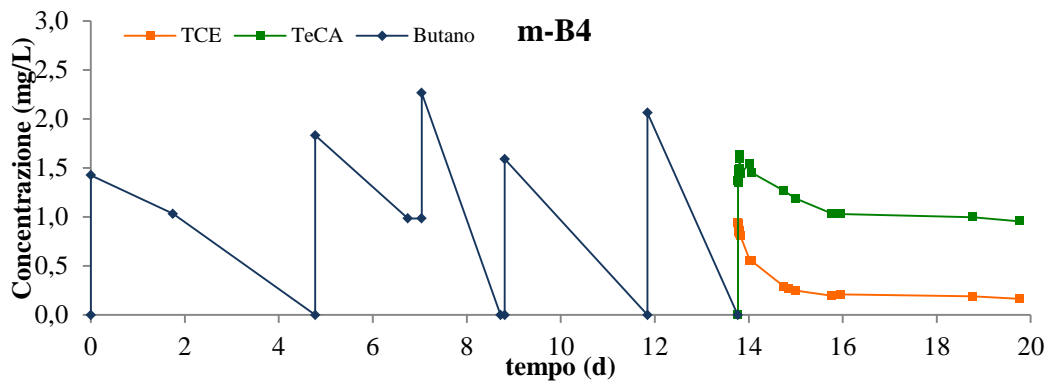
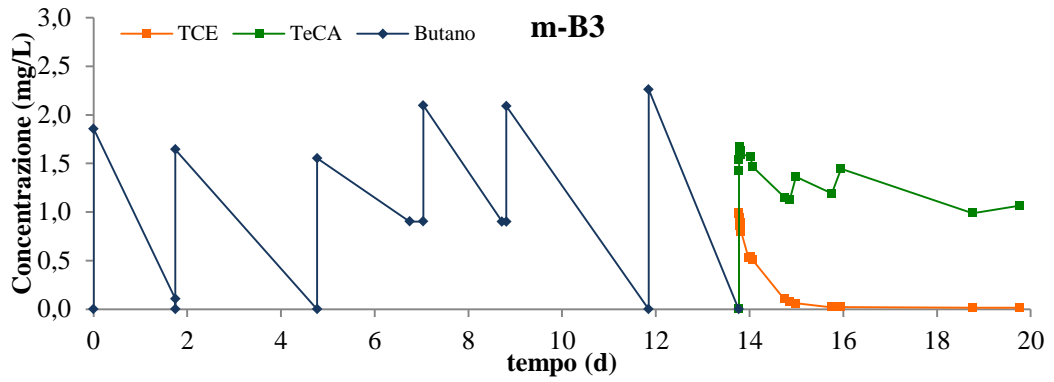
Ogni serie è composta da quattro rilanci, che si ottengono inoculando nelle quattro acque campionate le tre miscele prima descritte. Il volume dell'inoculo è del 10% rispetto al volume totale di liquido, ed è stato preparato in modo da ottenere, nel microcosmo finale, un'uguale quantità di biomassa di ogni consorzio originario. Nel caso dei microcosmi ottenuti dalla miscela dei consorzi butanotrofi e propanotrofi, il volume dell'inoculo è stato del 20% rispetto al volume totale di liquido. Si sono ottenuti quindi i microcosmi indicati con mix B, mix PR e mix B+PR.

A questi nuovi microcosmi sono stati eseguiti una serie di pulsus di substrato, in modo da aumentarne la concentrazione di biomassa e per attivare i meccanismi enzimatici che presiedono i fenomeni di degradazione. All'inizio della serie di pulsus di substrato primario e alla fine della stessa, sono stati fatti prelievi di fase liquida per determinare la concentrazione della biomassa in essa presente e per poter calcolare il coefficiente di resa batterica ($Y_{S/X}$).

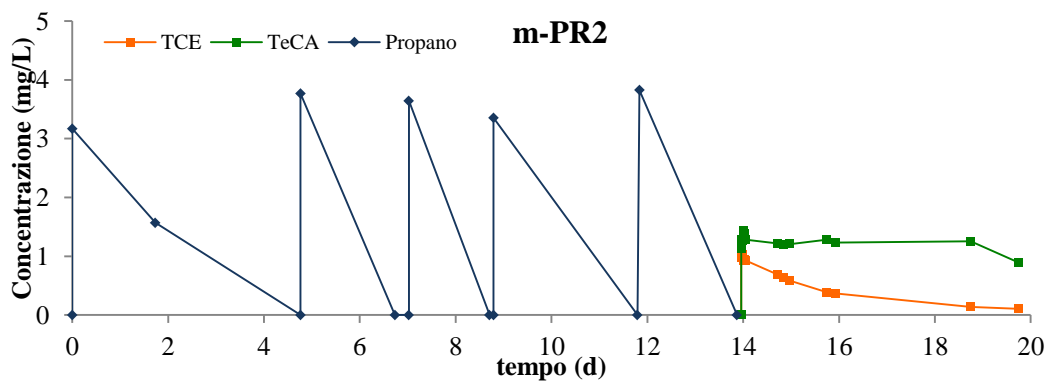
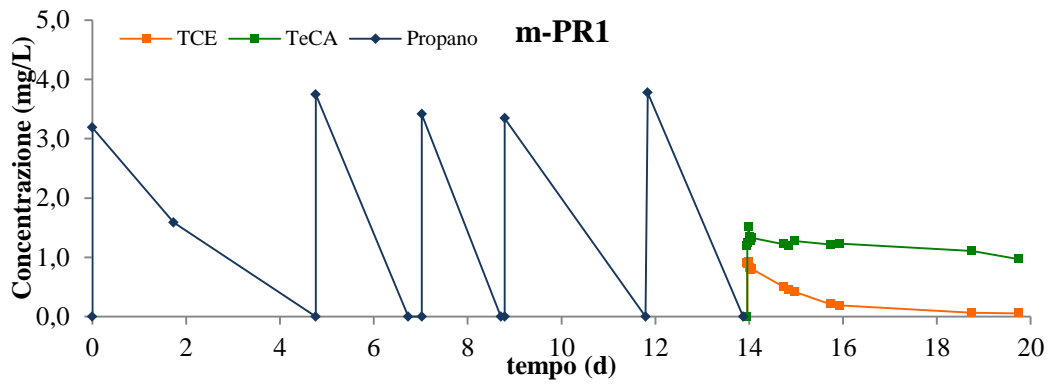
Alla biomassa fatta crescere attraverso la serie di pulsus di substrato primario, sono stati poi somministrati rispettivamente: 1 pulso di TCE tale da avere una concentrazione in fase liquida 1 mg/L ed un pulso di TeCA da 1,5 mg/L. Successivamente è stato monitorato l'andamento delle concentrazioni nel tempo e sono state poi calcolate le velocità specifiche di rimozione dei due substrati cometabolici. I risultati del monitoraggio e le velocità specifiche sono illustrati nei grafici sottoriportati.

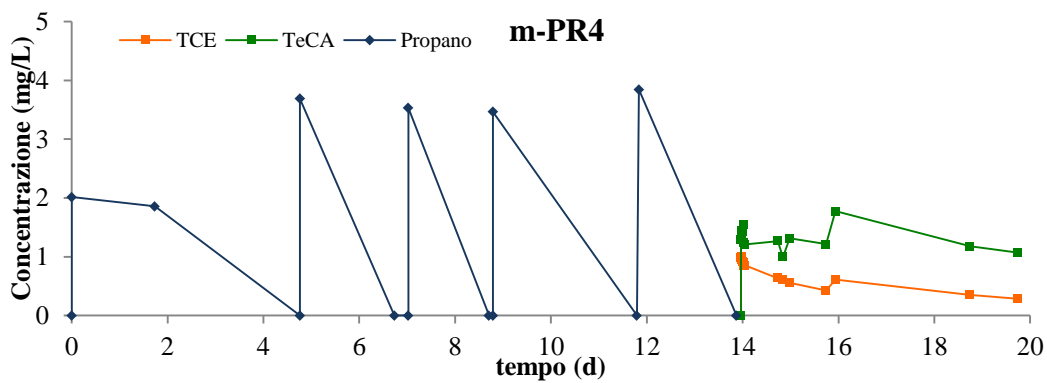
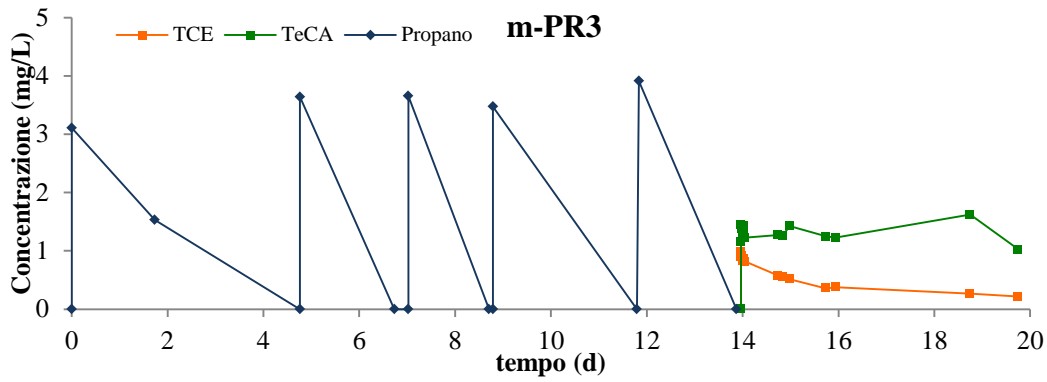
Consorzi butano-ossidanti



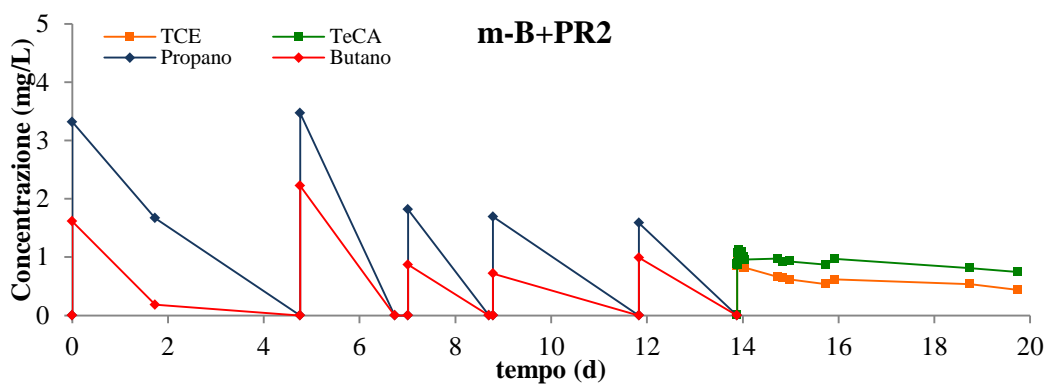
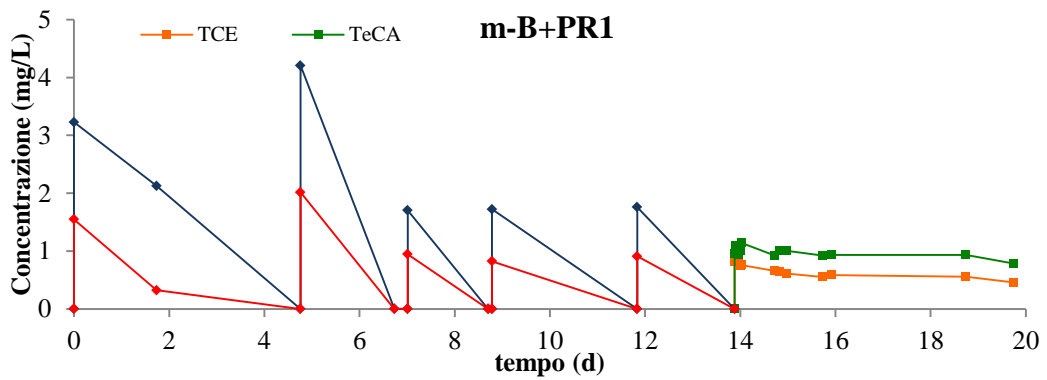


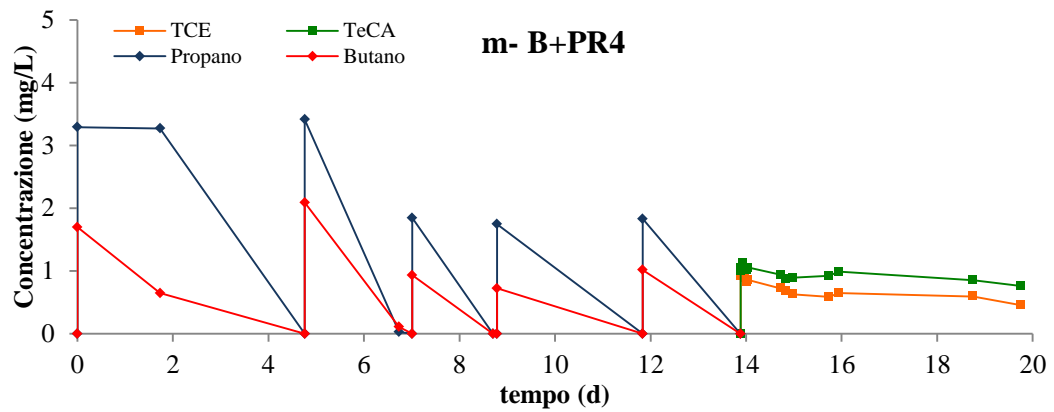
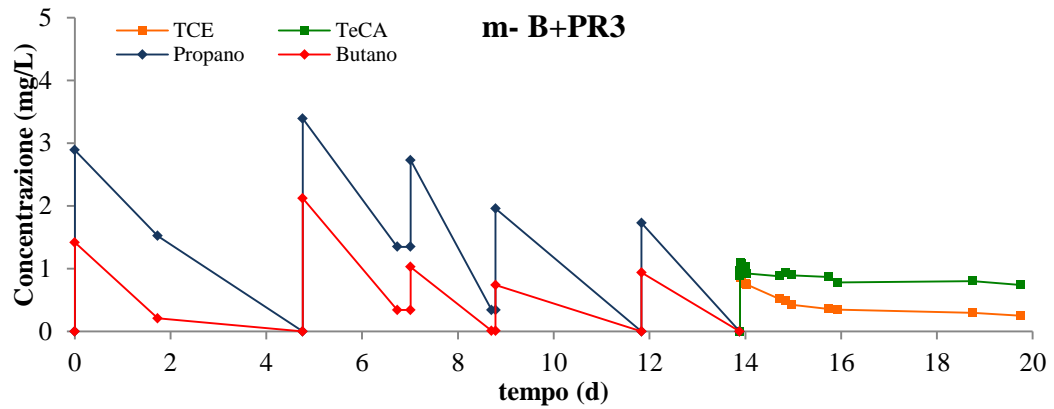
Consorti Propano-ossidanti





Consozi Butano/Propano-ossidanti





CONSUMO S (assenza TCE, TeCA)

Substrato	Vial	m sub. (mg)	X _i (mg/L)	X _f (mg/L)	Y _{X/S} (g _{prot} /g _S)	Y _{X/S} (g _{DW} /g _S)
Butano	m-B1	22,3	24,2	156,1	0,354	0,709
	m-B2	23,8	28,2	147,6	0,301	0,602
	m-B3	25,8	15,7	119,4	0,241	0,483
	m-B4	21,8	31,6	124,2	0,255	0,511
Propano	m-PR1	33,1	24,6	112,8	0,160	0,320
	m-PR2	33,7	16,8	128,7	0,200	0,399
	m-PR3	33,7	16,8	116,0	0,177	0,353
	m-PR4	31,4	13,4	130,6	0,224	0,449
Butano Propano	m-B+PR1	40,5	29,3	159,7	0,193	0,386
	m-B+PR2	39,6	37,2	163,8	0,192	0,384
	m-B+PR3	37,2	20,0	158,8	0,224	0,448
	m-B+PR4	40,2	30,1	169,8	0,209	0,417

DEGRADAZIONE TCE (presenza di inibizione)

Substrato	Vial	R_{TCE} (mg/L ⁻¹ d ⁻¹)	C_{TCE} (mgL ⁻¹)	R_{TCE}/C_{TCE} (d ⁻¹)	X (g _{prot} L ⁻¹)	r_{TCE} (Ld ⁻¹ g _{prot} ⁻¹)
Butano	mB1	2,898	1,0	2,875	0,156	18,411
	mB2	2,126	0,9	2,303	0,148	15,605
	mB3	5,873	1,0	5,942	0,119	49,771
	mB4	4,298	0,9	4,556	0,124	36,688
Propano	mPR1	1,969	0,9	2,186	0,113	19,370
	mPR2	0,893	1,0	0,874	0,129	6,794
	mPR3	2,017	1,0	2,056	0,116	17,719
	mPR4	2,406	1,0	2,404	0,131	18,408
Butano Propano	mB-PR1	0,893	0,9	1,047	0,160	6,553
	mB-PR2	1,777	1,0	1,857	0,164	11,339
	mB-PR3	1,494	0,9	1,668	0,159	10,503
	mB-PR4	1,756	1,0	1,801	0,170	10,609

DEGRADAZIONE TeCA (presenza di inibizione)

Substrato	Vial	R_{TeCA} (mg/L ⁻¹ d ⁻¹)	C_{TeCA} (mgL ⁻¹)	R_{TeCA}/C_{TeCA} (d ⁻¹)	X (g _{prot} L ⁻¹)	r_{TeCA} (Ld ⁻¹ g _{prot} ⁻¹)
Butano	mB1	0,300	1,5	0,200	0,156	1,279
	mB2	0,396	1,8	0,224	0,148	1,514
	mB3	0,275	1,7	0,165	0,119	1,383
	mB4	0,285	1,5	0,184	0,124	1,482
Propano	mPR1	0,060	1,3	0,045	0,113	0,394
	mPR2	0,224	1,4	0,155	0,129	1,208
	mPR3	0,072	1,4	0,050	0,116	0,432
	mPR4	0,114	1,5	0,073	0,131	0,562
Butano/ Propano	mB-PR1	0,094	1,1	0,083	0,160	0,517
	mB-PR2	0,118	1,5	0,076	0,164	0,463
	mB-PR3	0,112	1,5	0,072	0,159	0,454
	mB-PR4	0,109	1,1	0,096	0,170	0,566

Grafico 7. 4 Istogrammi delle rese di biomassa espressi in funzione del peso secco
Resa di biomassa ($Y_{X/S}$)

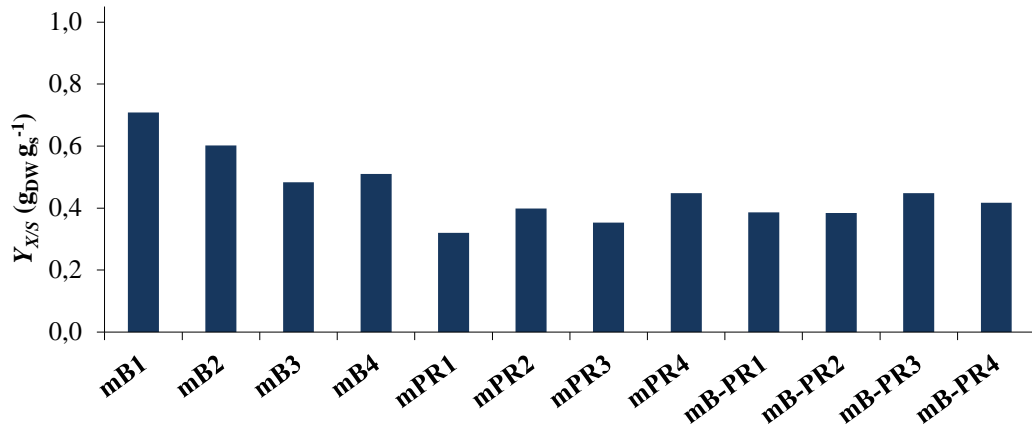
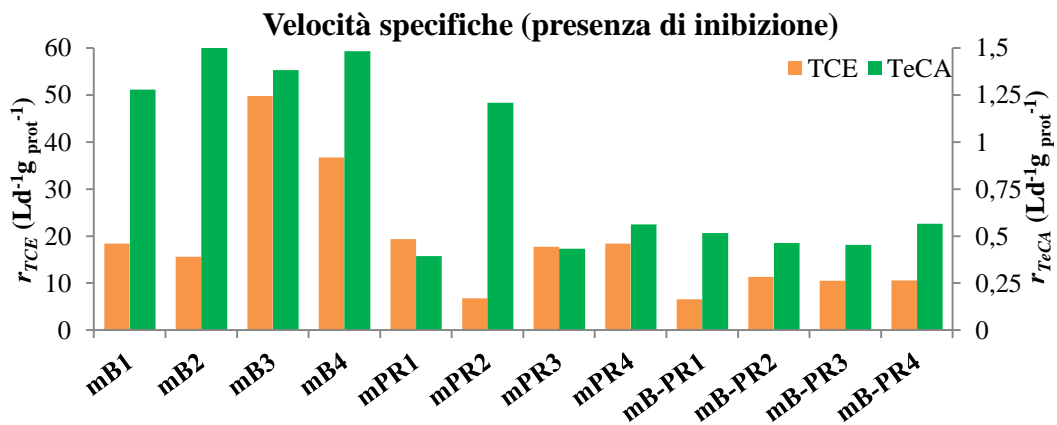


Grafico 7. 5 Istogrammi delle velocità di degradazione dei solventi clorurati in presenza di inibizione



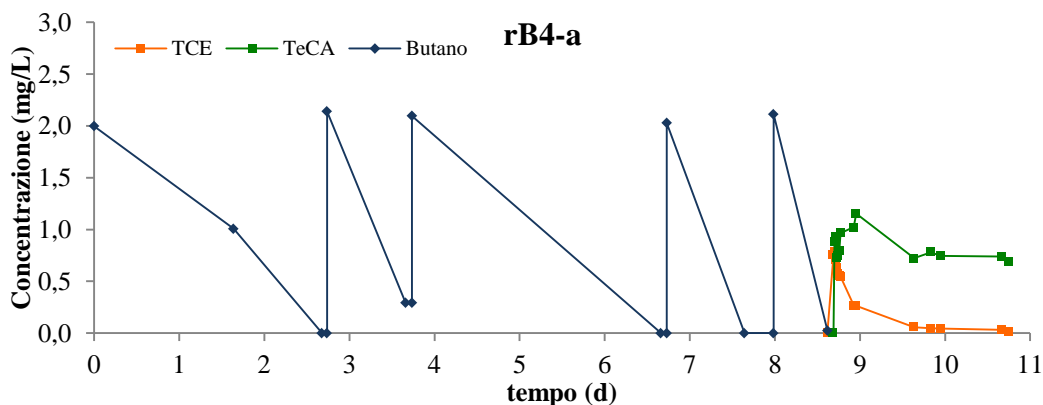
Dall'analisi del Grafico 7. 4, si nota che le biomasse presenti nei microcosmi mix mostrano buone rese di crescita ma, dall'analisi del Grafico 7. 5, si nota che le prestazioni in termini di velocità specifiche di rimozione dei solventi clorurati, risultano essere tutte inferiori a quelle determinate per i microcosmi originari. L'esito della prova non ha fornito quindi i risultati sperati riguardo l'obiettivo di coniugare le capacità cometaboliche.

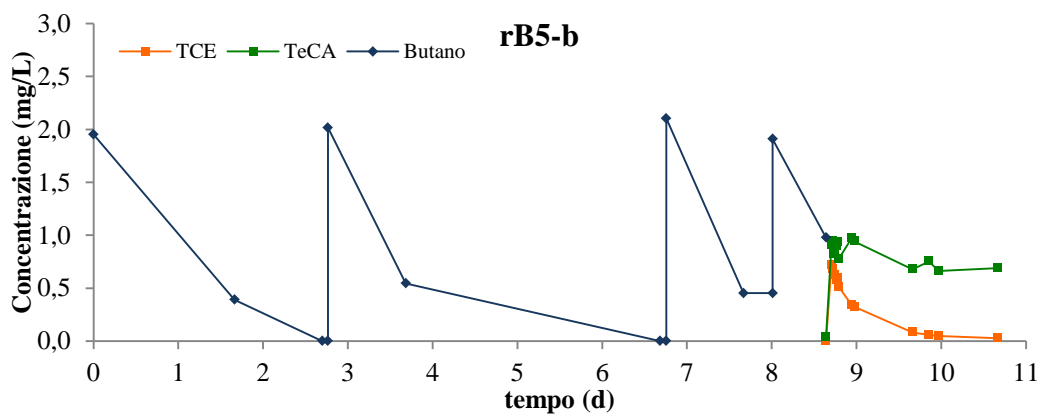
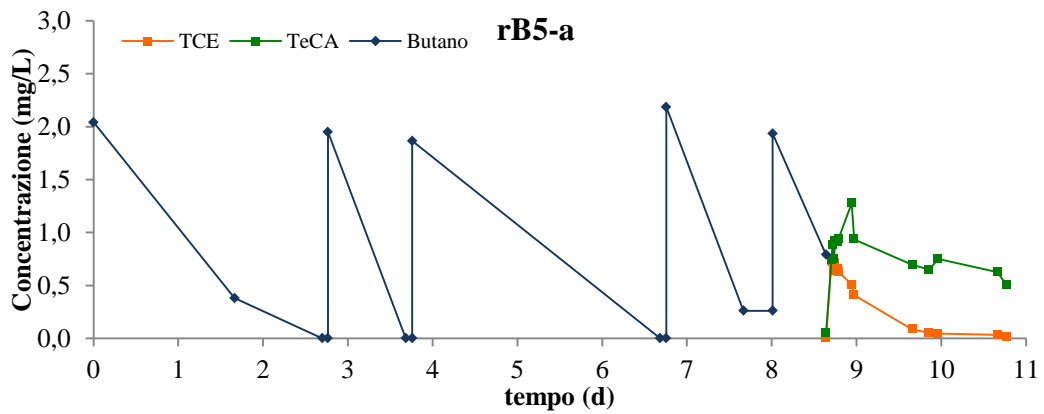
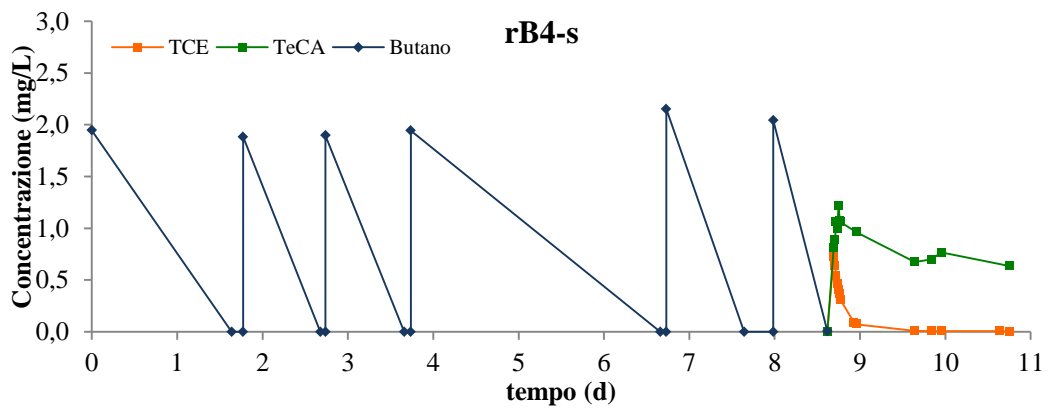
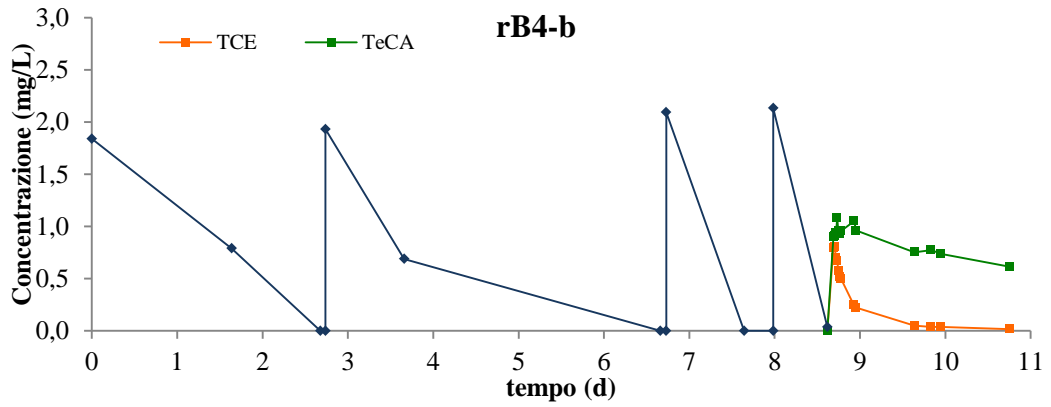
Comunque dal confronto dei risultati ottenuti in questo test con quelli ottenuti nella prova precedente, si può dedurre che i consorzi butanotrofi hanno capacità degradative superiori a quelli propanotrofi. Pertanto, allo scopo di selezionare il substrato di crescita che risulta avere le migliori prestazioni in termini di velocità di rimozione dei solventi clorurati, la scelta non può che essere il Butano.

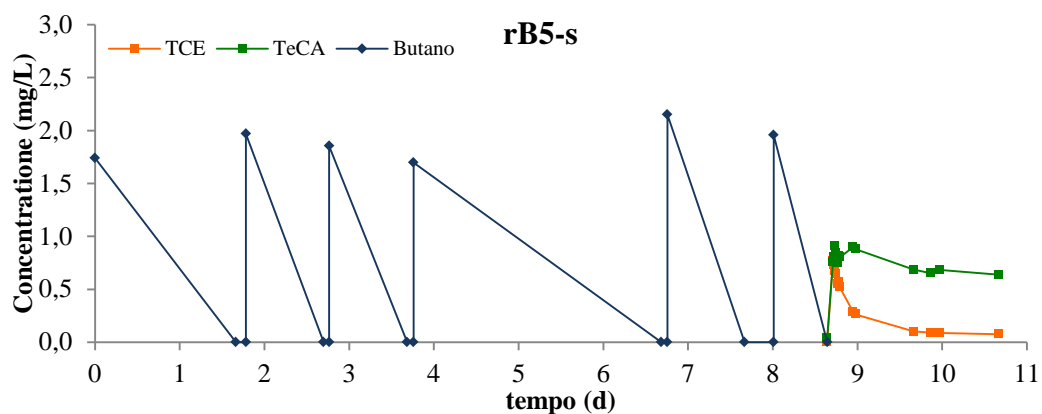
7.2.4 Selezione consorzio batterico

Obiettivo della prova è quello di selezionare, tra i due consorzi butanotrofi B4 e B5, il migliore in termini di velocità specifica di rimozione dei solventi clorurati. A tale scopo sono stati rilanciati dei nuovi microcosmi, partendo dalle colture primarie originarie B4 e B5. I nuovi microcosmi sono stati rilanciati in acqua 1 (in duplicato) e in un terreno minimo avente caratteristiche idrochimiche simili all'acqua 1. Si sono ottenuti quindi 2 serie di 3 microcosmi designati con la sigla r-B4a, r-B4b, r-B4s, r-B5a, r-B5b e r-B5s; dove la lettera "r" indica il rilancio effettuato del microcosmo B4 o B5, le lettere "a" e "b" indicano i duplicati in acqua 1 e la lettera "s" indica il rilancio nel terreno minimo. Ai microcosmi così allestiti sono stati somministrati una serie di pulsivi di Butano (variabile da 4 a 6) per stimolare la crescita della biomassa ed attivarne l'apparato metabolico. All'inizio e alla fine della serie di pulsivi di Butano, sono stati eseguiti dei prelievi di fase liquida per la determinazione della concentrazione di biomassa. Questo ha lo scopo di calcolare la resa di crescita batterica ($Y_{x/s}$), oltre che a fornire il dato di biomassa che permette di calcolare la velocità specifica di rimozione dei due substrati cometabolici.

Alla biomassa fatta crescere attraverso la serie di pulsivi di substrato primario, sono stati poi somministrati un pulso di TCE ed uno di TeCA, tale da avere una concentrazione nella fase liquida pari a 1 mg/L. Successivamente è stato monitorato l'andamento delle concentrazioni nel tempo e si sono quindi calcolate le velocità specifiche di rimozione dei due clorurati.







CONSUMO S (assenza TCE, TeCA)

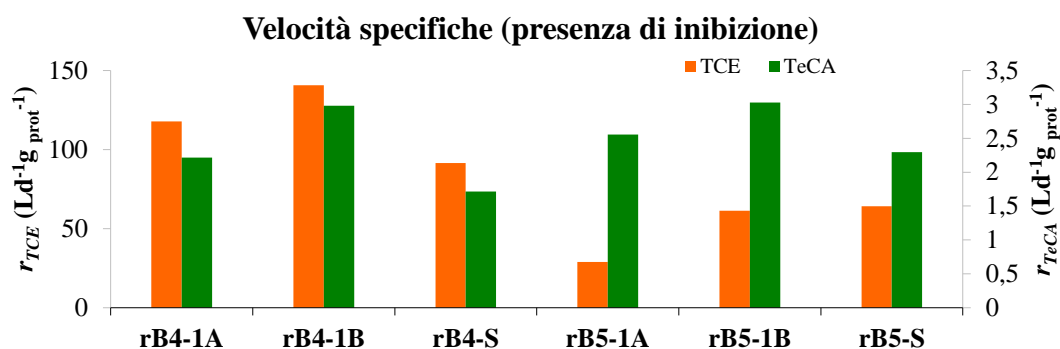
Vial	m sub. (mg)	X_i (mg/L)	X_f (mg/L)	$Y_{X/S}$ (g _{prot} /g _S)	$Y_{X/S}$ (g _{DW} /g _S)
rB4-a	26,7	6,8	81,5	0,168	0,336
rB4-b	21,2	2,5	66,3	0,180	0,360
rB4-s	31,5	10,1	128,6	0,226	0,451
rB5-a	23,7	8,4	83,0	0,189	0,378
rB5-b	17,4	5,1	72,8	0,233	0,467
rB5-s	30,2	2,9	93,6	0,180	0,360

DEGRADAZIONE TCE (presenza di inibizione)

Vial	R_{TCE} (mg/L ⁻¹ d ⁻¹)	C_{TCE} (mgL ⁻¹)	R_{TCE}/C_{TCE} (d ⁻¹)	X (g _{prot} L ⁻¹)	r_{TCE} (Ld ⁻¹ g _{prot} ⁻¹)
rB4-a	7,58	0,8	9,60	0,082	117,85
rB4-b	7,53	0,8	9,33	0,066	140,74
rB4-S	8,53	0,7	11,78	0,13	91,61
rB5-a	1,71	0,7	2,40	0,083	28,91
rB5-b	3,21	0,7	4,46	0,073	61,25
rB5-S	4,61	0,8	6,01	0,094	64,23

DEGRADAZIONE TeCA (assenza S, presenza TCE)

Vial	R_{TeCA} ($mg/L \cdot d^{-1}$)	C_{TeCA} (mg/L^{-1})	R_{TeCA}/C_{TeCA} (d^{-1})	X ($g_{prot} L^{-1}$)	r_{TeCA} ($Ld^{-1}g_{prot}^{-1}$)
rB4-1A	0,21	1,2	0,18	0,082	2,22
rB4-1B	0,19	1,0	0,20	0,066	2,98
rB4-S	0,23	1,1	0,22	0,13	1,71
rB5-1A	0,20	0,9	0,21	0,083	2,56
rB5-1B	0,22	1,0	0,22	0,073	3,03
rB5-S	0,19	0,9	0,21	0,094	2,30

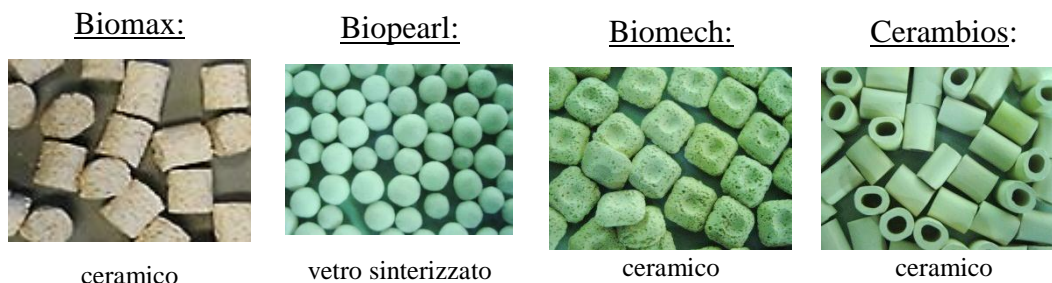


Dall'analisi delle velocità specifiche è facile notare come il consorzio batterico B4 mostri una velocità di rimozione del TCE doppia rispetto al consorzio B5, mentre, le velocità di rimozione del TeCA risultano confrontabili. Pertanto risulta ovvia la scelta del consorzio batterico B4 come consorzio deputato ad essere utilizzato nella realizzazione del nostro processo biologico cometabolico.

7.2.5 Prove di crescita in batch della biomassa su supporti porosi

Le prove svolte finora per la selezione del consorzio, hanno riguardato la determinazione delle velocità di rimozione dei due solventi da parte della biomassa in forma sospesa. Visto che lo scopo ultimo del progetto è quello di realizzare un reattore a biomassa adesa, risulta necessario testare la capacità del consorzio B4 di formare un biofilm stabile sui supporti. I supporti porosi scelti, sono quelli comunemente usati come biofiltri per acquari e sono

commercialmente denominati: Biomax, Biopearl, Cerambios e Biomech. La prova così condotta serve a dare una prima indicazione della capacità di colonizzazione dei supporti da parte della biomassa selezionata.

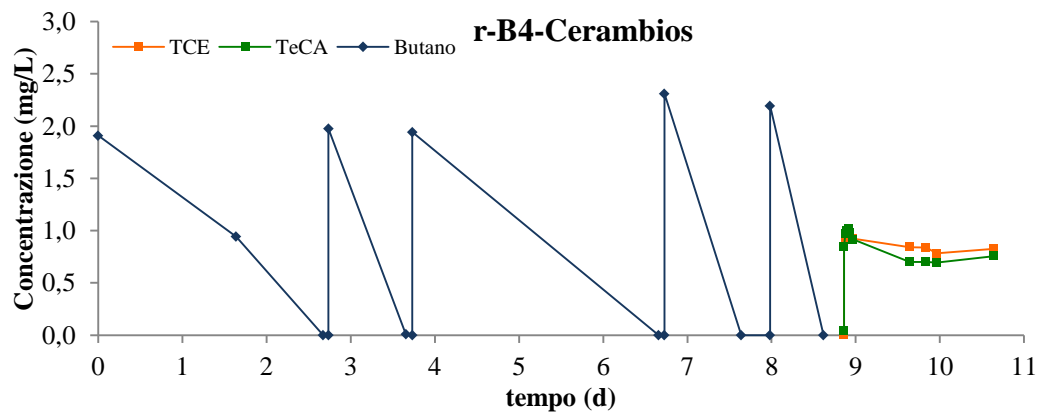
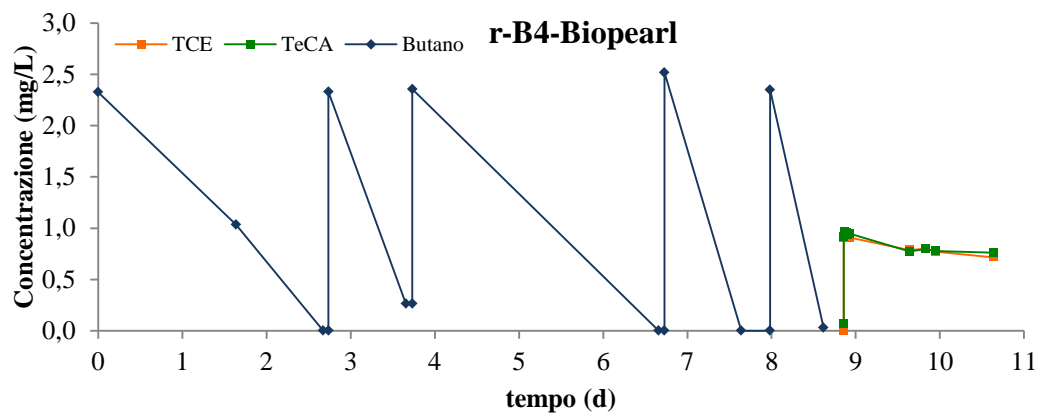
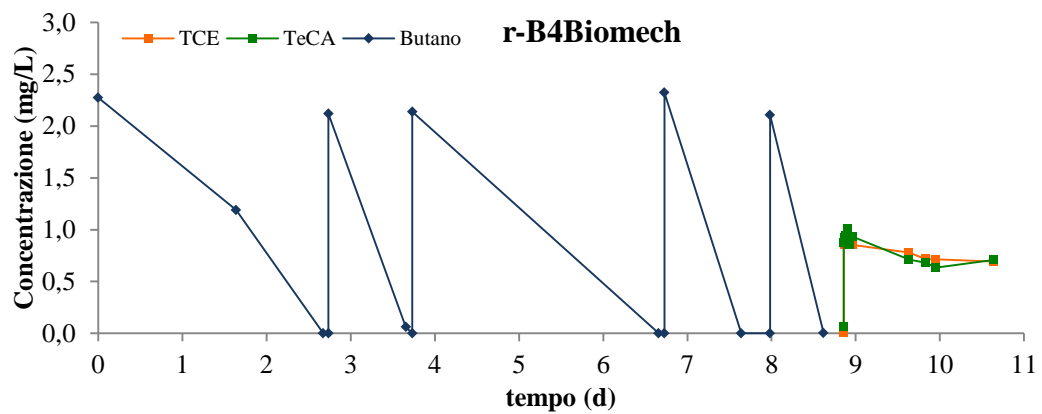
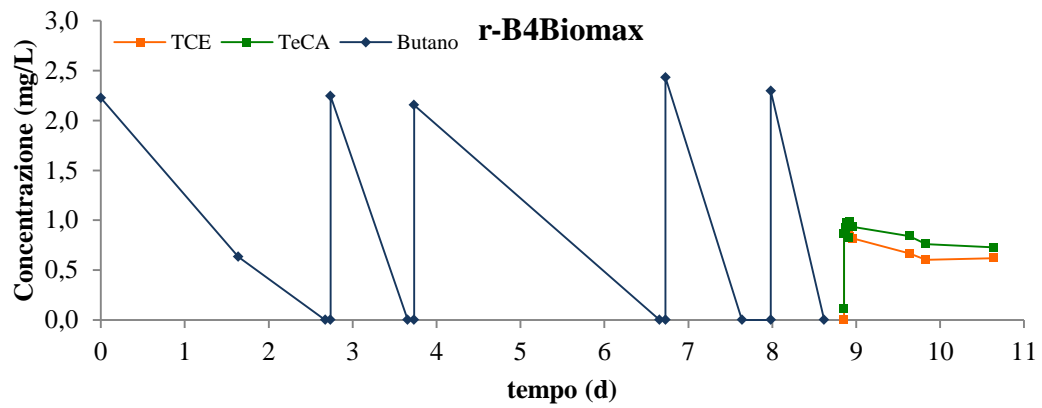


La procedura di allestimento di tali prove è stata eseguita effettuando 4 rilanci del consorzio B4 in acqua 1, precedentemente filtrata e gorgogliata in aria per eliminarne i solventi clorurati in essa originariamente presenti. In ognuno dei rilanci sono stati inseriti circa 40 mL di supporto, 43,5 mL di acqua 1, 6 mL di inoculo e 0,5 mL di una soluzione di nutrienti.

I nuovi microcosmi così allestiti sono stati etichettati con le sigle r-B4-Biomax, r-B4-Biopearl, r-B4-Biomech e r-B4-Cerambios. Al fine di sviluppare una sufficiente quantità di biomassa, si sono eseguiti una serie di pulsii di Butano, tali da determinare una concentrazione in fase liquida pari a 2 mg/L.

Constatato il consumo dei pulsii di substrato primario attraverso l'analisi gascromatografica, sono stati eseguiti 2 lavaggi con una soluzione fisiologica, allo scopo di rimuovere la fase sospesa della biomassa e lasciare la sola fase adesa ai supporti. Questi sono stati poi riposti in acqua 1 e sottoposti ad un pulso di TCE ed uno di TeCA, tali da avere una concentrazione in fase liquida pari a 1 mg/L. Si sono monitorate poi le concentrazioni dei due solventi clorurati nel tempo e si sono determinate le cinetiche di rimozione.

I grafici seguenti mostrano gli andamenti nel tempo delle concentrazioni sia del substrato primario che dei due substrati cometabolici delle prove effettuate.



DEGRADAZIONE TCE (presenza di inibizione)

Vial	R_{TCE} (mg/L ⁻¹ d ⁻¹)	C_{TCE} (mgL ⁻¹)	R_{TCE}/C_{TCE} (d ⁻¹)
rB4-Biomax	0,415	0,9	0,464
rB4-Biomech	0,181	0,9	0,206
rB4-Biopearl	0,183	0,9	0,200
rB4-Cerambios	0,122	0,9	0,131
rB5-Biomax	0,189	0,9	0,209
rB5-Biomech	0,119	0,9	0,137
rB5-Biopearl	0,119	0,9	0,135
rB5-Cerambios	0,170	0,9	0,184

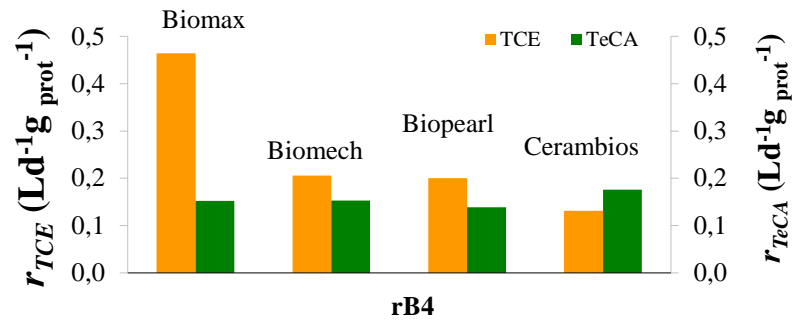
DEGRADAZIONE TeCA (presenza di inibizione)

Vial	R_{TeCA} (mg/L ⁻¹ d ⁻¹)	C_{TeCA} (mgL ⁻¹)	R_{TeCA}/C_{TeCA} (d ⁻¹)
rB4-Biomax	0,150	1,0	0,152
rB4-Biomech	0,143	0,9	0,153
rB4-Biopearl	0,133	1,0	0,139
rB4-Cerambios	0,180	1,0	0,176
rB5-Biomax	0,189	1,0	0,185
rB5-Biomech	0,259	0,9	0,273
rB5-Biopearl	0,303	1,0	0,294
rB5-Cerambios	0,235	1,0	0,232

Come si evince dalle tabelle non è stato possibile fornire un dato di concentrazione di biomassa adesa, poiché ad oggi non è stata ancora messa a punto una metodica di analisi specifica per i supporti in oggetto¹. Vengono fornite solo le velocità di degradazione osservate, normalizzate rispetto alla concentrazione iniziale del pulso ($R_i/C_{i\text{iniz.}}$).

¹ In questo caso ci si riferisce NON ad una metodica di analisi in senso stretto, ma ad una metodica per il distacco della biomassa dal supporto, per poterne misurare poi la concentrazione.

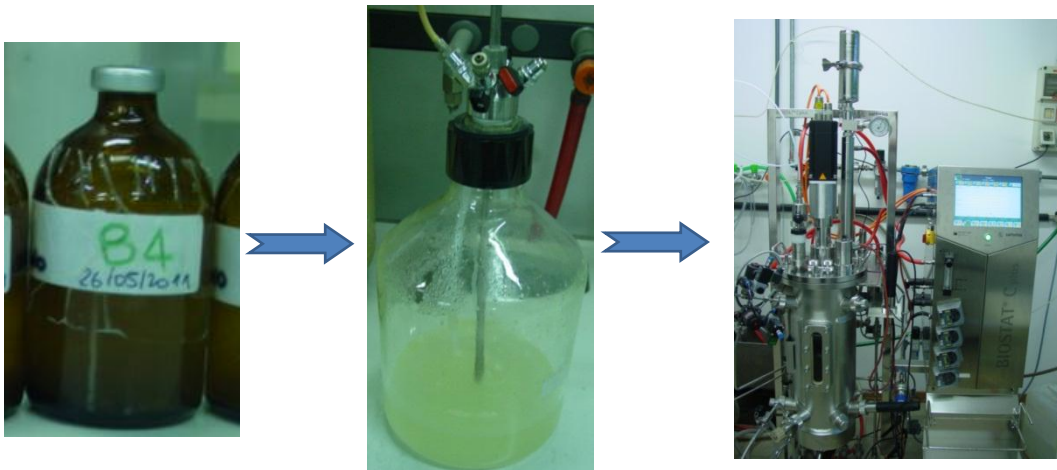
Velocità specifiche TCE e TeCA presenza di inibizione



Dal grafico ad istogramma, che riporta le velocità di rimozione normalizzate rispetto alla concentrazione, si nota che il microcosmo r-B4-Biomax mostra delle performance degradative maggiori rispetto agli altri. Questo è da imputare probabilmente alla maggiore quantità di biomassa adesa sui supporti. Si lascia a prove a flusso sull'impianto la conferma di questa prima rudimentale analisi.

7.3- Coltivazione del consorzio per la colonizzazione delle colonne a letto impaccato

Dato che la quantità di biomassa presente nel microcosmo è insufficiente per operare la colonizzazione delle colonne impaccate, si è proceduto ad una coltivazione della biomassa in un fermentatore Sartorius fed-batch, passando per una fase intermedia costituita da un reattore in pyrex da 5 L.



Le due successive coltivazioni sono state condotte in ambiente termostato a 30°C, in cui insieme al substrato primario sono stati aggiunti anche i due solventi clorurati. L'aggiunta dei solventi è stata fatta allo scopo di ricreare un ambiente simile a quello in cui si è sviluppato il consorzio originario nel corso delle prove. Obiettivo della fase intermedia è quello di ottenere un pre-inoculo a volume e concentrazione maggiori rispetto al microcosmo di partenza, per agevolare la successiva coltivazione nel fermentatore.

7.3.1 Coltivazione del pre-inoculo nella bottiglia da 5 L

Il reattore fed-batch è costituito da una bottiglia in pyrex del volume totale di 5 L, munita di un tappo attrezzato da cui è possibile effettuare prelievi ed aggiunte, senza contaminare l'ambiente interno. Il tappo presenta 5 porte di campionamento, di cui due pescanti nel liquido: l'una attraverso un tubo di teflon che permette il prelievo della biomassa e l'altra attraverso un tubo in acciaio per il gorgogliamento di aria all'interno della bottiglia. Le restanti 3 porte servono ad eseguire rispettivamente aggiunte di: solventi clorurati, Butano e prelievi per le analisi gas-cromatografiche.

L'allestimento del reattore è stato eseguito sterilizzando in autoclave il recipiente insieme a 1,35 L di terreno minimo preparato precedentemente. Si è effettuato quindi l'inoculo dello stesso utilizzando 150 mL, ottenuto dall'unione del contenuto dei 3 microcosmi r-B4-a, r-B4-b e r-B4-s. Al reattore così allestito, sono stati somministrati una serie di pulsii di substrato primario, di TCE e di TeCA, monitorando giornalmente l'avvenuta rimozione dei composti. Ogni volta che si è verificato il completo consumo del pulso di substrato primario e prima della somministrazione del successivo, si effettuava un gorgogliamento in aria per evitare che l'ossigeno diventasse l'elemento limitante del processo di crescita. L'effettivo aumento di biomassa all'interno del reattore è stato monitorato qualitativamente attraverso analisi di densità ottica, eseguite con uno spettrofotometro UV-vis ($\lambda = 600\text{nm}$). Dopo che la biomassa ha rimosso 6 pulsii di Butano è stata inoculata nel fermentatore per la successiva coltivazione.

7.3.2 Coltivazione della biomassa nel fermentatore Sartorius

Allo scopo di produrre una significativa quantità di inoculo per la colonizzazione delle colonne a flusso, si è usato un fermentatore in acciaio inox il cui settaggio dei parametri d'esercizio è automatizzato. La messa in esercizio del fermentatore, ha visto l'implementazione di un polmone esterno in Teflon comunicante con lo spazio di testa del reattore (Immagine 7. 6). Questo si è reso necessario per aumentare il volume dello spazio di testa e quindi le riserve di substrato primario, che altrimenti sarebbe terminato nei periodi in cui non è stata possibile operarne la riaggiunta (orari notturni e giorni non lavorativi). La crescita della biomassa è stata seguita attraverso misure di densità ottica, ottenendo valori considerevolmente più alti rispetto alla crescita nella bottiglia da 5 L. Dato l'elevato volume del polmone allestito e di conseguenza la quantità di butano aggiunta, non si è riusciti a monitorare l'effettivo consumo del substrato da parte della coltura.

Immagine 7. 6 Complesso delle apparecchiature utilizzate per condurre la coltivazione della biomassa



Capitolo 8

Conversione abiotica del TeCA in TCE

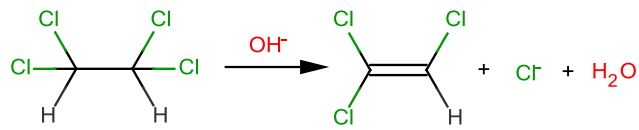
Nei test cinetici minimi di degradazione aerobica cometabolica, risulta evidente come il consorzio batterico B4 da noi selezionato, presenta una velocità di rimozione specifica del TeCA di due ordini di grandezza inferiore rispetto a quella del TCE. È ovvio quindi che sarà la cinetica di rimozione del TeCA a guidare il futuro dimensionamento di un reattore biologico, essendo lo “stadio lento” di questo processo. Per ottimizzare e rendere più efficiente la rimozione dei due clorurati, si propone di strutturare un sistema sequenziale che preveda un pretrattamento chimico in modo da convertire il più recalcitrante TeCA nel TCE²².

La reazione di conversione del TeCA è una tipica eliminazione di tipo E2, che avviene in ambiente fortemente basico in fase omogenea, il cui meccanismo risulta concertato. Un'eliminazione E2 (Schema 8. 1) avviene senza la formazione di intermedi e consiste nell'azione di una base (OH⁻) che strappa il protone acidificato dalla presenza degli atomi di Cloro; gli elettroni del legame C-H si spostano a formare il doppio legame e ad allontanare lo ione cloruro (Cl⁻) visto che è un ottimo gruppo uscente.

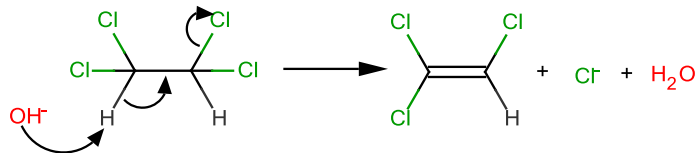
La cinetica della reazione, come riportato in letteratura (Jones et al. 1995)²³, risulta essere del secondo ordine e quindi dipendente dalle concentrazioni del TeCA e dello ione ossidrile presenti in soluzione, secondo la seguente relazione:

$$\frac{dC_{TeCA}}{dt} = -k \cdot [TeCA] \cdot [OH^-] \quad [8.1]$$

Schema 8. 1 Reazione di conversione del TeCA in TCE



Meccanismo:



Mantenendo il pH ad un valore costante, si può inglobare la concentrazione dello ione ossidrile nel valore della costante (k^*), semplificando la relazione ad una cinetica del primo ordine:

$$\frac{dC_{TeCA}}{dt} = -k^* \cdot [TeCA] \quad \text{con} \quad k^* = k [OH^-] \quad [8.2]$$

dove:

k^* è la costante cinetica per un valore di pH fissato.

La dipendenza della costante cinetica k dalla temperatura è data dall'equazione di Arrhenius:

$$k = A \cdot e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad [8.3]$$

dove:

A è la costante di Arrhenius

E_a è l'energia di attivazione della reazione

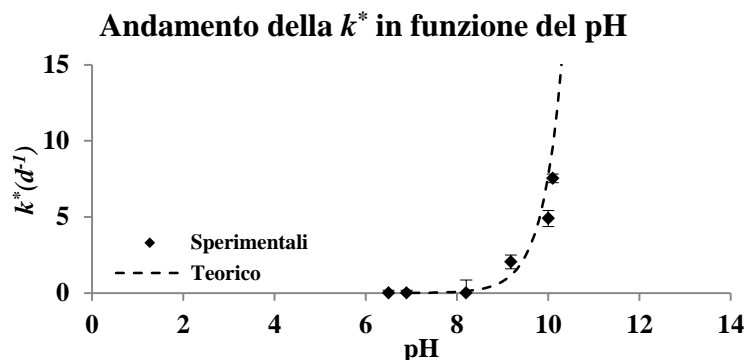
Per la reazione di conversione del TeCA in TCE, i valori di A e di E_a sono stati determinati sperimentalmente nello studio proposto da Cooper e collaboratori²⁴, e valgono $\log A = 15,87 \text{ L/mol s}$; $E_a = 91,1 \text{ KJ/mol}$.

Con i dati sperimentali trovati da Cooper et al. si grafica la curva di k^* al variare del pH secondo la relazione:

$$k^*(pH) = 10^{(pH-14)} \cdot k_{T=30^\circ C} \quad [8.4]$$

L'andamento di tale curva è rappresentato dalla linea tratteggiata nel Grafico 8. 1. Partendo da queste considerazioni si sono approntate delle prove di laboratorio al fine di verificare la ripetibilità del processo descritto nello studio di Cooper et al. (1995). Si sono preparate sei prove di conversione in batch a diversi valori di pH. Ogni prova è stata eseguita in triplicato mantenendo il pH delle soluzioni ad un valore costante attraverso l'utilizzo di tamponi. Sono stati effettuati pulsi di TeCA tali da avere una concentrazione nel liquido pari a 8 mg/L e monitorandone a brevi istanti di tempo la conversione. I risultati delle costanti cinetiche determinate come media delle tre prove per ogni pH, sono stati riportati nel Grafico 8. 1 in funzione del pH insieme alle deviazioni standard calcolate.

Grafico 8. 1 Grafico comparativo della curva teorica (determinata da Cooper et al.) con i valori sperimentali rilevati in laboratorio



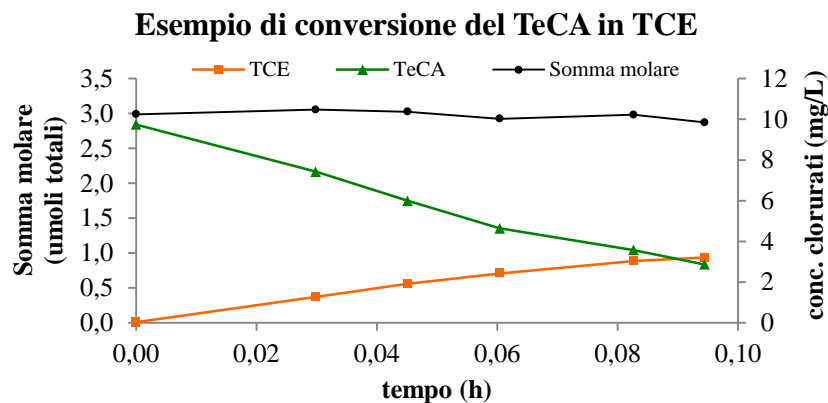
Nella Tabella 8. 1 si riportano, ad ogni valore di pH, le tre costanti cinetiche sperimentali, sulle quali sono state calcolate le rispettive medie e le deviazioni standard.

Tabella 8. 1 Valori delle costanti cinetiche della conversione del TeCA delle prove effettuate

k^* (d ⁻¹)	pH=6,5	pH=6,9	pH=8,2	pH=9,2	pH=10	pH=10,1
1	0	0	0	1,5	5,2	7,2
2	0	0	0	2,2	4,3	7,7
3	0	0	0	2,4	5,2	7,7
Media	0	0	0	2,0	4,9	7,5
Dev. Std.	0	0	0	0,5	0,5	0,3

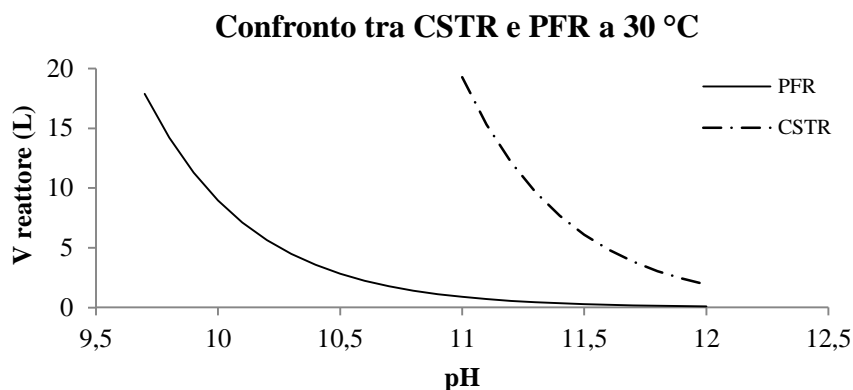
Nel Grafico 8. 2 invece si riporta un esempio dell'andamento delle concentrazioni nel tempo di TeCA e TCE durante la reazione di conversione. La retta in nero rappresenta la somma molare totale del TeCA e del TCE (riferita sia alla fase gas che a quella liquida). È da notare il fatto che la retta risulta costante nel tempo, a testimonianza del fatto che la reazione è equimolare, cioè per ogni mole di reagente che si converte se ne forma una di prodotto.

Grafico 8. 2 Andamento delle concentrazioni di TeCA e TCE durante la conversione e della somma molare a pH = 10,1



I dati ottenuti dalle prove effettuate si sono dimostrati coerenti con i risultati descritti nello studio fatto da Cooper et al.. Pertanto, nell'ottica di implementare un reattore su scala di laboratorio in testa alle colonne impaccate, si è effettuato un dimensionamento di massima per confrontare due diverse tipologie: un CSTR (Continuous Stirred Tank Reactor) ed un PFR (Plug Flow Reactor). Come specifiche di progetto sono state impostate: una conversione del TeCA del $X_{TeCA}=99\%$ ed una portata volumetrica pari a $\dot{V} = 15 \text{ L/d}$. La portata volumetrica è stata scelta per garantire l'alimentazione di una giornata intera evitando l'esaurimento delle sacche di alimentazione visto che la loro capacità è di 20 L. Nel Grafico 8. 3 vengono riportati i volumi dei due reattori in funzione del pH utilizzato. I calcoli sono stati effettuati sfruttando le costanti trovate nello studio di Cooper et al. e ad una temperatura di 30°C.

Grafico 8. 3 Volumi dei reattori PFR e CSTR necessari per la conversione del 99% del TeCA in ingresso a vari valori di pH



Come si evince dal grafico, a parità di pH, il volume di un PFR risulta avere un valore molto inferiore rispetto a quello del CSTR. In linea di principio sarebbe meglio lavorare a più bassi valori di pH, per evitare un'eccessiva alterazione idrochimica della soluzione alimentata, dovuta ai trattamenti di alcalinizzazione e successiva acidificazione che il processo richiede. Inoltre, dovendo dimensionare un reattore su scala di laboratorio, avente quindi un range di volumi che varia da 1L a 10L, il PFR risulta comunque essere il più adatto. Nell'ottica invece di dimensionare un reattore in scala reale, si deve prevedere un conto economico basato sull'intersezione delle funzioni dei costi dell'impianto e dei costi delle materie prime usate per regolare il pH. Visto che la funzione dei costi in funzione del volume dell'impianto è decrescente, mentre la funzione dei costi delle materie prime è crescente, la loro intersezione genererà un punto di minimo in cui verranno identificati un valore di pH e di volume tali da minimizzare i costi relativi a questo processo.

Capitolo 9

Allestimento di bioreattori a letto impaccato e prove fluidodinamiche

L'obiettivo dell'allestimento di un bioreattore in scala di laboratorio è quello di testare il processo cometabolico di degradazione dei solventi clorurati in condizioni analoghe (condizioni di flusso e biomassa adesa) a quelle che si realizzeranno nel reattore a scala reale.

Questo ha lo scopo di determinare i parametri che descrivono la cinetica di rimozione dei substrati e di mettere a punto una tecnica di alimentazione che renda il processo oltre che efficace, anche efficiente dal punto di vista del consumo di substrato primario. Lo studio delle diverse modalità di alimentazione dei substrati al reattore è necessario per evitare le criticità dell'implementazione dei processi biologici ai reattori a biomassa adesa (crescita massiva del biofilm nella parte iniziale del reattore ed intasamento delle macroporosità, non completa colonizzazione della colonna da parte della biomassa).

L'allestimento dei quattro diversi bioreattori a letto impaccato, si è reso necessario per testare, in condizioni di flusso, quale dei quattro supporti a nostra disposizione sia meglio colonizzabile dalla biomassa. Per far ciò è necessario poter disporre di un modello fluidodinamico che ci permetta di simulare, lungo la colonna, il profilo di concentrazione dei soluti presenti nella corrente liquida. La colonna impaccata quindi viene modellata come un mezzo poroso costituito dal riempimento dei supporti disposti alla rinfusa.

Lo studio condotto durante il periodo di tesi ha riguardato oltre che l'allestimento dell'impianto pilota, anche la realizzazione di prove fluidodinamiche preliminari per la stima di parametri del modello che descrive il profilo di concentrazione dei soluti lungo i quattro reattori.

9.1- Allestimento dell'impianto

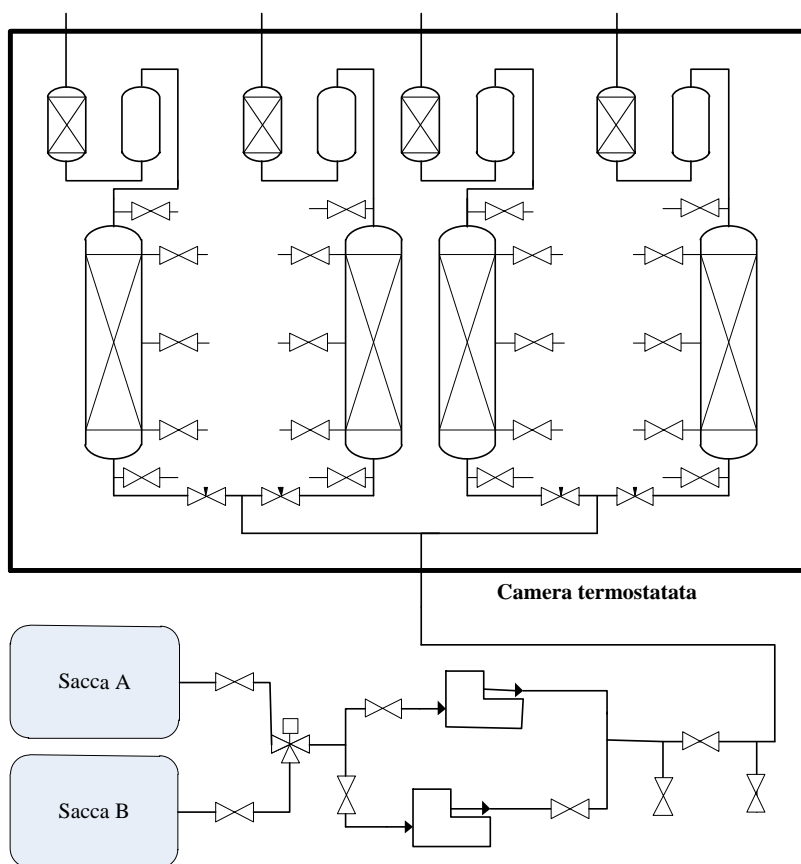
L'impianto è costituito da quattro colonne in vetro, impaccate ognuna con un diverso carrier e connesse ad un sistema di alimentazione comune, per mezzo di tubi e raccordi in acciaio inox dal diametro interno di 3mm. Si è scelto di utilizzare l'acciaio per minimizzare i fenomeni di adsorbimento e di permeazione delle diverse sostanze presenti in soluzione. Il sistema è inoltre dotato di valvole a sfera, opportunamente attrezzate, per facilitare il campionamento e per verificare le concentrazioni delle correnti lungo le colonne. A valle di ogni colonna è stato posto un filtro a carboni attivi per trattare la corrente in uscita prima dello scarico in fognatura. Ognuno dei quattro reattori sono collegati ad un insieme di apparati che permettono la realizzazione di diverse modalità di alimentazione (continua e a pulsii) dei diversi soluti. Nella fase sperimentale, dovendo alimentare soluzioni con concentrazioni di composto fissate, si è scelto di utilizzare, come serbatoi di alimentazione, delle sacche realizzate in materiale polimerico. In questo modo, durante l'alimentazione della soluzione al reattore, nella sacca non viene a crearsi uno spazio di testa, il quale

Immagine 9. 1 Allestimento dei reattori a colonna impaccati e sistema di trattamento con carboni attivi



determinerebbe una variazione di concentrazione del soluto nel liquido. Sono state scelte delle sacche in LDPE (polietilene a bassa densità) a tenuta gas-liquido della capienza di 20 L e ad elevata compatibilità chimica per le sostanze prese in esame. Le soluzioni vengono alimentate nel reattore a colonna tramite due pompe peristaltiche Masterflex, passando attraverso un'elettrovalvola a tre vie, che permette di cambiare la fonte di alimentazione ai reattori dalle diverse sacche.

Schema 9. 1 Schema di allestimento dei quattro reattori a colonna



9.1.1 I reattori a colonna impaccata

Le colonne impaccate sono costituite da quattro cilindri in vetro di altezza complessiva pari a 50 cm e dal diametro interno pari a 4,7 cm. Ogni colonna è dotata, alle estremità superiore ed inferiore, di due filettature su cui sono fissati dei tappi in plastica forniti di setti in teflon. I tappi sono stati forati per permettere

il fissaggio di un raccordo in acciaio, necessario alla connessione con il resto dell'impianto. Lungo l'asse verticale delle colonne sono presenti tre porte di campionamento costituite da attacchi filettati, chiusi da tappi forati, in cui sono inseriti raccordi in acciaio e nei quali è stato saldato un ago in acciaio con un tubo in Norprene per il prelievo dei campioni (Immagine 9. 2).

I diversi supporti utilizzati per la crescita del biofilm batterico, sono dei comuni supporti utilizzati come filtri biologici per acquari. In particolare sono costituiti da tre tipologie di elementi ceramici, registrati commercialmente col nome Biomax[®], Biomech[®] e Cerambios[®] ed un elemento sferico in vetro sinterizzato registrato commercialmente con il nome di Biopearl[®]. Questi sono posti in maniera casuale all'interno del reattore, determinando una porosità efficace che si è valutata nelle prove sotto descritte.

9.1.2 Il sistema di alimentazione

Il sistema di alimentazione è comune per tutti e quattro i reattori, ed è assicurata tramite l'utilizzo di una pompa peristaltica. Vista la limitata capacità delle sacche, per evitare un'interruzione del flusso nei periodi in cui non sarà possibile assicurare la presenza di un operatore, è stato deciso di allestire sull'impianto di una seconda pompa in parallelo alla prima, settata ad un più basso valore di portata. Questa pompa entrerà in funzione quando l'impianto sarà portato a regime e saranno effettuati i test di degradazione. Nell'Immagine 9. 3 si evidenzia l'allestimento delle due pompe che alimentano i reattori. Dato che le prove fluidodinamiche richiedono un repentino

Immagine 9. 2 Particolare dell'allestimento delle porte laterali e dell'uscita del reattore



Immagine 9. 3 Particolare dell'alimentazione: pompe ed elettrovalvola



cambio dell'origine di alimentazione è stata inserita, prima delle pompe, un'elettrovalvola a tre vie che permette lo switch.

Immagine 9. 4 Schema d'allestimento delle sacche di alimentazione



Le sacche utilizzate sono della capienza di 20 L ciascuna, a tenuta gas e liquidi, il cui involucro interno è realizzato in LPDE (Polietilene a bassa densità), un materiale ad elevata compatibilità chimica verso i solventi clorurati oggetto di studio. Queste sacche sono dotate di tre tubi in C.FLEX di cui, due attrezzati con rubinetti a sfera in acciaio ed uno munito di un setto per poter prelevare campioni ed immettere le sostanze oggetto di studio. All'interno delle sacche sono state poste 2 ancorette magnetiche per realizzare

l'agitazione necessaria ad una completa miscelazione della soluzione. Le sacche sono state poi adagiate in carrelli dotati di un letto di gomma-piuma per evitarne il danneggiamento durante le operazioni di movimentazione (vedi Immagine 9. 4). Dovendo alimentare, durante i test fluidodinamici ai reattori a colonna, soluzioni acquose di TCE e di TeCA a concentrazioni costanti, si è reso necessario condizionare le sacche per evitarne fenomeni di assorbimento. Tale operazione consiste nel monitoraggio e nella verifica che la concentrazione del solvente clorurato resti costante nel tempo. I grafici 9.1 e 9.2 mostrano il monitoraggio delle sacche dai quali si evince che è avvenuto il condizionamento, data la stabilità della concentrazione dei soluti all'interno della sacca.

Grafico 9.1 Andamento della concentrazione del TCE presente dentro la sacca nel tempo

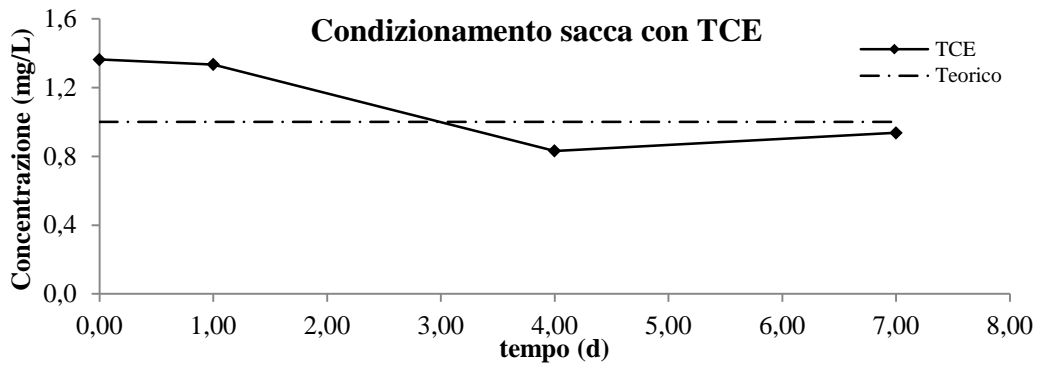
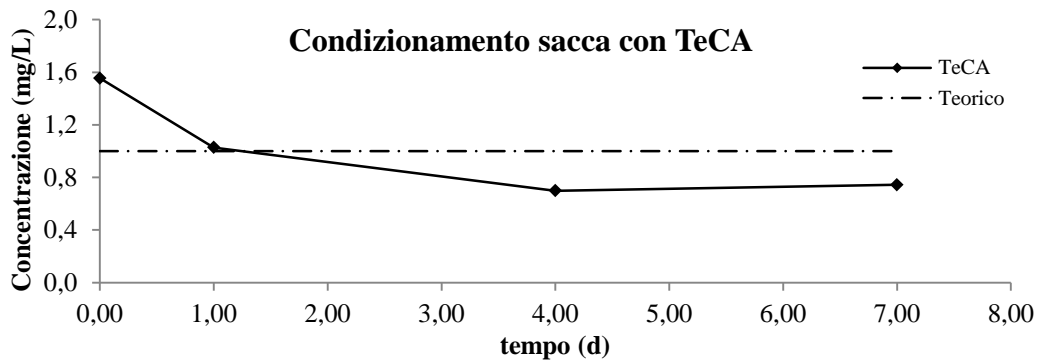


Grafico 9.2 Andamento della concentrazione del TeCA presenta nella sacca nel tempo



9.2- Il modello fluidodinamico

Si è già detto che, avere a disposizione un soddisfacente modello del comportamento fluidodinamico dei soluti all'interno del sistema a flusso, è di fondamentale importanza al fine di poter interpretare ed analizzare i risultati delle future prove di consumo del substrato primario e di biodegradazione dei solventi clorurati. I soluti dissolti nell'acqua di una corrente che attraversa un mezzo poroso, rappresentato dai supporti delle colonne, sono soggetti a diversi meccanismi di trasporto e da diversi meccanismi di rimozione.

Il profilo di concentrazione che si instaura all'interno delle colonne è descritto matematicamente da un'equazione differenziale detta "equazione della corrente monodimensionale", che deriva da un bilancio di massa su una sezione infinitesima del reattore, tenendo conto dei meccanismi di trasporto e rimozione.

9.2.1 Trasporto di soluti in un mezzo poroso

Le colonne impaccate che si vogliono studiare sono rappresentabili come mezzi porosi saturi, in cui si muove un fluido (acqua) con moto laminare.

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

$$u = -k_c \frac{\Delta h}{\Delta l} = \frac{Q}{A} \quad [9.1]$$

dove:

u è la velocità media superficiale

k_c è la conducibilità idraulica del terreno

$\Delta h/\Delta l$ è il rapporto tra le perdite di carico e la lunghezza del tratto in esame

Q è la portata volumetrica del fluido

A è la sezione di passaggio

Inoltre, la velocità media superficiale non è quella reale, poichè occorre considerare l'effettiva sezione di passaggio che deve tener conto della porosità del mezzo, secondo la relazione:

$$v = \frac{Q}{(\phi_e \cdot A)} = \frac{u}{\phi_e} \quad [9.2]$$

dove:

v è la velocità interstiziale

ϕ_e è porosità efficace del mezzo poroso.

9.2.2 Trasporto di materia

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

Trasporto convettivo

Il trasporto convettivo avviene con la velocità del fluido e dipende dalla concentrazione locale del soluto in fase liquida C_i , vale quindi la relazione:

$$F = q \cdot C_i \quad [9.3]$$

dove:

F è il flusso convettivo specifico del componente i

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 prima legge di Fick su una generica direzione k otteniamo un'espressione per il flusso diffusivo F_{ik} [mol/m²/s]:

$$F_{ik} = -D \cdot \frac{\partial C_i}{\partial x_k} \quad [9.4]$$

dove:

D è il coefficiente di diffusione del componente i nel fluido.

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:

$$F_{ik} = -D_{pm} \cdot \frac{\partial C_i}{\partial x_k} \quad \text{con} \quad D_{pm} = \omega \cdot D \quad [9.5]$$

dove:

ω è il coefficiente di tortuosità

Dispersione meccanica

L'acqua contenente un soluto che scorre in un mezzo poroso viaggia a diverse velocità; questo implica che non tutte le particelle si muovono allo stesso modo: alcune sono anticipate o ritardate rispetto al moto principale, mentre altre sono deviate in direzione trasversale. 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 *pistoni di fluido* che si muovono con fronti differenti.

L'effetto sia della dispersione meccanica che della diffusione molecolare viene descritto da una relazione tipo Fick. Lungo la direzione principale del flusso la diffusività è sostituita da un coefficiente D_L (detto di *dispersione longitudinale*) che tiene conto di entrambi i meccanismi:

$$F_L = -D_L \cdot \frac{\partial C_i}{\partial x_L} \quad \text{con} \quad D_L = D_{pm} + \alpha_L \cdot v \quad [9.6]$$

dove:

D_{pm} è la diffusività del composto nel mezzo poroso

α_L è la dispersività dinamica longitudinale

v è la velocità interstiziale del soluto

lungo una qualunque direzione perpendicolare a quella principale, invece, si definisce la dispersività dinamica trasversale α_T , ottenendo la relazione:

$$F_T = -D_T \cdot \frac{\partial C_i}{\partial x_T} \quad \text{con} \quad D_T = D_{pm} + \alpha_T \cdot v \quad [9.7]$$

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

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} = -v_x \cdot \frac{\partial C_i}{\partial x} + D_L \cdot \frac{\partial^2 C_i}{\partial x^2} + D_T \cdot \left(\frac{\partial^2 C_i}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 C_i}{\partial z^2} \right) \quad [9.8]$$

Nel caso di trasporto unidimensionale in direzione x , cioè quando le variazioni della concentrazione del soluto nelle direzioni y e z sono trascurabili, l'equazione 9.8 diventa:

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} = -v_x \cdot \frac{\partial C_i}{\partial x} + D_L \cdot \frac{\partial^2 C_i}{\partial x^2} \quad [9.9]$$

detta anche equazione del flusso a pistone con dispersione assiale.

9.3- Stima delle incognite del modello fluidodinamico

Considerate le basi teoriche del nostro modello fluidodinamico, risulta necessaria la stima dei parametri incogniti Φ_e (porosità efficace) e α_L (coefficiente di dispersività longitudinale), per determinare rispettivamente la velocità media interstiziale v_x ed il coefficiente di dispersione longitudinale D_L .

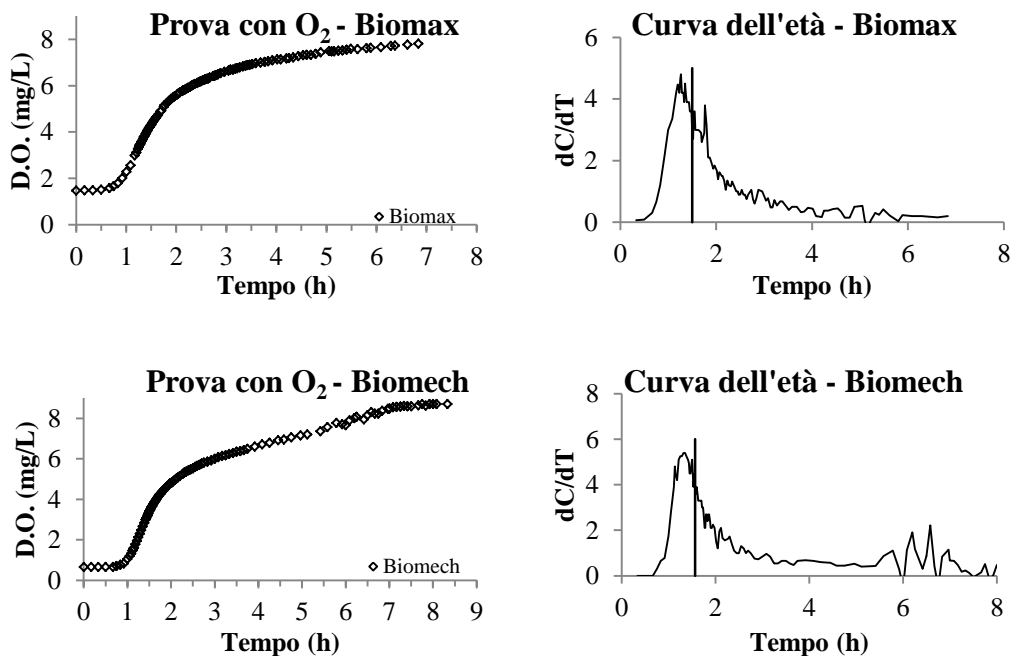
I due coefficienti, come si può vedere nell'equazione 9.9, sono direttamente correlati e quindi non direttamente determinabili. Nel nostro caso il percorso seguito si è basato innanzitutto sulla stima della porosità efficace Φ_e , realizzata attraverso l'analisi dei risultati di pulsi detti "a gradino" eseguiti sulle colonne. La valutazione prosegue poi con la determinazione della dispersività longitudinale α_L effettuata (mantenendo fissa la porosità efficace trovata precedentemente) attraverso l'elaborazione al computer del profilo del pulso effettuato. Questa elaborazione è eseguita tramite il codice di calcolo Comsol-Multiphysics che permette la simulazione dei dati sperimentali.

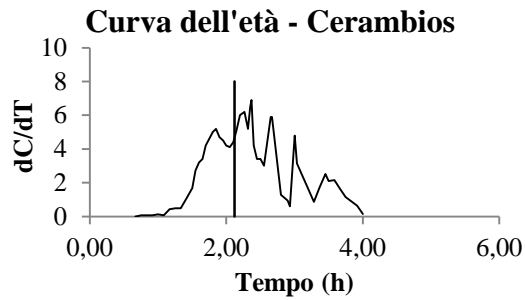
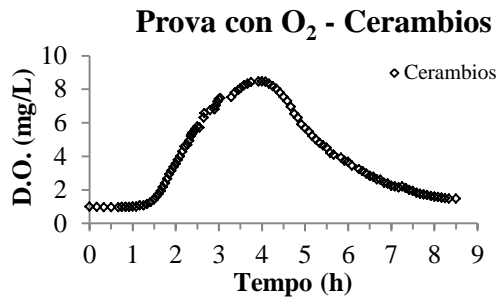
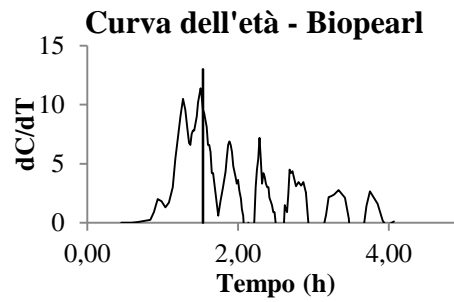
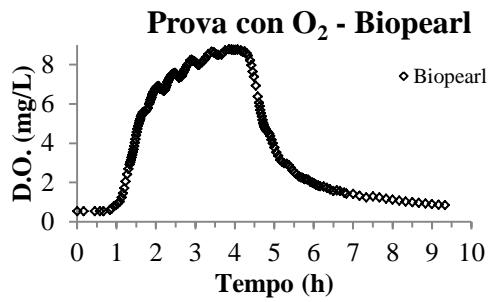
9.3.1 Calcolo della porosità efficace ϕ_e

La stima della porosità efficace è stata eseguita per ogni tipologia di supporto nella stessa modalità, secondo la seguente procedura. L'operazione inizia flussando nelle colonne impaccate acqua priva di ossigeno e monitorandone periodicamente le concentrazioni in uscita. Tramite l'elettrovalvola, si cambia repentinamente l'alimentazione passando dalla sacca deossigenata alla sacca contenente la soluzione acquosa dell'ossigeno. Si inizia quindi a monitorare la concentrazione in uscita osservandone l'evoluzione nel tempo. In generale, si assiste ad un aumento graduale della concentrazione in uscita fino ad un valore pari a quello in ingresso. Raggiunto tale valore si effettua un ulteriore switch dell'alimentazione, passando dalla sacca contenente la soluzione in cui è presente il soluto a quella che ne è priva, monitorandone quindi l'evoluzione di quello che è detto "contro gradino". Il monitoraggio del contro gradino non è stato possibile per tutte le prove, in quanto nel caso delle colonne impaccate con i supporti Biomax e Biomech, l'operazione sarebbe risultata eccessivamente lunga.

Riportando in un grafico la concentrazione dell'ossigeno in funzione del tempo, si ottengono, dove è stato possibile farlo, due sigmoidi. Dal primo dei due sigmoidi, cioè per concentrazioni crescenti di ossigeno, si ricava la derivata del grafico ottenendo così una gaussiana asimmetrica. Questo tipo di curva è chiamata “curva dell'età” ed è una funzione di probabilità che descrive la quantità di tempo di un elemento di fluido che può spendere all'interno del reattore. Il valore dell'ascissa che divide in due parti uguali l'area sottesa dalla curva, rappresenta il tempo medio di permanenza τ (o tempo di riempimento) di una particella all'interno di quello specifico reattore. Per la determinazione del coefficiente di porosità efficace si è applicata così l'equazione 9. 2, impostando come valore di velocità interstiziale il rapporto tra la lunghezza totale del reattore ed il tempo medio di permanenza determinato e come area la sezione della colonna. Di seguito vengono riportati i grafici dei pulsii a gradino per l'ossigeno (Grafico 9. 3 a sinistra) ed i grafici delle età dei fluidi comprensivi del tempo medio di permanenza (**Grafico 9. 3 a destra**).

Grafico 9. 3 a sinistra: Grafici dei pulsii a gradino per l'ossigeno; a destra: curve gaussiane ricavate dalla derivata dei grafici dei pulsii.





Nella Tabella 9. 1 vengono invece riportati i valori di velocità interstiziale calcolati insieme alla stima della porosità efficace.

Tabella 9. 1 Parametri della prova del pulso a gradino, valori di velocità interstiziale e porosità efficace

	Q (cm ³ /h)	Δt (h)	Δz (cm)	vx (cm/h)	Φe (-)
Biomax	346,8	1,5	62,19	41,46	0,48
Biomech	351,6	1,57	62,19	39,61146	0,51
Biopearl	367,2	1,53	62,19	40,64706	0,52
Cerambios	319,2	2,12	62,19	29,33491	0,63

9.3.2 Valutazione del coefficiente di dispersività longitudinale α_L

Nel moto di un soluto in un mezzo poroso, come già specificato nella descrizione del modello fluidodinamico, intervengono diversi fenomeni di trasporto di materia tra cui la dispersione meccanica e la diffusione molecolare, entrambi fenomeni diffusivi, descritti da una relazione tipo Fick.

Nelle future prove si determineranno i valori di dispersività dinamica longitudinale attraverso la simulazione al calcolatore del pulso a gradino

effettuato per la determinazione della porosità efficace. In particolare la simulazione è basata sul modello detto del flusso a pistone con dispersione assiale, in assenza di reazione (vedi equazione 9.9). Visto che la simulazione si riferisce alla prova sperimentale, è possibile sfruttare il dato di velocità interstiziale per esplicitare il valore del coefficiente di dispersione longitudinale.

Capitolo 10

Conclusioni

Durante il periodo del mio tirocinio, è stata studiata una tecnica per il trattamento di due inquinanti clorurati, il TCE ed il TeCA, presenti nelle acque di falda di un sito contaminato a Rho (Mi).

Il lavoro di tesi è stato diviso in due sezioni: la prima sezione è dedicata alla selezione e lo sviluppo di un consorzio batterico indigeno avente spiccate capacità degradative nei confronti dei solventi clorurati oggetto di studio; la seconda parte è stata dedicata all'allestimento di bioreattori a colonne impaccate (PBRs) e la conduzione di prove fluidodinamiche sugli inquinanti.

La prima parte del lavoro, ha visto la selezione dei batteri indigeni deputati alla degradazione, tramite la somministrazione del substrato primario di crescita, in compresenza coi due solventi clorurati. A questo scopo si sono allestiti 20 microcosmi contenenti le quattro acque campionate più una miscela equivolometrica delle stesse, suddivise per i substrati primari testati: Metano, Propano, Butano e Pentano. Delle colture primarie preparate, si sono selezionati i due migliori microcosmi in termini di capacità degradative dei solventi clorurati per ogni acqua campionata. Su di essi si sono effettuati test cinetici "minimi", che hanno portato alla designazione del Butano come il substrato di crescita di batteri che permettono una più efficiente degradazione dei solventi clorurati. Effettuando un'ulteriore test cinetico sui due microcosmi Butano-ossidanti scelti, è stato poi identificato nel B4 il consorzio destinato alla colonizzazione dei reattori a colonna. Dai test cinetici si è osservato che il consorzio è in grado di rimuovere facilmente il tricloroetilene ($r_{TCE} = 120 \pm 24,6 \text{ L g}_{\text{prot}}^{-1} \text{d}^{-1}$), mentre non altrettanto

agevolmente il TeCA ($r_{TeCA} = 2,3 \pm 0,6 \text{ L g}_{\text{prot}}^{-1} \text{d}^{-1}$); questo ha portato il gruppo di ricerca ad escogitare una via alternativa per l'abbattimento di tale inquinante. Da una ricerca bibliografica è emerso che, in ambiente fortemente basico, il TeCA viene convertito molto velocemente in TCE. Pertanto nello sviluppo del futuro reattore pilota che verrà costruito, si è proposto di effettuare un pretrattamento basico dell'acqua per l'abbattimento del TeCA molto più recalcitrante alla degradazione biologica.

La seconda parte del lavoro di tesi, come detto precedentemente, ha riguardato l'allestimento di un impianto composto da quattro reattori a colonne impaccate con differenti supporti porosi. Lo scopo dell'allestimento, è di capire quale supporto sia meglio colonizzabile dalla biomassa in modo da creare uno strato più spesso di biofilm, aumentando l'efficienza del processo degradativo. Oltre a questo, sono state condotte anche delle prove che hanno portato alla determinazione di uno dei parametri fondamentali nello sviluppo del modello fluidodinamico, che permette di capire il profilo di concentrazione dei soluti (Butano e TCE) lungo le colonne. Si sono quindi stimate le porosità efficaci ϕ_e nei quattro reattori, effettuando una rielaborazione dei dati ottenuti dalla pulsazione a gradino di una soluzione a concentrazione nota di ossigeno disciolto nella fase acquosa. La misura della porosità efficace è necessaria per esplicitare la velocità interstiziale v_x presente come incognita nel modello fluidodinamico. L'ulteriore parametro da stimare è il coefficiente di dispersività longitudinale α_L , ottenuto attraverso un'elaborazione al calcolatore del modello di flusso a pistone con dispersione assiale impostato nelle stesse condizioni sperimentali dei pulsati ad ossigeno; in tal modo la velocità interstiziale è conosciuta e permette di ottenere il valore desiderato. La stima della dispersività longitudinale è necessaria per la determinazione del coefficiente di dispersione idraulica D_L presente nel modello fluidodinamico.

Alla luce dei risultati ottenuti, in futuro sarà sicuramente effettuata la simulazione dei pulsati a gradino dell'ossigeno per la determinazione dell'ultimo parametro del modello fluidodinamico. Si dovrà quindi effettuare uno studio in maniera più approfondita della cinetica della degradazione cometabolica del TCE, in modo tale da esplicitare parametri quali: velocità specifica di degradazione q_{max} , costante

di affinità K_s , capacità di trasformazione T_c , costante di inibizione da substrato primario $k_{i,s}$ dei composti implicati nel processo. Tali parametri, inseriti nelle rispettive equazioni cinetiche forniranno i valori delle velocità di reazione, le quali saranno poi inglobate nel modello fluidodinamico. L'unione dei due contributi descriverà i profili di concentrazione lungo le colonne dei composti implicati. È molto importante conoscere tali parametri e la stima dei vari comportamenti perché, grazie a questi, si potranno testare e conseguentemente ottimizzare una modalità di alimentazione che minimizzerà i problemi legati al cometabolismo (metabolismo endogeno dei solventi clorurati, carenza di sostanze riducenti etc.), rendendo il processo molto più efficiente. Nell'ottica di effettuare uno scale-up su scala reale, si dovrà testare il processo degradativo ad una temperatura consona a quella di una generica falda acquifera, cioè a circa 15 °C. Considerato il metabolismo aerobico dei batteri, l'acqua di falda dovrà essere arricchita in ossigeno perché, soprattutto nelle zone più profonde, ci saranno condizioni di pseudo anaerobiosi. Si dovrà quindi studiare una tecnica di dissoluzione dell'ossigeno nell'acqua, prima che essa venga alimentata al reattore biologico. Effettuando infatti un gorgogliamento in aria, la rimozione dei solventi clorurati avviene soprattutto per strippaggio, mentre è solo secondario l'effetto di innalzamento delle concentrazioni di ossigeno in falda e quindi la stimolazione dei fenomeni di biodegradazione. Un esempio plausibile può essere l'utilizzo di ORC (Oxygen Release Compound), composti a base di perossidi presenti in matrici cementizie in grado di ridursi e fornire al liquido una adeguata quantità di ossigeno.

Bibliografia e sitografia

- 1: (D.Lgs. N_152 del 03/04/2006).
- 2: <http://legxv.camera.it/parlam/leggi/deleghe/06152dl.html>.
- 3: US EPA (2000) Engineered approaches to In Situ bioremediation of chlorinated solvents: fundamentals and field application.
- 4: Bradley P. (2000) Microbial degradation of chloroethenes in groundwater system. *Hydrogeology Journal*. 8: 104-111.
- 5: Hsiao, Lung, Chang, Alvarez-Cohen, Model for the cometabolic Biodegradation of Chlorinated Organics, *Environ. Sci. Technol.* 1995, 29: 2357-2367.
- 6: Alvarez-Cohen L., McCarty P.L., (1991) A cometabolic biotrasformation model for halogenated aliphatic compounds exhibiting product toxicity. *Environmental Science and Technology*. Vol 25, N.8: 1381-1387.
- 7 Alleman, J.E., Prakasam, T.B.S., 1983. Reflections on seven decades of activated sludge history. *J. Water. Pollut. Control. Fed.* 55 (5), 436-443.
- 8 Rajbir Singh, Debarati Paul, Rakesh K. Jain, (2006). Biofilms: implications in bioremediation, Review Article *Trends in Microbiology*. September, Vol. 14, Issue 9, 389-397. Witherspoon PA, Saraf DN (1965) Diffusion of methane, ethane, propane, and n-butane in water from 25 to 43°C. *J Phys Chem* 69:3752-3755
- 9: Nicolella, C.M., C.M. van Loosdrecht, et al. (2000). "Wastewater treatment with particulate biofilm reactors." *Journal of Biotechnology* 80(1): 1-33.
- 10: Frascari D., Pinelli D., Nocentini M., Baleani E., Cappelletti M., Fedi S., A kinetic study of chlorinated solvent cometabolic biodegradation by propane-

grown *Rhodococcus* sp. PB1, *Biochemical Engineering Journal* 42 (2008) 139-147.

11: Frascari D., Pinelli D., Nocentini M., Fedi S., Pii Y., Zannoni D., Chloroform degradation by butane-grown cells of *Rhodococcus aetherovorans* BCP1, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, (2006) 73:421-8.

12: Ciavarelli R., Cappelletti M., Fedi S., Pinelli D., Frascari D., Chloroform aerobic cometabolism by butane-growing *Rhodococcus aetherovorans* BCP1 in continuous-flow biofilm, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2011 NOV 1. [epub ahead of print].

13: <http://www.minotaurus-project.eu>.

14: (Lowry, OH, NJ Rosbrough, AL Farr, and RJ Randall. *J. Biol. Chem.* 193: 265. 1951.).

15: Alvarez-Cohen L. & Speitel Jr. GE (2001) Kinetics of aerobic cometabolism of chlorinated solvents. *Biodegradation* . 2001-2 , 42: 105-126 (22).

16: WilsonJT & WilsonBH (1985) Biotransformation of trichloroethylene in soil. *Appl. Envir. Microbiol.* 49: 242-243 (2).

17: Fliermans C.B., Phelps T.J., Reinfelberf D., Mikell A.T. & White D.C. (1988) Mineralization of trichloroethylene by heterotrophic enrichment cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1709-1714.

18: Wilson B.H., Pogue D.W. & Canter L.W. (1988) Biological treatment of trichloroethylene and 1,1,1-trichloroethane from contaminated air stream. *Proc. Petroleum Hydrocarbons Conference. National Water Well Association/American Petroleum institute, Houston, TX: 823-831.*

19: Arciero D., Vannelli T., Logan M., Hooper A.B. (1989) Degradation of trichloroethylene by the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europea*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159: 640-643.

-
- 20: Folsom B.R., Chapman P.J. & Pritchard P.H. (1990) Phenol and trichloroethylene degradation by *Pseudomonas cepacia* G4: Kinetics and interactions between substances. *Appl. Envir. Microbiol.* 56: 1279-1285.
- 21: Nelson M.J., Montgomery S.O., Neil E.J.O. & Pritchard P.H. (1986) Aerobic metabolism of trichloroethylene by a bacterial isolate. *Appl. Envir. Microbiol.* 52: 383-384.
- 22: Arnold W. A., Winget P., Cramer C. J., Reductive Dechlorination of 1,1,2,2-Tetrachloroethane, *Envir. Sci. Technol.* (2002), 36: 3536-3541
- 23: Jones J.A., Slifker R. A., Cadavid E. M., Martinez R. D., Nickelsen M. G., Cooper W. J., (1995) Ionic strength and buffer effects in the elimination reaction of 1,1,2,2-tetrachloroethane; *Water research*, vol. 29 No 8: 1924-1928.
- 24: Cooper W. J., Mehran M., Rlusech D. J., Jones J. A., (1987) Abiotic Transformation of Halogenated Organics. 1. Elimination reaction of 1,1,2,2-tetrachloroethane and formation of 1,1,2 trichloroethene, *Environ. Sci. Technol.*, 21: 1112-1114.