
ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DI BOLOGNA

FACOLTA' DI INGEGNERIA

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

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

Tesi di Laurea in Tecnologie di Trattamento di acque

**TRATTAMENTO COMETABOLICO AEROBICO DI
UN'ACQUA DI FALDA CONTAMINATA DA
TRICLOROETILENE E 1,1,2,2-TETRACLOROETANO**

Candidato

Matteo Tagliavini

Relatore

Chiar.mo Prof. **Dario Frascari**

Correlatore

Prof. **Davide Pinelli**

Anno Accademico 2012/2013

Seconda sessione

Indice

1	Introduzione	5
2	I Solventi Clorurati	7
2.1	Classificazione dei solventi clorurati	7
2.2	Tricloroetilene e 1,1,2,2-Tetracloroetano: utilizzi e tossicità	9
2.3	Diffusione dei solventi clorurati nell'ambiente	11
3	Meccanismi di Degradazione	13
3.1	Tipologie di Degradazione	13
3.1.1	Reazioni Abiotiche	14
3.1.2	Declorurazione Anaerobica Riduttiva	15
3.1.3	Ossidazione Aerobica	15
3.1.4	Biodegradazione Cometabolica Aerobica	16
3.2	Il Modello Cinetico	19
3.2.1	Modello di biodegradazione in assenza di substrato di crescita e con inibizione da prodotti intermedi	19
3.2.2	Modello di biodegradazione in presenza di substrato di crescita e con inibizione da prodotti intermedi	19
4	Tecnologie di Trattamento	21
4.1	Processi di rimozione in situ	21
4.2	Configurazione dei trattamenti in situ	23
4.3	Bioremediation ex-situ	25
5	Obiettivi	27
5.1	I Lavori Progressi	27
5.1.1	Selezione consorzio B4	27
5.1.2	Allestimento colonne a letto impaccato	28

5.2	Lo Sviluppo del Progetto	30
5.2.1	Selezione e mantenimento del consorzio B4	30
5.2.2	Studi cinetici	32
5.2.3	Scelta del supporto	33
6	Metodiche Analitiche e Strumentali	34
6.1	Analisi Cromatografiche	34
6.1.1	Modalità Manuale	35
6.1.2	Modalità Automatica	35
6.1.3	Calibrazioni	36
6.2	Analisi della Biomassa	42
6.3	Allestimento di microcosmi	44
7	Studi Cinetici	46
7.1	Studi cinetici preliminari	46
7.2	Allestimento e sviluppo delle prove cinetiche per il consumo di Butano e TCE	48
7.3	Stima dei parametri presenti nel modello cinetico	54
7.4	Calcolo delle incertezze da associare ai parametri	60
8	Scelta del Supporto	63
8.1	Test in bioreattori “batch” a 30°C e 15°C	64
8.2	Test in “continuous flow”	67
8.3	Risultati	70
9	Conclusioni	72

Capitolo 1

Introduzione

Le principali tecnologie messe a punto per il risanamento di falde acquifere possono essere suddivise in tre tipologie fondamentali: trattamenti fisici, trattamenti chimici e 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, l'inquinante 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. I trattamenti biologici, infine, prevedono la mediazione di microrganismi, presenti in falda o coltivati appositamente in laboratorio, per ottenere la completa degradazione o mineralizzazione degli inquinanti presenti e rappresentano le tecnologie più interessanti dal punto di vista della sostenibilità ambientale pur non presentando costi eccessivi rispetto ai trattamenti fisici o chimici.

Fra le tecnologie di tipo biologico per il risanamento di falde contaminate sono ormai note quelle che si basano su processi aerobici e sono applicate con successo per il trattamento di plume dovuti a contaminazioni da vari tipi di idrocarburi alifatici, BTEX e IPA. Oltre a tali composti si ritrovano frequentemente nelle falde acquifere composti clorurati e in particolare alifatici clorurati che sono composti chimici largamente utilizzati a livelli industriale. Per questa categoria di sostanze la biodegradazione aerobica non è sempre possibile e la sua efficacia dipende dal grado di clorurazione della molecola da trattare. Per bassi gradi di clorurazione il trattamento aerobico può essere efficace ma per gli elevati gradi di clorurazione la biodegradazione anaerobica, tra le tecnologie di tipo biologico, risulta l'unica applicabile. In ogni caso i processi anaerobici, nonostante siano in atto in numerosi siti in-

quinati, sono più difficilmente controllabili di quelli aerobici, inoltre sono processi lenti e in talune situazioni di difficile attuazione.

Il metabolismo aerobico diretto non è efficace sui composti con alto grado di clorurazione in quanto i batteri non riescono a trarre vantaggi energetici dall'ossidazione di questi composti, esiste però la possibilità di sfruttare un processo detto cometabolico nel quale la biomassa viene fatta crescere su un opportuno substrato primario (aggiunto al sistema) e in queste condizioni risulta poi in grado di degradare "accidentalmente" i composti clorurati (substrato cometabolico) che si legano allo stesso sito attivo dell'enzima responsabile del consumo del substrato primario.

Tuttavia per l'applicazione in campo di tali metodologie si richiedono conoscenze approfondite su vari aspetti del processo tra cui il tipo e le dosi di impiego del substrato da somministrare, la conoscenza dei tempi necessari allo sviluppo della biomassa idonea a realizzare la degradazione dei composti clorurati di interesse, la capacità di queste biomassa di colonizzare la zona di acquifero che si intende trattare e la sua persistenza, gli intervalli possibili per le concentrazioni degli inquinanti, le velocità di degradazione, la completezza della mineralizzazione delle sostanze inquinanti e i rischi di formazione di metaboliti pericolosi. Una volta noti tali aspetti si può, almeno in linea di principio, procedere alla progettazione razionale degli impianti di trattamento.

Nella tabella 1.1 vengono infine mostrate le concentrazioni soglia di contaminazione nel sottosuolo e nelle acque sotterranee di alcuni solventi clorurati secondo un disegno di legge (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.

Tabella 1.1: Concentrazioni soglia di contaminazione di alcuni composti clorurati

Composto	C_{SUOLO} (mg_{SS}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

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.

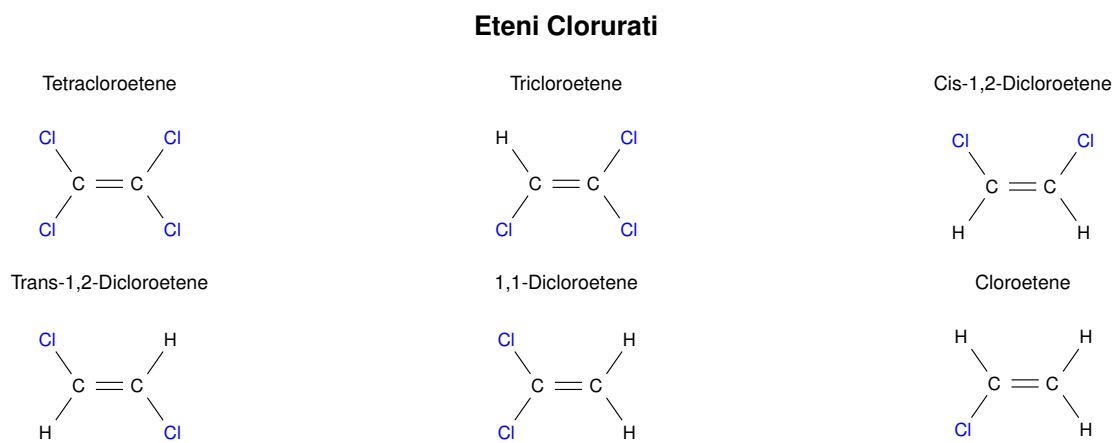
Capitolo 2

I Solventi Clorurati

2.1 Classificazione dei solventi clorurati

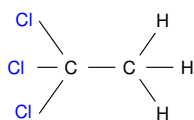
I solventi organici clorurati sono composti organici contenenti almeno un atomo di cloro legato tramite un legame covalente alla catena di atomi di carbonio. Nella maggior parte dei casi, si tratta di sostanze dotate di un ottimo potere solvente, propellente, refrigerante e di scarsa infiammabilità. La grande varietà di strutture e di proprietà dei solventi organici ha fatto sì che fossero utilizzati in svariate applicazioni nel corso degli ultimi decenni. Molti di questi composti, o dei loro derivati, si sono però rivelati dannosi per l'ambiente e per l'uomo. I solventi clorurati più comuni possono essere suddivisi in tre 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

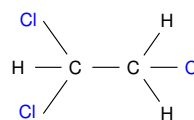


Etani clorurati

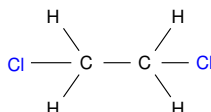
Tetracloroetene



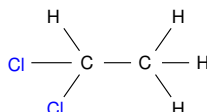
Tricloroetene



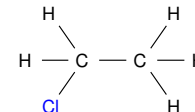
Trans-1,2-Dicloroetene



1,1-Dicloroetene

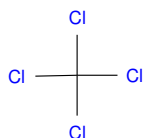


Cloroetene

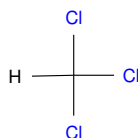


Metani clorurati

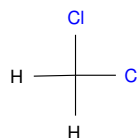
Tetraclorometano



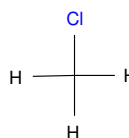
Triclorometano



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.
- 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.

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

- 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.

2.2 Tricloroetilene e 1,1,2,2-Tetracloroetano: utilizzi e tossicità

Il tricloroetilene, conosciuto con il nome commerciale di Trielina, è un ottimo solvente per molti composti organici e per questo è stato largamente usato in ambito industriale durante la seconda parte del 900. Al picco della sua produzione, negli anni '20, il suo impiego principale era l'estrazione di oli vegetali da piante quali la soia, il cocco e la palma. Tra gli anni '30 e gli anni '70, sia in Europa che negli USA il TCE è stato anche utilizzato come anestetico sostituendo in questo campo il Cloroformio e l'Etere. Tra gli altri usi nell'industria alimentare si annoveravano la decaffeinazione del caffè e l'estrazione di essenze.

Tabella 2.2: Proprietà chimico-fisiche di alcuni solventi clorurati a 25°C

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 1064	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
VC	62.5	Gas	2670	2660	0.315	1.38

Ha trovato uso anche come solvente per il lavaggio a secco, fino a quando non è stato soppiantato negli anni '50 dal tetracloroetilene.

L'1,1,2,2-Tetracloroetano ha il più alto potere solvente tra i tutti i solventi clorurati ed è stato sfruttato a livello industriale come solvente, per la pulizia e la sgrassatura di metalli e come refrigerante (conosciuto con il nome di R-130). Un'applicazione molto diffusa per il TeCA è stata quella di intermedio nella produzione industriale di altri composti come il tricloroetilene e il tetracloroetilene.

L'inalazione di questi due solventi deprime il sistema nervoso centrale e produce sintomi simili a quelli dell'ubriacatura da alcol: mal di testa, confusione, difficoltà nella coordinazione motoria. Un'esposizione prolungata può portare all'incoscienza e alla morte. Particolare attenzione va posta nei luoghi dove è possibile avere alte concentrazioni di suoi vapori; il tricloroetilene de-sensibilizza rapidamente il naso e diviene impercettibile all'olfatto, aumentando il rischio di inalare dosi elevate. L'esposizione ai suoi vapori può provocare un prolungato bruciore agli occhi.

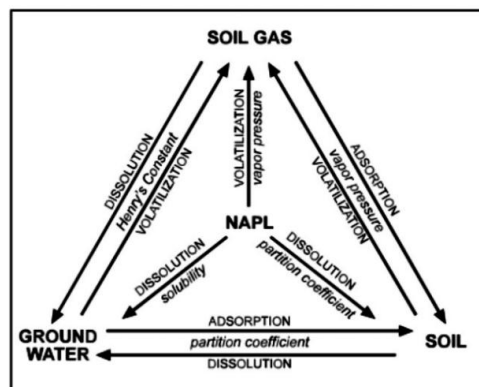
L'effetto dell'esposizione a lungo termine sugli esseri umani non è noto. La sperimentazione animale ha dimostrato la cancerogenicità del tricloroetilene a carico del fegato nei topi. Il tricloroetilene e il tetracloroetano sono considerati cancerogeni sospetti, e verso la fine degli anni '90 sono stati inseriti rispettivamente nella classe 2A e nella classe C della classificazione IARC per cancerogenicità su fegato e vie biliari. La scoperta dei possibili effetti cancerogeni dei solventi clorurati già a partire dagli anni '80 ha portato a una drastica riduzione del loro utilizzo industriale e ad una maggiore sensibilizzazione sul problema

del risanamento dei siti industriali fortemente contaminati da questi.

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.

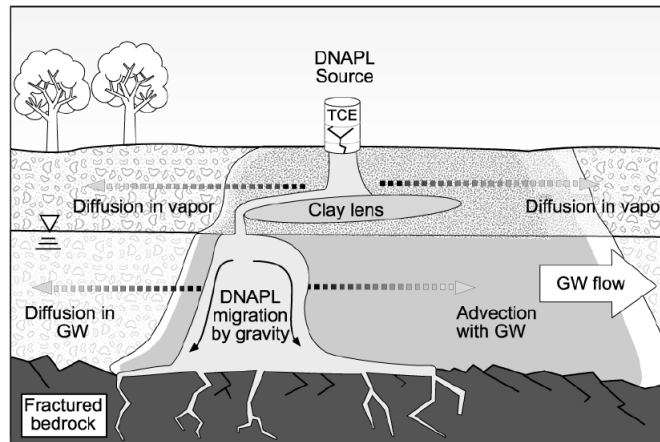
Figura 2.2: Equilibri tra le quattro fasi



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 Degradazione

3.1 Tipologie di Degradazione

In generale la biodegradazione dei solventi clorurati avviene attraverso meccanismi naturali, la cui efficienza può poi essere migliorata con interventi che modificano le condizioni ambientali rendendole ottimali per tali meccanismi degradativi. Alcuni composti organoclorurati vengono degradati anche da processi abiotici, in ogni caso nei sistemi naturali la degradazione di tipo biologico tende ad assumere una maggiore rilevanza rispetto ai meccanismi abiotici. Le reazioni biologiche, cioè realizzate attraverso microorganismi, sono ossido-riduzioni e necessitano quindi di un composto che si comporta da accettore di elettroni, che viene ridotto, e di un altro che funga da donatore di elettroni che viene invece ossidato. I solventi clorurati generalmente agiscono come donatori di elettroni, però a causa della natura elettronegativa degli atomi di cloro possono comportarsi anche come accettori di elettroni, subendo quindi una riduzione. Il loro comportamento dipende sostanzialmente dal grado di clorurazione: più questo è alto, più il carbonio organico risulta ossidato e sono quindi più suscettibili a riduzione. Di conseguenza, è più probabile che i composti medio-alto clorurati siano degradati mediante reazioni di riduzioni mentre quelli medio-basso clorurati sono più frequentemente ossidati piuttosto che ridotti. Dopo un accenno alle reazioni abiotiche che coinvolgono i CAH, verranno di seguito trattate i due principali meccanismi di degradazione che coinvolgono microorganismi:

- Ossidazione Aerobica
- Declorurazione Anaerobica Riduttiva

3.1.1 Reazioni Abiotiche

Le reazioni abiotiche avvengono senza scambio di elettroni e non hanno bisogno della presenza di catalizzatori organici o biochimici. Sono generalmente più lente delle reazioni con scambio di elettroni ma non trascurabili per quanto riguarda il moto dell'acqua nel sottosuolo. Come si può vedere, possono essere classificate in due tipi: sostituzione e eliminazione. Nelle reazioni di sostituzione l'atomo di cloro viene rimpiazzato da un altro atomo o gruppo funzionale con la formazione di un prodotto meno pericoloso mentre nelle eliminazioni due gruppi legati alla molecola sono rimossi portando alla formazione di un doppio legame. Le più comuni reazioni di sostituzione e eliminazione dei solventi clorurati sono rispettivamente l'idrolisi, dove il solvente clorurato sostituisce un atomo di cloro con una molecola di acqua formando un alcol, e la deidroalogenazione che porta all'eliminazione di acido cloridico e alla formazione di un doppio legame nel solvente.

Tabella 3.1: Reazioni di degradazione dei solventi clorurati

	Tipo di reazione	Classificazione della reazione	Meccanismo di Reazione
Reaz. abiotiche	Sostituzione	Idrolisi	$R-X + H_2O \longrightarrow ROH + H-X$
	Eliminazione	Deidroalogenazione (CAH saturi)	$ \begin{array}{c} H & H \\ & \\ H-C & -C-H \\ & \\ H & X \end{array} \longrightarrow \begin{array}{c} H & & H \\ & \backslash & / \\ & C=C & \\ & / & \backslash \\ H & & H \end{array} + H-X $
		idrossilazione	$ \begin{array}{c} H_2C-X \\ \\ H \end{array} + H_2O \longrightarrow \begin{array}{c} H_2C-X \\ \\ OH \end{array} + 2H^+ + 2e^- $
Reaz. con scambio di elettroni	Ossidazione	Alo-ossidazione	$H_3C-X + H_2O \longrightarrow H_3C-X^+ O^- + 2H^+ + 2e^-$
		Eossidazione (CAH insaturi)	$ \begin{array}{c} X \\ \\ HC=CH_2 \end{array} + H_2O \longrightarrow \begin{array}{c} O \\ / \quad \backslash \\ H_2C \quad \quad CH \\ \quad \quad \quad \\ \quad \quad \quad X \end{array} + 2H^+ + 2e^- $
		Idrogenolisi	$R-X + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow R-H + X$
	Riduzione	Accoppiamento	$2R-X + 2e^- \longrightarrow R-R + X$
		Dialoeliminazione	$ \begin{array}{c} H_2C-CH_2 \\ \quad \\ X \quad X \end{array} + 2e^- \longrightarrow H_2C=CH_2 + 2X $

3.1.2 Declorurazione Anaerobica Riduttiva

Le reazioni di riduzione dei composti clorurati mediate da microorganismi avvengono quasi esclusivamente in condizioni anaerobiche e il solvente clorurato agisce come accettore di elettroni (agente ossidante) mentre il donatore può essere un composto organico o inorganico. Il meccanismo di riduzione si articola in due stadi distinte. Nel primo stadio avviene il trasferimento di un e^- dall'agente riducente al composto alogenato portando alla formazione di un radicale alchilico, questa reazione, nella maggior parte dei casi rappresenta il processo limitante nella trasformazione complessiva. Nel secondo stadio, che necessita dell'intervento di un altro e^- proveniente dal metabolismo e di uno ione H^+ disponibile nel mezzo acquoso, consiste nell'inserimento di un atomo di H sul carbonio radicalico. Le reazioni di declorurazione riduttiva determinano quindi la degradazione di un composto alifatico clorurato per progressiva sostituzione di un atomo di cloro con uno di idrogeno. La ricerca in questo settore si è inizialmente occupata dei più diffusi solventi alto-clorurati dimostrando che molti ceppi batterici sono in grado di declorurare tali sostanze e il processo riduttivo procede per successiva sostituzione di atomi di cloro con atomi di idrogeno secondo la sequenza PCE - TCE - DCE - VC - etilene ed è stato anche dimostrato che la conversione di VC a etilene costituisce lo stadio limitante con conseguente accumulo di VC, noto per le sue proprietà cancerogene. Nella maggior parte dei casi, la declorurazione anaerobica riduttiva avviene per via cometabolica, ossia il composto clorurato è declorurato da microorganismi che utilizzano altri composti organici o inorganici come accettori finali di elettroni, mentre il solvente clorurato risulta "incidentalmente" utilizzato come accettore. Negli ultimi anni sono stati individuati meccanismi di declorurazione riduttiva diretti, si è infatti osservato che alcuni ceppi batterici utilizzano il composto alifatico clorurato come accettore finali di e^- nelle reazioni di ossidazione del substrato primario.

3.1.3 Ossidazione Aerobica

Nei sistemi biologici le reazioni di ossidazione dei composti alifatici clorurati avvengono attraverso metabolismo aerobico dove il composto clorurato agisce come donatore di elettroni mentre l'ossigeno da accettore. Queste reazioni sono di norma mediate da un 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 diretta. 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).

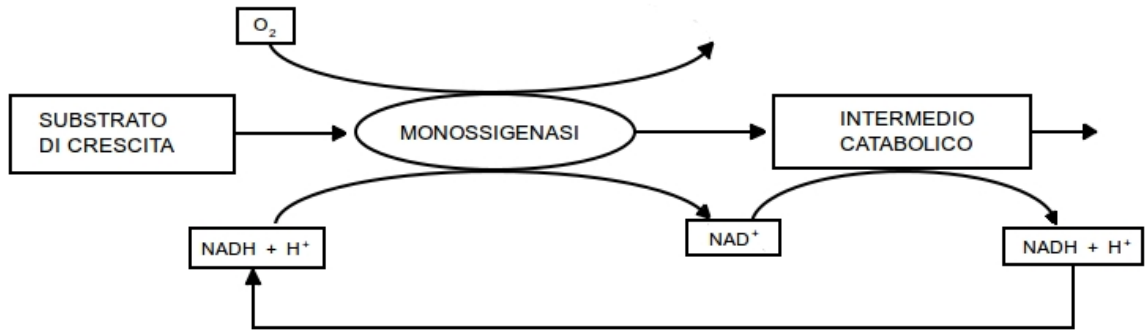
3.1.4 Biodegradazione Cometabolica Aerobica

La maggior parte dei solventi clorurati, inclusi TCE e TeCA oggetto di questa trattazione, sono degradabile tramite cometabolismo aerobico. I CAH sono quindi "incidentalmente" ossidati dai microorganismi nell'utilizzo del substrato primario come donatori di elettroni mentre l'ossigeno funge da accettore finale. L'ossidazione di entrambi i substrati, quello di crescita e quello cometabolico, è mediata dallo stesso enzima monossigenasi. Per quanto riguarda il substrato di crescita, nel primo stadio della reazione avviene la sostituzione di un gruppo H con un gruppo OH e gli elettroni necessari a questa reazione vengono forniti dall'ossidazione di un coenzima detto NADH a NAD^+ . Come mostrato in Figura 3.1, nel caso di utilizzo del substrato primario, il NAD^+ viene poi ridotto a NADH ossidando l'intermedio catabolico formatosi nel primo stadio, con la conseguente rigenerazione di potere riducente e, in ultimo, accumulo di energia sotto forma di ATP. Nel caso invece di substrato

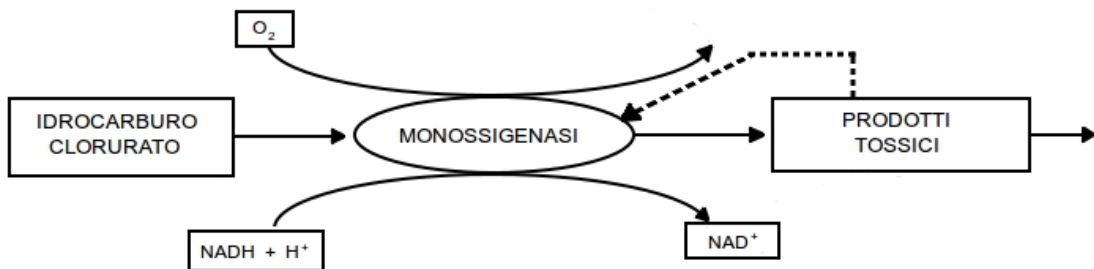
non di crescita il processo è tale da non consentire la rigenerazione di NADH, così che, in assenza di opportuno substrato primario, le scorte di tale coenzima tendono gradualmente a esaurirsi. Inoltre il prodotto dell'ossidazione dei solventi clorurati risulta spesso una sostanza tossica che può inibire specifiche funzioni cellulari, fino a portare alla completa disattivazione del metabolismo cellulare. È importante poi sottolineare che, essendo lo stesso enzima che catalizza l'ossidazione sia del substrato di crescita sia del cometabolita, si può verificare un fenomeno di competizione tra i due substrati. È quindi fondamentale la presenza del substrato di crescita per permettere ai microorganismi di crescere e effettuare le reazioni che permettono la degradazione dei CAH ma la sua somministrazione a concentrazioni troppo elevate potrebbe portare a 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 insaturi.

Figura 3.1: Schema dell'ossidazione dei due substrati mediata dall'enzima monossigenasi

(a) Substrato primario



(b) Substrato cometabolico



3.2 Il Modello Cinetico

3.2.1 Modello di biodegradazione in assenza di substrato di crescita e con inibizione da prodotti intermedi

Il primo modello cinetico per interpretare la bioeграzione cometabolica di alifatici clorurati fu proposto da Alvarez-Cohen all'inizio degli anni 90'. Questo modello descrive la velocità di degradazione di composti clorurati in assenza di substrato di crescita e considera per tale velocità un modello di tipo Monod. Vengono inoltre considerati due ulteriori fenomeni che portano la biomassa ad esaurirsi: la morte della biomassa per metabolismo endogeno e la sua inattivazione dovuta a metaboliti intermedi che hanno azione tossica sulla biomassa della quale si tiene conto mediante un parametro detto capacità di trasformazione T_c che rappresenta la quantità di contaminante che viene degradato per unità di biomassa. Le equazioni del modello sono le seguenti:

$$R_c = q_c \cdot X = \frac{q_{max} \cdot C_c}{C_c + K_{s,c}} \cdot X \qquad R_X = \left(b + \frac{1}{T_c} \cdot q_c \right) \cdot X$$

dove:

- R_c è la velocità di degradazione del contaminante
- R_X è la velocità con cui viene inattivata la biomassa
- X è la concentrazione della biomassa
- q_c e q_{max} sono rispettivamente la velocità specifica e la velocità specifica massima di consumo del substrato
- K_s è la costante di affinità del contaminante
- C_c è la concentrazione del contaminante
- b e T_c rappresentano rispettivamente il coefficiente di respirazione endogena della biomassa e la sua capacità di trasformazione

3.2.2 Modello di biodegradazione in presenza di substrato di crescita e con inibizione da prodotti intermedi

Dal modello presentato nel paragrafo precedente emerge la necessità di alimentare anche il substrato di crescita per sostituire la biomassa inattivata per effetto della tossicità dei prodotti di degradazione con nuova biomassa e in modo da evitare che la degradazione si arresti per esaurimento delle scorte di cofattori quali NADH e NADPH necessari

ai processi di degradazione degli idrocarburi clorurati. Si è però anche osservato come l'alimentazione del substrato di crescita sia associata a fenomeni di inibizione competitiva che portano ad una diminuzione della velocità di consumo del substrato cometabolico. Il modello precedente è stato quindi ampliato considerando una cinetica di tipo Monod per entrambi i substrati e un'inibizione competitiva fra i due substrati di cui si tiene in conto con la costante di inibizione K_i . Il modello cinetico assunto è il seguente:

$$R_S = (q_s + m) \cdot X = \left(\frac{q_{max,s} \cdot C_s}{K_{S,s} \cdot \left(1 + \frac{C_c}{K_{i,c}}\right) + C_s} + m \right) \cdot X$$

$$R_X = (Y_{x/s} \cdot q_s - b - \frac{1}{T_c} \cdot q_c) \cdot X \quad R_C = q_c \cdot X = \left(\frac{q_{max,c} \cdot C_c}{K_{S,c} \cdot \left(1 + \frac{C_s}{K_{i,s}}\right) + C_c} \right) \cdot X$$

dove, oltre ai simboli già introdotti, si ha:

- R_c velocità complessiva di consumo del substrato;
- q_s velocità specifica di consumo della frazione di substrato che viene convertita in nuova biomassa;
- m velocità specifica di consumo della frazione di substrato utilizzata per il mantenimento della biomassa
- $q_{max,s}$ velocità specifica massima di degradazione del substrato
- K_s è la costante di affinità del substrato di crescita
- C_s la concentrazione di substrato in fase liquida

Capitolo 4

Tecnologie di Trattamento

Sono state sviluppate e caratterizzate svariate tecniche per attuare processi di bioremediation di acquiferi su scala reale, questi possono essere divisi in due classi fondamentali:

- *Bioremediation in-situ*: queste sono tecniche che prevedono l'intervento sulle condizioni ambientali (Temperatura, pH, carica microbica ecc.) delle acque di falda senza che ci sia alcuna mobilizzazione di acqua.
- *Bioremediation ex-situ*: queste prevedono l'emungimento di acque profonde con successivo trattamento in apposite strutture atte ad accelerare il processo. I trattamenti possono essere effettuati sul posto (on site) oppure le acque possono essere trasportate in un luogo diverso per essere poi trattate in appositi impianti (off site).

4.1 Processi di rimozione in situ

Bioattenuazione

Con il termine bioattenuazione si intende il processo naturale di riduzione della concentrazione di sostanze inquinanti dovuto alla presenza di una fauna microbica autoctona che nelle condizioni ambientali naturali della falda permetta la mineralizzazione dei composti inquinanti. Come conseguenza di questo processo le popolazioni microbiche con questa capacità aumentano fortemente sotto la pressione selettiva esercitata dagli inquinanti mentre le altre regrediscono fino, a volte, a raggiungere un livello di non rilevanza. Questo processo di degradazione biologica, seppur lenta, si accompagna con processi chimico-fisici (volatilizzazione, degradazione chimica, diffusione) e comporta una diminuzione della concentrazione degli inquinanti sul sito di rilascio.

Biostimolazione

Questa modalità di intervento sulla falda inquinata prevede l'aggiunta di fattori che stimolano la crescita di microrganismi autoctoni capaci di degradare i composti inquinanti in esame. Di seguito si fornisce un elenco dei fattori comunemente utilizzati per la biostimolazione:

- *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 degli inquinanti.
- *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.

Un altro genere di additivi che permette di migliorare la biorimozione è rappresentato dagli *emulsionanti* che favoriscono il distacco degli inquinanti adsorbiti. Minimizzando il fenomeno dell'adsorbimento si rendono i composti da degradare maggiormente biodisponibili.

Bioaugmentation

Il termine bioaugmentation fa riferimento a trattamenti che prevedono anche l'aggiunta nella matrice ambientale contaminata di microrganismi appositamente selezionati in laboratorio in presenza dei composti inquinanti oggetto di interesse. Possono essere utilizzati sia microrganismi presenti in commercio sia consorzi microbici acclimatati in laboratorio

nei confronti degli specifici inquinanti. Per aumentare le possibilità di successo è opportuno che i microrganismi selezionati provengano dallo stesso sito contaminato e che siano coltivati in laboratorio in condizioni ambientali il più possibile simile a quelle del “campo”. 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 Configurazione dei trattamenti in situ

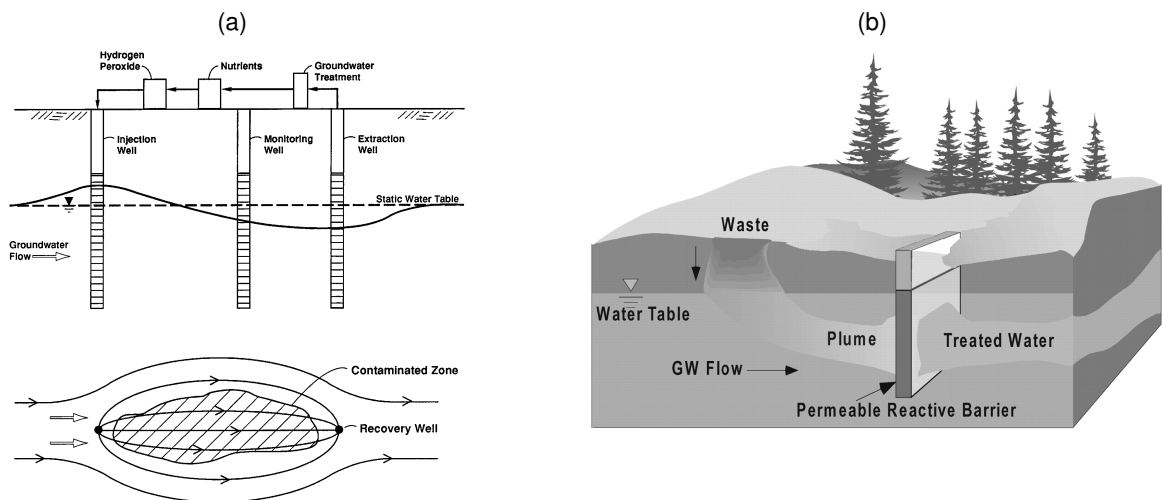
Come detto precedentemente per rendere efficaci il biorisanamento in situ di un acquifero è necessario introdurre nella zona contaminata alcuni fattori. Per quanto riguarda, in particolare, il caso di un trattamento cometabolico aerobico di solventi clorurati gli additivi fondamentali sono: substrato di crescita, ossigeno, nutrienti ed eventualmente biomassa. Di seguito sono elencate le tecniche più frequenti per rendere la matrice ambientale adatta ai processi biodegradativi:

- *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.

- *PBR (Permeable Reactive Barrier)*: Le barriere reattive permeabili (Figura 4.1) rappresentano una delle metodologie più innovative e promettenti per intervenire su acquiferi contaminanti. Le barriere costituite da materiale reattivo permeabile vengono poste all'interno dell'acquifero in modo da essere attraversate dall'acqua contaminata per effetto del gradiente naturale. Possono poi essere associate a elementi a bassa permeabilità che indirizzano il flusso di acqua dalla regione contaminata a una zona di trattamento permeabile contenente il materiale reagente.

Figura 4.1: Configurazione dei trattamenti in situ: a) Bioventing b) Permeable Reactive Barrier



4.3 Bioremediation ex-situ

La bioremediation ex-situ consiste nel prelievo di acqua di falda che viene poi trattata in appositi bioreattori per essere infine reimpressa nell'acquifero. I bioreattori utilizzati a questo scopo sono del tipo a biomassa adesa, vengono sfruttate pertanto le proprietà di alcuni microorganismi di aderire a particolari superfici formando un strutture compatta chiamata biofilm. 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).

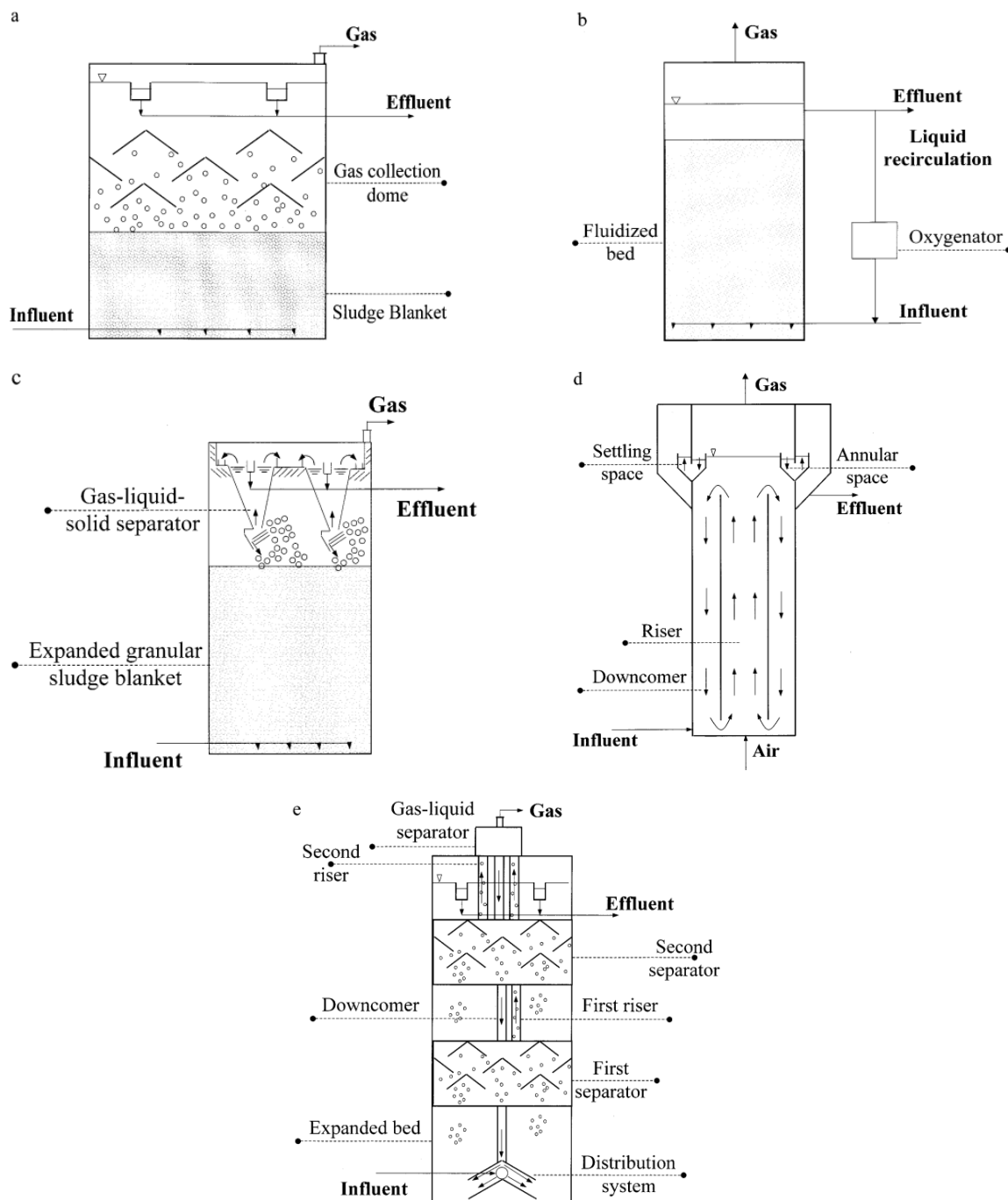


Figura 4.2: Configurazioni di alcuni reattori a biofilms, a) USB, b) BFB, c) EGSB, d) BAS, e) IC

Capitolo 5

Obiettivi

5.1 I Lavori Progressi

5.1.1 Selezione consorzio B4

Quattro diversi campioni di acqua di falda inquinati sono stati forniti e, a partire da questi, è iniziato il lavoro di selezione di un consorzio batterico in grado di degradare efficacemente i due solventi clorurati presenti attraverso un processo di arricchimento della flora batterica presente nelle acque. I campioni di acqua erano stati prelevati da quattro diversi pozzi dal sito contaminato Rho(Milano) e il primo passo è stata la caratterizzazione idrochimica delle quattro differenti acque che è riportata in tabella 5.1.

Tabella 5.1: Caratterizzazione idrochimica della acque

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				
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

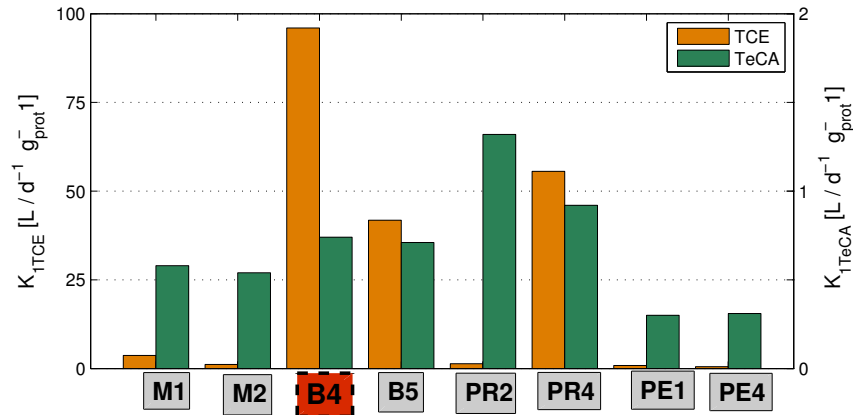
Facendo riferimento ai dati in letteratura sono poi stati scelti 5 diversi possibili substrati primari di crescita: Metano, Propano, Butano e Pentano. Quindi per ogni substrato sono stati allestiti 5 microcosmi, di cui 4 contenenti le singole acque campionate e uno contenente una miscela equivolumetrica 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. Ogni microcosmo è stato etichettato con la sigla del substrato somministratogli e con l'identificativo dell'acqua campionata assegnatagli in laboratorio. 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 provenienti dai diversi pozzi e la miscela delle quattro precedenti. 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 insieme a ossigeno puro 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. I microcosmi sono poi stati monitorati giornalmente attraverso l'analisi delle quantità di substrato e delle quantità dei solventi clorurati presenti originariamente nelle acque campionate procedendo infine all'aggiunta dei substrati e dell'ossigeno una volta che questi composti erano stati completamente consumati.

Le colture primarie che avevano mostrato una migliore efficacia sono poi state sottoposte ad un test cinetico "minimo" che ha permesso di individuare le velocità specifiche di metabolizzazione r (velocità di rimozione normalizzata rispetto alla biomassa ed alla concentrazione di substrato). Le diverse colture primarie sono poi state confrontate focalizzando l'attenzione sulle capacità degradative nei confronti dei substrati cometabolici e, come mostrato nel grafico seguente, il lavoro ha portato alla selezione del consorzio B4 grazie alla maggiore efficacia con cui degradava il Tricloroetilene (Figura 5.1).

5.1.2 Allestimento colonne a letto impaccato

L'obiettivo dell'allestimento di un bioreattore in scala laboratorio è quello di testare il processo di biodegradazione cometabolico dei solventi clorurati in condizioni analoghe (con-

Figura 5.1: Confronti tra i diversi substrati per il consumo dei solventi clorurati



dizioni di flusso e biomassa adesa) a quelle che si realizzeranno nel reattore a scala reale. In seguito all'allestimento sono stati condotti studi per la determinazione del modello fluidodinamico dei soluti all'interno delle colonne, con due scopi principali:

- Permettere il confronto di diverse modalità di alimentazione dei substrati in modo da valutare non solo l'efficacia del processo nella degradazione dei solventi ma anche l'efficienza nel consumo del substrato primario lungo i bioreattori così da permettere una crescita uniforme della biomassa.
- Confrontare diversi supporti porosi in termini di degradazione dei solventi e crescita della biomassa adesa in condizioni fluidodinamiche analoghe a quelle di un reattore su scala reale.

L'impianto è costituito da quattro colonne, ognuna impaccata con un diverso supporto poroso (carrier), connesse ad un sistema comune di alimentazione per mezzo di tubi e raccordi in acciaio inox dal diametro interno di 3mm. 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 .

Ogni colonna impaccata è costituita da un cilindro in vetro di altezza 50cm e diametro interno pari a 4,7 cm. Alle estremità delle colonne sono stati fissati dei tappi in plastica forniti di setto in teflon, ognuno dei quali è stato forato per permettere il fissaggio di un raccordo in acciaio, necessario alla connessione con il resto dell'impianto. I diversi supporti utilizzati per la crescita del biofilm batterico, sono dei comuni supporti utilizzati come filtri biologici per acquari la cui caratterizzazione sarà riportata nel Capitolo 8.

Il sistema di alimentazione è comune ai quattro reattori ed è assicurato 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. Dato che le prove fluidodinamiche richiedono un repentino cambio dell'origine di alimentazione è stata inserita, prima delle pompe, un'elettrovalvola a tre vie che permette lo switch. 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 adagate in carrelli dotati di un letto di gomma-piuma per evitarne il danneggiamento durante le operazioni di movimentazione.

5.2 Lo Sviluppo del Progetto

5.2.1 Selezione e mantenimento del consorzio B4

Nel capitolo 5.1.1 è stato mostrato il lavoro che ha portato alla selezione del consorzio B4 a partite dalle quattro differenti acque di falda. A questo punto è opportuno continuare il processo di selezione e mantenimento testando la biomassa con una serie di prove che ne valutino l'efficacia degradativa in presenza di condizioni ambientali differenti. Per raggiungere questo obiettivo sono state pianificati alcuni test da eseguire sui microcosmi in "batch" e che sono elencate di seguito. In seguito si è presentata la necessità di mantenere il consorzio B4 in un scala più grande rispetto ai microcosmi da 119 mL in modo da avere una maggiore disponibilità di biomassa per gli inoculi necessari alle prove successive: a questo scopo il consorzio B4 è stato inoculato in due bottiglie da 5L, una contenente acqua 663 (l'acqua proveniente dalla falda inquinata), l'altra acqua sintetica con le opportune aggiunte di nutrienti. In secondo luogo è stata avviata la coltivazione del consorzio B4 nel Fermentatore Sartorius disponibile nei laboratori del DICMA in via Terracini.

- *HTCE e HteCA*

L'obiettivo di questa prova è testare la biomassa proveniente dal consorzio B4 in presenza di concentrazioni elevate (High-TCE, High-TeCA) di solventi clorurati. Si alimentano quindi le vials contenenti la biomassa con volumi relativamente alti di solventi e una volta che questi sono stati consumati completamente si aumentano progressivamente i volumi da aggiungere fino a raggiungere concentrazioni di TCE e TeCA così alte da non poter essere degradate dai microorganismi.

- *MTCE*

Fin ad oggi non sono ancora stati trovati organismi capaci di biodegradare solventi clorurati come TCE e TeCA con un metabolismo diretto. Questo presenterebbe numerosi vantaggi, a partire da una riduzione dei costi, rispetto alla via cometbolica. A questo scopo sono state allestite una serie di vials chiamate "Metabolic TCE" con le quali si è cercato appunto di selezionare un consorzio in grado di degradare in maniera diretta i solventi clorurati. In una di queste è stato inoculato il consorzio B4 e iniettato TCE ma senza l'aggiunta del substrato di crescita, mentre altre 4 sono state allestite a partire delle acque di falda senza effettuare inoculo e soprattutto senza fornire il substrato.

- *Selezione consorzio a 15 °C*

Per la maggior parte dei microorganismi la temperature ottimale per la crescita è di circa 30°C ed è per questo che tutte le prove di selezione e mantenimento precedentemente descritte sono state condotte a questa temperatura. Le acque di falda però hanno temperature notevolmente più basse, risulta quindi necessario verificare l'efficacia del consorzio B4 anche a temperature minori. Saranno quindi allestite cinque vials, delle quali una contenente il consorzio B4 mentre le altre costituite dalle quattro differenti acque di falda, che saranno poi mantenute ad un temperature di 15°C, alimentate con butano, TCE, TeCA e ossigeno e monitorate tre volte a settimana.

- *Mantenimento del consorzio nella bottigli da 5L*

Ognuno dei reattori 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 dei reattori è stato eseguito sterilizzando in autoclave i recipienti insieme a 1,35 L del terreno costituito da acqua 663 nel primo caso e da acqua sinetica preparata precedentemente nel secondo caso. È stato quindi effettuato l'inoculo dei due reattori utilizzando 150 mL di consorzio B4, per poi iniziar a somministrare una serie di pulsali 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 ($\lambda = 600\text{nm}$).

- *Coltivazione della biomassa nel fermentatore Sartorius*

Allo scopo di produrre una significativa quantità di inoculo per la colonizzazione delle colonne a flusso e per lo svolgimento delle prove cinetiche, si è usato un fermentatore in acciaio inox il cui settaggio dei parametri d'esercizio è automatizzato. Per aumentare le riserve di substrato primario, che altrimenti sarebbe terminato nei periodi in cui non è possibile operarne la riaggiunta (orari notturni e giorni non lavorativi), è stato opportuno aumentare lo spazio di testa del fermentatore collegandolo ad un polmone esterno in Teflon (Figura 5.2). Il terreno utilizzato per la crescita è acqua addolcita, lo stesso terreno utilizzato per la colonizzazione delle colonne a letto impaccato. 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.

5.2.2 Studi cinetici

Il modello cinetico considerato è quello di Monod in presenza di substrato di crescita e con inibizione da metaboliti intermedi, come descritto nel paragrafo 3.2.2. L'obiettivo finale delle prove è quello di valutare l'adattabilità dei dati sperimentali al modello teorico e di stimare i parametri presenti nel modello in modo da caratterizzare la cinetica con cui il consorzio B4 consuma i substrati di interesse: butano, TCE e TeCA. Verranno quindi allestite alcune prove utilizzando il consorzio B4 cresciuto in "soft-water" all'interno del fermentatore. Nella conduzione degli studi cinetici verrà data priorità alle cinetiche relative al substrato primario e al Tricloroetilene, in quanto il Tetracloro-etano può essere convertito in maniera abiotica in Tricloroetilene. In totale si allestiranno quindi quattro diverse prove: nelle prime due i bioreattori in "batch" saranno alimentati esclusivamente con uno dei due substrati (oltre ov-

Figura 5.2: Complesso delle apparecchiature utilizzate per condurre la coltivazione della biomassa



viamente a ossigeno e inoculo di biomassa) per evitare fenomeni di inibizione. In seguito si affronterà invece la cinetica inibita dei due substrati e i bioreattori allestiti in laboratorio presenteranno concentrazioni diverse del substrato oggetto di studio con la presenza però anche del substrato inibente in concentrazione costante.

5.2.3 Scelta del supporto

L'obiettivo finale è quello di sviluppare una tecnologia di trattamento a biomassa adesa, cioè con i microorganismi che formano una strato compatto detto biofilm su determinati supporti porosi. Sono stati quindi scelti e caratterizzati quattro diversi supporti porosi, la cui caratterizzazione verrà descritta in dettaglio nel capitolo 8, e sono stati poi condotti dei test per valutare quale fosse migliore in termini di velocità di degradazione dei solventi clorurati e crescita della biomassa sui supporti. A queste scopo verranno allestiti alcuni microcosmi contenenti i supporti che saranno poi monitorati in seguito all'alimentazione dei diversi substrati. I risultati di queste prove eseguite su microcosmi in "batch" saranno poi integrati con i risultati derivanti dalle prove sui bioreattori continui con l'obiettivo di definire quale dei supporti sia il più efficace per il processo di biodegradazione trattato.

Capitolo 6

Metodiche Analitiche e Strumentali

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 e dei solventi clorurati. 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 (primario e cometabolico) e dell'ossigeno sono state effettuate utilizzando il metodo della gascromatografia. A causa della diversa natura dei composti sono stati montati due differenti detector sul Gas Cromatografo HP 6890: un rivelatore FID ("Flame Ionization Detector") e un rivelatore ECD ("Electron Capture Detector").

Il detector a ionizzazione di fiamma (FID) è, in generale, utilizzato per le misure di concentrazioni di idrocarburi, essendo infatti efficace sui composti in cui sono presenti legami C-H. Il campione da analizzare viene combusto da una fiamma dopo essere stato miscelato con una corrente di idrogeno e ossigeno. I vapori di combustione vengono caricati generando una corrente elettrica traducibile in un segnale allo strumento. È stato quindi utilizzato per la misura del substrato di crescita.

Nel rivelatore ECD si sfrutta invece un sorgente radioattiva (Ni_{62}) depositata su una lamina d'oro che emette radiazioni β in grado di ionizzare il gas di trasporto (N_2) secondo la seguente reazione: $\text{N}_2 + \text{particella } \beta \mapsto \text{N}_2^+ + \text{e}^-$. Vengono quindi prodotti elettroni che generano una corrente, la presenza nel campione iniettato di composti con atomi molto elettronegativi, che assorbono quindi la corrente, viene rilevata dallo 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 manuale descritta non risulta però utile quando si vuole misurare la concentrazione dei substrati direttamente dalla fase liquida. Bisogna dunque utilizzare la modalità automatica facendo ricorso ad un ulteriore strumento associato al gas-cromatografo: un analizzatore di spazio di testa Agilent 7694E. Per prima cosa bisogna preparare le vials iniettando 1 mL della fase liquida di cui si vuole analizzare la presenza di substrati in vials

da 10 o 20 mL e posizionarle nel carrello dell'analizzatore. Le vials vengono poi spostate automaticamente verso una camera riscaldante, la cui temperatura è impostata dall'utente, e mantenute a questa temperatura per un determinato intervallo di tempo, anch'esso impostato dall'utente, sufficiente per stabilire l'equilibrio tra le fasi. L'analizzatore procede poi autonomamente all'iniezione del campione nel gas-cromatografo dopo aver pressurizzato le vials in modo da caricare una valvola loop.

Le condizioni di temperatura e il tempo di equilibrio sono parametri che devono essere impostati dall'operatore. Tali parametri risultano di fondamentale importanza poiché 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 Calibrazioni

Le aree dei picchi nei cromatogrammi forniti dal gas cromatografo devono essere associate a determinati valori di concentrazione del substrato e per ottenere questo bisogna trovare un coefficiente di correlazione che legghi l'area del picco con la concentrazione di substrato.

Le calibrazioni sono state effettuate per i solventi clorurati e per il substrato di crescita nel caso della modalità manuale mentre ci si è limitati alla calibrazione rispetto ai due solventi clorurati per quanto riguarda la modalità automatica. Attraverso uno standard di controllo, i due solventi clorurati sono stati poi 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.

Modalità Manuale

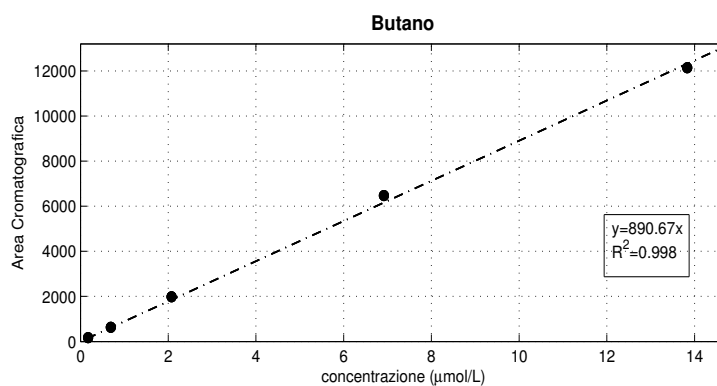
Per la calibrazione del Butano, sono stati preparati una serie di standard a concentrazione nota, inserendo differenti volumi dell'analita in vials da 119 mL chiuse ermeticamente. I valori delle concentrazioni degli standard e le aree di picco per il butano sono elencati nella tabella 6.2.

Tabella 6.2: Standard del Butano per la calibrazione in modalità automatica

	V_{butano} [mL]	C_{gas} [mmol/L]	Area
A	0.5	0.173	167.8
B	2	0.692	629.5
C	6	2.075	1985.5
D	20	6.916	6474.9
E	40	13.832	12138.5

Nel grafico di Figura 6.1 viene mostrata la relativa retta di calibrazione, ottenuta riportando le aree cromatografiche in funzione delle rispettive concentrazioni degli standard di butano.

Figura 6.1: Retta di Calibrazione per il Butano



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 il valore del coefficiente di calibrazione trovato in precedenza e li converte (tramite i pesi molecolari) in quelli espressi in area L mg⁻¹.

Tabella 6.3: Valori del coefficiente di calibrazione per il Butano

	PM [mg / mmol]	Coeff. Calibrazione [Area mmol / L]	Coeff. Calibrazione [Area mg / L]
Butano	58	890.57	15.35

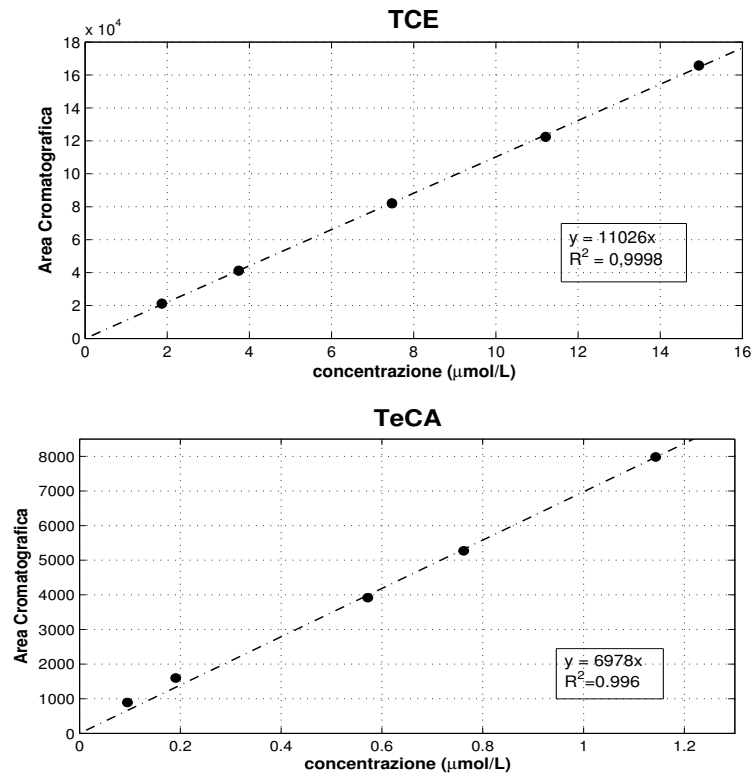
Per la calibrazione del tricloroetilene e del 1,1,2,2-tetracloroetano, sono state preparate delle soluzioni madre a concentrazione nota in esano. Per la preparazione della soluzione madre di TCE, si sono prelevati 500 µL del solvente puro, li si sono inseriti in un pallone da 125 mL e si è portato a 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 µL 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_{TCE} [mL]	C_{gas} [mmol/L]	Area		V_{TeCA} [mL]	C_{gas} [mmol/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 µmol L⁻¹). La Tabella 6. 5 mostra i valori dei coefficienti di

Figura 6.2: Rette di calibrazione TCE e TeCA



calibrazione trovati in precedenza e li converte (tramite i pesi molecolari) in quelli espressi in area L mg⁻¹.

L'accuratezza del metodo di analisi viene stimata in termini di errore percentuale attraverso la messa appunto di carte di controllo. La carta di controllo viene costruita definendo un valore medio a cui saranno poi associati dei limiti 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 degli standard di controllo deve ricadere entro questi limiti affinchè la calibrazione possa essere considerata valida, altrimenti le misure stimate con quella calibrazione in uso non sono più statisticamente accettabili.

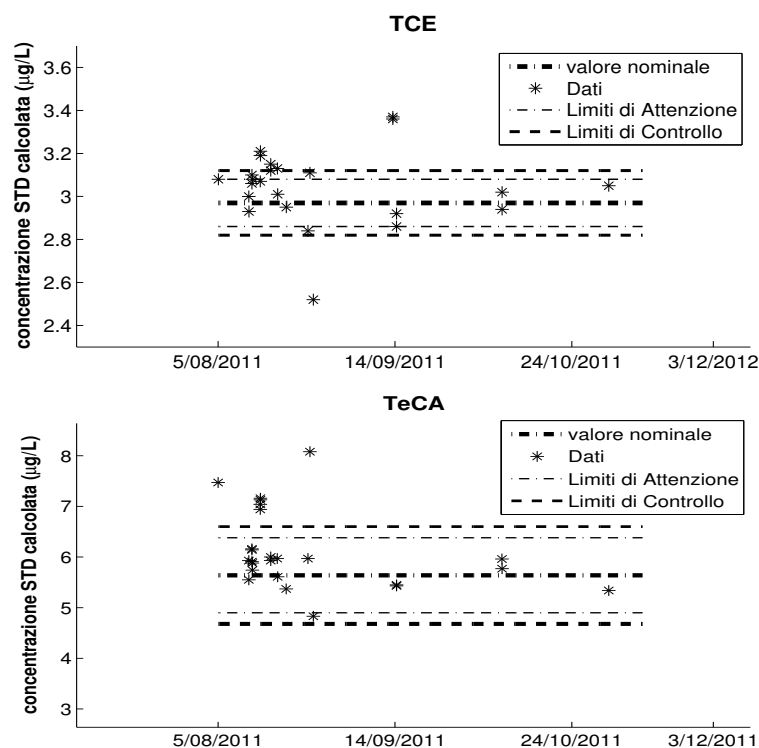
Nel nostro caso le carte di controllo sono state costruite per i due solventi clorurati e gli standard sono stati preparati in modo da ottenere concentrazioni di entrambi gli anilitti comprese nel range utilizzato per effettuare la calibrazione. Le concentrazioni nominali scelte risultano pari a 2,97 µg/L per il TCE e 5,64 µg/L per il TeCA. Nei grafici di Figura 6.3 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

Tabella 6.5: Valori del coefficiente di calibrazione per TCE e TeCA

	PM [mg / mmol]	Coeff. Calibrazione [Area mmol / L]	Coeff. Calibrazione [Area mg / L]
TCE	131.35	11026	83947
TeCA	167.85	6978.0	41573

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.

Figura 6.3: Carte di controllo dei due solventi clorurati



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 pre-

parazione 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	25.82

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 (Tabella 6. 8).

Tabella 6.7: Standard dei solventi clorurati preparati per le calibrazioni

Standard TCE							
Sol. Madre 1			Sol. Madre 2				
	V_{TCE} [μL]	C_{gas} [mg/L]	Area		V_{TCE} [μL]	C_{gas} [mg/L]	Area
A	80	0.192	6556.2	E	250	2.396	97491.2
B	100	0.240	7444.6	F	500	4.79	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_{TCE} [μL]	C_{gas} [mg/L]	Area		V_{TCE} [μL]	C_{gas} [mg/L]	Area
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.

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

Figura 6.4: Rette di calibrazione per TCE e TeCA - modalità automatica

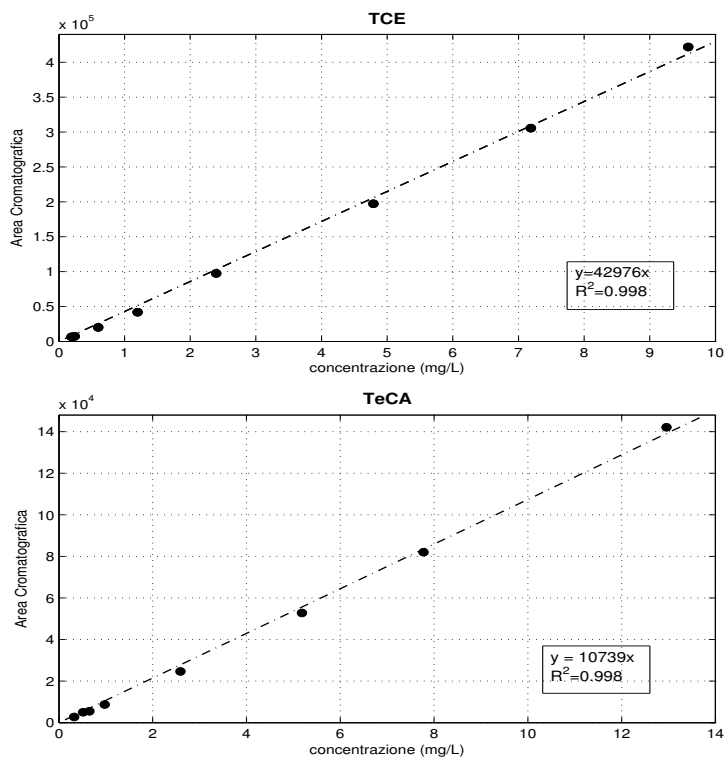


Tabella 6.8: Coefficienti di calibrazione dei solventi clorurati usati

	Coeff. Calibrazione [Area/mg/L]
TCE	42976
TeCA	10738

6.2 Analisi della Biomassa

Un dato molto importante per gli studi cinetici è la concentrazione di biomassa presente nel sistema considerato. Nel nostro caso si è dovuta determinare la quantità di biomassa presente sotto due forme: come biomassa sospesa e come biomassa adesa ai supporti.

- *Biomassa sospesa*

Per quanto riguarda la biomassa sospesa è stato utilizzato uno spettrofotometro presente nel Laboratorio del DICMA per ottenere in prima approssimazione la concentrazione di biomassa, contemporaneamente un campione di biomassa è stato mandato al Dipartimento di Ingegneria Civile, Ambientale e dei Minerali (DICAM) dove è stata effettuata l'analisi delle proteine seguendo il metodo di Lowry.

Lo spettrofotometro è uno strumento che misura la assorbanza o trasmittanza di un fascio di luce che attraversa un campione in soluzione. Esiste poi una relazione lineare tra assorbanza e concentrazione di biomassa, che permette appunto di risalire a quest'ultima a partire dal valore che viene emesso dallo strumento. La semplicità e velocità di utilizzo dello spettrofotometro fa sì che sia molto utile per avere una prima stima della presenza di microorganismi, i principali limiti sono però il fatto di non poter distinguere tra organismi vivi e morti e la perdita della linearità tra assorbanza e concentrazione quando questa raggiunge valori alti.

Il metodo di Lowry, 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 (Cu²⁺), il legame peptidico delle proteine complessano lo ione, che viene ridotto a rame monovalente. Il rame monovalente formato reagisce con il reattivo di Folin-Ciocalteu (reattivo fosfo-tungstico-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).

- *Biomassa adesa*

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, dopodiché si procede con il dosaggio tramite il metodo di Lowry.

6.3 Allestimento di microcosmi

Sia per il lavoro di selezione e mantenimento del consorzio B4, così come per la realizzazione delle prove cinetiche è necessario una strumentazione che permetta di verificare la presenza di diversi elementi (substrato, solventi, ossigeno) e di monitorarne l'andamento nel tempo dopo che questi sono stati aggiunti al sistema.

Figura 6.5: Schema di allestimento di un microcosmo



Per microcosmo si intende un piccolo bioreattore fed-batch costituito da un recipiente (figura 6.5), in cui viene inserito un volume noto di acqua di falda oppure direttamente un inoculo di biomassa, tale da lasciare uno spazio di testa, che permetta l'inserimento di substrati e di micro e macro-nutrienti. La vial viene 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. 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:

$$m_i = m_{i,g} + m_{i,l} \quad (6.1)$$

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:

$$m_{i,g} = c_{i,g} \cdot PM_i \cdot V_g \quad (6.2)$$

$$P_i = H_i \cdot c_{i,l} \quad (6.3)$$

$$P_i = \frac{n_{i,g}}{V_g} \cdot RT \quad (6.4)$$

$$c_{i,g} = \frac{H_i}{RT} \cdot c_{i,l} \quad (6.5)$$

$$c_{i,g} = \frac{\text{Area}}{f_{\text{cal}}} \quad (6.6)$$

da cui segue:

$$c_{i,l} = \frac{\text{Area}}{H_i^\circ \cdot f_{\text{cal}}} \quad (6.7)$$

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

Capitolo 7

Studi Cinetici

L'obiettivo finale di una prova cinetica è la determinazione dei parametri presenti nel modello teorico che nel nostro è, come anticipato nel paragrafo 3.2.2, il modello di Monod con inibizione competitiva, dove i parametri da determinare sono q_{\max} , K_s e K_i .

Il modello cinetico mette in relazione la concentrazione del substrato con la velocità iniziale di consumo di questo e la prova, dal punto di vista sperimentale, consiste quindi nella determinazione delle diverse velocità iniziali di degradazione in funzione delle diverse concentrazioni presenti in ogni microcosmi. I dati ottenuti verranno poi trattati con un metodo di regressione che porta alla stima dei parametri cinetici che permettono una migliore adattabilità dei dati sperimentali al modello teorico.

7.1 Studi cinetici preliminari

Prima di procedere con le prove cinetiche, sono state effettuate sia per il butano che per il TCE due prove cinetiche preliminari con l'obiettivo di valutare l'eseguitività delle prove cinetiche vere e proprie. Sono state quindi allestiti due vials da 19 mL con 7 mL di coltura B4 prelevata dal fermentatore, flussate in ossigeno puro, alle quali sono stati aggiunti due determinati volumi di butano corrispondenti alle concentrazioni limite della prova cinetica che sarà effettuata in seguito. Per quanto riguarda il TCE si è deciso di testare, oltre all'effettiva degradazione del solvente in tempi ragionevoli, anche l'assenza di altri fenomeni secondari abiotici che in scala di laboratorio potrebbero contribuire alla diminuzione di TCE nelle vials. Per valutare l'importanza dei fenomeni di adsorbimento sul tappo e sulle cellule è stato confrontato l'andamento del TCE in due vials: la prima contenente B4 e TCE ad una concentrazione media rispetto al range che sarà utilizzato nella prova, la seconda contenente un inoculo di B4 neutralizzato da Sodio Azide e TCE. Per assicurarsi infine l'as-

senza di reazioni chimiche secondarie del TCE sono state allestite due ulteriori vials senza inoculo del consorzio B4: nella prima è stato poi aggiunto solo TCE mentre nella seconda oltre al composto clorurato è stata effettuata un'iniezione di Sodio Azide. Lo schema 7.1 e il grafico in Figura 7.1 a seguire si riferiscono alla prova preliminare sul TCE, mentre la Tabella 7.2 mostra un confronto tra le velocità di degradazione nelle diverse prove.

Tabella 7.1: Schema prova cinetica preliminare TCE

Sigla Prova	Inoculo	conc. iniziale	V vial	V liquido	V gas	Massa di solvente da introdurre	Vol. di soluzione madre da introdurre	Sodio Azide
		$\mu\text{mol/L}$ (acq)	mL	mL	mL	μg	μL	mL
B4-TCE	vivo	42.26	119	40	79	440	400	0
B4-NaN₃-TCE	morto	42.26	119	40	79	440	400	1,2
H₂O-NaN₃-TCE	acqua	42.26	119	40	79	440	400	1,2
H₂O-TCE	acqua	42.26	119	40	79	440	400	0

Figura 7.1: Andamento TCE durante la prova cinetica preliminare

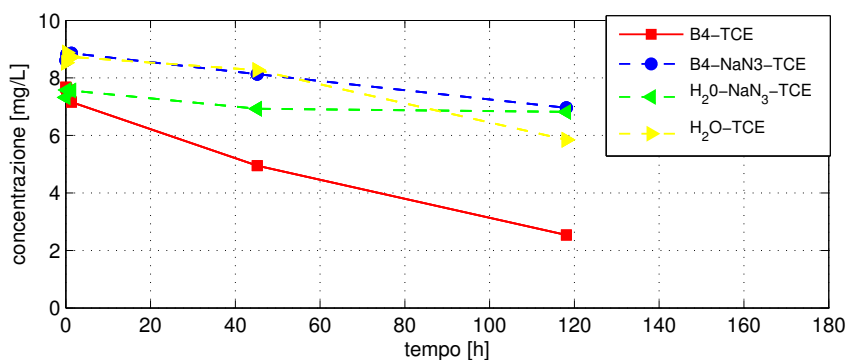


Tabella 7.2: Velocità di degradazione - prova cinetica preliminare TCE

Sigla	Velocità di degradazione		K di primo ordine 1/d
	mg/L/h	mg/L/d	
B4 - TCE	0.04	1.029	0.134
B4 - NaN₃- TCE	0.015	0.366	0.043
H₂O - NaN₃- TCE	0.006	0.144	0.020
H₂O - TCE	0.024	0.566	0.066

7.2 Allestimento e sviluppo delle prove cinetiche per il consumo di Butano e TCE

Prove Cinetiche senza inibizione

L'obiettivo di queste prove è quello di stimare i parametri q_{max} e K_s senza considerare i fenomeni di inibizione competitiva dovuti alla presenza di un altro composto che si lega allo stesso sito attivo del primo durante il processo di degradazione. Verrà quindi testata la degradazione alternativamente di ognuno dei due substrati in presenza di biomassa attiva.

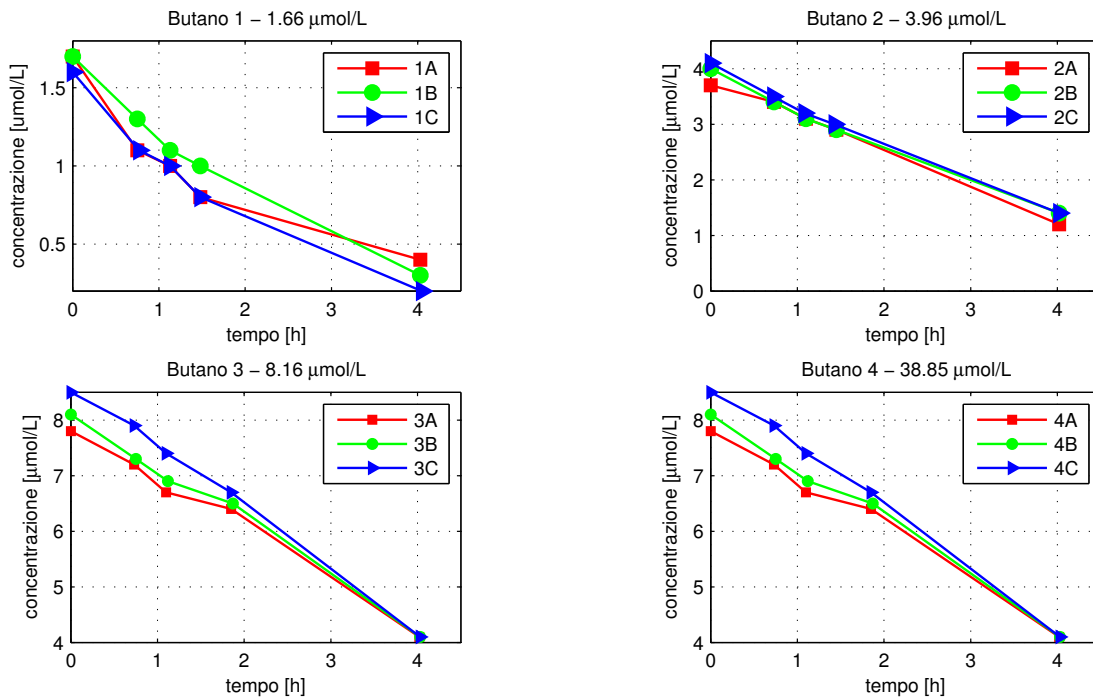
Per prima cosa sono state selezionate dieci diverse concentrazioni per il butano, come rappresentato dalla Tabella 7.3, ognuna delle quali corrispondente a un determinato volume di butano da iniettare. In seguito sono state allestite trenta vials da 11.6 mL contenenti 5 mL di inoculo del consorzio B4 prelevato dal fermentatore. Ogni concentrazione di butano è stata iniettata in triplicato per minimizzare gli errori sperimentali. Le trenta vials sono poi state analizzate a ripetizione per diverse ore fino ad ottenere i grafici che rappresentano l'andamento della butano alle diverse concentrazioni (Figura 7.2). La pendenza iniziale di questi grafici rappresenta appunto la velocità di degradazione iniziale per ogni concentrazione.

Per il TCE sono state scelte solamente otto diverse concentrazioni, questo perchè per ogni concentrazione è stato necessario aggiungere un controllo negativo, cioè una vial con TCE e inoculo morto (neutrazlizzato con sodio azide), per assicurarsi che i fenomeni di natura abiotica presentati nel paragrafo precedente fossero trascurabili rispetto al consumo dovuto all'attività biologica. Analogamente a quanto fatto per il butano, per ogni concentrazione sono state allestite tre vials da 116 mL con 40 mL di inoculo dal fermentatore, oltre al controllo negativo, e le 32 vials sono poi state analizzate al gascromatografo per ottenere i grafici di Figura 7.3 mentre nella Tabella 7.4 è rappresentato lo schema delle aggiunte di TCE.

Tabella 7.3: Schema prova cinetica Butano

Sigla	Concentrazione iniziale attesa			V vials	V liq	V gas	Massa di Butano da aggiungere	Vol di Butano da aggiungere
	$\mu\text{mol/L}$ (acq)	$\mu\text{g/L}$ (acq)	$\mu\text{g/L}$ (gas)					
BUT 1 a-b-c	1.4	79	3473	11.6	5	6.6	23.3	10
BUT 2 a-b-c	3.4	197	8682	11.6	5	6.6	58.3	25
BUT 3 a-b-c	6.8	395	17364	11.6	5	6.6	116.6	50
BUT 4 a-b-c	13.6	789	34728	11.6	5	6.6	233.2	100
BUT 5 a-b-c	34.0	1973	86820	11.6	5	6.6	582.9	250
BUT 6 a-b-c	68.0	3946	173641	11.6	5	6.6	1165.8	500
BUT 7 a-b-c	108.9	6314	277825	11.6	5	6.6	1865.2	800
BUT 8 a-b-c	163.3	9471	416737	11.6	5	6.6	2797.8	1200
BUT 9 a-b-c	217.7	1268	555650	11.6	5	6.6	3730.4	1600
BUT 10 a-b-c	272.2	15785	694562	11.6	5	6.6	4663.0	2000
BUT 11 a-b-c	476.3	27625	1215484	11.6	5	6.6	8160.3	3500
BUT 12 a-b-c	680.4	39464	1736405	11.6	5	6.6	11657.6	5000
BUT 13 a-b-c	816.5	47357	2083686	11.6	5	6.6	13989.1	6000

Figura 7.2: Grafici dell'andamento del Butano nel tempo - prova cinetica Butano



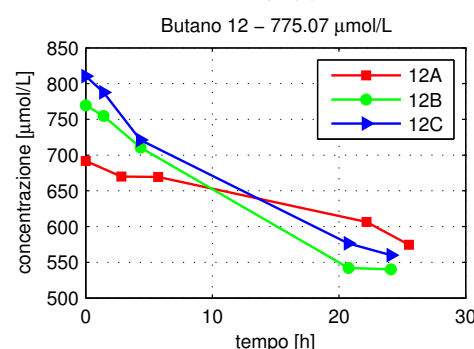
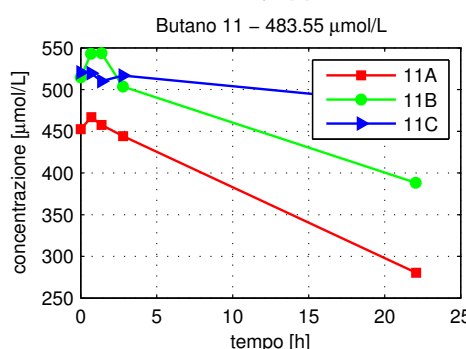
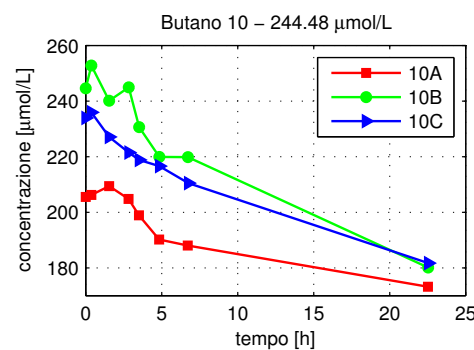
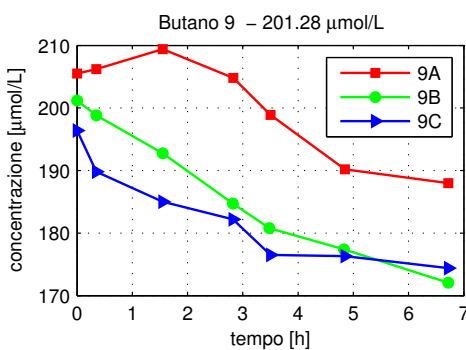
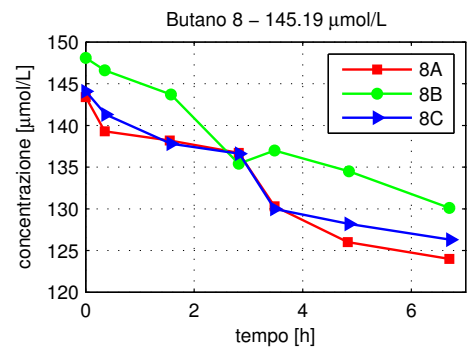
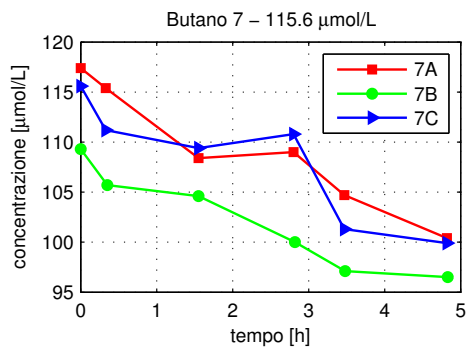
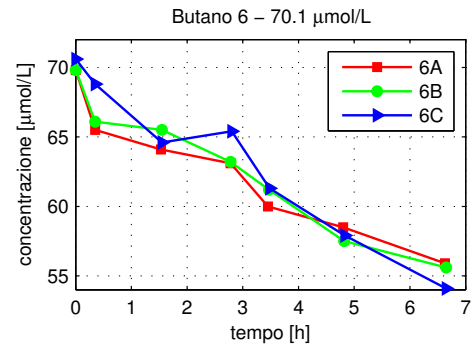
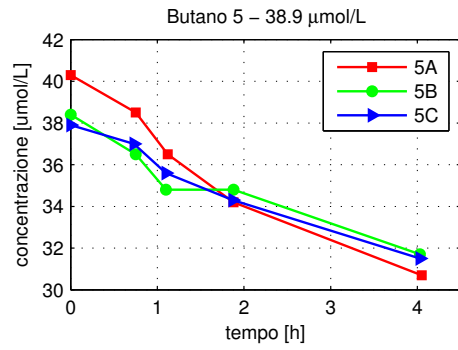
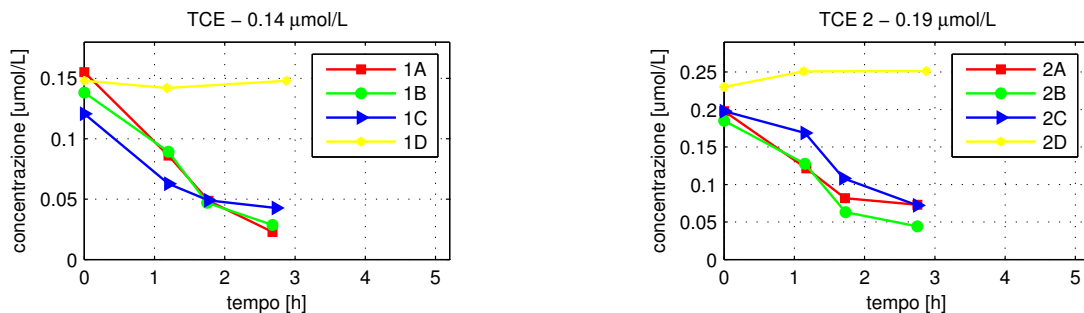
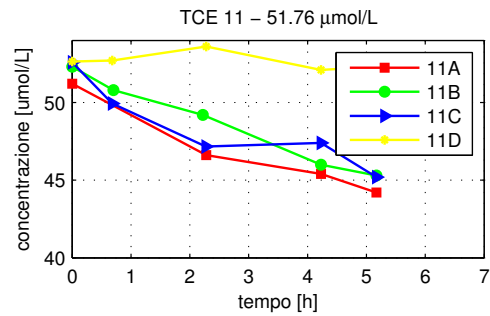
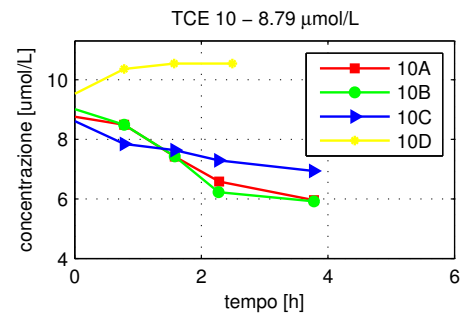
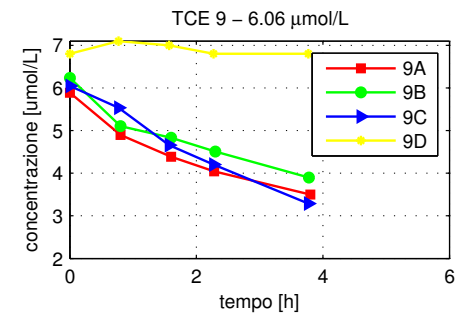
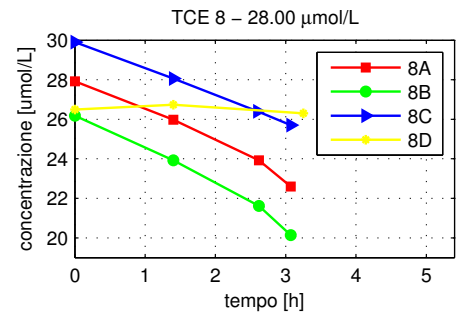
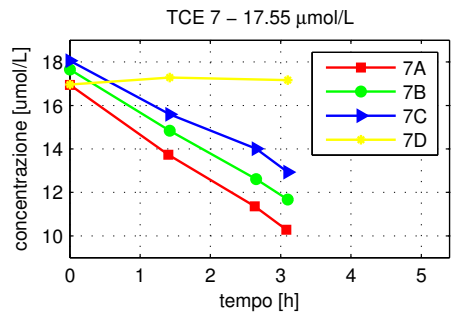
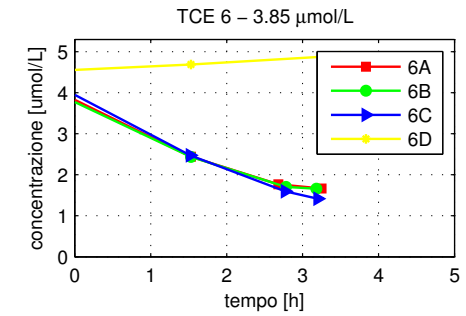
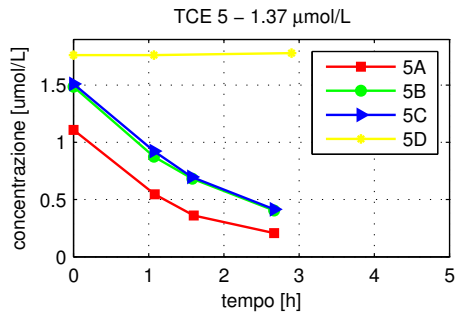
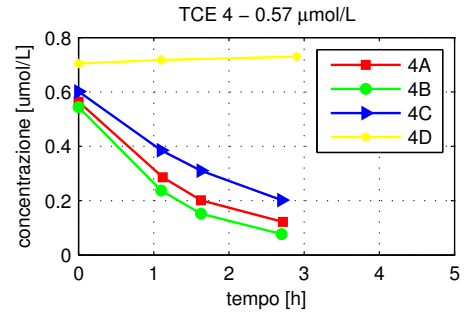
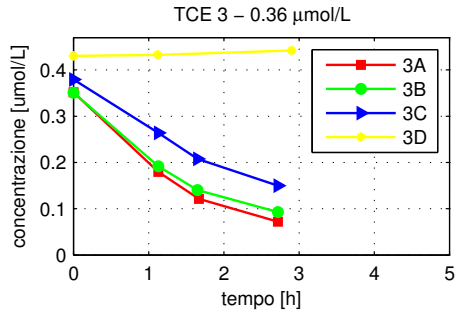


Tabella 7.4: Schema prova cinetica TCE

Sigla	Concentrazione iniziale attesa			V vials	V liq	V gas	Massa di Butano da aggiungere	Vol di Butano da aggiungere	Sodio Azide
	$\mu\text{mol/L}$ (acq)	$\mu\text{g/L}$ (acq)	$\mu\text{g/L}$ (gas)						
TCE 1 a-b-c	1.1	141	70	116	40.01	75.99	11.0	10.00	0
TCE 1 d	1.1	140	70	116	41.21	74.79	11.0	10.00	1.2
TCE 2 a-b-c	2.2	283	141	116	40.02	75.98	22.0	20.00	0
TCE 2 d	2.1	281	139	116	41.22	74.78	22.0	20.00	1.2
TCE 3 a-b-c	4.3	566	281	116	40.04	75.96	44.0	40.00	0
TCE 3 d	4.3	561	279	116	41.24	74.76	44.0	40.00	1.2
TCE 4 a-b-c	7.5	990	492	116	40.07	75.93	77.0	70.00	0
TCE 4 d	7.5	982	488	116	41.27	74.73	77.0	70.00	1.2
TCE 5 a-b-c	21.5	2825	1404	116	40.20	75.8	220.0	200.00	0
TCE 5 d	21.3	2803	1393	116	41.40	74.6	220.0	200.00	1.2
TCE 6 a-b-c	53.7	7049	3503	116	40.50	75.5	550.0	500.00	0
TCE 6 d	53.3	6995	3477	116	41.70	74.3	550.0	500.00	1.2
TCE 7 a-b-c	212.6	27927	13880	116	42.00	74	2200.0	2000.00	0
TCE 7 d	211.0	27714	13774	116	43.20	72.8	2200.0	2000.00	1.2
TCE 8 a-b-c	368.5	48408	24059	116	43.50	72.5	3850.0	3500.00	0
TCE 8 d	365.8	48043	23878	116	44.70	71.3	3850.0	3500.00	1.2
TCE 9 a-b-c	8.6	1131	562	116	40.08	75.92	88.0	80.00	0
TCE 9 d	8.5	1122	558	116	41.28	74.72	88.0	80.00	1.2
TCE 10 a-b-c	12.9	1696	843	116	40.12	75.88	132.0	120.00	0
TCE 10 d	12.8	1683	836	116	41.32	74.68	132.0	120.00	1.2
TCE 11 a-b-c	64.4	8454	4201	116	40.60	75.4	660.0	600.00	0
TCE 11 d	63.9	8389	4169	116	41.80	74.2	660.0	600.00	1.2

Figura 7.3: Grafici dell'andamento del TCE nel tempo - prova cinetica TCE





Durante il monitoraggio delle vials attraverso analisi cromatografiche, oltre a Butano e TCE, è stata ovviamente controllata anche la presenza di ossigeno in quantità tali da non risultare un agente limitante nel processo.

Le concentrazioni iniziali presenti negli schemi delle prove cinetiche (Tabelle 7.3 e 7.4) rappresentano le concentrazioni attese e cioè le concentrazioni che teoricamente si volevano ricreare all'interno dei microcosmi. Tuttavia a causa di errori sperimentali e di possibili problemi relativi alle soluzioni sature dei solventi clorurati le concentrazioni realmente presenti nelle vials sono risultate differenti e sono elencate nella Tabelle 7.6 e 7.7 sulla rielaborazione dei dati ottenuti dalle cinetiche.

Propria a causa di questi errori sperimentali non è stato possibile ottenere le velocità di degradazione dei substrati all'interno di tutto il range di concentrazioni di interesse. Per superare questo problema è stata effettuata un'ulteriore prova cinetica, sia per il Butano che per il TCE, attraverso la quale è stato possibile integrare i punti delle prime prove cinetiche in corrispondenza dei valori di concentrazione mancanti. I dati della prova di integrazione sono anch'esse rappresentati nelle Tabelle 7.4 e 7.5 caratterizzati rispettivamente delle sigle But11,12,13 per il Butano e TCE9,10,11 per il TCE.

Prove cinetiche con inibizione

Come mostra la tabella 7.5, in queste prove sono stati iniettati entrambi i substrati in vials sterili da 119 mL in cui erano presenti 60 mL di consorzio B4 prelevato dal fermentatore per la prova del Butano e 10 mL per quanto riguarda la prova sul TCE. Sei differenti concentrazioni di Butano e TCE sono state scelte e iniettate in triplicato insieme ad una concentrazione costante del substrato inibente, rispettivamente 0,5 mg/L di TCE per la prova butano inibito da TCE e 1,15 mg/L di Butano per la prova cinetica del TCE inibito da Butano. Per ogni concentrazione è stato inoltre allestito un controllo negativo contenente biomassa uccisa con NaN_3 . Per avere un riscontro immediato della presenza di inibizione e della conseguente riduzione della velocità di degradazione sono state preparate e analizzate altre tre vials contenenti biomassa attiva e il substrato oggetto di studio senza la presenza di quello inibente.

Attraverso le analisi cromatografiche è stato poi possibile determinare il profilo delle concentrazioni di Butano e TCE in presenza di inibizione e si è cercato di mantenere costante la concentrazione del composto inibente effettuando delle aggiunte ogni volta che questo raggiungeva un valore inferiore al 90% di quello iniziale.

Tabella 7.5: Schema prove cinetiche con inibizione

Sigla	Concentrazione iniziale attesa			V vials	V liq	V gas	Massa di Butano da aggiungere	Vol di Butano da aggiungere
	$\mu\text{mol/L}$ (acq)	$\mu\text{g/L}$ (acq)	$\mu\text{g/L}$ (gas)					

Prova Butano inibito da TCE - $C_{TCE}=0.5$ mg/L

BUT 1 a-b-c-d	7.6	439	19312	119	60	59	1165.8	500
BUT 2 a-b-c-d	42.4	2458	108149	119	60	59	6528.3	2800
BUT 3 a-b-c-d	113.5	6584	289684	119	60	59	17486.4	7500
BUT 4 a-b-c-d	196.8	11412	502119	119	60	59	30309.7	13000
BUT 5 a-b-c-d	484.3	28091	1235986	119	60	59	74608.6	32000
BUT 6 a-b-c-d	484.3	28091	1235986	119	60	59	74608.6	32000

Prova TCE inibito da Butano - $C_{But}=1.15$ mg/L

TCE 1 a-b-c-d	1.30	171	85	119	10.01	108.99	11.0	10
TCE 2 a-b-c-d	2.6	343	170	119	10.02	108.98	22.0	20
TCE 3 a-b-c-d	6.5	857	426	119	10.05	108.95	55.0	50
TCE 4 a-b-c-d	18.2	2397	1191	119	10.14	108.86	154.0	140
TCE 5 a-b-c-d	33.8	4448	2210	119	10.26	108.74	286.0	260
TCE 6 a-b-c-d	52	6835	3397	119	10.40	108.6	440.0	400

7.3 Stima dei parametri presenti nel modello cinetico

Stima di q_{\max} e K_s di Butano e TCE

Per la stima di q_{\max} e K_s per il butano e TCE si fa riferimento ai dati ottenuti nelle prove cinetiche non inibite (Figure 7.2,7.3). Dai grafici che rappresentano l'andamento del substrato nel tempo è possibile ricavare con una regressione lineare le pendenze nei punti iniziali della curva, le medie delle pendenze su ogni triplicato corrispondono alle velocità iniziali di consumo nella fase liquida. Da queste, applicando la legge di Henry, possiamo risalire alle velocità iniziali di degradazione del butano sia nella fase liquida che in quella gassosa, per ottenere infine le velocità di consumo specifiche normalizzando per la concentrazione di biomassa (Tabella 7.6,7.7). A questo punto possiamo rappresentare in un grafico, per ogni substrato, le velocità specifiche iniziali in funzione delle corrispondenti concentrazioni (Figura 7.4,7.5). Effettuando infine un'analisi della regressione ai minimi quadrati, sui punti precedentemente ottenuti, rispetto a una funzione teorica del tipo $y = \frac{q_{\max} \cdot x}{K_s + x}$ è possibile trovare i valori di q_{\max} e K_s che meglio approssimano il modello teorico ai nostri dati sperimentali.

Si presenta infine la necessità di stabilire la qualità dei valori di concentrazione misurati e delle velocità specifiche ricavate. Per stimare l'intervallo di confidenze del 95 % si può usare la distribuzione di student dopo aver determinato per ogni triplicato la deviazione standard σ . Facendo riferimento alla tavola di distribuzione di Student si può trovare che alla probabilità $p=0.95$ per un problema a 3 gradi di libertà il valore critico riportato è 3.1824 che ci permette di definire, per ogni triplicato, l'errore da associare alla media come:

$$e_i = 3.1824 \frac{\sigma_i}{\sqrt{3}}$$

Tabella 7.6: Velocità iniziali specifiche di degradazione del Butano

Sigla	Conc. iniziale	Massa Butano consumata	R iniz. But	R iniz. But / X	
	[mg/L]	[μ mol/L]	[μ mol]	[μ mol/L/d]	
				[μ mol/mg _{prot} /d]	
<i>Prova cinetica Butano 27/03/2012 - Conc. Biomassa = 0.088 mg_{prot}/mL</i>					
BUT 1 abc	0.10	1.66	0.49	439.3	5.01
95% IC	0.01	0.13	0.04	74.6	0.85
BUT 2 abc	0.23	3.96	1.17	918	10.47
95% IC	0.02	0.36	0.11	18.9	0.22
BUT 3 abc	0.47	8.16	2.41	1422	16.22
95% IC	0.04	0.62	0.18	253.7	2.89
BUT 5 abc	2.25	38.85	11.48	2376	27.10
95% IC	0.002	2.34	0.69	447.2	5.10
BUT 7 abc	6.62	114.12	33.71	4078	46.51
95% IC	452.9	7.81	2.31	1033.4	11.79
BUT 8 abc	8.42	145.19	42.89	4373	49.88
95% IC	0.03	4.62	1.36	124.9	1.42
BUT 9 abc	11.67	201.28	59.46	5128	58.49
95% IC	521.2	8.99	2.65	1665.9	19.00
BUT 10 abc	14.5	249.86	73.81	5928	67.61
95% IC	0.14	23.50	6.94	622.5	7.10
<i>Completamento Cinetica 10/05/2012- Conc. Biomassa = 0.176 mg_{prot}/mL</i>					
BUT 11 abc	28.05	483.55	142.84	10589	60.31
95% IC	0.47	80.94	23.91	3191.8	18.18
BUT 12 abc	44.95	775.07	228.96	13322	75.88
95% IC	0.42	71.87	21.23	2002.2	11.40
BUT 13 abc	48.05	828.40	244.71	12532	71.38
95% IC	0.29	50.11	14.80	5480.1	31.21

Tabella 7.7: Velocità iniziali specifiche di degradazione del TCE

Sigla	Conc. iniziale	Massa Butano consumata	R iniz. But	R iniz. But / X	
	[mg/L]	[μ mol/L]	[μ mol]	[μ mol/L/d]	
				[μ mol/mg _{prot} /d]	
<i>Prova cinetica Butano 3/04/2012 - Conc. Biomassa = 0.140 mg_{prot}/mL</i>					
BUT 1 abc	18.1	0.14	0.011	1.901	0.014
95% IC	4.2	0.03	0.002	0.935	0.007
BUT 2 abc	25.4	0.19	0.015	2.319	0.017
95% IC	1.8	0.01	0.001	0.326	0.002
BUT 3 abc	47.4	0.36	0.028	4.435	0.032
95% IC	3.9	0.03	0.002	0.786	0.006
BUT 4 abc	74.9	0.57	0.04	7.532	0.054
95% IC	0.002	2.34	0.69	447.2	0.008
BUT 5 abc	179.8	1.37	0.106	17.967	0.129
95% IC	54.5	0.41	0.03	3.428	0.025
BUT 6 abc	505.5	3.85	0.299	33.556	0.240
95% IC	21.4	0.16	0.013	5.872	0.042
BUT 7 abc	2306.1	17.55	1.365	87.742	0.609
95% IC	136.0	1.03	0.080	23.137	0.166
BUT 8 abc	3679.4	28.00	2.178	77.227	0.529
95% IC	448.9	3.42	0.266	23.731	0.170
<i>Completamento Cinetica 10/05/2012- Conc. Biomassa = 0.176 mg_{prot}/mL</i>					
BUT 9 abc	795.9	6.06	0.471	54.441	0.304
95% IC	42.0	0.32	0.025	25.058	0.143
BUT 10 abc	1167.5	8.89	0.691	65.226	0.367
95% IC	49.0	0.37	0.029	51.958	0.296
BUT 11 abc	6880.0	52.36	2.517	97.085	0.553
95% IC	49.1	0.37	0.273	18.383	0.105

Figura 7.4: Stima di q_{max} e K_S del Butano

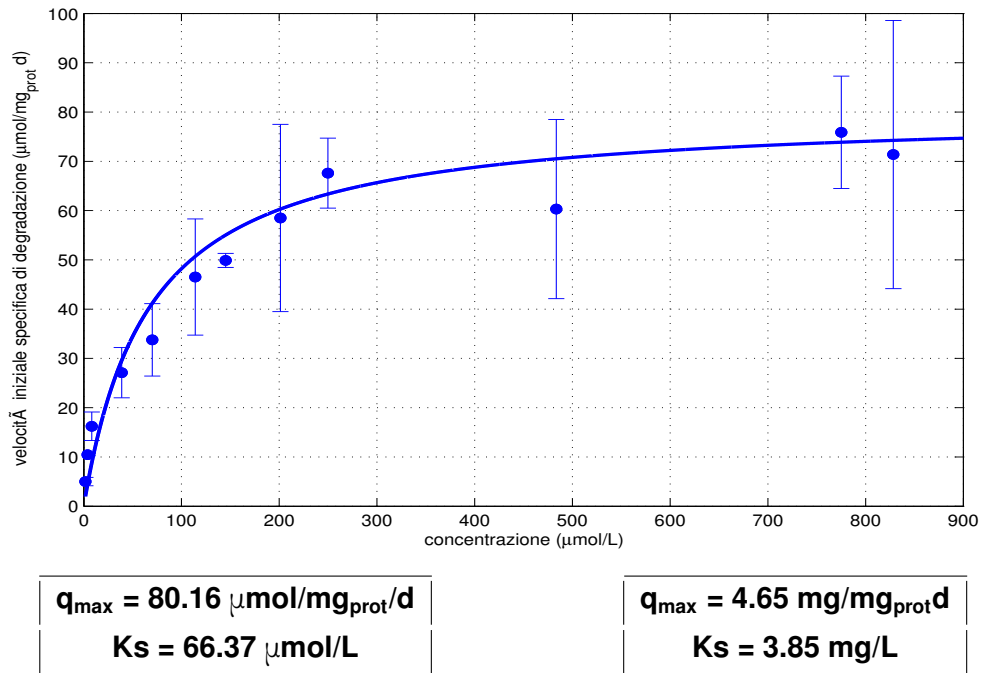
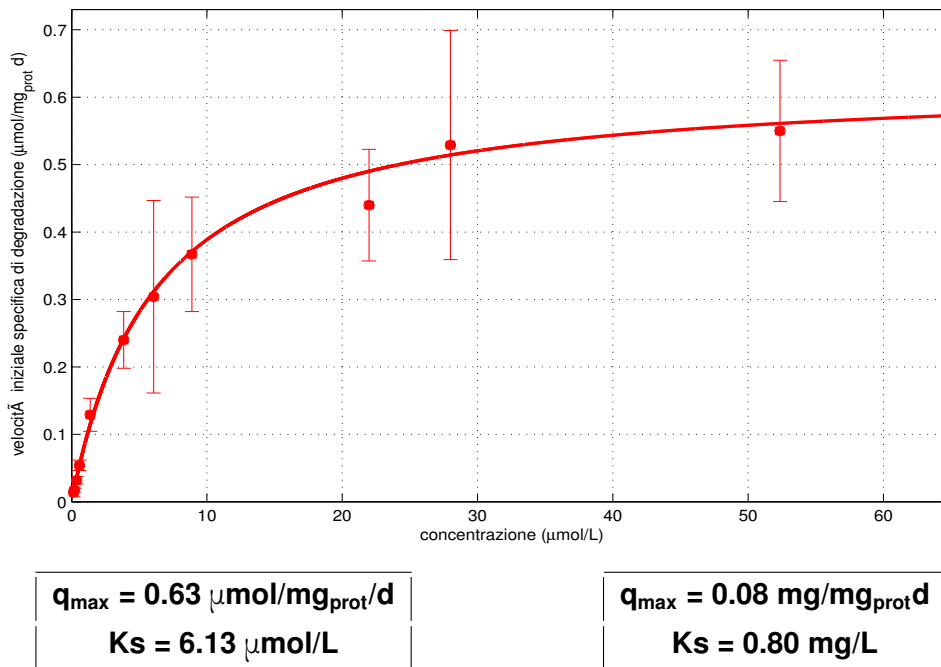


Figura 7.5: Stima di q_{max} e K_S del TCE



Stima di Ki di butano e TCE

Il procedimento per la stima delle costanti di inibizione è analogo a quello per q_{max} e K_s . La Tabelle 7.8,7.9 mostrano come si siano derivate le velocità iniziali a partire dai grafici alle diverse concentrazioni per ogni substrato. Come in precedenza, le velocità verranno rappresentate in funzione della concentrazione e si effettuerà un'analisi della regressione dei punti questa volta rispetto a una funzione teorica del tipo $y = \frac{q_{max} * x}{K_s * (1 + \frac{C_{i,sub}}{K_{i,sub}}) + x}$ dove q_{max} e K_s sono i valori stimati nella sezione precedente mentre $C_{i,sub}$ è la concentrazione del substrato inibente mantenuta costante durante la prova (rispettivamente 0,5 mg/L di TCE per la prova butano inibito da TCE e 1,15 mg/L di Butano per la prova cinetica del TCE inibito da Butano). La costante di inibizione K_i risulta quindi l'unico parametro da stimare con una regressione ai minimi quadrati, come mostrato nelle Figure 7.6,7.7, dove viene anche evidenziata la riduzione delle velocità dovuti ai fenomeni di inibizione rispetto al caso senza inibizione rappresentato con una linea tratteggiata.

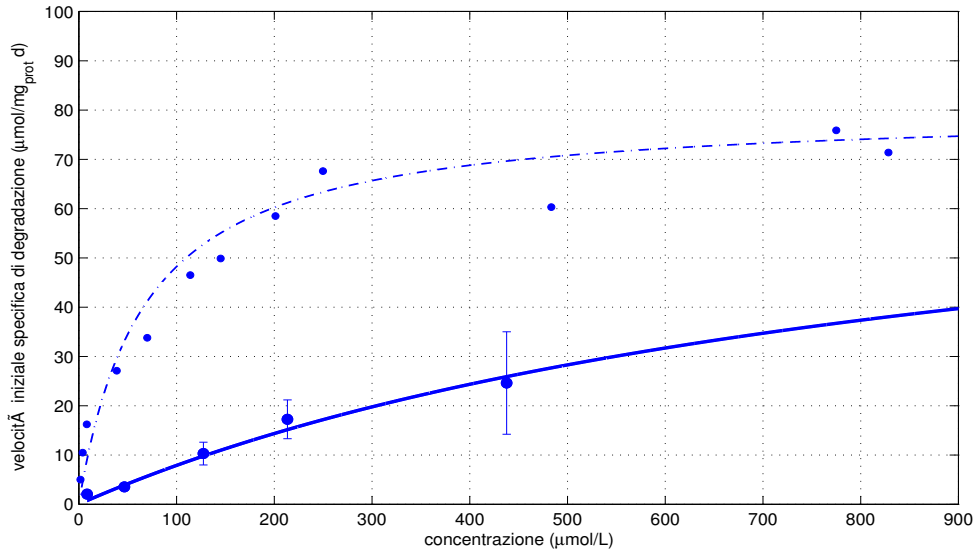
Tabella 7.8: Velocità di degradazione ottenute dalla prova cinetica del Butano inibito da TCE

Conc. Biomassa nelle vials = 0.234 mg_{prot}/mL

Conc. TCE inibente = 0.5 mg/L

Sigla	Conc. iniziale		Massa Butano consumata	R iniziale Butano	R iniz. But / X
	[mg/L]	[μmol/L]	[μmol]	[μmol/L/d]	[μmol/mg _{prot} /d]
BUT 1 abc	0.49	8.59	22.82	612	2.04
95% IC	0.01	0.24	0.65	96.7	0.41
BUT 2 abc	2.70	46.62	123.82	834	3.53
95% IC	0.12	2.15	5.71	163.0	0.70
BUT 3 abc	7.40	127.53	338.73	2412	10.29
95% IC	0.38	6.59	17.50	540.3	2.31
BUT 4 abc	12.39	213.5	567.23	4032	17.25
95% IC	0.15	2.54	6.75	920.1	3.94
BUT 5 abc	25.39	437.81	1162.81	9412	24.60
95% IC	2.6	45.62	121.16	2428.0	10.39

Figura 7.6: Stima di $K_{i,TCE}$ a partire dai dati sperimentali



$$K_{i,TCE} = 1.33 \mu\text{mol/L}$$

$$K_{i,TCE} = 0.08 \text{ mg/L}$$

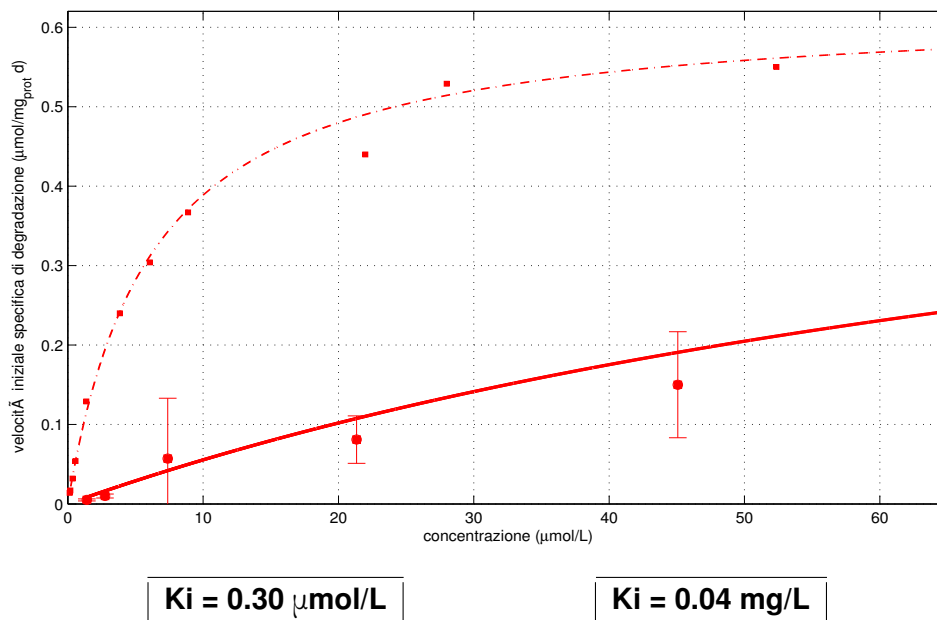
Tabella 7.9: Velocità di degradazione ottenute dalla prova cinetica del TCE inibito da Butano

Conc. Biomassa nelle vials = 0.234 mg_{prot}/mL

Conc. Butano inibente = 1.15 mg/L

Sigla	Conc. iniziale		Massa TCE consumata	R iniziale TCE	R iniz. TCE / X
	[mg/L]	[μmol/L]	[μmol]	[μmol/L/d]	[μmol/mg _{prot} /d]
TCE 1 abcd	0.49	8.59	22.82	612	2.04
95% IC	0.01	0.24	0.65	96.7	0.41
TCE 2 abcd	2.70	46.62	123.82	834	3.53
95% IC	0.12	2.15	5.71	163.0	0.70
TCE 3 abcd	7.40	127.53	338.73	2412	10.29
95% IC	0.38	6.59	17.50	540.3	2.31
TCE 4 abcd	12.39	213.5	567.23	4032	17.25
95% IC	0.15	2.54	6.75	920.1	3.94
TCE 5 abcd	25.39	437.81	1162.81	9412	24.60
95% IC	2.6	45.62	121.16	2428.0	10.39

Figura 7.7: Stima di $K_{i,But}$ a partire dai dati sperimentali



7.4 Calcolo delle incertezze da associare ai parametri

Una volta determinati i parametri del modello cinetico attraverso la regressione ai minimi quadrati è importante determinarne la qualità con una procedura statistica per permetta di definire l'incertezza da associare ad ogni parametro. La procedura a cui si fa riferimento è un metodo approssimativo (Draper and Smith, 1985), già ampiamente utilizzato in altri campi, che può essere applicato anche nell'ambito delle cinetiche biologiche.

In generale l'incertezza del parametro stimato è proporzionale alla somma degli scarti al quadrato e inversamente proporzionale al quadrato della sensitività dei valori predetti dal modello conseguentemente a una perturbazione nei parametri stessi. L'errore quadratico medio (σ^2) è stato calcolato nel modo seguente:

$$\sigma^2 = \frac{1}{n - p} \cdot \text{SSE} \quad (7.1)$$

dove:

- SSE è la somma dei quadrati degli scarti
- n è il numero di punti sperimentali
- p è il numero di parametri da stimare

La sensitività del modello rispetto ai parametri è stata determinata attraverso l'approssimazione della derivata prima del modello rispetto ad ogni parametro. Ad esempio, per quanto riguarda q_{max} (sia per il substrato cometabolico che per quello primario) avremo il coefficiente di sensitività definito come segue:

$$\frac{\partial y_i^{pred}}{\partial q_{max}} \approx \frac{y_i^{pred}(q_{max} + \Delta q_{max}) - y_i^{pred}(q_{max})}{\Delta q_{max}} \quad (7.2)$$

Una misura della sensitività globale dei valori predetti dal modello, è una matrice $p \times p$, detta matrice di sensitività, nella quale la diagonale principale è composta dalla somma dei coefficienti di sensitività al quadrato riguardanti ogni singolo parametro, mentre le diagonali minori rappresentano la somma dei prodotti dei coefficienti di sensitività per ogni coppia di parametri. Di seguito viene riportata la matrice di sensitività per un problema a due parametri: q_{max} e K_S .

$$A = \begin{bmatrix} \sum_1^n \left(\frac{\partial y_i^{pred}}{\partial q_{max}} \right)^2 & \sum_1^n \left(\frac{\partial y_i^{pred}}{\partial q_{max}} \right) \cdot \left(\frac{\partial y_i^{pred}}{\partial K_S} \right) \\ \sum_1^n \left(\frac{\partial y_i^{pred}}{\partial q_{max}} \right) \cdot \left(\frac{\partial y_i^{pred}}{\partial K_S} \right) & \sum_1^n \left(\frac{\partial y_i^{pred}}{\partial K_S} \right)^2 \end{bmatrix} \quad (7.3)$$

L'errore standard di ogni parametro può essere infine ricavato dalla diagonale principale di una matrice V , detta matrice degli errori standard, legata ad A attraverso la relazione:

$$V = \sigma^2 \cdot A^{-1} \quad (7.4)$$

L'errore standard da associare al primo parametro sarà quindi $\sqrt{V_{11}}$ mentre le diagonali minori della matrice V possono essere utilizzate per stimare la correlazione tra i diversi parametri presenti nel modello. Generalmente un basso coefficiente di correlazione è apprezzabile in quanto definisce l'indipendenza dei diversi parametri presenti nel modello mentre un alto coefficiente di correlazione sancisce l'interdipendenza tra i parametri.

In conclusione l'intervallo di confidenza al 95 %, definito come la regione all'interno della quale si ha il 95 % di probabilità di trovare il valore stimato, può essere assunto per ogni parametro come $2 \cdot \sqrt{V_{11}}$. Nel caso di q_{\max} e K_S otteniamo:

$$q_{\max} = q_{\max} \pm 2 \cdot \sqrt{V_{11}} \quad (7.5)$$

$$K_S = K_S \pm 2 \cdot \sqrt{V_{22}} \quad (7.6)$$

Nella tabella seguente sono riassunti i risultati riguardanti gli studi cinetici comprensivi degli intervalli di confidenza al 95% calcolati come indicato sopra.

	q_{\max} mg/mg _{prot} d	K_S mg/L	K_i mg/L
Butano	4.6 ± 0.5	3.8 ± 1.8	0.040 ± 0.006
TCE	0.082 ± 0.002	0.80 ± 0.07	0.08 ± 0.02

Capitolo 8

Scelta del Supporto

Lo scopo ultimo del progetto è quello di realizzare un reattore a biomassa adesa, si presenta quindi la necessità di selezionare un supporto poroso sul quale fare crescere la biomassa e testarne le capacità degradative nei confronti dei solventi clorurati oggetto di studio. Sono stati quindi scelti quattro supporti comunemente usati come biofiltri per acquari e denominati Biomax, Biopearl, Cerambios e Biomech. Il primo passo è stato poi la caratterizzazione di questi supporti che viene mostrata nella tabella 8.1.

Figura 8.1: Supporti porosi selezionati

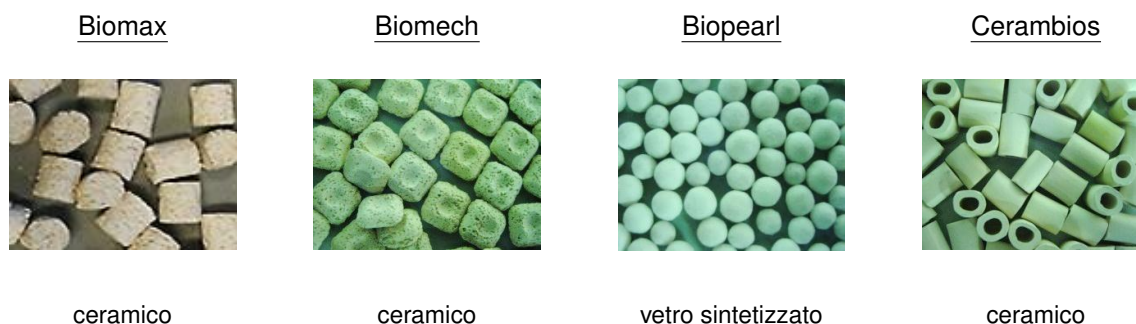


Tabella 8.1: Caratteristiche di peso e porosità dei supporti

	Porosità totale	Porosità interna	Porosità Esterna	Densità di bulk g/mL	Densità del solido g/mL	Peso medio g
BIOMAX	74%	10%	64%	0.950	2.535	1.735
BIOMECH	60%	30%	30%	0.658	1.646	0.823
BIOPEARL	64%	19%	45%	0.682	1.894	1.018
CERAMBIOS	58%	15%	43%	0.950	2.261	0.457

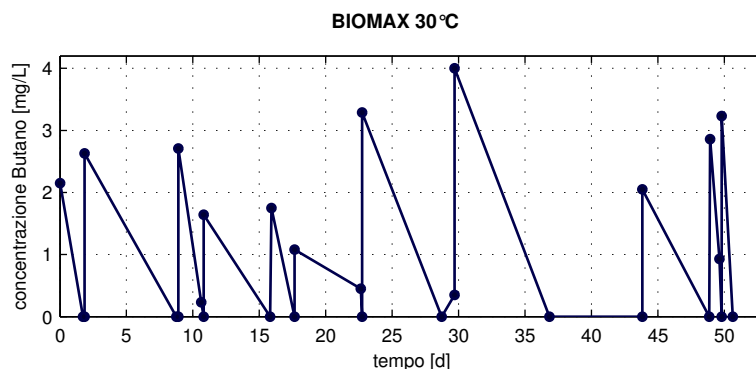
Nelle sezioni a seguire verranno presentate le differenti prove per la selezione del supporto, a partire dai test più generali per verificare l'effettiva tendenza del consorzio selezionato a formare un biofilm sui supporti per arrivare poi a descrivere le prove successive che hanno permesso un confronto tra i diversi supporti in termini di degradazione dei solventi e crescita di biomassa adesa su essi.

8.1 Test in bioreattori “batch” a 30°C e 15°C

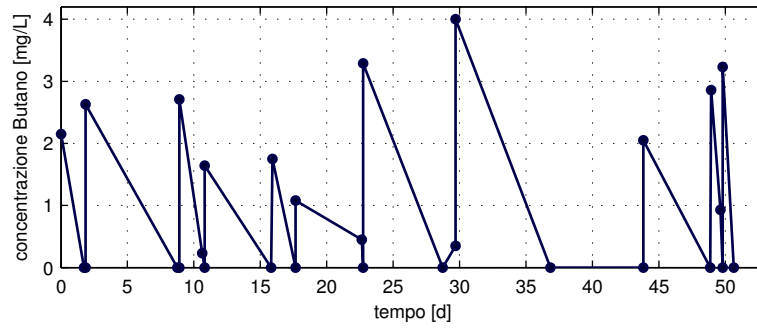
- *Prove di crescita della biomassa sui supporti*

L'obiettivo di queste prove è di testare la capacità del consorzio B4 di formare un biofilm stabile sui supporti porosi oltre a determinare in maniera preliminare le velocità di degradazione della biomassa in forma adesa rispetto a Butano e TCE. A questo scopo sono state allestite quattro vials da 119 mL ognuna delle quali riempita con uno dei supporti scelti in modo che questi raggiungessero in ogni vial un volume di 60 mL. Le vials sono poi state inoculate con 6 mL di consorzio B4, alimentate con pulsivi di butano per favorire la crescita dei batteri e monitorate con analisi gascromatografiche per diverse settimane (Figura 8.2), ogni volta che la concentrazione di butano si esauriva si procedeva con un ulteriore pulso. Durante tutto il periodo di monitoraggio le vials sono state conservate in un agitatore a 30°C. La prova è stata ripetuta in maniera analoga però lasciando i microcosmi in agitazione a 15°C per testare la capacità della biomassa di aderire ai supporti anche a questa temperatura, che, come già detto, è una temperatura più vicina a quella reale di un'acqua di falda (Figura 8.3).

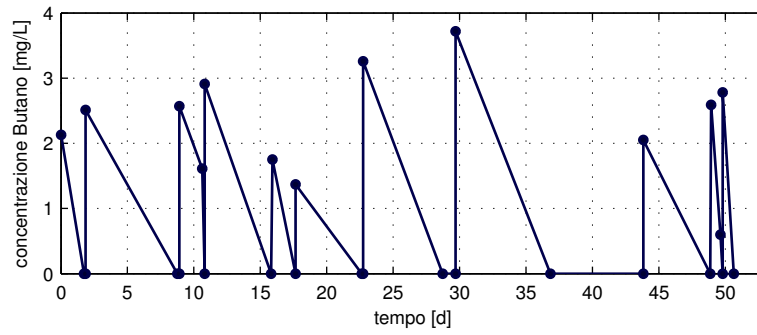
Figura 8.2: Monitoraggio del consumo di butano nella prova di crescita della biomassa sui supporti a 30°C



BIOMECH 30°C



BIOPEARL 30°C



CERAMBIOS 30°C

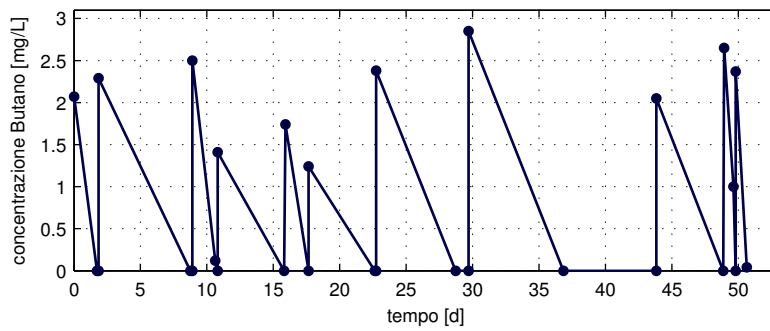
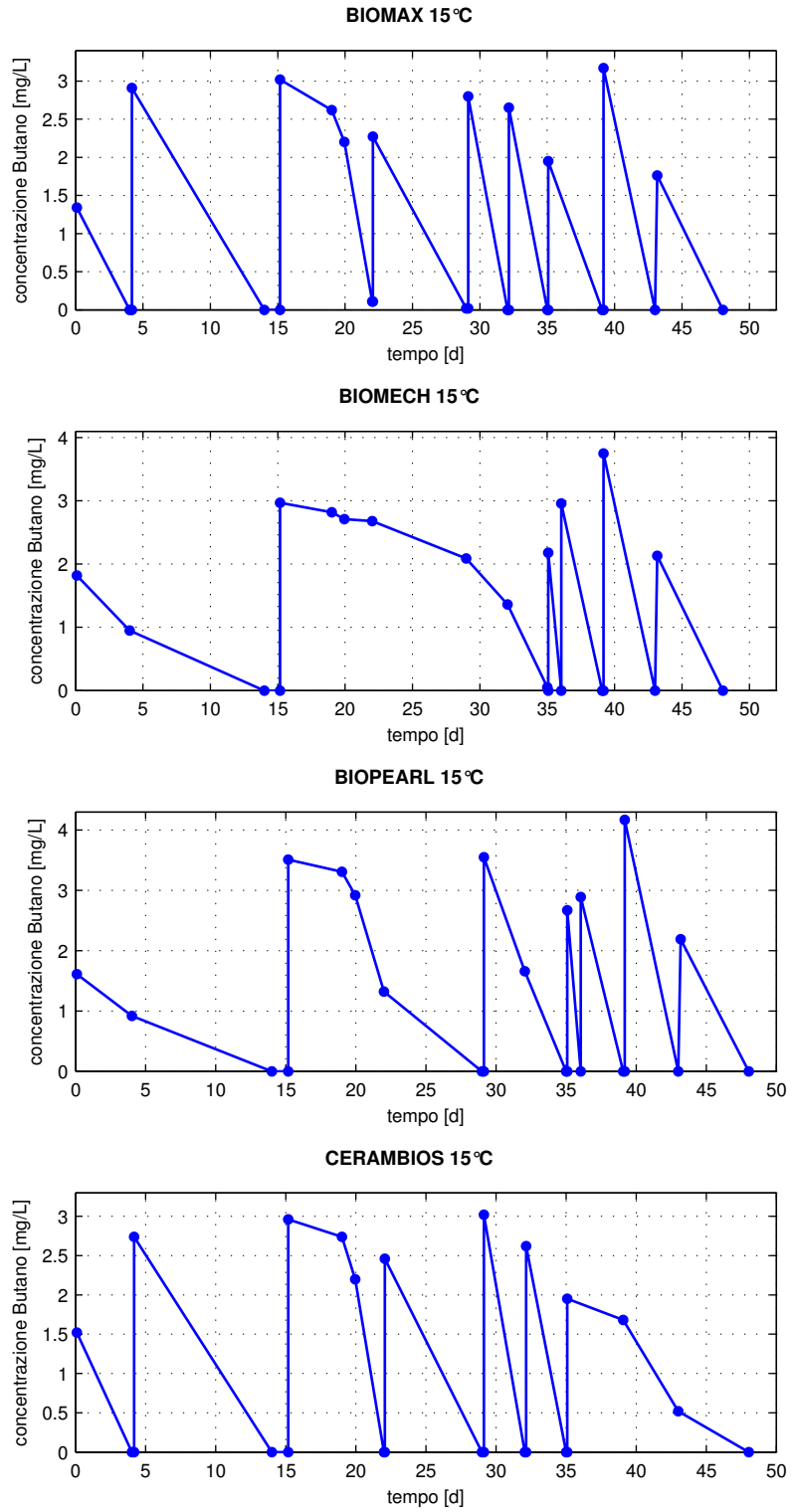


Figura 8.3: Monitoraggio del consumo di butano nella prova di crescita della biomassa sui supporti a 15°C



- *Prove cinetiche preliminari sulla biomassa adesa*

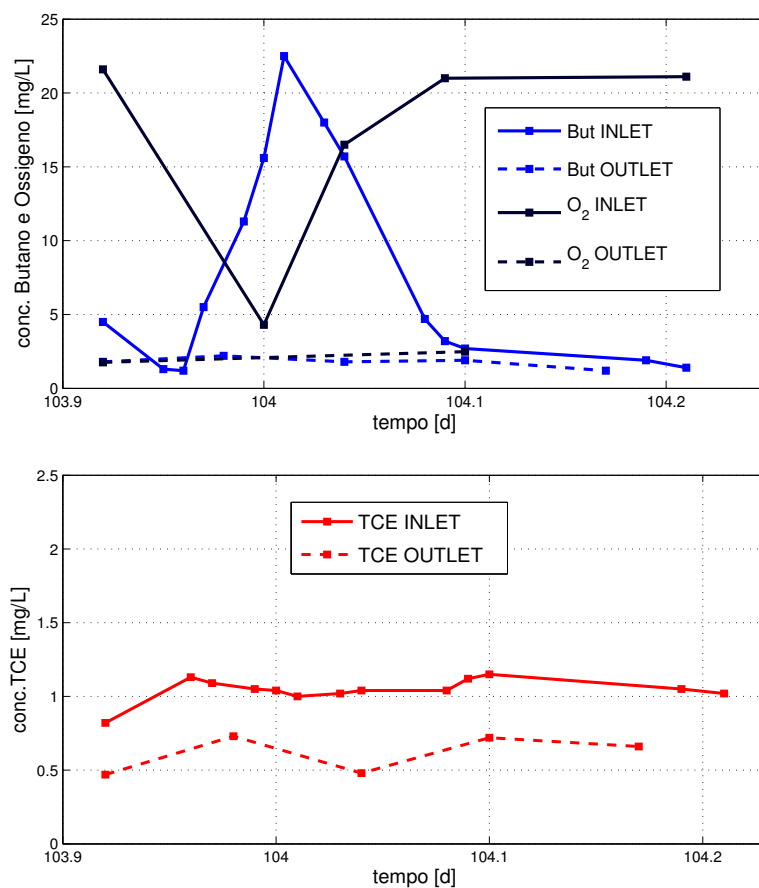
La prima parte della prova serviva a permettere la crescita della biomassa sui supporti, la seconda parte ha invece l'obiettivo di valutare in modo preliminare le velocità di degradazione della biomassa adesa ai diversi supporti rispetto a Butano e TCE. Per prima cosa è stata necessario rimuovere la biomassa presente in sospensione: è stata quindi rimossa la fase liquida, dopodichè ad ogni vial sono stati aggiunti 40 mL di soluzione fisiologica e sono state lasciate in agitazione per 30 minuti. La fase liquida è stata integrata con 40 mL di acqua sintetica e le vials sono state flussate con ossigeno puro. A questo punto si è potuto procedere con gli studi cinetici: è stato primo aggiunto Butano in concentrazione approssimativamente di 2.6 mg/L ed è stata seguita la cinetica attraverso analisi cromatografiche inizialmente ogni 15 minuti. In seguito la stessa procedura è stata utilizzata per il TCE iniettando un volume tale da raggiungere 1 mg/L di concentrazione e seguendo l'andamento del consumo di TCE.

Al termine della prova i microcosmi sono stati mandati al Dipartimento di Ingegneria Civile, Ambientale e dei Minerali (DICAM) dove è stata effettuata l'analisi della biomassa adesa sia a 30°C che a 15°C.

8.2 Test in “continuous flow”

Per la conduzione dei test in “continuous flow” è stato utilizzato l'impianto a quattro colonne in parallelo allestito precedentemente. I biorettori contenenti i diversi supporti sono stati alimentati con pulsali alternati di butano e ossigeno mentre si è cercato di mantenere costante la concentrazione (in ingresso) di TCE sfruttando una micropompa che pescava direttamente dalla soluzione satura del solvente clorurato. Lo schema di pulsazione prevedeva quattro pulsali al giorno mentre la durata dei pulsali era rispettivamente 108 minuti per il butano e 252 minuti per l'ossigeno. I grafici di figura 8.4 mostrano l'andamento tipico in entrata e in uscita dei diversi composti ottenuto usando come supporto Biomech.

Figura 8.4: Profilo dei pulsali alternati di Butano, Ossigeno e profilo costante del TCE



In seguito all'esecuzione di ogni pulso sono stati monitorati i valori di concentrazione attraverso analisi cromatografiche, effettuate ogni dieci minuti, di campioni prelevati dalla prima porta di campionamento per ottenere le concentrazioni in ingresso e dall'ultima porta per verificare la presenza di substrato, ossigeno e TCE all'uscita del bioreattore. Partendo dalle concentrazioni in entrata e in uscita si può ricavare la massa di composto che è stata consumata in un determinato tempo di monitoraggio e attraverso questo è poi possibile ricavare le velocità di degradazione di Butano e TCE per ogni pulso effettuato. Nel riquadro seguente vengono presentate le relazioni con le quali è possibile calcolare le velocità di degradazione del TCE a partire dalle concentrazioni in ingresso e uscita:

Calcolo velocità di degradazione per il TCE

$$\dot{m}_{\text{TCE,degr}} = \dot{m}_{\text{TCE,IN}} - \dot{m}_{\text{TCE,OUT}} = Q \cdot (\bar{c}_{\text{TCE,IN}} - \bar{c}_{\text{TCE,OUT}}) \quad (8.1)$$

Dove le masse in ingresso e in uscita di TCE sono state calcolate considerando il profilo delle concentrazioni sperimentali rispetto al tempo e il corrispondente valore medio.

A questo punto la velocità di degradazione rispetto al TCE si può ottenere dividendo la portata di solvente degradata per l'effettivo volume di reazione, detto volume di bulk:

$$V_{\text{bulk}} = V_{\text{supporti}} + V_{\text{liquido}} \quad (8.2)$$

$$r_{\text{TCE}} = \frac{\dot{m}_{\text{TCE,degr}}}{V_{\text{bulk}}} \quad (8.3)$$

Al termine della prova sono stati prelevati alcuni supporti (da tre sezioni diverse della colonna) e sono stati mandati al DICAM dove è stata effettuata l'analisi della biomassa con il metodo delle proteine. Le concentrazioni di biomassa trovate, così come le velocità di degradazione del TCE, sono riportate nella Tabella 8.2.

8.3 Risultati

I risultati ottenuti dalle prove introdotte precedentemente sono stati poi elaborati per poter permettere un confronto tra i diversi supporti in termini di: crescita di biomassa adesa e velocità di degradazione del TCE. Attraverso la regressione lineare sui grafici dell'andamento dei substrati ottenuti dalle prove cinetiche preliminari "batch" sono state ricavate le velocità di degradazione espresse in (mg/L/d) per ciascun substrato e da queste si è risaliti poi alle velocità normalizzate rispetto alla concentrazione iniziale (1/d). I risultati riguardanti le tre diverse prove sono elencati nella Tabella 8.2 mentre gli istogrammi di Figura 8.5 permettono un confronto diretto tra le potenzialità dei diversi supporti e da questi emerge che il supporto Biomax risulta nettamente il più efficace in termini di crescita di Biomassa adesa e, per questo, è stato scelto come supporto per le prove future che verranno realizzate.

Figura 8.5: Confronto tra i supporti

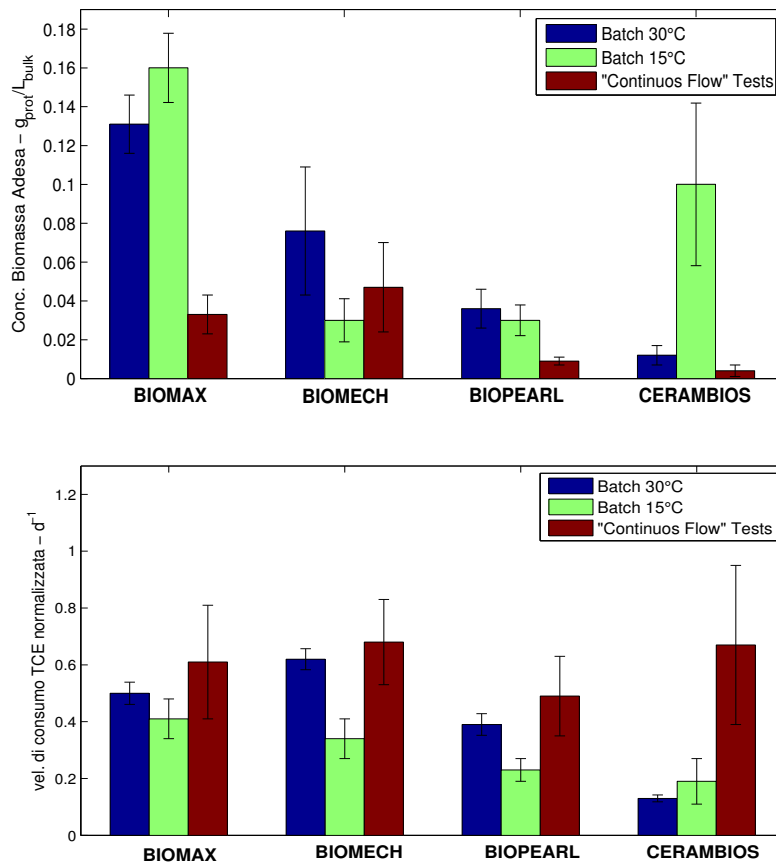


Tabella 8.2: Riassunto dei risultati delle diverse prove per la scelta del supporto

		BIOMAX	BIOMECH	BIOPEARL	CERAMBIOS
<i>"Batch" 30 °C</i>	X_{adesa} g/L _{bulk}	0.131	0.076	0.036	0.012
	95% IC	0.015	0.033	0.010	0.005
	r_{But} mg/L _{bulk} /d	369	370	437	46
	95% IC	31	19	21	3
	C_{iniz. But} mg/L _{bulk}	2.64	2.72	2.57	2.23
	95% IC	0.01	0.01	0.01	0.01
	r_{But} / C_{iniz. But} 1/d	140	136	170	21
	95% IC	12	7	8	1
	r_{TCE} mg/L _{bulk} /d	0.50	0.52	0.39	0.12
	95% IC	0.04	0.03	0.04	0.01
	C_{iniz. TCE} mg/L _{bulk}	1.00	0.84	1.01	0.91
	95% IC	0.01	0.01	0.01	0.01
r_{TCE} / C_{iniz. TCE} 1/d	0.50	0.62	0.39	0.13	
95% IC	0.04	0.04	0.04	0.01	
<i>"Batch" 15 °C</i>	X_{adesa} g/L _{bulk}	0.159	0.026	0.030	0.105
	95% IC	0.027	0.011	0.010	0.035
	r_{But} mg/L _{bulk} /d	2.06	2.28	2.33	2.17
	95% IC	0.01	0.01	0.01	0.01
	C_{iniz. But} mg/L _{bulk}	2.6	2.72	2.57	2.23
	95% IC	0.01	0.01	0.01	0.01
	r_{But} / C_{iniz. But} 1/d	7.6	12.6	6.9	0.9
	95% IC	0.2	0.3	0.2	0.4
	r_{TCE} mg/L _{bulk} /d	0.31	0.24	0.19	0.19
	95% IC	0.05	0.05	0.03	0.08
	C_{iniz. TCE} mg/L _{bulk}	0.76	0.70	0.83	1.00
	95% IC	0.01	0.01	0.01	0.01
r_{TCE} / C_{iniz. TCE} 1/d	0.41	0.34	0.23	0.19	
95% IC	0.07	0.07	0.04	0.08	
<i>"Continuous" 30 °C</i>	X_{adesa} g/L _{bulk}	0.033	0.047	0.009	0.004
	95% IC	0.010	0.023	0.002	0.003
	C_{iniz. TCE} mg/L _{bulk}	0.54	0.90	2.02	0.45
	95% IC	0.12	0.17	0.13	0.08
	r_{TCE} / C_{iniz. TCE} 1/d	0.61	0.68	0.49	0.67
95% IC	0.06	0.04	0.05	0.05	

Capitolo 9

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 fatto precedentemente al mio inizio aveva portato alla selezione e il mantenimento di un consorzio batterico avente spiccate capacità degradative particolarmente nei confronti del tricloretilene, il consorzio B4 è stato ottenuto con un lavoro di arricchimento della flora batterica presente nel sito contaminato Rho (Mi), partendo da quattro diverse acque, provenienti da quattro diversi pozzi, e testando su ognuna di esse cinque differenti possibili substrati di crescita. In seguito è stato allestito un impianto a quattro colonne impaccate per avere la possibilità di testare il processo degradativo in condizioni di “continuous flow”, più vicine a quelle di una falda acquifera.

Il mio lavoro di tesi è stato diviso in due sezioni: la prima parte si è incentrata sulla caratterizzazione della cinetica con cui il consorzio B4 precedentemente selezionato consumava il substrato primario (Butano) e il Tricloretilene; la seconda parte è stata dedicata alla scelta di un supporto poroso adatto ad essere colonizzato dalla biomassa in forma in adesa. La prima parte ha visto la realizzazione di prove cinetiche con l'obiettivo di stimare i parametri cinetici presenti nel modello teorico scelto: il modello di Monod con inibizione competitiva. A questo scopo sono state allestite 30 vials (10 concentrazioni in triplicato) contenenti il consorzio B4 e diverse concentrazioni di Butano oltre ad assicurarsi ovviamente la presenza di ossigeno. Queste sono state monitorate frequentemente con analisi cromatografiche fino ad ottenere i profili delle concentrazioni di Butano nel tempo dai quali sono state ricavate le velocità iniziali di consumo ad ogni concentrazione. Le velocità così ottenute sono poi state rappresentate in funzione della concentrazione e interpolate rispetto al modello teorico per ottenere alla fine i parametri cinetici ($q_{\max, \text{BUT}}=4.6$

mg/mg_{prot d} , $K_{S,BUT}=3.8$ mg/L). La stessa procedura è stata seguita per la prova cinetica del TCE dove però sono state scelte solo otto concentrazioni ed ad ogni triplicato è stato aggiunto un controllo negativo contenente biomassa uccisa con SodioAzide ($q_{max,TCE}=0.082$ mg/mg_{prot d} , $K_{S,TCE}=0.80$ mg/L). In seguito sono state eseguite le prove con inibizione dove insieme a cinque concentrazioni selezionate di Butano prima e TCE poi, è stato aggiunto nelle vials anche in concentrazione costante il substrato inibente. Ricavate e rappresentate in funzione delle concentrazioni le velocità, è stato poi possibile trovare le due costanti di inibizione ($K_{i,TCE,BUT}=0.08$ mg/L , $K_{i,BUT,TCE}=0.04$ mg/L).

La seconda parte del lavoro è stata dedicata alla selezione del supporto poroso per la crescita del biofilm. Quattro tipi di supporto sono stati scelti e confrontati in tre condizioni sperimentali differenti: prove in Batch a 30°C, prove in Batch a 15°C e prove in "Continuous Flow" a 30°C. I risultati hanno permesso un confronto tra i diversi supporti in termini di concentrazione di biomassa adesa e velocità di degradazione (normalizzata per la concentrazione iniziale) ed è stato infine scelto il supporto Biomax che assicurava un maggiore resa di biomassa adesa.

La programmazione dei lavori successivi prevede poi altri test per l'ottimizzazione del processo metabolico aerobico. Verranno quindi effettuate altre prove cinetiche riguardanti però la degradazione mediata dalla biomassa in forma adesa utilizzando Biomax come supporto. Un'altra prova di fondamentale importanza è la verifica stechiometrica della conversione dei solventi clorurati in cloruri Cl⁻ necessaria per assicurarsi che i solventi da trattare non vengano in realtà trasformati in metaboliti tossici ma completamente mineralizzati.

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: Laurence H. Smith, Peter K. Kitanidis, Perry L. McCarty, Numerical Modeling and Uncertainties in Rate Coefficients for Methane Utilization and TCE Cometabolism by a Methane-Oxidizing Mixed Culture, *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 53, no. 3, february 5, 1997 .

Elenco delle figure

2.1	Formule di struttura dei principali solventi clorurati	7
2.2	Equilibri tra le quattro fasi	11
2.3	Esempio di trasporto dei solventi clorurati nel sottosuolo	12
3.1	Schema dell'ossidazione dei due substrati mediata dall'enzima monossigenasi	18
4.1	Configurazione dei trattamenti in situ: a) Bioventing b) Permeable Reactive Barrier	24
4.2	Configurazioni di alcuni reattori a biofilms, a) USB, b) BFB, c) EGSB, d) BAS, e) IC	26
5.1	Confronti tra i diversi substrati per il consumo dei solventi clorurati	29
5.2	Complesso delle apparecchiature utilizzate per condurre la coltivazione della biomassa	33
6.1	Retta di Calibrazione per il Butano	37
6.2	Rette di calibrazione TCE e TeCA	39
6.3	Carte di controllo dei due solventi clorurati	40
6.4	Rette di calibrazione per TCE e TeCA - modalità automatica	42
6.5	Schema di allestimento di un microcosmo	44
7.1	Andamento TCE durante la prova cinetica preliminare	47
7.2	Grafici dell'andamento del Butano nel tempo - prova cinetica Butano	49
7.3	Grafici dell'andamento del TCE nel tempo - prova cinetica TCE	51
7.4	Stima di q_{max} e K_S del Butano	57
7.5	Stima di q_{max} e K_S del TCE	57
7.6	Stima di $K_{i,TCE}$ a partire dai dati sperimentali	59
7.7	Stima di $K_{i,But}$ a partire dai dati sperimentali	60
8.1	Supporti porosi selezionati	63
8.2	Monitoraggio del consumo di butano nella prova di crescita della biomassa sui supporti a 30°C	64

8.3	Monitoraggio del consumo di butano nella prova di crescita della biomassa sui supporti a 15°C	66
8.4	Profilo dei pulsanti alternati di Butano, Ossigeno e profilo costante del TCE	68
8.5	Confronto tra i supporti	70

Elenco delle tabelle

1.1	Concentrazioni soglia di contaminazione di alcuni composti clorurati	6
2.1	Nomenclature e formule brute dei principali solventi clorurati	9
2.2	Proprietà chimico-fisiche di alcuni solventi clorurati a 25°C	10
3.1	Reazioni di degradazione dei solventi clorurati	14
5.1	Caratterizzazione idrochimica della acque	27
6.1	Caratteristiche e parametri impostati al gascromatografo	35
6.2	Standard del Butano per la calibrazione in modalità automatica	37
6.3	Valori del coefficiente di calibrazione per il Butano	38
6.4	Standard dei solventi clorurati preparati per le calibrazioni	38
6.5	Valori del coefficiente di calibrazione per TCE e TeCA	40
6.6	Concentrazioni delle soluzioni madre dei due solventi clorurati	41
6.7	Standard dei solventi clorurati preparati per le calibrazioni	41
6.8	Coefficienti di calibrazione dei solventi clorurati usati	42
7.1	Schema prova cinetica preliminare TCE	47
7.2	Velocità di degradazione - prova cinetica preliminare TCE	47
7.3	Schema prova cinetica Butano	49
7.4	Schema prova cinetica TCE	51
7.5	Schema prove cinetiche con inibizione	54
7.6	Velocità iniziali specifiche di degradazione del Butano	55
7.7	Velocità iniziali specifiche di degradazione del TCE	56
7.8	Velocità di degradazione ottenute dalla prova cinetica del Butano inibito da TCE	58
7.9	Velocità di degradazione ottenute dalla prova cinetica del TCE inibito da Butano	59
8.1	Caratteristiche di peso e porosità dei supporti	63
8.2	Riassunto dei risultati delle diverse prove per la scelta del supporto	71