

POLITECNICO DI MILANO

Facoltà di Ingegneria Civile Ambientale e Territoriale

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria per l'Ambiente e il Territorio



**RIDUZIONE IN SITU DEL CROMO ESAVALENTE MEDIANTE
INIEZIONE DI SUBSTRATI ORGANICI IN ACQUIFERO**

Relatore: Prof.ssa Sabrina SAPONARO

Co-relatore: Ing. Andrea Filippo MASTORGIO

Ing. Elena SEZENNA

Tesi di Laurea di:

Luca BRIZZI Matr. 817427

Federico GALBUSERA Matr. 816490

Anno Accademico 2014-2015

Ringraziamenti

Vorremmo prima di tutto rivolgere un sentito ringraziamento alla nostra relatrice di tesi Prof.ssa Sabrina Saponaro per averci concesso l'opportunità di vivere questa esperienza di ricerca costruttiva, motivante e formativa per il nostro percorso di studi.

Un ringraziamento speciale è rivolto ad Andrea ed Elena per la loro grande disponibilità e per averci seguito costantemente durante tutto l'intero percorso. Ci sarebbero moltissimi motivi per ringraziarvi, ma un semplice GRAZIE li racchiude tutti.

Un ringraziamento doveroso è diretto alle nostre famiglie che in questi anni ci hanno sempre supportato e permesso di intraprendere con serenità questo percorso che non sempre si è rivelato semplice.

Si ringrazia di cuore Riccardo Berenato, Alessandro Meco e tutto il birrificio "La Ribalta" per averci gentilmente offerto il substrato utilizzato nel seguente elaborato e per essere stati ampiamenti disponibili nel fornirci assistenza e consigli. Grazie alla loro donazione è stato possibile ottenere un risultato scientifico con ottime potenzialità per il futuro. Ringraziamo tutto lo staff tecnico del laboratorio che ci ha seguito: Dott.ssa Laura Romele, Enrico Gelmi, Ing. Glauco Menin e l'Ing. Ruggiero Tardivo. Si ringraziano inoltre tutte le persone con le quali abbiamo lavorato e condiviso gli spazi all'interno del famoso "labo1": Tugui, Ing. Aronne Teli e Laura Dominguez.

Un ringraziamento sentito a Sabrina Varisco che ha collaborato con noi per un lungo mese, forse il più duro, con pazienza e costanza. A lei rivolgiamo un in bocca al lupo per la sua maturità e carriera universitaria. Si ringraziano tutti i nostri compagni di viaggio che, nel bene e nel male, ci hanno affiancato durante tutto questo lungo percorso. Si ringrazia a questo proposito Sara Montagnino, Valentina Vanzetto, Roberto Santarsia e Paolo Gratarola.

Un reciproco ringraziamento, forse il più intimo e sentito, va al mio amico e collega di studi per essere stato un punto di riferimento nonché un appoggio morale, non solo durante l'attività di tesi e vita universitaria, ma anche esternamente dal contesto accademico.

Dopo anni di impegno, sacrifici, gioie e rinunce possiamo finalmente dire: "Siamo laureati!"

INDICE

INTRODUZIONE	9
1 CROMO ESAVALENTE.....	12
1.1 Impiego del cromo.....	12
1.2 Chimica del cromo	13
1.3 Trasformazione del cromo nell'ambiente	16
1.4 Tossicità.....	21
1.5 Normativa.....	24
2 TECNOLOGIE DI TRATTAMENTO.....	26
2.1 Ex-situ.....	26
2.1.1 <i>Acque di falda</i>	26
2.1.1.1 Pump & Treat.....	26
2.1.2 <i>Terreni</i>	29
2.1.2.1 Scavo e smaltimento	29
2.1.2.2 Soil washing.....	31
2.1.2.3 Stabilizzazione e solidificazione.....	32
2.2 In-situ.....	35
2.2.1 <i>Soil flushing</i>	35
2.2.2 <i>Processi chimici</i>	38
2.2.2.1 Ferro zero valente.....	39
2.2.2.2 Ditionito di sodio	47
2.2.2.3 Gas riducenti.....	48
2.2.2.4 Elettrocoagulazione	50
2.2.2.5 Elettrocinesi.....	58
2.2.3 <i>Processi biologici</i>	66
2.2.3.1 Processi biologici diretti	67
2.2.3.1.1 Condizioni strettamente Aerobiche	72
2.2.3.1.2 Condizioni strettamente Anaerobiche	88
2.2.3.1.3 Condizioni facoltative.....	95
2.2.3.2 Processi biologici indiretti.....	105
2.2.3.2.1 Prodotti a marchio registrato.....	105
2.2.3.2.2 Prodotti non brevettati.....	112
2.2.4 <i>Attenuazione naturale</i>	118
3 SOLUZIONI IMPIANTISTICHE	121
3.1 Barriere reattive permeabili.....	121
3.2 Zone reattive in - situ.....	125
3.3 Iniezione di gas riducenti	130
SCOPO DEL LAVORO.....	132
4 PROVE DI ABBATTIMENTO DEL CR(VI)	133
4.1 Materiali.....	133
4.1.1 <i>Acqua di rete</i>	133
4.1.2 <i>Caratterizzazione dei terreni</i>	134
4.1.3 <i>Substrati</i>	136

4.1.3.1	Permeato di siero di latte.....	136
4.1.3.2	Scarto da birra.....	136
4.1.3.3	Melasso	137
4.2	Metodi.....	138
4.2.1	<i>Calcolo dei dosaggi</i>	138
4.2.2	<i>Allestimento dei test in microcosmo</i>	144
4.2.2.1	Prove preliminari con sabbia	145
4.2.2.2	Prove preliminari con sabbia e aggiunta di Fe(II)	146
4.2.2.3	Prove preliminari con terreno d'acquifero	147
4.2.2.4	Prove per la valutazione del rilascio naturale di ferro e manganese 148	
4.2.2.5	Prove per la cinetica di rimozione del Cr(VI).....	149
4.3	Risultati e discussione	155
4.3.1	<i>Prove preliminari con sabbia</i>	155
4.3.2	<i>Prove preliminari con sabbia e aggiunta di Fe(II)</i>	159
4.3.3	<i>Prove preliminari con terreno d'acquifero</i>	160
4.3.4	<i>Prove per la valutazione del rilascio naturale di ferro e manganese</i>	161
4.3.5	<i>Prove per la cinetica di rimozione del Cr(VI)</i>	161
4.3.5.1	Microcosmi con sabbia.....	161
4.3.5.2	Microcosmi con terreno d'acquifero	168
4.4	Conclusioni.....	175
CONCLUSIONI.....		177
ALLEGATO A - CARATTERIZZAZIONE DEI TERRENI.....		179
	Umidità	179
	Frazione di carbonio organico.....	181
	Distribuzione granulometrica	182
	Densità apparente su base secca.....	188
	Porosità.....	189
	Test per la valutazione del pH	190
	Conta batterica	192
ALLEGATO B - METODO UTILIZZATO PER LE ANALISI		194
	Metodo colorimetrico	194
	Reagenti.....	194
	Stabilizzazione del campione.....	199
	Preparazione del campione	199
	Spettrofotometro	201
	Messa a punto del metodo.....	205
	<i>Retta di taratura</i>	206
	<i>Valutazione delle interferenze</i>	211
	Acqua di rete	212
	Ferro bivalente - Fe(II).....	213
	Permeato di siero di latte.....	216
	Melasso da barbabietola.....	217
	Substrato da birrificio.....	219
	Soluzioni per la stabilizzazione del campione	221

SIGLE E ABBREVIAZIONI.....	223
INDICE DELLE FIGURE.....	225
INDICE DELLE TABELLE.....	228
BIBLIOGRAFIA.....	234
SITOGRAFIA	256

INTRODUZIONE

Il cromo esavalente è un metallo pesante presente in molti siti contaminati; le principali cause della presenza del Cr(VI) sono attribuibili ad attività industriali. L'interramento e lo sversamento di rifiuti pregressi in maniera incrollata ha portato alla nascita di numerosi siti nei quali viene compromessa la qualità della falda e dell'acquifero. Il primo caso di rilascio in ambiente di cromo è si è registrato durante la Seconda Guerra Mondiale quando questo metallo trovò la sua principale occupazione nel processo di cromatura degli aeromobili. Tutt'ora le principali fonti di contaminazione di cromo nel terreno e nell'acqua di falda sono dovute a processi industriali quali cromatura elettrostatica, tintura di pelli e capi di manifattura tessile, produzione di vernici, prodotti per la conservazione del legno nonché smaltimento di reflui e scarti industriali (U.S. EPA, 2000).

Il cromo risulta essere un elemento molto versatile il quale varia, anche considerevolmente, le sue proprietà chimiche e tossiche in funzione del suo stato di ossidazione nonché nella fase in cui esso si trova. Le contaminazioni causate dalla sua forma esavalente, seppur in bassa concentrazione, risultano essere altamente pericolose. In questo stato di ossidazione esso risulta essere un elemento cancerogeno nonché altamente mobile in ambiente; le contaminazioni così generate sono caratterizzate da un'elevata estensione spaziale la quale comporta notevoli difficoltà nella ricerca di una fonte di inquinamento univoca.

L'interesse nei confronti dei siti che presentano contaminazioni da cromo esavalente ha visto nell'ultimo decennio una crescita esponenziale. Il panorama delle tecnologie di bonifica presenti sul mercato in questo campo è costellato da numerose soluzioni impiantistiche, sia in-situ che ex-situ, ormai ben consolidate. Molte di queste tecnologie hanno già trovato un'applicazione a scala pilota e realizzate per trattare casi di studio reali. In generale, il trattamento ex-situ degli acquiferi contaminati da Cr(VI) consiste tipicamente nell'installazione di sistemi di estrazione e trattamento (P&T) dell'acqua di falda contaminata, nello scavo e smaltimento dei terreni contaminati oppure in operazioni congiunte di scavo e smaltimento dei terreni maggiormente contaminati con azioni di pompaggio e trattamento. In particolare, i sistemi di pompaggio e trattamento (P&T) risultano ampiamente utilizzati in Italia nell'ambito di interventi di bonifica di acque di falda contaminate da Cr(VI). Nonostante le operazioni di P&T consentano, in una prima fase, una rapida riduzione delle concentrazioni di Cr(VI) presente in soluzione, il

rendimento del sistema tende a diminuire nel tempo, portando le concentrazioni ad assestarsi su valori asintotici (Leombruni 2014).

Per questo motivo, unitamente agli elevati costi di scavo della matrice solida ed estrazione della matrice liquida, le tecnologie ex-situ sono in partenza economicamente insostenibili e perlopiù inefficaci al raggiungimento dei comuni obiettivi di bonifica.

Le tecnologie di bonifica in-situ prevedono invece l'utilizzo di barriere permeabili reattive (PRB), soil flushing nonché iniezioni per la creazione di zone reattive. Queste soluzioni, similmente alle tecnologie ex-situ, prevedono anch'esse, seppur in campo, lo scavo e iniezione/estrazione tramite pompaggio. Lo scopo dei trattamenti in-situ risulta ad ogni modo comune a tutti i trattamenti: favorire la precipitazione del cromo nella sua forma trivalente meno tossica. Il Cr(III), precipitando come composto solido, si lega alla matrice solida dell'acquifero instaurando delle condizioni di equilibrio. Rispetto alle soluzioni impiantistiche non applicate direttamente sul campo esse risultano economicamente più accessibili nonché di più semplice realizzazione. I trattamenti in-situ trovano impiego principalmente in situazioni che presentano concentrazioni di inquinante elevate nonché sono fortemente dipendenti dalle condizioni sitospecifiche del terreno; risulta perciò aperta la ricerca di ulteriori possibilità che risultino meno costose e con un range di applicabilità più ampio.

Il presente elaborato si pone quindi come obiettivo la ricerca di una alternativa valida alle attuali tecnologie di bonifica per contaminazioni da cromo esavalente. La tesi si compone di due parti: una prima ricerca bibliografica per inquadrare le tecnologie attualmente esistenti e il loro campo di applicazione ed una seconda parte in cui viene descritta l'attività di ricerca effettuata in laboratorio.

L'attività sperimentale, effettuata in batch, riguarda l'applicazione di attività di biorisanamento ovvero di attività di riduzione del metallo pesante sfruttando il metabolismo batterico. I microorganismi, consumando un substrato di crescita, provocano il completo consumo di ossigeno con conseguente instaurazione di condizioni anaerobiche nel sistema; questa condizione riducente del potenziale redox dell'acquifero comporta un cambio di stato di ossidazione del metallo. A questo proposito si è indagata la possibilità di utilizzare, come substrato di crescita batterica, delle matrici di scarto recuperate da attività di processo industriale. La scelta dei substrati verte sulla selezione di matrici organiche iniettabili che rispettino le caratteristiche chimico-fisiche di non tossicità e non recalcitranza. Le matrici biodegradabili sulle quali è stata posta attenzione sono: permeato di siero di latte, melasso da barbabietola e scarto della produzione della birra.

Lo studio indaga le condizioni di applicabilità di questa tecnologia innovativa e ne prova il suo funzionamento. La ricerca in questo campo è tutt'ora in evoluzione e la strada da compiere è ancora lunga e imperversa.

1 CROMO ESAVALENTE

1.1 IMPIEGO DEL CROMO

Negli anni le proprietà anti corrosive di questo metallo hanno portato un massiccio impiego dello stesso in un numero sempre crescente di applicazioni e processi industriali. Nella metallurgia, il fenomeno di ossidazione dell'acciaio, cioè la deposizione di uno strato di ossido invisibile ed estremamente sottile chiamato film di passività, è prevenibile modificando la percentuale di cromo nella lega metallica. La norma EN 10020 prevede un contenuto minimo di cromo pari al 10,5% (Boneschi & Boniardi, 2008). Inoltre la saldatura e il taglio dell'acciaio ad alta temperatura sono altre due attività che possono potenzialmente rilasciare cromo in ambiente. Un largo impiego di pigmenti di Cr(VI) è utilizzato per la produzione di coloranti, vernici, inchiostri e plastiche. Tra le attività di verniciatura meritano una particolare attenzione quelle in cui sono impiegati prodotti contenenti composti del cromo, che, seppure in maniera più contenuta che nel passato, vengono ancora utilizzati sia a fini decorativi (brillantezza dei colori) che tecnico-funzionali (protezione delle superfici). In effetti, questo trattamento superficiale comporta importanti riflessi ed implicazioni in tema di salute e sicurezza. I composti più utilizzati in questo senso sono il giallo di piombo solfocromato ed il piombo cromato molibdato solfato rosso, che in proporzioni variabili a seconda del tipo di effetto desiderato sono costituenti delle paste basi e gli ingredienti di varie tinte e nei quali il cromo si trova in genere allo stato esavalente (Nolli et al. in CIMAL, 2009).

Un ulteriore ruolo dei composti del Cr(VI) si ha durante l'applicazione e la fabbricazione di sostanze fitosanitarie (pesticidi), di cemento portland ed in alcuni rami come la concia delle pelli e la fotografia e l'industria del vetro. Si valuta che circa 80-90% del pellame prodotto nel mondo è conciato al cromo. La concia al cromo, tramite l'utilizzo di solfato di cromo, è un processo relativamente semplice da eseguire, economico, abbastanza rapido e sufficientemente flessibile: si possono produrre pelli per qualsiasi utilizzo.

Nel 2008, circa 24 milioni di tonnellate di cromo sono state prodotte, di cui il 2% è stato impiegato per la produzione di sali di cromo, quale il solfato di cromo $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$, utilizzato sia per la concia che per la produzione di coloranti e materie plastiche (silvateam.com).

La contaminazione dei terreni dovuta ai processi sopracitati può avvenire in seguito a perdita di materie prime, residui di produzione, sottoprodotti di processi chimici oppure durante le fasi di manutenzione dell'impianto produttivo. La presenza di cromo esavalente in falda può essere dovuta anche in piccola parte a fenomeni di rilascio naturale causati da rocce contenenti minerali quali cromite FeCr_2O_4 , nonché come descritto nel capitolo precedente, alla riossidazione dovuta alla presenza di rocce con elevato contenuto di manganese. La maggior parte delle immissioni di Cr(VI) rimane comunque di natura antropica. L'inquinamento ambientale può risultare diffuso, puntuale o entrambi. L'inquinamento diffuso si verifica con il largo utilizzo di pesticidi o attraverso sversamenti localizzati in una precisa area che interessano però un'ampia superficie causando un forte impatto per acqua di falda e corpi idrici superficiali. I centri di pericolo puntuali, nel caso specifico del cromo esavalente sono rappresentati dalla presenza di vasche utilizzate per la cromatura quali celle galvaniche, oppure vasche utilizzate per la conciatura delle pelli, serbatoi o silos in cui vengono stoccati i sali di cromo.

Attualmente il 96% del cromo totale viene utilizzato nel campo metallurgico più precisamente per la produzione di ferrocromo ossia una lega strettamente necessaria per la produzione dell'acciaio inox. Nel 2013 è stato stimato che la produzione di cromo si è attestata attorno a 30,2 milioni di tonnellate mentre nel 2014 tale produzione è diminuita del 3% (29,4 milioni di tonnellate). Attualmente il maggiore detentore della risorsa, estrattore e produttore di cromo è il Sud Africa, la produzione percentuale di tale paese rispetto al mercato mondiale si attesta attorno al 48%. Il più grande giacimento di cromite $\text{FeO}\cdot\text{Cr}_2\text{O}_3$, ossia l'unico minerale da dove si può estrarre il cromo, si trova sull'altipiano di Bushveld (Sud Africa) ed ha un'estensione di circa 60.000 km^2 (Maier et al., 2013). Altre importanti riserve di tale minerale si trovano in Kazakistan la cui disponibilità ammonta a 320 milioni di tonnellate, lo Zimbabwe il quale possiede riserve di 140 milioni di tonnellate, l'India la quale possiede 27 milioni di tonnellate ed è la quinta detentrica mondiale. Ad esse seguono Finlandia, Brasile e Cina anche se in quantità minore. Riserve molto piccole rispetto alle precedenti si possono trovare in Oman, Iran, Turchia e Albania.

1.2 CHIMICA DEL CROMO

Il cromo è un metallo grigio, fragile, molto lucido, presente in natura nella crosta terrestre con concentrazione media di 125 $\mu\text{g/g}$ (NAS, 1974). È un tipico metallo di transizione e in

funzione della sua struttura molecolare assume differenti proprietà; in particolare, al variare del suo stato di ossidazione, assume differenti caratteristiche magnetiche nonché di colorazione, mobilità e di tossicità. Il cromo ha degli stati di ossidazione compresi in un range da -2 a +6; le sue forme più comuni sono 0,+2,+3 e +6 (Richard & Bourg, 1991).

Lo stato di ossidazione neutro del cromo, rappresentato dal cromo zerovalente Cr(0), è uno stato fortemente instabile e quindi raramente presente in natura; le forme più interessate dallo studio ambientale sono la forma trivalente (Cr(III)) ed esavalente (Cr(VI)). Le condizioni redox e di pH in cui il cromo si può trovare influiscono sulle caratteristiche di mobilità e di tossicità del cromo stesso. Il Cr(VI) è altamente tossico e classificato dall' U.S. EPA (2000) come cancerogeno per l'uomo per via inalatoria; presenta una tossicità da 10 a 100 volte la tossicità del Cr(III) per via orale a causa del suo forte potere ossidante (Hawley & Deeb, 2004) . Sotto forti condizioni ossidanti il cromo è presente nella sua forma esavalente. I composti più diffusi (Tab 1.1) in cui è più usale trovare il cromo esavalente sono il cromato (CrO_4^{2-}), il cromato di idrogeno (HCrO_4^-) anche chiamato bicromato e il dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$).

Nome della sostanza	Formula chimica	Colore
Acido Cromico	H_2CrO_4	arancione-rosso
Ione acido cromato	HCrO_4^-	arancione
Ione Dicromato	$\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$	arancione
Ione Cromato	CrO_4^{2-}	giallo

Tab 1.1 - Forme più comuni di composti ionici in cui si trova il cromo esavalente (Deltcombe et al. in Marks, 1997)

Il cromo Cr(III) è caratterizzato da una bassa tossicità nonché da una bassa mobilità e risulta un elemento fondamentale per il metabolismo degli esseri viventi (US.EPA; 1992).

Il Cr(III) è presente molte volte in forma libera cationica (Cr^{3+}) ed altrettante in forma di idrossido. Gli idrossidi del cromo, fortemente dipendenti da potenziale redox (Eh) e pH, sono CrOH^{2+} , $\text{Cr}(\text{OH})_2^+$, $\text{Cr}(\text{OH})_3$ e CrOH_4^- (Rai et al.; 1987 in Hawley & Deeb, 2004). Le concentrazioni della forma cationica e degli idrossidi si influenzano tra loro dando un equilibrio stabile in acqua. Naturalmente il cromite può essere anche trovato in rocce di origine naturale amorfa contenenti ferro (Fe(III)) e cromo. Le rocce amorfe più diffuse sono la cromite ($\text{FeCr}_2\text{O}_4(\text{s})$) e l'eskolaite ($\text{Cr}_2\text{O}_3(\text{s})$). In letteratura per capire lo stato di ossidazione in funzione delle condizioni pH e potenziale redox del sistema, si fa riferimento al diagramma di Pourbaix (Fig 1.1).

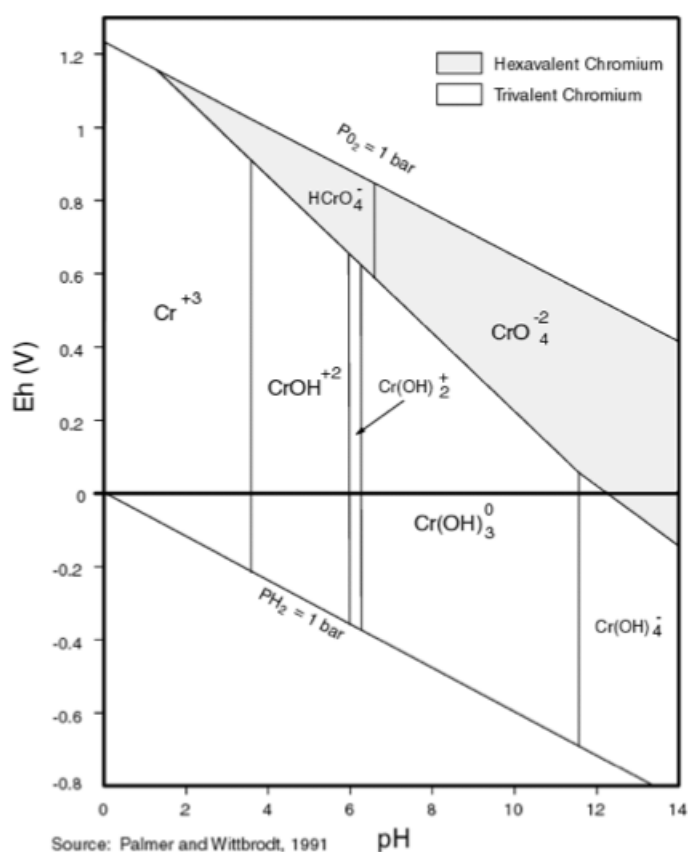


Fig 1.1 – Diagramma di Pourbaix dell'elemento cromo (C D Palmer & Wittbrodt, 1991)

I dati rappresentati in figura derivano dai parametri tipici di condizioni acquose. Questo diagramma non è sufficiente per descrivere in maniera completa le forme nelle quali il cromo si presenta in ambiente. Il catione trivalente del cromo, ad esempio, può reagire con acidi citrici e fulvici che ne determinano la presenza a condizioni diverse da quelle caratteristiche del diagramma di Pourbaix (Shaker & Albishri, 2014). Per un'analisi completa risulta necessario considerare la concentrazione della specie, la temperatura, la pressione e la presenza o meno di altre specie ioniche; in altre parole vi è la necessità di conoscere le caratteristiche sito specifiche.

La forma Cr(III) è prevalente per pH inferiori a 3 e potenziale redox Eh maggiore di 0, mentre il cromo è presente sotto forma di idrossidi per pH maggiore di 3,5. Il Cr(OH)₃ è il precipitato più frequente in condizioni neutre durante il processo di riduzione del cromo esavalente nei processi di bonifica. Il cromo esavalente è presente, a parità di pH, a maggiori potenziali redox.

1.3 TRASFORMAZIONE DEL CROMO NELL'AMBIENTE

Verranno ora descritte le principali trasformazioni chimiche che il cromo può avere interagendo all'interno di un sistema ambientale composto da acqua e terreno (Fig 1.2).

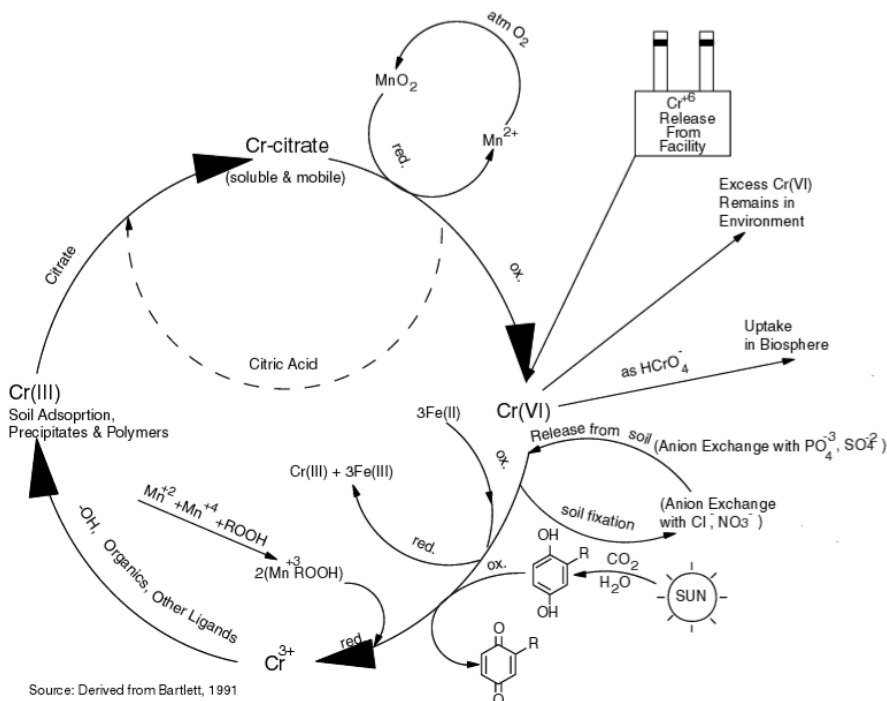


Fig 1.2 - Ciclo del cromo (Bartlett, 1991)

La chimica del cromo in ambiente dipende da molte condizioni, rendendola molto complessa. Le forme di maggiore interesse per il seguente studio sono il cromo trivalente ed esavalente. Attraverso processi di ossido-riduzione, assorbimento e precipitazione il cromo può passare da uno stato di ossidazione ad un altro in maniera dinamica.

Il processo di riduzione da Cr(VI) a Cr(III), dipende dalle condizioni di pH, dalla concentrazione di ossigeno, da catalizzatori e dalle specie riducenti le quali fungono da donatori di elettroni. Alcuni dei più diffusi donatori di elettroni sono il ferro elementare (Fe(0)), Mn²⁺, S²⁻, CH₄ e alcuni acidi organici come gli acidi umici, fulvici e amminoacidi (C D Palmer & Wittbrodt, 1991).

La materia organica partecipa attivamente al processo di riduzione del Cr(VI), formando del Cr(III) solubile complesso; tale reazione è lenta in condizione aerobiche e a temperatura ambiente; si ha un incremento del rateo di reazione spostando il pH del sistema verso pH acidi (<5). Una tipica struttura di un acido umico è quella mostrata in Fig 1.3. Il gruppo funzionale idrochinone è il principale responsabile della riduzione.

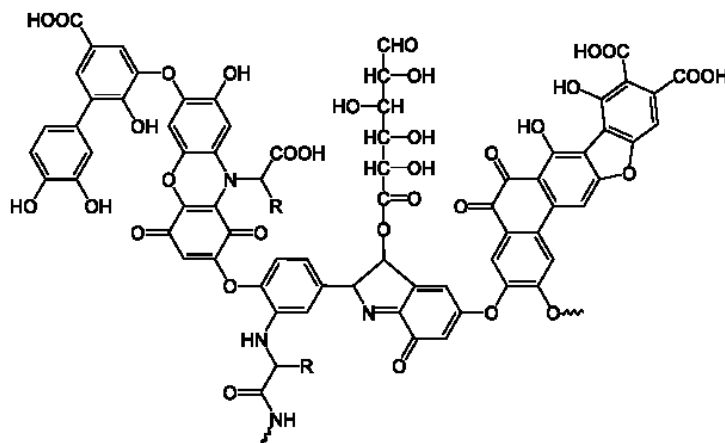
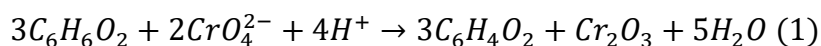


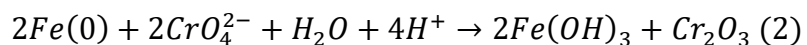
Fig 1.3 - Molecola di acido umico con gruppo funzionale idrochinone

L'equazione (1) mostra il potere riducente dell'idrochinone ossidato a chinone con conseguente generazione di alcalinità.

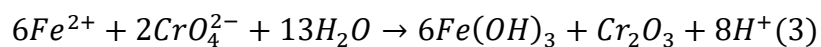


In presenza di acidi organici chelanti a basso peso molecolare contenenti un gruppo funzionale alfa-OH, quali acido tartarico e acido citrico, aumenta notevolmente l'efficienza di riduzione del Cr(VI) a Cr(III); per questo motivo trovano impiego nelle tecniche di bonifica.

Per quanto riguarda il ferro, le sue forme zero valente e bivalente (rispettivamente Fe(0) e Fe(II)), sono i principali agenti riducenti del Cr(VI). Nella reazione (2) che intercorre tra il cromato e il Fe(0) si può notare come la riduzione sia accompagnata da un consumo di H^+ con un conseguente aumento del pH.



Quando il cromato reagisce con il Fe(II), viene generata acidità come mostrato nell'equazione (3)



In entrambi i casi, per il principio di Le Châtelier, sotto moderati valori di pH, il consumo di acidità comporta una precipitazione del ferro nella forma di triidrossido ferrico.

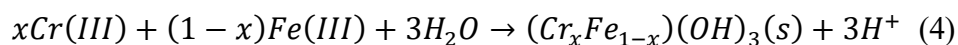
Il ruolo del Fe^{2+} è particolarmente importante quando l'attività biologica del sistema è limitata. A causa della presenza di ossigeno si può avere una rapida ossidazione del Fe^{2+} a Fe^{3+} a valori di pH molto acidi con conseguente incapacità di riduzione del cromo esavalente (Stumm e Morgan; 1981 in Fendorf, 1995); il ferro bivalente è tanto più efficace quanto più l'ambiente risulta anossico. In presenza di rocce quali ematite e biotite, nonostante l'ambiente sia fortemente aerobico, si è comunque in grado di ridurre il Cr(VI) a Cr(III) (Fendorf, 1995). Questo è valido anche quando la componente minerale del terreno contiene composti come $\text{Fe}(\text{OH})_2$, FeS , FeS_2 .

La formazione di Cr(III) si può anche verificare in presenza di manganese Mn^{2+} che ossidandosi a Mn^{3+} comporta la riduzione del Cr(VI).

Un altro fenomeno che partecipa al ciclo del cromo è l'adsorbimento sulla matrice solida, tale processo non influisce sulla tossicità del cromo ma ne riduce la pericolosità. I processi di rilascio e immobilizzazione sono influenzati per quanto riguarda il Cr^{3+} , dalla capacità di scambio cationico (CSC) delle particelle di argilla presenti nel terreno e dalla capacità di scambio anionico (CSA) per le forme CrO_4^{2-} e $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ del Cr(VI). La CSC, in presenza di ferro idrato ($\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e di ossidi di manganese, posizionanti sulle particelle fini del terreno, consente di adsorbire cationi Cr^{3+} . Un ruolo fondamentale è ricoperto dalla materia organica della matrice argillosa in quanto possiede valori elevati di CSC. La CSA è invece responsabile di fenomeni di scambio anionico sulla superficie della componente minerale del suolo, in quanto caricata negativamente. Il Cr(VI) viene quindi rilasciato in presenza di ioni PO_4^{3-} e SO_4^{2-} in quanto meno affine. Viceversa il Cr(VI) viene adsorbito, in sostituzione di Cl^- e NO_3^- , in quanto più affine con i siti attivi. Inoltre, riportando alcuni studi eseguiti da (Zachara et al., 1989), si è notato che l'adsorbimento del cromato incrementa con il crescere del pH. Suoli ricchi di alluminio e di ossidi metallici hanno un ottimo effetto sull'adsorbimento del Cr(VI). Si ha una riduzione dell'adsorbimento del Cr(VI) in presenza di carbonio inorganico in quanto compete ai siti di adsorbimento.

L'equilibrio tra le fasi solide e quelle dissolte all'interno del suolo interagiscono tra di loro formando le precipitazioni di Cr(III). Il processo di precipitazione è utilizzato molto spesso come "focus" primario durante i processi di bonifica. La precipitazione del Cr(III) può avvenire secondo tre forme: $\text{Cr}(\text{OH})_3$ (precipitato amorfo), FeCr_2O_4 e la $\text{Cr}_x\text{Fe}_{1-x}(\text{OH})_3$ (co-precipitato) (USEPA, 2000). Il precipitato puro solido (amorfo) è il risultato del

cambiamento di condizioni redox e di alcalinità del sistema. I co-precipitati sono generati dalla reazione del Cr(III) con Fe(III) a pH maggiori di 4, come mostrato nell'equazione 4.



Dove la x varia tra 0 e 1. Stechiometricamente si è ipotizzato che i co-precipitati abbiano la forma chimica $\text{Cr}_{0,25}\text{Fe}_{0,75}(\text{OH})_3$ (Papassiopi et al., 2014).

Esiste inoltre una categoria di precipitati organici ad alto peso molecolare derivanti da acidi umici; questi risultano essere agenti inibitori del processo di ri-ossidazione a Cr(VI). La precipitazione e la dissoluzione delle forme di cromo risultano strettamente collegate al valore di pH del sistema, della materia organica e in funzione della presenza di altre specie di ioni. Infine, si è osservato che in presenza di metalli alcalini o metalli alcalino terrosi quali bario (Ba), calcio(Ca), piombo(Pb) e potassio(K) si verifica una precipitazione naturale del Cr(VI) sotto forma di solidi solubili (BaCrO_4 , PbCrO_4 , K_2CrO_4). Per questo motivo il fenomeno non è considerato una vera diminuzione della concentrazione di Cr(VI) (Palmer et al; 1990 in Hawley & Deeb, 2004).

Il ciclo del cromo, mostrato in figura (Fig 1.2), si completa analizzando le reazioni di riossidazione del Cr(III) a Cr(VI). Il manganese risulta essere una delle principali cause di tale fenomeno; ricerche condotte da James et al., (2008) hanno dimostrato che il 15% del Cr(III) precipitato viene immediatamente ri-ossidato in presenza di ossidi di manganese. Una soluzione presa in considerazione da Fendorf et al. (1992a) è quella di limitare il processo di ossidazione del Cr(III) modificando la superficie dell'ossido di manganese idratando il precipitato che si andrà a legare con essa. I complessi Cr(III)-cit. e Cr(III)-tar sono soggetti ad essere più mobili e solubili, rispetto ai precipitati, in condizioni di umidità favorevole del terreno (Cao et al., 2011) . Questi ultimi migrano verso la superficie del terreno dove l'azione dell'ossigeno atmosferico provoca un'ossidazione Mn(II) a MnO_2 il quale, a sua volta, ossida i complessi cromiti-organici a basso peso formando Cr(VI). La reazione di ossidazione dipende da numerosi fattori quali il pH, le caratteristiche degli ossidi, la presenza di Cr(III) dissolto e le caratteristiche della superficie degli ossidi. Il meccanismo di ossidazione evolve in quattro steps (F.Yang et al., 2014):

1. isolamento dello ione Cr(III) dal complesso organico acido
2. l'adsorbimento degli ioni di Cr(III) sulla superficie dell'ossido di manganese
3. l'ossidazione del Cr(III) adsorbito a C(VI)

4. rilascio di ioni Cr(VI) in fase acquosa

Gli studi di F. Yang et al. (2014) hanno dimostrato che l'ossidazione del Cr(III)-cit e Cr(III)-tar è più lenta rispetto alla reazione del MnO₂ con Cr(III) acquoso. Questo fenomeno è imputabile all'alto impedimento sterico dei due complessi organici acidi. Inoltre è presente anche un processo inverso di ri-riduzione del Cr(VI) ad opera degli stessi complessi organici una volta dissociati.

In aggiunta alle reazioni chimiche presentate strettamente legate al ciclo del cromo, si è iniziato a considerazione i processi di biotrasformazione naturali da Cr⁶⁺ al Cr³⁺. Dalla scoperta del primo microbo in grado di ridurre il Cr(VI) nel 1970 (Romanenko e Korenkov in Cheung & Gu, 2007), la ricerca dei microrganismi cromo riducenti (aerobici e anaerobici) è cresciuta esponenzialmente, con un numero sempre maggiore di ceppi.

La complessità dei meccanismi biologici aerobici e anaerobici rende l'argomento di ricerca uno dei più complessi. Negli ultimi anni grazie ai numerosi studi sul metabolismo batterico è stato possibile incrementare la consapevolezza riguardante le potenzialità di disinquinamento dei microrganismi in campo ambientale. I batteri coinvolti in questo processo devono avere la caratteristica principale di essere cromo resistenti e/o tolleranti alla forma tossica del metallo. La resistenza di un microorganismo è definita come l'abilità di sopravvivere agli effetti tossici dovuti all'esposizione al metallo implementando meccanismi di detossificazione come risposta diretta all'esposizione alla specie metallica considerata. La tolleranza invece è definita come l'abilità di un microorganismo di sopravvivere alla tossicità del metallo implementando delle caratteristiche intrinseche di sopravvivenza alle condizioni ambientali di tossicità, anche variabili nel tempo. Esistono principalmente tre fenomeni di attenuazione del cromo dovuti all'attività biologica:

1. Cr(VI) può prendere parte al metabolismo di batteri aerobici o anaerobici ed essere ridotto con reazioni riducenti enzimatiche (Fein et al., 2002)
2. Cr(VI) non partecipa al metabolismo batterico, ma viene ridotto da reazioni che avvengono sulla superficie dei microrganismi stessi (Fein et al., 2002)
3. Cr(VI) subisce una precipitazione, con conseguente riduzione, all'interno della cellula biologica (Cervantes et al., 2001).

I composti cromati sono attivamente trasportati attraverso la membrana biologica sia in microorganismi procarioti che eucarioti. Una volta all'interno della cellula microbiale, il Cr(VI) si riduce a Cr(III); questo è effettuato da due processi riducenti, diretti e indiretti.

In presenza di ossigeno la riduzione batterica necessita di steps di processo: il Cr(VI) viene inizialmente trasformato nei composti Cr(V) e/o Cr(IV) i quali sono poi ulteriormente

ridotti a Cr(III) con una reazione spontanea catalizzata per via enzimatica. La resa di conversione è strettamente legata al grado di resistenza del batterio al cromo (Kamaludeen et al., 2003). L'efficienza di bioriduzione può essere inoltre incrementata in presenza di materia organica o altri nutrienti in acqua/suolo in quanto aumenta il rateo di crescita di microorganismi stessi.

Nel caso di condizioni anossiche il meccanismo di riduzione del Cr^{6+} è usato come terminale accettore di elettroni nella catena respiratoria di una lista numerosa di donatori di elettroni che include carboidrati, proteine, grassi, idrogeno, NAD(P)H e riserve di elettroni endogene (Y.-T. Wang, 2000). Esistono inoltre bioriduzioni dirette e indirette. Nell'azione diretta il cromo è coinvolto direttamente nel metabolismo di tali microorganismi, mentre nel caso indiretto vengono prodotti dei metaboliti che creano le condizioni riducenti nel terreno, le quali comportano la riduzione del Cr(VI) in Cr(III).

Un esempio di metabolita prodotto in condizioni anaerobiche è il solfuro di idrogeno H_2S prodotto da batteri SRB (batteri solfato riduttori). Questo risulta essere un prodotto della respirazione cellulare; tale composto genera condizioni acide e produce rilasciando donatori di elettroni. Alcuni dei principali microorganismi studiati sono *Euglena gracilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putidia*, *Escherichiacoli*, *B. cereu* etc. I processi relativi all'interazione tra flora batterica e cromo verranno trattati nel capitolo

1.4 TOSSICITÀ

La forma trivalente è caratterizzata da una bassa mobilità e una bassa tossicità; di conseguenza, anche i suoi composti sono scarsamente tossici, poco assorbibili e poco solubili a pH neutro o debolmente alcalino. È un nutriente essenziale per l'organismo umano in quanto provvede al mantenimento del livello ematico di glucosio (potenzia la funzione dell'insulina attraverso la sua attività tirosina chinasi) (Cefalu & Hu, 2004). Deve essere assunto in piccole dosi come quelle tipiche contenute negli alimenti vegetali. Se si assume un eccesso di cromo trivalente questo può, entrando nella cellula tramite meccanismi micropinocitici selettivi, alterare la funzionalità delle molecole del DNA 3,7 causando aberrazioni cromosomiche e danni ossidativi.

Il cromo esavalente, è considerato altamente tossico e sulla base di evidenze sperimentali ed epidemiologiche è stato classificato dalla IARC (International Agency for Research on

Cancer) come cancerogeno per l'uomo per inalazione (classe I) (ISPESL, 2008). Il Cr(VI) è molto più solubile, mobile e tossico del Cr(III), esso entra nella cellula attraverso la via del solfato e del fosfato, prevalentemente come ione cromato (CrO_4^{2-}), attraverso i recettori di trasferimento e altre proteine leganti dei metalli. Una volta all'interno della cellula, il Cr(VI) viene rapidamente ridotto da diversi componenti cellulari: glutatione, ascorbato e cisteina. La tossicità del Cr(VI) a livello intracellulare si manifesta soprattutto con le numerose alterazioni molecolari e strutturali provocate dalle forme instabili [Cr(V) e Cr(IV)] e stabili [Cr(III)] derivanti dal processo di riduzione. I composti del Cr(VI) hanno capacità ossidante, attività tossica sul citoplasma e proprietà mutagene, vengono ridotti a Cr(III) producendo sottoprodotti tossici e specie ossigenate reattive e, inoltre, vengono inibite le reazioni enzimatiche cellulari (ISS; 2011).

Gli effetti locali e sistemici sull'organismo umano sono collegati ad una esposizione acuta o prolungata a concentrazioni di cromo dannose per l'organismo stesso. Nel caso di un'esposizione ripetuta e/o prolungata per motivi professionali, l'effetto cronico del cromo determina alterazioni del sistema respiratorio (pneumoconiosi, perforazione del setto nasale, riniti croniche, faringiti, bronchiti croniche). Per quanto riguarda l'esposizione non professionale concentrazioni troppo elevate introdotte nell'organismo alterano il metabolismo del glucosio, causando forti danni al tratto gastrointestinale.

Inoltre il Cr (VI) irrita le membrane mucose causando rinorrea, arrossamento della gola e broncospasmi. Prolungate inalazioni di cromati in polvere producono irritazioni respiratorie croniche con iperemia, cataratta cronica, congestione della laringe, polipi del tratto respiratorio superiore, infiammazione cronica del polmone, enfisema, tracheiti, bronchiti croniche, faringiti croniche e broncopolmoniti.

Piccole assunzioni tramite ingestione riescono ad essere convertite, grazie all'ambiente acido dello stomaco stesso, in buona parte da Cr^{6+} in Cr^{3+} meno nocivo (una piccola quantità minore del 10% di Cr(VI) viene comunque assorbita indipendentemente dalla concentrazione iniziale) (Fawell & Lund, 1996; Oehha, 2011). La capacità del Cr(VI) di attraversare le membrane cellulari ne comporta il trasferimento placentale durante la gravidanza, risultando teratogeno per il feto.

Nel corpo sono presenti circa 6 mg di Cr e nei tessuti la concentrazione varia da 0,02 pg a diverse centinaia di μg e diminuisce dalla nascita all'età di 10 anni. La dose letale per ingestione di vari composti del Cr (VI) è nel range compreso tra 1,5-1,6 g; a seguito di

assunzioni di tali dosi, gli effetti immediati sono alterazioni emorragiche in vari organi provocando shock e morte (<http://www.iss.it/>).

Lo IARC, sulla base dei dati epidemiologici disponibili, classifica l'evidenza di cancerogenicità per l'uomo in:

- "inadeguata" - riferita a Cr metallico e Cr (III)
- "sufficiente" -riferita a Cr (VI).

L'US.EPA, sulla base dei dati epidemiologici disponibili, classifica l'evidenza di cancerogenicità in: "sufficiente".

Nel 2008, la Società Italiana di Medicina del Lavoro ed Igiene Industriale ha riassunto nelle sue linee guida i valori limite professionali (VLP) ed i valori limite biologici equivalenti (BLV) per le sostanze, tra le quali Cr(VI) e suoi composti. Il Threshold Limit Value (TLV) fissato dall'ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists) è 0,05 mg/m³ nell'aria, portato a 0,01 mg/m³ per i composti del Cr(VI) insolubili. Lo stesso limite, denominato TRK (Technische Richt Konzentrationen) è stato adottato in Germania. L'OSHA (Occupational Safety & Health Administration, USA) ha aggiornato nel 2006 i limiti di esposizione industriale a Cr(VI) in tutte le sue forme e composti: 0,0025 mg/m³ è l'action level e 0,005 mg/m³ il PEL (Permissible Exposure Limit), calcolati come concentrazioni medie pesate in un turno lavorativo di 8 ore (TWA Time Weighted Average). Il monitoraggio biologico viene effettuato mediante dosaggio del cromo urinario; il limite superiore dei valori di riferimento nella popolazione non esposta è pari a 0,2 µg/g creatinina. A fine turno ed a fine settimana lavorativa il BLV è stato fissato a 15 µg/g creatinina, con una differenza massima consentita tra inizio turno e fine turno lavorativo di 5 µg/g creatinina. Poiché nelle urine il cromo è totalmente ridotto alla forma trivalente, per valutare l'esposizione esclusivamente a Cr(VI) è necessario effettuare la determinazione nei globuli rossi. Vengono riassunte in Tab 1.2 le principali caratteristiche dal punto di vista tossicologico delle due forme di cromo.

Cr(III)	Cr(VI)
Non supera la membrana eritrocitaria. Essenzialmente presente nel plasma associato alla membrana.	Penetra la membrana eritrocitaria associandosi alla globina dall'emoglobina dopo riduzione a Cr(III). Forma un complesso a basso peso molecolare (Cr-glutazione)
Forma forti legami con le proteine	Forma con le proteine solo legami deboli a bassi pH

Assorbimento modesto	Assorbimento da 3 a 5 volte più elevato
Graduale accumulo epatico 24 h	Decremento epatico nelle 24 h
In esposizioni croniche: concentrazioni tissutali inferiori a quelle dei gruppi di ratti trattati con Cr(VI)	In esposizioni croniche: concentrazioni tissutali inferiori a quelle dei gruppi di ratti trattati con Cr(VI)
Tossicità molto limitata	Tossicità 100 volte superiore e differenziata in funzione della specie considerata
Effetti sistematici molto limitati anche ad alte dosi	Ridotta crescita e danni a livello epatico e renale in animali da laboratorio
Nessun effetto irritante	Ulcere della pelle ed effetti corrosivi del setto nasale

Tab 1.2 - Proprietà tossicologiche del Cr(III) messe a confronto con quelle del Cr(VI)

1.5 NORMATIVA

In Italia le norme in materia ambientale, le definizioni di inquinamento e bonifica sono state recepite dall'UE e raccolte nel Testo Unico ambientale ovvero il D.Lgs 152/2006. La sensibilità sul tema dei siti inquinati da cromo, e in generale da metalli pesanti, è aumentata esponenzialmente negli ultimi anni in quanto, concentrazioni elevate di tali inquinanti, costituiscono un pericolo per la salute pubblica, un danno all'ambiente naturale nonché ostacolano lo sviluppo e la fruizione dell'area. Il D.Lgs. 152/2006 attraverso la Parte IV ("Norme in materia di gestione dei rifiuti e di bonifica dei siti inquinati"), Titolo V ("Bonifica dei siti contaminati"), introduce novità sostanziali nella disciplina della bonifica dei siti contaminati; vengono riportati in Tab 1.3 i valori della tabella 1 e 2 dell'allegato V del testo unico sull'ambiente relativi alle concentrazioni di cromo.

	Unità	Cromo VI	Cromo TOT
Acque sotterranee	µg/l	5	50
Acque di scarico fognatura	mg/l	0.2	2
Acque di scarico superficiali	mg/l	2	4
Terreni commerciali	mg/kg	15	800
Terreni per verde	mg/kg	2	150

Tab 1.3 - Tabella riassuntiva dei limiti legislativi previsti dalle tabelle 1 e 2 dell'allegato V del D.Lgs 152/2006 per quanto riguarda acque e terreni in funzione della loro fruizione

Il D.Lgs. 152/2006 in materia di tutela delle acque dall'inquinamento fissa criteri di qualità diversificati per i due stati di ossidazione (50 µg/l per Cr(III)+Cr (VI) e 5 µg/l per il Cr(VI) per le acque sotterranee) mentre per le acque superficiali destinate alla potabilizzazione il limite è di 50 µg/l senza alcuna specifica per lo stato di ossidazione. Per le acque idonee alla vita dei pesci, limitatamente alla specie più esigente, i salmonidi, sono previsti per il cromo criteri compresi tra 5 e 50 µg/l, in funzione della durezza dell'acqua.

Nel momento in cui le concentrazioni di cromo superano le concentrazioni soglia contaminazione delle tabelle 1 e 2 è necessario effettuare un'analisi di rischio (ADR). Con tale analisi è possibile valutare il rischio ai recettori principali:

- umani (rischio sanitario),
- idrici (rischio a protezione delle risorse idriche),
- ecosistemici (rischio ecologico). → nella normativa non viene indicato come procedere su questo punto.

Al fine di soddisfare le esigenze normative, vengono proposti da IRSA-CNR, (2003) alcuni metodi analitici diretti e indiretti per la determinazione del cromo totale e nella sua sola forma esavalente. Sono spesso usati nella pratica metodi per differenza basati sulla determinazione del cromo totale e di una delle due forme. Se si vuole procedere a determinazioni specifiche dei due stati di ossidazione il campione, filtrato o meno, non dovrà essere acidificato ma lasciato al suo pH naturale poiché eventuali modifiche di tale parametro potrebbero alterare la distribuzione del cromo tra le due forme.

Il cromo totale disciolto può essere determinato direttamente nel campione mediante spettrometria di assorbimento atomico in fiamma (metodo A) oppure mediante assorbimento atomico con atomizzazione elettrotermica (metodo B1); oppure per bassi livelli di concentrazione o per matrici complesse (es. acque marine) può essere determinato previa concentrazione dell'analita mediante coprecipitazione con idrossido ferrico ed analisi in assorbimento atomico con atomizzazione elettrotermica (metodo B4).

Il Cr(VI) può essere determinato direttamente nel campione mediante la misura spettrofotometrica dell'assorbanza del composto che esso forma con la difenilcarbazide (metodo C1) oppure mediante spettrometria di assorbimento atomico con atomizzazione elettrotermica, previa estrazione tramite complessazione con ammonio pirrolidinditiocarbammato (APDC) (metodo B2). Il Cr(III) può essere determinato mediante spettrometria di assorbimento atomico con atomizzazione elettrotermica (metodo B3), dopo allontanamento del cromo (VI) mediante estrazione con APDC

2 TECNOLOGIE DI TRATTAMENTO

2.1 EX-SITU

Le tecnologie di bonifica per terreni e acque di falda di tipo ex-situ prevedono la movimentazione della matrice, rispettivamente terreno e acqua, con il conseguente trattamento della stessa in impianti dedicati. Le tipologie di intervento ex-situ secondo la normativa vigente nel campo della bonifica dei siti contaminati (D.Lgs 152/2006) sono classificate in:

- interventi ex situ-on Site: con movimentazione e rimozione di materiali e suolo inquinato ma con trattamento nell'area del sito stesso e possibile riutilizzo;
- interventi ex situ off site: con movimentazione e rimozione di materiali e suolo inquinato fuori dal sito stesso per avviare i materiali estratti in impianti di trattamento autorizzati o in discarica.

Destinazione ultima della matrice prevede lo smaltimento del materiale inquinato in discarica. In tali tipologie di trattamento il materiale inquinato può subire, prima dell'intervento di decontaminazione vero e proprio, una preselezione per ridurre la frazione da trattare. Sono presenti tipologie di trattamento di tipo fisico-chimico, termico e biologico; nel caso di trattamenti per terreni contaminati da cromo esavalente sono più efficaci trattamenti chimico-fisici.

2.1.1 ACQUE DI FALDA

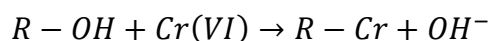
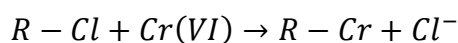
2.1.1.1 *PUMP & TREAT*

Il pump & treat è una tecnologia di bonifica che prevede il pompaggio dell'acqua di falda portandola in un impianto situato in superficie nel quale subisce un trattamento di decontaminazione. Questo tipo di tecnologia prevede la realizzazione di uno sbarramento idraulico generato dal sistema di pompaggio che crea un fronte idraulico di cattura del plume d'inquinante. Con questa tecnologia, per avere una buona efficienza di rimozione, è necessario che l'impianto funzioni per lunghi periodi di tempo, per le contaminazioni più elevate anche anni facendo aumentare i costi di trattamento e rendendo tale tecnologia

ormai non più sostenibile (Lookman et al., 2013). L'effluente in uscita dal pompaggio sarà caratterizzato da un'alta concentrazione di cromo mentre la concentrazione nell'acquifero subirà un progressivo abbattimento. Nel pump and treat sono presenti due fenomeni chiamati tailing e rebound, tali fenomeni generano due problematiche: tempi di trattamento più lunghi e concentrazioni residue superiori ai limiti di riferimento. Il fenomeno di tailing si verifica durante la fase di pompaggio dell'acqua e comporta che la concentrazione residua nell'acquifero persista per un lungo periodo di tempo. In particolare, quando la concentrazione di inquinante adsorbito sul suolo scende sotto un certo limite e la velocità di desorbimento è bassa, il trattamento diventa inutile in quanto si finisce per estrarre acqua praticamente priva di cromo. Il rebound si verifica a seguito dello spegnimento dell'impianto quando la velocità della falda si riduce ritornando al valore naturale. La concentrazione degli inquinanti aumenta in quanto il tasso di desorbimento dell'inquinante dal suolo risulta maggiore rispetto alla velocità della falda. Per ovviare a questi problemi è necessario monitorare in continuo l'acqua di falda nonché gestire cicli di accensione/spegnimento dell'impianto di estrazione per assicurarsi una completa rimozione con conseguente elevato consumo energetico. Altre limitazioni del trattamento sono:

- l'efficienza dipende dalla geologia dell'acquifero e dal tipo di inquinante
- tecnologia di rimozione lenta
- processo costoso

Successivamente alla fase di pump, l'acqua contaminata subisce un trattamento, fase di treat, che può essere svolta con tecnologie di rimozione basate su diversi principi chimico fisici. Uno dei possibili trattamenti è l'utilizzo di una colonna a scambio ionico. In tali sistemi si utilizzano resine a scambio ionico aventi elevata affinità con il contaminante le quali cedono uno ione con minor affinità all'acqua e prendono invece lo ione cromo. Per il trattenimento del cromo si usano prevalentemente ioni Cl^- o OH^- caricati su zeoliti inorganici o resine sintetiche basiche (deboli o forti). Di seguito sono mostrate le due reazioni tipiche delle due tipologie di colonne:



Le colonne a scambio ionico possono ridurre la concentrazione di cromo fino al limite massimo di detenzione della colonna; quando essa viene portata a saturazione si verifica un fenomeno di breakthrough tale per cui nel flusso di uscita dalla colonna sarà presente la stessa concentrazione di inquinante in ingresso. In questo caso è necessario compiere un'operazione di rigenerazione,

Alternativamente allo scambio ionico è possibile sfruttare il processo di adsorbimento sfruttando il carbone attivo granulare (GAC). Tale materiale trova largo impiego più che altro nel trattamento delle acque reflue. La capacità e il rateo di adsorbimento sono influenzati da: presenza di altri composti (organici o inorganici), dalla temperatura e dal pH. Usare il GAC comporta degli svantaggi che non ne consentono un valido uso nella bonifica di siti contaminati da Cr(VI):

- il GAC esaurito deve essere rigenerato con conseguente asportazione del materiale in colonna.
- durante la fase di rigenerazione si ottiene un flusso di scarto secondario ad alta concentrazione di Cr(VI) che richiede a sua volta un trattamento.
- l'uso in campo del GAC, a causa della sua forte dipendenza dal pH, può richiedere l'aggiunta di additivi chimici per regolarne il valore. (U.S. EPA, 1989)

Oltre a tale materiale il processo di adsorbimento può essere condotto anche con l'utilizzo di materiali adsorbenti alternativi. Negli ultimi anni la ricerca ha studiato il fenomeno di adsorbimento su materiali quali gusci di noccioline, pneumatici, biomassa morta, composti alginati, ceneri di letame, chitosano, lignina o segatura. Le caratteristiche e la modellizzazione del processo di adsorbimento rimane invariata rispetto ai materiali usati comunemente, ma le efficienze di rimozione risultano talvolta più elevate (Bailey et al., 1999).

L'utilizzo di materiali alternativi comporta alcuni aspetti critici:

- lo smaltimento di questi materiali, una volta raggiunto il fine vita (breakthrough), risulta critico. Essi non subiscono trattamenti di rigenerazione in quanto il costo della rigenerazione stessa risulta più elevato dell'acquisto di nuovo materiale.
- il possibile rilascio di sostanze potenzialmente dannose nel momento in cui il materiale adsorbente viene messo a contatto con il flusso d'acqua.

Alternativamente è possibile utilizzare un processo fisico di rimozione quale la filtrazione su membrana, tecnica solitamente utilizzata nella depurazione di acque di

approvvigionamento e reflue. Il flusso di acqua che attraversa la membrana crea una pressione sulla stessa che permette, se adeguata, la separazione del flusso permeato (acqua depurata) dal flusso di concentrato (Cr(VI) e specie ioniche). La pressione generata è direttamente proporzionale al flusso di acqua da trattare. Le membrane, a seconda della dimensione caratteristica dei pori (cut-off), vengono definite microfiltranti (MF), ultrafiltranti (UF), nanofiltranti (NF) ed ad osmosi inversa (RO). Il Cr(VI), avendo dimensioni ioniche, non può essere rimosso con i processi di microfiltrazione e ultrafiltrazione se non con un pretrattamento per adsorbire il cromo su macromolecole in modo da ottenere un cut-off compatibile con queste tecnologie. Anche questa tecnologia comporta alcuni svantaggi:

- avviene uno sporcamento (fouling) della membrana che ostacola il passaggio del flusso
- elevati costi di gestione e manutenzione
- il concentrato in uscita dal processo sarà caratterizzato da un'elevata concentrazione di cromo esavalente e altre specie ioniche e richiede un ulteriore trattamento
- le efficienze di rimozione dipendono fortemente dal pH, talvolta, sono necessarie delle operazioni di stabilizzazione della soluzione da trattare (Halfiane et al. 2000).

2.1.2 TERRENI

2.1.2.1 SCAVO E SMALTIMENTO

La tecnologia di bonifica di scavo e smaltimento può essere applicata nel caso di suoli contaminati e consente di rimuovere la parte di terreno interessata attraverso l'uso di mezzi di movimentazione. Il terreno asportato viene deposto sullo stesso sito oppure in un altro luogo e può in entrambi i casi subire trattamenti supplementari facoltativi (stabilizzazione e solidificazione). La deposizione del terreno contaminato on-site risulta più economica di quella off-site, ma la sua applicabilità è fortemente influenzata dalle condizioni sito specifiche. Vengono in questo modo realizzate sul sito delle vasche di contenimento le quali sono dotate di un fondo impermeabile (Fig 2.1).

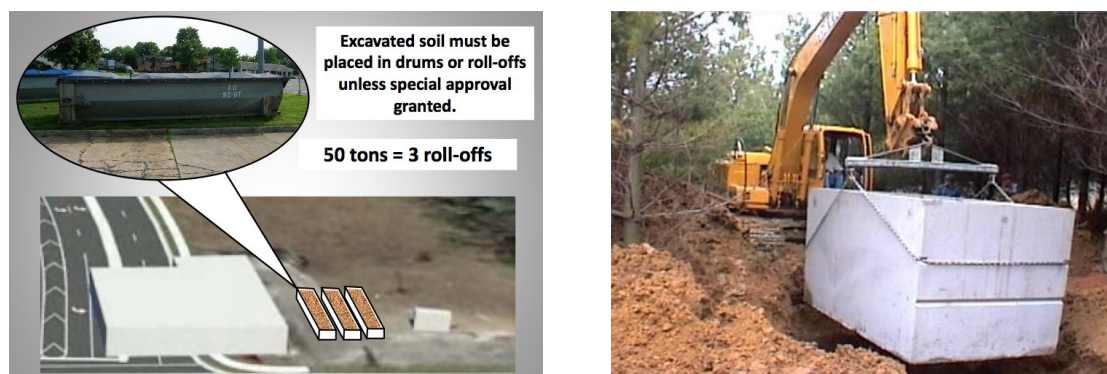


Fig 2.1 - Esempio di realizzazione di vasca di contenimento

La scelta di deporre il terreno scavato on-site è funzione delle caratteristiche del terreno ospitante. Ci deve essere infatti spazio sufficiente nel quale collocare la cassa nonché non devono assolutamente essere poste nelle vicinanze di falde. Installazioni di tipo on-site richiedono un monitoraggio e un controllo costante in quanto lo stato della cella non deve mai essere compromesso.

La deposizione off-site consiste nello smaltire il terreno in area esterna rispetto all'area di escavazione opportunamente dedicata. Le aree dedicate allo smaltimento, nel caso italiano, sono le discariche. Rispetto al caso on-site non richiede monitoraggi a lungo termine e risultano più sicure dal punto di vista della salute pubblica in quanto a tali siti l'accesso è consentito al solo personale addetto e autorizzato. Il problema primario che l'utilizzo di questa tecnologia comporta sono i costi. Il trasporto deve avvenire in maniera sicura attraverso l'utilizzo di container chiusi per minimizzare le eventuali fuoriuscite e conseguenti perdite di materiale contaminato. In Tab 2.1 vengono riportati i limiti e vantaggi delle due applicazioni descritte:

Vantaggi	Limiti
<ul style="list-style-type: none"> • È una tecnologia molto veloce e facilmente implementabile. • Richiede esclusivamente monitoraggi a lungo termine. • È una tecnologia flessibile nella sua applicazione. • È una soluzione permanente al problema di terreni inquinati 	<ul style="list-style-type: none"> • I costi sono ingenti • È una tecnologia invasiva • Necessità di discariche adeguate (in caso off-site)

Tab 2.1 - Vantaggi e limiti dello scavo e smaltimento

2.1.2.2 SOIL WASHING

Il soil washing è una tecnologia di risanamento ex-situ che rimuove gli agenti inquinanti dal suolo trasferendoli in fase acquosa. La configurazione impiantistica più semplice utilizza, per rimuovere i contaminanti dal terreno, meccanismi fisici quali il lavaggio. Viene separata la frazione fine del suolo (argilla e limo) dalla frazione più grossolana “pulita” (ghiaia e sabbia). La responsabile della maggior parte della contaminazione è proprio la frazione con granulometria minore in quanto l’inquinante stesso è più adeso ad essa. Il liquido di lavaggio che trova più impiego nel trattamento di soil washing è l’acqua, esistono comunque dei trattamenti più complessi in cui si creano delle soluzioni acquose contenenti degli specifici reagenti chimici; si parla in questi casi di lavaggio chimico. L’estrazione del contaminante dalla frazione fine può avvenire meccanicamente attraverso un’operazione di disgregazione delle particelle con conseguente rilascio o con trasferimento fisico-chimico variando il pH del sistema o alterando le forze superficiali con tensioattivi. Le soluzioni estraenti e le loro caratteristiche sono riassunte in Tab 2.2:

Soluzione estraente	Tipo di contaminante/i	Altre caratteristiche
Acqua	Contaminazione deve essere solubile. Solfati e cloruri metallici	Ha un’azione di estrazione e diluizione dell’inquinante
Acido (HCl, HNO ₃ , H ₂ SO ₄ , acido acetico)	Metalli in forma cationica.	La concentrazione dell’acido nel liquido di lavaggio dipende fortemente dalla granulometria delle particelle solide (particelle piccole come l’argilla, ossidi di ferro e manganese necessitano di concentrazioni acide più elevate.
Soluzione alcalina (NaOH e Na ₂ CO ₂)	Metalli e metalloidi in forma anionica	Comportano un innalzamento del pH che favorisce la dissoluzione dell’inquinante
Agenti chelanti	Sono per contaminanti metallici (carbonati o idrossidi)	Insieme all’inquinante possono essere dissolti anche altri elementi non considerati contaminanti quali: Fe, Al e Mn e i carbonati di Ca e Mg. Gli agenti chelanti hanno costi molto elevati.

Ossidanti o riducenti (raramente possono essere usati solventi organici come metiletilchetone o pentano)	Metalli	Tramite reazioni redox modificano il numero di ossidazione del metallo rendendolo nella forma più mobile, asportandolo così dalla matrice.
--	---------	--

Tab 2.2 - Caratteristiche delle soluzioni estraenti

Gruppi Di Contaminanti		Terreni Ghiaioso – Sabbiosi	Terreni Argilloso – Limosi
INORGANICI	Metalli volatili	AEE	AEL
	Metalli non volatili	AEE	AEL
	Amianto	NA	NA
REATTIVI	Ossidanti	AEL	AEL
	Riducenti	AEL	AEL

Legenda: AEE= applicabilità con elevata efficienza; AEL= applicabilità con efficienza limitata ; NA= non applicabile

Tab 2.3 - Applicabilità del soil washing in funzione della natura ea e del tipo di contaminante

Pertanto l'applicabilità (Tab 2.3) nel caso di contaminazione di terreni da cromo esavalente, essendo esso un elemento inorganico metallico, risulta molto efficiente su terreni caratterizzati da diverse granulometrie. L'applicazione del soil washing ha un'efficienza elevata su terreni ghiaioso sabbiosi mentre presenta condizioni di applicabilità più limitata per terreni a granulometria più fine quali quelli argilloso limosi.

2.1.2.3 STABILIZZAZIONE E SOLIDIFICAZIONE

La tecnica di stabilizzazione/solidificazione (S/S) nasce dalla ricerca di nuove forme di bonifica alternative alle tecniche tradizionali già consolidate ma molto costose. Le tecniche S/S combinano due processi strettamente correlati tra loro (Cullinane, Jones, Malone, Laboratory., & Station., 1986) che l'US.EPA definisce come segue:

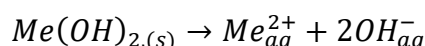
- **stabilizzazione:** tecnica che riduce la pericolosità potenziale del rifiuto, convertendo i contaminanti nelle loro forme meno solubili, mobili o tossiche. Non determina cambiamenti delle proprietà fisiche del materiale trattato.
- **solidificazione:** tecnica che incapsula il rifiuto in una struttura solida monolitica ad elevata integrità strutturale. Non prevede necessariamente un'interazione chimica tra il rifiuto e gli agenti solidificanti.

I processi combinati di S/S hanno come focus quello di inertizzare il contaminante all'interno di una matrice solida, per questo motivo si parla anche di fissazione o di inertizzazione (Desogus, 2012).

Il legante utilizzato per eseguire la tecnica di S/S definisce la tipologia di trattamento, esistono leganti inorganici (cemento, calce, argilla, pozzolana, silicato di sodio, fly ash) e organici (torba, asfalto, bitume, resine termoplastiche o termoindurenti e polimeri organici). Solo nel 10% dei casi applicativi si sono utilizzati leganti di tipo organico. I leganti organici si utilizzano nelle situazioni in cui la contaminazione è dovuta a inquinanti radioattivi e/o da particolari contaminanti organici altamente pericolosi. Per quanto riguarda i leganti inorganici il cemento risulta essere il più utilizzato. Questo materiale è caratterizzato da alta reperibilità sul mercato, economicità, buone proprietà meccanico-strutturali, stabilità chimico-fisica anche nel lungo periodo e comportamenti chimico-fisici noti in maniera consolidata.

I meccanismi di immobilizzazione dei metalli nella matrice cementizia avvengono secondo reazioni chimiche di:

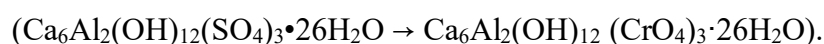
- **precipitazione:** avviene in presenza di una soluzione soprassatura rispetto a una fase solida, essa avviene sotto forma di idrossidi, solfuri o per processi di sostituzione (Kulik e Karsten; 2001). L'equilibrio tra idrossido metallico e lo ione metallico acquoso può essere scritto nel modo seguente (Bonomo, 2005):



La costante di solubilità K_{SO} è definita da:

$$K_{SO} = [Me^{2+}] * [OH^{-}]^2$$

Un tipico esempio di questo processo è l'immobilizzazione degli ioni cromato per sostituzione dei solfati nell'ettringite:



- **adsorbimento:** può essere specifico (complessazione superficiale) o non specifico (scambio ionico). Nel primo caso abbiamo una complessazione superficiale caratterizzata dalla formazione di complessi sull'interfaccia solido – liquido

attraverso dei gruppi funzionali (idrossile, carbossile o sulfidrilici). Il metallo adsorbito, tramite legami covalenti è trattenuto sulla superficie del solido. Lo scambio ionico invece coinvolge fenomeni di attrazione elettrostatica e sostituzione dello ione metallico al gruppo funzionale.

- **ossido – riduzione:** i metalli subiscono una trasformazione in forme ridotte e/o ossidate che risultano meno tossiche della forma di partenza.
- **incapsulamento:** si verifica quando gli ioni vengono racchiusi all'interno della matrice di C-S-H. Nel caso dei metalli, essi reagiscono con il C-S-H in forma gel durante la fase di idratazione del cemento. Gli studi di Richardson & Biernacki (2002) hanno portato alla formulazione di un modello di incapsulamento dei metalli quando si ha l'idratazione dei C_3S a pH altamente basici, producendo come prodotto di precipitazione la portlandite. Per concentrazioni elevate di metalli può verificarsi una co-precipitazione di idrossidi metallici amorfi. I metalli, sotto forma di idrossidi, possono sostituire la Portlandite nel gel di C-S-H (Q. Chen, 2003).

Ione	Meccanismo di immobilizzazione
As (Arsenico)	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitazione (arseniato) • Scambio ionico (con ettringite) • Immobilizzazione (CaHAsO₃)
Cd (Cadmio)	<ul style="list-style-type: none"> • Formazione (Cd(OH)₂) • Incorporamento (C-S-H)
Cr (III)	<ul style="list-style-type: none"> • Precipitazione • Incorporamento (C-S-H)
Cr(VI)	<ul style="list-style-type: none"> • Riduzione (Cr(III)) • Scambio ionico (ettringite)
Hg (Mercurio)	<ul style="list-style-type: none"> • Formazione di HgS
Pb (Piombo)	<ul style="list-style-type: none"> • Formazione di Pb-SH
Zn (Zinco)	<ul style="list-style-type: none"> • Incorporamento (in C-S-H)
Cl (Cloro)	<ul style="list-style-type: none"> • Sostituzione (con OH)
SO ₄	<ul style="list-style-type: none"> • Produzione (solfati solidi)

Tab 2.4 - Ione e rispettivo meccanismo di immobilizzazione nel processo di SS

Spesso, rifiuti organici, sali e metalli pesanti possono non essere compatibili con il trattamento di S/S (Wang et al; 2000). Un aspetto critico non trascurabile è il processo di degradazione del conglomerato cementizio dovuto a diverse cause. I principali effetti degradativi derivano principalmente da fenomeni chimici, fisici, meccanici e biologici.

2.2 IN-SITU

Le tecnologie di bonifica per terreni e acque di falda in-situ non prevedono la movimentazione della matrice la quale subisce un trattamento di decontaminazione in loco. Queste tecniche, rispetto alle tecniche ex-situ, presentano una serie di vantaggi. Il loro uso comporta un notevole risparmio in termini economici in quanto sono evitate le procedure di escavazione e trasporto (casi off-site) con una diminuzione della complessità della logistica che interessa il sito da bonificare. Per quanto riguarda l'impatto ambientale, esso viene minimizzato in quanto vi è mancata movimentazione della matrice. Le tecnologie di trattamento hanno dei vantaggi e svantaggi, in termini di applicabilità, efficacia e gestione del prelievo e iniezione di fluidi e reagenti, che sono funzione principalmente delle condizioni e delle caratteristiche dei contaminanti presenti nel sottosuolo. Per esempio uno dei fattori determinanti per l'applicazione di tali tecnologie è la permeabilità la quale influenza le modalità di inserimento di reagenti chimici liquidi o gassosi. Le tecniche che si sono sviluppate negli ultimi anni sono di tipo chimico, fisico e biologico. Le soluzioni impiantistiche, trattate nel successivo capitolo, sono studiate sulla base della potenziale sinergia tra queste tecnologie di trattamento. Tale approccio integrato aumenta l'efficacia di decontaminazione. In questo capitolo verranno trattate le principali reazioni di tipo chimico fisico che provocano l'abbattimento e/o trasformazione dell'inquinante.

2.2.1 SOIL FLUSHING

Il soil flushing è un trattamento di natura chimico – fisica, applicato in situ per la decontaminazione di terreni affetti da metalli. Il trattamento consiste nell'immissione, nel terreno contaminato, di una soluzione estraente, in grado di solubilizzare i contaminanti, in modo che questi possano essere estratti dal terreno. Ci sono molti tipi differenti di soluzioni estraenti, queste sono scelte in funzione dell'affinità con l'inquinante da rimuovere. Alcune tra le soluzioni utilizzate sono composte da acqua additivata di agenti chelanti, co-solventi, tensioattivi e altri estrattori (Roote, 1997). Per studiare l'applicabilità del processo, selezionare l'additivo e settare gli aspetti ingegneristici del processo è importante conoscere il regime idrogeologico del sito. I costi economici e di mantenimento del sistema, al contrario, sono strettamente legati alla profondità.

L'efficienza di decontaminazione dipende sia dai parametri caratteristici del terreno che dalle proprietà dell'inquinante. Dal punto di vista della matrice terreno, la rimozione

dipende dalla CEC, dal pH, dalla permeabilità e dalla conducibilità idraulica che deve essere tale di permettere alla soluzione estraente di attraversare la matrice terreno. Tipicamente assume valori maggiori di 10^{-3} cm/s. Inoltre deve essere misurata in maniera isotropa; esistono delle condizioni di eterogeneità del terreno che sono estremamente ostacolanti nella buona riuscita del processo. Bisogna verificare la presenza di rocce o materiale a granulometria fine (limi e argille) i quali possono rallentare o non consentire il passaggio della soluzione estraente. Anche la presenza di detriti, fratturazioni o percorsi preferenziali dovuti all'azione delle radici può dar vita a fenomeni di ostacolamento e/o deviazione del flusso della soluzione estraente.

Dal punto di vista dell'inquinante, le caratteristiche da cui dipende l'efficienza di rimozione sono descritte in Tab 2.5:

Parametri del contaminante	Influenza
Coefficiente di partizione all'equilibrio tra suolo e soluzione estraente	Sono preferibili contaminanti che si partizionano sulla soluzione estraente
Solubilità in acqua	Elevate solubilità favoriscono l'estrazione
Capacità di adsorbimento sul suolo	L'adsorbimento rende più difficile la rimozione
Viscosità della soluzione	Basse viscosità favoriscono il flusso della soluzione estraente attraverso il terreno

Tab 2.5 - Parametri fisico chimici del contaminante e relativa influenza sul trattamento

Esistono molti tipi di soluzioni estraenti che possono essere utilizzate per condurre il processo di soil flushing compatibilmente con i parametri riportati in Tab 2.6.

Soluzione estraente	Esempi	Inquinanti rimossi
Acidi	Acido citrico Acido tartarico Acido cloridrico	Metalli, sali inorganici metallici (carbonato di nickel zinco e rame), contaminati basici organici
Basi		Fenoli, metalli
Riducenti: reazioni che avvengono soprattutto in acque sotterranee.	Ossidi di manganese MnO ₂	Metalli
Chelanti	EDTA EDDS	Alcune forme metalliche. Non agiscono su As, Cr(VI), Mo, Sb.

Tab 2.6 - soluzioni estraenti tipicamente utilizzate per il soil flushing e tipologia di inquinanti rimovibili con esse

Nel caso di contaminazione da metalli, tra le soluzioni estraenti più utilizzate vi sono gli acidi organici, inorganici (Wasay et al., 2010) e agenti chelanti. Vi sono molti agenti chelanti noti tra cui EDTA, DTPA, NTA, EDDS (Xia et al., 2009). I chelanti, possedendo una forte affinità con le specie metalliche, sono in grado di provocarne il desorbimento dal terreno e di legarsi ad essi portandoli in soluzione. Un agente chelante dovrebbe presentare elevata solubilità, elevata stabilità termodinamica dei complessi formati, scarsa tendenza ad essere adsorbito sul suolo e elevata selettività per i contaminanti target (Lim et al., 2004). Gli agenti leganti sono tutti costituiti da gruppi donatori di elettroni; l'efficienza della chelazione è proporzionale al tipo e alla posizione dei gruppi funzionali. Il processo di chelazione con il contaminante deve essere dominante rispetto a tutti gli altri fenomeni geochemici di interazione tra chelante/terreno e inquinante/terreno. L'utilizzo di agenti chelanti in ambiente, rispetto agli agenti estraenti acidi o basici, comporta una serie di aspetti positivi e negativi riassunti in Tab 2.7:

Vantaggi	Svantaggi
<ul style="list-style-type: none"> • Minor impatto ambientale • Reagendo con il metallo formano, nella maggior parte dei casi, complessi stabili • Cineticamente favoriti 	<ul style="list-style-type: none"> • Non selettività rispetto al metallo target • Non sono biodegradabili • Se il desorbimento dell'inquinante avviene lentamente, diventa complesso valutare il potenziale rischio ambientale • Se vi è contaminazione da più specie metalliche, non sono in grado di garantire una corretta decontaminazione

Tab 2.7 - aspetti negati e positivi degli agenti chelanti rispetto agli agenti estraenti acidi e/o basici

Per quanto riguarda la formazione di complessi con il cromo, i chelanti non sono in grado di legare con la forma esavalente, in quanto presente in forma anionica, ma contribuiscono al solo desorbimento del metallo dal terreno (Jean-Soro et al., 2012).

L'efficacia di solubilizzazione del cromo ad opera di acidi non è direttamente legata alla sua costante di complessazione. Il cromo presente nel suolo, in entrambe le sue forme, può essere attribuito alla sovrapposizione di due effetti: (1) un rilascio di Cr(III) dovuto a reazioni di complessazione e (2) un rilascio di Cr(VI) dovuto a un meccanismo di sostituzione tra chelante e inquinante sulla superficie del terreno. Il Cr(III) presenta le condizioni ottimali per reagire rapidamente con il chelante formando complessi chelante – Cr(III) (Threeprom et al., 2005). L'efficacia di dissoluzione/complezione del cromo può

essere classificata, a seguito degli studi di Jean-Soro et al. (2012) sull'acido citrico, come più efficiente nel caso si utilizzino acidi rispetto ai chelanti.

2.2.2 PROCESSI CHIMICI

I reagenti in grado di effettuare la riduzione del cromo esavalente alla sua forma trivalente, naturalmente presenti nel terreno o artificialmente inseriti, hanno come caratteristica in comune quella di essere tutti donatori di elettroni. Esistono tre classi di reagenti utilizzabili:

- reagenti contenenti ferro
- reagenti contenenti zolfo
- reagenti contenenti ferro e zolfo

Le specie riducenti che trovano maggior impiego in campo di risanamento dei suoli contaminati da cromo esavalente, sono elencati in Tab 2.8.

Classe	Reagente	Referenze
Reagenti contenenti ferro in forma ridotta	Solfato ferroso (FeSO_4)	(Cheng et al., 2009)
	Cloruro ferroso (FeCl_2)	(Seaman et al., 1999)
	Solfato ferroso ammonico (sale di Mohr) ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$)	(Cheng et al., 2009)
	Ferro zero valente ($\text{Fe}(0)$)	(R. Dutta et al., 2010)
Reagenti contenenti zolfo in forma ridotta	Diossido di zolfo (SO_2)	(Ahn et al., 2003)
	Idrogeno solforato (H_2S)	(Edward C Thornton & Amonette, 1999) (Fruchter, 2002)
	Ditionito di sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)	
	Polisulfide di calcio (CaS_5) Bisolfito di sodio (NaHSO_3) Bisolfito di calcio ($\text{Ca}(\text{HSO}_3)_2$)	(Jacobs et al., 2001)
Reagenti contenenti ferro e zolfo in forma ridotta	Solfuro di ferro (FeS)	(Mullet et al., 2004)
	Pirite (FeS_2)	(Lin & Huang, 2008)

Tab 2.8 - Classi di specie riducenti utilizzate in matrici contaminate da cromo esavalente

Studi di laboratorio alla scala pilota con differenti donatori di elettroni hanno dimostrato che i processi chimici hanno un grande potenziale nel risanamento dei suoli con tecniche in – situ essendo caratterizzati da efficienze di riduzione elevate. I risultati degli esperimenti sono fortemente dipendenti dalle caratteristiche sito specifiche del terreno (Powell et al.,

1995). Nello studio dell'interazione tra reagente e contaminante devono essere sempre considerate le reazioni competitive di riossidazione dovute principalmente alla presenza di sostanza organica naturale e altri elementi ossidanti quali il manganese. Il pH del sistema, nel momento in cui viene aggiunta la sostanza chimica, viene modificato di conseguenza per ottimizzare le reazioni elettrostatiche superficiali di interazione tra le specie anioniche del Cr(VI) e il donatore di elettroni (Hawley et al., 2004).

In questo capitolo verrà analizzato il processo di riduzione dovuto:

- al ferro nei suoi due stadi di ossidazione (Fe^0 , Fe^{2+}) e relativi problemi di riossidazione (Fe^{3+})
- all'utilizzo di ditionito, tale meccanismo risulta essere equivalente per tutti quei composti contenenti ossidi di zolfo (bisolfito di sodio, bisolfito di calcio)
- all'interazione tra cromo e composti gassosi contenenti zolfo (idrogeno solforato)

Nell'ultima parte della trattazione si descriveranno i processi chimico fisici generati dal passaggio di corrente attraverso l'ausilio di elettrodi. L'applicazione di un'opportuna differenza di potenziale crea un movimento di cariche nonché delle condizioni riducenti che sono volte a decontaminare il sito d'interesse. I processi trattati saranno i meccanismi di elettrocoagulazione e di electrokinetics.

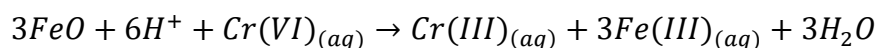
2.2.2.1 FERRO ZERO VALENTE

Il ferro nel suo stato di ossidazione zerovalente risulta un elemento molto reattivo nei processi di ossido - riduzione che coinvolgono la specie Cr(VI). Le leghe basate sul ferro zero valente sono preparate a partire da rotami di ferro, da ghisa o dalla macinazione setacciatura e ricottura dell'acciaio in atmosfera ossidante; il risultato di queste operazioni porta generalmente ad avere materiali ferrosi aventi sullo strato esterno un film di ossido di ferro (Noubactep et al., 2009). In primi test in colonna effettuati risalgono al 1975 ad opera di Schroeder & Lee (1975) i quali scoprirono che il Fe(II) aveva la capacità di ridurre il Cr(VI) a Cr(III). Si è osservato come in natura, molti minerali contengano Fe(II); questi minerali includono silicati, ossidi o solfuri (Palmer & Puls, 1994):

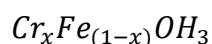
Silicati	Ossidi	Solfati
Olivina Pirosseni(augite e Hedenbergite) Anfiboli (orneblenda, cummingtonite, grunerite) Miche (biotite, flogopite, glauconite) Cloriti Argille	Magnetite Ilmenite Ematite	Pirite → minerale in cui Fe(II) e solfuro sono attivi nel ridurre il Cr(VI)

Tab 2.9 - Rielaborazione della tabella degli studi di Palmer & Puls, 1994

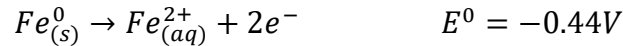
Il Fe(II), in sistemi anaerobici naturali in condizioni pH neutrali o alcalini, controlla la riduzione del Cr(VI) mentre, per valori di pH acidi, esistono degli agenti riducenti più efficienti. La reazione di riduzione del Cr(VI), quando il Fe(II) (come ossido di ferro FeO) deriva dalla presenza di ematite o biotite, può essere espressa come (Richard & Bourg; 1991 in Stanin & Pirnie, 2004):



Per valori di pH maggiori di 4 il Cr(III) precipita con il Fe(III) in una soluzione solida, generalmente sotto forma di (C D Palmer & Wittbrodt, 1991):



In condizioni acide, a causa della bassa solubilità del FeOH₃, il cromo si ritrova nella forma di idrossido (CrOH₃). Le reazioni di riduzione del Cr(VI) da parte del Fe(II) hanno dipendenza anche da attività microbologiche che verranno descritte in dettaglio nel capitolo 2.2.3. Dalla scoperta della funzionalità del Fe(II), fino ai primi anni 90, la ricerca ha portato alla sperimentazione di diverse reazioni tra varie forme del ferro con diverse specie del cromo in varie condizioni ambientali. Uno dei materiali tutt'ora utilizzati ed efficaci risulta essere lo ZVI (Zero Valent Iron). Le reazioni red-ox che coinvolgono il ferro nello suo stato zero valente, sono reazioni promosse dalla capacità di quest'ultimo di donare elettroni alle specie metalliche presenti in soluzione. Il potenziale red-ox standard della coppia Fe²⁺/Fe⁰ risulta essere negativo questo a conferma delle sue capacità riducenti.



Quando si hanno condizioni aerobiche e in assenza di specie ossidanti il ferro si comporta da donatore di elettroni subendo una forte e veloce ossidazione dovuta alla presenza di ossigeno disciolto in soluzione il quale assume il ruolo di accettore.

Al contrario, in situazioni anaerobiche, con pH basici o debolmente acidi, è lo ione H^+ dell'acqua a comportarsi come accettore di elettroni, in questo caso il processo ossidativo del ferro avviene più lentamente a causa della mancanza di ossigeno disciolto.

Stato	Reazioni Coinvolte
AEROBICO	$2Fe_{(s)}^0 + O_{2(g)} + 2H_2O \rightarrow 2Fe_{(aq)}^{2+} + 4HO^-$
ANAEROBICO	$Fe_{(s)}^0 + 2H_2O_{(l)} \rightarrow Fe_{(aq)}^{2+} + H_{2(g)} + 2HO^-_{(aq)}$ $Fe_{(s)}^0 + 2H^+_{(aq)} \rightarrow Fe_{(aq)}^{2+} + H_{2(g)}$

Tab 2.10 - Reazioni coinvolte con $Fe(0)$ in stato aerobico e anaerobico

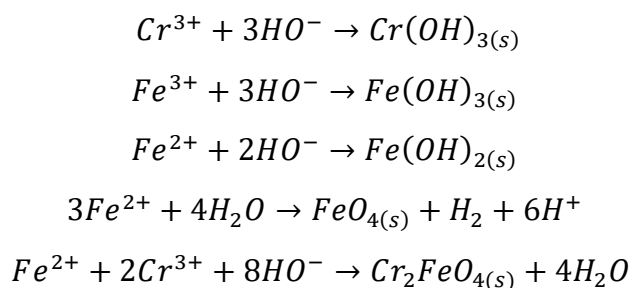
In presenza di altre specie ossidanti come il $Cr(VI)$, il ruolo di accettore di elettroni è funzione del pH del sistema. Dagli studi condotti da Gheju et al. (2008) si è dimostrato come per valori di $pH < 2,5$ l'accettore di elettroni dominante, presente in soluzione, è lo ione idronio mentre per $pH > 2,5$ è il cromo. Ponendosi nella situazione in cui in soluzione è presente un $pH > 2,5$, il processo di riduzione del $Cr(VI)$ può avvenire con metodologie diverse. In Tab 2.11 sono riportate le reazioni coinvolte nei possibili processi. Le reazioni possono essere di due tipi in funzione della catalisi di reazione. Si parla di reazione eterogena quando i reagenti si trovano in una fase differente, nel caso di fasi uguali si parla di reazioni omogenee.

Tipo Di Reazione	Metodologia	Reazione	Fonte
Eterogenea diretta	Trasferimento e- da $Fe(0)$ a $Cr(VI)$	$2HCrO_4^-_{(aq)} + 3Fe_{(s)}^0 + 14H^+_{(aq)} \rightarrow 3Fe_{(aq)}^{2+} + 2Cr_{(aq)}^{3+} + 8H_2O_{(l)}$	(T. R. Lee & Wilkin, 2010)
Eterogena indiretta	Assorbimento del $Cr(VI)$ su $Fe(0)$ con formazione precipitati $Fe(III)$ - $Cr(III)$ che possono rimanere adesi alla superficie dello ZVI	$(1-x)Fe_{(aq)}^{3+} + (x)Cr_{(aq)}^{3+} + H_2O \rightarrow Cr_xFe_{1-x}OH_{3(s)} + H^+$ $(1-x)Fe_{(aq)}^{3+} + (x)Cr_{(aq)}^{3+} + 2H_2O \rightarrow Cr_xFe_{1-x}OOH_{(s)} + 3H^+$	(Vega et al., 2010)

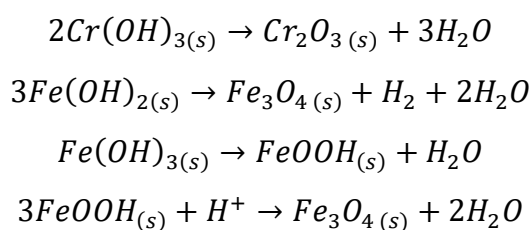
	oppure trasferiti in soluzione		
Omogenea indiretta	Fe ²⁺ derivante dalla reazione di riduzione eterogena diretta, riduce a sua volta il Cr(VI)	$HCrO_4^- + Fe_{(s)}^0 + 7H_{(aq)}^+ \rightarrow Fe_{(aq)}^{3+} + Cr_{(aq)}^{3+} + 4H_2O_{(l)}$	(Noubactep, 2010)
Eterogenea	Riduzione Cr(VI) condotta da H ₂ molecolare o atomico, generato dalla corrosione del Fe(0)	$\frac{1}{3}CrO_4^{2-} + \frac{5}{3}H^+ + \frac{1}{2}H_2 \rightarrow \frac{1}{3}Cr^{3+} + \frac{4}{3}H_2O$ $\frac{1}{2}Fe_{(s)}^0 + H^+ \xrightarrow{slow} \frac{1}{2}Fe_{(s)}^{2+} + H^{\bullet}$ $3H^{\bullet} + Cr(VI) \xrightarrow{fast} Cr^{3+} + 3H^+$	(T. R. Lee & Wilkin, 2010) (Noubactep et al., 2009)

Tab 2.11 - Accettori di elettroni in funzione del pH nei processi a ZVI

Dalle reazioni riportate nella tabella precedente, si nota il formarsi di tre ioni Cr³⁺, Fe³⁺ e il Fe²⁺ i quali non rimangono in soluzione acquosa ma precipitano sotto forma di idrossidi aumentando l'acidità del sistema acquoso. Vengono qui di seguito descritte le reazioni di formazione degli idrossidi e precipitati solidi:



A loro volta i metalli sotto forma di precipitati cristallini, possono generare ossidi metalli, con conseguente rilascio di nuove molecole di H₂O.



I parametri di processo che influenzano l'efficienza di riduzione ad opera dello ZVI, sono riassunte in Tab 2.12.

Parametro	Andamento	Fonte
pH	La riduzione del Cr(VI) operata dallo ZVI è altamente sensibile al pH della soluzione, il rateo di riduzione aumenta al diminuire del pH	(Alidokht et al., 2011)
Concentrazione iniziale Cr(VI)	L'efficienza di rimozione del Cr(VI) decresce di circa 30% a seguito di un aumento di concentrazione di cromo esavalente iniziale del 500%	(Alidokht et al., 2011)
Granulometria e superficie specifica del ZVI	Al diminuire della dimensione si ha un aumento della superficie specifica con conseguente aumento del rateo di riduzione	(Gheju, 2011)
Dose	All'aumentare della dose aumenta l'efficienza di rimozione del Cr(VI)	(Gheju, 2011)
Sostanza organica	Studi recenti hanno portato a dimostrare come il Fe(0) si presti ad essere un substrato di crescita batterica. Tali batteri hanno capacità di riduzione nei confronti del Cr(VI)	(Da Silva et al., 2007) (Flury et al., 2009)
Temperatura	Nel range di applicazione in campo ambientale, (4 - 23°C) si osserva il rapido incremento della rimozione del Cr(VI) in tutto l'intervallo senza evidenti differenze	(Pratt et al., 1997)

Tab 2.12 - Influenza dei parametri di una riduzione ad opera di ZVI

Esistono diversi tipi di pre-trattamenti industriali per la matrice ZVI. Questi processi portano al miglioramento delle efficienze di rimozione del Cr(VI). Alcuni di questi sono:

- eliminazione delle impurezze sulla superficie dello ZVI
- lucidatura, elettrica o chimica con acidi o basi organici oppure attraverso l'utilizzo di ultrasuoni.

Numerose tipologie di leghe a base di ZVI, sotto forma di granuli, limature trucioli sono stati studiati, essi sono presentati in Tab 2.13 (Gheju, 2011).

Fornitore	Dimensioni	Area superficiale	Tipo di test	Bibliografia
Non menzionato	0,5-1 < 0,5 mm e 1-5 mm	n.a.	Esperimento batch e test in Colonna	Blowes & Ptacek (1992)
Ada Iron e Metal	1.10 mm	1,4 m ² /g	Scala pilota	Puls et al. (1999b)
	0,5 mm	n.a.	Esperimento batch	Blowes et al. (1999)
Master Builder	0,1- 2 mm	1,1 m ² /g	Scala pilota (PRB)	Puls et al. (1999b)

	0,25-1 mm	1,1 m2/g	Esperimento batch e test in Colonna	Blowes et al. (1999)
	0,5-1 mm	1,2- 1,5 m2/g	Test in colonna	Gandhi et al. (2002)
	1 mm	n.a.	Esperimento batch	Oh et al. (2007)
	Miscela di limatura di ferro, GX-27	n.a.	Test in colonna	Melitas et al. (2001)
	< 0,5 mm	1,75 m2/g	Esperimento batch	Fernandez-Sanchez et al. (2004)
Non menzionato	0,5-1 mm e 1-5 mm	n.a.	Esperimento batch e test in Colonna	Blowes et al. (1999)
Non menzionato	5-8 e 20-40 maglia	n.a.	Esperimento batch	Wu et al. (2009)
Peerless Metal	18-35 maglia	1,50 m2/g	Esperimento batch	Alowitz and Scherer (2002)
Powders e Abrasive	0,7 mm	0,87 m2/g	Esperimento batch	Lee et al. (2003)
	0,42-4,8 mm	0,98- 1,75 m2/g	Test in Colonna	Mackenzie et al. (2003)
	0,25 -1 mm	0,81 m2/g	Esperimento batch e test in Colonna	Blowes et al. (1999)
	195, 37 µm	0,055 m2/g	Esperimento batch	Yang et al. (2006); Yang et al. (2007)
Connelly GPM	18-35 maglia	1,68 m2/g	Esperimento batch	Alowitz and Scherer (2002)
	0,25-2 mm	1,80 m2/g	Esperimento batch	Liu, tsang e Lo (2008); Liu et al. (2009a, b)
	0,5-1 mm	n.a.	Esperimento batch e test in Colonna	Liu e Lo (2011)
	n.a.	1,23 m2/g	Test in Colonna	Gui et al. (2009)
	0,30- 2,38 mm e 0,17- 1,41 mm	2,52 m2/g	Test in Colonna	Jeen et al. (2007, 2008)
	0,25-2 mm	1,80 m2/g	Test in Colonna	Lo et al. (2005, 2006)
	n.a.	1,23 m2/g	Test in Colonna	Yang (2006)
	18-35 maglia	n.a.	Esperimento batch	Mak et al. (2011)
	0,25-2 mm	1,94 m2/g	Test in Colonna	Lai e Lo (2008)

Gotthart maiser	0,25-2 mm	0,745 m ² /g	Esperimento batch e test in Colonna	Dries et al. (2005)
	5-20 mm	n.a.	Scala pilota (PRB)	Flury et al. (2009°, b)
Non menzionato	0,3- 0,6 mm	200-300 cm ⁻¹	Esperimento batch	Fiuza et al. (2010)
Aesar	2,5 x 2,5 x 0,4 mm	0,0605 m ² /g	Test in colonna	Kaplan e Gilmore (2004)
	<0,75 µm	0,359 m ² /g	Esperimento batch	Yoon et al. (2011)
	Lunghezza 10 cm diametro: 1,2 mm	n.a.	Esperimento batch	Melitas et al. (2011)
SHOWA Chemical	300 maglia	n.a.	Esperimento batch	Lee et al. (2006)
USMetal	0,13 mm	2,8 m ² /g	Esperimento batch	Li et al. (2006)
J.T. Baker	Lunghezza n.a. diametro: 245 µm	20,78 cm ² /g	Esperimento batch	Gould (1982)
	325 maglia	n.a.	Esperimento batch	Ponder et al. (2000)
Fisher Scientific	40 maglia	2,30 m ² /g	Esperimento batch	Alowitz and Scherer (2002)
	100 maglia	n.a.	Esperimento batch	Cao et al. (2006)
	100 maglia	n.a.	Esperimento batch	Manning et al. (2007)
	40 maglia	n.a.	Esperimento batch	Ponder et al. (2000)
	40 maglia	1,0 m ² 7g	Esperimento batch	Rivero- Huguet e Marshall (2009a, b)
	n.a.	n.a.	Esperimento batch	Yang et al. (2007)
	<0,42 mm	2,43 m ² /g	Esperimento batch	Cantrell et al. (1995)
Sicalab	20-100 µm	0,1 m ² /g	Esperimento batch	Dos Santos Coelho et al. (2008)
RDH Chemical	212 µm	0,183 m ² /g	Reattore a letto fluido	Chen et al. (2007)
LOBA Chemic	120 µm	n.a.	Esperimento batch	Dutta et al. (2010)
Sigma	Lunghezza: 3,2-10 cm; Diametro: 1,2 mm	n.a.	Impedenza elettrochimica con spettroscopio	Melitas e Farrell (2002)

Tranjin Kermel	100 maglia	7,5 m ² /g	Esperimento batch	Hou et al. (2008)
Non menzionata	50-100 nm	n.a.	Esperimento batch e test in colonna	Hoch et al. (2008)
BASF	0,77 µm	n.a.	Esperimento batch e test in colonna	-
Ferrocav E	1 x 1 x 0,5 cm	n.a.	Spettroscopio a raggi-X	McCafferty et al. (1988)
Cercona	2,4 – 3,4 mm	n.a.	Test in colonna	Mackenzie et al. (1999)
Aldrich	10-30 maglia	n.a.	Esperimento batch	Ponder et al. (2000)
Jinshan	<200 maglia	0,49 m ² /g	Esperimento batch	Qian et al. (2008); Niu et al. (2005)
	< 0,075 mm	n.a.	Esperimento batch	Wang et al. (2010)
Shinyo Pure Chemical	196,46 µm	0,065 m ² /g	Esperimento batch	Yang et al. (2006, 2007)
Kemiou Chemical reagent	<0,11 mm	0,22 m ² /g	Esperimento batch	Zhou et al. (2008)
Non menzionata	1-2 mm	n.a.	Esperimento batch	Chang (2003)
Non menzionata	Lunghezza: 3.5 mm; Diametro: 0,5 mm	n.a.	Esperimento batch	Chang (2005)
Non menzionata	Diametro: 30 µm	n.a.	Test in colonna	Ozer et al. (1997)
Merek	< 0,150 µm	0,1 m ² /g	Test in colonna	Astrup et al. (2000)
Ranbaxy chemicals	300 maglia	n.a.	Esperimento batch e test in colonna	Guha e Bharvaga (2005)
Koganas iron	n.a.	n.a.	Esperimento batch	Yang et al. (2007)
Nanjing	65,3 nm	n.a.	Esperimento batch	Liu et al. (2010)

Tab 2.13 - Prodotti ZVI commerciali (Gheju, 2011).

Le caratteristiche che devono possedere i composti commerciali in modo tale da garantirne l'efficacia sono:

- superficie dei granuli priva di strati ossidati
- composizione in peso superiore al 95% di ferro zerovalente

- range granulometrico compreso tra 0,1 - 4 mm
- assenza di oli o altre sostanze

La scelta della granulometria è influenzata da due fattori: tipologia di contaminante e conducibilità idraulica del sito. La superficie specifica e quindi le cinetiche dei processi degradativi diminuiscono all'aumentare della dimensione dei grani di ZVI.

Nel caso di contaminanti quali cromo, è stata brevettata da una ditta statunitense un'altra soluzione che prevede l'iniezione di una schiuma di ferro (iron foam) la quale non ha ancora riscontrato una larga diffusione nel campo di applicazione (Bincoletto, 2007).

2.2.2.2 DITIONITO DI SODIO

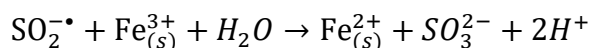
Lo ione ditionito è un ossoanione moderatamente riducente utilizzato nella produzione della carta e avente formula chimica $S_2O_4^{2-}$. Il ditionito è possibile trovarlo come sale di ditionito $Na_2S_2O_4$ (o ditionito di sodio). La dissociazione dell' $S_2O_4^{2-}$ porta alla formulazione di due specie radicaliche solfate $SO_2^{\bullet-}$ come mostrato nella seguente reazione di dissociazione (S. S. Suthersan & Payne, 2004):

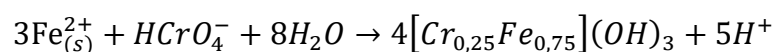


Le due specie radicaliche però sono caratterizzate da una vita breve in quanto vi è la tendenza a riformare il ditionito con una cinetica abbastanza rapida. L' $S_2O_4^{2-}$ è stato utilizzato e testato, proprio grazie alle sue specie radicaliche, per creare condizioni fortemente riducenti consentendo la precipitazione di specie metalliche nonché di alcuni solventi.

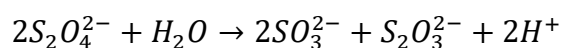
I radicali prodotti non reagiscono direttamente con la specie esavalente, ma in maniera eterogenea con minerali presenti quali il ferro trivalente. Il radicale solfato riduce il Fe(III) a Fe (II) e quest'ultimo, a sua volta, è il responsabile della diretta riduzione del Cr(VI).

La sequenza reattiva è descritta dalle seguenti reazioni:





Inoltre l'anione $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ può dare luogo a reazioni competitive di consumo del ditionito direttamente con l'acqua formando anioni solfiti (SO_3^{2-}) e tiosolfati ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) secondo la reazione:



L' SO_3^{2-} risulta essere il secondo prodotto di dissociazione dell'acido solforoso, in situazione di pH acidi questo anione possiede la tendenza di acquistare ioni H^+ per formare lo ione HSO_3^- . Questa reazione comporta ovviamente la scomparsa e il consumo della specie $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$, fondamentale per la riduzione del Cr(VI). Per il suo utilizzo in acquifero è necessario quindi portare il sistema in condizioni basiche in modo da sfavorirne la reazione di idrolisi.

2.2.2.3 GAS RIDUCENTI

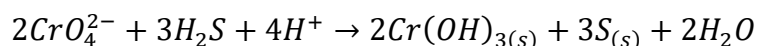
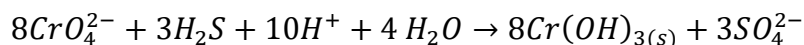
La riduzione tramite gas compiuta in *in-situ* (ISGR) è una tecnologia recente pensata come alternativa ai classici processi chimici di riduzione e immobilizzazione del Cr(VI) (Hua & Deng, 2003). Il flusso gassoso si diffonde con facilità sia negli orizzonti saturi che insaturi (anche attraverso livelli scarsamente permeabili), come testimoniato dagli esiti dei numerosi test condotti in anni di sperimentazione.

Tutte le miscele gassose utilizzate hanno come caratteristica comune la presenza di idrogeno molecolare; le principali miscele utilizzate per compiere questo tipo di reazione sono:

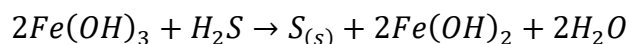
- idrogeno solforato (H_2S) miscelato con aria
- idrogeno in corrente di azoto
- metano

I primi due vengono utilizzati per avere una reazione diretta tra Cr(VI) e il gas, mentre il metano viene utilizzato come substrato di crescita per microorganismi impiegando batteri quali *Methylococcus capsulatus* (Hasin et al., 2010). Per quanto riguarda l'uso di H_2S è stato dimostrato dagli studi di E C Thornton & Jackson (1994) come le efficienze di riduzione e di immobilizzazione possano raggiungere valori anche superiori al 90%. La

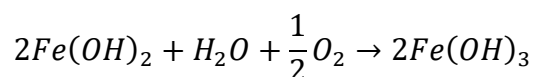
reazione di interesse principale è la riduzione del Cr(VI) a Cr(III) con conseguente ossidazione dell'H₂S. Il cromo precipita sotto forma di idrossido di cromo idrato. La reazione di riduzione e immobilizzazione (rappresentata dall'anione cromato CrO₄) può essere descritta dalle seguenti reazioni (E C Thornton et al., 2007):



Un meccanismo competitivo di consumo del gas si può instaurare in presenza di idrossidi di ferro (Fe(OH)₃). Gli studi di laboratorio condotti da Zhong et al., (2004) hanno dimostrato che l'idrossido di ferro si riduce a Fe(OH)₂ come segue:



In presenza di un ambiente aerobico si instaura un meccanismo ciclico di consumo in quanto l'idrossido ferroso, reagendo con l'ossigeno disponibile, porta alla riformazione di idrossido ferrico. La reazione di riossidazione è descritta qui di seguito:



Per quanto concerne l'utilizzo di idrogeno in corrente di azoto, il brevetto è stato depositato dall'azienda Sapio® con il nome di Soilution. Sono già stati effettuati test pilota nonché casi applicativi (suoli contaminati da ex galvaniche) portati a bon fine nei quali è stata dimostrata l'efficacia dell'utilizzo di tale gas. Poiché si usa un gas come agente riducente composto da elementi presenti anche in natura (idrogeno e azoto) non si vengono a formare sottoprodotti di reazioni tra il gas stesso e la matrice suolo. Il gas risulta in ogni caso pericoloso a causa della sua infiammabilità, per questo si sono dovute trovare soluzioni per il suo uso in condizioni di sicurezza; una possibile alternativa operativa è l'operare in condizioni lontane dal punto di infiammabilità.

In generale, mentre i processi chimici di riduzione con sostanza organica (acidi umici e fulvici) o ferro zero – valente sono processi lenti, pH dipendenti e fortemente influenzati dalle altri componenti presenti nella matrice suolo, i processi che utilizzano miscele

gassose, risultano meno influenzati dalle condizioni ambientali e quindi applicabili senza ulteriori complicazioni nella maggior parte dei casi.

2.2.2.4 ELETTROCOAGULAZIONE

Il processo chimico dell'elettrocoagulazione ha come obiettivo principale la destabilizzazione dell'inquinante portandolo in forma di precipitati che potranno essere rimossi da successivi processi di trattamento. L'elettrocoagulazione (EC), consiste nel passaggio di corrente elettrica attraverso l'acqua con l'utilizzo di elettrodi; è un processo elettrochimico in grado di rimuovere oltre il 99% dei cationi di metalli pesanti ed appare capace di igienizzare l'acqua dalla presenza di microorganismi batterici. Inoltre è in grado di far precipitare delle particelle colloidali cariche e rimuovere una quantità significativa di ioni, colloidi ed emulsioni (Matteson et al., 1995). Questo tipo di reazione è economicamente sostenibile e di interesse in campo ambientale; negli ultimi anni la ricerca si sta muovendo in questa direzione sia per lo studio del trattamento delle acque sia per la bonifica di terreni contaminati da specie metalliche (Vepsalainen, 2012).

Il processo su cui si basa l'EC è un principio scientifico che lega matrice acquosa e processi di ossidazione e riduzione causati dalla stessa nel momento in cui viene attraversata da un flusso elettrico. L'elettricità viene generata tramite l'applicazione di una differenza di potenziale applicata ai due elettrodi, i materiali più comuni utilizzati per gli elettrodi sono alluminio o ferro. Questi due materiali sono scelti in quanto economici, altamente disponibili sul mercato, efficienti e non tossici. Tramite la dissoluzione dell'anodo metallico in acqua vengono rilasciati dei cationi che riescono a neutralizzare gli ioni e particelle cariche facendoli precipitare. Nei sistemi a elettrocoagulazione avvengono, oltre alle reazioni che coinvolgono direttamente lo ione metallico, simultaneamente reazioni secondarie quali la formazione di idrogeno. In Fig 2.2 sono rappresentate tutte le reazioni coinvolte nel processo EC.

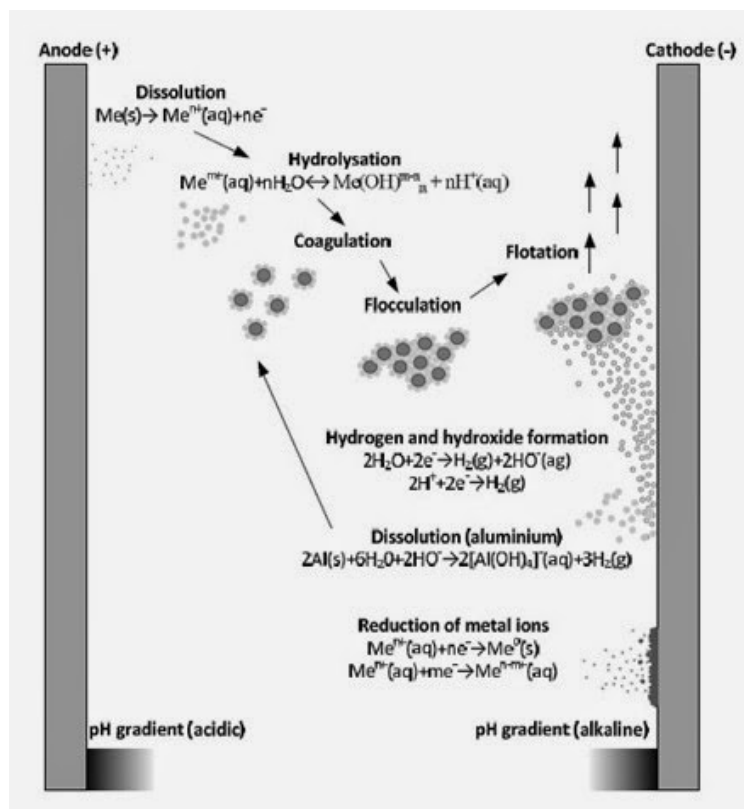


Fig 2.2 - Visione globale del sistema di reazioni coinvolte in un processo di elettrocoagulazione (Vepsalainen, 2012)

Sono stati condotti esperimenti in batch da parte di Bazrafshan et al. (2008) per valutare l'efficienza del processo in funzione del tipo di elettrodi, della densità di corrente, del pH iniziale, della concentrazione di cromo iniziale, della conducibilità e della temperatura del sistema. Sono stati perciò cercate diverse configurazioni di materiali per gli elettrodi:

- anodo e catodo entrambi di ferro
- anodo e catodo entrambi di alluminio
- anodo di ferro e catodo di alluminio

In tutti e tre i test di laboratorio la configurazione adottata per il sistema risulta la medesima ed è rappresentata in Fig 2.3.

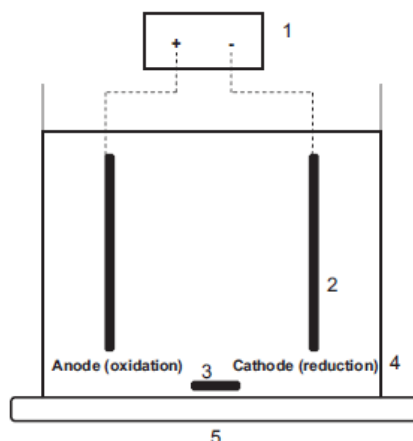


Fig 2.3 - Configurazione del sistema di elettrocoagulazione in batch utilizzata per test di laboratorio (Bazrafshan et al., 2008)

Viene applicata una differenza di potenziale (d.d.p) tra anodo e catodo in modo tale da creare reazioni di ossidazione all’anodo con conseguente liberazione cationi metallici ed elettroni i quali vengono attirati verso il catodo provocando la riduzione dell’inquinante. Il quantitativo totale di cationi metallici rilasciati durante la reazione all’anodo è calcolabile tramite la legge di Faraday come segue:

$$m = \frac{I * t * M_w}{z * F}$$

Dove:

- I è la corrente circolante [A]
- t è l’arco di tempo in cui è effettuata la prova (arco di tempo nel quale è applicata la corrente)
- M_w è il peso molecolare della sostanza che costituisce l’elettrodo [g/mol]
- F è la costante di Farady (96485 C/mol)
- Z è il numero di elettroni coinvolti nella reazione
- m è la quantità di metallo disciolto [g]

Il Cr(III), derivato dalla riduzione del Cr(VI), reagisce con gli ioni ossidrilici formando dei precipitati idrossidi amorfi del cromo.

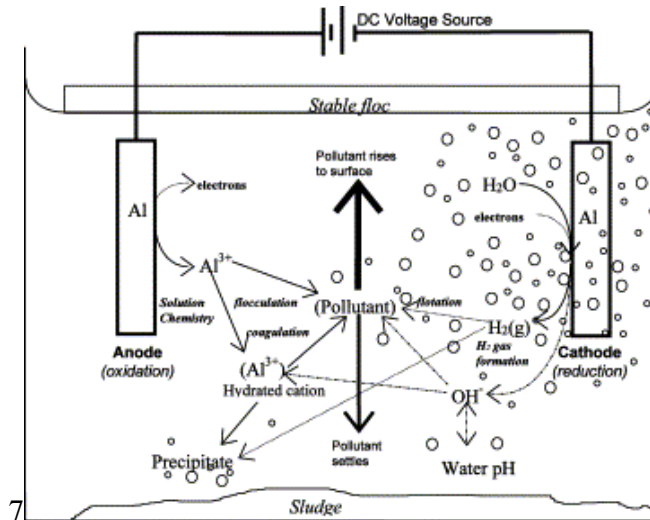


Fig 2.4 - Schema reattivo della cella di elettrocoagulazione quando gli elettrodi sono sottoposti a d.d.p (Holt et al., 2002)

Come precedentemente descritto, durante il processo reattivo principale, avvengono delle reazioni secondarie di ossidazione dell'acqua all'anodo e una riduzione dell'acqua al catodo. Un ulteriore fenomeno che si potrebbe verificare è la flottazione di una frazione del contaminante, le bolle di gas che si generano dagli elettrodi sotto tensione elettrica portano in superficie un parte del contaminante stesso. Si verifica inoltre l'ossidazione del Fe(II) a Fe(III) con conseguente produzione di idrossidi di ferro. Nel caso di elettrodi in alluminio si verifica anche una produzione di idrossidi di alluminio causati dalla presenza di alluminio trivalente nel sistema. La forma nella quale si possono trovare i precipitati idrossidi dipende ovviamente dal pH del sistema nonché dalla concentrazione del metallo. In Fig 2.4 sono riportati i grafici che relazionano la concentrazione in scala logaritmica e il pH della matrice.

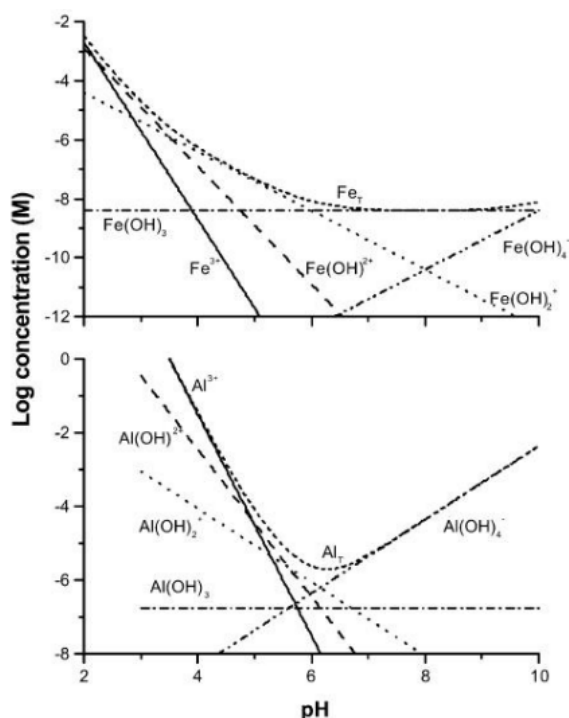


Fig 2.5 - Concentrazione di prodotti monomerici solubili di ferro e di Alluminio in equilibrio con idrossidi amorfi a 25°C e a potenziale 0 (Vepsalainen, 2012)

Le reazioni primarie e secondarie sono riassunte in Tab 2.14.

Tipologia Di Electrodo	Reazioni All'anodo	Reazione Al Catodo
Anodo e catodo entrambi di ferro	$Fe(s) \rightarrow Fe^{2+} + 2e^- \quad E^\circ = +0,44V$ $2H_2O(l) \rightarrow O_2(g) + 4H^+ + 4e^- \quad E^\circ = -1,23V$	$2H_2O + 2e^- \rightarrow H_2(g) + 2OH^- \quad E^\circ = -0,83V$ $Cr_2O_7^{2-} + 6e^- + 7H^2O \rightarrow 2Cr_{aq}^{3+} + 14OH^-$
Anodo e catodo entrambi di alluminio	$Al(s) \rightarrow Al^{3+} + 3e^- \quad E^\circ = +1,66V$ $2H_2O(l) \rightarrow O_2(g) + 4H^+ + 4e^- \quad E^\circ = -1,23V$	$2H_2O + 2e^- \rightarrow H_2(g) + 2OH^- \quad E^\circ = -0,83V$ $Cr_2O_7^{2-} + 6e^- + 7H^2O \rightarrow 2Cr_{aq}^{3+} + 14OH^-$
Anodo di ferro e catodo di alluminio	$Fe(s) \rightarrow Fe^{2+} + 2e^- \quad E^\circ = +0,44V$ $2H_2O(l) \rightarrow O_2(g) + 4H^+ + 4e^- \quad E^\circ = -1,23V$	$2H_2O + 2e^- \rightarrow H_2(g) + 2OH^- \quad E^\circ = -0,83V$ $Cr_2O_7^{2-} + 6e^- + 7H^2O \rightarrow 2Cr_{aq}^{3+} + 14OH^-$
REAZIONI SECONDARIE		
Ossidazione del Fe(II)	$Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + e^- \quad E^\circ = -0,77V$ $2Fe^{2+} + \frac{1}{2}O_2(g) + H_2O(l) \rightarrow 2Fe^{3+} + 2OH^- \quad E^\circ = -0,37V$	
Produzione di idrossidi di alluminio	$Al^{3+}(aq) + 3OH^-(aq) \rightarrow Al(OH)_{3(s)} + \frac{3}{2}H_2(g)$	
Produzione di idrossidi di cromo	$Cr^{3+}(aq) + 3OH^-(aq) \leftrightarrow Cr(OH)_{3(s)}$	
Produzione di idrossidi di ferro	$Fe^{3+}(aq) + 3OH^-(aq) \leftrightarrow Fe(OH)_{3(s)}$	

Tab 2.14 - tabella riassuntiva delle reazioni che avvengono in un processo di elettrocoagulazione

In base alle condizioni dell'acquifero anche il comportamento degli elettrodi in funzione dell'equilibrio del sistema, essendo composti da materiale metallico, è descritto dal grafico di Pourbaix; vengono quindi riportati in Fig 2.6 i diagrammi Eh-pH per ferro e alluminio (ad una concentrazione 10^{-6} M).

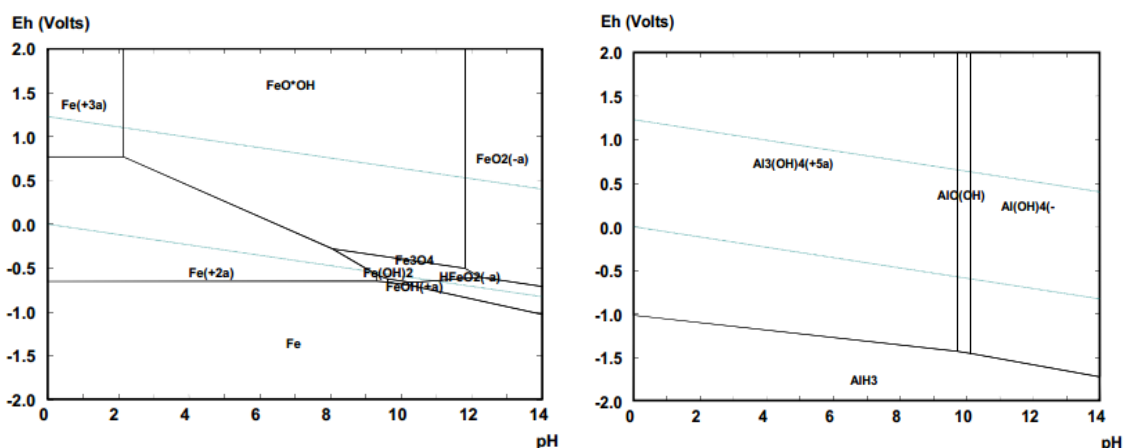


Fig 2.6 - Diagrammi di Pourbaix del ferro e alluminio

Ci sono diversi parametri di processo che influenzano le reazioni elettrocoagulazione; questi parametri sono:

1. **MATERIALI DEGLI ELETTRODI** → Possono essere formati da ferro o alluminio oppure materiali inerti (tipicamente utilizzati al catodo). Nel caso di elettrodi di ferro la dissoluzione dell'anodo è favorita come ferro trivalente in presenza di agenti ossidanti e pH alcalino. Per quanto riguarda l'alluminio, esso si dissolve sempre nella sua forma trivalente. Il materiale scelto influisce anche sull'efficienza complessiva del processo, l'alluminio ha riscontrato in tutti i test efficienze maggiori. Da tenere sempre in considerazione sono anche i costi dei materiali, infatti il ferro risulta un materiale più economico trovando quindi maggior impiego.
2. **pH DELLA SOLUZIONE** → Il pH della soluzione definisce il tipo di idrossido metallico che sarà presente in soluzione. La variazione di alcalinità del sistema giustifica il consumo degli elettrodi quando essi sono formati in alluminio. Come mostrato dai grafici in figura (Fig 2.6) la forma trivalente del ferro ha un campo di esistenza più ampio rispetto alla forma trivalente dell'alluminio. Sasson et al. (2009) hanno dimostrato che in presenza di soluzioni acide si ha l'inibizione della

reazione di dissoluzione chimica del catodo poiché i gruppi ossidrilici vengono consumati dalla soluzione acida stessa.

In caso di elettrodi di ferro la dissoluzione degli stessi risulta significativa anche in assenza di elettricità per valori di pH poco alcalino; il rateo continua a diminuire con l'aumentare del pH. Nel caso specifico di una contaminazione da cromo, investigando un range di pH compreso tra 3 e 10, si può notare come anche l'efficienza di rimozione del metallo sia funzione del valore iniziale di pH (Bazrafshan et al., 2008).

3. **DENSITÀ DI CORRENTE** → La densità di corrente è direttamente proporzionale alle reazioni elettrochimiche che hanno luogo sull'elettrodo e che possono influenzare il potenziale dell'elettrodo stesso. La densità di corrente è proporzionale alla dissoluzione dell'anodo in entrambi i casi (sia di elettrodi in ferro che di alluminio) per valori di pH neutri o alcalini (Mouedhen et al., 2008). La legge di Faraday per elettrodi di ferro in condizioni alcaline sottostima il rateo di dissoluzione, questo fenomeno è sintomo della presenza di ulteriori reazioni competitive che avvengono all'anodo (Sasson et al., 2009).
4. **POTENZIALE AGLI ELETTRODI** → definisce le reazioni che avvengono sulla superficie dell'elettrodo.
5. **TEMPO DI TRATTAMENTO** → tempo durante il quale viene erogata corrente all'interno del sistema EC. Esso è proporzionale alla concentrazione iniziale dell'inquinante e dipende dal materiale con cui è costruito l'elettrodo. In Fig 2.7 e Fig 2.8 sono mostrati i risultati dei test in batch di laboratorio effettuati da Hamdan & El-Naas (2014), il transitorio per raggiungere efficienze di rimozione prossime al 100% cresce al diminuire della densità di corrente nonché nel caso di elettrodi in alluminio.

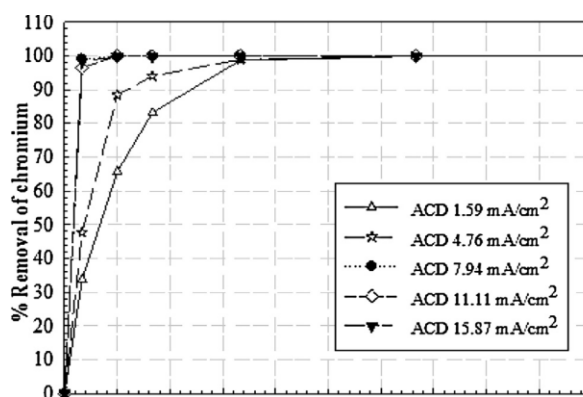


Fig 2.7 - Efficienza di rimozione percentuale in funzione della densità di corrente applicata a un sistema ad elettrodi in alluminio (Hamdan & El-Naas, 2014)

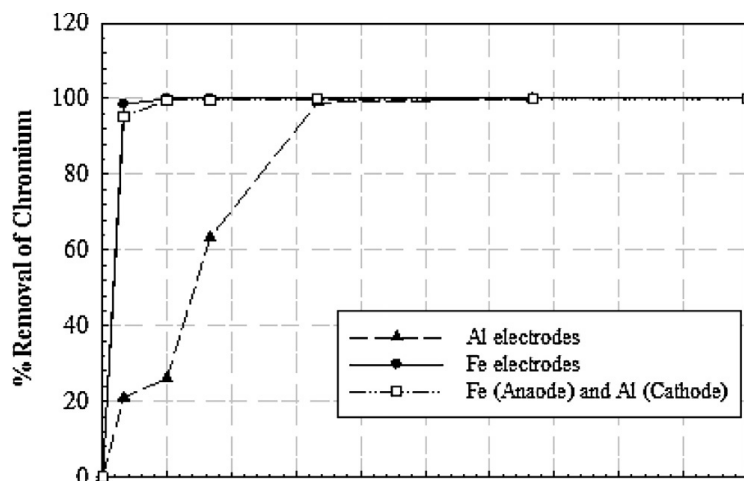


Fig 2.8 - Efficienza di rimozione percentuale in funzione del materiale con cui sono realizzati gli elettrodi. Sono stati eseguiti tre test: con entrambi gli elettrodi di alluminio, con entrambi gli elettrodi in ferro e elettrodi misti (alluminio, ferro) (Hamdan & El-Naas, 2014)

6. **CONCENTRAZIONE DEGLI ANIONI**→ la presenza di sostanze anioniche quali solfati o fluoridi causano fenomeni competitivi nei confronti dei precipitati idrossidi di alluminio e ferro.
7. **TEMPERATURA DELL'ACQUIFERO**→ può influenzare il rateo di precipitazione. Dagli studi di Chen (2004) si evince come temperature troppo elevate possano creare un gel di $\text{Al}(\text{OH})_3$ che si può depositare sulla superficie dell'elettrodo. L'aumento di temperatura ha una grande influenza anche sulla solubilità dell'alluminio, i due parametri sono direttamente proporzionali.
8. **CONDIZIONI IDRODINAMICHE**

In letteratura la maggior parte degli studi dimostrano l'applicabilità dell'elettrocoagulazione per il trattamento di differenti tipi di acque di rifiuto. Per quanto riguarda il trattamento sulla matrice solida l'efficienza del processo risente notevolmente dell'opposizione al passaggio della corrente elettrica dovuta a valori minori di conducibilità rispetto alle matrici liquide rendendo il trattamento oneroso dal punto di vista energetico. Un altro aspetto critico è dovuto alle tensioni operative da utilizzare sui terreni in quanto, se troppo elevate, possono provocare un aumento considerevole della temperatura con conseguente fusione e denaturazione della matrice solida.

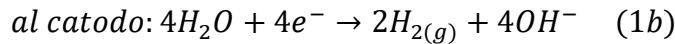
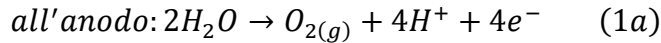
2.2.2.5 ELETTRICITÀ

La chimica dei processi elettrocinetici è una tecnologia studiata e sviluppata per la rimozione e distruzione dei metalli pesanti, composti organici e radionuclidi in acquifero (Acar & Alshawabkeh, 1993). L'applicazione di un campo elettrico nell'ordine di 2-4 V/cm attraverso una zona porosa satura genera numerosi fenomeni di trasporto di soluti attraverso la fase liquida della matrice solida. Sotto l'influenza del campo elettrico ci sono 5 meccanismi atti a trasportare il contaminante in fase acquosa attraverso il mezzo poroso: advezione, dispersione, elettromigrazione, elettrosmosi ed elettroforesi (Acar & Alshawabkeh, 1993). Advezione e dispersione sono legati a fenomeni prevalentemente di tipo idraulico ovvero differenze di carichi idraulici tra punti del mezzo poroso. I fenomeni più interessanti per la rimozione di metalli pesanti quali cromo esavalente sono elettromigrazione, elettroforesi ed elettrosmosi, essi sono diretta conseguenza dell'influenza del campo elettrico. Paillat et al. (2000) definisce i tre processi come segue:

- elettromigrazione trasporto di specie ioniche verso l'elettrodo avente carica apposta
- elettroforesi: termine usato per descrivere la migrazione di particelle colloidali cariche verso elettrodi opposti.
- elettrosmosi: è lo scorrere del fluido (bulk) verso un elettrodo, causato da interazioni elettriche complesse tra la superficie solido/liquido.

I contributi di elettrosmosi, elettroforesi ed elettromigrazione alla migrazione delle specie ioniche inquinanti dipende dal tipo di suolo, dal contenuto di acqua, da altre specie ioniche presenti nel bulk e dal tipo di specie ionica inquinante stessa.

La descrizione della migrazione delle specie in cui il cromo si può presentare è complessa in quanto esso esiste in due forme; è essenziale perciò conoscere sia la concentrazione di cromo totale che la sua ripartizione in Cr(III) e Cr(VI). Durante l'elettromigrazione le specie anioniche del cromo esavalente migrano verso l'anodo (Mattson & Lindgren, 1994). Il Cr(III) si può trovare sotto forma di idrossidi complessi cationici quali: CrOH^{2+} , CrOH_2^+ , CrOH_3 ; queste specie positive migrano verso il catodo (Alshawabkeh; 1995 in Reddy; 2001). Il fenomeno di riduzione e precipitazione del cromo esavalente è legato alle condizioni acide e alcaline che si vengono a creare, a causa del processo elettrocinetico, rispettivamente all'anodo e al catodo. Le reazioni seguenti descrivono ciò che accade ai due elettroliti:



Le specie ioniche negative del Cr(VI), migrando verso l'ambiente riducente prodotto all'anodo, reagiscono con gli elettroni presenti con conseguente riduzione parziale del Cr(VI) in Cr(III). Ne consegue una coesistenza all'anodo di entrambe le forme come si evince dal grafico in Fig 2.9. Il Cr(III) a seguito della migrazione degli ioni ossidrili verso l'anodo reagisce formando idrossidi precipitati di cromo. Per quanto riguarda il cromo totale (Cr(VI) + Cr(III)) si osserva, dagli studi di Reddy (1998), una migrazione verso il catodo. Questo fenomeno è dovuto al fatto che le specie del Cr(III) migrano verso l'elettrodo positivo mentre i composti del cromo esavalente subiscono un primo spostamento verso l'anodo, con conseguente trasformazione del Cr(III) in Cr(VI) e una successiva migrazione nella direzione del catodo.

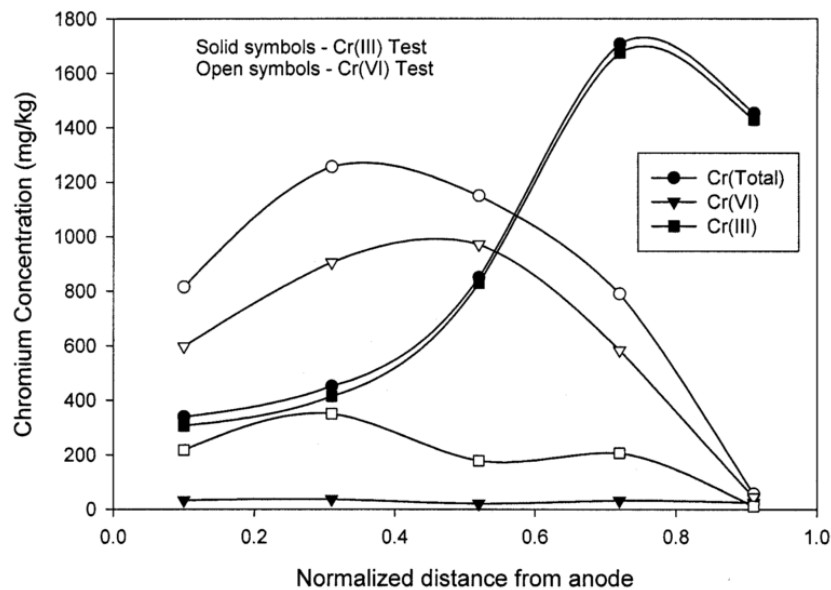


Fig 2.9 - Effetto della forma iniziale del cromo sotto campo elettrico di 1V/cm

Il processo elettrochimico è influenzato dai seguenti parametri:

- Forma iniziale della specie cromo → Quando la forma iniziale del cromo è quella esavalente, la migrazione della specie si ha verso l'anodo con conseguente accumulo dovuto ai valori di pH acido (2 – 4). Se si ha una situazione iniziale con abbondanza di cromo trivalente, si osservano alte concentrazioni nella regione del catodo e basse concentrazioni nella regione dell'elettrodo positivo.

- Tipo suolo → per studiare l'effetto del tipo di suolo sulla migrazione del Cr(VI) si introduce l'effetto di buffering del suolo stesso. Il buffering è definito come la capacità del suolo di reagire, grazie alla sua capacità di scambio cationico, alle modifiche di nutrienti o pH tramite processi di adsorbimento/desorbimento di sostanze nutritive. La capacità di buffering del suolo influenza quindi il pH con diretta influenza anche sul cromo presente nella matrice e relative migrazioni. Suoli con un'alta capacità di buffering fanno sì che vi sia Cr(VI) in fase acquosa, viceversa, per bassi valori di buffering, il Cr(VI) risulterà adsorbito sulla matrice solida (Reddy; 1998). Le argille, a differenza di terreni con granulometria grossolana, hanno un valore di buffering maggiore.
- Effetto degli agenti ossidanti e riducenti → in presenza di agenti ossidanti e riducenti, rispettivamente manganese e solfuro di sodio (Na_2S), può influenzare significativamente il processo elettrochimico, modificando il profilo di concentrazione del sistema.

Il processo elettrocinetico è soggetto a diversi fattori limitanti descritti nel decreto Legislativo 372/99:

- contenuto di umidità: se il terreno in cui si vuole operare è caratterizzato da un'umidità ridotta (al di sotto del 10%) l'efficienza è fortemente ridotta. Il range ottimo si trova tra il 14% e il 18%;
- anomalie fisiche nella matrice: se vi è la presenza di masse metalliche o materiali che tendono a isolare la capacità di conducibilità elettrica, l'efficienza del processo elettrocinetico è fortemente ridotta; l'applicazione a siti molto eterogenei è sconsigliata;
- gli elettrodi utilizzati non devono rilasciare nessuna sostanza inquinante, ma devono risultare inerti. Si ha quindi una preferenza per elettrodi in ceramica, grafite e platino;
- bisogna sempre considerare fenomeni competitivi dovuti al buffering adsorbimento/desorbimento sulla matrice solida. Questi fenomeni, come visto in precedenza sono più o meno significativi in funzione del tipo di suolo. Condizioni estreme di pH e reazioni di ossido-riduzione possono influire negativamente sull'efficienza, anche se condizioni di pH acido favoriscono la mobilizzazione dei metalli pesanti;

La conducibilità elettrica del terreno influenza il costo dell'operazione costituendo uno dei maggiori aspetti critici. I valori tipici di conducibilità elettrica dei terreni spaziano da 30 a più di 3000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ con i valori più alti relativi alle argille saturate. Il valore ottimo di applicabilità del processo risulta pari a 500 $\mu\text{S}/\text{cm}$; in questo caso si stima un consumo energetico giornaliero pari a 12 kWh/m³.

La spaziatura degli elettrodi influisce sul tempo di trattamento e di conseguenza sui costi del processo.

ELETTROMIGRAZIONE

L'elettromigrazione descrive il flusso di ioni in soluzione acquosa causato dall'applicazione del campo elettrico. Durante la migrazione deve essere soddisfatta la condizione di elettroneutralità in ogni punto del sistema come espresso dall'equazione (Marks et al., 1997).

$$\sum_j^n z_j c_j = 0$$

Dove:

z_j : numero di valenza ionica

c_j : concentrazione dello ione di tipo j

n : numero totale delle specie ioniche presenti nel sistema considerato

Le specie positive verranno attratte dal catodo, mentre le specie negative si muoveranno verso l'anodo (Fig 2.10).

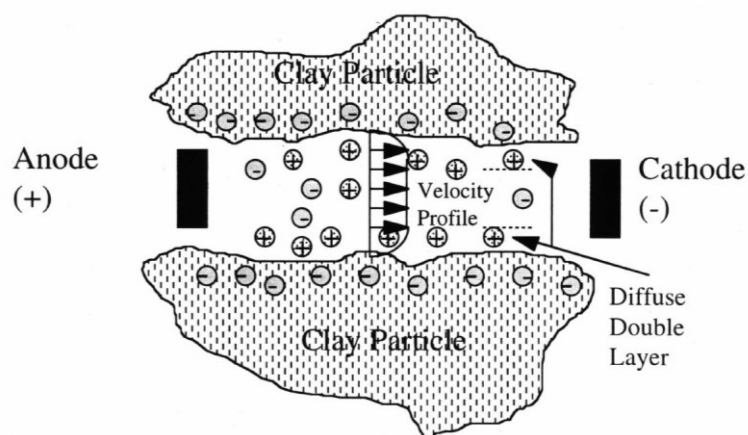


Fig 2.10 - Elettromigrazione in una matrice argillosa porosa

La mobilità ionica, ovvero la velocità di uno ione quando il campo elettrico applicato è 1 V/m, assume valori compresi tra $1 \cdot 10^{-8}$ e $10 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Yeung, 2005). Tramite l'equazione Nernst – Einstein si può ricavare la mobilità ionica effettiva funzione dello stato di ossidazione del contaminante, della temperatura e della porosità del mezzo.

$$u_j^* = \frac{D_j^* z_j F}{RT}$$

Dove:

u_j : mobilità ionica effettiva

z_j : numero di valenza ionica

T: temperatura [K]

R: costante ideale dei gas $8,315 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$

F: costante di Faraday 96485 C/mol

D_j^* : coefficiente di diffusione effettivo della specie chimica j; esso è funzione del coefficiente di diffusione D_j , il coefficiente di anisotropia (0,1 – 0,7) e porosità (0,2 – 0,5)

La presenza di anodo e catodo sotto tensione fa verificare una migrazione di ioni idrogeno verso il catodo e di ioni ossidrilici verso l'anodo, influenzando così la chimica acido base del terreno (Gillen, 2006). Gli H^+ migrano verso il catodo con un rateo descritto dalla mobilità ionica effettiva u_j^* pari a $760 \text{ cm}^2/\text{V}\cdot\text{s}$. Gli ioni OH^- migrano verso l'anodo con un valore u_j^* di $432 \text{ cm}^2/\text{V}\cdot\text{s}$ (Acar & Alshawabkeh, 1993). In sistemi elettrocinetici si parla di fronte acido in quanto il movimento delle specie ioniche è dettato dalla mobilità degli H^+ che risulta essere quasi doppia rispetto a quella degli ioni ossidrilici. In Tab 2.15 vengono riportati i coefficienti di diffusione non efficace e i coefficienti di mobilità ionica degli anioni e cationi più rappresentativi.

Specie	$D_j \left(* 10^{-6} \frac{\text{cm}^2}{\text{s}} \right)$	$u_j \left(* 10^{-6} \frac{\text{cm}^2}{\text{Vs}} \right)$	$u_j^* \left(* 10^{-6} \frac{\text{cm}^2}{\text{Vs}} \right)$
H⁺	93	3625	760
Na⁺	13	519	109
Ca⁺	8	617	130
OH⁻	53	2058	432
MnO₄⁻	40	-	-
NO₃⁻	19	740	155

Tab 2.15 - Coefficienti di diffusione non efficace e coefficienti di mobilità ionica per tipiche specie anioniche e cationiche presenti in acquifero

ELETTROFORESI

L'elettroforesi è un processo di migrazione, causato dall'applicazione di un campo elettrico, di particelle colloidali verso gli elettrodi con carica opposta (Marks, 1997).

L'elettroforesi è generalmente trascurabile in quanto la meno influente dei tre processi che si verificano nell'elettrokinetics, questo perché i colloidi hanno una dimensione più grande rispetto a quella della porosità impedendone di conseguenza la migrazione. I contributi di elettroosmosi, elettroforesi ed elettromigrazione alla migrazione delle specie ioniche inquinanti dipende dal tipo di suolo, dal contenuto di acqua, da altre specie ioniche presenti nel bulk e dal tipo di specie ionica inquinante stessa.

ELETTROOSMOSI

Elettro osmosi è il termine dato al movimento della soluzione di bulk acquoso attraverso un mezzo poroso, dovuto alla diretta applicazione di un campo elettrico continuo (Gillen, 2006). Il fenomeno di elettroosmosi è collegato a complessi fenomeni di interazione tra solido e liquido; il liquido, comportandosi da conduttore, permette il trasferimento di corrente nonché la formazione di doppi strati elettrici (EDL) tra l'interfaccia solido liquido. L'EDL consiste in una regione in cui sono attratte elettrostaticamente sulla superficie del solido delle cariche ioniche di segno opposto (controioni) (Gillen, 2006). Si viene a generare uno strato diffusivo a causa dell'interazione tra le cariche presenti nel bulk che vengono attratte per compensare le cariche compattate presenti sulla superficie solida. L'andamento dello strato diffusivo dipende dalla legge di Boltzmann.

$$p = p_0 \exp\left(-\frac{z * e * \psi}{kT}\right)$$

Dove:

p_0 = concentrazione del bulk

z = carica degli elettroni

e = carica del protone

k = costante di Boltzmann

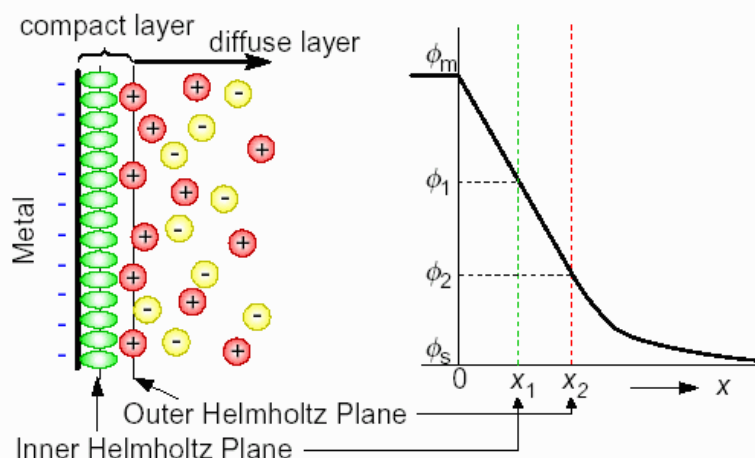


Fig 2.11 - A sinistra si ha la rappresentazione grafica dello strato diffuso. A destra viene rappresentato l'andamento del potenziale Z in funzione della distanza dallo ione metallico, secondo legge di Boltzmann

Come si può osservare dal grafico riportato in figura (Fig 2.11) all'aumentare della distanza x dallo ione metallico si ha una decrescita esponenziale, secondo la legge di Boltzmann, del potenziale Z . Il potenziale Z può essere definito come il potenziale di un qualunque piano preso all'interno dell'EDL (compreso tra la regione CL e DL). La distanza caratterizzata da un potenziale Z pari a $0V$ è chiamata point of zero charge (PZC).

Lo strato sottile di cariche fluide migrano lungo il gradiente potenziale trasferendo momento al bulk il provocandone lo spostamento verso l'anodo o il catodo. Ad esempio nelle argille, le quali sono generalmente caricate negativamente per valori di pH compresi tra 5 e 9, l'EDL assume carica positiva e migra quindi, insieme al bulk, verso il catodo. La velocità di migrazione del liquido durante l'elettrosmosi è stata teorizzata la prima volta da Helmholtz in 1879 e modificata successivamente da 1914 Smoluchowski (Saichek & Reddy, 2005). La legge di Helmholtz – Smoluchowski, chiamata anche legge di HS, è descritta dalla relazione:

$$v = \frac{\varepsilon * \xi * E}{\mu}$$

Dove

v : velocità del bulk

ϵ : permittività elettrica del mezzo essa descrive il comportamento dielettrico della soluzione in presenza di un campo elettrico. In particolare, quantifica la tendenza del mezzo a contrastare l'intensità del campo elettrico presente al suo interno [F/m]

ξ : potenziale Z del suolo

E : intensità del campo elettrico applicato [V/m]

μ : viscosità del fluido

Alcune considerazioni su questa formula. Questa è rigorosamente valida se lo spessore dello strato elettrico diffuso è piccolo rispetto al raggio della matrice suolo, inoltre non considera i fenomeni di conduzione superficiale. Un'altra formula, proposta nel 2000 da Paillat, rappresenta una valida alternativa alla formula HS

$$V_e = K_e i_e$$

Dove:

V_e : velocità del fluido [ms^{-1}]

i_e : gradiente di potenziale elettrico [Vm^{-1}]

K_e : permeabilità elettrosmotica, essa è funzione del potenziale Z della porosità del mezzo, della viscosità dell'acqua e della costante dielettrica [$\text{m}^2 \text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$]. L'espressione della permeabilità è descritta dalla seguente relazione:

$$K_e = \frac{\epsilon * \xi * n}{\mu}$$

Dove

K_e : permeabilità elettrosmotica

ϵ : permittività elettrica del mezzo [F/m]

ξ : potenziale Z del suolo

n : porosità [-]

μ : viscosità del fluido

Osservando la nuova formulazione proposta da Paillat della velocità idraulica del fluido, si nota come essa si indipendente dalla dimensione dei pori della matrice suolo.

2.2.3 PROCESSI BIOLOGICI

Il campo dei processi biologici risulta essere un'area di studio particolarmente attiva nel campo della ricerca in quanto le biotecnologie ambientali ricoprono potenzialmente un ruolo chiave nell'ottica di uno sviluppo sostenibile. Tali studi sono volti in maniera sostanziale in due direzioni: il miglioramento delle tecnologie odierne e l'implementazione di nuovi metodi di risanamento. I due approcci hanno come peculiarità comune l'utilizzo di microrganismi come attori protagonisti della decontaminazione della matrice terreno. Negli ultimi anni la ricerca ha dimostrato come sia possibile sfruttare questi organismi molto versatili per agire sia su contaminati organici che inorganici quali metalli pesanti.

Il biorisanamento o bioremediation è quindi un insieme di tecnologie di depurazione del suolo che utilizzano microrganismi naturali o ricombinanti per abbattere sostanze tossiche e pericolose attraverso processi aerobici e anaerobici. Tali processi possono essere applicati in situ, sfruttando i microrganismi autoctoni o attraverso l'introduzione di ceppi batterici o fungini. Il biorisanamento comporta la degradazione di composti tossici attraverso la loro conversione in sostanze meno tossiche e/o innocue. I microrganismi, infatti, sono ubiquitari e hanno sistemi metabolici in grado di degradare e utilizzare vari composti tossici come sorgente di energia grazie al metabolismo aerobico, anaerobico, alla fermentazione e al cometabolismo. Solitamente la biodegradazione aerobica ha un'efficienza maggiore dei processi anaerobici ed è ampiamente utilizzata compatibilmente con la natura chimica del contaminante. I processi aerobici ed anaerobici possono, inoltre, essere utilizzati in serie, per ridurre la complessità o la tossicità del contaminante.

Storicamente tutti i processi utilizzati per il risanamento di sistemi inquinati da cromo esavalente si basavano su meccanismi chimico – fisici; l'utilizzo di questi metodi su larga scala risulta proibitivo in quanto molto costosi. Negli ultimi anni si stanno cercando quindi metodi sostitutivi cost- friendly che prevedano l'impiego microrganismi sfruttando i loro processi biochimici e biofisici. L'intervento ingegneristico comporta un controllo di tipo biogeochimico il quale modifica i parametri chimico fisici del terreno stesso come pH, donatori o accettori di elettroni, temperatura etc.

I batteri cromo riducenti possono essere più o meno sensibili alla presenza del metallo in funzione del Gram rispettivamente negativo e positivo. Nei successivi due sotto capitoli verranno trattati sia i meccanismi di riduzione strettamente biologici sia le modalità di creazione di un ambiente riducente ad opere delle reazioni metaboliche di consumo di un

substrato energetico di crescita. In particolare verranno approfonditi i meccanismi strettamente biologici di riduzione quali:

- aerobico diretto
- anaerobico diretto
- anaerobico indiretto.

Nel caso di utilizzo di batteri per il solo cambiamento delle condizioni ossido – riducenti dell'ambiente ospitante verranno tratti due tipologie di substrati:

- commerciali
- non commerciali e/o scarti di produzione.

2.2.3.1 PROCESSI BIOLOGICI DIRETTI

Il risanamento biologico di terreni contaminati da cromo esavalente può essere effettuato in modo diretto utilizzando numerose specie batteriche in grado di resistere in tali ambienti, sfruttando alcune delle loro caratteristiche metaboliche per la riduzione del metallo. La capacità dei microrganismi di sopravvivere ad alte concentrazioni di inquinante (cromo) può essere mediata non solo da enzimi e/o da proteine di trasporto molto specifiche, ma anche da strutture sub- cellulari che interagiscono con i metalli stessi sequestrandoli (Baldi e Barbieri.; 2008). In campo microbiologico è stato dimostrato che esistono molti microrganismi in grado di crescere e sopravvivere ad elevate concentrazioni di Cr(VI) sviluppando meccanismi di resistenza e di tolleranza all'inquinante. Molti autori hanno trovato che i batteri cromo resistenti aventi Gram – positivi sono più resistenti che quelli Gram – negativi (Viti & Giovannetti, 2005; Ross et al., 1981), così come è noto che i procarioti sono più resistenti degli eucarioti (Kamaludeen et al., 2003). La resistenza può essere definita come la capacità dei microrganismi di resistere agli effetti tossici del metallo (Gadd, 1992); alcuni esempi di meccanismi di resistenza possono essere: la formazione di particolari proteine (Baker & Proctor, 1990; Hall, 2002), riduzione della permeabilità della membrana cellulare (Horitsu et al.; 1987 in *Geomicrobiology, Fifth Edition*, 2008) nonché la trasformazione di cationi metallici in forme meno tossiche e volatili. Gadd (1992) definisce la “tolleranza” come l'abilità di microrganismi di sopravvivere alla azione tossica del metallo grazie a internistiche proprietà come la composizione della parete cellulare, oppure tramite, meccanismi gratuiti di resistenza (Gadd & Griffiths, 1978), che limitano la

tossicità del metallo. Uno dei principali meccanismi di tolleranza al Cr(VI) consiste nel bioassorbimento ossia nel legame del Cr(VI) con le componenti della superficie batterica (Quintelas et al.; 2008 in Decorosi, 2010). Altri meccanismi di tolleranza batterica possono essere la produzione di polisaccaridi esacellulari o l'escrezione di metaboliti capaci di legare o precipitare metalli pesanti convertendoli in forme innocue.

La differenza tra tolleranza e resistenza è molto sottile e ancora ampiamente dibattuta in ambito scientifico (Macnair, 1993) questo perché nella riduzione biologica diretta i microrganismi utilizzano contemporaneamente meccanismi di tolleranza e di resistenza per evitare la morte cellulare. La morte batterica, che può conseguire in seguito all'esposizione a Cr(VI) è dovuta all'accumularsi di numerosi danni cellulari che impediscono la sopravvivenza del microrganismo (Aertsen & Michiels, 2004).

Lo studio del metabolismo e delle caratteristiche di tolleranza e resistenza batterica è ampiamente oggetto di ricerca da parte della comunità scientifica; i batteri resistenti/tolleranti al cromo sono in grado di trasformare il Cr(VI) a Cr(III) e vengono chiamati quindi cromo riducenti.

I meccanismi di bioriduzione, aerobici e anaerobici, possono coinvolgere reazioni extracellulari attraverso l'interazione con la catena respiratoria presente nella membrana nonché reazioni enzimatiche citoplasmatiche intracellulari con riduttori solubili mediate da enzimi (Chirwa & Molokwane, 2011).

Di seguito sono elencate le principali strategie di resistenza con annessi pathways di riduzione (Fig 2.12):

- assorbimento del cromato tramite il sistema transmembranico di trasporto del solfato (Brown et al., 2006; Hu et al., 2005) nonché pompe di efflusso con localizzazione plasmidica
- riduzione metabolica intracellulare ed extracellulare (Ngwenya & Chirwa, 2011) del Cr(VI) al Cr(III) in condizioni aerobiche (diretta) e anaerobiche (diretta e indiretta)
- risposta allo stress ossidativo causato dai cromati tramite l'attivazione di enzimi (Ackerley et al., 2004)
- riparazione dei danni al DNA (Ramírez-Díaz et al., 2008) tramite risposta enzimatica (RecA, RecG, RuvAB) (Hu et al., 2005)
- regolazione dell'assunzione di ferro per prevenire la generazione di radicali idrossili altamente reattivi tramite reazioni Fenton (Brown et al., 2006)

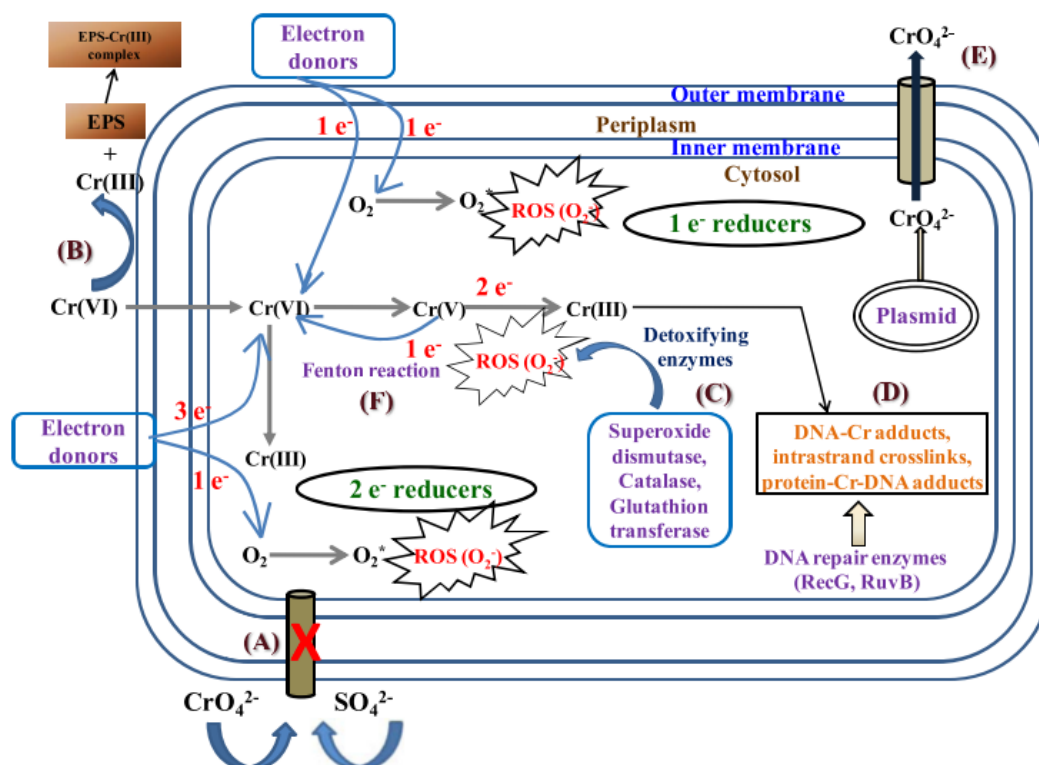


Fig 2.12 - Meccanismi di resistenza al cromo della cellula batterica. (A) meccanismo di assorbimento del cromo tramite il sistema di trasporto del solfato. (B) riduzione extracellulare del Cr(VI) a Cr(III). (C) riduzione intracellulare del Cr(VI) a Cr(III) tramite cromato reduttasi. (D) funzione di risposta allo stress ossidativo. (E) pompa di efflusso del cromato con origine nei plasmidi. (F) meccanismo di formazione dei ROS e relativo stress ossidativo (Modificata da (Thatoi et al., 2014).

Il meccanismo di assorbimento dei nutrienti quale lo ione solfato (SO_4^{2-}) avviene tramite il sistema di trasporto transmembranico del solfato. Il trasporto del solfato attraverso la membrana citoplasmatica fino all'interno della cellula è un processo attivo che avviene sia contro gradiente chimico, visto che la concentrazione del solfato all'interno delle cellule è da 100 a 1000 volte più alta rispetto a quella della soluzione del terreno, sia contro gradiente elettrico, essendo il solfato carico negativamente. Quindi, il trasporto avviene con un meccanismo di tipo secondario che prevede consumo di energia ricavata dall'idrolisi dell'ATP (Zuchi, 2008). Il cromato (CrO_4^{2-}), data la somiglianza strutturale con il solfato (SO_4^{2-}) (Fig 2.13), riesce ad attraversare la membrana e raggiungere l'interno della cellula (Cervantes et al., 2001).

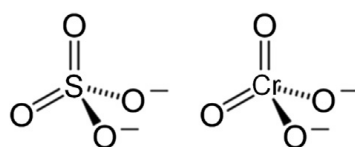


Fig 2.13 - Similarità tra la forma ionica solfato e cromato

Nome del gene	Codifica della proteina e suo ruolo nella riparazione del DNA
Geni con funzione nota	
PolB (dinA)	Codifica la polimerizzazione di alcune sotto unità di polimerase del DNA. È richiesto per far ripartire la replicazione
uvrA	Codifica l'ABC excinuclease
uvrB	
umuC	Codifica la polimerase V del DNA
umuD	
sulA	Codifica quelle proteine che inibiscono la divisione cellulare
recA	Codifica la proteina RecA richiesta per la riparazione error-prone e la riparazione della ricombinazione
dinB	Codifica la polimerase IV del DNA
Geni coinvolti nel DNA per il metabolismo ma con ruolo sconosciuto nella riparazione	
Ssb	Codifica una proteina di tipo SSB
uvrD	Codifica l'elicasi del DNA
himA	Codifica una sotto unità di integrazione di fattori principali, utilizzata nella ricombinazione sito specifica, replicazione, trasporto e regolazione dell'espressione genetica
recN	Richiesta per la riparazione di ricombinazione
Geni ancora senza una funzione nota	
dinD	
dinF	

Tab 2.16 - Principali geni dell'E.coli che inducono le funzioni SOS per la protezione del codice genetico (Janion, 2008)

Per quanto riguarda l'esposizione diretta al Cr^{3+} non causa alcun effetto in quanto la membrana cellulare risulta impermeabile a questa forma (Salnikow & Zhitkovich, 2008). Il processo di riduzione della forma esavalente dipende dal tipo di metabolismo batterico, la riduzione microbica diretta è stata dimostrata in aerobiosi che in anaerobiosi. Nel grafico estratto dagli studi di Cheung & Gu (2007) sono confrontati gli steps reattivi nei due metabolismi (Fig 2.15); nei due paragrafi seguenti verranno descritti tali processi.

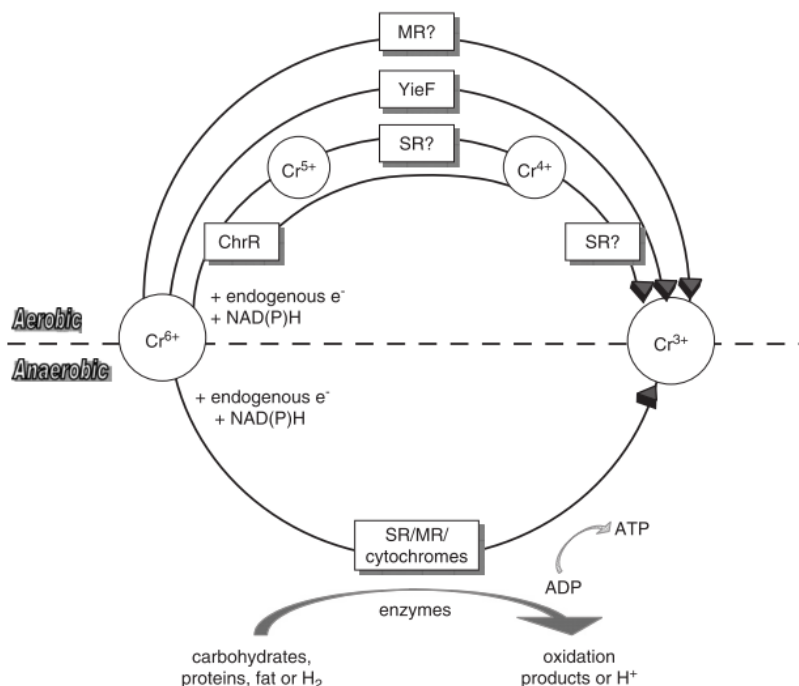


Fig 2.15 - Differenti processi metabolici responsabili della riduzione del Cr(VI) in Cr(III) (Cheung & Gu, 2007).

2.2.3.1.1 CONDIZIONI STRETTAMENTE AEROBICHE

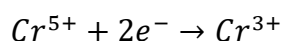
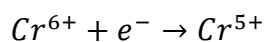
In condizioni aerobiche si osservano tre meccanismi di riduzione differenti per tempistiche e steps intermedi. La caratteristica che accomuna tutti i processi è il trasferimento di elettroni al Cr(VI) a partire da una riserva endogena, dal nucleotide nicotinammide adenina dinucleotide fosfato (NADPH) o dal nicotinammide adenina dinucleotide (NADH) (Bestetti & Galli, 2008). Un esempio di reazione è il seguente:



La trasmissione elettronica avviene ad opera di reduttasi solute nel citoplasma le quali, essendo in grado di operare sul cromo, prendono il nome di cromato – reduttasi (Ackerley et al., 2004).

Il primo pathway di riduzione implica la presenza della flavoproteina dimerica ChrR (Ackerley et al., 2004), ossia di una cromato – reduttasi che prevede la presenza di due o tre stati di ossidazione intermedi (Cheung & Gu, 2007). Il ChrR trasferisce due elettroni: in un primo momento un elettrone per portare il Cr⁶⁺ a Cr⁵⁺, successivamente vi è il trasferimento di due ulteriori e⁻ in concomitanza di una riduttasi solubile non ancora

specificata (Wang & Shen, 1995 in Cheung & Gu, 2007) (SR? in Fig 2.15), per formare il prodotto termodinamicamente stabile Cr^{3+} . Le reazioni di riduzione vengono descritte da Singh et al. (2011) come segue:



Risulta possibile la formazione di un ulteriore intermezzo reattivo, il Cr^{4+} , caratterizzato da una vita breve in quanto fortemente instabile (Czakó-Vér et al., 1999). Una parte dell'intermedio Cr^{5+} è spontaneamente riossidata generando ROS (reactive oxygen species), che sono i principali responsabili dello stress ossidativo subito dalla cellula.

La riduttasi ChrR fu isolata per la prima volta durante la purificazione dello *Pseudomonas putida* effettuata da Park et al. (2000).

La seconda via per ottenere la forma trivalente del cromo si basa sulla riduttasi Yief la quale, utilizzando le stesse riserve di elettroni, è motrice del trasferimento di quattro elettroni. Tre e^{-} vengono consumati per la riduzione del Cr^{6+} mentre il rimanente viene ceduto all'ossigeno generando quindi specie ROS in quantità e reattività inferiore rispetto al caso precedente (Park et al., 2001). Un tipico batterio che utilizza la flavoproteina cromo – riduttasi è l'*E.coli* (W.-C. Bae et al., 2005). Vengono riassunti in Tab 2.17 i primi due meccanismi di trasferimento elettronico con relativa formazione di ROS.

Numero di elettroni trasferiti	Meccanismi impiegati per la riduzione del cromo	Effetti sulla cellula	Citazione
Tre	Riduzione del Cr(VI) a Cr(III) via stati di ossidazione intermedi. Vi è una continua trasformazione da Cr(V) a Cr(VI); le specie ROS sono generate quando il Cr(V), riossidandosi, trasferisce un e^{-} all' O_2 tramite reazioni Fenton.	Stress ossidativo è molto forte in quanto la quantità di ROS generata è molto elevata.	(Barak et al., 2006)

Quattro	Trasferimento di 3e ⁻ al Cr(VI) che viene ridotto direttamente a Cr(III). Un e ⁻ è trasferito all'O ₂ formando ROS. Non vengono generati stati di ossidazione intermedi	ROS generato è in minore quantità nonché meno reattivo. Lo stress ossidativo risultante è inferiore rispetto al caso precedente.	(Thatoi et al., 2014)
----------------	--	--	-----------------------

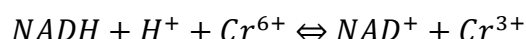
Tab 2.17 - Meccanismi di trasferimento elettronico e relativa formazione di ROS

I ROS possono essere classificati in due categorie (Provvidenza, 2010):

- a) i radicali liberi dell'ossigeno contenenti l'elettrone spaiato (O₂•⁻ e OH•)
- b) specie non radicaliche H₂O₂

Gli effetti delle specie reattive ossidanti sulla salute della cellula possono essere, potenzialmente in grado di provocare numerosi danni. Tuttavia il microrganismo è in grado di neutralizzarli bloccando la loro attività tramite la produzione di antiossidanti. Gli antiossidanti a loro volta, in funzione della sequenza temporale d'azione, possono essere distinti in primari (enzimatici) e secondari (non enzimatici).

Da ulteriori studi effettuati da Cheung & Gu nel 2007 è emersa una nuova specie batterica che utilizza una terza via di riduzione, il cui processo non è ancora del tutto noto e caratterizzato (Cheung & Gu, 2007). Si è osservata la possibilità di ridurre il Cr⁶⁺ a Cr³⁺ nell'ambiente esterno prossimo alla membrana. Nella riduzione del cromo esavalente associata alla membrana, un enzima media il trasferimento degli elettroni da un donatore (NADH/NADPH) a un terminale accettore (Cr⁶⁺). In questo modello, descritto in figura (Fig 2.16), il passaggio degli e⁻ è mediato da una pompa protonica transmembranica chiamata NADH – deidrogenasi che svolge ruolo simile alle cromo – riduttasi (Dutta et al., 2013). La reazione chimica condotta dalla flavoproteina è la seguente:



Alcuni dei microrganismi che operano con questo tipo di riduzione sono: *Bacillus megaterium* TKW3 (Cheung & Gu, 2007), *Shewanella oneidensis* MR-1 (Myers et al., 2000), *Pseudomonas fluorescens* LB300 (Bopp & Ehrlich, 1988), *Pseudomonas maltophilia* O-2 (Focardi et al., 2013).

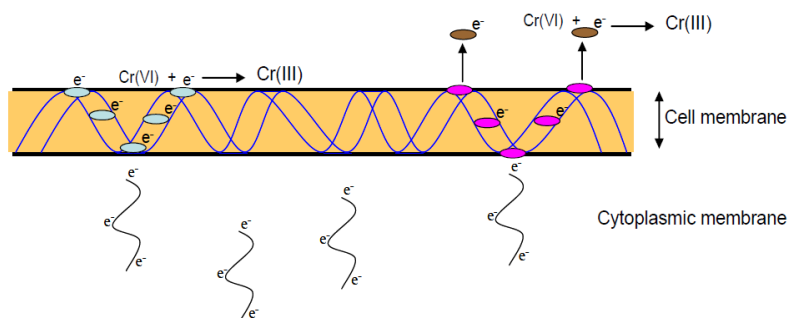


Fig 2.16- riduzione del Cr(VI) che coinvolge l'interazione tra catena respiratoria e Cr(VI) tramite proteine transmembratiche (pompe protoniche)

Sono stati raccolti in Tab 2.18 i principali ceppi batterici in grado di ridurre il Cr(VI) in condizioni strettamente aerobiche.

BATTERI AEROBICI	
Batterio	Fonte bibliografica
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	(Nies, 1990)
<i>Arthrobacter crystallopoietes ES 32</i>	(Camargo et al., 2004)
<i>Arthrobacter SUK 1201</i>	(Dey & Paul, 2014)
<i>Bacillus amyloliquefaciens CSB 9</i>	(Das et al., 2014)
<i>Bacillus cereus</i>	(Murugavelh & Mohanty, 2013)
<i>Bacillus drentensis</i>	(Seo et al., 2013)
<i>Bacillus maroccanus</i>	(Viti et al., 2003)
<i>Bacillus maroccanus ChrA21</i>	(Viti et al., 2003)
<i>Bacillus megaterium TKW3</i>	(Cheung & Gu, 2007)
<i>Bacillus sp.</i>	(Elangovan et al., 2006)
<i>Bacillus sp. ATCC 700729</i>	(Shakoori et al., 2000)
<i>Bacillus sp. ES29</i>	(Camargo et al., 2003)
<i>Bacillus sp. FM-1</i>	(Masood & Malik, 2011)
<i>Bacillus spp.</i>	(Venil et al., 2011); (T. Verma et al., 2009)
<i>Bacillus subtilis BYCr-1</i>	(Zheng et al., 2015)
<i>Bacillus CSB-4</i>	(Biswaranjan Dhal et al., 2010)
<i>Bacillus XW-2</i>	(Liu et al., 2006)
<i>Bacillus XW-4</i>	(Liu et al., 2006)
<i>Bacillus PB2</i>	(Okeke et al., 2008)

<i>Bacillus thuringensis</i>	(Şahin & Öztürk, 2005)
<i>Brevibacterium sp.</i>	(Faisal & Hasnain, 2004)
<i>Corynebacterium hoagie ChrB20</i>	(Viti et al., 2003)
<i>Enterobacter sp.</i>	(Molokwane & Nkhalambayausi-Chirwa, 2009)
<i>Exiguobacterium sp. ZM-2</i>	(Alam & Malik, 2008)
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	(Molokwane & Nkhalambayausi-Chirwa, 2009)
<i>Ochrobactrum intermedium SDCr-5</i>	(Faisal & Hasnain, 2004; Sultan & Hasnain, 2007)
<i>Ochrobactrum sp. CSCr-3</i>	(He et al., 2009)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Aguilera et al., 2004)
<i>Pseudomonas aeruginosa A2Chr</i>	(Ganguli & Tripathi, 2002)
<i>Pseudomonas fluorescens LB300</i>	(E. M. N. Chirwa & Wang, 1997)
<i>Pseudomonas maltophilia O-2</i>	-
<i>Pseudomonas synxantha</i>	(Mclean & Beveridge, 2001; West, 2007)
<i>Vibrioharveyi KCTC 2720</i>	(Kwak et al., 2003)
<i>Vigribacillus sp. H4</i>	(Mishra et al., 2012)
<i>Wautersia eutropha</i>	(Cheung & Gu, 2007)

Tab 2.18 - Principali ceppi batterici in grado di ridurre il Cr(VI) in Cr(III) in aerobiosi

ARTHROBACTER SP

Il primo tentativo di speciazione e studio dell'attività cromo riducente dell'*Arthrobacter sp.* (Gram – positivo) risale al 2003 ad opera Megharaj et al., i quali notarono il meccanismo di riduzione senza però aver riconosciuto il ceppo responsabile. Tra le diverse specie successivamente speciate dell'*Arthrobacter* sono stati prese in considerazione *Arthrobacter crystallopoietes* ES 32 e l' *Arthrobacter* SUK 1201. Il batterio con ceppo ES 32 è stato studiato da Camargo, et al. nel 2004. Le proprietà cromo riducenti dell'ES 32, isolato da un suolo contaminato da dicromato, sono state testate sia nella forma integrale della cellula che sottoforma di cell-free extract (CFE). Nel caso di cellula integrale si osserva una riduzione del 90% di Cr(VI) entro 12 ore e la completa riduzione si ha al termine delle 24 ore. Con una concentrazione di 2,61 µM di substrato batterico si ha una velocità di riduzione pari a 0,0142 µmol min⁻¹ mg_{proteine}⁻¹ (l'unità di misura è espressa in questa maniera per renderla confrontabile con il caso CFE). Nel caso CFE le cromato

riduttasi libere, con concentrazione pari a $1,78 \mu\text{M}$, riducono il Cr(VI) con un rateo di $0,096 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}_{\text{proteine}}^{-1}$. Sono stati additivati differenti donatori di elettroni (glicerolo, glucosio, acetato, ascorbato etc); il più performante, come mostrato in Fig 2.17, risulta essere il NADH. L'azione delle proteine estratte può essere inibita dalla presenza di alcuni cationi metallici.

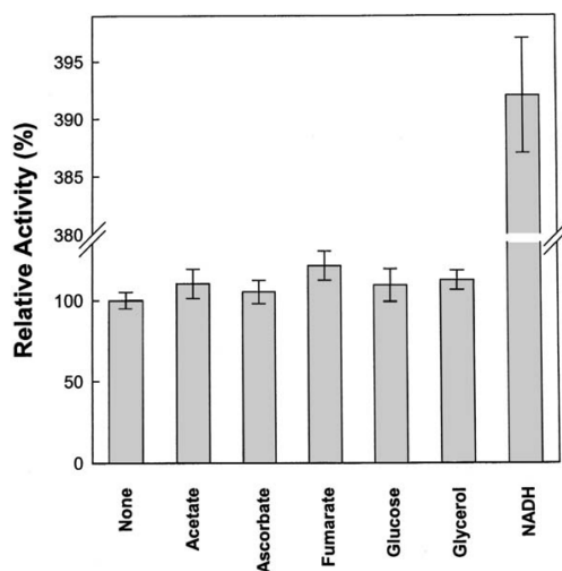


Fig 2.17 - Effetto degli elettroni donatori sulle attività delle cromato riduttasi estratte dal CFE del *A. crystallopoietes* ES 32

ARTHROBACTER SUK 1201

L'*Arthrobacter* SUK 1201, studiato nel 2012 da Dey & Paul, ha mostrato come nel caso ES 32 una buona capacità di cromo riduzione in un ampio spettro di condizioni ambientali. Il SUK 1201 è stato isolato da un campione prelevato da una miniera di cromite. L'esperimento è stato svolto in-vitro con una concentrazione di cromati pari a 2 mM la quale è stata degradata con un'efficienza di riduzione pari al 67% nei primi 7 giorni. La progressiva riduzione del Cr(VI) ha generato precipitati di color verde, colore tipico del triossido di cromo. La riduzione dei cromati aumenta con l'incrementare della densità cellulare (valore massimo $1010 \text{ cellule ml}^{-1}$, ma il rateo di riduzione decresce con l'aumentare del Cr(VI)). Le migliori efficienze di rimozione dei cromati si sono verificate con il glicerolo e il glucosio come substrati, ad un valore di pH 7 ed a una temperatura di $35 \text{ }^\circ\text{C}$. Come nel caso CFE dell'ES 32 la riduzione può essere inibita da molte specie metalliche. Le caratteristiche biologiche mostrate dall' SUK 1201 lo rendono parecchio adattabile a molte condizioni ambientali, in particolare si può apprezzare la sua efficienza nei sistemi acquosi. Dey e Paul nel 2014 hanno evidenziato che in seguito a 4 cicli di

riduzione la cellula batterica perdeva in efficienza riduttiva. La soluzione proposta dai due autori è stata quella di immobilizzare l'*Arthrobacter* all'interno di specie algali, mantenendo inalterato il meccanismo di riduzione per un numero di cicli maggiore.

BACILLUS AMYLOLIQUEFACENS CSB 9

Il *Bacillus amyloliquefacens* CSB 9 (Gram – positivo) venne analizzato negli studi di Das et al. (2014). La capacità di riduzione del Cr(VI) da parte del CSB 9 è stata indagata sotto diverse condizioni operative di tempo, pH (5, 6, 7, 8, 9), temperatura (25, 30, 35, 40 °C), velocità di agitazione (75, 100, 125, 150, 175 rpm) e utilizzando diversi donatori di elettroni (glucosio, saccarosio, fruttosio, lattosio, acetato di sodio). Il batterio risulta avere una tolleranza ad altre concentrazioni di Cr(VI) ($\leq 900 \text{ mg l}^{-1}$) e una velocità di riduzione di $2,22 \text{ mg}_{\text{Cr(VI)}} \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Le condizioni ottimali si sono verificate a concentrazioni iniziali di $100 \text{ mg}_{\text{Cr(VI)}} \text{ l}^{-1}$, pH 7 e temperatura intorno ai 35 °C (Biswaranjan Dhal et al., 2010) portando il tempo di degradazione inferiore alle 45 h. Temperature estreme causano squilibri nell'attività metabolica con conseguente riduzione della crescita batterica e attività riduttiva.

BACILLUS CEREUS

Murugavelh & Mohanty (2013), hanno studiato le potenzialità del *Bacillus cereus* nel campo del biorisanamento. Il glucosio è risultato il miglior elettrone donatore per la riduzione del Cr(VI) usando CFE (Tab 2.19) e, con una concentrazione iniziale di $60 \text{ mg}_{\text{Cr(VI)}} \text{ l}^{-1}$, porta ad avere il massimo rateo specifico di riduzione pari a $0,83 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ con efficienza di rimozione di 96,7%.

Substrato organico	Rateo specifico di riduzione del Cr(VI) [mg/g/h]
Acetate	0,32
Citrate	0,46
Lactate	0,31
Oxalate	0,41
Succinate	0,21
Glucose	0,83
Glycerol	0,65
Tryptone	0,58
No Substrate	0,17

Tab 2.19 - Effetto dei differenti substrati organici sulla riduzione del Cr(VI) ad opera del *Bacillus Sp.* A pH 7, temperatura di 37°C ed una concentrazione iniziale di cromo esavalente pari a 60 mg/L. (Murugavelh & Mohanty, 2013)

Per concentrazioni iniziali minori (10 -50 mg l-1) l'efficienza di riduzione risulta pari al 100%; essa subisce una progressiva riduzione all'aumentare del Cr(VI) iniziale. Il CFE estratto dal *Bacillus cereus* ha la massima performance per pH 6. Si sono verificati inoltre fenomeni di inibizione in presenza di specie inibenti quali EDTA, azide, PCP (fenciclidina) e KCN (cianuro di potassio).

BACILLUS MAROCCANUS CHRA21 E CORYNEBACTERIUM HOAGIE CHR20

I microrganismi *Bacillus maroccanus* ChrA21 e *Corynebacterium hoagie* ChrB20 sono stati studiati da Viti et al. (2003). Il focus dello studio era quello di isolare ed identificare il ceppo utilizzabile, calcolare la concentrazione minima inibitoria (MIC – Minimum inhibitory concentration) e valutarne le capacità di cromo riduzione e resistenza. La caratterizzazione preliminare dei batteri isolati ne ha determinato il Gram nonché il diverso ceppo tramite un'analisi 16S rRNA (Tab 2.20).

Ceppo	Identificativo	Gram	MIC di K ₂ CrO ₄ [mM]
ChrA21	<i>Bacillus maroccanus</i>	+	20
ChrB20	<i>Corynebacterium hoagie</i>	+	22
ChrC22	<i>Bacillus maroccanus</i>	+	14
ChrC31	<i>Bacillus maroccanus</i>	+	16

Tab 2.20 - Ceppi batterici relativi al batterio *B.maroccanus*. Modificata da Viti et al. 2003

Tutti i microrganismi studiati sono in grado di resistere al Cr(VI) e ridurre i cromati. Il *Bacillus maroccanus* mostra una MIC maggiore di 14 mM anche se il più resistente risulta essere il *Corynebacterium hoagie* ChrB20 (22 mM). Tutte le specie sono state testate con prove di durata pari a 96 ore nelle quali le efficienze di rimozione risultano essere comprese tra 56÷69 %.

BACILLUS MEGATERIUM TKW3

Nel 2005 Cheung & Gu hanno lavorato sul *Bacillus megaterium* TKW3 precedentemente isolato da sedimenti marini contaminati da cromo. Si è osservata la capacità del microgansimo di ridurre Cr(VI) in presenza di metalloidi quali Se(VI), Se(IV) e As(V). Sono stati testati come substrati glucosio, maltosio e mannitolo i quali non hanno

mostrato significative differenze nella velocità di riduzione. Il *megaterium TKW3* è noto per il suo meccanismo di riduzione associato alla membrana che non coinvolge attività plasmidiche e presenta un rateo di riduzione di $0,22 \text{ nmol}_{\text{Cr(VI)}} \text{ mg}_{\text{proteine}}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

BACILLUS SP. RE

Elangovan et al. nel 2006 ha proposto un ulteriore approfondimento sulla capacità di riduzione del CFE relativo al *Bacillus sp. RE*. Si è verificato come all'aumentare della concentrazione iniziale di cromo venga inibita la capacità di riduzione; con concentrazioni di Cr(VI) di 10 mg l^{-1} , 40 mg l^{-1} e 80 mg l^{-1} si sono verificate efficienze di rimozione rispettivamente pari a 95% (in 24 h), 95% (in 72 h) e 50%. L'utilizzo di CFE è come sempre stimolato dalla presenza di NAD(P)H. L'attività enzimatica risulta stabile a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ per pH tra 5,5 e 8; si ha invece una forte destabilizzazione per pH tra 4 – 5. L'optimum si raggiunge a pH 6 e temperatura pari a $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Elangovan et al. descrivono un rateo (V_{max}) di $3,8 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}_{\text{proteine}}^{-1}$ con una K_m di $14 \text{ } \mu\text{M}$. In tutti e tre gli studi si è notato come l'attività della specie *Bacillus* si intensificata dalla presenza di Cu^{2+} e inibita dalla presenza di Hg.

BACILLUS SP. ATCC 700729

Il *Bacillus sp. ATCC 700729*, identificato anche con il ceppo CMB-Cr1, è stato isolato nel 2000 da Shakoori et al., da uno scarico di conceria. Lo studio è stato condotto su vetri di agar aventi un substrato di crescita (medium) con concentrazione di bicromato pari a 20 mg l^{-1} ; in 72 ore l'87% del bicromato è stato ridotto. pH pari a 9 e temperatura di $37 \text{ }^\circ\text{C}$ costituiscono i parametri ottimali per la riduzione. L'efficacia dell'ATCC 700729 è riconosciuta nel campo nel trattamento di reflui industriali.

BACILLUS SP. ES 29

Un altro studio è stato condotto da Camargo et al. nel 2003 per isolare batteri cromo resistenti dai suoli contaminati da bicromato e descriverne l'influenza dei parametri ambientali di pH, temperatura e tempo di riduzione del Cr(VI). In letteratura è possibile osservare batteri in grado di tollerare concentrazioni massime fino a 2500 mg l^{-1} di Cr(VI); quelli isolati in questo studio sono capaci di agire a concentrazioni minori di 1500 mg l^{-1} . L'attività cromo riducente è stata verificata per cinque ceppi appartenenti al gene *Bacillus* identificati tramite la sequenza genetica 16S rRNA. Il massimo rateo di riduzione è osservato a valori ottimizzati di pH compresi tra 7 – 9 e temperatura di $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Tra i batteri isolati compare il *Bacillus sp. ES 29*, esso è in grado, in condizioni aerobiche, di ridurre il

90 % della concentrazione iniziale di cromo in 6 ore. L'attività di riduzione complessivamente osservata per i cinque ceppi batterici, caratterizzati da una K_m compresa tra $0,271 \text{ mg l}^{-1}$ (2,61 mM) – $1,51 \text{ mg l}^{-1}$ (14,50 mM), possiede una rateo appartenente all'intervallo $88,4 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($14,17 \text{ nmol min}^{-1}$) e $489 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($78,36 \text{ nmol min}^{-1}$). Una seconda pubblicazione di Camargo et al. nel 2003 è stata interamente dedicata allo studio del CFE estratto dal *Bacillus* ES 29 e della sua attività enzimatica stimolata dalla presenza di Cu^{2+} utilizzando come donatore di elettroni il NADH. Nel caso di utilizzo di cellule libere estratte, a parità di riduzione (6 h) si ha una minore efficienza di riduzione (60 %) rispetto al caso dell'utilizzo del batterio tal quale. L'attività di riduzione del Cr(VI), utilizzando una concentrazione K_m di CFE pari a 7,09 mM, ha una V_{\max} di $0,171 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}_{\text{proteine}}^{-1}$.

BACILLUS SP. FM1

Nel 2011 un nuovo *Bacillus sp.* con ceppo FM1 è stato isolato da un suolo agricolo contaminato a causa dell'irrigazione con effluenti provenienti da conceria. Masood & Malik hanno mostrato la capacità dell'FM1 di resistere ad alte concentrazioni di una grande varietà di metalli pesanti (Cr(VI), Cr(II), Cu^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} e Zn^{2+}). In letteratura è dimostrata la capacità di resistenza fino a concentrazioni massime di $1000 \text{ mgCr(VI) l}^{-1}$, nel presente articolo l'esperimento è stato condotto utilizzando 100 mg l^{-1} di Cr(VI) trasformato in Cr(III) completamente in 48h. La riduzione ottima si ha per una temperatura pari a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ e pH 8, e risulta migliore con l'additivazione di glucosio come substrato. In presenza di altri cationi metallici possono verificarsi fenomeni competitivi di riduzione dovuta alla seguente scala di affinità: $\text{Cd}^{2+} > \text{Cu}^{2+} = \text{Ni}^{2+} > \text{Cr(VI)} > \text{Cr(III)} = \text{Zn}^{2+}$. Il ceppo FM1 appartenente al gene *Bacillus* è simile geneticamente al 97% al *Bacillus thuringiensis* studiato nel 2005 da Şahin & Öztürk.

BACILLUS SPP.

Verma et al. nel 2009 hanno isolato da effluenti di conceria quattro batteri corno resistenti appartenenti alla famiglia dei *Bacillus spp.* (Gram – positivo). La loro capacità di riduzione è stata testata anche per alti livelli di concentrazione di Cr(VI); sono state inoltre approfondite le performance di resistenza e riduzione operate nel citoplasma. Sopra tutti si è speciato il *Bacillus brevis* il quale ha mostrato efficienze di rimozione del 75 – 78 %, entro le 28 ore, ad una concentrazione iniziale di $180 \text{ } \mu\text{g}_{\text{Cr(VI)}} \text{ ml}^{-1}$ e ad una temperatura

di 35 °C. Il *B.brevis* opera la riduzione e la resistenza ai cromati tramite reazioni plasmidiche e questo processo non è influenzato significativamente dalla presenza di altri cationi metallici. Questa capacità *B.brevis* risulta molto importante in quanto può essere potenzialmente usato per la riduzione in tempi brevi ed in ambienti nei quali sono presenti, oltre agli ioni cromo, altri ioni metallici che possono risultare inibenti per altre specie batteriche. La temperatura del test è stata fissata a 35 °C. La speciazione dei batteri *Bacillus spp.* è proseguita ad opera di Venil et al. (2011) i quali riconobbero il *Bacillus spp.* con ceppo *REP02* in grado di rimuovere il 99.08% di Cr^{2+} .

BACILLUS BYCR-1

Nel 2015 Zheng et al. hanno scoperto l'attività della flavoproteina reduttasi, *nfrA*, prodotta dal *Bacillus BYCr-1* (Gram – positivo) responsabile della riduzione del Cr(VI) . La flavoriduttasi *nfrA* è molto simile alla proteina *NfsA* presente nell'*E.coli* e *Pseudomonas ambigua* (Suzuki et al., 1992 in Zheng et al., 2015). La funzionalità dell'*nfrA* è stata valutata, con una concentrazione iniziale di 0,2 mM Cr(VI) , sotto diverse condizioni:

1. @pH = 7 temperatura variabile tra 23÷42°C
2. @T=37 °C con pH variabile tra 5÷9

La prima esperienza di laboratorio ha portato alla luce la temperatura di riduzione ottimale ossia pari a 37 °C. Nella seconda prova si è indagato il ruolo del pH e si è osservato che per valori di pH pari a 9 si ha la completa inibizione mentre per pH compreso tra 6 – 7 si ha il valore ottimo di riduzione. Mantenendo le condizioni operative ottimizzate, nell'arco di 48 h, l'intera concentrazione iniziale di 0,2 mM Cr(VI) è stata completamente ridotta, internamente ed esternamente alla cellula, a Cr(III) .

BACILLUS SP. CSB-4

Il *Bacillus sp.* CSB-4 è stato testato nel 2012 da Dhal et al. A pH 7 e ad una temperatura di 35 °C si è verificata la rimozione del 98% del Cr(VI) iniziale dopo 16 ore di incubazione. Il rateo di riduzione decresce nel tempo, specialmente con l'aumentare della concentrazione iniziale a causa dell'incremento di tossicità per le cellule. La riduzione del cromo esavalente da suoli contaminati è stata approfondita tramite l'utilizzo di differenti condizioni di crescita (differenti substrati). L'utilizzo di saccarosio come sorgente di carbonio comporta la stessa efficienza del LB. Le proprietà riducenti del CSB – 4 erano già

state investigate nel 2010 sempre da parte di Dhal et al. i quali evidenziarono già allora i parametri cinetici ottimi di bioriduzione.

BACILLUS SP XW-4

Liu et al. nel 2006 hanno riconosciuto e isolato dal terreno 5 ceppi di batteri cromo riducenti. Due di essi XW-2 e XW-4 sono stati identificati come *Bacillus sp.*

Il ceppo XW-4 è stato selezionato per lo studio della sua resistenza al Cr(VI) e ne sono studiate anche le capacità riducenti. Esso è in grado di resistere a concentrazioni molto alte fino a $100 \text{ mgCr(VI) l}^{-1}$, ma la crescita cellulare a tali concentrazioni risulta essere inibita. Gli esperimenti hanno inoltre dimostrato che il Cr(VI) veniva effettivamente ridotto alla forma meno tossica Cr(III), la riduzione è favorita significativamente se viene additivato del glucosio. Il range ottimale di pH che favorisce il processo è attorno a 9 e temperatura prossima a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. L'attività cromo riducente, a differenza della crescita batterica, prosegue anche per valori elevati di concentrazione e non risulta influenzata dalla presenza di solfati e nitrati.

BACILLUS SP PB2

Okeke et al., nel 2008 hanno isolato da un terreno fertile 12 batteri cromo resistenti ad alte concentrazioni. Il gruppo di ricerca ha riconosciuto un *Bacillus sp.* (Gram - positivo) con ceppo PB2 e ne ha investigato i parametri principali ambientali e cinetici. La temperatura ottimale di crescita e riduzione è risultata pari a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ e si verifica la massima bioriduzione per pH pari a 8. Una bioriduzione sostanziale del Cr(VI) è stata osservata in un mezzo salino ma l'efficienza di riduzione è risultata inversamente proporzionale alla concentrazione del sale stesso (1 – 9%). Per la stima della K_m e V_{max} di bioriduzione sono state utilizzate l'equazione iperbolica Michaelis – Menten e il diagramma dei doppi reciproci di Lineweaver – Burk. Tramite un'analisi di regressione non lineare della curva iperbolica si è ottenuta una K_m di $82,5 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ e una V_{max} di $7,78 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1} \text{ h}^{-1}$ a fronte di una K_m di $80,9 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ e V_{max} $10,6 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1} \text{ h}^{-1}$ calcolati con regressione lineare. Studi condotti nel tempo hanno mostrato un'efficienza di riduzione del 90% a partire da una concentrazione iniziale di $8000 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ in 8 h.

BACILLUS THURINGIENSIS

Il *Bacillus thuringiensis*, studiato da Şahin & Öztürk nel 2005, può ridurre la specie esavalente del cromo con una bioriduzione diretta da parte della cellula vegetativa e/o un meccanismo indiretto utilizzando le spore prodotte; entrambi sono stati valutati in batch con prove di laboratorio. In Fig 2.18 si può vedere il meccanismo di sporulazione della cellula vegetativa.

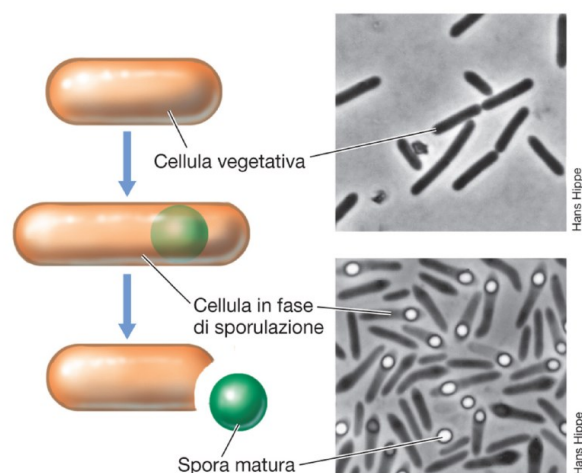


Fig 2.18 - Meccanismo di sporulazione della cellula vegetativa

L'assorbimento (q_{eq}) massimo si può verificare per pH pari a 2, ad una temperatura ottima di 25°C, ed aumenta all'aumentare della concentrazione iniziale del metallo pesante (Tab 2.21).

Cellule vegetative		Endospore	
C_0 [mg l ⁻¹]	q_{eq} [mg g ⁻¹]	C_0 [mg l ⁻¹]	q_{eq} [mg g ⁻¹]
37.4	14.3	34.7	20.06
105.8	28.6	76.9	34.2
163.4	41.6	148.9	47.5
303.2	54.7	225.0	61.5

Tab 2.21 - Comparazione tra l'assorbimento apportato da cellule vegetative vs endospore @pH 2

Il confronto tra il trend di adsorbimento delle cellule vegetative e delle endospore, valutato a pH e temperatura ottimi, e con concentrazione iniziale pari a 100 mg l⁻¹ è riportato in Tab 2.22:

Specie attiva	Condizioni operative			qe [mg g ⁻¹]
	pH	T (°C)	C ₀ [mg l ⁻¹]	
B. thuringiensis (cellula vegetativa)	2	25	100	38.6
B. thuringiensis (endospore)	2	25	100	34.2

Tab 2.22 - Confronto tra il trend di adsorbimento delle cellule vegetative e delle endospore, valutato a pH e temperatura ottimi

BREVIBACTERIUM SP. CRT-13

Dagli studi di Faisal & Hasnain (2004) si è evidenziata la possibilità di utilizzare il *Brevibacterium sp.* CrT-13 (Gram – positivo) nel campo del biorisanamento. Questo microrganismo è risultato tollerante a concentrazioni in vitro di $K_2CrO_4 > 40 \text{ mg } K_2CrO_4 \text{ ml}^{-1}$ utilizzando come substrato di crescita l'agar. La capacità di assunzione di cromato è risultata maggiore nelle cellule viventi rispetto a quelle morte o essiccate. CrT – 13 è in grado di ridurre il 41%, 14% e 9% da concentrazioni di Cr(VI) di partenza rispettivamente pari a 100, 500 e 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ in 24 ore. Come per il *Bacillus spp.* Le concentrazioni di altri metalli non influenzano la riduzione. L'efficienza di riduzione è stata anche testata su scarichi industriali a temperature variabili tra 5, 6 e 25 °C; il CrT – 13 ha convertito il 68% e il 47% del Cr(VI) in Cr(III) dopo 40 ore, a concentrazioni iniziali pari a 150 e 300 $\mu\text{g ml}^{-1}$ di Cr(VI).

EXIGUOBACTERIUM SP. ZM-2

Il batterio *Exiguobacterium sp.* ZM-2 (Gram-positivo), isolato da un suolo agricolo irrigato con scarichi di conceria, è stato studiato da Alam e Malik nel 2008. Lo ZM-2 è in grado di resistere fino a 12,37 mM di cromato di potassio nonché ad una serie di ioni metallici. Da prove condotte in vitro è emerso che le proprietà cromo riducenti dello ZM-2 gli permettono di ridurre in condizioni aerobiche 500 μM di cromo esavalente in 56 ore. Il processo viene inibito completamente in presenza di azoturo di sodio e cianuro di sodio nonché parzialmente a causa di solfati di sodio. Lo stesso viene però incentivato con 2,4 dinitrofenolo. Il test in vitro è stato effettuato con CFE di *Exiguobacterium* e ha presentato una K_m di 106,1 μM Cr (VI) e una V_{max} di 1,24 $\mu\text{mol/min}$ per mg di proteine. Le temperature utilizzate sono 4 °C in fase di incubazione e 37 °C in fase di riduzione proteica.

OCHROBACTRUM INTERMEDIUM SDCr-5

Un batterio cromo resistente con ceppo SDCr-5 (Gram-negativo) è stato identificato dalla famiglia degli *Ochrobactrum intermedium* ad opera di Sultan e Hasnain (2007). Il microrganismo è in grado di tollerare, se inserito in un terreno con acetato, concentrazioni superiori a 15 mg ml⁻¹. Opera cromoriduzione in un range compreso tra 100 e 1500 mg ml⁻¹ (il rateo di riduzione incrementa con l'aumentare della concentrazione iniziale) in condizioni ottimali di pH e temperatura pari rispettivamente a 7 e 37 °C; in queste condizioni si è testato che è in grado di ridurre 200 mgCr(VI) ml⁻¹ in 72 ore e 721 mg ml⁻¹ in 96 ore. Il SDCr-5 può essere impiegato per la rimozione del cromo esavalente in diverse condizioni ambientali anche se la presenza di Cu²⁺, Co²⁺, Mn²⁺ e Ni²⁺ inibisce il processo.

OCHROBACTRUM CSCr-3

Nel 2008, He et al. hanno isolato l'*Ochrobactrum* (Gram- negativo) con ceppo CSCr-3 caratterizzato dalla sequenza genetica 16S rRNA. I risultati di laboratorio hanno mostrato che il CSCr-3 è tollerante a concentrazioni di cromo esavalente molto alte (800 mg L⁻¹) ed è capace di ridurre differenti forme del Cr(VI) (cromato e dicromato) in un range molto ampio di temperature (25-40 °C) e di pH (7-11). L'ottimo di riduzione si ha per una temperatura di 35 °C e un pH fortemente alcalino (10). L'aggiunta di glucosio innalza drasticamente la sua capacità di riduzione e la presenza di solfati e nitrati non inibisce il processo. Ambienti contenenti specie metalliche quali Cu, Co, Mn, etc. stimolano significativamente la conversione in Cr(III).

PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Nell'esperimento condotto da Aguilera et al. (2004) è stata scoperta l'attività della proteina ChrA prodotta dallo *Pseudomonas aeruginosa*. Tale proteina fornisce resistenza al cromo di tale battere. Il meccanismo di resistenza della cellula è stato dimostrato sia nell'intera cellula che in vescicole subcellulari. Tale proteina ha un meccanismo che si basa sull'efflusso di energia in funzione della presenza di ioni cromo

PSEUDOMONAS AERUGINOSA A2CHr

Gli studi di Ganguli & Tripathi (2002) hanno indagato la capacità di cromato reductasi del *Pseudomonas aeruginosa* avente ceppo A2CHr. Sono stati eseguiti tre tipi di esperimenti per la valutazione dell'efficienza di rimozione utilizzando i seguenti sistemi: tramite batch, con cellule intrappolato all'interno un tubo per dialisi e con cellule

immobilizzate in un film di agarosio-alginato. In tutti e tre i sistemi si è notato che la massima efficienza di riduzione si è avuta per una concentrazione di 10 mgCr(VI)/l, con concentrazioni dell'ordine di 50 mgCr(VI)/l solamente il 16% del Cr(VI) totale è stato ridotto.

PSEUDOMONAS FLUORECENS LB 300

Chirwa & Wang, nel 1997 hanno investigato la capacità di cromo resistenza dello *Pseudomonas fluorescens* LB 300 (Gram – negativo) in un reattore a biomassa fissata. Il reattore è stato analizzato in condizioni stazionarie con valori di influenti da 30 a 100 mg/l e con un tempo di ritenzione idraulico variabile tra 3,6 a 14,2 min. L'unica fonte di carbonio per la crescita cellulare, presente nel sistema, è il glucosio il quale si comporta da elettrone-donatore. Lo *Pseudomonas* LB 300 opera una reduttasi associata alla membrana la quale coinvolge il trasferimento degli elettroni dal NADH al cromato. L'azione del batterio porta ad avere un'uscita dal reattore sotto forma di Cr(III). I due studiosi hanno inoltre mostrato che per avere elevate rimozioni è necessario aumentare il tenore di glucosio in ingresso. Le condizioni critiche si sono verificate per concentrazioni pari a 200 mgCr(VI)/l con un tempo di ritenzione idraulico pari a 14,2 min.

VIBRIO HARVEY KCTC 2720

Un importante studio condotto da Kwak et al. (2003) ha dimostrato come le cromato reduttasi purificate dallo *Pseudomonas ambigua* siano simili a molte nitroreduttasi. Le nitroreduttasi dell'*E.coli* DH5 α e quelle del *Vibrio harvey* KCTC 2720 sono state selezionate nello studio e hanno consentito di provare la loro attività cromato riducente. È stata prodotta in laboratorio una fusione tra GST (glutazione transferase) e nitroriduttasi NfsA e NfsB dell'*E.coli* DH5 α producendo rispettivamente GST-EcNfsA e Gst-EcNfsB; lo stesso procedimento è stato eseguito con la nitroriduttasi del *V.harvey* generando il GST-VhNfsA. Si sono verificati dei valori di K_m per la cromato riduttasi pari a 11.8, 23.5 e 5.4 μ m mentre valori di V_{max} pari a 3.8, 3.9, 10.7 nmol/min/mg rispettivamente per il GST-EcNfsA, GST-EcNfsB, e GST-VhNfsA. Si nota quindi che la miglior efficienza è conseguita da parte della cromato reduttasi GST-VhNfsA. Il range di temperature è rispettivamente pari a 55, 30 e 30 °C rispettivamente per GST-EcNfsA, GST-EcNfsB, e GST-VhNfsA. Questo conferma come le nitroriduttasi possono essere usate come cromato

reduttasi. Quando si aggiunge cromo alla cromato reduttasi GST-VhNfsA si nota un incremento del rateo di consumo del NADH.

VIGRIBACILLUS H4

Mishra et al. nel 2012 sono riusciti a isolare da un terreno salino di mangrovie il batterio *Vigribacillus* (Gram-positivo) con ceppo H4. Esso risulta essere, oltre che cromo resistente, un microrganismo alofilo ossia in grado di adattarsi molto bene anche ad ambienti che presentano un elevata salinità. L'esperimento di laboratorio è stato condotto per mezzo LB (Luria Broth), dove l'H4 è risultato tollerante a concentrazioni fino a 1000 mg_{Cr(VI)} l⁻¹. In condizioni ottimali e con una concentrazione iniziale di 100 mg Cr(VI) l⁻¹ si sono misurate efficienze di rimozione di 90,2-99,2 % entro 70 ore sia in assenza che in presenza di NaCl per un massimo del 6% in peso. Il 35% del Cr⁶⁺ rimosso è stato ritrovato sotto forma di precipitati nella sua forma Cr(III) mentre la restante parte (65%) si è presentata in soluzione nella forma trivalente solubile. Il *Vigribacillus* risulta molto utile nel campo del biorisanamento soprattutto di ambienti salini.

2.2.3.1.2 CONDIZIONI STRETTAMENTE ANAEROBICHE

La riduzione microbica diretta anaerobica fu scoperta nel microrganismo *D.vulgaris* il quale è in grado, tramite il coinvolgimento di un citocromo di tipo c3 solubile, di ridurre il Cr⁶⁺ (D R Lovley, 1995).

In un processo diretto lo scambio elettronico può avvenire in prossimità della membrana tramite l'interazione con la catena respiratoria (Francis et al., 2000) o all'interno del plasma cellulare reagendo con idrogenasi/citocromi (Chardin et al., 2002). I citocromi utilizzati, principalmente di tipo c, sono proteine vettori di elettroni che permettono l'utilizzo dell'ossigeno a livello cellulare. Durante il trasporto di elettroni si ha come conseguenza immediata la sintesi delle molecole di ATP a partire da ADP. In qualsiasi situazione la reazione è mediata da reduttasi o molecole organiche riducenti (amminoacidi, nucleotidi, zuccheri semplici etc) (Ramírez-Díaz et al., 2008) prodotte dall'ossidazione di molecole organiche complesse quali carboidrati, proteine, grassi e idrogeno molecolare (Fig 2.19).

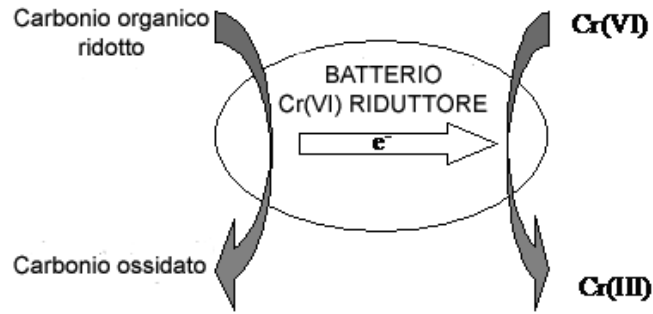


Fig 2.19 - Schema semplificato del processo batterico di riduzione anaerobica diretto (Decorosi, 2010)

Ulteriori studi hanno dimostrato la presenza di determinati ceppi batterici in grado di condurre una riduzione anaerobica indiretta del cromo esavalente. Il loro metabolismo non coinvolge direttamente il cromo (Fig 2.20) ma composti a base di ferro o zolfo, prendendo rispettivamente il nome di batteri ferro riduttori (A) e solfato riduttori (B). I batteri ferro riduttori utilizzano come elettrone accettore il Fe^{3+} il quale viene ridotto a Fe^{2+} , i solfato riduttori producono invece H_2S a partire dalla riduzione dell' SO_4^{2-} . In entrambi i casi la riossidazione abiotica dei prodotti, ottenuti dai processi biotici sopra descritti (A e B), genera la perdita di un elettrone che viene impiegato per la riduzione del $Cr(VI)$ (Xu et al., 2005).

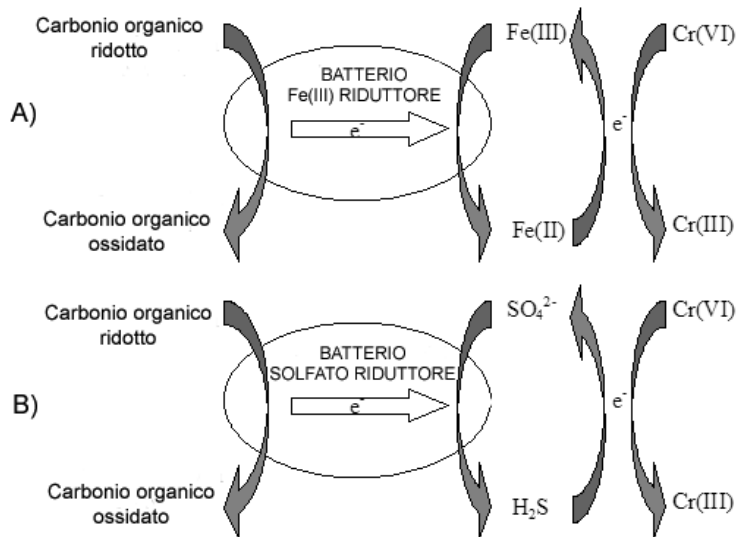


Fig 2.20 - Processi di riduzione anaerobica indiretta a partire da batteri ferro riduttori (A) e solfato riduttori (B)

I donatori di elettroni, come mostrato nella figura (Fig 2.20) sono i medesimi del caso aerobico diretto ossia $NAD(P)H$ e/o riserve endogene. Sono stati raccolti in Tab 2.23 i

principali ceppi batterici in grado di ridurre il Cr(VI) in condizioni strettamente anaerobiche.

BATTERI ANAEROBICI	
Batterio	Fonte bibliografica
<i>Achromobacter sp.</i>	-
<i>Bacillus subtilis</i>	(Garbisu et al., 1998)
<i>Brevibacterium casei</i>	(Tuhina Verma & Singh, 2013)
<i>Cellulomonas flavigena</i>	(Xu et al., 2005)
<i>Cellulomonas sp.</i>	(Sani et al., 2003)
<i>D.vulgaris Hildenborough</i>	(Goulhen et al., 2006) (Klonowska et al., 2008)
<i>Deinococcus radiodurans RI</i>	(Fredrickson et al., 2000)
<i>Desulfomicrobium sp.</i>	-
<i>Desulfovibrio fructosovorans</i>	(Ollivier et al., 1988)
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	(Arias & Tebo, 2003)
<i>Enterobacter cloacae H01</i>	(Pattanapitpaisal et al., 2001; P. C. Wang et al., 1989)
<i>Geobacter metallireducens</i>	(Cheung & Gu, 2007)
<i>Microbacterium sp. MP30</i>	(Pattanapitpaisal et al., 2001)
<i>Ochrobactrum sp.</i>	-
<i>Pantoea Agglomerans SPI</i>	(Francis et al., 2000)
<i>Pseudomonas chromatophilia</i>	-
<i>Pseudomonas dechromaticans</i>	-
<i>Rhodobacter spheroids</i>	-
<i>Shewanella oneidensis MR-1</i>	(Belchik et al., 2011; Middleton et al., 2003)
<i>Shewanella putrefacens MR-1</i>	(Myers et al., 2000)

Tab 2.23 - Principali ceppi batterici in grado di ridurre il Cr(VI) in Cr(III) in anaerobiosi

BACILLUS SUBTILIS

Garbisu et al. nel 1998 hanno testato le capacità di riduzione del cromo del batterio *Bacillus Subtilis* in presenza di ossigeno. Per l'esperimento di laboratorio si è utilizzato il Cell free Extract (CFE) del *B. Subtilis*. Esso è in grado di sopravvivere a concentrazione di cromato di potassio (K_2CrO_4) fino a 1mM. La cromatoriduttasi non è stata influenzata dall'eccesso di nitrati inseriti nel sistema i quali sarebbero stati utilizzati immediatamente

in condizioni anaerobiche. Così come per l'*Exiguobacterium sp.* ZM-2 anche le attività del *B. Subtilis* vengono inibite in presenza di azoturo di sodio e cianuro di sodio.

BREVIBACTERIUM CASEI

Nel 2013 sono state studiate colture di *Brevibacterium casei* (Gram-positivo) ad opera di Tuhina Verma & Singh. Nello studio si sono usati scarichi di conceria inquinati da cromo esavalente di natura sintetica. Dallo studio è emerso che il *B. casei* è in grado di ridurre l'84% del metallo entro 72 ore e addirittura, a seguito di tecniche di immobilizzazione del cromo può essere ridotto al 78% entro le 48 ore. I batteri sono stati incubati ad una temperatura di 37 °C; Si è pensata ad una possibile applicazione su scala pilota anche se non è mai stata implementata.

CELLULOMONAS FLAVIGENA

Gli studi di Xu et al. (2005) sono stati condotti sul microorganismo *Cellulomonas flavigena* (Gram-positivo). Lo studio si concentra in particolare sull'analisi dell'influenza dei composti ferrosi sul processo di bioriduzione del Cr(VI). I risultati hanno mostrato come l'additivazione di diversi composti ferrosi possa modificare il rateo di riduzione. Ad esempio con l'aggiunta di FeCl₃ si è verificato un aumento del rateo, cosa che non si è osservato in presenza di ematite (Fe₂O₃). Il rateo è inoltre influenzato dal pH, il quale cresce progressivamente da 7 a 9, e dalla concentrazione iniziale di Fe(III) e Cr(VI); si osserva un aumento del rateo a fronte di un aumento di concentrazione iniziale.

CELLULOMONAS SP WS01/WS18/ES5

Nel 2003 Sani et al. hanno isolato tre microorganismi appartenenti alla famiglia dei *Cellulomonas sp.* ceppi WS01, WS18 ed ES5. In tutti i casi queste culture hanno dimostrato la capacità di ridurre il Cr(VI) oltre che U(VI) e Fe(III). In 100 ore usando come elettrone donatore il lattato è stato possibile osservare una riduzione della concentrazione di cromo da 0,2mM a meno di 0,001mM. Inoltre si è notato che in tutte le sospensioni anche in mancanza di lattato si verifica la rimozione di Cr(VI) anche se ad una velocità inferiore rispetto al caso in cui vi è la presenza di un elettrone-donatore. Gli esperimenti hanno portato ad avere anche risultati visivi, hanno notato infatti un cambiamento del colore della soluzione da giallo (tipico colore dovuto a presenza di Cr(VI)) a grigio/bianco ossia situazione tipica in cui vi sono precipitati di Cr(III). L'andamento medio osservato per

quanto riguarda il ES01 è il seguente: riduzione in 10h di una concentrazione di Cr(VI) da 0,2 a 0,16mM in 10 ore di incubazione con presenza di lattato. Se viene a mancare l'elettron donatore, il risultato finale è il medesimo ma in un tempo pari a 70 h.- Tale comportamento è estendibile anche agli altri ceppi. Nel 2007 è stato proposto uno studio da Lee et al., che evidenzia il variare dei ratei di riduzione in funzione della quantità di ossigeno fornita al *Cellulomonas sp.* Si nota come all'aumentare della percentuale di ossigeno, da 2% a 20%, il rateo di riduzione decresce fino a diventare nullo per valori prossimi all'ossigeno atmosferico.

DESULFOVIBRIO VULGARIS HILDENBOROUGH

Goulhen et al. nel 2006 hanno testato la forte resistenza al cromo esavalente del *Desulfovibrio vulgaris* con ceppo Hildenborough. Questo tipo di batterio fa parte di quei batteri chiamati SRB ossia batteri solfato riducenti. È stato dimostrato come la crescita del batterio è inibita quando vi è in concomitanza la produzione di energia e che anche l'anabolismo viene inibito in questa condizione. Lo studio mostra come tali batteri, sottoposti a stress dovuto alla presenza di Cr(VI), abbassino il potenziale redox della soluzione catabolizzando la loro fonte di energia ossia il lattato. Un abbassamento del potenziale redox consente a tali batteri di trovare le condizioni di sopravvivenza. Quando il *D. vulgaris* di ceppo Hildenborough è sottoposto a tale stress, prima abbassa il potenziale redox del mezzo e poi cresce. Se ad esempio viene aggiunta una concentrazione di 25 μ M di Cr(VI) il potenziale redox del mezzo aumenta a un valore pari a +135 mV. I primi segni di riduzione avvengono abbassando il potenziale redox a -150 mV condizione in cui si ha un ottimo per la crescita di batteri SRB. Si deduce quindi che la riduzione del metallo è essenziale per la sopravvivenza dei batteri. L'analisi al microscopio ha mostrato che non vi è un accumulo di cromo trivalente nella fase iniziale di crescita solo superficialmente, ma anche all'interno delle membrane. Questo significa che il batterio mineralizza in situ il cromo. Gli studi dimostrano come il cromo potrebbe penetrare nelle cellule e formare precipitati nella membrana periplasmatica e nei compartimenti della membrana. Gli ioni del cromato penetrano all'interno della cellula tramite la pompa di trasporto dello ione solfuro, questo perché simile sia dal punto di vista della carica che per struttura. La produzione di H₂S può favorire la precipitazione del Cr(III). Tale processo avviene ma è in minima parte rispetto all'uptake che si ha via membrana. La riduzione diretta del metallo è catalizzata da proteine quali citocromo c3.

DEINOCOCCUS RADIODURANCE R1

Fredrickson et al. nel 2000 hanno studiato colture anaerobiche di *Deinococcus radiodurance* usando come substrato di crescita il lattato e valutandone le potenzialità cromo riducenti. Il *radiodurance* è un microrganismo eccezionalmente resistente alle radiazioni, esso è capace di sopravvivere ad esposizioni acute di radiazioni ionizzanti fino a 15000 Gy. In condizioni anaerobiche, il *D.radiodurance* R1, è in grado di ridurre l'acido Fe(III)-nitritotriacetico e contemporaneamente ossidare il lattato formando CO₂ e acetato; non è capace di sfruttare questi processi per la sua crescita. La riduzione è risultata favorita in presenza di antrachinone2,6 disulfonato (AQDS) sostanza analoga all'acido umico.

MICROBACTERIUM SP. MP30 / ENTEROBACTER CLOACAE HOI

Pattanapitpaisal et al. nel 2001 hanno indagato la possibilità di effettuare una bioriduzione con altri due ceppi batterici quali il *Microbacterium* sp. MP30 (Gram-positivo) e il *Enterobacter cloacae* HOI (Gram-negativo). Quest'ultimo era stato già studiato nel 1989 da P. C. Wang et al. i quali lo isolarono da un refluo di un impianto a fanghi attivi. L' *E.cloacae* risulta resistente ai cromati sia in condizioni aerobiche che anaerobiche, ma solo la coltura in condizioni di anaerobiosi ha presentato delle capacità riducenti. In assenza di ossigeno si è osservato un aumento progressivo della torbidità chiaro segno che si sono formati composti insolubili del cromo nella sua forma trivalente. La presenza di ossigeno inibisce quindi il processo ed è preferito un utilizzo di substrati come il glicerolo e l'acetato piuttosto che il glucosio. L'attività del HOI è stata osservata per valori di pH tra 6 e 8,5 (valore ottimo a pH 7) e temperature di 10-40 °C (valore ottimo a 30 °C). Ulteriori studi di P. C. Wang et al. un anno dopo (1990) hanno portato alla scoperta del meccanismo esatto con cui avviene la riduzione, ovvero uno scambio di elettroni che avviene sulla membrana del microrganismo.

PANTOEA AGGLOMERANS

Una monocultura anaerobica facoltativa Fe(III) riducente è stata isolata da Francis et al. nel 2000. Un'analisi 16S rRNA ha speciato il batterio *Pantoea agglomerans*, un membro della famiglia degli *Enterobacteriaceae* appartenente alla sub divisione dei Proteobacteria. Questo microrganismo designato con ceppo SP1, può crescere compiendo contemporaneamente l'ossidazione di acetato o idrogeno molecolare e la riduzione di molte

specie accettori di elettroni (Fe(III), Mn(VI), Cr(VI)) esclusi i solfati. Sono batteri mesofili e per questo motivo la loro temperatura ottimale di esercizio risulta essere 37 °C.

SHEWANELLA PUTREFACTENS MR-1

Myers et al. nel 2000 constatarono che la *Shewanella putrefacens* MR-1 è in grado di ridurre diversi composti in condizioni anaerobiche incluso il manganese, ossidi di ferro, nitrati e altri composti. Questi processi riduttivi sono apparentemente collegati con un sistema di trasporto elettronico molto complesso. L'attività di formazione delle cromo reduttasi è stata indagata in condizioni anaerobiche durante la crescita di cellule di *S.putrefacens* MR1 caratterizzate dalla più elevata attività citoplasmatica. Il principale donatore di elettroni è il NADH mentre non si verifica nessuna attività se si usa L-lattato o NADPH. L'attività è inibita in presenza di catene di trasporto elettroniche elettrone-donatrici multicomponenti che includono citocromo o chinoni.

SHEWANELLA ONEIDENDISIS MR-1

Middleton et al. nel 2003 hanno studiato la capacità di cromo riduzione in batch di colture di *Shewanella oneidensis* MR-1 sotto condizioni aerobiche, denitrificanti e senza elettrone accettore. La crescita e la capacità di rimozione suggeriscono un funzionamento di tipo cometabolico. In assenza di nitrati o di ossigeno, infatti, l'MR1 riduce il Cr(VI) ma senza nessun aumento di biomassa vitale. Solo una piccola parte degli elettroni sono stati trasferiti dal lattato al Cr(VI) (1,6%). In 48 ore la capacità di trasformazione ammonta a 0,78mgCr(VI) mg proteine⁻¹ per concentrazione di cromo molto elevata e somministrata in una sola volta. Per somministrazioni a concentrazioni più basse invece hanno registrato un incremento della capacità riducente che si attesta a 3,33 mgCr(VI) mg proteine⁻¹. I due diversi modi di somministrazione hanno dimostrato come vi sia una inibizione dell'attività del batterio a causa della tossicità del Cr(VI) per concentrazioni elevate. In condizioni aerobiche e di denitrificazione invece, si ha un incremento prestazionale in termini di velocità di riduzione. Le concentrazioni di Cr(VI) hanno diversi effetti su questo batterio. La crescita in condizioni aerobiche non subisce alcun effetto per concentrazioni pari a 60 µM invece viene inibita a 150 µM. L'effetto di nitrato riduzione non subisce nulla a 6 µM mentre a 45 µM risulta essere inibito fino ad essere completamente fermato per concentrazioni pari a 200 µM.

2.2.3.1.3 CONDIZIONI FACOLTATIVE

Ulteriori studi di letteratura hanno riportato l'utilità di microorganismi anaerobi/aerobi facoltativi per la bioriduzione del cromo esavalente. I batteri presentati fino ad ora sono in grado di compiere le normali attività di respirazione cellulare e fermentazione in sola presenza o assenza di ossigeno, essi sono chiamati rispettivamente organismi strettamente aerobi e anaerobi obbligati.

In questa sezione sono presentati dei microorganismi in grado di svolgere un comportamento misto tra i due, essi sono preferenzialmente aerobi, necessitano quindi di ossigeno per compiere le funzioni metaboliche principali, ma sono anche in grado di sopravvivere in condizioni precarie in assenza di esso. Questi microorganismi prendono il nome di anaerobi facoltativi e appartengono principalmente ai ceppi degli *Pseudomonas*, *E.Coli* e *Shewanella*. Essi utilizzano quindi la respirazione aerobica in presenza di O₂ ed in sua assenza sono in grado di fermentare. Tutti i batteri elencati in Tab 2.24 possiedono capacità di cromo riduzione, diretta o indiretta, descritte nei paragrafi precedenti. Si riporta, di seguito una tabella che riassume alcuni batteri le cui proprietà sono state discusse e divulgate in determinati articoli scientifici; si riportano le caratteristiche dei singoli

BATTERI AEROBICI/ANAEROBICI

Batterio	Fonte bibliografica
<i>Achromobacter sp. Ch1</i>	(Ma et al., 2007; Zhu et al., 2008)
<i>Agrobacterium radiobacter EPS-916</i>	(Llovera et al., 1993)
<i>Burkholderia cepacia MCMB-821</i>	(Wani et al., 2007)
<i>Cellulomonas spp.</i>	(Viamajala et al., 2007)
<i>E.coli</i>	(Abskharon et al., 2009; Abskharon et al., 2010)
<i>E.coli ATCC 33456</i>	(W. C. Bae et al., 2000)
<i>Ochrobactrum Intermedium BCR400</i>	(Kavita & Keharia, 2012)
<i>Pannonibacter phragmitetus</i>	(Shi et al., 2012)
<i>Providencia sp.</i>	(Thacker et al., 2006)
<i>Pseudomonas ambigua G-1</i>	(Suzuki et al., 1992)

<i>Pseudomonas fluorescens</i>	(Res et al., 2012)
<i>Pseudomonas putida MK1</i>	(C. H. Park et al., 2000)
<i>Pseudomonas putida PRS-2000</i>	(Ishibashi et al., 1990; C. H. Park et al., 2000)
<i>Pseudomonas putida SKG-1 mtcc</i>	(Garg et al., 2013; Ishibashi et al., 1990)
<i>Pseudomonas sp. CRB5</i>	(McClean & Beveridge, 2001)
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	(Badar et al., 2000)
<i>Pseudomonas stutzeri KC</i>	(Zawadzka et al., 2007)
<i>Shewanella alga (BrY-MT) ATCC 55627</i>	(H. Guha et al., 2001)
<i>Shewanella alga</i>	(H. Guha et al., 2003)
<i>Shewanella oneidensis MR-1</i>	(Belchik et al., 2011; Middleton et al., 2003)

Tab 2.24 - Principali ceppi batterici in grado di ridurre il Cr(VI) in Cr(III) in aerobiosi e anaerobiosi

ACHROMOBACTER SP. CH-1

La riduzione del cromo ad opera del *Achromobacter sp.* Ch-1 (Gram – negativo) è stata indagata da Ma et al. (2007) e da Zhu et al. (2008) rispettivamente in condizioni aerobiche e anaerobiche. In condizioni aerobiche lo studio è stato effettuato alla temperatura di 30 °C in vitro con diversi elettroni donatori e tra tutti quelli testati il maggior rateo di riduzione si è verificato, come si può apprezzare dalla Tab 2.25, con l’inserimento di lattato:

Donatore di elettroni	Rateo di riduzione [mg L ⁻¹ min ⁻¹]
Nessuno	1,85 ± 0,07
Lattosio	1,96 ± 0,05
Fruttosio	1,98 ± 0,06
Glucosio	1,92 ± 0,04
Acetato	1,89 ± 0,07
Piruvato	2,85 ± 0,08
Citrato	1,94 ± 0,05
Metanoato	1,86 ± 0,04
Lattato	4,09 ± 0,06

Tab 2.25 - Ratei di riduzione in funzione del tipo di substrato in alimento

La riduzione del cromo è influenzata dal pH iniziale nonché dalla concentrazione del lattato. Le condizioni ottimali di riduzione si hanno a valori di pH pari a 9 e con una concentrazione di substrato pari a 4000 mg l⁻¹; in presenza di tali condizioni l'*Achromobacter sp.* Ch-1 presenta un rateo di riduzione pari a 5,45 mg l⁻¹ min⁻¹, Il rateo di reazione decresce con l'incremento della concentrazione di Cr(VI) e aumenta proporzionalmente con la densità batterica. La massima velocità di riduzione è stata raggiunta a una concentrazione di Cr(VI) pari a 2107 mg l⁻¹. Il Ch-1 può trovare quindi impiego nel campo del bio-risanamento in situazioni caratterizzate da alte concentrazioni di inquinante. Anche nel caso anaerobico il pH e la concentrazione del lattato influenzano fortemente la capacità di riduzione; le condizioni ottimali sono si ottengono a pH 9, così come in presenza di ossigeno, e con una concentrazione di lattato di 40mM; in presenza di tali condizioni l'*Achromobacter sp.* Ch-1 presenta un rateo di riduzione pari a 12,5μmol 10⁹ celle⁻¹ min⁻¹. La concentrazione iniziale di Cr(VI) e la densità batterica non influiscono sul rateo di riduzione. La massima riduzione (54,2 mM) è stata dimostrata in presenza di una concentrazione batterica di 3,64 10⁹ celle ml⁻¹.

AGROBACTERIUM RADIOBACTER EPS-916

Llovera et al. nel 1993 ha dimostrato le proprietà cromo riducenti del *Agrobacterium radiobacter* EPS-916 (Gram – negativo) isolato direttamente da una matrice suolo. I risultati presentati nel paper sono riferiti alle sole condizioni aerobiche, ma ulteriori test, di cui non si dispongono i risultati, sono stati eseguiti anche in anaerobiosi. Sia in condizioni aerobiche che anaerobiche, rispettivamente con una concentrazione iniziale di cromato pari a 0,05 mM e 0,15 mM, si è dimostrato che è possibile, grazie al suo potenziale redox, trattare concentrazioni di contaminante fino a 0,5 mM. I substrati investigati sono: glucosio, fruttosio, maltosio, lattosio, mannitolo, glicerolo, glutammato e succinato. L'utilizzo degli ultimi due substrati ha portato risultati negativi in termini di riduzione ma consentono ugualmente la crescita dell'EPS-916. Sono stati testati valori di pH compresi in un range tra 5 – 8 e temperature tra 10 e 40 °C. Il rateo di riduzione è influenzato dalla densità cellulare, e presenta un massimo per pH compresi tra 7- 7,5 ad una temperatura variabile tra 25 e 30 °C.

BURKHOLDERIA CEPACIA MCMB-821

Il batterio cromo riducente MCMB-821 è stato isolato da un lago di origine meteorica ed è stato identificato come *Burkholderia cepacia* (Wani et al., 2007). MCMB – 821 risulta resistente a 1000 ppm di Cr(VI) e riduce il 98% di 75 ppm di Cr(VI) entro 36 ore, a pH 9 e in presenza del 2% di sale e lattosio come donatore di elettroni. L'efficienza di rimozione dei cromati del MCMB – 821 è comparabile sia sotto condizioni aerobiche che sotto condizioni anaerobiche. L'attività delle cromato riduttasi può essere limitata dalla presenza di inibitori sulla membrana. La riduzione è stata testata per temperature comprese tra 25 °C e 40 °C mentre il range accettato di pH varia tra 7-10. Con una concentrazione pari a 75mgCr(VI) l⁻¹ si è in presenza del 2% di sale e 1% di lattosio come donatore di e⁻ si è osservato che l'ottimo si ha per una temperatura di 35 °C e per un pH pari a 9.

CELLULOMONAS SPP

Approfonditi studi sulle capacità di resistenza e di riduzione del Cr(VI) da parte del ceppo batterico *Cellulomonas spp.* furono eseguiti nel 2007 da parte di Viamajala et al.. Tali batteri caratterizzati dalla sequenza 16S rRNA sono in grado, in presenza del giusto substrato di crescita, di raggiungere buone rimozioni del Cr(VI) sia in condizioni aerobiche che anaerobiche. I substrati utilizzati sono stati, acido citrico, glicerolo e xilosio. Si è notato come quest'ultimo conferisca le migliori prestazioni al microorganismo andando a ridurre una concentrazione di 0,04mM Cr(VI) a 0,002mM Cr(VI) (limite di rilevazione strumentale) in 3 giorni. Inoltre l'esperimento è stato esteso per altri 4 mesi a dimostrazione del fatto che tali ceppi batterici sono in grado di mantenere la loro capacità cromo riducente per lunghi periodi. L'esperimento è stato condotto per una durata totale di 4 mesi, questo porta ad affermare che tali batteri possono essere implementati in bio barriere passive per la riduzione in situ di Cr(VI) di acquiferi contaminati.

E.COLI ASU 3/ASU 7/ASU 8/ASU 18

Abskharon et al. nel 2010, hanno studiato le capacità cromo riducenti di 4 diversi tipi di ceppi batterici appartenenti all'*E.coli* rispettivamente di ceppo ASU 3, 7, 8 e 18. Gli studi hanno mostrato come tale tipi di batteri isolati in diversi siti egiziani, sfruttino la mediazione plasmidica per resistere alla forma esavalente del cromo. La capacità di riduzione è stata investigata sotto condizioni aerobiche in tre mezzi di crescita e variando la concentrazione di cromo immessa da 1 a 10 ppm mantenendo un pH pari a 7 e una temperatura di 37 °C. Il miglior risultato è stato registrando usando *E.coli* ASU 7, il quale

a concentrazioni di 1, 2, 5 e 10 ppm ha avuto efficienze di rimozione in 48h rispettivamente pari a 54,62, 53,42, 46,73 e 41,35% la particolare capacità di resistenza batterica alla specie esavalente del cromo di questo ceppo è stata associata al plasmide DH5 α . In conclusione è stato affermato che l'ASU 7 è un buon candidato ad essere utilizzato nel campo della bioremediation.

E.COLI ATCC 33456

Nel 2000 W. C. Bae et al. mostrano le proprietà cromo riducenti dell'*E.Coli* ATCC 33456. Il donatore di elettroni preferibile è il glucosio. L'*E.coli* risulta più resistente ai cationi metallici di molti altri microrganismi risultati resistenti al Cr(VI). La crescita cellulare è inibita dal Cr(VI) in un mezzo liquido; con un tempo di ritenzione idraulico di 20 ore e a partire da una concentrazione iniziale di 10-40 mg l⁻¹ si ottengono efficienze di rimozione tra l'84 e il 100 %. Il rateo specifico di riduzione dipende dalla concentrazione dell'influente in ingresso, si sono osservati prossimi a 2,41 mgCr(VI) gDCW⁻¹ (Dry Cell Weight) h⁻¹ a fronte di 40 mgCr(VI) l⁻¹.

OCHROBACTRUM INTERMEDIUM BCR400

Il batterio cromo resistente *Ochrobactrum intermedium* BCR400 è stato isolato da un terreno contaminato da cromo a Vadodara in India da parte di Kavita & Keharia nel 2012. Tale ceppo è in grado di ridurre completamente una concentrazione pari a 100 mgCr(VI)/l in 52 ore con un rateo di riduzione iniziale pari a 1,98 mg/L/h. il rateo di riduzione del Cr(VI) diminuisce all'aumentare della concentrazione di contaminante da 100 mg/L a 500 mg/L. Gli studi hanno dimostrato che aggiungendo antrachinone 2- acido solfonico (AQS) alla coltura batterica fa aumentare di parecchio il rateo di riduzione questo perché agisce da intermedio di reazione. Inoltre con l'aggiunta di AQS si nota un aumento di cromato reductasi. Affinché il processo avvenga, l'*Ochrobactrum intermedium* necessita di NADH come elettrone accettore. La massima attività si è verificata per pH pari a 7 e una temperatura di 30 °C. I risultati portano a concludere che l'*Ochrobactrum intermedium* possa essere usato nella bioaugmentation con un possibile incremento di prestazioni fornendo AQS.

PANNONIBACTER PHRAGMITETUS

Un ulteriore batterio cromo riducente, isolato da un fango contaminato, è stato speciato nel 2012 da Y. Shi et al. Il microrganismo è stato identificato, grazie alle sue caratteristiche fisiologiche e biochimiche, come *Pannonibacter phragmitetus* a seguito dell'analisi genetica 16S rRNA. Il *P. phragmitetus* è in grado di ridurre il Cr(VI) sia in presenza che in assenza di ossigeno, ma in questo studio è stato testato in ambiente anaerobico. Esso ha mostrato un meccanismo molto efficiente di rimozione riducendo completamente in 24 ore una concentrazione iniziale pari a 1,917 mg L⁻¹, con il massimo rateo di 562,8 mg L⁻¹ h⁻¹. Il rateo di riduzione incrementa con l'aumentare della concentrazione iniziale cromo. Il microrganismo è in grado di utilizzare numerosi elementi come elettroni donatori quali lattosio, fruttosio, glucosio, citrato, lattato e NAD(P)H, ma è solo il lattato ad avere una forte influenza sull'aumento del meccanismo di riduzione. La presenza o meno di altri metalli può influenzare il processo; in particolare Zn, Cd e Ni sono elementi inibitori mentre Cu, Pb, Mn e Co sono composti stimolanti. Il set di parametri ottimo prevede un pH pari a 9 ed una temperatura pari a 30 °C. La prova di laboratorio ha mostrato il potenziale del *P. phragmitetus* nei sistemi inquinati da cromo sia in matrice solida (suolo) che acquosa (acquifero).

PROVIDENCIA SP UTDM314

Un batterio Gram negativo cromo riducente (UTDM314) è stato isolato da un sito industriale contaminato, il microrganismo è stato identificato tramite un'analisi biochimica 16S rRNA come *Providencia sp.*. Thacker et al. (2006) hanno dimostrato che l'isolato risulta in grado, in condizioni ottime di pH 7 e T 37°C, di crescere e ridurre i cromati al 100% in un range di concentrazioni 100-300 mg l⁻¹ e al 99,31% per 400 mg l⁻¹. Le condizioni di crescita sono comunque garantite in range di pH e temperatura rispettivamente di 5-9 e 30-45 °C. Esso è inoltre resistente alla presenza di numerosi metalli quali nichel, zinco, mercurio, piombo e cobalto. Ulteriori prove in vitro hanno dimostrato che la parte più reattiva della cellula nella cromo riduzione è la frazione solubile.

PSEUDOMONAS AMBIGUA G-1

Dagli studi di Suzuki et al nel 1992 è stata purificata una cromo reduttasi del NAD(P)H dallo *Pseudomonas ambigua* G-1. L'Analisi stechiometrica della reazione enzimatica ha mostrato che l'enzima catalizzata la riduzione di 1 mol di Cr (VI) a Cr (III) con un consumo di 3 mol di NADH come elettroni-donatore. Il cromo (VI) è stato ridotto a

Cr(V) da una molecola di NADH equivalente in assenza dell'enzima. La risonanza paramagnetica ha dimostrato che il Cr(V) è stato generato durante la riduzione enzimatica. La quantità di Cr(V) prodotta è di circa 10 volte più grande rispetto alla riduzione non enzimatica. I risultati dell'esperimento mostrano che la riduzione del Cr(VI) a Cr(III) avviene almeno attraverso due stadi di reazione tramite Cr(V) come intermedio. I dati ottenuti dall'esperimento provano che l'ottimo dell'attività del processo enzimatico si ha a 37 °C per un pH pari a 7.

PSEUDOMONAS FLUORESCENS

Nel 2012 è stato approfondito da Res et al. lo studio dei batteri appartenenti alla specie *Pseudomonas Fluorescens*. Già nel 1997 E. M. N. Chirwa & Wang avevano studiato lo *Pseudomonas Fluorescens* LB300 il quale era in grado di operare bioriduzione in condizioni aerobiche. Con gli ulteriori studi più recenti si è osservato come differenti ceppi del *P.Fluorescens* (Gram-negativo) possano ricoprire un ruolo importante in biorisanamento sia in presenza che in assenza di ossigeno. Il test è stato effettuato in laboratorio in vitro con substrato di crescita LA (Lutria Agar). Il *P. Fluorescens* è risultato capace di resistere fino 1000 ppm di cromo esavalente. Si è inoltre testata l'efficienza di rimozione in funzione della concentrazione iniziale per un tempo di trattamento pari a 8 giorni, i dati più significativi del test sono stati riassunti in Tab 2.26.

Concentrazione iniziale [ppm]	Efficienza di rimozione [%]
200	98,4
400	98,6
600	99,85
800	99

Tab 2.26 - Efficienza di rimozione del P.Fluorescens. Elaborata da (Devi et al., 2012)

Si è potuto quindi capire che all'aumentare della concentrazione iniziale di cromati si osserva un incremento dell'efficienza di rimozione. Anche il rateo massimo di crescita della biomassa si è verificato ad una concentrazione di 800 ppm di Cr(VI).

P.PUTIDA MK1/P.PUTIDA PSR2000

Ulteriori studi sul batterio *P.putida* sono stati svolti da Park et al (2000). In questo studio sono stati indagate e messe a confronto le caratteristiche delle cromato riduttasi estratte da dalla *P.Putida* MK1 e dalla *P.Putida* PSR2000. Le due cromato riduttasi sono

entrambe solubili a differenza delle riduttasi estratte dall'*Enterobacter cloacae*, ma differiscono per molti aspetti. Ad esempio, l'enzima dell'MK1 ha una temperatura ottimale di funzionamento pari a 80 °C ad un pH di 5, mentre l'enzima del PRS2000 risulta molto attivo per valori di alcalinità compresi tra 6,5 e 7,5. Similmente sono stati osservati valori differenti di K_m per MK1 e PRS2000 rispettivamente pari a 370 μM e 40 μM inoltre, come dimostrato anche da Ishibashi, si ha che l'enzima PRS2000, a differenza delle reduttasi MK1, non viene inibito da solfati. Si ha anche un diverso pattern di evoluzione da una colonna di scambio ionico delle due riduttasi.

PSEUDOMONAS PUTIDA PRS2000

Un ulteriore specie di batteri studiati per il biorisanamento è la *Pseudomonas Putida* (Gram-negativo). I primi studi vennero effettuati nel 1990 da Ishibashi et al. i quali hanno isolato lo *P. putida* con ceppo PRS2000. Essi hanno provato che sia utilizzando cellule in sospensione sia fluido surnatante di celle lise (CFE) si è in grado di trasformare il cromo esavalente nella sua forma trivalente meno tossica. L'attività di cromato riduzione del PRS2000 è associata all'azione di proteine solubili contenute nel citoplasma e non ad opera di azioni riducenti sulla membrana. La sola attività enzimatica citoplasmatica mostra una K_m pari a 40 μM CrO_4^{2-} . Ishibashi et al. (1990) hanno dimostrato inoltre come la presenza di nitrati o solfati non influenzi la riduzione né in vitro né in presenza di cellule integrali.

PSEUDOMONAS PUTIDIA SKG-1

Nel 2013 Garg et al hanno speciato lo *Pseudomonas Putida* SKG-1 (10510) e ne hanno studiato il comportamento, a diverse condizioni di coltura e con diversi substrati, durante i processi simultanei di dechlorazione del pentaclorofenolo (PCP) e rimozione del cromo esavalente. Lo ceppo è risultato molto tollerante ad alte concentrazioni di inquinanti, fino a 1400 mg l^{-1} per il PCP e 4300 mg l^{-1} Cr(VI) . L'operatività del batterio si osserva per pH 7-9 e temperatura in un range di 28-32 anche se il rateo massimo di crescita si verifica per pH 8 e temperatura 30°C. Nelle condizioni di ottimo, a fronte di una concentrazione iniziale di PCP e Cr(VI) rispettivamente pari a 100 mgPCP l^{-1} e 500 mgCr(VI) l^{-1} , si sono ottenute efficienze di rimozione prossime al 87,5 % per il PCP e 80% per il Cr^{6+} .

Lo SKG-1 si è dimostrato essere una valida alternativa per il trattamento di reflui soprattutto industriali contaminati da PCP e cromati.

PSEUDOMONAS SP. CRB5

Mclean & Beveridge nel 2001 hanno isolato lo *Pseudomonas sp.* CRB5 (Gram – negativo) da una riserva boschiva in disuso contaminata da cromati. Il CRB5 è in grado di ridurre i cromati a forme precipitate insolubili trivalenti del cromo sia in condizioni aerobiche che in anaerobiche. Esso è in grado di tollerare fino a 520 mgCr(VI) l⁻¹ e ridurre cromati anche in presenza di rame e arsenico. In condizioni anaerobiche è in grado di ridurre contemporaneamente anche Co(III) e U(VI) inertizzandoli parzialmente. I risultati degli esperimenti hanno mostrato che la riduzione dei cromati è mediata da enzimi solubili che sono contenuti in abbondanza sia nel citoplasma sia nella membrana più esterna della cellula stessa. La sola attività di cromo reductasi nella frazione solubile mostra una K_m 23 mg l⁻¹ (437 μmol) e un rateo massimo V_{max} di 0,98 mgCr(VI) h⁻¹ mg proteine⁻¹ (317 nmol min⁻¹ mgproteine⁻¹).

PSEUDOMONAS STUTZERI CM463/462

Badar et al. nel 2000 hanno tentato di estrarre numerosi ceppo di batteri da un campione di suolo estratto da un terreno in prossimità di una conceria e di una fonderia. Sono riusciti ad isolare due ceppo dello *Pseudomonas stutzeri*: il CMG463 e il CMG462. Lo scopo di questo studio era di mettere a confronto le condizioni di crescita e le efficienze di riduzione del cromo esavalente nel caso aerobico e anaerobico. Le efficienze massime di rimozione si sono verificate in assenza di ossigeno, ma il processo di riduzione è in grado di svolgersi, seppur non efficientemente, anche in condizioni di aerobiosi. Il *P. stutzeri* CMG463 ha mostrato un rateo di rimozione del Cr(VI) maggiore rispetto al CMG462, rispettivamente pari a 88 μmol l⁻¹ e 58 μmol l⁻¹. I dati riportati in Tab 2.27 e Tab 2.28 riportano le concentrazioni (μM) di Cr(VI) residue e rimosse nonché i ratei di riduzione nelle due condizioni di studio.

Ceppo	Cr(VI) residuo [μM]	Cr(VI) perso[μM]	Rateo [nmol mg ⁻¹ proteine per h]
CMG462	87±1	14	0,1
CMG463	87±1	15	0,4

Tab 2.27 - Riduzione del cromo ad opera di celle in ambiente aerobico

Ceppo	Cr(VI) residuo [μM]	Cr(VI) perso[μM]	Rateo [nmol mg ⁻¹ proteine per h]
CMG462	42±3	58	3,0
CMG463	12±3	88	2,6

Tab 2.28 - Riduzione del cromo ad opera di celle in ambiente anaerobico

PSEUDOMONAS STUTZERI KC

Un ulteriore ceppo del microrganismo *Pseudomonas stutzeri* è stato spaciato nel 2007 da Zawadzka et al.; essi hanno isolato lo *Pseudomonas stutzeri* KC il quale è in grado di produrre dei siderofori in grado di ridurre il Cr(VI), il Hg(II), Cd(II) e As(III) sia in condizioni aerobiche che anaerobiche. Gran parte dei microrganismi hanno sviluppato una strategia per l'acquisizione del ferro basata sulla produzione di siderofori, molecole con forte affinità per gli ioni Fe³⁺ (Neilands, 1995). I siderofori sono quindi agenti chelanti che hanno il compito di legare e trasportare il ferro, vengono prodotti nel momento in cui l'organismo si trova in un ambiente con carenza di ferro stesso (Weller, 1988). La fluorescenza degli *Pseudomonas* è dovuta proprio a questi siderofori. Nello studio di Zawadzka et al. si è studiato il sideroforo, preparato chimicamente, denominato PDTC (piridina – 2,6 bi(acido tiocarbossilico)) che, reagendo con il Cr(VI), è in grado di ridurlo. Il PDTC è anche responsabile dei meccanismi di resistenza della cellula batterica alle concentrazioni di metalli pesanti. Le temperature alle quali è stato effettuato il test hanno tutte valori superiori ai 20 °C e valori di pH compresi fra 7 e 8.

SHEWANELLA ALGA (BRY-MT) ATCC 55627

Nel 2001 Guha et al. hanno condotto e riportato i risultati di esperimenti cinetici in batch per determinare la riduzione del cromo esavalente ad opera di *Shewanella alga* (BrY-MT) ATCC 55627. Il Cr(VI) è stato ridotto a Cr(III) dal BrY-MT cresciuto in 3 differenti substrati: BHIB (brain heart infusion broth), TSB (tryptic soy broth) e M9 (minimum broth). Sono state testate 4 diverse concentrazioni iniziali di Cr(VI) (4,836, 10, 37,125, e 260 mg l⁻¹) e se ne è misurato il rateo in condizioni aerobiche che anaerobiche. Il BrY-MT cresciuto in BHIB presenta la massima velocità di riduzione, seguito da quello coltivato in TSB. La quantità di ossidi di carbonio prodotti dalla respirazione batterica variano in funzione della presenza o meno dell'ossigeno nel sistema. Sempre Guha et al. nel 2003 hanno condotto una serie di esperimenti dinamici in colonna per sperimentare la riduzione del Cr(VI) ad opera di BRY-MT in condizioni di anaerobiosi facoltativa. La presenza di forti ossidanti quali il β-MnO₂ che, come noto, riossidano il Cr(III) in Cr(VI). Le condizioni di crescita sono state testate in modo tale che il ruolo di donatore di elettroni e sorgente energetica sia ricoperto dal lattato. La riduzione del Cr(VI) avviene rapidamente (entro 8 ore) nel mezzo sabbioso senza manganese mentre risulta rallentata in presenza di β-MnO₂ (57 h).

2.2.3.2 PROCESSI BIOLOGICI INDIRETTI

L'idea di indurre delle condizioni riducenti si basa sullo stesso principio di iniettare sostanze estranee al sistema per modificarne le condizioni e creare una zona reattiva favorevole alla riduzione del Cr(VI). Mentre nella normale iniezione di reagenti chimici essi reagiscono direttamente con l'inquinante, nel caso di induzione di condizioni riducenti si vuole sfruttare l'attività microbiologica di consumo di sostanze energetiche carboniose iniettate per far variare i parametri sistemici di pH e redox.

Il consumo di tali substrati ad opera dei microrganismi comporta una simultanea riduzione di ossigeno nella matrice portando il sistema a redox bassi. Come si osserva dal grafico di Pourbaix (Fig 1.1) il risultato di una riduzione di potenziale Eh è analogo al risultato che si ottiene utilizzando la riduzione strettamente biologica del metallo ovvero si osserva la formazione di composti precipitati del cromo in forma trivalente.

Le sostanze che consentono la crescita batterica, che dovranno essere iniettate, devono essere caratterizzate da una viscosità sufficientemente bassa e nonché valori di densità non troppo elevati. Verranno analizzati substrati consumabili sia di origine commerciale che non.

2.2.3.2.1 PRODOTTI A MARCHIO REGISTRATO

Esistono in commercio diversi prodotti a marchio registrato che consentono, una volta iniettati, di indurre l'acquifero in condizioni anaerobiche in modo da ottenere le condizioni redox ottimali per la precipitazione del cromo esavalente. Tutti i prodotti in commercio, analogamente ai prodotti non commerciali, sono stati progettati in modo da bonificare aree contaminate senza l'uso di una fonte continua di energia elettrica la quale risulta fondamentale e indispensabile nei tradizionali trattamenti meccanici di risanamento. Tra i prodotti utili ai fini della riduzione del Cr(VI) si possono citare:

- 3-D Microemulsion (3DMe[®]).
- Hydrogen Release Compound (HRC[®])
- Hydrogen Release Compound Extended Formula (HRC-X[®])
- Metals Remediation Compound (MRC)

3-D MICROEMULSION (3DME®)

Il 3DMe® è stato brevettato negli USA e nasce per massimizzare l'efficienza di trattamento anaerobico dei composti clorurati ed ottenere un completo risanamento al minor costo possibile. Questa molecola, come mostrato in Fig 2.21, è composta da acido lattico libero, acido lattico a rilascio controllato (polilattato) e acidi grassi esterificati su una catena molecolare carboniosa della glicerina.

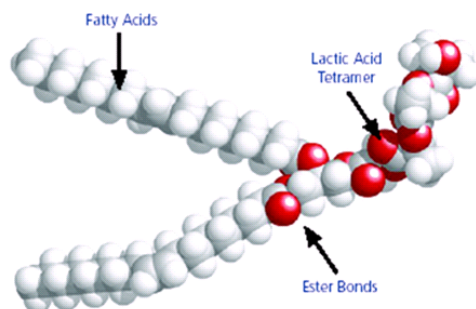


Fig 2.21 - Struttura molecolare del 3-D Microemulsion (3DMe®)

La struttura molecolare del prodotto è stata concepita per formare in falda strutture micellari favorendone la mobilità e di conseguenza la distribuzione degli elettro-donatori.

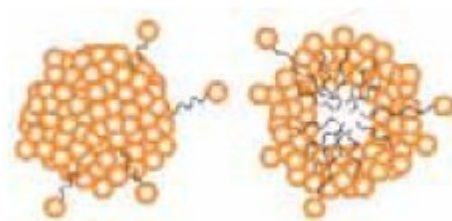


Fig 2.22 - Formazione dell'unità micellare del 3-D Microemulsion (3DMe®)

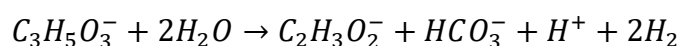
La parte più esterna delle micelle è costituita dalla frazione idrofila; il processo di distribuzione ed emulsione del prodotto avviene seguendo un gradiente negativo di contrazione da zone più concentrate a meno.

Il vantaggio dell'utilizzo del è di fornire substrato di consumo, con conseguente produzione di idrogeno, per un arco di tempo fino a 5 anni a partire da un'unica iniezione. Come mostrato dal profilo di sequenzialità dei rilasci degli elettro-donatori (Fig 2.23) si osserva come l'acido lattico libero venga rilasciato completamente entro il primo anno, mentre l'acido lattico a rilascio controllato nonché gli acidi grassi sono convertiti in idrogeno in tempi medio lunghi.

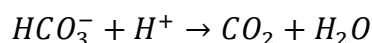


Fig 2.23 - Sequenzialità e archi temporali dei rilasci degli elettroni-donatori

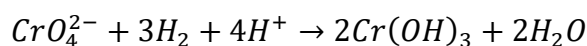
Si riporta a titolo informativo la serie di reazioni che lo ione lattato subisce quando si trova a contatto con l'acqua di falda e la relativa produzione di idrogeno. Lo ione lattato, reagendo con l'acqua, forma un anione acetato, un anione bicarbonato, idrogeno molecolare con contemporaneo aumento di acidità. La variazione di acidità può comportare una riduzione di pH fino a 1,5 entro un range radiale di 3 m dal punto di iniezione.



A questo punto ione bicarbonato e ione idrogeno possono reagire formando anidride carbonica:



Se in falda vi è la presenza di Cr(VI) sotto forma di ione CrO_4^{2-} la reazione preferibile è quella che porta alla formazione di precipitato trivalente meno tossico secondo la seguente stechiometria:



Dalla reazione si evince quindi come lo ione H^+ sia il principale accettore di elettroni e quindi la driving force del processo di bonifica. Nel complesso il trattamento conduce a una riduzione significativa dell'ossigeno disciolto, prossimo allo 0, con riduzione del potenziale redox fino a valori inferiori a -200 mV. La riduzione dei valori del potenziale redox in falda può comportare a sua volta variazioni alla solubilità dei metalli. Il cromo

riduce la sua solubilità mentre il ferro e manganese, il cui stato di ossidazione è fortemente influenzato da quello del cromo, aumentano in forma disciolta.

HYDROGEN RELEASE COMPOUND (HRC®)

Il composto per il rilascio di idrogeno ideato da Regenesi® era nato inizialmente con lo scopo di dechlorare sostanze inquinanti presenti nella matrice suolo. Essendo anch'esso, analogamente al 3DMe®, composto da glicerolo polilattato può trovare ulteriore impiego per la riduzione del Cr(VI). La differenza tra 3DMe e HRC risiede nella tempistica di rilascio; mentre il primo è caratterizzato da tre distinte fasi di rilascio, l'HRC è caratterizzato da un unico lento rilascio di acido lattico. In Fig 2.24 è mostrata un'infografica sulla struttura dell'HRC nonché una rappresentazione semplificata.

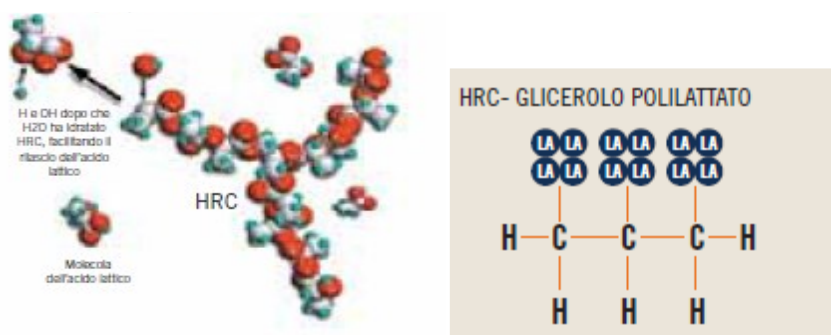


Fig 2.24 - Composto a lento rilascio di acido lattico (HRC®)

HYDROGEN RELEASE COMPOUND EXTENDED FORMULA (HRC-X®)

Tal prodotto è una variante dell'HRC con la caratteristica di garantire un rilascio più duraturo di donatori di elettroni nonché una più lenta produzione di idrogeno. Una volta in falda viene garantito un rilascio di acido lattico per un massimo di 3 anni. La necessità di trovare una variante al normale HRC è nata per quelle situazioni caratterizzate da contaminazioni da idrocarburi pesanti (DNAPL) le quali risultavano molto persistenti nel tempo.

METALS REMEDIATION COMPOUND (MRC®)

Il prodotto più recente ideato da Regenesi è il Metal Remediation Compound (MRC®) il quale è nato per fronteggiare le contaminazioni causate da metalli. A differenza dei prodotti visti precedentemente esso è un composto sulfidrilico nel quale si possono riconoscere un'unità di zolfo esterificato unita ad una catena carboniosa. L'estere organico dello zolfo è

inserito in una matrice di polilattato la quale è responsabile dell'elevata densità e viscosità dell'MRC[®] come apprezzabile in Fig 2.25; in ogni caso la matrice risulta facilmente iniettabile previo riscaldamento. L'MRC[®] ha quindi una duplice azione in quanto il composto organico dello zolfo immobilizza direttamente sulla matrice solida il metallo il quale rimane adeso anche al termine dell'attività microbica, mentre la catena carboniosa funge da fonte energetica per i batteri e crea condizioni ottimali sia per l'immobilizzazione sia per la produzione di ioni H^+ .

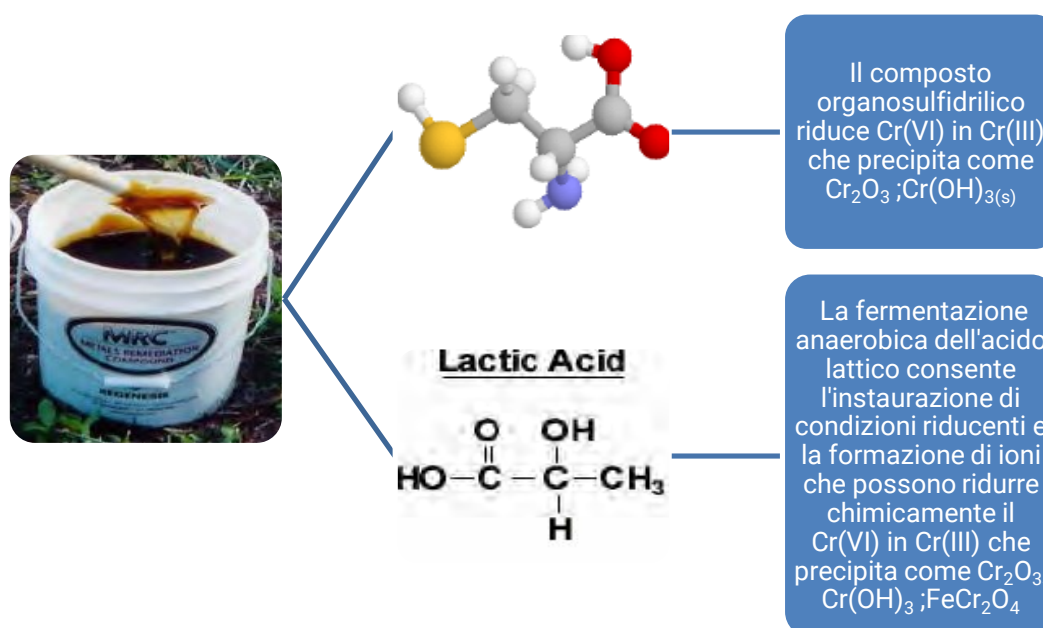
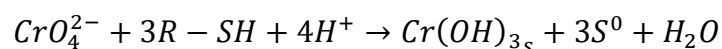


Fig 2.25 - molecole principali che compongono l'MRC

Le proprietà riducenti del gruppo sulfidrilico non alterano a natura dell'acquifero e sono espresse dalla reazione:



Test di laboratorio condotti da Regenesi[®] hanno dimostrato una riduzione di concentrazione di Cr(VI) da 15 mg/l a 0,4 mg/l nell'arco di 30 giorni. Il processo di reazione dell'MRC all'interno della matrice di terreno saturo, non è esente dalla formazione di sottoprodotti i quali risultano tutti biodegradabili.

Alcuni studi in letteratura sono stati eseguiti per valutare la capacità di riduzione in falda del Cr(VI) tramite l'utilizzo di tali prodotti commerciali. Negli studi condotti da Brodie et al., (2011) sono stati messi a confronto i differenti prodotti della famiglia Regenesi[®], più specificatamente sono stati testati: p-HRC, HRC, HRC-X e MRC. Tutti i prodotti hanno mostrato ottime capacità di riduzione del cromo esavalente sia in test con sola acqua di falda, sia nel caso di microcosmi. I test sono stati eseguiti partendo da una concentrazione iniziale di 900 ppb Cr(VI) e dimostrano come l'HRC riduce la concentrazione di Cr(VI) sotto i 30 ppb (limite analitico per questo studio) in 2 settimane, mentre l'MRC è in grado di ridurre la contaminazione in una sola settimana. Inoltre lo studio mostra come l'introduzione di uno qualsiasi di questi prodotti stimoli in maniera molto forte la crescita batterica autoctona. Si può notare come prodotti diversi stimolino ceppi batterici differenti come mostrato in Fig 2.26.

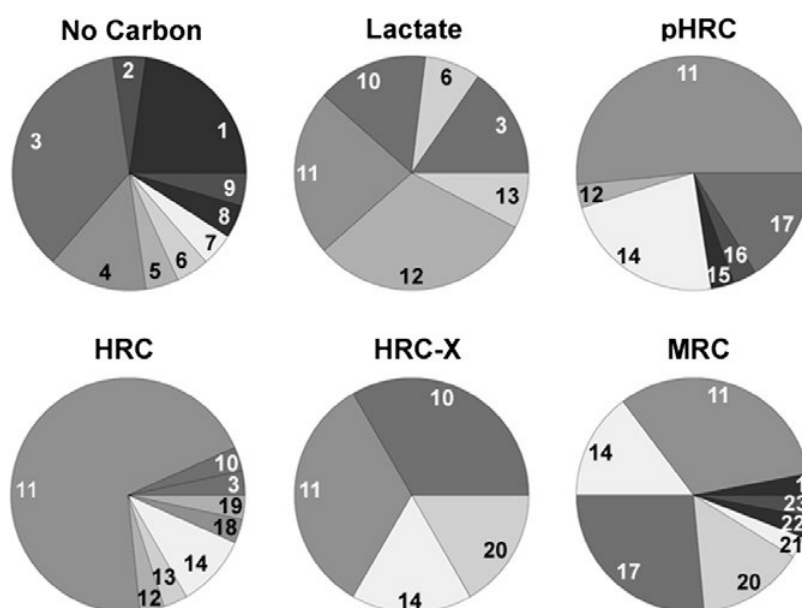


Fig 2.26 - Andamento dei differenti ceppi batterici in funzione del prodotto utilizzato. (1) *Methylophilus*, (2) *Sphingobacterium*, (3) *Oxalobacter*, (4) *Arthrobacter*, (5) *Bacteriovorax*, (6) *Mesorhizobium*, (7) *Ramlibacter*, (8) *Chitinophaga*, (9) unclassified *Burkholderiales*, (10) *Dechloromonas*, (11) *Pseudomonas*, (12) *Rhizobium*, (13) *Azoarcus*, (14) *Sporomusa*, (15) *Acidovorax*, (16) *Sinorhizobium*, (17) *Desulfosporosinus*, (18) unclassified *gamma proteobacteria*, (19) *Variovorax*, (20) *Vogesella*, (21) *Rhodiferax*, (22) *Clostridium*, (23) *Serratia*. (Brodie et al., 2011)

Un interessante studio di riduzione del Cr(VI) tramite prodotti commerciali è stato eseguito da Wierzbicki et al., (2004) i quali hanno testato questi prodotti nell'ambito di un sito contaminato in Michigan. L'acquifero in questione è composto da sabbia di granulometria medio fine e la contaminazione di cromo esavalente prima dell'iniezione di HRC[®] si

attestava intorno ai 40000 µg/l. Trascorso un tempo di 128 giorni dall'iniezione, si è notata una riduzione della concentrazione di Cr(VI) circa del 60%.

PEROXYCHEM EHC®- M

EHC® Metals è una tecnologia di bonifica in situ per trattare contaminazioni simultanee di metalli. Questo prodotto, inserito sul mercato da Peroxychem®, è stato pensato per garantire una stabilizzazione a lungo termine di arsenico, cromo, mercurio e altri metalli pesanti presenti in acquifero (Mueller et al., 2014). L' EHC®- M consente il rilascio controllato di carbonio organico, ferro zero valente e funge da sorgente a lento rilascio di solfidi.



Fig 2.27 - Tipica consistenza dopo miscelazione dell'EHC-M

A seguito dell'iniezione di EHC Metalli nella zona satura, un certo numero di sostanze chimiche e processi microbiologici si combinano per creare condizioni fortemente riducenti grazie alle quali la maggior parte dei metalli pesanti possono essere sequestrati eliminati dalla fase acquosa attraverso la formazione di precipitati ferro - metal- solfuri nonché attraverso adsorbimento su prodotti secondari corrosivi del ZVI (Product sheet Peroxychem). Questo prodotto commerciale risulta di semplice utilizzo in quanto non è pericoloso né per la salute umana né per l'ambiente. L' EHC rispetta tutte le caratteristiche di un composto che deve essere iniettato nel sottosuolo, infatti è stato realizzato in uno stato semiliquido che ne permette l'iniezione agevole nel sottosuolo. I metodi per applicare questa soluzione proposta da Peroxychem sono principalmente tre: iniezione direct push, iniezione pneumatico a fratturazione, miscelazione diretta del suolo. Anche se il prodotto è in commercio da un tempo relativamente breve esso ha trovato già impiego in alcune situazioni reali in campo. Sino alla data odierna l' EHC è stato usato in 166 siti per un totale di 32205 kg di prodotto; nella maggior parte dei casi si sono osservate, partendo da

situazioni con una contaminazione di 24 mgCr(VI)/L, concentrazioni finali al di sotto del limite di rilevabilità del laboratorio (Mccall & Bagby, 2010).

2.2.3.2.2 PRODOTTI NON BREVETTATI

Lo scopo di questo capitolo è presentare delle valide alternative ai normali prodotti commerciali affermatosi da anni sul mercato. L'utilizzo di tali substrati consente di indurre condizioni anaerobiche e generare quindi quelle condizioni redox necessarie a far precipitare il Cr(VI) in Cr(III). Questo tipo di approccio può essere una valida e sostenibile alternativa in quanto tali substrati sono solitamente degli scarti produttivi. In tale elaborato vengono esaminati tre tipi di substrati tutti provenienti da attività produttive nel campo alimentare; essi sono: permeato di siero di latte, scarto da attività di birrificazione e melasso da barbabietola. Grazie alle loro caratteristiche di densità e viscosità tali substrati hanno come punto di forza la possibilità di essere iniettati, alcuni direttamente (permeato e scarto da birrificio) e altri diluiti con acqua (melasso) in quanto più densi. Quando questi substrati vengono introdotti all'interno di un sistema acquoso, molecole organiche fermentabili vengono rilasciate e trasformate in idrogeno e acetato da microorganismi normalmente presenti nel sistema naturale. Tali prodotti di reazione vengono utilizzati come donatori di elettroni e fonte di carbonio da parte di molteplici ceppi batterici eterotrofi. Essendo questi substrati di origine naturale, non sono pericolosi per l'operatore né per l'ambiente in quanto la biodegradabilità è sempre garantita. L'utilizzo di tali reagenti in campo, alla luce delle loro caratteristiche di iniettabilità, è permesso grazie a sistemi di iniezione a pressione che generano in falda muri reattivi.

SIERO DI LATTE

Il siero di latte, che costituisce fino al 90% del prodotto nella caseificazione, rappresenta la fase acquosa separata dal caglio durante la produzione del formaggio o della caseina. Per molto tempo non si è trovato un impiego che valorizzasse il siero di latte; ultimamente questa importante fonte di proteine e minerali è stata impiegata come integratore per l'alimentazione animale all'interno di allevamenti e/o in campo industriale per la produzione di alimenti soprattutto inerenti al settore dolciario. La matrice del siero è composta principalmente da acqua che costituisce il solvente di numerose sostanze solubili in essa come: il lattosio, proteine, sali minerali, sali organici solubili e composti azotati non proteici. Dall'industria casearia si distinguono due tipi di sieri di latte in funzione della

provenienza: siero di grana (latte vaccino) e siero di pecorino (latte ovino). Nella Tab 2.29 sono riportati i valori medi dei principali parametri chimico-fisici che caratterizzano i due sieri:

	Siero di grana – Latte vaccino		Siero di pecorino – Latte ovino	
	[g/L]	% su secco	[g/L]	% su secco
Sost secca	66	100	101	100
Proteine	8,9	13,5	17,1	16,9
Lattosio	49,3	74,7	53,6	53,1
Ceneri	5,5	8,3	5,1	5,0
Grasso	2,3	3,5	25,2	25,0
pH	6,3±0,2			

Tab 2.29 - Valori medi dei principali componenti del siero di latte vaccino e ovino.

A sua volta il siero vaccino può essere classificato in funzione del grado di acidità distinguendo tre sottocategorie:

- siero di vaccino dolce
- siero di vaccino acido
- siero di vaccino di caseina

In Tab 2.30 viene riportata la composizione di ognuno.

	Siero dolce		Siero acido		Siero di caseina	
	[g/L]	% su secco	[g/L]	% su secco	[g/L]	% su secco
Sost secca	62	100	57	100	61	100
Proteine	7,5	12,1	3	5,3	5	8,2
Lattosio	48	77,4	46	80,7	47	77,0
Ceneri	6	9,7	8	14,0	9	14,8
Grasso	0,5	0,8	-	-	-	-
pH	6,1		4,6		4,4	

Tab 2.30 - Classificazione del siero di latte vaccino in funzione dell'acidità e valori medi per ogni componente principale

Per valorizzare completamente il siero di latte è necessario un processo di ultrafiltrazione ovvero un processo fisico di separazione che prevede il passaggio del siero attraverso una membrana posta ad alta pressione. Così facendo si ottiene, come mostrato in Fig 2.28, un flusso di permeato e uno di retentato.

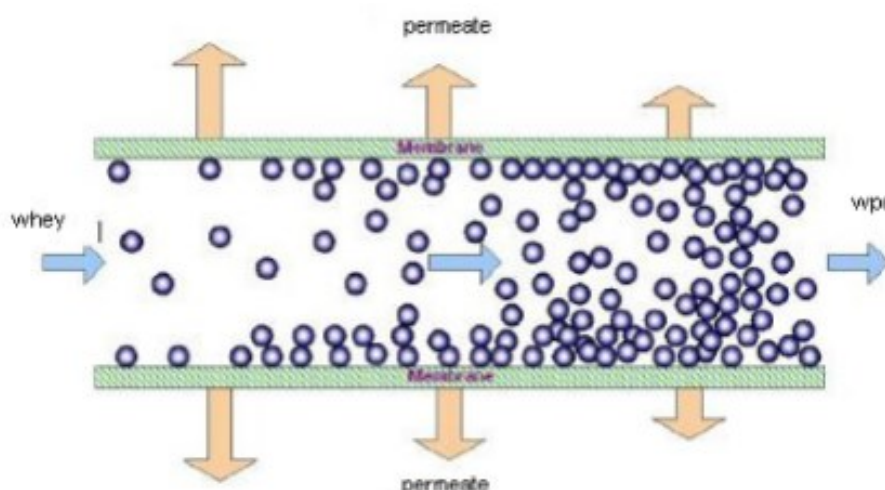


Fig 2.28 - Schema concettuale di un'unità di ultrafiltrazione. Si riconosce un flusso di permeato che attraversa la membrana e un flusso di retentato a cui viene impedito il passaggio

La matrice permeata è composta dall'acqua madre nella quale è soluta polvere di permeato e di lattosio, mentre il flusso retentato, in funzione del grado di concentrazione delle proteine, costituisce il cosiddetto WPC (Whey Protein Concentrate) o WPI (Whey Protein Isolate). Lo scopo principale è l'ottenimento pressoché totale di recupero di proteine e grassi come concentrato e la separazione del lattosio come permeato. La composizione media delle due matrici permeate è riportato in Tab 2.31.

Composizione %	WPI	WPC	Polvere di permeato	Polvere di siero demineralizzato	Polvere di lattosio
Secco	94-96	96-97	95-98,5	96-97	99,5-99,8
Lattosio	1,5-3,0	10-60	75-85	75-80	99-99,5
Proteine	92-96	30-80	2,6	13-15	0,1-0,3
Materia grassa	0,1-1,0	3-8	0,2-0,5	1-1,5	-
Ceneri	2-3	4-8	7-10	1-5	0,1-0,3
pH	5,8-6,1	4-6,5	5,8-6,2	6,5	6

Tab 2.31 - Caratteristiche dei principali derivati del siero e valori medi di ogni componente

Mentre il concentrato trova molte applicazioni in campo industriale, il permeato trova dei possibili impieghi soprattutto nel settore dolciario. Se il permeato viene ulteriormente trattato per separare le due frazioni solide (siero e lattosio) dalla matrice acquosa (acqua madre) esse possono essere riutilizzate a loro volta come mostrato in Tab 2.32.

Prodotti	Applicazioni	Interesse
Lattosio	Cioccolati	Carica glucidica a basso potere dolcificante
	Alimentazione infantile	Fissatore di aromi
	Prodotti lattieri	Standardizzazione proteine del latte e riduzione dei costi
	Panificazione dolciaria	Agente di carica
Permeato di siero	Cioccolati/Dolciari	Agente di carica

Tab 2.32 - Principale utilizzo del permeato e lattosio

Un impiego alternativo e molto recente del permeato, senza ulteriore raffinazione, è nel campo del biorisanamento ambientale. Il lattosio presente risulta essere un'ottima fonte di carbonio per l'attività metabolica dei microrganismi e può essere sfruttato come driving force del processo di consumo dell'ossigeno con conseguente creazione di un ambiente riducente. Il lattosio, caratterizzato da formula chimica $C_{12}H_{22}O_{11}$, è un disaccaride composto da glucosio e galattosio. Le molecole di glucosio e galattosio sono collegate come si può osservare in Fig 2.29 da un ponte a ossigeno che costituisce un legame beta.

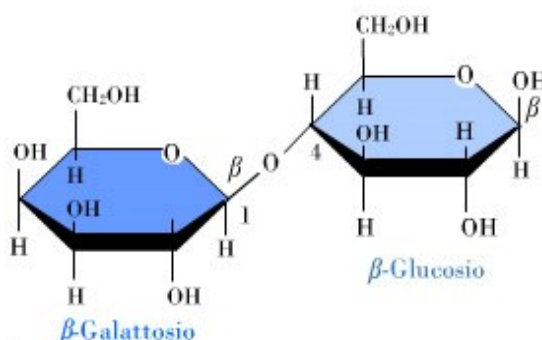


Fig 2.29 - Molecola del lattosio

Molti procarioti preferiscono come substrato energetico il glucosio in quanto caratterizzato da un'ampia disponibilità in natura. In mancanza di esso e in presenza di lattosio come unico substrato i microrganismi si trovano costretti a modificare la loro produzione enzimatica rendendosi capaci di degradare questa nuova fonte energetica. Il meccanismo di repressione da catabolita permette alle cellule di utilizzare la migliore fonte di carbonio limitando e/o escludendo la produzione di enzimi per il trasporto all'interno della membrana e scissione di altri substrati. Ne consegue che la sintesi di proteine quali la β -galattoside permeasi e la β -galattosidasi, rispettivamente utilizzate per il trasporto transmembranico e scissione del lattosio, è repressa finché la crescita batterica non risulta esclusivamente basata sul lattosio stesso.

Un caso recente in cui è stata utilizzata questa tecnologia di bonifica è relativo a un sito contaminato nel bresciano che ha visto la riduzione della concentrazione di cromo esavalente da 200000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 20000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ nell'arco di tre anni.

MELASSO

Il melasso, chiamato in campo commerciale black-strap molasses, è uno sciroppo di colore nero ottenuto come sottoprodotto del processo di produzione dello zucchero. In funzione della materia prima da cui si estrae il saccarosio distinguiamo due tipi di melasso: melasso da barbabietola (molasses) e melasso da canna da zucchero (black strap).



Fig 2.30 - Consistenza del melasso black-strap

Ponendo sottopressione la canna o tagliando la barbabietola e concentrando tramite bolliture successive le acque madri di lavorazione si ottiene questa importante fonte di carbonio che ha trovato negli ultimi anni il suo maggiore impiego nell'alimentazione animale negli allevamenti intensivi. Sono nati quindi numerosi mangimi liquidi a base di melasso, un esempio è il Glucosev® ovvero un mangime a base di melasso altamente energetico. I costi contenuti e l'evato apporto di carbonio fanno del melasso un ottimo integratore energetico o substrato di consumo primario per colonie batteriche in fase di fermentazione o digestione anaerobica per la produzione di biogas. La composizione media e le caratteristiche generali del melasso sono molto sensibili alla variazione dei parametri di processo, in particolar modo sono molto variabili le frazioni di saccarosio e saccarosio idrolizzato in fruttosio e glucosio. Una variante del melasso prodotto è la produzione dello sciroppo bruno dall'attività di produzione del glucosio dall'amido di mais.

Il melasso ha all'incirca la seguente composizione: 26% acqua; 46% zuccheri, di cui riducenti 20%, 5,6% di azoto come proteine-amminoacidi, 0,07% fosforo. La componente

organica è lievemente diversa tra melasso di barbabietola e di canna e viene riportata in Tab 2.33.

Componente organica	Barbabietola	Canna da Zucchero
Saccarosio	66	44
Glucosio	1	10
Fruttosio	1	13
Betaina	6	0
Amminoacidi	8	3
Altre sostanze	18	30

Tab 2.33 - composizione media del melasso da barbabietola e da canna da zucchero (divini.net)

Il primo impiego del melasso come substrato carbonioso per la crescita di materiale biologico, risale al 2005 ad opera di Schmidt et al. i quali testarono la crescita algale. Successivi studi sulla crescita sono stati effettuati nel 2007 e nel 2011 rispettivamente ad opera di Andrade & Costa e N. Sharma & Rai.

SCARTI DA BIRRIFICIO

Un ulteriore scarto di produzione industriale utilizzabile come feed per i microrganismi è ricercabili negli scarti della filiera di produzione della birra. Gli scarti del processo sono caratterizzati principalmente da elevato contenuto di sostanza organica nonché da un tenore di umidità elevato. Analizzando il diagramma di flusso dello schema di un tipico impianto di produzione della birra si osserva che i flussi secondari allontanati dal sistema sono essenzialmente due:

- scarto dalle trebbie: è il residuo che si genera a seguito della bollitura e decantazione dei chicchi di malto in fase di ammostamento. La scorza dei chicchi non potendo rimanere in soluzione, viene separata per gravità in tini di legno o metallo. Il residuo delle trebbie è tipicamente costituito da cellulosa, zuccheri, amido e proteine.
- flusso di spurgo da fermentatore. Nei moderni processi di produzione si utilizza uno stesso tank (fermentatore) nel quale avviene la fermentazione seguita da un processo di maturazione a basse temperature con deposito sul fondo dei lieviti sospesi. Nei fermentatori si può verificare il fenomeno dell'autolisi ossia la rottura delle cellule micotiche. Tale rottura deriva dalla sovrappressione generata della birra chiarificata sui lieviti sedimentati sul fondo del reattore. Per evitare questo

fenomeno è necessario allontanare periodicamente una quota a parte del sedimentato che costituisce la portata di spurgo. La matrice allontanata risulta essere ricca di vitamine, sostanza organica sia viva che morta nonché dai lieviti stessi.

In Tab 2.34 sono riassunte le caratteristiche dei due flussi di scarto organico allontanati.

Tipologia di biomassa di scarto	Fattore di produzione [kgscarto/hbirra]	Classificazione dello scarto	Destinazione tipica
Trebbie	18	Sottoprodotto	Mangime
Lievito	3	Sottoprodotto	Mangime

Tab 2.34 - Caratteristiche degli scarti organici dell'industria della birra

2.2.4 ATTENUAZIONE NATURALE

Il termine attenuazione naturale descrive i processi che avvengono naturalmente in ambiente senza alcun intervento umano per ridurre la massa, la tossicità, la mobilità, il volume o la concentrazione dei contaminanti degli inquinanti (Stanin & Pirnie, 2004). I principali meccanismi chimico, fisici e biologici di attenuazione in situ includono: la biodegradazione, dispersione, assorbimento, diluizione, volatilizzazione, stabilizzazione biologica o chimica, trasformazione e distruzione (USEPA, 2000).

I processi di attenuazione naturale del cromo esavalente sono di grande interesse ingegneristico e la loro conoscenza può evitare l'installazione di tecnologie di bonifica per il raggiungimento degli standard di legge sulla qualità delle acque (Sims et al., 1991).

Il grado di attenuazione risulta sito specifico ovvero l'efficacia della riduzione ad opera di processi naturali varia da luogo a luogo in quanto l'efficienza dei meccanismi è strettamente legata alle proprietà e al tipo di suolo o acquifero. Si possono riassumere tre principi affinché avvenga la riduzione del Cr(VI) nel sottosuolo (Stanin & Pirnie, 2004):

1. Presenza di elementi riducenti nell'acquifero
2. La quantità di Cr(VI) e delle altre specie chimiche reattive non devono superare la capacità limite di riduzione dell'acquifero.
3. Il rateo di riduzione del Cr(VI) deve essere maggiore del rateo di trasporto dalla sorgente contaminata

I principali responsabili dell'AN sono: specie dissolte, ioni assorbiti, costituenti minerali nonché la sostanza organica. Come descritto dagli studi di Barcelona & Holm (1992)

l'interazione dominante nel processo è quella che intercorre tra Cr(VI) e matrice solida in quanto la componente acquosa partecipa solamente all'1% alle reazioni complessive. I processi chimico fisici che interessano quindi Cr(VI) e matrice solida possono essere riassunti come segue:

1. riduzione ad opera della sostanza organica naturale
2. reazioni redox dirette e indirette tra Cr(VI) e la superficie dei minerali
3. desorbimento dalla superficie dei minerali di sostanze riducenti come il Fe^{2+}

Per avere una panoramica completa delle reazioni geochimiche interessate si può fare riferimento al ciclo naturale del cromo descritto precedentemente nel capitolo 1.

Il Cr(III) può essere quindi riossidato a Cr(VI) in presenza di ossidi di manganese nel suolo, ma può anche precipitare sottoforma di idrossido in funzione della massa di Cr(VI), della massa di Cr(III) e del rateo di riduzione. Il rateo di trasformazione tra Cr(VI) e Cr(III) risulta quindi la somma del rateo di riduzione del Cr(VI) e di ossidazione del Cr(III) (Sims et al., 1991):

$$\frac{d[Cr(VI)]}{dt} = \left[\frac{[Cr(VI)]}{dt} \right]_{red} + \left[\frac{[Cr(VI)]}{dt} \right]_{ox} = R_{red} + R_{ox}$$

Un esempio di R_{red} , che è possibile apprendere dalla letteratura riferito alla riduzione del Cr(VI) in presenza della sola matrice organica (Carl D. Palmer & Puls, 1994), è esprimibile come segue:

$$R_{red} = -k_{red} * X_e^{-1} * [HCrO_4^-] * [SHS] * [H^+]^p$$

Dove:

k_{red} : costante di riduzione espressa in d^{-1}

X_e : frazione equivalente di sostanza umica che è stata ossidata

SHS : concentrazione di sostanza umica totale

p : coefficiente empirico

Per descrivere il rateo empirico di ossidazione R_{ox} in presenza di ossidi di manganese viene riportata una relazione proposta da Fendorf & Zasoski (1992b):

$$R_{ox} = k_{ox} * [CrOH^{2+}] * \left[\frac{A}{V} \right]^m * [H^+]^n$$

Dove:

k_{ox} : costante di ossidazione espressa in d^{-1}

A/V : area superficiale dell' MnO_2 per unità di volume della soluzione

n : coefficiente empirico

Il processo di attenuazione naturale presenta differenti vantaggi ma allo stesso tempo una serie di limitazioni; tali caratteristiche vengono riportate nella seguente Tab 2.35.

Vantaggi	Svantaggi
<ul style="list-style-type: none"> • Processo non invasivo in quanto non richiede l'installazione di nessun tipo di tecnologia • Potenzialmente applicabile in tutti i siti contaminati • È una tecnologia a costo zero salvo per il monitoraggio • L'efficienza di riduzione alle basse concentrazioni è maggiore rispetto a molte tecnologie di bonifica • È combinabile con altre tecnologie • Non comporta alcun rischio per l'uomo 	<ul style="list-style-type: none"> • I costi per caratterizzare il sito ai fini di capire l'entità dell'attenuazione naturale possono essere elevati • Essendo reazioni complesse è necessario un'attività di monitoraggio a lungo termine • Operando su una matrice complessa è difficile conoscere il rateo di riduzione in quanto varia in funzione di essa

Tab 2.35 - Descrizione dei principali vantaggi e svantaggi apportati dall'attenuazione naturale

3 SOLUZIONI IMPIANTISTICHE

In questo capitolo vengono presentate le soluzioni impiantistiche che consentono l'implementazione delle tecnologie di bonifiche trattate nel Capitolo 2.

Vengono approfondite le modalità di applicazione dei reagenti e dei meccanismi di riduzione del cromo esavalente impiegate nelle bonifiche dei terreni, esse sono riconducibili a tre soluzioni impiantistiche: barriere reattive permeabili, generazione di zone reattive e iniezione di gas riducenti.

3.1 BARRIERE REATTIVE PERMEABILI

Una delle più innovative tecnologie in-situ utilizzate per la bonifica di acquiferi inquinati è quella di realizzare delle zone reattive permeabili (Tratnyek, 2002). Viene posto un materiale reattivo in grado di intercettare il plume di contaminante, garantendo un deflusso dell'acquifero decontaminato (Hawley & Deeb, 2004) (Fig 3.1). Questo dispositivo è passivo e non richiede l'uso di fonti energetiche per poter funzionare (Skinner & Schutte, 2006).

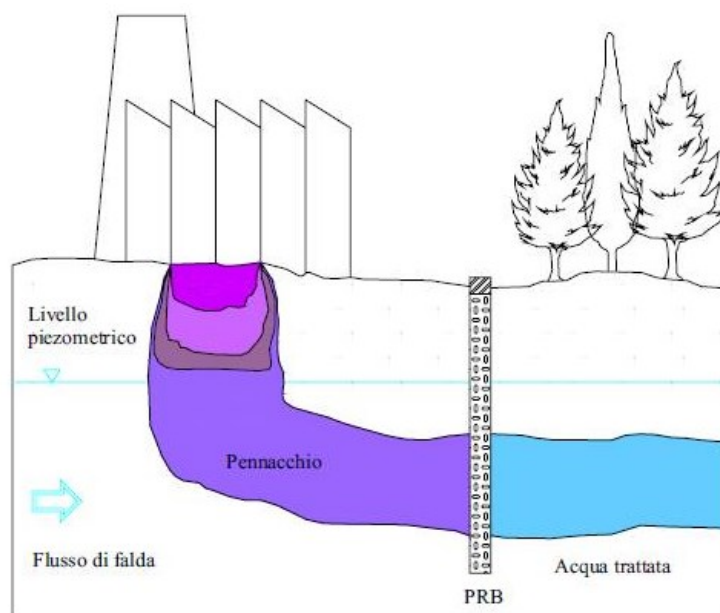


Fig 3.1 - Configurazione generica di una barriera reattiva

Lo studio di questa tecnologia prosegue fin dagli inizi degli anni 90 e i risultati di molti anni di studio hanno portato ad affermare che tale sistema di bonifica è una valida

alternativa, sostenibile ed economicamente vantaggiosa, rispetto al convenzionale sistema di pump and treat (Chen et al., 2001).

Per la realizzazione di questo tipo di sistemi di bonifica è necessario procedere a una caratterizzazione accurata del sito contaminato. Questa caratterizzazione deve includere: localizzazione del plume, direzione del flusso, velocità del flusso e la concentrazione del/i contaminante/i; quest'ultimo dato è di fondamentale importanza in quanto la sua conoscenza determina la fattibilità o meno dell'intervento. In generale devono essere indagati questi aspetti fondamentali prima dell'implementazione delle PRB:

- idrogeologia
- carico del contaminante

Dal punto di vista dell'idrogeologia è necessario capire la direzione del flusso e la distribuzione del plume di contaminante. Questo è molto importante ed è legato al funzionamento vero e proprio di questi sistemi, infatti se il plume di contaminate scavalca la zona reattiva non ci sarà alcun tipo di riduzione. Scendendo nello specifico, una corretta caratterizzazione, prevede la conoscenza della conducibilità idraulica, porosità, e di tutti quei parametri quali velocità di advezione, andamento della piezometria, e gradiente idraulico. Un corretto studio impiantistico deve tenere conto anche di tutti quei cambiamenti stagionali che si possono verificare durante il funzionamento quali ad esempio la ricarica dell'acquifero e il cambiamento della direzione di flusso. Alcune variazioni di questi dati possono portare allo scarso successo dell'intervento.

L'analisi della geologia dell'acquifero è strettamente necessaria per la realizzazione di un intervento efficace. La variazione della stratigrafia consente di identificare zone in cui la barriera può essere introdotta. La presenza di rocce fratturate, ad esempio, può influire negativamente sul funzionamento delle PRB in quanto si possono creare cortocircuiti attorno alla barriera stessa (USEPA, 1998).

La distribuzione spaziale del contaminate implica la diretta progettazione della zona reattiva della barriera; infatti, la dimensione è legata alla massima concentrazione di contaminante prevista. Questo tipo di approccio consente una progettazione a favore di sicurezza. La conoscenza geochimica dell'acquifero invece è strettamente necessaria per capire l'influenza di questi sistemi nel tempo; i reattivi che vengono utilizzati possono indurre variazioni del livello di redox, cambiamento del pH, influenza sulla capacità

tampone dell'acqua etc. È necessario quindi caratterizzare da questo punto di vista il sito in cui deve essere realizzato l'intervento.

Nel caso di barriere biologiche è importante la conoscenza di colonie naturali che possono avere un effetto di attenuazione del plume di contaminante. Ad esempio la presenza di batteri solfato riduttori può ridurre il potenziale redox dell'acquifero agevolando quindi il processo di riduzione di contaminanti come il Cr(VI). Noti i dati relativi all'acquifero in esame, al contaminante e alla geologia è possibile pianificare l'intervento realizzativo in due diverse configurazioni: continue o "funnel and gate" (Fig 3.2). Nelle barriere continue, si scava una trincea, realizzata per mezzo di diverse tecniche di escavazione, ponendo in tale spazio la zona reattiva avente dimensioni tali da contenere l'intero plume di contaminante.

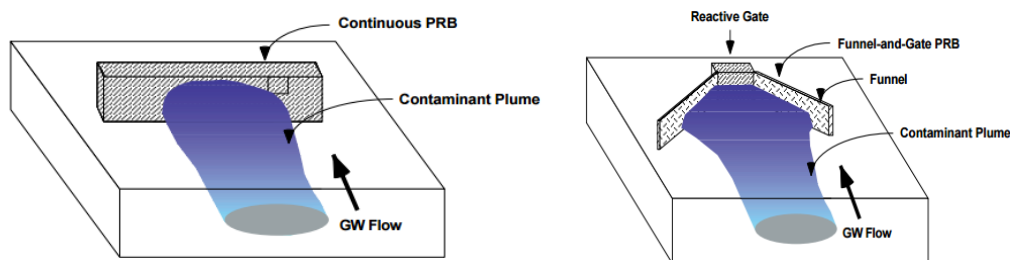


Fig 3.2 - Barriera permeabile di tipo continuo (sx) e funnel & gate (dx) (USEPA, 1998)

Il materiale che viene utilizzato per la realizzazione della PRB deve avere una conducibilità idraulica paragonabile o superiore rispetto a quella del materiale naturale. Tale configurazione è utilizzabile solo in quei casi in cui il plume ha una larghezza limitata (Gavaskar, et al., 2000). Le tecniche utilizzate per la realizzazione sono molteplici e funzione della profondità dell'intervento. Tipicamente nei casi in cui la profondità è compresa nei 35 piedi è possibile effettuare lo scavo con tecniche convenzionali di escavazione consentendo di contenere i costi (USEPA, 2000). Quando le profondità crescono l'uso di escavazione sia tradizionale che con macchine apposite diventa impraticabile; In questi casi si procede attraverso soil mixing o con iniezioni ad alta pressione.

Nel primo caso, attraverso delle trivellatrici a largo diametro (1-2,5 m), si procede a forare il terreno e, mentre vi è l'azione meccanica della coclea, si ha l'introduzione di materiale reattivo. Questo consente una miscelazione omogenea tra terreno e materiale reattivo. Tale tecnologia consente di scendere a profondità maggiori di 40 m. Nel secondo caso si procede

si procede all'iniezione, tramite jet grouting, di agenti per la realizzazione di muri impermeabili che garantiscono resistenza strutturale al terreno.

Quando si parla di barriere funnel and gate (Fig 3.2) si tratta di strutture costituite da due muri impermeabili che hanno il compito di intercettare il plume di contaminante e di convogliarlo nella zona reattiva che risulta essere più piccola rispetto al caso delle barriere continue. Questo tipo di barriere vengono preferite a quelle continue quando non si ha molta conoscenza del plume da trattare e quando si lavora con sistemi eterogenei; la realizzazione di questi sistemi implica una maggior complessità di progettazione e realizzazione (Carey et al., 2002). Dal punto di vista dei costi, si preferisce la realizzazione di PRB di tipo funnel and gate in quanto la quantità di materiale reattivo da utilizzare è minore. Dal punto di vista realizzativo molteplici tecniche sono state messe a punto per questo tipo di barriere: fondazioni pneumatiche, iniezioni ad alta pressione, fratturazione idraulica verticale, (Naidu & Birke, 2014) etc. La realizzazione della zona reattiva deve avvenire scegliendo un opportuno materiale di riempimento che sia attivo nei confronti del contaminante stesso. Tale materiale non deve generare reazioni chimiche o sottoprodotti quando viene a contatto con il contaminante e, se possibile, non si deve comportare a sua volta da contaminante. Inoltre, come in tutti gli interventi di bonifica per far sì che siano sostenibili dal punto di vista economico, devono avere alta durabilità nel tempo. In funzione del tipo di materiale le barriere si distinguono in: adsorbenti (ad esempio uso di carbone attivo), chimiche (ad esempio uso di ferro zero valente) oppure biologiche (batteri) (Hawley & Deeb, 2004). Vengono riassunti in Tab 3.1 i principali metodi reattivi e materiali di riempimento per i maggiori inquinanti metallici di interesse.

Contaminante	Materiale di riempimento	Bibliografia
Ni, Cu, Zn, Pb, Cd, Fe, As, Cr, Hg, etc	Calcare, Zeoliti, ZVI,, Bauxite, Ditionito di sodiom Bentonite, Allumina attivata, Ceneri volatili etc	Benner et al. (1999,2002), Cheng et al. (1997), Chung et al. (2007), Genç-Fuhrman et al. (2005) etc

Tab 3.1 - Materiali di riempimento per PRB in funzione del contaminante metallico

Quando si ha a che fare con il cromo esavalente è possibile utilizzare due tipi di barriere: quelle chimiche e quelle biologiche. Nel primo caso numerosi studi in letteratura hanno dimostrato la funzionalità di barriere chimiche dotate di Fe(0) come materiale reattivo.

L'uso di questo tipo di reagente per la rimozione del Cr(VI) implementato nelle PRB è stato investigato in maniera sostanziosa sia in applicazioni di tipo batch come emerge, ad

esempio, dagli studi di Powell et al. (1995), in colonna (Blowes et al., 1997), a scala pilota e a piena scala come nel caso di Elizabeth City in North Carolina (Shafieiyoun et al., 2013) dove è stata realizzata una barriera di lunghezza pari a 46 m e profondità 8 m.

Per quanto riguarda la realizzazione di biobarriere per bonificare siti contaminati da cromo esavalente si necessitano di biobarriere anaerobiche; l'idea è quella di utilizzare materiale organico per stimolare l'attività microbica e indurre condizioni riducenti nell'acquifero. Il substrato organico possiede quindi due funzioni, esso funge da supporto per la crescita batterica nonché da substrato carbonioso per indurre il processo biodegradativo con conseguente rimozione dell'ossigeno a valle della barriera stessa (Itrc, 2011).

Un caso di studio a scala di laboratorio (test in colonna) è stato affrontato dall'università La Sapienza. La ricerca, condotta da Boni e Scaffoni (2009), ha evidenziato una riduzione superiore al 99% a partire da una concentrazione iniziale pari a 10 mg Cr (VI)/L grazie all'utilizzo di compost derivato da verde. Un tentativo di applicazione a scala pilota è stato condotto in India da Jeyasingh et al nel 2011, utilizzando un mix tra PRB e zona reattiva si è ottenuto una riduzione prossima al 83%, partendo da una concentrazione pari a 250 mgCr(VI)/L.

3.2 ZONE REATTIVE IN – SITU

Le zone reattive in situ sono basate sulla creazione di una zona di reazione ove il contaminante viene degradato o trasformato in una forma meno tossica. Le zone reattive consentono all'acquifero di proseguire nel suo corso naturale, a differenza delle barriere reattive, non prevedono interventi di scavo. Esse vengono immediatamente poste a valle del punto della sorgente per intercettare il plume di contaminazione. Per quanto riguarda contaminazioni di metalli pesanti, il classico processo di pump and treat risulta proibitivo e altamente costoso; grazie all'utilizzo di zone reattive è possibile ottenere costi minori di installazione, mantenimento e esercizio mantenendo inalterata l'efficienza di riduzione (Suthersan et al., 1999).

Nel capitolo 2 sono stati trattati gli elementi principali responsabili della riduzione dello stato di ossidazione del Cr(VI), sono stati presentati il ferro zero valente, il ditionito, i substrati organici (siero di latte, melasso e alcoli) e i prodotti commerciali. Tutti questi elementi sono sostanze iniettabili nel terreno in quanto sono caratterizzate da bassa tossicità, bassa recalcitranza nonché non modificano la permeabilità dell'acquifero.

In Tab 3.2 sono riportati i principali chemicals/sostanze organiche e relative caratteristiche di iniettabilità.

Substrati	Modalità di iniezione	Fase di applicazione	Frequenza
Substrati solubili			
Metanolo, Etanolo, Benzoato di sodio	Pozzi di iniezione o sistemi di ricircolo	Diluito in acqua	Continuo per 1 mese
Lattato e Butirato	Pozzi di iniezione o sistemi di ricircolo	Acidi o sali diluiti in acqua	Continuo per 1 mese
Melasso, Sciroppo di fruttosio da mais	Pozzi d'iniezione	Dissolto in acqua	Continuo per 1 mese
Siero di latte	Iniezione diretta e pozzi d'iniezione	Dissolto in acqua o slurry	Da una volta al mese a una volta l'anno
Substrati a lento rilascio			
HRC o HRC-X	Iniezione diretta	Iniezione in pressione	Annualmente o biennialmente per HRC, ogni 3-4 anni per HRC-X
Oli vegetali	Iniezione diretta o pozzi d'iniezione	Iniezione in pressione di olio con acqua o tramite emulsione di olio (>20%) e acqua	Singola applicazione
Emulsioni di oli vegetali	Iniezione diretta o pozzi d'iniezione	Microemulsione sospesa in acqua di olio (>10%) e acqua	Tipicamente ogni 2-3 anni

Tab 3.2 - Sostanze organiche e relative caratteristiche di iniettabilità per la realizzazione di fronti reattivi (Y. T. He & Su, 2015)

I substrati solubili sono applicabili nella maggior parte dei siti ad esclusione di acquiferi aventi velocità di flusso maggiore di 30 cm/d o minore di 30 cm/anno (Y. T. He & Su, 2015). Queste sostanze solubili, applicate in soluzione acquosa, offrono, rispetto ad altri substrati, la migliore distribuzione uniforme nella matrice. Essi risultano semplici da maneggiare, mischiare e iniettare.

L'iniezione richiede un'accurata conoscenza dal punto di vista idrogeologico del sito in esame per determinare al meglio il posizionamento dei punti di iniezione, nonché intercettare il plume di contaminazione. In Tab 3.3 sono riportati i principali parametri geologici/idrogeologici e l'influenza che essi hanno sul layout impiantistico.

Parametro geologico/idrogeologico	Impatto sulla progettazione
Profondità della tavola freatica	Pozzi d'iniezione profondi
Larghezza del plume di contaminante	Numero di punti d'iniezione all'interno di un cluster
Profondità del plume di contaminante	Iniezione in pressione vs alimentazione a gravità
Velocità della falda	Rateo d'iniezione tempo di residenza dei reagenti e diluizione dei prodotti finali
Conducibilità idraulica (orizzontale e verticale)	Zona di miscelazione ed estensione della zona reattiva, numero dei punti di iniezione
Variazioni geologiche, stratigrafia e sedimenti nel suolo	Ubicazione dei punti d'iniezione
Porosità del suolo e distribuzione granulometrica	Rimozione dei prodotti finali

Tab 3.3 - Influenza dei parametri geologici e idrogeologici sulla progettazione degli interventi di iniezione (USEPA, 2000)

L'iniezione dei reattivi può avvenire attraverso due modalità: per gravità o in pressione (Fig 3.3). Il primo caso è realizzabile per trattare contaminazioni che interessano una zona poco profonda del terreno, il reagente espande il fronte reattivo per meccanismi diffusivi.

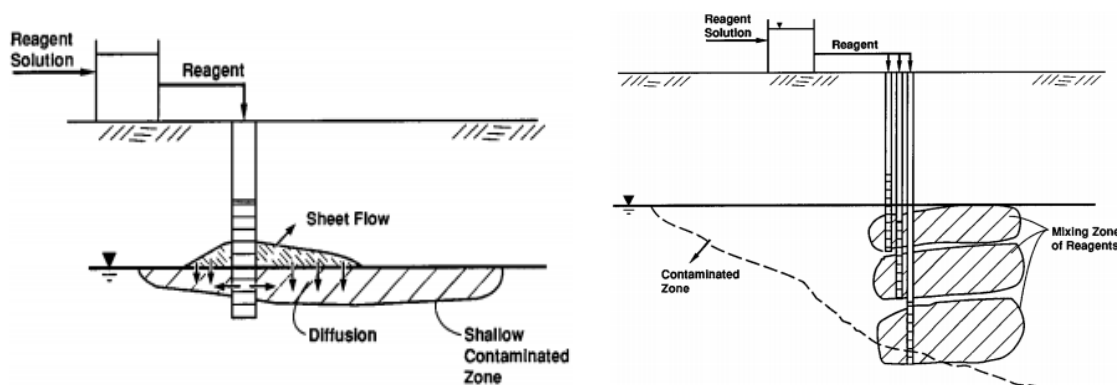


Fig 3.3 - Iniezione per gravità dei reagenti (sx) e iniezioni a più profondità (dx) (E. S. S. Suthersan, 1999)

Nel caso di iniezioni in pressione si possono raggiungere profondità più elevate e sono richiesti punti di iniezione a diverse profondità; a differenza dell'alimento a gravità si ha una minore diffusione del reagente in quanto la pressione impone una direzione preferenziale di movimento. Questo problema è ovviabile attraverso l'infitimento dei punti di iniezione con conseguente aumento dei costi. Quest'ultima configurazione per iniezione in pressione prende anche il nome di sistema direct push. Questa modalità è utilizzabile sia per substrati solubili che viscosi e risulta sempre applicabile, anche per la bonifica di

acquiferi poco profondi e non consolidati. Essa risulta l'unica tecnologia efficace in grado di iniettare substrati viscosi e a lento rilascio. L'applicabilità di questa tecnologia è funzione della dimensione dei grani e del grado di cementazione del terreno. Una delle macchine attualmente in commercio che utilizza questa tecnologia è il Geoprobe. La tecnologia Geoprobe (Fig 3.4) è in grado di operare a profondità massima pari a 10 m con una spinta idraulica prossima a 100 kN.



Fig 3.4 - Tecnologia Geoprobe

In particolari casi in cui la velocità darciana dell'acquifero è molto bassa è richiesta una configurazione impiantistica con ricircolo come mostrato in Fig 3.5.

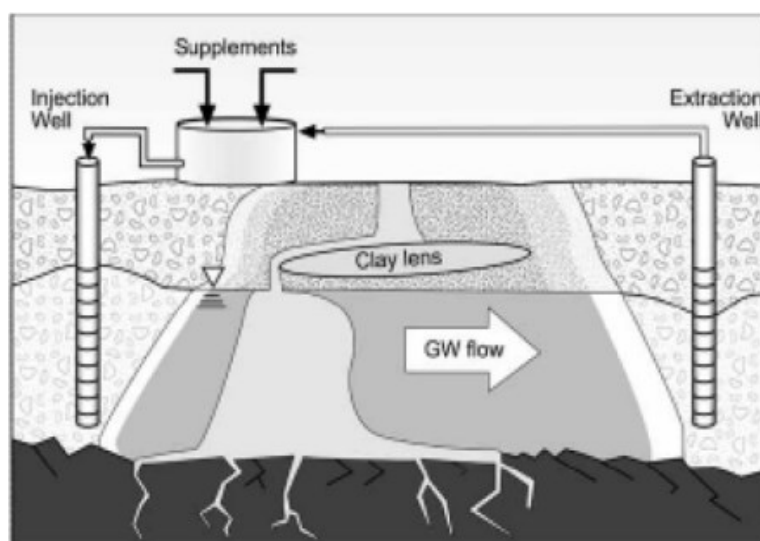


Fig 3.5 - Iniezione con ricircolo del reagente (Y. T. He & Su, 2015)

La distanza tra il punto di iniezione e recupero è funzione della velocità, della dimensione del plume e della cinetica di processo. Il dimensionamento è fatto in modo tale da poter controllare il trasporto del substrato nella zona di trattamento. Questo layout risulta il modo migliore per ottenere una buona distribuzione del substrato/reagente quando le condizioni naturali dell'acquifero stesso sono avverse. Un sistema di ricircolo consente di avere anche un controllo del tempo di ritenzione idraulico.

Un test a scala pilota condotto nel 1997 nel Midwestern (USA) ha valutato la possibilità di rimuovere il convenzionale impianto di pump and treat con delle zone reattive alimentate a melasso. Il test è stato condotto per sei mesi utilizzando tre punti di iniezione e cinque punti di monitoraggio per controllare il buon avvenimento del processo di bonifica.

La concentrazione di melasse utilizzata è di 200:1 in volume, per promuovere l'attività biologica ed innescare quindi la precipitazione del Cr(III). Mediamente sono stati introdotti 150 L ogni due settimane ottenendo una notevole riduzione delle concentrazioni del cromo esavalente da 15 mg/L a 0,05 mg/L (USEPA, 2000).

Un caso di studio condotto da Ludwig et al. nel 2007 ha indagato la riduzione del cromo esavalente in una zona industriale tramite l'iniezione di solfato ferroso (FeSO_4) e 0,2 M di sodio ditionito. L'acquifero in esame è caratterizzato da sabbia e risulta non confinato; le concentrazioni iniziali di Cr(VI) sono comprese tra 4 e 8 mg/L e, a seguito di un trascorso di 1020 giorni, si sono raggiunte concentrazioni pari a 0,015 mg/L. I due punti di iniezione sono stati realizzati per mezzo di un sistema direct push ad una profondità compresa tra i 3-5 m dal piano campagna.

Per una visione completa ed esauriente del sistema ad iniezione vengono di seguito riportati alcune criticità descritte da USEPA (2000):

- Nel trattamento dei metalli questi non vengono rimossi, ma solamente posti in uno stato ossidativo inerte nei confronti dell'acqua. Anche nel caso del cromo, i precipitati del cromo trivalente non vengono rimossi.
- Si ha una limitazione nel controllo idraulico
- Possibili cortocircuiti idraulici che impediscono di portare a termine il trattamento
- Rimuovono solo il plume di contaminazione e non la sorgente

3.3 INIEZIONE DI GAS RIDUCENTI

Il sistema prevede l'insufflaggio di gas tecnici, in particolare di idrogeno gassoso in corrente di azoto per la riduzione del cromo esavalente in trivalente (Sapio, n.d.). Sul sito di interesse vengono realizzati due sistemi: il primo per lo stoccaggio dell'azoto e il secondo per la produzione in situ di idrogeno su richiesta. Per quanto riguarda l'azoto viene stoccato allo stato liquido in un serbatoio criogenico che consente l'erogazione del gas ad una pressione compresa tra 4-13 bar; tale dispositivo è completamente controllato elettronicamente in modo da mantenere l'impianto in sicurezza.

Per quanto riguarda l'idrogeno, esso viene generato attraverso l'elettrolisi di acqua demineralizzata ottenendo una miscela di gas pura al 99%. La macchina è automatizzata e non prevede l'accumulo di H₂ in modo da evitare il rischio di esplosioni. I due gas, prima di essere iniettati nel terreno, vengono miscelati mantenendo inalterato nel tempo la concentrazione di idrogeno al variare della richiesta di portata. Il trattamento prevede l'immissione controllata della miscela reagente per generare condizioni riducenti nel terreno. Tale miscela è iniettata sottoforma di microbolle tramite un sistema simile all'airsparging. Vengono quindi realizzate nel terreno, in funzione delle caratteristiche del plume da contaminare, una batteria di aste cave poste nel terreno mediante perforazioni realizzate con direct push alle quali viene collegato il sistema di iniezione (Fig 3.6).



Fig 3.6 - Iniezione di idrogeno in corrente di azoto per la creazione di condizioni riducenti in falda. Modificata da (Danish Enviromental Protection Agency, 2002)

I punti d'insufflaggio sono distribuiti intorno al nucleo della contaminazione; la posizione dei punti di iniezione viene determinata in funzione di test pilota e studi sulle dinamiche sito specifiche di interazione tra inquinante e gas. Un esempio tipico di layout con il quale

viene affrontata una bonifica è rappresentato in Fig 3.7; i punti di iniezione e monitoraggio sono di norma posti su ideali circonferenze concentriche in modo tale da studiare in maniera uniforme e dinamico l'evoluzione della bonifica.

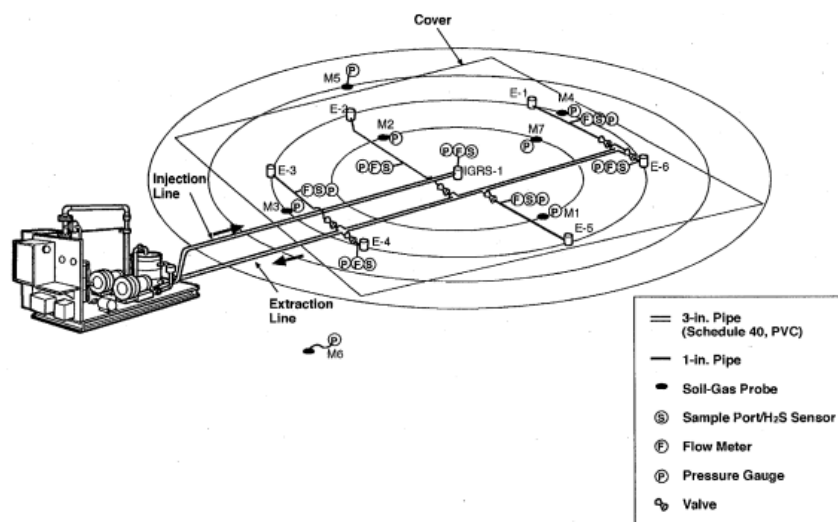


Fig 3.7 - Layout del sistema di iniezione di gas riducenti nel suolo, esso consta di punti di iniezione e di monitoraggio (Edward C Thornton & Amonette, 1999)

Di seguito (Tab 3.4 - Parametri caratteristici di un impianto ad idrogeno Sapiro) alcune caratteristiche dell'impianto Sapiro (Cecchinato, 2013).

<i>Portata massima</i>	10 m ³ /h
<i>Pressione massima</i>	6 bar
<i>Purezza gas</i>	99,5%
<i>Potenza assorbita</i>	55kw
<i>Consumo acqua distillata</i>	8,4 l/h
<i>Portata acqua di raffreddamento</i>	1,7 m ³ /h

Tab 3.4 - Parametri caratteristici di un impianto ad idrogeno Sapiro

L'utilizzo di questa tecnologia di bonifica comporta l'assunto che le strutture in superficie siano inserite in un ambiente in grado di rendere disponibile all'utilizzo le quantità di gas sufficienti all'applicazione.

SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questa tesi è valutare la possibilità di riduzione del cromo esavalente alla sua forma trivalente, meno tossica, tramite la creazione di un ambiente anaerobico in acquifero saturo mediante l'iniezione di substrati carboniosi. L'approccio si colloca in una posizione innovativa nel panorama delle soluzioni di biorimediazione, con prospettive interessanti in termini di ridotti costi e impatti ambientali complessivi.

E' stata condotta una ricerca bibliografica iniziale per selezionare possibili substrati con idonee caratteristiche di iniettabilità, biodegradabilità e non tossicità.

Per la riproduzione di sistemi naturali in laboratorio, sono stati allestiti microcosmi batch artificialmente contaminati da cromo esavalente tramite aggiunta di bicromato di potassio, in differenti concentrazioni (5 – 10 mg Cr(VI)/L).

I substrati addizionati sono provenienti dagli scarti dell'industria alimentare, quali permeato di siero di latte ad una concentrazione di 5mL/L e una matrice proveniente dal processo di birrificazione per ottenere un valore di COD prossimo a 300 mgCOD/L. Questi valori sono il risultato di uno studio effettuato per minimizzare il quantitativo di substrato stesso consentendo comunque il completo consumo degli accettori degli elettroni (dall'ossigeno ai solfati).

Per la valutazione dell'applicabilità dell'intervento in diverse condizioni ambientali, sono state indagate due differenti matrici solide, di differente origine e composizione (sabbia e terreno da acquifero). Si sono allestite inizialmente prove preliminari per indagare l'applicabilità di questa tecnologia innovativa. Tali prove sono state quindi condotte ad una temperatura di 25 ± 2 °C in modo tale da accelerare il processo di consumo dei vari accettori di elettroni degli ambienti aerobico e anossico. Ulteriori prove preliminari sono state effettuate additivando Fe(II) analizzandone l'influenza sui meccanismi di abbattimento del contaminante. A questo scopo si sono rese necessarie delle valutazioni di rilascio naturale da parte della matrice solida di ferro bivalente e manganese valutandone anche la possibile riossidazione. Tutte queste prove sono servite per allestire in maniera più mirata le successive destinate alla cinetica di rimozione del cromo esavalente. Queste ultime sono state condotte ad una temperatura controllata di 17 ± 1 °C, per simulare al meglio le condizioni di falda

4 PROVE DI ABBATTIMENTO DEL Cr(VI)

4.1 MATERIALI

4.1.1 ACQUA DI RETE

Per quanto riguarda la matrice liquida da utilizzare nelle prove in microcosmo la scelta è ricaduta sull'acqua di rete; questo viene giustificato dal fatto che si vuole attribuire un'ampia replicabilità alla sperimentazione. Si è effettuato tuttavia un confronto con le caratteristiche di un'acqua di prima falda di Milano (Tab 4.1), con la quale non si evidenziano marcate differenze.

PARAMETRO	Unità di misura	Acqua di rete	Acqua di falda	Metodica parametro
pH	Unità pH @ 20°C	7	7,2	APAT – IRSA 2060, 2003
Conducibilità	µS/cm @ 20°C	590	615	APAT – IRSA 2030, 2003
Alcalinità	mgCaCO ₃ /l	283	280	SM 2320 mod. in DIIAR/POP.98.401 Agg0
Calcio (ICP-MS)	mg/l	88	99	UNI EN ISO 17294 – 1 2007 e 17294 – 2 2005
Magnesio (ICP-MS)	mg/l	25	17	UNI EN ISO 17294 – 1 2007 e 17294 – 2 2005
Sodio (ICP-MS)	mg/l	17	30	UNI EN ISO 17294 – 1 2007 e 17294 – 2 2005
Potassio (ICP-MS)	mg/l	1,9	3,3	UNI EN ISO 17294 – 1 2007 e 17294 – 2 2005
Azoto totale (k)	mgN/l	10	9,5	MU 201, 2006
Cloruri (IC)	mg/l	30	36	ISO 10304 – 1, 1999
Nitrati (IC)	mg/l	37	34	APAT IRSA CNR 4020 Man 29/2003
Solfati (IC)	mg/l	49	66	APAT IRSA CNR 4020 Man 29/2003
Fosfati (k)	mg _P /l	0,13	0,4	MU 201, 2006
Litio (ICP-MS)	mg/l	<0,1	<0,1	UNI EN ISO 17294 – 1 2007 e 17294 – 2 2005

Tab 4.1 - Caratteristiche dell'acqua di rete e dell'acqua di prima falda milanese (zona Bovisa - Milano)

4.1.2 CARATTERIZZAZIONE DEI TERRENI

Si sono indagate le proprietà chimico-fisiche di una matrice sabbiosa proveniente dall'area del Ticino e di un terreno estratto, tramite carotaggio, da un tipico acquifero milanese. Nel testo, per agevolare la lettura, si parlerà di “Sabbia” e “Terreno d'acquifero”. I due terreni sono stati scelti con caratteristiche evidentemente differenti per osservare eventuali differenze nelle prove batch oggetto del seguente elaborato. Per la completa caratterizzazione della matrici, sono stati determinati i seguenti parametri, con il relativo metodo:

- **umidità** (ASTM D 2216-05. *Standard Test Method for Laboratory Determination of Water (Moisture) Content of Soil and Rock by Mass*)
- **frazione di carbonio organico** (UNI EN 15169:2007. *Caratterizzazione dei rifiuti – Determinazione della perdita al fuoco in rifiuti, fanghi e sedimenti. NOTA: il metodo è relativo alla sola perdita in peso da solidi volatili*)
- **distribuzione granulometrica** (ISO 11277:2009. *Soil quality – Determination of particle size distribution in mineral soil material – Method by sieving and sedimentation*)
- **densità apparente del terreno secco** (ISO 11272:1998. *Soil quality – Determination of dry bulk density*)
- **porosità** (metodo riportato in: Scesi L., Papini M. (1997). *Il rilevamento geologico-tecnico*. Città Studi Edizioni.)
- **pH** (Metodo III.1 (*Determinazione del grado di reazione – pH*) riportato nell'Allegato 1 del Decreto Ministeriale 13/09/1999 “Approvazione dei Metodi ufficiali di analisi chimica del suolo” (Gazz. Uff. Suppl. Ordin.n° 248 del 21/10/1999), come modificato dal D.M. 25 marzo 2002, “Rettifiche al decreto ministeriale 13 settembre 1999 riguardante l'approvazione dei metodi ufficiali di analisi chimica del suolo” (Gazz. Uff. n° 84 del 10 Aprile 2002).)

In Tab 4.2 vengono riportati a confronto i risultati emersi dalla fase di caratterizzazione (Allegato B).

Parametro	N° Replicati	Sabbia	Terreno d'acquifero
Umidità [g _{H2O} /g _{ss}]	5	6,5	9,1
Frazione di carbonio organico [%]	3	0,27	0,59
Distribuzione granulometrica	3	Sabbia	Sabbia con ghiaia debolmente limosa
Densità apparente su secco [kg/m ³]	3	1478±22	1606±63
Porosità [-]	3	0,39±0,02	0,29±0,02
pH [-]	3	8,5±0,1	8,52±0,01
Conta batterica [UFC/100mL]	-	10	10 ⁴

Tab 4.2 - Caratteristiche dei due terreni usati nella sperimentazione

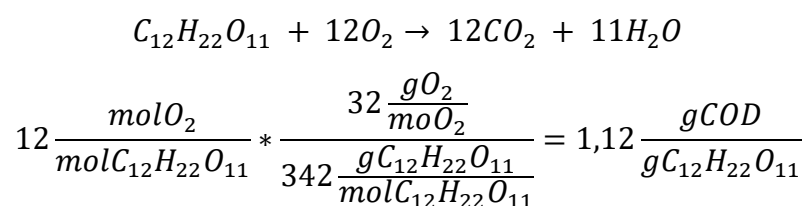
Dai dati raccolti in tabella emerge che:

- nel terreno di acquifero risulta essere presente una frazione di carbonio organico più del doppio di quella nella sabbia; entrambi i terreni, secondo classificazione Agenzia Regionale per la Prevenzione e protezione Ambientale del Veneto (ARPAV), risultano scarsi di sostanza organica.
- l'analisi granulometrica conferma la classe di appartenenza granulometrica della sabbia, mentre classifica il terreno d'acquifero come sabbia con ghiaia debolmente limosa. La seconda matrice è caratterizzata da una maggiore compattezza fornita dalla frazione percentuale, seppure in quantità non elevata, di materiale di dimensione granulometrica inferiore quali colloid, argille e limo.
- la densità del terreno di acquifero è maggiore rispetto alla matrice sabbia. Questo dato presuppone una quantità di terreno d'acquifero inserita nei microcosmi, a parità di rapporto solido volume, inferiore rispetto agli analoghi allestimenti con sabbia.
- il valore di porosità medio della sabbia risulta essere il 30% superiore a quello del terreno d'acquifero;
- entrambi i terreni, essendo alcalini, potrebbero influenzare il pH della matrice liquida durante lo svolgimento delle prove; l'entità della variazione del pH del microcosmo è anche funzione della capacità tampone dell'acqua stessa;
- i risultati della conta batterica risultano non correlati al valore di foc trovato, questo perché i batteri pur essendo in numero sufficiente per avviare una degradazione biologica, non danno contributo ingente in termini di peso.

4.1.3 SUBSTRATI

4.1.3.1 PERMEATO DI SIERO DI LATTE

Sono state eseguite delle valutazioni teoriche e delle analisi di laboratorio che hanno reso possibile la caratterizzazione del permeato di siero di latte. Dalle analisi di laboratorio mediante kit si evince che il valore di COD si attesta essere 59,7 mgCOD/L. Assumendo che lo zucchero maggiormente presente all'interno di tale composto sia il lattosio:



Con tale valore è possibile ricavare la concentrazione di lattosio all'interno del permeato di siero di latte utilizzato in seguito per il calcolo delle dosi di substrato. Esso è calcolato come segue:

$$\frac{59,7 \frac{g COD}{L_{Siero}}}{1,12 \frac{g COD}{g C_{12}H_{22}O_{11}}} = 53,2 \frac{g C_{12}H_{22}O_{11}}{L_{Siero}}$$

Si è eseguita un'analisi dell'azoto totale presente, risultato di 180 mgN/L. Questa informazione è utile per valutare l'eventuale formazione di ammoniaca come conseguenza diretta dell'attività biologica nei microcosmi.

Un'aliquota di tale substrato è stata anche inviata al laboratorio microbiologico dell'università Milano Bicocca per la conta batterica. L'analisi del campione ha rivelato la presenza di un numero di unità formanti colonie dell'ordine di 10^6 UFC/100 mL.

4.1.3.2 SCARTO DA BIRRA

Il substrato è stato gentilmente fornito da un birrificio artigianale locale il quale, a differenza della birrificazione industriale, non possiede la strumentazione necessaria a fornire una composizione di tale sottoprodotto. Si presume che le componenti principali

siano identificabili in lieviti in elevata concentrazione, sostanza organica attiva e deceduta nonché un inevitabile frazione di etanolo.

Si è quindi proceduto a commissionare un'analisi di COD al laboratorio. Ne è risultata una concentrazione pari a 121,8 gCOD/L_{birra}. Poiché si ipotizza la presenza non trascurabile di proteine e per indagare la possibile formazione di azoto in seguito all'attività sperimentale, si è effettuato un ulteriore test riguardante la valutazione dell'azoto totale; l'analisi ha restituito un valore pari a 1810 mgN/L.

Anche per questo substrato è stata effettuata la conta batterica, che ha messo a luce un contenuto di 10³ UFC/100 mL; questo dato è rappresentativo esclusivamente dei soli batteri presenti nel substrato, in quanto il metodo analitico utilizzato non è funzionale per il rilevamento di lieviti.

4.1.3.3 MELASSO

Lo zuccherificio che ha offerto il substrato per questa sperimentazione ha anche gentilmente fornito una caratterizzazione di massima del melasso. In Tab 4.3 è riportata la composizione percentuale di tale matrice:

Componente	Percentuale
Acqua	20% massa
Zuccheri semplici (saccarosio)	63% secco
Composti inorganici (ceneri)	16% secco
Composti azotati (betaina, PCA, aminoacidi, proteine ecc.)	15% secco
Acidi organici non azotati (lattico, malico, citrico acetico ecc.)	5% secco
Altro (polisaccaridi ecc.)	1% secco

Tab 4.3 - Composizione media del melasso da barbabietola

Si sono eseguite, anche in questo caso, analisi per la determinazione del COD reale (da kit) e dell'azoto totale. I risultati ottenuti sono elencati di seguito:

- COD: 0,39 gCOD/L → 0,8 gO₂/g_{melasso}
- N totale: 20 mg/L → 41,5 mgN/g_{melasso}

La conta batteriologica, effettuata anche per questo substrato, ha evidenziato un numero di microrganismi pari a circa 10⁴ UFC/100mL.

4.2 METODI

4.2.1 CALCOLO DEI DOSAGGI

Per consentire al microcosmo di raggiungere le condizioni riducenti idonee a trasformare il Cr(VI) nella sua forma meno tossica Cr(III), è necessario stimare il quantitativo di substrato organico da iniettare. I processi metabolici dei microrganismi presenti nella matrice, consumando il carbonio organico additivato, consumano ossigeno e altri accettori di elettroni, portando il sistema in condizioni riducenti. In Tab 4.4 sono elencati i principali accettori di elettroni in ordine di consumo.

Tempo					
O ₂	NO ³⁻	SO ₄ ²⁻	Mn(IV)	Fe(III)	CO ₂
Aerobico	Anossico		Anaerobico		Metanogenesi

Tab 4.4 - Andamento relativo al consumo di accettori degli elettroni in fase liquida

La prima fase di consumo di accettori di elettroni coinvolge completamente l'ossigeno molecolare, in parte disciolto e in parte contenuto nello spazio di testa della bottiglia contenente il microcosmo. Una volta consumato l'ossigeno prontamente disponibile, si attiva un meccanismo di consumo dell'ossigeno legato, in particolare si osserva il consumo di nitrati e solfati. Il sistema vira da condizioni anossiche a condizioni anaerobiche quando viene esaurito tutto l'ossigeno sia molecolare che legato; a seguito di questo viraggio vi è la reazione con Mn(IV) e Fe(III) i quali sono agenti fortemente ossidanti. L'ultimo accettore che partecipa al processo è la CO₂ la quale è utilizzata da una flora batterica di microrganismi metanigeni. Il calcolo per la stima del dosaggio di siero di latte e melasso è stato eseguito sulla base degli studi di Henry (2010). Nel Final Report sono proposte tre metodologie di calcolo.

- 1) **Idrogeno potenziale come prodotto di reazioni di fermentazione:** tale metodologia considera le reazioni di fermentazione dei principi attivi contenuti nel siero di latte e melasso e ne calcola, basandosi sui pesi molecolari, la produzione stechiometrica di idrogeno
- 2) **Idrogeno potenziale formato da completa ossidazione:** viene calcolata la produzione di idrogeno dal composto a partire dalla completa ossidazione in acqua del principio attivo del composto. Confrontando la completa ossidazione con le

reazioni di fermentazione, si può assumere che approssimativamente 1/3 dell'idrogeno potenziale prodotto dall'ossidazione (mineralizzazione) è disponibile come idrogeno molecolare. Risulta un metodo più semplificato in quanto non implica reazioni di fermentazione di substrati complessi.

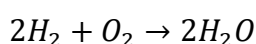
- 3) **Potenziale idrogeno come rapporto (percentuale) tra la massa dell'idrogeno prodotto e la somma delle masse molecolari dei substrati consumati:** è il metodo usato dai produttori dei substrati complessi per fornire una stima del consumo di tali reagenti. Risulta il metodo più completo in quanto produce risultati meno sottostimati rispetto ai due metodi proposti precedentemente.

Per l'applicazione di tutti e tre i metodi è fondamentale conoscere la concentrazione di accettori di elettroni presenti in acqua nonché le loro reazioni di consumo dovute all'idrogeno come elettro-donatore. Si sono a questo scopo analizzati i principali accettori di elettroni rappresentativi dell'acqua di falda, i quali vengono coinvolti direttamente nella degradazione del substrato stesso. In Tab 4.5 sono riportate le concentrazioni di ossigeno, nitrati, solfati, manganese, ferro e anidride carbonica.

Accettore di elettroni	Concentrazione [mg/L]	Riferimenti
Ossigeno	6,45	Analisi mix EP7 + EP8
Nitrati	34	Analisi mix EP7 + EP8
Solfati	66	Analisi mix EP7 + EP8
Manganese (IV)	0,3	MM S.p.A
Ferro (III)	0,1	MM S.p.A
Anidride carbonica	15	Valore di concentrazione a saturazione a 20°C

Tab 4.5 - Concentrazione degli accettori degli elettroni costituenti l'acqua utilizzata per la realizzazione dei microcosmi

Si procede quindi al calcolo della concentrazione di idrogeno necessaria al completo consumo di tutte le specie riportate in Tab 4.6. Viene riportato a titolo di esempio il procedimento di calcolo effettuato per l'ossigeno. La reazione rappresenta il consumo dell'ossigeno da parte dell'idrogeno:



Avendo a disposizione 6,45 mgO₂/L si ottiene, come segue, il quantitativo di idrogeno necessario per estinguerlo completamente:

$$\frac{6,45 \frac{mgO_2}{L}}{32 \frac{mgO_2}{mmolO_2}} * 2 \frac{mmolH_2}{mmolO_2} * 2,016 \frac{mgH_2}{mmolH_2} = 0,8127 \frac{mgH_2}{L}$$

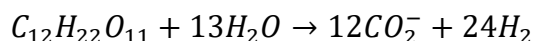
Analogamente viene effettuata la stessa operazione per tutti gli altri accettori, le reazioni e i consumi relativi di idrogeno molecolare sono elencati in Tab 4.6:

Accettore di elettroni	Reazione di consumo H ₂	H ₂ richiesto [mgH ₂ /L]
Ossigeno	$2H_2 + O_2 \rightarrow 2H_2O$	0,8127
Nitrati	$2H^+ + 5H_2 + 2NO_3^- \rightarrow N_2 + 6H_2O$	2,7639
Solfati	$4H_2 + H^+ + SO_4^{2-} \rightarrow HS^- + 4H_2O$	5,5440
Manganese	$2H^+ + H_2 + MnO_2 \rightarrow Mn^{2+} + 2H_2O$	0,0110
Ferro	$4H^+ + H_2 + 2FeOOH \rightarrow 2Fe^{2+} + 4H_2O$	0,0018
Anidride carbonica	$4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$	2,7491

Tab 4.6 - Quantitativo di idrogeno molecolare necessario al completo consumo dell'accettore di elettroni

METODO 1

Il metodo prevede di ossidare completamente in acqua il principio attivo del substrato iniettato. Per i calcoli riguardanti il siero di latte e melasso viene fatto riferimento rispettivamente al solo lattosio e saccarosio contenuti in essi; entrambi sono caratterizzati dalla medesima formula bruta C₁₂H₂₂O₁₁. Di seguito vengono riportati, insieme alle reazioni di ossidazione, i passaggi svolti al fine di ottenere un rapporto di idrogeno molecolare prodotto per unità di lattosio/saccarosio.



Risulta quindi:

$$\frac{24 \text{ mol}H_2 * 2,016 \frac{gH_2}{molH_2}}{1 \text{ mol}C_{12}H_{22}O_{11} * 342 \frac{gC_{12}H_{22}O_{11}}{molC_{12}H_{22}O_{11}}} = 0,141 \frac{gH_2}{gC_{12}H_{22}O_{11}}$$

Noti i coefficienti di consumo di idrogeno (Tab 4.6) è possibile ricavare la concentrazione in massa di substrato da additivare per consumare tutti gli accettori di elettroni presenti nel sistema. Ad esempio per il consumo dell'ossigeno ne segue:

$$0,8127 \frac{mgH_2}{L} * \frac{1}{0,141} \frac{mgC_{12}H_{22}O_{11}}{mgH_2} = 5,7638 \frac{mgC_{12}H_{22}O_{11}}{L}$$

Vengono riportati in Tab 4.7 i valori di concentrazione validi per entrambi i substrati da dosare:

Accettore di elettroni	H ₂ richiesto [mgH ₂ /L]	H ₂ prodotto per unità di lattosio/saccarosio [mgH ₂ /mgC ₁₂ H ₂₂ O ₁₁]	Concentrazione di C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ da dosare [mgC ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ /L]
Ossigeno	0,813	0,141	5,764
Nitrati	2,764	0,141	19,602
Solfati	5,544	0,141	39,319
Manganese	0,011	0,141	0,078
Ferro	0,002	0,141	0,013
Anidride carbonica	2,749	0,141	19,497

Tab 4.7- METODO 1: Idrogeno prodotto da ogni unità della molecola di riferimento e concentrazione di principio attivo da dosare per il completo consumo dell'accettore di elettroni

Sommando tutti i valori di concentrazione da dosare ottenuti si ottiene 84,27 mgC₁₂H₂₂O₁₁/L. Poiché vengono dosati siero di latte e melasso, si è riferita tale concentrazione alla matrice del substrato di partenza. Per quanta riguarda il siero di latte si ottiene:

$$84,27 \frac{mgC_{12}H_{22}O_{11}}{L} * \frac{1}{53216} \frac{L_{siero}}{mgC_{12}H_{22}O_{11}} = 0,00158 \frac{L_{siero}}{L} = 1,584 \frac{mL_{siero}}{L}$$

Per il melasso da barbabietola ne risulta invece:

$$84,27 \frac{mgC_{12}H_{22}O_{11}}{L} * \frac{1}{0,8} \frac{mg_{melasso}}{mg_{melasso,secco}} * \frac{1}{0,63} \frac{mg_{melasso,secco}}{mgC_{12}H_{22}O_{11}} = 167,208 \frac{mg_{melasso}}{L}$$

METODO 2

Come precedentemente indicato, tale metodo confronta le reazioni di fermentazione con quelle di ossidazione e impone di assumere che solo 1/3 dell'idrogeno potenzialmente

prodotto sia disponibile in forma molecolare. Poiché le reazioni e l'H₂ richiesto per il consumo completo degli accettori degli elettroni sono analoghe alla metodologia di calcolo 1, vengono riportati solamente i risultati in Tab 4.8.

Accettore di elettroni	H ₂ richiesto [mgH ₂ /L]	H ₂ prodotto per unità di lattosio/saccarosio [mgH ₂ /mgC ₁₂ H ₂₂ O ₁₁]	Concentrazione di C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ da dosare [mgC ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ /L]
Ossigeno	0,813	0,047	17,29
Nitrati	2,764	0,047	58,81
Solfati	5,544	0,047	117,96
Manganese	0,011	0,047	0,24
Ferro	0,002	0,047	0,04
Anidride carbonica	2,749	0,047	58,49

Tab 4.8 - METODO 2: idrogeno prodotto da ogni unità della molecola di riferimento e concentrazione di principio attivo da dosare per il completo consumo dell'accettore di elettroni

La concentrazione da dosare, ottenuta come precedentemente visto nel metodo 1, risulta 252,82 mgC₁₂H₂₂O₁₁/L. Riferendosi alle dosi di siero di latte e melasso si ottiene rispettivamente una concentrazione pari a: 4,75 mL_{siero}/L e 501,63 mg_{molasso}/L.

METODO 3

Per calcolare la produzione specifica di idrogeno per unità di substrato si deve considerare il numero di moli di idrogeno molecolare potenzialmente rilasciato dal principio attivo del substrato complesso. In Tab 4.9 viene riportato i substrati utilizzati, con relativi principi attivi nonché il range di potenziale rilascio di idrogeno

Substrato	Principio attivo	Formula bruta	Range rilascio H ₂ molecolare	Valore imposto di H ₂
Permeato di siero di latte	Lattosio	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	11	11
Melasso	Saccarosio	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	8÷11	8

Tab 4.9 - METODO 3: idrogeno ipoteticamente rilasciato dalla molecola di principio attivo

Il valore di idrogeno specifico prodotto, relativo al lattosio e al saccarosio, è calcolabile tramite le seguenti formule:

$$\frac{11 \text{ molH}_2}{\text{molC}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}} * \frac{2,016 \frac{\text{gH}_2}{\text{molH}_2}}{342 \frac{\text{gC}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}}{\text{molC}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}}} = 0,0648 \frac{\text{gH}_2}{\text{gC}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}}$$

$$\frac{8 \text{ molH}_2}{\text{molC}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}} * \frac{2,016 \frac{\text{gH}_2}{\text{molH}_2}}{342 \frac{\text{gC}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}}{\text{molC}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}}} = 0,0471 \frac{\text{gH}_2}{\text{gC}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}}$$

Vengono riportate le tabelle relative al calcolo del consumo degli accettori degli elettroni dei due principi attivi: lattosio (Tab 4.10) e saccarosio (Tab 4.11):

Accettore di elettroni	H ₂ richiesto [mgH ₂ /L]	H ₂ prodotto per unità di lattosio [mgH ₂ /mgC ₁₂ H ₂₂ O ₁₁]	Concentrazione di C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ da dosare [mgC ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ /L]
Ossigeno	0,813	0,065	12,54
Nitrati	2,764	0,065	42,65
Solfati	5,544	0,065	85,56
Manganese	0,011	0,065	0,17
Ferro	0,002	0,065	0,03
Anidride carbonica	2,749	0,065	42,42

Tab 4.10 - METODO 3: idrogeno prodotto da ogni unità della molecola di riferimento e concentrazione di lattosio da dosare per il completo consumo dell'accettore di elettroni

Accettore di elettroni	H ₂ richiesto [mgH ₂ /L]	H ₂ prodotto per unità di saccarosio [mgH ₂ /mgC ₁₂ H ₂₂ O ₁₁]	Concentrazione di C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ da dosare [mgC ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ /L]
Ossigeno	0,813	0,047	17,25
Nitrati	2,764	0,047	58,68
Solfati	5,544	0,047	117,71
Manganese	0,011	0,047	0,23
Ferro	0,002	0,047	0,04
Anidride carbonica	2,749	0,047	58,37

Tab 4.11 - METODO 3: idrogeno prodotto da ogni unità della molecola di riferimento e concentrazione di saccarosio da dosare per il completo consumo dell'accettore di elettroni

Riferendo i risultati alla matrice complessa si ottiene un dosaggio pari a 3,45 mL_{siero}/L e 500,56 mg_{melasso}/L.

Per il dosaggio dei substrati complessi, si è fatto in prima battuta riferimento al metodo 3, in quanto è il metodo utilizzato dai produttori di substrati a marchio registrato. Ricordando che il principio attivo costituisce il 35% del permeato di siero e il 63% sul peso secco del

melasso, si è deciso di aumentare la concentrazione del siero del 25% lasciando invariata quella del melasso in modo tale da ottenere valori di dosaggi superiori ai quantitativi restiuti da tutti i tre metodi.

I valori da dosare risulterebbero quindi $5 \text{ mL}_{\text{siero}}/\text{L}$ e $500 \text{ mg}_{\text{melasso}}/\text{L}$. In realtà, il melasso da barbabietola non è stato utilizzato nella sperimentazione in quanto, come dimostrato dalle prove d'interferenza (Allegato C), esso interferisce con l'analisi mediante spettrofotometro impedendo una corretta lettura del contaminante cercato.

Per quanto riguarda lo scarto da birrificio, avendo una composizione complessa e non nota, si è deciso di assumere una concentrazione che fornisca in soluzione lo stesso valore di COD ottenuto con il siero di latte. La concentrazione di COD desiderata è ottenibile come segue:

$$5 \frac{\text{mL}_{\text{siero}}}{\text{L}} * 59,7 \frac{\text{mgCOD}}{\text{mL}_{\text{siero}}} = 298,5 \frac{\text{mgCOD}}{\text{L}}$$

A cui corrisponde un volume di scarto da birrificazione da dosare pari a:

$$\frac{298,5 \frac{\text{mgCOD}}{\text{L}}}{121800 \frac{\text{mgCOD}}{\text{L}_{\text{birra}}}} = 2,45 \frac{\text{mL}_{\text{birra}}}{\text{L}}$$

4.2.2 ALLESTIMENTO DEI TEST IN MICROCOSMO

Per lo studio dell'attività di rimozione del Cr(VI) si sono creati ambienti controllati: i microcosmi. Essi, a differenza della falda, riproducono una condizione batch del sistema e sono composti da una matrice solida e una acquosa cui viene aggiunto il substrato e il contaminante. L'utilizzo di un sistema chiuso comporta un dosaggio ridotto di substrato, in quanto non vi è trasporto. La realizzazione di tali sistemi avviene per mezzo di bottiglie a tre colli in vetro con volume pari a circa 1,25 L ciascuna. Le bottiglie sono realizzate con un materiale che conferisce la resistenza a trattamento di autoclavatura e sono munite di particolari tappi in grado di ospitare diversi tipi di sonde analitiche.

I parametri fondamentali del microcosmo da monitorare sono: il potenziale redox, l'ossigeno disciolto, la temperatura e il pH. Per il monitoraggio dei primi tre parametri si è ricorso all'utilizzo del sistema automatico MARTINA. Il Multiple Analysis

pRogrammable TItratioN Analyser è un analizzatore multiparametrico da laboratorio, realizzato specificatamente per l'esecuzione di test biologici, il quale esegue monitoraggi degli stessi in maniera continuativa nel tempo. L'analizzatore consente il collegamento in contemporanea di 8 sonde:

- 4 sonde redox per la misura del potenziale
- 2 ossimetri per la rilevazione della concentrazione dell'ossigeno disciolto
- 2 sonde PT100 per la misura della temperatura

Per quanto riguarda la misura del pH, poiché non si attendono variazioni significative, si procede misurandolo puntualmente al momento dell'allestimento e ogni qualvolta viene fatto un campionamento e relativa analisi. La procedura completa dell'allestimento e della gestione delle prove in microcosmo (descritte nel Capitolo 4.2.2.5) è frutto di esperienza pregressa acquisita da numerose sperimentazioni preliminari, che hanno messo in luce problemi e limitazioni superate apportando le opportune migliorie.

4.2.2.1 PROVE PRELIMINARI CON SABBIA

I primi test sono stati preparati utilizzando come matrice solida la sabbia, in rapporto con acqua pari al 25% in peso. Le prove sono state condotte per tutta la loro durata a una temperatura media superiore a quella di falda e prossima a 25 ± 2 °C. In queste condizioni, se da un lato viene sfavorita la sedimentazione dei precipitati di Cr(III), dall'altro vengono accelerati i processi biologici di consumo dell'ossigeno da parte della popolazione eterotrofa. Poiché l'obiettivo è portare il sistema in condizioni riducenti (anaerobiche), si è provveduto alla chiusura della bottiglia. Per ognuna delle bottiglie a tre colli in vetro si sono realizzati alcuni replicati in bottigliette in plastica, di volume pari a 250 mL ognuna. I replicati sono stati allestiti con caratteristiche analoghe alla rispettiva bottiglia in vetro; su di essi si è effettuato un campionamento periodico per monitorare la concentrazione di Cr(VI). Il campionamento della bottiglietta ha comportato la dismissione del microcosmo. In questo modo la bottiglia a tre colli ha assunto il ruolo di campione rappresentativo per l'analisi in continuo dei parametri chimico-fisici precedentemente elencati, mentre i replicati hanno svolto ruolo esclusivamente da campioni per l'analisi del Cr(VI). Lo smantellamento progressivo dei microcosmi replicati per le analisi è stato effettuato a tempi pianificati, previo raggiungimento di valori di ORP negativi indicati dalla sonda collegata al MARTINA. Si sono studiate due differenti concentrazioni iniziali di contaminante, 5000

e 10000 µg/L con differenti substrati. In Tab 4.12 vengono riportate le specifiche utilizzate per ciascun microcosmo realizzato per le prove preliminari:

Parametro	Microcosmo Tipo 1	Microcosmo Tipo 2	Microcosmo Tipo 3	Microcosmo Tipo 4
Tipo di terreno	Sabbia	Sabbia	Sabbia	Sabbia
Rapporto solido liquido	25%	25%	25%	25%
Substrato	Siero	Siero	Birra	Birra
Conc. di substrato	5 mL/L	5 mL/L	298.5 mgCOD/L	298.5 mgCOD/L
Conc. Iniziale di Cr(VI)	5000 µg/L	10000 µg/L	5000 µg/L	10000 µg/L
Altri additivi	-	-	-	-
Temperatura	25±2 °C	25±2 °C	25±2 °C	25±2 °C
Durata della prova	38 d	38 d	38 d	38 d
Numero di replicati	2	2	2	2
Giorni di campionamento	7/38 d	7/38 d	7/38 d	7/38 d
Parametri campionati	Redox, pH, OD, Cr(VI) disciolto	Redox, pH, Temperatura, Cr(VI) disciolto	Redox, pH, OD, Cr(VI) disciolto	Redox, pH, Temperatura, Cr(VI) disciolto

Tab 4.12 - Specifiche dei microcosmi per le prove preliminari con sabbia senza aggiunta di ferro

4.2.2.2 PROVE PRELIMINARI CON SABBIA E AGGIUNTA DI FE(II)

Una frazione del surnatante delle prove preliminari con sabbia è stata utilizzata per la preparazione di quattro campioni, uno per ciascun microcosmo, nei quali è stato aggiunto FeCl₂*4H₂O ad una concentrazione pari a 10 mg Fe(II)/L. Questa prova preliminare condotta in parallelo vuole indagare la possibile influenza del Fe(II) sul composto inquinante. A seguito di 31 giorni di incubazione, i campioni sono stati analizzati per la quantificazione del Cr(VI). In Tab 4.13 vengono riportate le caratteristiche di ciascuna aliquota prelevata:

Parametro	Microcosmo Tipo 1	Microcosmo Tipo 2	Microcosmo Tipo 3	Microcosmo Tipo 4
Substrato	Siero	Siero	Birra	Birra
Conc. di substrato	5 mL/L	5 mL/L	298.5 mgCOD/L	298.5 mgCOD/L
Conc. Iniziale di Cr(VI)	5000 µg/L	10000 µg/L	5000 µg/L	10000 µg/L
Altri additivi	10 mgFe(II)/L	10 mgFe(II)/L	10 mgFe(II)/L	10 mgFe(II)/L
Temperatura	25±2 °C	25±2 °C	25±2 °C	25±2 °C
Durata della prova	31 d	31 d	31 d	31 d
Numero di replicati	1	1	1	1
Giorni di campionamento	31 d	31 d	31 d	31 d
Parametri campionati	Cr(VI) disciolto	Cr(VI) disciolto	Cr(VI) disciolto	Cr(VI) disciolto

Tab 4.13 - Specifiche dei campioni realizzati con sabbia per le prove preliminari con aggiunta di Fe(II)

4.2.2.3 PROVE PRELIMINARE CON TERRENO D'ACQUIFERO

Alla luce dei risultati ottenuti dalle prove preliminari con sabbia, si è deciso di allestire una prova sostituendo la sabbia con un tipico terreno proveniente da un acquifero milanese e aumentando il rapporto tra fase solida e liquida al 50% in peso. Anche in questo caso, analogamente alla prova preliminare con sabbia, si è effettuata un'analisi dopo 7 e 29 giorni; i tempi della prova sono più contenuti rispetto ai precedenti in quanto il processo di abbattimento, percepibile dalla decolorazione del campione, è avvenuto più rapidamente. Vengono riportati in Tab 4.14 le specifiche dei microcosmi allestiti:

Parametro	Microcosmo Tipo 1	Microcosmo Tipo 2	Microcosmo Tipo 3	Microcosmo Tipo 4
Tipo di terreno	Terreno d'acquifero	Terreno d'acquifero	Terreno d'acquifero	Terreno d'acquifero
Rapporto solido liquido	50%	50%	50%	50%
Substrato	Siero	Siero	Birra	Birra

Conc. di substrato	5 mL/L	5 mL/L	298.5 mgCOD/L	298.5 mgCOD/L
Conc. Iniziale di Cr(VI)	5000 µg/L	10000 µg/L	5000 µg/L	10000 µg/L
Altri additivi	-	-	-	-
Temperatura	25±2 °C	25±2 °C	25±2 °C	25±2 °C
Durata della prova	29 d	29 d	29 d	29 d
Numero di replicati	2	2	2	2
Giorni di campionamento	7/29 d	7/29 d	7/29 d	7/29 d
Parametri campionati	Redox, pH, OD, Cr(VI) disciolto	Redox, pH, Temperatura, Cr(VI) disciolto	Redox, pH, OD, Cr(VI) disciolto	Redox, pH, Temperatura, Cr(VI) disciolto

Tab 4.14 - Specifiche dei microcosmi per le prove preliminari con terreno d'acquifero

4.2.2.4 PROVE PER LA VALUTAZIONE DEL RILASCIO NATURALE DI FERRO E MANGANESE

Prima di realizzare le prove per il tracciamento della cinetica di rimozione del Cr(VI), sono state eseguite ulteriori prove in microcosmo con lo scopo di determinare il rilascio di Fe(II) e Mn a diversi tempi per entrambi i terreni (sabbia e terreno d'acquifero). Sono stati preparati in bottiglie di plastica, 4 microcosmi così configurati:

- 5mL/L di permeato di siero di latte e sabbia (x2)
- 5mL/L di permeato di siero di latte e terreno d'acquifero (x2)

Il valore di ferro e manganese rilasciati ottenuti con questa sperimentazione sono stati ipotizzati validi anche per i microcosmi realizzati con substrato da birrificazione, in quanto il dosaggio di quest'ultimo è basato sul COD equivalente. La contaminazione da cromo esavalente non è stata effettuata, in quanto influirebbe sulla valutazione finale. Per ognuno dei microcosmi elencati è stato realizzato un replicato in vetro nel quale è stata dosata una concentrazione di resazurina (indicatore redox) pari a 0,8 mg/L; questo è necessario in quanto le bottiglie plastiche non vengono monitorate in continuo e non possono essere aperte fino all'analisi, poiché tale procedura comporterebbe la riossidazione. In Fig 4.1

viene mostrata la dinamica con la quale la resazurina vira nel tempo. Il colore azzurro dell'indicatore redox rappresenta una condizione di aerobiosi (redox positivi); tale colore subisce un progressivo mutamento, passando da roseo a trasparente al raggiungimento rispettivamente delle condizioni 0 mV e circa -200 mV. Le prove sono state condotte in cella termostata alla medesima temperatura ($17\pm 2^\circ\text{C}$) delle prove per l'analisi della cinetica di rimozione del Cr(VI). La valutazione del rilascio di ferro bivalente e manganese è stata indagata dopo 10 e 30 giorni di incubazione.



Fig 4.1 - Replicati con additivazione di resazurina per le prove per l'analisi del rilascio del ferro nel tempo

4.2.2.5 PROVE PER LA CINETICA DI RIMOZIONE DEL Cr(VI)

Si procede ora a descrivere nel dettaglio la modalità di allestimento delle prove sperimentali progettate sulla base dei risultati ottenuti dalle preliminari. Ci si limiterà alla sole prove senza aggiunta di Fe(II), in quanto i risultati relativi a quelle con additivazione non sono ancora disponibili. Le modalità di allestimento di queste prove sono riconducibili, in quanto simili, a quelle presentate per le prove preliminari. In questo caso, sia le bottiglie in vetro che quelle in plastica, durante l'intera prova vengono ricoperte con un film plastico nero per evitare l'ingresso della radiazione solare, la quale potrebbe attivare processi di fotosintesi con conseguente fioritura algale e produzione di ossigeno. Per queste nuove prove, a differenza dei test preliminari, si è deciso di operare a temperatura pari a $17\pm 1^\circ\text{C}$ per simulare, per quanto possibile, le condizioni di falda. Per questo motivo è stato necessario allestire un criostato a bagno d'acqua, nel quale immergere le bottiglie in vetro

monitorate dal MARTINA. Tale apparecchiatura, tramite un ricircolo di acqua che avviene all'interno di un refrigeratore/riscaldatore, consente di mantenere costante la temperatura selezionata indipendentemente dalle condizioni ambientali esterne. I replicati nelle bottiglie plastiche sono invece riposti in cella termostata, impostata alla medesima temperatura.

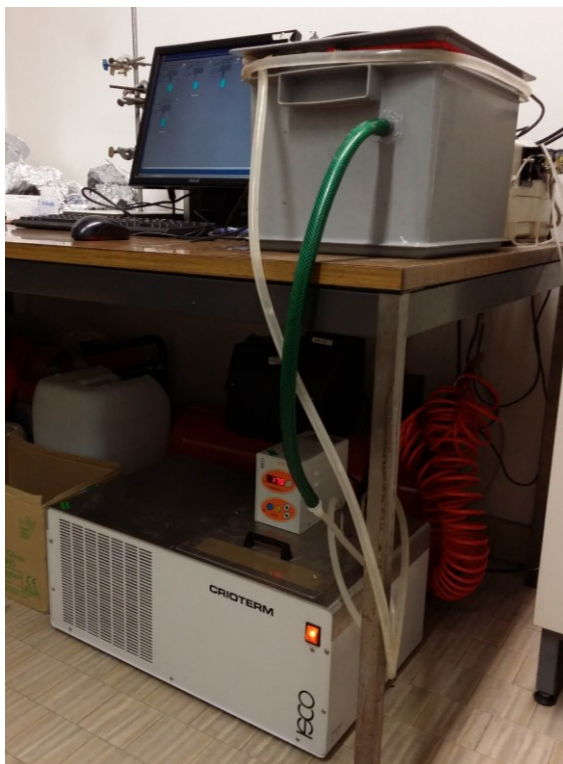


Fig 4.2 - Vista dell'allestimento del criostato per la conduzione delle prove a temperatura costante

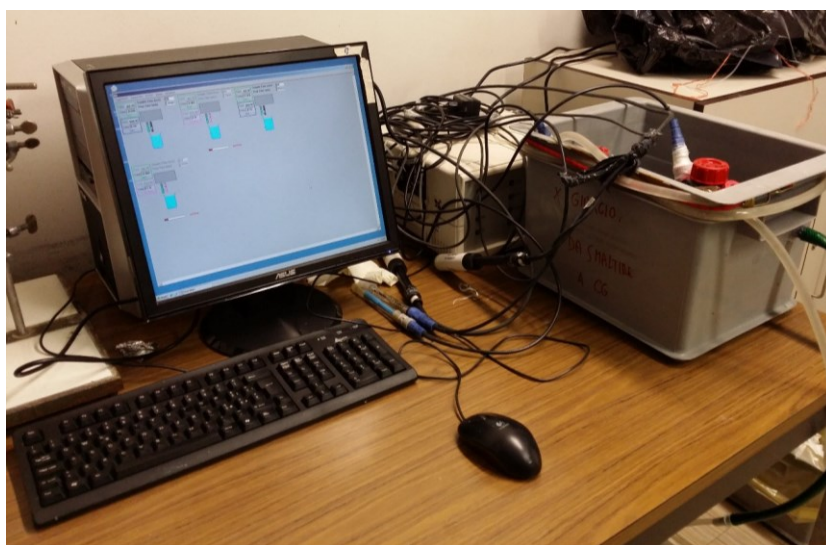


Fig 4.3 - Vista del sistema MARTINA utilizzato per il campionamento continuo di dati redox, ossigeno disciolto e temperatura



Fig 4.4 - Replicati in bottiglia di vetro compatibile con sistema MARTINA opportunamente schermate dalla luce solare con film nero plastico

Terreni e substrati sono statati inseriti nei microcosmi senza subire trattamenti termici (quali autoclavatura) per l'inibizione batterica. Per quanto riguarda i substrati, essi sono stati conferiti nelle differenti bottiglie a partire da un'unica soluzione madre. Sono state prelevate due aliquote dei due substrati al fine di effettuare analisi sul contenuto iniziale di: carbonio organico totale (TOC), composti anionici (nitrati e solfati), ferro e manganese. Le aliquote sono state prelevate prima dell'aggiunta dell'inquinante, in quanto non influente con i metodi analitici. Si sono previste analisi analoghe anche per l'ultimo campione della serie di replicati. La realizzazione della contaminazione, sia nelle bottiglie in vetro che nei relativi replicati, viene fatta in maniera indipendente, realizzando un opportuno spike a partire da una soluzione 0,2 N (vedi Allegato C - Reagenti). Una volta raggiunto un redox negativo stabile, le bottiglie sono state private delle sonde e dismesse.

I valori di potenziale redox dell'ossigeno nei microcosmi, come detto in precedenza, sono stati rilevati dal sistema MARTINA nel quale è stato impostato un tempo di campionamento pari a 60 secondi. Il parametro pH invece è stato puntualmente letto esclusivamente all'inizio e alla fine della prova nonché ogni qualvolta c'è stato uno smantellamento di un replicato per lo svolgimento dell'analisi. I dati di potenziale redox sono stati registrati in tutte 4 le bottiglie in controllo (compatibilmente con MARTINA) in quanto risulta essere un parametro influenzato da tutte le componenti costitutive dei microcosmi (matrici solide e liquide, substrati nonché contaminate). Diversamente è stato

fatto per l'ossigeno, poiché esso è funzione della sola attività batterica e della concentrazione di substrato; per questo motivo si è registrata la concentrazione di O₂ nelle sole bottiglie contenenti una concentrazione di 5000 µg Cr(VI)/L. La prova sperimentale si ritiene conclusa in qualsiasi caso al trentaseiesimo giorno, quando l'ultimo dei microcosmi replicati viene analizzato. Queste modalità di allestimento sono state ripetute per i microcosmi con sabbia (Tab 4.15) e i microcosmi con terreno d'acquifero (Tab 4.16). Le due sperimentazioni sono state condotte in serie monitorando d'apprima i quattro microcosmi con sabbia.

Sabbia				
Parametro	Microcosmo Tipo 1	Microcosmo Tipo 2	Microcosmo Tipo 3	Microcosmo Tipo 4
Tipo di terreno	Sabbia	Sabbia	Sabbia	Sabbia
Rapporto solido liquido	50%	50%	50%	50%
Substrato	Siero	Siero	Birra	Birra
Conc. di substrato	5 mL/L	5 mL/L	298.5 mgCOD/L	298.5 mgCOD/L
Conc. Iniziale di Cr(VI)	5000 µg/L	10000 µg/L	5000 µg/L	10000 µg/L
Altri additivi	-	-	-	-
Temperatura	17±1 °C	17±1 °C	17±1 °C	17±1 °C
Durata della prova	36 d	36 d	36 d	36 d
Numero di replicati	6	6	6	6
Giorni di campionamento [d]	11/18/21/28/33/ 36 d	11/18/21/28/33/ 36 d	8/18/21/28/33/ 36 d	11/18/21/28/33/ 36 d
Parametri campionati	Redox, pH, OD, Cr(VI) disciolto	Redox, pH, Temperatura, Cr(VI) disciolto	Redox, pH, OD, Cr(VI) disciolto	Redox, pH, Temperatura, Cr(VI) disciolto

Tab 4.15 - Composizione in sintesi dei microcosmi con sabbia realizzati per il tracciamento della cinetica di abbattimento del Cr(VI)

Terreno D'acquifero				
Parametro	Microcosmo Tipo 1	Microcosmo Tipo 2	Microcosmo Tipo 3	Microcosmo Tipo 4
Tipo di terreno	Terreno d'acquifero	Terreno d'acquifero	Terreno d'acquifero	Terreno d'acquifero
Rapporto solido liquido	50%	50%	50%	50%
Substrato	Siero	Siero	Birra	Birra
Conc. di substrato	5 mL/L	5 mL/L	298.5 mgCOD/L	298.5 mgCOD/L
Conc. Iniziale di Cr(VI)	5000 µg/L	10000 µg/L	5000 µg/L	10000 µg/L
Altri additivi	-	-	-	-
Temperatura	17±1 °C	17±1 °C	17±1 °C	17±1 °C
Durata della prova	36 d	36 d	36 d	36 d
Numero di replicati	6	6	6	6
Giorni di campionamento [d]	8/11/18/21/28/ 36	8/11/18/21/28/ 36	8/11/18/21/28/ 36	8/11/18/21/28/ 36
Parametri campionati	Redox, pH, OD, Cr(VI) disciolto	Redox, pH, Temperatura, Cr(VI) disciolto	Redox, pH, OD, Cr(VI) disciolto	Redox, pH, Temperatura, Cr(VI) disciolto

Tab 4.16 - Composizione in sintesi dei microcosmi con terreno d'acquifero realizzati per il tracciamento della cinetica di abbattimento del Cr(VI)

Di seguito vengono inoltre riportate le concentrazioni di manganese, nitrati, solfati e carbonio totale al tempo “zero” della soluzione acquosa aggiunta ai microcosmi (Tab 4.17). I valori di manganese presenti nelle due soluzioni sono trascurabili. I valori di TOC sono indice della quantità di carbonio organico legato in composti organici; il TOC dello scarto da birrificazione risulta essere superiore del 50% rispetto al permeato di siero di latte. Per quanto riguarda le concentrazioni di nitrati e solfati, sono coerenti con i risultati emersi dall'analisi della matrice acqua (Allegato A).

Substrato	Mn	NO ₃	SO ₄	TOC
	µg/L	mg/L	µg/L	mgC/L
Soluzione con siero di latte	<5	20	44	86
Soluzione con Scarto da birrificazione	<5	28	49	125

Tab 4.17 - Caratterizzazione iniziale delle soluzioni in alimento dei microcosmi

Per una completa caratterizzazione della prova, si riportano i valori di pH e redox iniziali misurati per ciascuna microcosmo in vetro per sabbia (Tab 4.18) e terreno d'acquifero (Tab 4.19):

Sabbia				
	Microcosmo Tipo 1	Microcosmo Tipo 2	Microcosmo Tipo 3	Microcosmo Tipo 4
pH	7,1	7,2	7,4	7,5
Temperatura [°C]	24,1	23,9	24,2	23,9
Redox [mV]	289	352	241	258

Tab 4.18 - Valori di pH, redox e temperatura iniziali per i microcosmi realizzati con sabbia per la cinetica di rimozione

Terreno D'acquifero				
	Microcosmo Tipo 1	Microcosmo Tipo 2	Microcosmo Tipo 3	Microcosmo Tipo 4
pH	7,3	7,5	7,1	7,2
Temperatura [°C]	23,2	22,9	23,5	23,6
Redox [mV]	244	313	291	208

Tab 4.19 - Valori di pH, redox e temperatura iniziali per i microcosmi realizzati con terreno d'acquifero per la cinetica di rimozione

4.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

4.3.1 PROVE PRELIMINARI CON SABBIA

Vengono presentati i grafici relativi agli andamenti del redox (Fig 4.7 e Fig 4.9) e dell'ossigeno (Fig 4.8 e Fig 4.10) delle prove preliminari con sabbia.



Fig 4.5 - Bottiglie di monitoraggio in vetro collegate al sistema MARTINA



Fig 4.6 - Vista dei replicati in plastica per ogni tipo di microcosmo

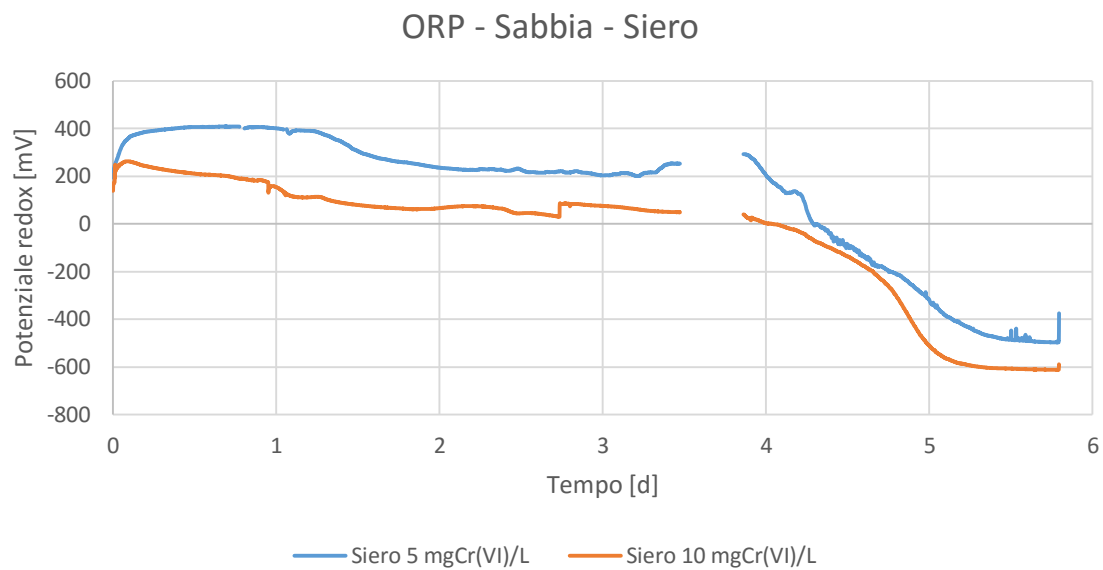


Fig 4.7 - Andamento del potenziale redox dei microcosmi contenenti sabbia, permeato di siero di latte (5mL/L) ed concentrazione di Cr(VI) pari rispettivamente a 5000 $\mu\text{g/L}$ (curva blu) e 10000 $\mu\text{g/L}$ (curva arancione).

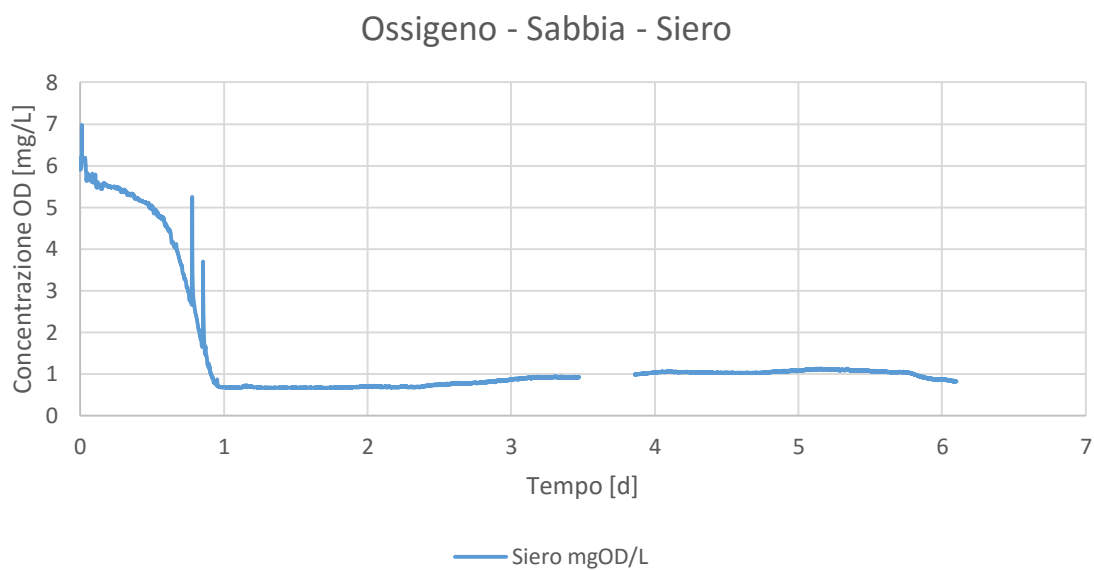


Fig 4.8 - Andamento dell'ossigeno disciolto nel microcosmo con sabbia, permeato di siero di latte e concentrazione di Cr(VI) pari a 5000 $\mu\text{g/L}$.

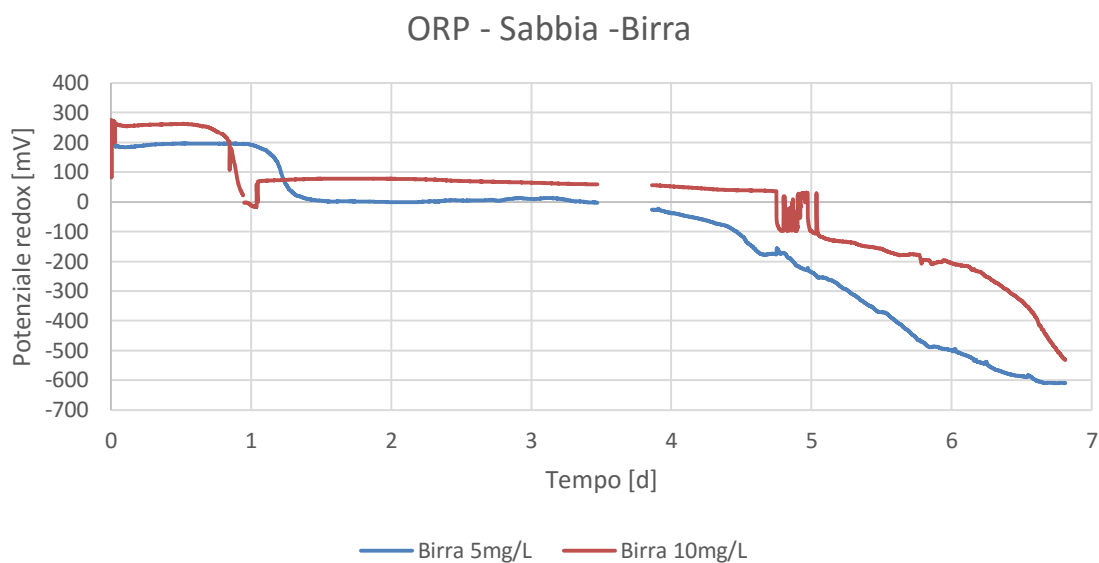


Fig 4.9 - Andamento del potenziale redox dei microcosmi contenenti sabbia, substrato da birrifico (298,5 mgCOD/L) e concentrazione di Cr(VI) pari rispettivamente a 5000 $\mu\text{g/L}$ (curva blu) e 10000 $\mu\text{g/L}$ (curva rossa).

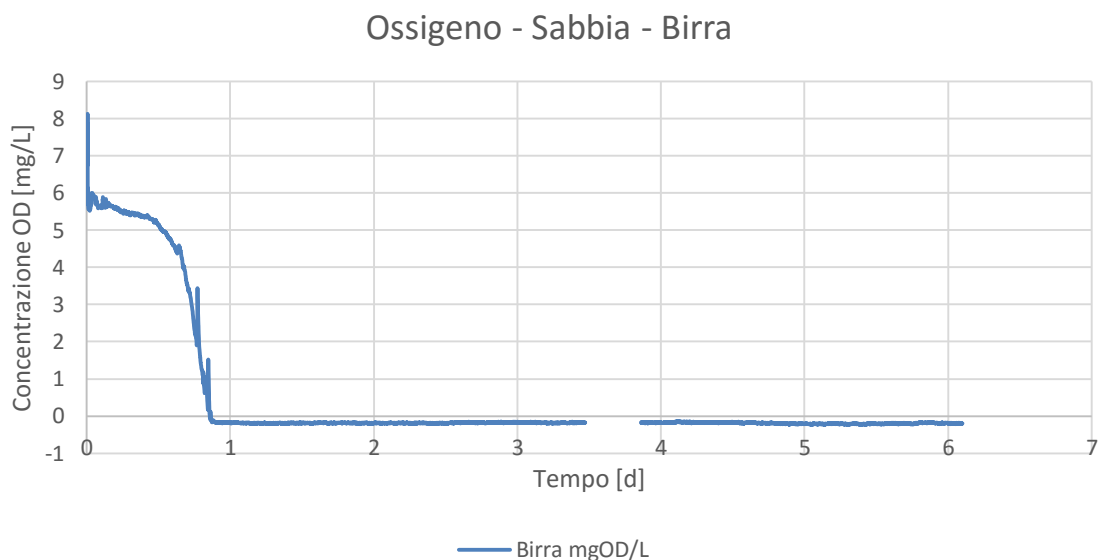


Fig 4.10 - Andamento dell'ossigeno disciolto (curva blu) nel microcosmo con sabbia, substrato da birrifico e concentrazione di Cr(VI) pari a 5000 $\mu\text{g/L}$.

A causa di un blackout nell'area milanese, il sistema MARTINA si è arrestato per un arco di tempo di circa 8 ore; i grafici presentano quindi una mancanza di dati in un limitato intervallo di tempo. Il pH iniziale nel sistema, in tutte le configurazioni allestite, è risultato mediamente pari a 7. In tutte le bottiglie, l'ossigeno disciolto (OD) è diminuito da 6,5 mg/L a valori inferiori a 0,5 mg OD/L dopo circa 1 giorno di incubazione. Condizioni riducenti (potenziali redox negativo) si sono verificate nei sistemi entro quattro giorni di incubazione

e il potenziale redox è diminuito passando da circa 250 mV a -500 mV in 7 giorni. Dopo tale tempo, le concentrazioni di Cr (VI) disciolto in acqua non hanno subito significative variazioni rispetto ai valori iniziali come mostrato nelle tabelle sottostanti.

Replicati	pH	Temperatura
1 – Siero 5 mgCr(VI)/L	7,03	25,8
2 – Siero 10 mgCr(VI)/L	7,01	25,6
3 – Birra 5 mgCr(VI)/L	7,21	25,8
4 – Birra 10 mgCr(VI)/L	6,87	25,6

Tab 4.20 - pH e temperatura iniziali per le quattro configurazioni di microcosmi delle prove per la rimozione

Conc. Iniziale [µg/L]	Conc. Finale [µg/L]	Abbattimento %
5000	4648 ± 465	7%
	4656 ± 466	7%
	4656 ± 466	7%

Tab 4.21 - Concentrazione a 7 d di incubazione in microcosmo di tipo 1 (5 mg Cr(VI)/L iniziali, siero, sabbia)

Conc. Iniziale [µg/L]	Conc. Finale [µg/L]	Abbattimento %
10000	10912 ± 1091	-9%
	10959 ± 1096	-10%
	10928 ± 1093	-9%

Tab 4.22 - Concentrazione a 7 d di incubazione in microcosmo di tipo 2 (10 mg Cr(VI)/L iniziali, siero, sabbia)

Conc. Iniziale [µg/L]	Conc. Finale [µg/L]	Abbattimento %
5000	4418 ± 442	12%
	4518 ± 452	10%
	4348 ± 435	13%

Tab 4.23 - Concentrazione a 7 d di incubazione in microcosmo di tipo 3 (5 mg Cr(VI)/L iniziali, birra, sabbia)

Conc. Iniziale [µg/L]	Conc. Finale [µg/L]	Abbattimento %
10000	10128 ± 1013	-1%
	10466 ± 1047	-5%
	10482 ± 1048	-5%

Tab 4.24 - Concentrazione a 7 d di incubazione in microcosmo di tipo 4 (10 mg Cr(VI)/L iniziali, birra, sabbia)

In Tab 4.25 vengono riportate invece i risultati relativi al campionamento trascorsi 38 giorni dall'inizio della prova.

	Conc. Iniziale [$\mu\text{g/L}$]	Conc. Finale [$\mu\text{g/L}$]	Abbattimento %
Birra	10000	9389 \pm 939	6%
	10000	9374 \pm 937	6%
	10000	9420 \pm 942	6%
Birra	5000	3715 \pm 372	26%
	5000	3946 \pm 395	21%
	5000	3792 \pm 379	24%
Siero	10000	8943 \pm 894	11%
	10000	8912 \pm 891	11%
	10000	8928 \pm 893	11%
Siero	5000	3792 \pm 379	24%
	5000	3792 \pm 379	24%
	5000	3869 \pm 387	23%

Tab 4.25 - Concentrazioni del replicato 2 per ciascuna tipo di microcosmo senza aggiunta di ferro. Le percentuali di abbattimento si riferiscono ad un periodo di tempo pari a 38 giorni dall'allestimento

La resa oscilla tra il 6% e il 24% rispettivamente per le concentrazioni iniziali di 10000 $\mu\text{g/L}$ e 5000 $\mu\text{g/L}$.

4.3.2 PROVE PRELIMINARI CON SABBIA E AGGIUNTA DI FE(II)

In queste prove preliminari, arrestate dopo 38 giorni, si sono osservati abbattimenti significativi come mostrato in Tab 4.26.

	Conc. Iniziale [$\mu\text{g/L}$]	Conc. Finale [$\mu\text{g/L}$]	Abbattimento %
Birra	10000	5235 \pm 524	48%
	10000	5235 \pm 524	48%
	10000	5235 \pm 524	48%
Birra	5000	1041 \pm 104	79%
	5000	1048 \pm 105	79%
	5000	1056 \pm 106	79%
Siero	10000	6251 \pm 625	37%
	10000	6205 \pm 620	38%
	10000	6189 \pm 619	38%
Siero	5000	1448 \pm 145	71%
	5000	1456 \pm 146	71%
	5000	1441 \pm 144	71%

Tab 4.26 – Concentrazioni per ciascuna tipo di microcosmo senza aggiunta di ferro realizzato con sabbia per le prove preliminari. Le percentuali di abbattimento si riferiscono ad un periodo di tempo pari a 38 giorni dall'allestimento

Concentrazioni iniziali di 10000 µg/L hanno subito il 38% di abbattimento con permeato di siero di latte e il 48% con scarto da birrificio; per le concentrazioni iniziali più basse, è precipitato il 71% di Cr(VI) utilizzando permeato di siero di latte e il 79% con scarto da birrificazione. Dai risultati ottenuti, si può concludere che la mancanza di ferro sia la causa principale, o comunque un elemento chiave, della scarsa rimozione di Cr(VI) osservata nelle prove preliminari con sabbia senza aggiunta di ferro.

4.3.3 PROVE PRELIMINARI CON TERRENO D'ACQUIFERO

Vengono riportati nelle due tabelle sottostanti i risultati di abbattimento a 7 e 29 giorni per i 2 replicati di ciascun tipo di microcosmo.

	Conc. Iniziale [µg/L]	Conc. Finale [µg/L]	Abbattimento %
Birra	10000	7820 ± 782	22%
	10000	7858 ± 786	22%
	10000	7789 ± 779	22%
Birra	5000	671 ± 67	87%
	5000	663 ± 66	87%
	5000	656 ± 66	87%
Siero	10000	8312 ± 831	17%
	10000	8296 ± 830	17%
	10000	8296 ± 830	17%
Siero	5000	4017 ± 145	20%
	5000	3986 ± 399	20%
	5000	3994 ± 399	20%

Tab 4.27 - Concentrazioni e rese ottenute nei microcosmi con terreno d'acquifero dopo 7 giorni dall'inizio della prova

	Conc. Iniziale [µg/L]	Conc. Finale [µg/L]	Abbattimento %
Birra	10000	<17,5	>99,65%
	10000	<17,5	>99,65%
	10000	<17,5	>99,65%
Birra	5000	<17,5	>99,65%
	5000	<17,5	>99,65%
	5000	<17,5	>99,65%
Siero	10000	5358 ± 536	46%
	10000	5373 ± 537	46%
	10000	5373 ± 537	46%
Siero	5000	<17,5	>99,65%
	5000	<17,5	>99,65%
	5000	<17,5	>99,65%

Tab 4.28 - Concentrazioni e rese ottenute nei microcosmi con terreno d'acquifero dopo 29 giorni dall'inizio della prova

Queste prove preliminari hanno evidenziato riduzioni medie prossime al 20% nel microcosmo con concentrazione iniziale di 5000 µg/L e substrato carbonioso da birrificio. Dopo 29 giorni di incubazione, la maggior parte dei campioni ha mostrato una resa di abbattimento superiore al 99,65%.

4.3.4 PROVE PER LA VALUTAZIONE DEL RILASCIO NATURALE DI FERRO E MANGANESE

Vengono di seguito riportate in Tab 4.29 le concentrazioni di Fe(II) e manganese rilasciate al tempo iniziale, dopo 10 e 30 giorni di incubazione rispettivamente per sabbia e terreno d'acquifero.

GIORNI DA ALLESTIMENTO	0	10	30
SABBIA			
Fe (II) [µg/L]	<10	58	1738
Mn [µg/L]	<5	655	1980
TERRENO D'ACQUIFERO			
Fe (II) [µg/L]	<10	1340	1348
Mn [µg/L]	<5	869	1109

Tab 4.29 - Rilascio di ferro bivalente e manganese per sabbia e terreno d'acquifero

Il dato di Fe(II) relativo al tempo “zero” è il risultato di analisi commissionate a laboratorio della soluzione di alimento iniziale. Dai dati si può subito notare la differenza tra i due rilasci di Fe(II) dopo 10 giorni; il terreno d'acquifero ha un rilascio 23 volte superiore a quello della sabbia. Questa informazione porta all'ipotesi di una migliore resa di abbattimento nei microcosmi realizzati con terreno d'acquifero.

4.3.5 PROVE PER LA CINETICA DI RIMOZIONE DEL Cr(VI)

4.3.5.1 MICROCOSMI CON SABBIA

In Fig 4.11 vengono riportati a titolo di confronto tutti gli andamenti delle curve ORP delle quattro bottiglie con sabbia.

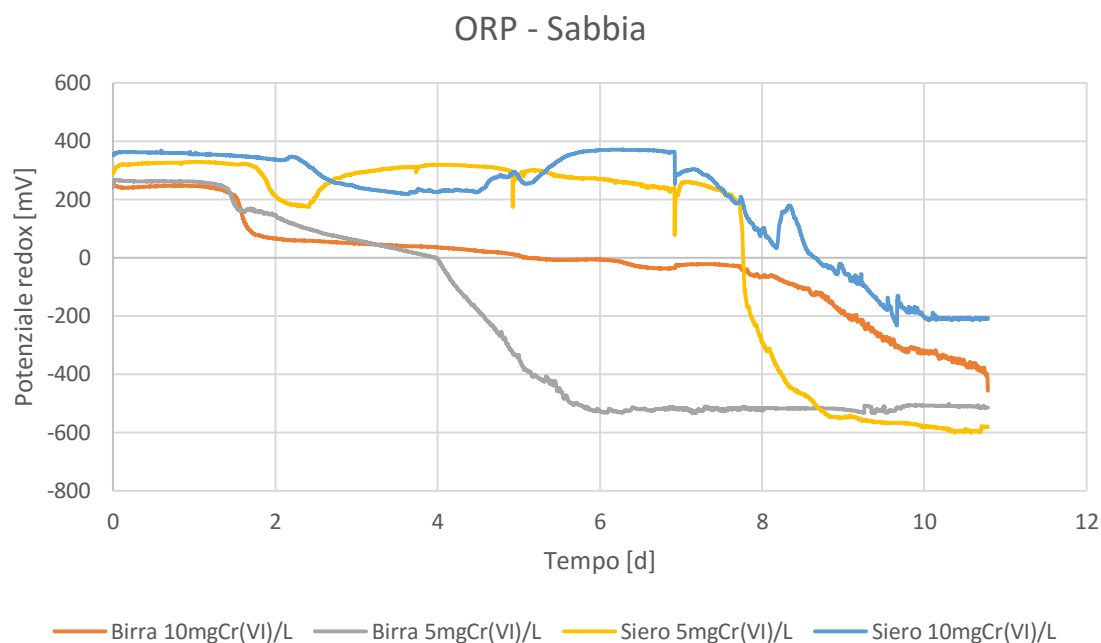


Fig 4.11 - Andamento delle curve ORP alle diverse concentrazioni di cromo e con diversi substrati dei sistemi realizzati con sabbia per lo studio della cinetica di rimozione

Si possono notare valori iniziali differenti e cinetiche di rimozione dell'ORP diversificate. Il grafico evidenzia come il comportamento delle curve sia pressoché analogo per i primi 4 giorni di incubazione. Trascorso questo periodo, i microcosmi contenuti 5 mg Cr(VI)/L subiscono una brusca riduzione dell'ORP sino al raggiungimento di condizioni riducenti stabili. Esse vengono raggiunte nel momento in cui il potenziale redox del sistema si assesta ad un valore stabile di -500 mV. Il microcosmo alla concentrazione di Cr(VI) più elevata (10 mg/L) invece raggiunge valori prossimi a -450 mV in circa 11 giorni. Dalle due curve si nota come l'intervallo di tempo che trascorre tra l'inizio della riduzione del potenziale e la stabilizzazione del sistema in condizioni riducenti sia analogo in entrambi i casi; il tempo effettivo di riduzione ha una durata circa pari a due giorni. Il ritardo nella discesa della curva a più alta concentrazione di cromo fa presupporre una possibile influenza del contaminante sulle specie ioniche in soluzione.

Confrontando il grafico ORP con il sottostante grafico dell'andamento della concentrazione dell'ossigeno (Fig 4.12) emerge come, dopo 1 giorno, ci sia una corrispondenza tra il tempo di completo consumo dell'ossigeno e il primo picco di discesa del potenziale. Questo fenomeno rafforza quanto dimostrato nella sezione "Calcolo dei dosaggi", cioè che l'ossigeno risulta essere l'accettore preferenziale e quindi il primo ad essere consumato dalla biomassa eterotrofa.

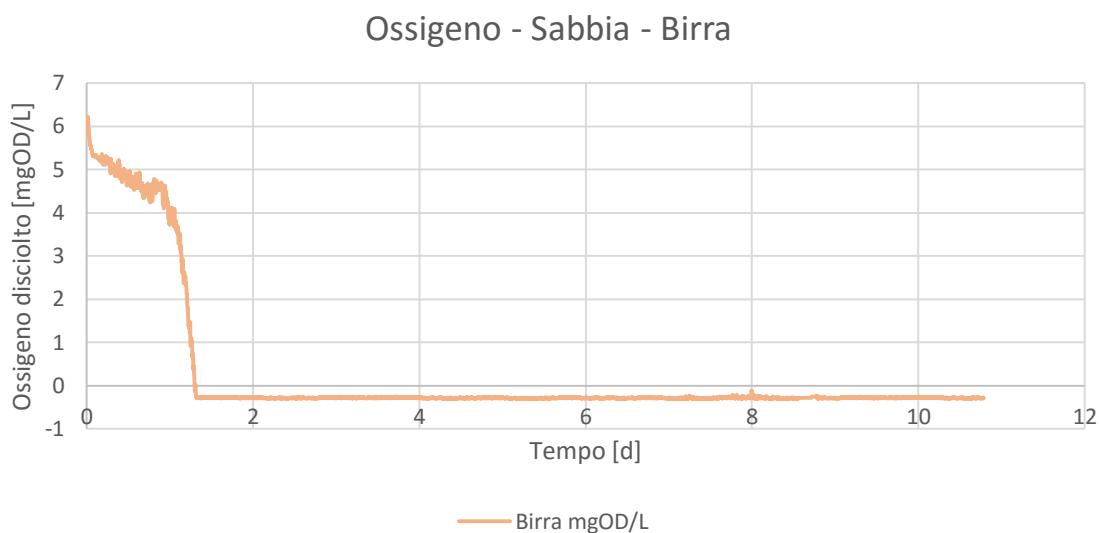


Fig 4.12 - Andamento dell'ossigeno nel tempo nei microcosmi realizzati con substrato scarto da birrificazione, sabbia e con una concentrazione iniziale pari a 5 mgCr(VI)/L.

Analogamente possono essere confrontate le curve ORP dei microcosmi contenuti siero (5 mL/L) alle due diverse concentrazioni di cromo.

Le considerazioni effettuate sugli andamenti dei microcosmi alimentati con scarto da birrificio sembrano essere confermate nelle curve ORP degli analoghi microcosmi allestiti con permeato di siero di latte (Fig. 4.5). Anche in questo caso il tempo effettivo che intercorre tra l'inizio e la fine della discesa è pari a 2 giorni ad entrambe le concentrazioni di cromo. Dopo 8 giorni il microcosmo a minor concentrazione di cromo ha raggiunto condizioni riducenti stabili con un potenziale redox di -600 mV, mentre nel caso della concentrazione più elevata si è raggiunto l'equilibrio a -200 mV dopo 10 giorni. Analogamente a quanto emerso dalle prove realizzate con scarto da birrificazione, l'equilibrio raggiunto a concentrazione di cromo più elevate risulta meno negativo rispetto a microcosmi a 5 mgCr(VI)/L. Il completo consumo di ossigeno, come si può apprezzare dal grafico (Fig 4.13), avviene dopo 2 giorni di incubazione dei microcosmi.



Fig 4.13 - Andamento dell'ossigeno nel tempo nei microcosmi realizzati con permeato di siero di latte, sabbia e con una concentrazione iniziale pari a 5 mgCr(VI)/L.

Il processo di consumo del substrato è imputabile alla presenza di batteri eterotrofi autoctoni già presenti nella matrice solida e di microrganismi veicolati nel microcosmo attraverso il substrato. Anche se dalla sezione descrizione dei substrati è emerso che il permeato di siero ha una carica batterica più elevata rispetto allo scarto da birrificazione, si verifica un processo di biodegradazione più rapido per la rimozione di quest'ultimo. Questo comportamento può essere spiegato dal fatto che l'etanolo può risultare più degradabile del lattosio e con la presenza di lieviti fermentatori.

A parità di concentrazione iniziale di cromo ma differente substrato iniettato, si osserva una riduzione più repentina dell'ORP dei microcosmi con birra, indipendentemente dalla concentrazione iniziale di inquinante. Vengono ora riportati in Fig 4.14 gli andamenti delle concentrazioni di cromo esavalente nel tempo per i microcosmi allestiti con sabbia.

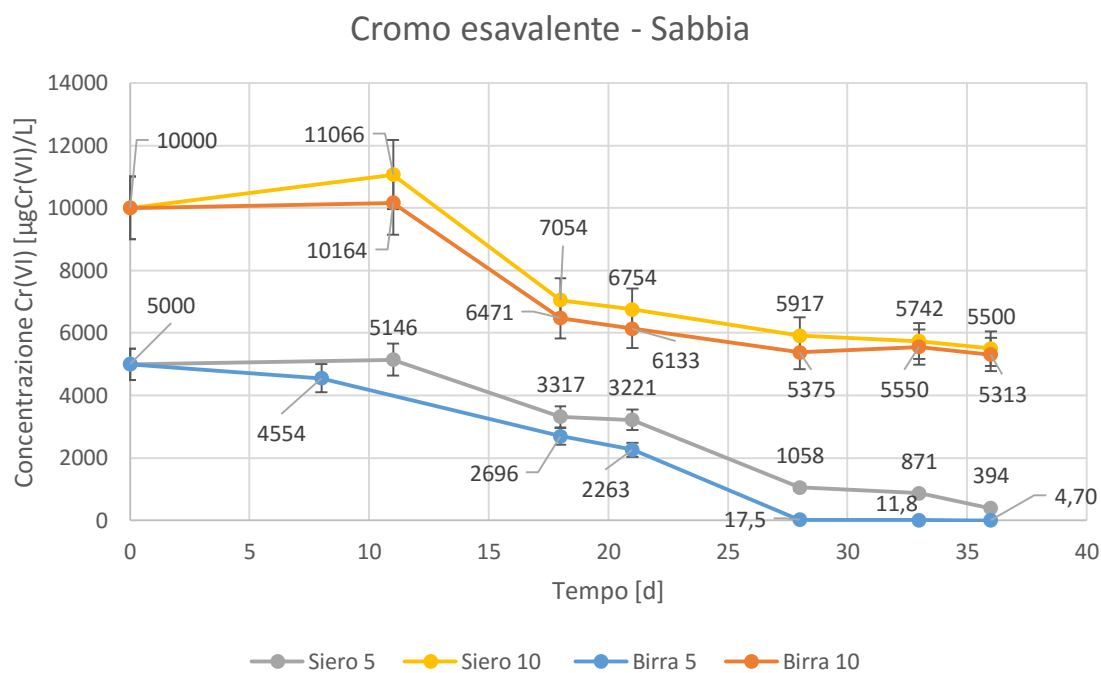


Fig 4.14 - Andamento delle cinetiche di rimozione del Cr(VI) nei microcosmi con sabbia

Dal grafico si osserva come vi sia stata una significativa rimozione del Cr(VI), contrariamente a quanto emerso dai risultati delle prove preliminari con sabbia. Nelle prove qui in discussione si è aumentato il rapporto solido-liquido dei microcosmi dal 25% delle prove preliminari al 50 %, per garantire un maggior rilascio di Fe(II) da parte della matrice solida una volta raggiunte le condizioni di anaerobiosi nel microcosmo. La cinetica di rimozione è simile in tutti i casi, escluso il microcosmo con substrato da birrificazione e concentrazione iniziale di Cr(VI) pari a 5 mg/L. Per questa configurazione è stato necessario anticipare il primo campionamento e la relativa analisi, in quanto il redox ha raggiunto condizioni riducenti più rapidamente rispetto agli altri microcosmi.

Di seguito viene discussa singolarmente ciascuna cinetica dei sistemi realizzati con sabbia nonché vengono tabellate le concentrazioni medie nei giorni di campionamento e relative percentuali di abbattimento ottenute.

Il microcosmo con scarto da birrificio e 5 mgCr(VI)/L mostra un'alta capacità di abbattimento in quanto si sono raggiunte concentrazioni di Cr(VI), dopo 36 giorni di incubazione, inferiori a 5 µg/L. La percentuale di abbattimento risulta in questo caso massima e prossima al 99,91%. In Tab 4.30 vengono riportati gli andamenti medi per ogni replicato e il relativo errore commesso in misura.

Giorni dall'allestimento	Conc. media [$\mu\text{g/l}$]	% Abbattimento
0	5000 \pm 500	-
8	4554 \pm 455	9%
18	2696 \pm 270	46%
21	2263 \pm 226	55%
28	17,5 \pm 1,7	99,65%
33	11,8 \pm 0,12	99,76%
36	4,7 \pm 0,5	99,91%

Tab 4.30 - Andamento nel tempo della concentrazione di Cr(VI) nel tempo dei diversi replicati realizzati con sabbia e substrato scarto da birrificazione alla concentrazione iniziale di 5 mgCr(VI)/L. Vengono riportate le percentuali di abbattimento l'errore del metodo colorimetrico

Dall'andamento delle concentrazioni in Fig 4.14 si può notare come, dopo 30 giorni dall'allestimento, le forti condizioni riducenti e il rilascio di Fe(II) causato dalla matrice solida siano sufficienti alla completa precipitazione del Cr(VI).

A differenza del microcosmo realizzato con substrato scarto da birrificazione, nel sistema con siero e 5 mgCr(VI)/L non si raggiungono concentrazioni al di sotto del limite di rilevabilità del metodo. In ogni caso la percentuale di abbattimento del contaminante non è trascurabile in quanto prossima all'92%.

Giorni dall'allestimento	Conc. media [$\mu\text{g/l}$]	% Abbattimento
0	5000 \pm 500	-
11	5146 \pm 515	-3%
18	3317 \pm 332	34%
21	3221 \pm 322	36%
28	1058 \pm 106	79%
33	871 \pm 87	83%
36	394 \pm 39	92%

Tab 4.31 - Variazione della concentrazione di Cr(VI) nel tempo dei diversi replicati realizzati con sabbia e substrato permeato di siero di latte alla concentrazione iniziale di 5mgCr(VI)/L. Vengono riportate le percentuali di abbattimento l'errore del metodo colorimetrico

Come nel caso precedente è possibile notare che l'andamento della concentrazione di Cr(VI) scende in funzione del progressivo rilascio di ferro da parte della matrice solida.

Per quanto riguarda i sistemi realizzati con scarto da birrificazione e 10 mgC(VI)/L analogamente a quanto emerso dalle curve ORP relative ai microcosmi con 10 mgCr(VI)/L, la degradazione del Cr(VI) subisce un rallentamento che porta la cinetica a valori asintotici che rispecchiano efficienze di degradazione prossime al 47%. Dopo 36 giorni sono state misurate concentrazioni di 5312 $\mu\text{gCr(VI)/L}$ (Tab 4.32).

Giorni dall'allestimento	Conc. media [$\mu\text{g/l}$]	% Abbattimento
0	10000 \pm 1000	-
11	10164 \pm 1016	-2%
18	6471 \pm 647	35%
21	6133 \pm 613	39%
28	5375 \pm 538	46%
33	5550 \pm 555	45%
36	5312 \pm 531	47%

Tab 4.32 - Andamento nel tempo della concentrazione di Cr(VI) nel tempo dei diversi replicati realizzati con sabbia e substrato scarto da birrificazione alla concentrazione iniziale di 10 mgCr(VI)/L. Vengono riportate le percentuali di abbattimento l'errore del metodo colorimetrico

Osservando invece la cinetica di rimozione dei microcosmi con siero ed una concentrazione iniziale di Cr(VI) pari a 10 mgCr(VI)/L si osserva come la percentuale di rimozione risulti prossima al 42%. Le considerazioni sul redox e concentrazione di inquinatane a partire da una concentrazione iniziale di 10 mgCr(VI)/L trovano riscontro anche in questa cinetica.

Giorni dall'allestimento	Conc. media [$\mu\text{g/l}$]	% Abbattimento
0	10000 \pm 1000	-
11	11066 \pm 1107	-11%
18	7054 \pm 705	29%
21	6754 \pm 675	32%
28	5917 \pm 592	41%
33	5742 \pm 574	43%
36	5550 \pm 550	45%

Tab 4.33 - Andamento nel tempo della concentrazione di Cr(VI) nel tempo dei diversi replicati realizzati con sabbia e substrato permeato di siero di latte alla concentrazione iniziale di 10 mgCr(VI)/L. Vengono riportate le percentuali di abbattimento l'errore del metodo colorimetrico

Come evidenziato dal grafico di Pourbaix (Fig 1.1), lo stato di un contaminante inorganico non dipende solamente dal potenziale redox, ma anche dal valore di pH del sistema. Per questo motivo vengono riportati i risultati dei campionamenti puntuali effettuati nel tempo (Fig 4.15).

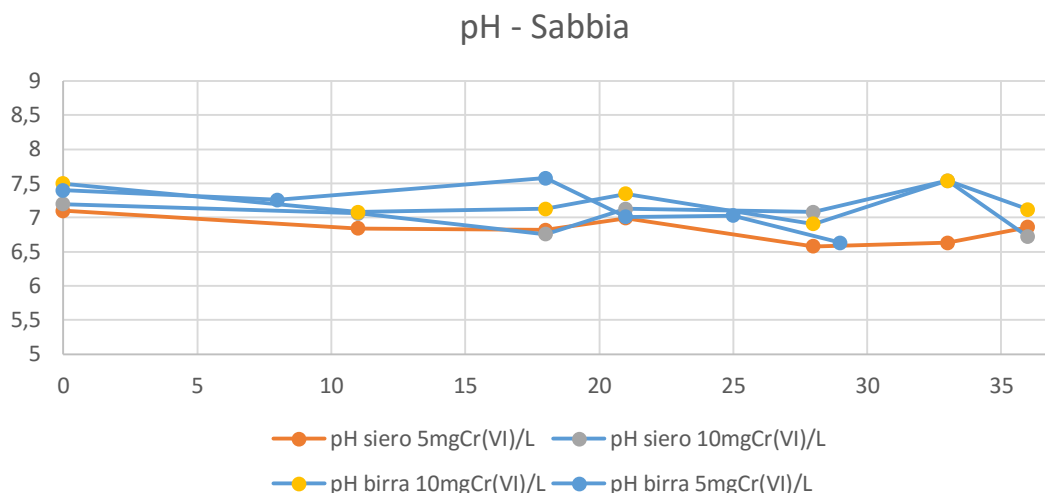


Fig 4.15 - Andamento dei valori di pH per i microcosmi realizzati con sabbia per lo studio della cinetica di rimozione del Cr(VI)

Per quanto riguarda i valori di pH ci si attendeva valori più alcalini verso il termine della sperimentazione in quanto, come emerso dall'analisi del pH del terreno, essendo basico, avrebbero potuto rilasciare una quantità di specie OH^- tali da influenzare il potere tampone dell'acqua. Mediamente il pH si attesta attorno a $7 \pm 0,5$.

4.3.5.2 MICROCOSMI CON TERRENO D'ACQUIFERO

In Fig 4.16 vengono presentate a titolo di confronto i quattro andamenti di ORP campionati dal sistema MARTINA per le prove con terreno d'acquifero. Il monitoraggio in continuo è stato arrestato indipendentemente per ciascuna microcosmo al raggiungimento di condizioni redox negative stabili.

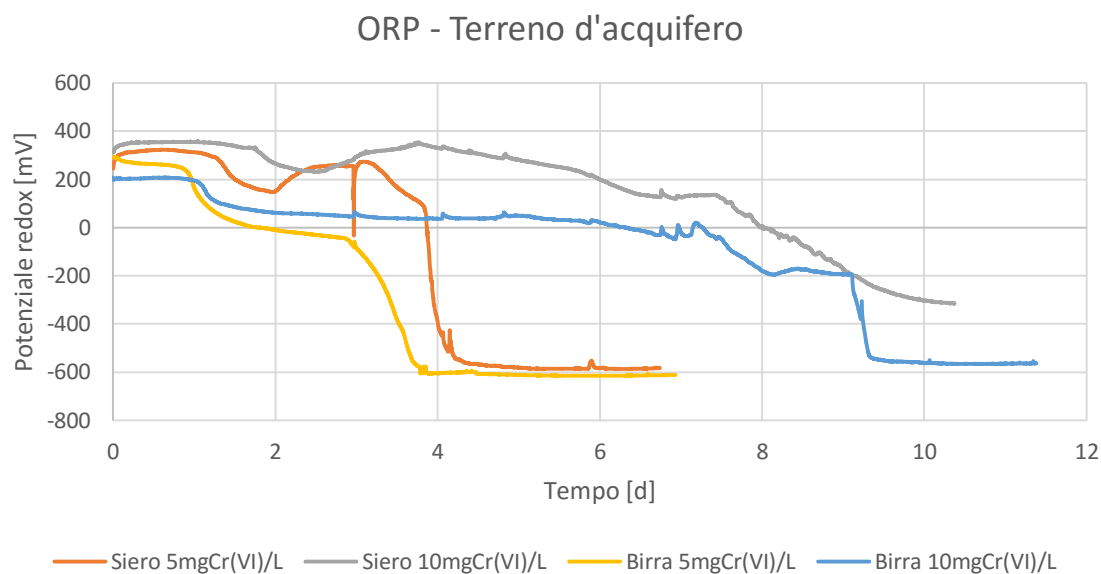


Fig 4.16 - Andamento delle curve ORP alle diverse concentrazioni di cromo e con diversi substrati dei sistemi realizzati con terreno d'acquifero per lo studio delle cinetiche di rimozione del contaminante

La prima caratteristica comune a tutte le curve di potenziale redox che emerge dalla sperimentazione con terreno d'acquifero è una discesa a potenziali negativi anticipata rispetto alla sabbia di almeno un giorno, in tutte e quattro le configurazioni. Questo fenomeno può essere dovuto alla maggior carica batterica autoctona nella nuova matrice solida; a fronte di un numero di microrganismi più elevato si riscontra un consumo di ossigeno totale del sistema più rapido. Tale ipotesi trova riscontro peraltro nelle curve di concentrazione di ossigeno riportate in Fig 4.17 e Fig 4.18, rispettivamente per il microcosmo contenente siero e birra alla medesima concentrazione iniziale di inquinante (5 mg Cr(VI)/L).

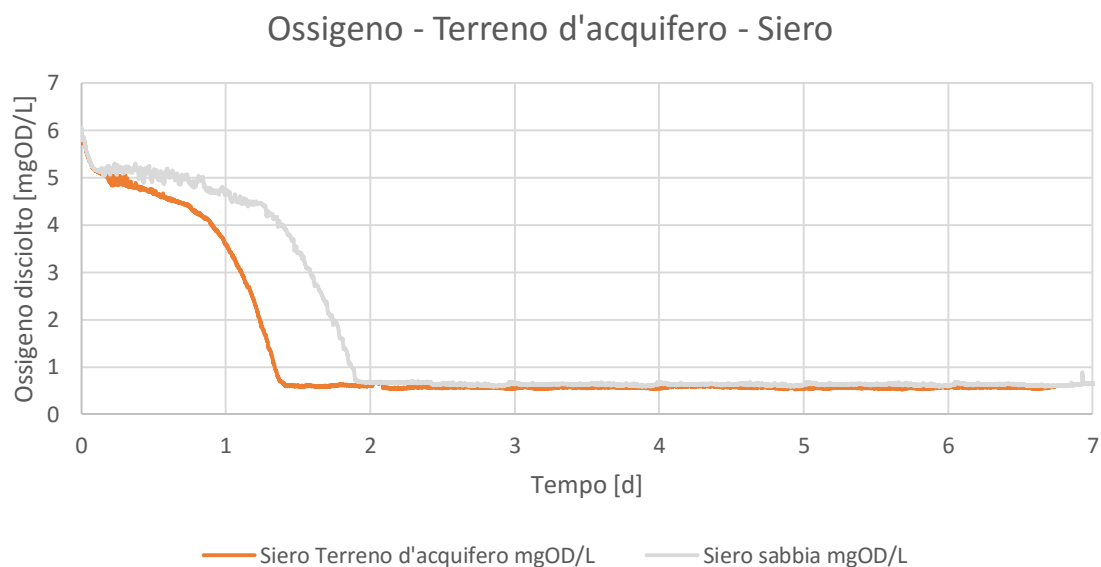


Fig 4.17 - Confronto negli andamenti dell'ossigeno disciolto tra i microcosmi realizzati con terreno d'acquifero e sabbia con substrato permeato di siero di latte alla concentrazione iniziale di 5 mgCr(VI)/L.

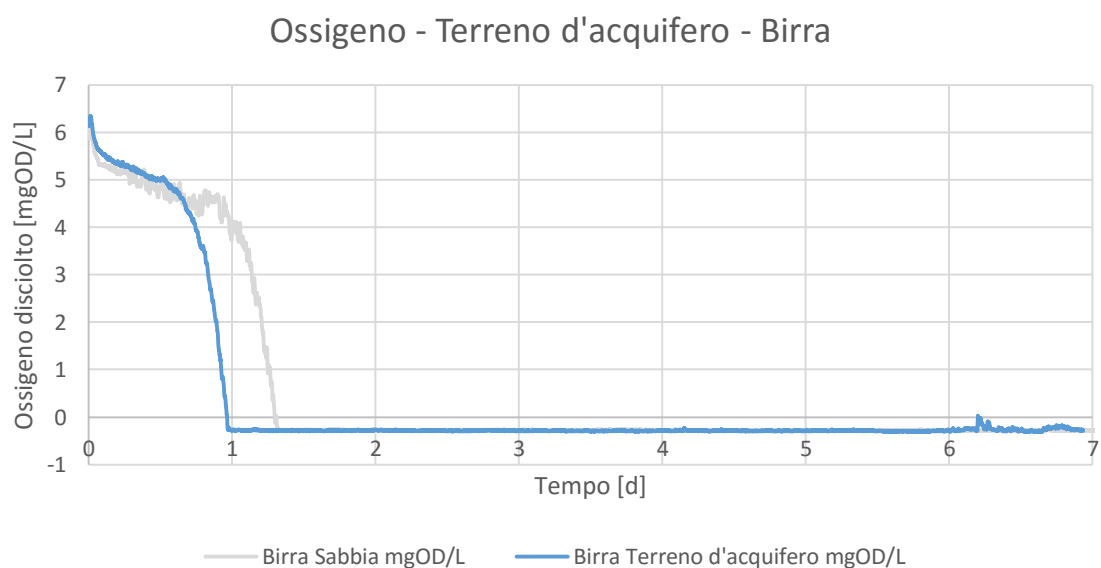


Fig 4.18 - Confronto negli andamenti dell'ossigeno disciolto tra i microcosmi realizzati con terreno d'acquifero e sabbia con substrato scarto da birrificazione e concentrazione iniziale pari a 5 mgCr(VI)/L.

In entrambi i casi, il terreno d'acquifero mostra un'anticipazione del raggiungimento di concentrazioni prossime a 0 mg OD/L, pari mediamente a 12 ore. L'utilizzo dello scarto da birrificazione come substrato, anche in questo caso risulta di maggiore efficacia.

I sistemi alimentati con scarto da birrificazione hanno un periodo di transizione, da ambiente aerobico a riducente, analogo ai microcosmi con sabbia a entrambe le concentrazioni iniziali di contaminante (2 giorni). Si è riscontrato anche in questo caso un

lag nel raggiungimento di condizioni riducenti per concentrazioni iniziali di 10 mg Cr(VI)/L. Le considerazioni appena fatte valgono anche per i microcosmi con siero a entrambe le condizioni iniziali di Cr(VI).

Una differenza più marcata rispetto ai sistemi con sabbia si evidenzia nella curva ORP dei microcosmi di tipo 1 e 3; la maggiore carica batterica del terreno d'acquifero provoca un raggiungimento di condizioni riducenti nella metà del tempo. Il consumo totale degli accettori degli elettroni con terreno d'acquifero è incentivato nei microcosmi nei quali è stato iniettato scarto da birrificazione. Analogamente a quanto visto per la sabbia, si osserva un tempo per raggiungere valori redox negativi stabili di circa 2 giorni, anche se i sistemi con il terreno d'acquifero, essendo esso più ricco di microrganismi, raggiungono anticipatamente valori redox prossimi a -400 mV. Identicamente a quanto fatto per i microcosmi realizzati con sabbia, si riportano in Fig 4.19 le cinetiche di rimozione ottenute dalla sperimentazione con terreno d'acquifero e le relative tabelle mostranti concentrazioni e percentuale di abbattimento del Cr(VI).

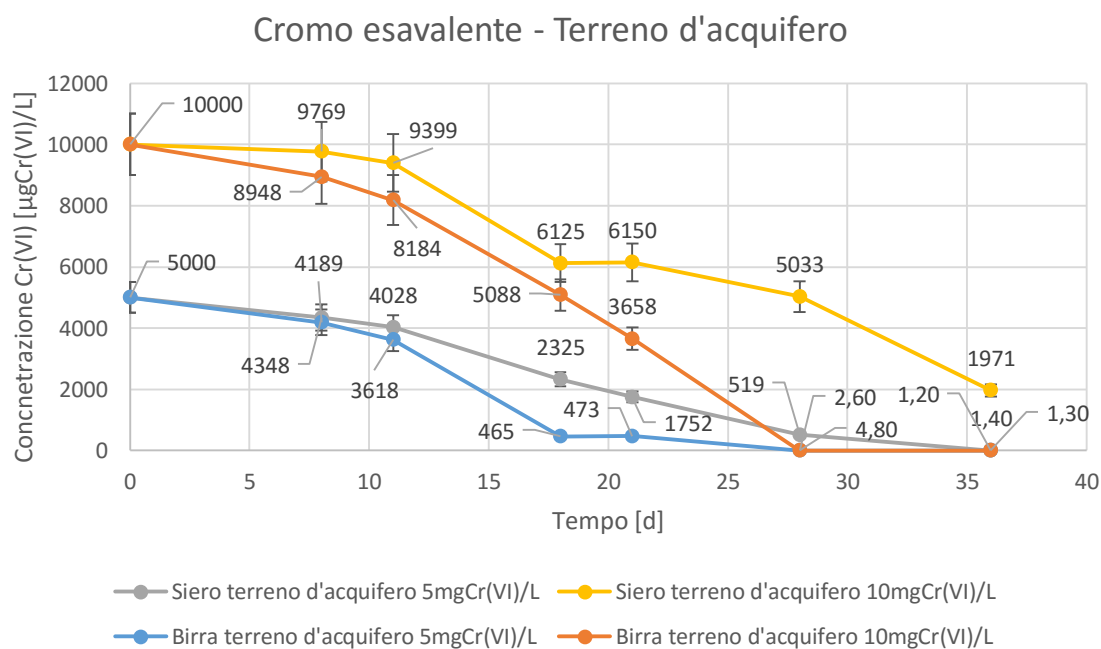


Fig 4.19 - Andamento delle cinetiche di rimozione del Cr(VI) nei microcosmi con terreno d'acquifero

Tutte le cinetiche dei sistemi con terreno d'acquifero sono state analizzate agli stessi intervalli di tempo in quanto la rimozione, già testata nelle prove preliminari, ha mostrato fin da subito percentuali di abbattimento dell'inquinante apprezzabili per tutte e quattro le configurazioni. A fine sperimentazione si può notare come entrambi i microcosmi realizzati

con substrato da birrificio e il microcosmo con permeato di siero di latte con concentrazione iniziale di 5 mgCr(VI)/L abbiano raggiunto concentrazioni inferiori a 5 µg/L. Questi valori di abbattimento non si riscontrano nel sistema con siero e 10 mg Cr(VI)/L, nel quale non si raggiunge la CSC di cui al DLgs 152/06 per le acque di falda. Il rateo di rimozione massimo si osserva tra gli 11 e i 18 giorni, in accordo con quanto emerso dalle prove per il rilascio di Fe(II) (Capitolo 4.3.4). Il microcosmo con scarto da birrificazione e 5 mgCr(VI)/L mostra la più alta capacità di abbattimento in quanto si sono raggiunte concentrazioni di Cr(VI), dopo 36 giorni di incubazione, pari a 1,2 µg Cr(VI)/L. La percentuale di abbattimento risulta in questo caso massima e prossima al 99,98 % (Tab 4.34).

Giorni dall'allestimento	Conc. media [µg/l]	% Abbattimento
0	5000 ± 500	-
8	4190 ± 419	16,21%
11	3618 ± 362	27,65%
18	465 ± 47	90,71%
21	473 ± 47	90,54%
28	4,80 ± 0,5	99,90%
36	1,20 ± 0,12	99,98%

Tab 4.34 - Andamento nel tempo della concentrazione di Cr(VI) nel tempo dei diversi replicati realizzati con terreno d'acquifero e substrato scarto da birrificazione alla concentrazione iniziale di 5 mgCr(VI)/L. Vengono riportate le percentuali di abbattimento l'errore del metodo colorimetrico

Già nei primi 11 giorni si osserva un abbattimento significativo, pari a circa il 30 %, legato al rapido raggiungimento di condizioni riducenti. Questo andamento tra 11 e 18 giorni trova conferma sulle considerazioni effettuate precedentemente riguardo il rilascio di Fe(II) il quale promuove una precipitazione a sua volta favorita dalle basse temperature a cui è stata eseguita la sperimentazione. La cinetica di rimozione del microcosmo con siero e 5 mgCr(VI)/L vede invece una concentrazione finale pari a 1,4 µgCr(VI)/L e una percentuale di abbattimento pari a 99,97 % come mostrato in Tab 4.35.

Giorni dall'allestimento	Conc. media [µg/l]	% Abbattimento
0	5000 ± 500	-
8	4349 ± 435	13,03%
11	4028 ± 403	19,44%
18	2325 ± 233	53,50%
21	1752 ± 175	64,96%
28	519 ± 52	89,63%
36	1,40 ± 0,14	99,97%

Tab 4.35 - Andamento nel tempo della concentrazione di Cr(VI) nel tempo dei diversi replicati realizzati con terreno d'acquifero e substrato permeato di siero di latte alla concentrazione iniziale di 5 mgCr(VI)/L. Vengono riportate le percentuali di abbattimento l'errore del metodo colorimetrico

La curva di rimozione, pur lavorando a un valore di COD equivalente alle prove effettuate con scarto da birrificazione, mostra una pendenza meno marcata durante tutto l'arco di esecuzione della sperimentazione. Ottimi risultati sono riscontrabili anche per quanto riguarda la rimozione utilizzando scarto da birrificazione a concentrazioni più elevate di Cr(VI) (10 mg/L).

Un abbattimento dell'99,99% si osserva dopo 36 giorni dall'allestimento delle prove, a cui corrisponde una concentrazione di inquinante pari a 1,3 µgCr(VI)/L. Osservando i dati in Tab 4.36 emerge un rateo di rimozione pressoché lineare a partire dall'ottavo giorno di incubazione.

Giorni dall'allestimento	Conc. media [µg/l]	% Abbattimento
0	10000 ± 1000	-
8	8948 ± 895	10,52%
11	8184 ± 818	18,16%
18	5088 ± 509	49,13%
21	3658 ± 366	63,42%
28	2,60 ± 0,26	99,99%
36	1,30 ± 0,13	99,99%

Tab 4.36 - Andamento nel tempo della concentrazione di Cr(VI) nel tempo dei diversi replicati realizzati con terreno d'acquifero e substrato permeato di siero di latte alla concentrazione iniziale di 10 mgCr(VI)/L. Vengono riportate le percentuali di abbattimento l'errore del metodo colorimetrico

Lo scarto da birrificazione si conferma essere il substrato che rende il meccanismo di abbattimento più efficiente. Sono state formulate due ipotesi per giustificare questo comportamento:

1. le molecole dello scarto da birrificazione sembrano più appetibili per le colonie batteriche autoctone del terreno e del substrato stesso.
2. la complessità del substrato, come già presentato in letteratura, può avere proprietà chelanti sulla forma esavalente del cromo causandone la precipitazione sotto forma di composti complessi.

I risultati meno performanti si sono ottenuti nelle prove con permeato di siero di latte ed una concentrazione iniziale di 10 mg Cr(VI)/L

In questo caso, a fronte di un abbattimento del 80,29 %, si riscontra una concentrazione finale pari a 1971 µg Cr(VI)/L (Tab 4.37).

Giorni dall'allestimento	Conc. media [$\mu\text{g/l}$]	% Abbattimento
0	10000 \pm 1000	-
8	9769 \pm 977	2,31%
11	9400 \pm 940	6,01%
18	6125 \pm 613	38,75%
21	6150 \pm 615	38,50%
28	5033 \pm 503	49,67%
36	1971 \pm 197	80,29%

Tab 4.37 - Andamento nel tempo della concentrazione di Cr(VI) nel tempo dei diversi replicati realizzati con terreno d'acquifero e substrato permeato di siero di latte alla concentrazione iniziale di 10 mgCr(VI)/L. Vengono riportate le percentuali di abbattimento l'errore del metodo colorimetrico

Il comportamento di questo tipo di microcosmo risulta differente dall'analogo con sabbia, in quanto si osservano percentuali di abbattimento superiori al 80%. Tale comportamento conferma la miglior risposta dei sistemi realizzati con terreno d'acquifero rispetto agli analoghi con sabbia. Si riporta infine l'andamento nel tempo del pH campionato puntualmente (Fig 4.20).

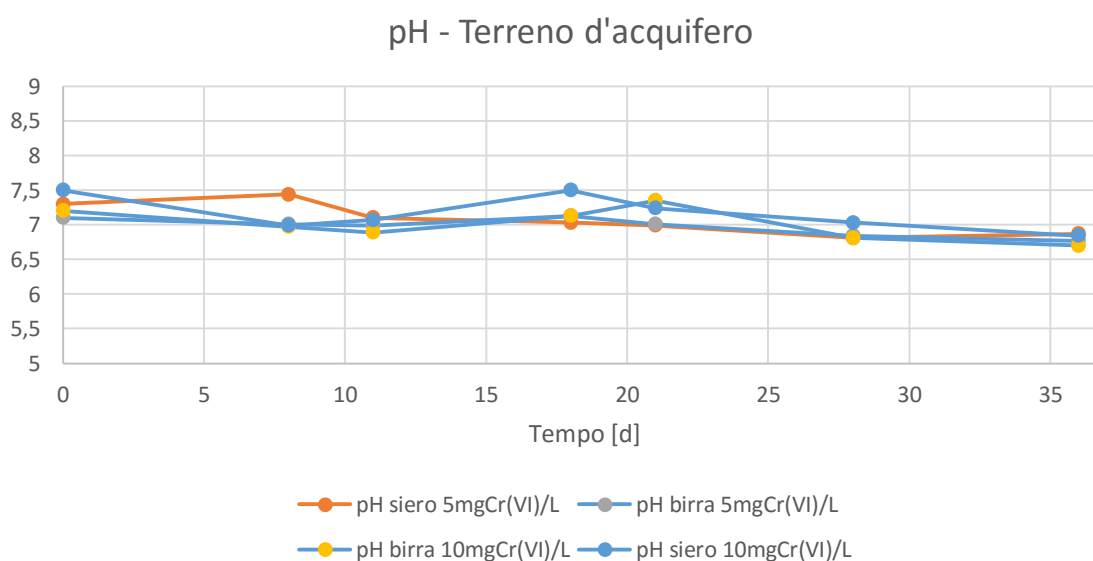


Fig 4.20 - Andamento dei valori di pH per i microcosmi realizzati con terreno d'acquifero per lo studio della cinetica di rimozione del contaminante

Dai dati raccolti emerge come la basicità del terreno non influenzi, durante la durata dell'intera prova, il pH della soluzione. Le variazioni si attestano entro $\pm 0,5$ unità di pH dal valore iniziale.

4.4 CONCLUSIONI

Dai risultati presentati nel seguente capitolo emerge quanto segue:

- la presenza di Fe(II) all'interno dei microcosmi è un fattore chiave, nonché un parametro limitante, nel processo di abbattimento del contaminante. Dopo 10 giorni si è osservato un rilascio di Fe(II) da parte del terreno d'acquifero e della sabbia rispettivamente pari a 1340 µg/L e 58 µg/L;
- in tutti i sistemi il consumo di ossigeno, ovvero il raggiungimento di condizioni anossiche, avviene al massimo entro 2 giorni dall'inizio dell'incubazione;
- i microcosmi alimentati con substrato da birrificio e con concentrazione iniziale di 5 mgCr(VI)/L raggiungono valori redox negativi pari a -600 mV in 4 e 6 giorni rispettivamente nei sistemi allestiti con terreno d'acquifero e sabbia;
- i microcosmi caratterizzati da una concentrazione iniziale di 10 mg Cr(VI)/L raggiungono condizioni stabili a redox negativi in un tempo maggiore. Sia con terreno d'acquifero che con sabbia, necessitano 10 giorni per raggiungere valori redox di -200 mV (con permeato di siero di latte) e -400 mV (con scarto da birrificazione);
- i microcosmi realizzati con terreno d'acquifero sono caratterizzati da un consumo più rapido degli accettori degli elettroni; questo è imputabile alla maggior carica batterica (10^6 UFC/100 mL) propria della matrice solida;
- i microcosmi con sabbia aventi una concentrazione iniziale di 10 mg Cr(VI)/L presentano abbattimento di contaminante inferiore al 50% per entrambi i substrati testati. Il microcosmo allestito con sabbia, scarto da birrificazione e 5 mgCr(VI)/L ha mostrato l'efficienza di abbattimento più elevata (> 99,9%) tra tutti quelli con sabbia, in quanto si sono raggiunte, dopo 36 giorni di incubazione, concentrazioni minori di 5 µg Cr(VI)/L (4,70 µgCr(VI)/L);
- i microcosmi allestiti con terreno d'acquifero presentano tutte concentrazioni di contaminante, dopo 36 giorni di sperimentazione, minori delle CSC previste dal Dlg.s 152/2006 (< 5 µgCr(VI)/L), ad esclusione del sistema con permeato di siero di latte e 10 mg Cr(VI)/L.
- la temperatura di 17 ± 1 °C, se da un lato promuove la precipitazione del contaminante, dall'altro rallenta l'attività batterica. Ne conseguono quindi

efficienze di abbattimento più elevate e tempi di raggiungimento di condizioni anaerobiche maggiori;

- i valori di pH con entrambe le matrici (sabbia e terreno d'acquifero) non hanno mostrato variazioni significative, in quanto i valori sono risultati prossimi alla neutralità ($7\pm 0,5$) per tutta la durata della prova. L'applicazione di tali substrati in campo non comporterebbe quindi radicali variazioni delle condizioni del sistema naturale.

CONCLUSIONI

Il cromo esavalente è riconosciuto come uno dei metalli fortemente cancerogeni e con un'ampia diffusione in ambiente. Risulta quindi necessario ricercare soluzioni alternative ed innovative alle tecnologie di bonifica esistenti, in modo da rendere l'abbattimento di tali contaminazioni economicamente sostenibile.

Con il seguente elaborato si è voluto valutare la rimozione del Cr(VI) in acque di falda mediante l'utilizzo di substrati carboniosi per la promozione di attività batterica eterotrofa e conseguente ottenimento di condizioni anaerobiche riducenti. In tale ambiente, il metallo pesante tende a precipitare con stato di ossidazione +3, sotto forma di idrossidi meno mobili e non cancerogeni.

Come mostrato nel Capitolo 4, sono stati utilizzati due differenti terreni (sabbia e terreno d'acquifero) e due diversi substrati (permeato di siero di latte e substrato da birrificazione), opportunamente caratterizzati. Il raggiungimento delle condizioni riducenti è stato promosso dall'iniezione di un quantitativo di substrato opportunamente dosato in funzione delle caratteristiche della matrice acquosa, in modo da consumarne completamente gli accettori di elettroni degli ambienti aerobico e anossico.

Le prove sono state condotte in modalità batch, realizzando microcosmi, che sacrificati ad opportuni intervalli temporali, hanno permesso di seguire la decrescita della contaminazione dicioletta, oltre che ossigeno disciolto e potenziale redox.

I risultati hanno mostrato come le condizioni di precipitazione teoriche mostrate dal diagramma di Pourbaix non si verificano in un sistema reale. È stato infatti necessario il raggiungimento di potenziali redox stabili ed inferiori a -200 mV per osservare riduzione della concentrazione di Cr(VI).

In linea generale, gli abbattimenti più elevati si sono verificati nei microcosmi realizzati con terreno d'acquifero, raggiungendo in 36 d percentuali di abbattimento > 99,9% per tutte le configurazioni, ad esclusione di quella alimentata con permeato di siero di latte e concentrazione iniziale di 10 mg Cr(VI)/L; in questo caso l'abbattimento è risultato pari all'80%. Per quanto riguarda i microcosmi realizzati con sabbia, il maggiore abbattimento si è verificato per il microcosmo alimentato con scarto da birrificazione con una concentrazione iniziale di 5 mg Cr(VI)/L, il quale ha raggiunto concentrazione finale pari a 4,7 µg Cr(VI)/L.

In conclusione si può affermare che il substrato con valore di TOC più elevato, a parità di COD, rende più rapidi i meccanismi che portano alla riduzione della forma esavalente di cromo. Lo scarto da birrificazione risulta essere il substrato più efficace; si sono riscontrati comunque ottimi risultati anche utilizzando il permeato di siero di latte.

Anche le concentrazioni iniziali di contaminante immesso influenzano le condizioni che si possono instaurare nel sistema, rendendo talora non raggiungibili la CSC del DLgs 152/06 per le acque di falda.

In tutti i microcosmi, sia quelli realizzati con sabbia sia con terreno d'acquifero, la presenza di ferro bivalente è un elemento fondamentale per la rimozione del cromo esavalente.

I valori di pH rilevati in tutti i replicati dei microcosmi hanno mostrato come, anche dopo 36 giorni, non vi siano effetti di basificazione significativa del sistema.

Un'eventuale iniezione in acquifero dei substrati testati potrebbe portare al raggiungimento di concentrazione di cromo esavalente al di sotto del valore soglia previsto dalla normativa vigente in tema di siti contaminati ($5 \mu\text{gCr(VI)/L}$).

Tale elaborato può essere utilizzato come punto di partenza teorico e sperimentale per future ricerche in tema di processi biologici applicati al Cr(VI) per bonifiche in situ di acqua di falda. A fronte di quanto discusso nell'elaborato, sarebbe interessante approfondire la possibilità di una bonifica che combini un processo biologico a un potenziamento della riduzione chimica e co-precipitazione mediante aggiunta di ferro bivalente. Si potrebbero inoltre speciare i microrganismi coinvolti nella riduzione anaerobica e ricercare eventuali cromo-riduttori. Sarà necessario indagare riguardo le condizioni del sistema in grado di riossidare i precipitati trivalenti del cromo, in funzione della mineralogia del terreno, delle caratteristiche chimico-fisiche delle acque di falda e dai parametri idrogeologici dell'acquifero. Un'ulteriore prova interessante in ambiente anaerobico sarebbe quella di confrontare gli scarti utilizzati in questo elaborato con reagenti a marchio registrato, per capirne la possibile collocazione nel mercato delle tecnologie di bonifica. In ultimo, prove in microcosmo potrebbero essere condotte in ambiente aerobico, al fine di investigare la bioriduzione diretta del Cr(VI) tramite inoculazione di ceppi batterici cromo-detossificanti.

ALLEGATO A - CARATTERIZZAZIONE DEI TERRENI

UMIDITÀ

L'umidità viene determinata per via gravimetrica come perdita in peso del suolo dopo riscaldamento a 105 °C per 24 h. In una capsula in alluminio precedentemente tarata (Fig A.1) (pretrattata riscaldandola a 105 °C per 24 h per rimuovere la possibile umidità residua) vengono pesati circa 10 g di terreno tal quale.



Fig A.1 - Attività di laboratorio- forno per il riscaldamento dei campioni a 105 °C per 24h

Il campione viene posto in stufa a 105 °C per 24 h; al termine di questo periodo il campione, nel quale non vi è più acqua libera residua, viene nuovamente pesato.



Fig A.2 - Attività di laboratorio- Porta campioni in alluminio (capsule)



Fig A.3 - Attività di laboratorio - Campioni dopo il trattamento

L'umidità può essere espressa come rapporto tra la massa d'acqua presente nel campione, differenza tra peso netto del suolo tal quale e peso netto del suolo dopo riscaldamento, e la sola massa della fase solida oppure come rapporto tra la massa d'acqua presente nel campione e la massa totale del campione. Nel primo caso si esprime come % riferita alla sostanza secca (s.s.) nel secondo come % riferita al tal quale (t.q.). Questa procedura è stata ripetuta quattro volte sia per la sabbia che per il terreno proveniente dall'acquifero per una migliore elaborazione statistica. Nelle Tab A.1 e Tab A.2 sono riportati i dati misurati necessari alla determinazione dei valori di umidità rispettivamente per la sabbia e terreno d'acquifero:

N° vaschetta	Tara	Terreno T.Q.	Lordo, dopo stufa	Ms	Mw	W % terreno secco
[-]	[g]	[g]	[g]	[g]	[g]	[g _{H2O} /g _{ss}]
3	4,0998	10,050	14,143	10,043	0,007	6,67
4	4,2893	10,063	14,345	10,056	0,007	6,86
9	4,1766	10,074	14,244	10,068	0,006	6,36
18	4,2963	10,023	14,314	10,017	0,006	5,99
20	4,2878	10,022	13,711	9,423	0,599	6,35

Tab A.1 - Dati acquisti necessari al calcolo dell'umidità della sabbia

N° vaschetta	Tara	Terreno T.Q.	Lordo, dopo stufa	Ms	Mw	W % terreno secco
[-]	[g]	[g]	[g]	[g]	[g]	[g _{H2O} /g _{ss}]
3	4,0999	10,973	14,160	10,060	0,913	9,1
4	4,2896	9,806	13,281	8,992	0,814	9,1
9	4,1768	10,290	13,600	9,423	0,867	9,2
18	4,2961	10,161	13,597	9,301	0,860	9,2
20	4,2879	10,147	13,589	9,301	0,846	9,1

Tab A.2 - Dati acquisti necessari al calcolo dell'umidità per il terreno d'acquifero

Le prove sono state replicate in 5 capsule di alluminio per ciascun terreno. Dai risultati emerge un valore di umidità media per la sabbia pari al 6,45% mentre per quanto riguarda il terreno d'acquifero risulta pari a 9,1%. Il valore di umidità percentuale così ridotto per la sabbia è attribuibile alla conservazione prolungata in un luogo asciutto e ventilato.

FRAZIONE DI CARBONIO ORGANICO

La frazione di carbonio organico è stimata a partire dal contenuto di solidi volatili presenti nel campione, questi ultimi determinati per via gravimetrica mediante riscaldamento del campione a 550 °C per 2 h. In una capsula in ceramica precedentemente tarata (il peso viene preso dopo riscaldamento a 550 °C per 2 h per rimuovere ogni possibile residuo volatile presente nella capsula), si pesano circa 15 g di terreno precedentemente essiccato (posto cioè in stufa a 105 °C per almeno 24 h). Il campione viene posto in muffola a 550 °C; il conteggio del tempo di prova, ovvero le 2h, partono dal momento in cui si raggiunge effettivamente la temperatura di 550 °C; il tempo totale in muffola sarà quindi la somma del tempo necessario per raggiungere i 550 °C e delle due ore di tempo di permanenza in muffola. Al termine del tempo di permanenza stabilito, i campioni devono essere raffreddati in essiccatore e successivamente pesati. La massa dei solidi volatili è la differenza tra il peso netto di terreno secco misurato prima del riscaldamento a 550 °C per 2 h e il peso netto del campione dopo tale riscaldamento. La percentuale di volatili nel terreno è data dal rapporto tra la massa di solidi volatili e la massa di terreno secco. La frazione di carbonio organico del terreno si ottiene moltiplicando la percentuale di solidi volatili sopra calcolata per un parametro pari a 0,5. Per consentire l'elaborazione statistica si sono effettuati tre replicati per ciascuna matrice solida.

I dati relativi alla prova sperimentale sono riportati in Tab A.3 per la sabbia e in Tab A.4 per il terreno d'acquifero.

Campione	Tara	Peso netto prima riscaldamento	Peso lordo dopo 550	Solidi volatili	Volatili terreno	foc
	[g]	[g]	[g]	[g]	[%]	[%]
98	71,15	15,0726	86,1404	0,0782	0,52	0,26
83	68,2356	15,0584	83,2127	0,0813	0,54	0,27
26	65,4753	15,0203	80,4084	0,0872	0,58	0,29

Tab A.3 - dati acquisiti necessari al calcolo della frazione di carbonio organico per la sabbia

Campione	Tara	Peso netto prima riscaldamento	Peso lordo dopo 550	Solidi volatili	Volatili terreno	foc
	[g]	[g]	[g]	[g]	[%]	[%]
98	71,1502	10,0128	81,0375	0,1255	1,25	0,63
83	68,2366	10,0341	78,1548	0,1159	1,16	0,58
26	65,4745	9,9849	75,3463	0,1131	1,13	0,57

Tab A.4 - dati acquisti necessari al calcolo della frazione di carbonio organico per il terreno d'acquifero

Secondo lo schema interpretativo ARPAV riguardo la classificazione dei suoli in base al contenuto di sostanza organica (Tab A.5) la sabbia risulta essere un terreno molto povero di sostanza organica in quanto la media di tale valore risulta essere 0,55% mentre per il terreno proveniente dall'acquifero è possibile classificarlo come scarso in quanto il valore si attesta pari a 1,19%. Nella pianura veneta, così come in altre aree della Pianura Padana, ci sono pochi terreni molto poveri (<1%) di sostanza organica, mentre più diffusi (30-35% dei casi) sono i terreni scarsamente dotati (tra 1 e 1,8) (ARPAV) (Giandon & Bortolami, 2007).

Giudizio	Sostanza Organica %
Molto povero	<0,8
Scarso	0,8-1,2
Medio	1,2-2,0
Buono	2,0-4,0
Ricco	4,0-8,0
Molto ricco	>8,0

Tab A.5 - Metodo di valutazione secondo ARPAV per la sostanza organica

Il valor medio di foc per la sabbia è pari a 0,273% mentre per il terreno d'acquifero è prossimo a 0,59%. Anche se i due terreni non possiedono un elevato valore di foc questo non implica una ridotta abbondanza in termini di popolazione batterica; è stato necessario quindi effettuare un'aggiuntiva conta batterica.

DISTRIBUZIONE GRANULOMETRICA

La prova di distribuzione granulometrica viene eseguita tramite setacciatura meccanica. Il campione in testa ad una pila di setacci aventi apertura delle maglie progressivamente decrescente. Un'aliquota di terreno precedentemente essiccato ($M_{\text{secco,tot}}$) viene caricata su un setacciatore meccanico e fatta passare per 15 minuti attraverso la colonna di setacci.



Fig A.4 - Vista di un campione proveniente dall'acquifero



Fig A.5 - Attività di laboratorio- allestimento della prova granulometrica mediante l'utilizzo di setacci posti in serie con luce di passaggio decrescente

Essendo la sabbia caratterizzata da una dimensione dei grani media compresa tra 60 μm e 2000 μm , si sono selezionati i setacci posti in serie aventi le seguenti luci di passaggio: 4000, 2000, 600, 400 e 63 μm . Il test granulometrico, così impostato, è stato eseguito 3 volte per garantire la giusta replicabilità. Per quanto riguarda il terreno proveniente dall'acquifero si è scelta una batteria di setacci con range di maglie più ampio in quanto ci si aspetta una granulometria più ampiamente distribuita. I setacci utilizzati in questo caso sono: 40000, 20000, 10000, 6000, 4000, 3000, 1000, 600, 400, 63 μm . A fine prova, sul setaccio i -esimo si troverà un quantitativo di campione il cui peso M_i è una frazione di $M_{\text{secco,tot}}$, ovvero della massa totale di terreno secco inserito. La percentuale di campione bloccata nel setaccio i -esimo sarà quindi data dal rapporto tra M_i e $M_{\text{secco,tot}}$.



Fig A.6 - Attività di laboratorio- setacciatore con pedana vibrante in funzione per 15 minuti per effettuare l'analisi granulometrica

Per una corretta valutazione statistica le prove per ogni tipologia di terreno sono state svolte in triplicato. Vengono riportati (Tab A.6, Tab A.7e Tab A.8) i valori ottenuti necessari alla tracciatura della curva granulometrica (Fig A.7) delle tre prove distinte realizzate sulla matrice sabbia.

Peso Totale	Tara Vaschetta	Tara Setacci	Soprav. vaschetta	Setaccio sporco	Terreno netto tratt.	Distr.Gr	Distr. Gr. Cumul.		
[g]	[g]	[μ m]	[g]	[g]	[g]	[%]	[%]		
770,86	A	11,84	4000	1062,47	11,84	1062,48	0	0,0%	0,0%
	B	11,79	2000	882,58	67,85	883,68	57,16	7,4%	7,4%
	C	11,82	600	858,88	262,03	859,46	250,79	32,5%	40,0%
	D	11,87	400	792,39	336,32	793,68	325,74	42,3%	82,2%
	E	11,88	63	728,63	148,78	728,61	136,88	17,8%	100,0%
	F	11,93	<63	1180,77	11,93	1181,00	0,23	0,0%	100,0%

Tab A.6 - Dati acquisiti necessari al calcolo della distribuzione granulometrica. I dati in tabella si riferiscono alla prima di tre prove

Peso Totale	Tara Vaschetta	Tara Setacci		Soprav. vaschetta	Setaccio sporco	Terreno netto tratt.	Distr.Gr	Distr. Gr. Cumul.
[g]	[g]	[μm]	[g]	[g]	[g]	[g]	[%]	[%]
770,09	A	11,85	4000	1062,46	11,85	1062,46	0	0,0%
	B	11,81	2000	882,61	98,31	883,41	87,30	12,5%
	C	11,86	600	861,07	229,19	860,54	216,80	31,0%
	D	11,88	400	792,46	307,06	794,04	296,76	42,5%
	E	11,91	63	728,61	109,99	728,61	98,08	14,0%
	F	11,93	<63	1180,79	11,93	1180,93	0,14	0,0%

Tab A.7- Dati acquisiti necessari al calcolo della distribuzione granulometrica. I dati in tabella si riferiscono alla seconda di tre prove

Peso Totale	Tara Vaschetta	Tara Setacci		Soprav. vaschetta	Setaccio sporco	Terreno netto tratt.	Distr.Gr	Distr. Gr. Cumul.
[g]	[g]	[μm]	[g]	[g]	[g]	[g]	[%]	[%]
771,27	A	11,84	4000	1062,42	11,84	1062,42	0	0,0%
	B	11,79	2000	882,51	81,46	884,93	72,09	9,3%
	C	11,84	600	859,00	273,58	859,77	262,51	34,0%
	D	11,89	400	792,68	319,58	793,56	308,57	40,0%
	E	11,88	63	728,60	139,89	728,60	128,01	16,6%
	F	11,93	<63	1180,77	0,00	1180,93	0,16	0,0%

Tab A.8 - Dati acquisiti necessari al calcolo della distribuzione granulometrica. I dati in tabella si riferiscono alla terza di tre prove

Distribuzione granulometrica

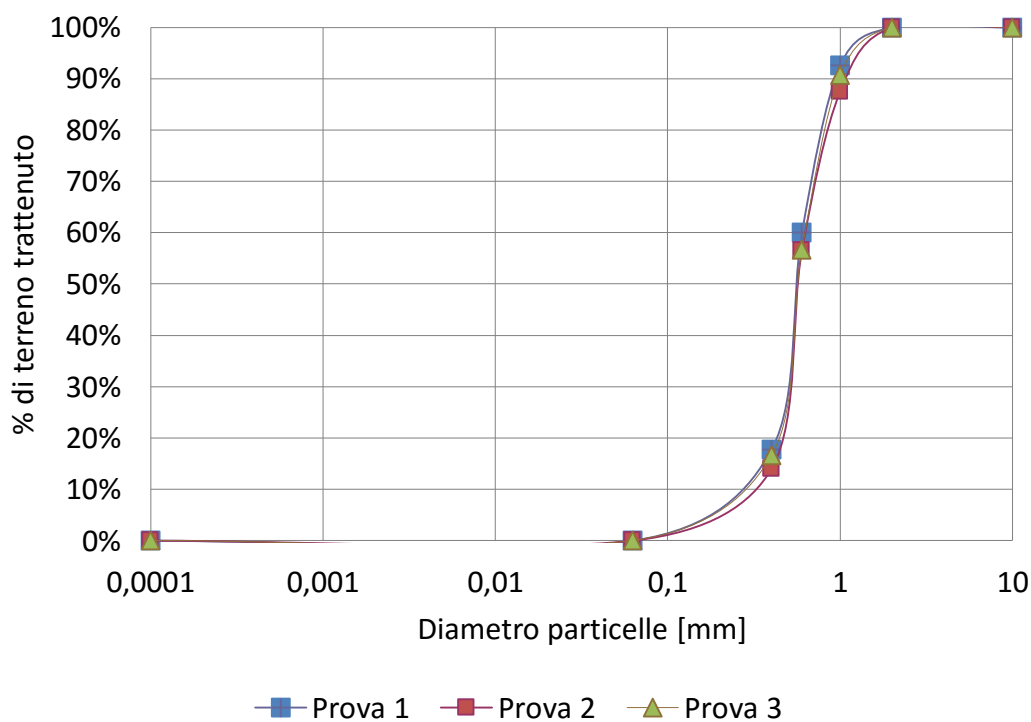


Fig A.7 - Andamento della distribuzione granulometrica della sabbia

La distribuzione granulometrica ottenuta, analizzata secondo standard ASTM (American Society Standard Material), evidenzia una composizione come quella riportata in Tab A.9 sottostante.

Diametro [mm]	Classificazione	%
0,063-0,08	Limo	3
0,08-0,4	Sabbia fine	15
0,4-2	Sabbia media	82

Tab A.9 - Tabella classificazione AGI I

Dalla nomenclatura AGI (Associazione Geotecnici Italiana), alla luce delle percentuali ottenute, il terreno analizzato prende il nome di sabbia. Per quanto riguarda il terreno proveniente dall'acquifero, vengono riportate di seguito le tabelle relative alle tre prove granulometriche (Tab A.10, Tab A.11 e Tab A.12):

Peso Totale	Tara Vaschetta	Tara Setacci	Soprav. vaschetta	Setaccio sporco	Terreno netto tratt.	Distr. Gr	Distr. Gr. Cumul.	
[g]	[g]	[µm]	[g]	[g]	[g]	[%]	[%]	
573,54	A	11,84	40000	1062,47	11,84	1062,47	0,00	0
	B	11,99	20000	1029,72	75,28	1029,72	63,29	11,0
	C	12,01	10000	985,70	55,27	985,67	43,23	7,5
	D	11,56	6000	1070,88	77,54	1070,91	66,01	11,5
	E	12,2	4000	1062,41	61,75	1062,70	49,84	8,7
	F	12,2	3000	1162,82	31,33	1162,93	19,24	3,4
	G	12,09	1000	911,68	86,510	915,09	77,83	13,6
	H	11,96	600	858,97	43,57	859,41	32,05	5,6
	I	7,38	400	792,46	50,63	792,77	43,56	7,6
	L	7,4	63	728,58	119,64	744,28	127,94	22,3
	M	7,39	<63	1180,83	57,60	1181,02	50,40	8,8

Tab A.10 - Dati acquisiti necessari al calcolo della distribuzione granulometrica. I dati in tabella si riferiscono alla prima di tre prove per il terreno d'acquifero

Peso Totale	Tara Vaschetta	Tara Setacci	Soprav. vaschetta	Setaccio sporco	Terreno netto tratt.	Distr. Gr	Distr. Gr. Cumul.	
[g]	[g]	[µm]	[g]	[g]	[g]	[%]	[%]	
551,49	A	11,84	40000	1062,47	11,84	1062,47	0,00	0
	B	11,99	20000	1029,72	75,28	1029,72	63,29	11,5
	C	11,96	10000	985,66	59,64	985,70	47,72	8,7
	D	11,14	6000	1070,88	51,02	1070,86	39,86	7,2
	E	11,86	4000	1062,47	49,30	1063,26	38,23	6,9
	F	11,85	3000	1162,64	30,43	1162,86	18,80	3,4
	G	11,91	1000	911,71	87,390	912,75	76,52	13,9

	H	11,82	600	859,02	48,84	859,56	37,56	6,8	58,5
	I	7,35	400	792,46	52,26	792,77	45,22	8,2	66,7
	L	7,37	63	728,66	131,57	731,17	126,71	23,0	89,7
	M	7,33	<63	1180,78	63,01	1181,87	56,77	10,3	100,0

Tab A.11 - Dati acquisiti necessari al calcolo della distribuzione granulometrica. I dati in tabella si riferiscono alla seconda di tre prove per il terreno d'acquifero

Peso Totale	Tara Vaschetta	Tara Setacci		Soprav. vaschetta	Setaccio sporco	Terreno netto tratt.	Distr. Gr	Distr. Gr. Cumul.
[g]	[g]	[μ m]	[g]	[g]	[g]	[g]	[%]	[%]
555,54	A	11,84	40000	1062,47	11,84	1062,47	0,00	0
	B	11,99	20000	1029,72	75,28	1029,72	63,29	11,4
	C	11,96	10000	985,71	57,86	985,70	45,89	8,2
	D	11,14	6000	1070,76	68,14	1070,86	57,10	10,3
	E	11,86	4000	1062,51	55,24	1062,76	43,63	7,8
	F	11,85	3000	1162,61	30,87	1162,86	19,27	3,5
	G	11,91	1000	911,70	87,610	912,75	76,75	13,8
	H	11,82	600	859,05	45,79	859,56	34,48	6,2
	I	7,35	400	792,47	51,19	792,77	44,14	7,9
	L	7,37	63	728,64	124,03	730,31	118,33	21,3
M	7,33	<63	1180,81	60,80	1180,98	53,64	9,6	100,0

Tab A.12 - Dati acquisiti necessari al calcolo della distribuzione granulometrica. I dati in tabella si riferiscono alla terza di tre prove per il terreno d'acquifero

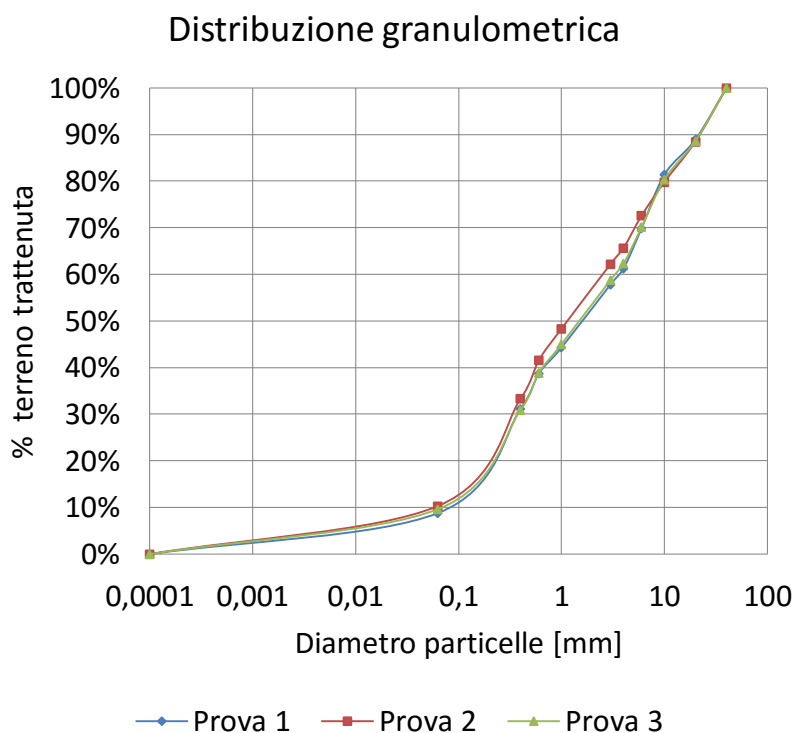


Fig A.8 - Andamento della distribuzione granulometrica media cumulata per il terreno d'acquifero

Dalla Fig A.8 è stata estrapolata la seguente Tab A.13:

Diametro [mm]	Classificazione	%
0,0001-0,001	Colloidi	2
0,001-0,005	Argilla	4
0,005-0,09	Limo	6
0,09-4	Sabbia	48
>4	Ghiaia	40

Tab A.13 - Tabella per la classificazione AGI 2

La nomenclatura agi classifica questo terreno come sabbia con ghiaia debolmente limosa.

DENSITÀ APPARENTE SU BASE SECCA

La valutazione della densità apparente su base secca avviene per mezzo di un cilindro graduato. Dopo averne misurato accuratamente il peso, si introduce un volume prefissato (30 mL) di terreno precedentemente essiccato riducendo la possibile formazione di bolle d'aria interne. Arrivati al volume prefissato, si pesa il cilindro al fine di ricavare il peso del terreno secco inserito. La densità apparente del terreno secco deriva dal rapporto tra la massa di terreno secco misurato (M_s) e il volume di terreno inserito (V_t). Anche per questa prova sono state effettuate tre prove per ogni matrice solida. Le prove di densità apparente sono state eseguite a partire da un peso netto e un volume noti di terreno, i dati delle prove e i relativi risultati sono riportati in Tab A.14 e Tab A.15:

DENSITÀ APPARENTE DELLA SABBIA SECCA					
Prova	Tara Cilindro	V_t occupato da terreno	Peso Cilindro + Terreno	M_s	ρ_b
	[g]	[ml]	[g]	[g]	[Kg _{ss} /m ³ _{ss}]
A	71,772	30	115,9989	44,2269	1474,2
B	69,2459	30	113,0035	43,7576	1458,6
C	71,7615	30	116,814	45,0525	1501,8

Tab A.14 - Dati acquisiti necessari al calcolo della densità apparente della sabbia

DENSITÀ APPARENTE DEL TERRENO D'ACQUIFERO SECCO					
Prova	Tara Cilindro	V_t occupato da terreno	Peso Cilindro + Terreno	M_s	ρ_b
	[g]	[ml]	[g]	[g]	[Kg _{ss} /m ³ _{ss}]
A	79,0023	30	129,3649	50,3626	1678,8
B	69,2461	30	116,315	47,0689	1569,0
C	79,5554	30	126,6607	47,1053	1570,2

Tab A.15 - Dati acquisiti necessari al calcolo della densità apparente del terreno da acquifero

La densità apparente media di terreno secco per la sabbia e il terreno di falda risulta rispettivamente pari a $1478,2 \text{ kg}_{\text{ss}}/\text{m}^3_{\text{ss}}$ $1606 \text{ kg}_{\text{ss}}/\text{m}^3_{\text{ss}}$.

POROSITÀ

La porosità si valuta introducendo in un cilindro graduato un volume prefissato V (ad esempio, 30 mL) di terreno precedentemente essiccato, riducendo la possibile formazione di bolle d'aria interne. Successivamente si inserisce lentamente un volume V' di acqua distillata, raggiungendo infine un volume totale nel cilindro pari a V'' .

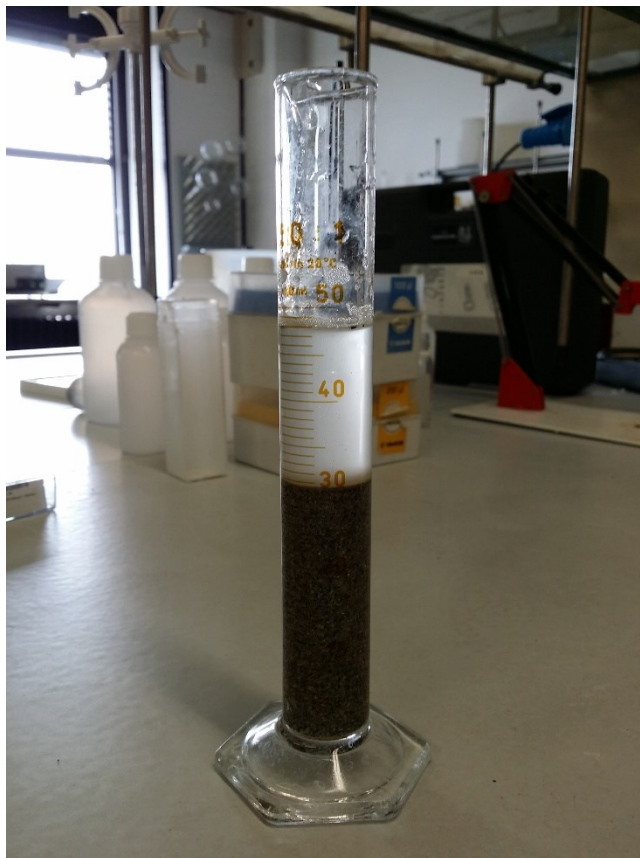


Fig A.9 - Prova di laboratorio per la determinazione della porosità del terreno

La porosità si calcola come:

$$f = \frac{V' - (V'' - V)}{V}$$

La valutazione della porosità è stata eseguita in triplicato per ogni terreno analizzato. I risultati relativi alla prova di porosità e relative condizioni di analisi sono riportati in Tab A.16 e Tab A.17:

Porosità Della Sabbia		
V acqua deionizzata immessa	Livello battente equilibrio	Porosità
[ml]	[ml]	[v/v]
30	49	0,37
30	48	0,40
30	48	0,40

Tab A.16 - Dati acquisiti necessari al calcolo della porosità della sabbia

Porosità Del Terreno D'acquifero		
V acqua deionizzata immessa	Livello battente equilibrio	Porosità
[ml]	[ml]	[v/v]
30	52	0,27
30	51	0,30
30	51	0,30

Tab A.17 - Dati acquisiti necessari al calcolo della porosità del terreno d'acquifero

La porosità media risultante è di 0,39 per la sabbia e 0,29 per il terreno d'acquifero.

TEST PER LA VALUTAZIONE DEL PH

Il pH del terreno influenza notevolmente sia l'attività microbiologica sia la disponibilità di elementi minerali. Per l'allestimento della prova è necessario preparare una soluzione 1 M di KCl realizzata con acqua ultrapura. Successivamente, in un becker in vetro da 100 mL, si pesano 10 g di terreno precedentemente essiccato e si inseriscono 25 mL di soluzione 1 M di KCl. Attraverso un agitatore magnetico si miscela il campione per almeno 2 h. A fine miscelazione si lascia sedimentare per qualche minuto e si procede alla misura del pH nel surnatante mediante pH – metro il quale ne fornisce anche la temperatura.



Fig A.10 - Vista dei tre agitatori magnetici utilizzati per l'analisi del pH

Il pH risultante per le tre prove effettuate sui due diversi tipi di terreni è apprezzabile rispettivamente in Tab A.18 per la sabbia e in Tab A.19 per il terreno d'acquifero:

	Campione 1	Campione 2	Campione 3
pH	8,61	8,58	8,35
Temperatura [°C]	26,6	26,8	26,7

Tab A.18 - Risultati relativi al test in triplicato per la ricerca del pH medio della sabbia

	Campione 1	Campione 2	Campione 3
pH	8,51	8,52	8,53
Temperatura [°C]	25,1	24,6	24,4

Tab A.19 - Risultati relativi al test in triplicato per la ricerca del pH medio del terreno d'acquifero

Confrontando i valori di pH medi ottenuti con la Tab A.20 per la classificazione dei terreni ARPAV (Giandon & Bortolami, 2007) per il pH si osserva come entrambi i terreni risultino alcalini. La sabbia ha un valore medio pari a 8.51 mentre il terreno d'acquifero è pari a 8.52.

Classi	pH
Molto acido	<5,4
Acido	5,4-5,9
Subacido	6,0-6,6
Neutro	6,7-7,2
Subalcalino	7,3-8,0
Alcalino	8,1-8,6
Molto alcalino	>8,6

Tab A.20 - Classificazione ARPAV per i terreni in funzione del pH

CONTA BATTERICA

La stima dei batteri presenti nella matrice solida è stata effettuata tramite il metodo della conta in piastra. Essa si basa sulla produzione di colonie microbiche su terreni agarizzati ovvero matrici solide additivate con L.D. Agar. Quest'ultimo è un concentrato gelinoso di nutrienti per favorire la coltivazione e l'identificazione dei batteri su piastra. La composizione di tale terreno di crescita è riportata in Tab A.21.

Ingredienti	g/L
Caseina idrolizzata enzimatica	5
Estratto di lievito	5
Cloruro di sodio	2,5
Solfito di sodio	0,1
L-Cistina	0,4
L-Triptofano	0,2
Vitamina K1	0,01
Hemin	0,01
Agar	20

Tab A.21 - Composizione media dell'L.D. Agar. La composizione può variare in funzione delle performance desiderate

Sul disco di Petri viene posto un quantitativo di L.D. Agar, precedentemente disciolto e autoclavato, con l'aggiunta di un'aliquota di campione da analizzare. Se il disco presenta, dopo incubazione, un numero di colonie troppo elevato da conteggiare, risulta necessario procedere con il metodo delle diluizioni successive (Fig A.11).

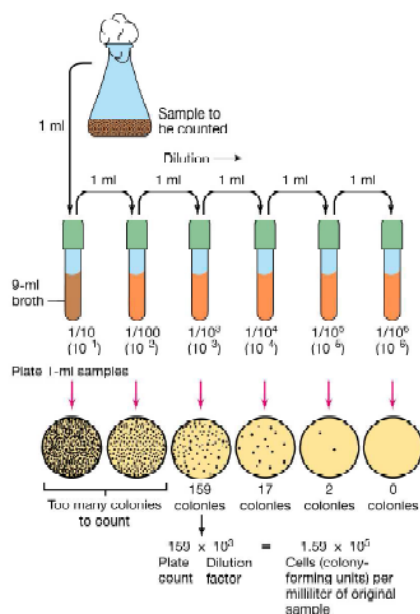


Fig A.11 - Metodo delle diluizioni successive

Dalle analisi condotte dal dipartimento di Scienze Ambientali dell'università Milano Bicocca sono emersi i risultati riportati in Tab A.22 sotto riportata.

Terreno	UFC/100mL
Sabbia	10
Terreno d'acquifero	10 ⁴

Tab A.22 - Conta batterica dei terreni utilizzati nei microcosmi

ALLEGATO B - METODO UTILIZZATO PER LE ANALISI

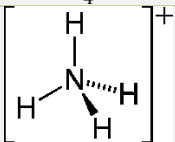
METODO COLORIMETRICO

Il metodo colorimetrico è utile per determinare la concentrazione di cromo in acque naturali o di scarico in un range compreso tra 100-1000 µg/l. Il metodo si basa sullo sviluppo del colore conseguente alla reazione tra Cr(VI) e difenilcarbazide ($C_{13}H_{14}N_4O$). Il meccanismo di tale reazione ancora non completamente noto, sembra consistere in una riduzione del Cr(VI) a Cr(III) e in una contemporanea ossidazione della difenilcarbazide a difenilcarbazione con conseguente formazione di un composto colorato in rosso – violetto (IRSA -CNR, 2003). La determinazione analitica del Cr(VI) è condotta secondo il modello C APAT – IRSA (2003) per l'analisi dei metalli e specie metalliche. Esso prevede di riportare i campioni a temperatura ambiente con successiva aggiunta di 1 mL di H_2SO_4 (1:1) e 2 mL di difenilcarbazide. L'aggiunta di acido solforico fa sì che il pH venga riportato a valori compresi tra $2,0 \pm 0,5$ permettendo alla difenilcarbazide di innescare la reazione redox con il Cr(VI) con conseguente formazione del composto colorato. Il Cr(VI) viene determinato eseguendo misure di assorbanza alla lunghezza d'onda di 540 nm tramite l'utilizzo di uno spettrofotometro nel campo visibile con cuvette da 4cm. Le misure possono essere effettuate esclusivamente dopo un tempo di 5 minuti dall'aggiunta al campione della difenilcarbazide. Tale tempo risulta il minimo necessario per consentire la completa reazione della difenilcarbazide nonché una colorazione stabile e completa del campione.

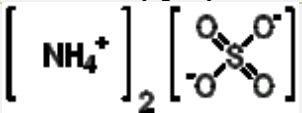
REAGENTI

Soluzione buffer

La soluzione *buffer* è stata preparata dissolvendo 33 g di ammonio solfato $(NH_4)_2SO_4$ in 75 mL di acqua e aggiungendo 6,5 mL di idrossido di ammonio (NH_4OH) portandolo a volume a 100 mL con acqua deionizzata. Di seguito sono riportate le caratteristiche chimico fisiche dei due composti utilizzati per creare la soluzione tampone (Tab B.1 e Tab B.2).

Idrossido di Ammonio	
CAS – Number	1336-21-6
Formula bruta	NH_4OH
Struttura chimica	
Stato fisico	Liquido limpido
Peso molecolare [g/mol]	35,04
Temperatura di ebollizione [°C]	24,7
Temperatura di fusione [°C]	-91,5
Densità relativa [g/mL]	0,89
Pressione di vapore @20 °C [mmHg]	-

Tab B.1 - Caratteristiche chimico fisiche dell'idrossido di ammonio estrapolate dalla scheda di sicurezza secondo regolamento europeo N° 1907/2006 (REACH)

Ammonio Solfato	
CAS – Number	7783-20-2
Formula bruta	$(NH_4)_2SO_4$
Struttura chimica	
Stato fisico	Solido cristallino paglierino
Peso molecolare [g/mol]	132,14
Temperatura di ebollizione [°C]	Si decompone prima dell'ebollizione
Temperatura di fusione [°C]	235
Densità relativa [g/cm³]	1,769

Tab B.2 - Caratteristiche chimico fisiche dell'ammonio solfato estrapolate dalla scheda di sicurezza secondo regolamento europeo N° 1907/2006 (REACH)

Soluzione di idrossido di sodio 5N

Per la preparazione della soluzione di idrossido di sodio si è dissolto 20 g di pastiglie di $NaOH$ (Tab B.3) in circa 75 mL di acqua deionizzata in un becker di plastica mentendo controllata la miscelazione e la temperatura. Poiché la reazione è fortemente esotermica è stata realizzata una camicia con ghiaccio per raffreddare il becker. Il tempo di contatto della soluzione con il matraccio in vetro, necessario per portare a volume la soluzione (100 mL), è stato minimizzato in quanto la soda attacca fortemente il vetro corrodendolo e incrostandolo. La soluzione così preparata ha una normalità pari a 5 N ed è stata stoccata in una bottiglietta da 250 mL in polietilene.

Idrossido Di Sodio	
CAS – Number	1310-73-2
Formula bruta	NaOH
Struttura chimica	
Stato fisico	Solido
Peso molecolare [g/mol]	39,99
Temperatura di ebollizione [°C]	1390
Temperatura di fusione [°C]	318,4
Densità relativa [g/cm ³]	2,13

Tab B.3 - Caratteristiche chimico fisiche dell'idrossido di sodio estrapolate dalla scheda di sicurezza secondo regolamento europeo N° 1907/2006 (REACH)

Entrambe le soluzioni sono state preparate in regime di sicurezza lavorando sotto cappa.

Soluzione di acido solforico

La soluzione di acido solforico (1+1) è stata preparata tramite diluizione 1:1 dell'acido solforico H_2SO_4 concentrato (95 - 97%) in acqua deionizzata. La reazione è stata condotta in un becker posto sotto cappa; la temperatura è stata controllata, analogamente a quanto fatto per la soluzione di idrossido di sodio 5 N, tramite l'utilizzo di una camicia di ghiaccio. La procedura corretta e sicura per la preparazione prevede l'aggiunta dell'acido in acqua e non viceversa in quanto si potrebbero generare zampilli.

Acido Solforico	
CAS – Number	7664-93-9
Formula bruta	H_2SO_4
Struttura chimica	
Stato fisico	Liquido limpido
Peso molecolare [g/mol]	98,08
Temperatura di ebollizione [°C]	330
Temperatura di fusione [°C]	-15
Densità relativa [g/mL]	1,84
Pressione di vapore @20°C [mbar]	0,0001

Tab B.4 - Caratteristiche chimico fisiche dell'acido solforico estrapolate dalla scheda di sicurezza secondo regolamento europeo N° 1907/2006 (REACH)

Soluzione di difenilcarbazide

Per la preparazione della soluzione di difenilcarbazide sciogliere 0,25 g di 1,5-difenilcarbazide in 50 ml di acetone. In tutte le reazioni colorimetriche che il Cr(VI) compie la difenilcarbazide è l'elemento chimico più utilizzato in quanto maggiormente affine

(Pflaum & Howick, 1956). La soluzione deve essere conservata in una bottiglia di vetro scuro in quanto la luce solare può provocare fenomeni degradativi; essa, inoltre, deve essere preparata settimanalmente ogni qualvolta si osserva una decolorazione. La colorazione rosso – violetta del prodotto ottenuto deriva dalla specie chelata che si forma tra il Cr(III), formato dalla riduzione del Cr(VI) con la difenilcarbazide, e il difenilcarbazono, formatosi dall'ossidazione della difenilcarbazide (Zambotti, 2000). In Fig B.1 sono messe a confronto le strutture chimiche della difenilcarbazide prima e dopo l'interazione con il cromo esavalente.

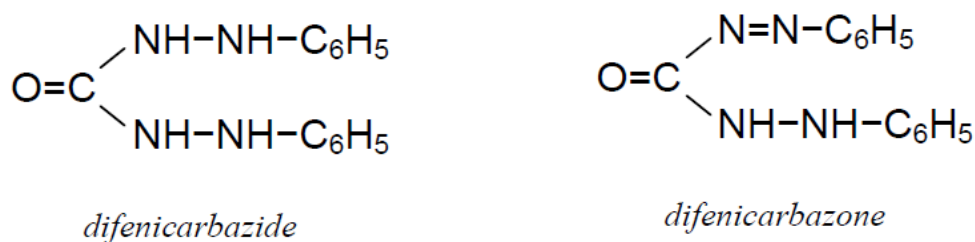
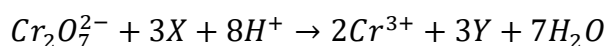
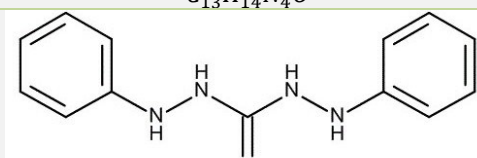


Fig B.1 - Difenilcarbazide e difenilcarbazono

Indicando la difenilcarbazide con X e il difenilcarbazono con Y, la reazione è la seguente:



In Tab B.5 è riportato un estratto della scheda di sicurezza secondo normativa REACH delle principali proprietà chimico fisiche della difenilcarbazide.

Difenilcarbazide	
CAS – Number	140-22-7
Formula bruta	$\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}$
Struttura chimica	
Stato fisico	Solido biancastro
Peso molecolare [g/mol]	242,28
Temperatura di ebollizione [°C]	-
Temperatura di fusione [°C]	170
Densità relativa [g/cm ³]	0,42

Tab B.5 - Caratteristiche chimico fisiche della difenilcarbazide estrapolate dalla scheda di sicurezza secondo regolamento europeo N° 1907/2006 (REACH)

Soluzioni di cromo esavalente

Per la realizzazione della contaminazione da cromo esavalente necessaria ai fini di questo elaborato si è utilizzata una soluzione di bicromato di potassio ($K_2Cr_2O_7$) con titolo 0,2 N. La scelta dell'impiego della soluzione di cromo a titolo noto deriva da considerazioni in ambito di sicurezza in quanto la preparazione di questa a partire dai relativi sali di cromo comporterebbe un elevato rischio cancerogeno dovuto alla possibile inalazione. Poiché la soluzione 0,2 N presente in laboratorio è stata preparata non recentemente, si è effettuata un'operazione di contro titolazione per verificare l'effettiva normalità della soluzione. La contro titolazione con assorbimento atomico, realizzata secondo lo standard APAT – IRSA 3150A (2003), è risultata necessaria in quanto tali soluzioni, se non ben stabilizzate e conservate, possono decadere nel tempo diminuendo la concentrazione effettiva di esavalente. La soluzione 0,2 N è stata conferita in laboratorio e il risultato di tale analisi ha come esito un valore di concentrazione di Cr(VI) pari a 3500 mg/l. Tale soluzione risulta troppo concentrata relativamente ai dosaggi a noi necessari; per questo motivo si è deciso di procedere alla realizzazione di una soluzione diluita 1:100 a partire da quest'ultima. La diluizione è stata realizzata prelevando 1ml dalla soluzione 0,2 N e portandola a volume con acqua ultra pura in un matraccio avente volume pari a 100 ml e stoccata in una bottiglietta di vetro scuro per limitarne il decadimento. La soluzione diluita (Fig B.2) si presenta come un liquido trasparente color giallo paglierino tipico della presenza in soluzione del metallo in forma esavalente.

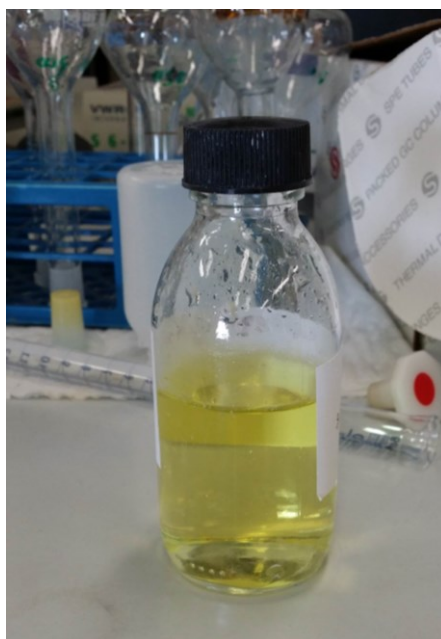


Fig B.2 - Soluzione di cromo diluita

STABILIZZAZIONE DEL CAMPIONE

I campioni prelevati, se non analizzati immediatamente, devono essere conservati previa stabilizzazione. Per la procedura di stabilizzazione si è scelto di riferirsi al modello descritto dallo Standard Methods n° 3500 – B. Tale metodo prevede una prima filtrazione a 0,45µm e una successiva correzione del pH il quale deve essere aggiustato e portato in un range compreso tra 9,3 e 9,7 tramite l'utilizzo di una soluzione *buffer* con l'aggiunta successiva di 600 µL 5N di idrossido di sodio (NaOH) per 100 mL di campione. Il pH così aggiustato riduce la solubilità del Cr(III) nonché preserva lo stato di ossidazione della forma esavalente del metallo. I campioni stabilizzati devono essere stoccati ad una temperatura < 6 °C per un massimo di 28 giorni e possono essere diluiti al massimo del 10 % rispetto al loro volume iniziale.

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Si è indagato riguardo la possibilità di variazioni delle condizioni redox durante la fase di preparazione del campione. Sono stati quindi analizzati: campione tal quale, stabilizzato e non filtrato, filtrato e non stabilizzato nonché stabilizzato e filtrato.

Siero 5000 µg/L			
Campione	pH	Temperatura	Redox
Tal quale	7,26	26,3	-180
No Filtrato / Stab	9,58	26	-15
Filtrato / No stab	7,41	25,4	-45
Filtrato / Stab	9,6	25,5	-5

Tab B.6 - Valori di pH, temperatura e redox del campione in diverse modalità di preparazione della bottiglia siero 5 mgCr(VI)/L

	Concentrazione [µg/L]
Tal quale	4972
	4979
	4979
No Filtrato / Stab	4772
	4787
	4764
Filtrato / No stab	4664
	4664
	4633
Filtrato / Stab	4633
	4641
	4633

Tab B.7 - Concentrazione della bottiglia siero 5 mgCr(VI)/L nelle diverse modalità di preparazione

Substrato Da Birrificio 5000 µg/L			
Campione	pH	Temperatura	Redox
Tal quale	7,53	26,1	-30
No Filtrato / Stab	9,64	25,6	10,8
Filtrato / No stab	7,73	25,1	95
Filtrato / Stab	9,64	25,3	33,3

Tab B.8 - Valori di pH, temperatura e redox del campione in diverse modalità di preparazione della bottiglia birra 5 mgCr(VI)/L

Campione	Concentrazione [µg/L]
No Filtrato / Stab	4587
	4572
	4572
Filtrato / Stab	4356
	4379
	4379

Tab B.9 - Concentrazione della bottiglia birra 5 mgCr(VI)/L nelle diverse modalità di preparazione

Siero 10000 µg/L			
Campione	pH	Temperatura	Redox
Tal quale	7,30	27,7	-205
No Filtrato / Stab	9,60	27,3	-40
Filtrato / No stab	7,80	26,4	40
Filtrato / Stab	9,62	27,2	-17,1

Tab B.10 - Valori di pH, temperatura e redox del campione in diverse modalità di preparazione della bottiglia siero 10 mgCr(VI)/L

Campione	Concentrazione [µg/L]
Filtrato / Stab	9989
	9974
	9974

Tab B.11 - Concentrazione della bottiglia siero 10 mgCr(VI)/L nelle diverse modalità di preparazione

Substrato Da Birrificio 10000 µg/L			
Campione	pH	Temperatura	Redox
Tal quale	7,22	26,1	-108
No Filtrato / Stab	9,57	26,2	5,7
Filtrato / No stab	7,41	24,8	95
Filtrato / Stab	9,53	25,4	35

Tab B.12 - Valori di pH, temperatura e redox del campione in diverse modalità di preparazione della bottiglia birra 10 mgCr(VI)/L

Substrato Da Birrificio 10000 µg/L				
	Assorbanza	Concentrazione	Fatt molt	Conc reale
Filtrato / Stab	0,600	228	40	9128
	0,603	229		9174
	0,601	229		9143

Tab B.13 - Valori di pH, temperatura e redox del campione in diverse modalità di preparazione della bottiglia birra 10 mgCr(VI)/L

Sulla base di quanto sopra, non si è osservata sostanziale variazione dei parametri nelle operazioni di filtrazione e stabilizzazione del campione.

SPETTROFOTOMETRO

Nella determinazione colorimetrica del Cr(VI) mediante difenilcarbazide il cromo esavalente reagisce, come precedentemente illustrato, ossidando la difenilcarbazide a difenilcarbazono e creando un complesso cromo – carbazono di colore violetto del quale se ne stima l'entità. A tale scopo risulta necessario l'impiego di uno spettrofotometro. Le tecniche spettroscopiche sono basate sullo scambio di energia che si verifica tra energia radiante e la materia. In particolare la spettrofotometria di assorbimento è interessata ai fenomeni di assorbimento delle radiazioni luminose della regione dello spettro elettromagnetico appartenenti al campo del visibile (350 – 700 nm) e del vicino ultravioletto (200 – 350 nm). Alcuni spettrofotometri, se opportunamente posti sotto vuoto o in atmosfera di gas inerte, sono anche in grado di lavorare nel range dell'UV lontano (10 -200 nm) (Maccà, 2014). Per la tesi in oggetto è stato utilizzato uno spettrofotometro UNICAM UV2 – 300 mostrato in Fig B.3.



Fig B.3 - Spettrofotometro UNICAM – UV2

Esso è uno strumento molto complesso, il cui funzionamento è riconducibile a 5 unità costitutive fondamentali:

- 1) Sorgente di luce
- 2) Selettore di lunghezza d'onda

- 3) Contenitore del campione o cuvetta
- 4) Rivelatore di radiazioni
- 5) Elaboratore del segnale e dispositivo indicatore

In Fig B.4 viene mostrata la configurazione tipica per la misura di assorbimento nel campo UV-VIS.



Fig B.4- Configurazione per la misura di assorbimento nel campo UV-VIS

Sorgente di luce

Lo spettrofotometro utilizzato si costituisce di due sorgenti di energia radiante utilizzabili una nell'UV e l'altra nel visibile. Nel campo dell'ultravioletto vengono attivate lampade a deuterio o a idrogeno costituite da un bulbo di quarzo saturo di gas il quale, se eccitato da scariche elettriche emette una radiazione elettromagnetica caratterizzata da una lunghezza d'onda compresa tra 190 nm e 400 nm. Nel campo del visibile vengono usate lampade a filamenti di tungsteno costituite da un bulbo di vetro contenete il filamento il quale, sottoposto a tensione, raggiunge una temperatura di circa 2800 °C emettendo una radiazione in un range compreso tra 330 e 930 nm. L'UNICAM UV2 – 300, in funzione della lunghezza d'onda settata, è in grado di attivare la lampada opportuna. Nel caso del Cr(VI) lo strumento è stato impostato, secondo standard APAT – IRSA, ad una lunghezza d'onda nel range del visibile pari a 540 nm.

Monocromatori

Il monocromatore è uno strumento in grado di prelevare un fascio di luce policromatico e di suddividerlo in più fasci monocromatici caratterizzati dall'averne un'unica lunghezza d'onda (frequenza). I fasci ottenuti possono essere analizzati dal punto di vista dell'intensità utilizzando la relazione intercorrente con la lunghezza d'onda. In Fig B.5 è rappresentato il dispositivo in esame:

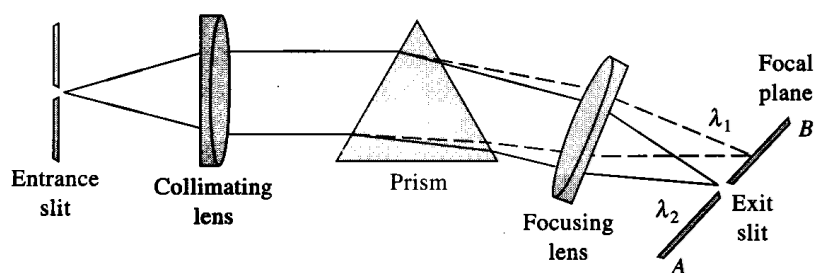


Fig B.5 - Configurazione di Bunsen per dividere un fascio policromatico in più fasci monocromatici aventi lunghezza d'onda λ_1 e λ_2

Porta campioni o cuvette

Le caratteristiche delle cuvette utilizzate per l'analisi variano in funzione dell'accuratezza desiderata nonché dalla lunghezza d'onda alla quale si sta effettuando l'analisi. Esistono perciò cuvette a base circolare, con raggio variabile tra 1 e 5 cm, per analisi caratterizzate da minor precisione; mentre per analisi più dettagliate devono essere utilizzate cuvette a base rettangolare di spessore costante pari a 1 cm e con cammino ottico compreso tra 1 e 5 cm. Il materiale, in funzione dello spettro in cui viene eseguita l'analisi, può essere di quarzo per il campo UV, oppure di vetro, quarzo o plastica per il campo del visibile. In Fig B.6 è riportata la cuvetta utilizzata per l'analisi colorimetrica del Cr(VI) con cammino ottico di 4 cm:

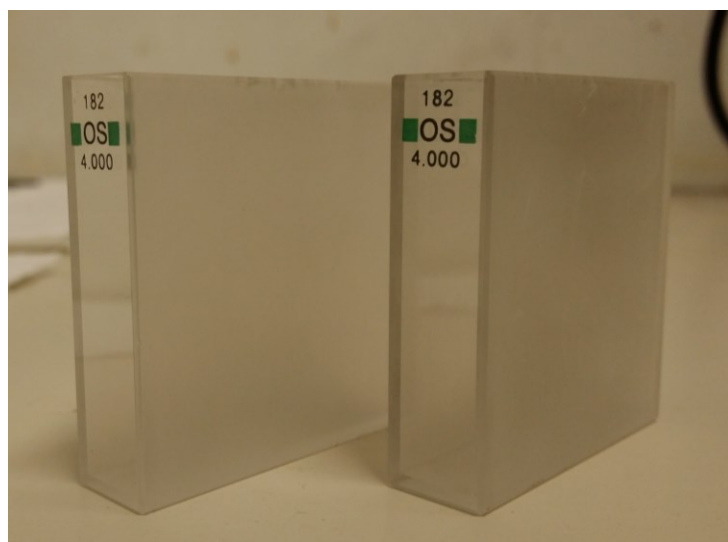


Fig B.6 – Cuvette

Rivelatore di radiazioni

Il rivelatore di radiazioni è un dispositivo elettronico in grado di convertire un segnale luminoso proveniente dal passaggio attraverso il campione in un corrispondente segnale elettrico il quale può essere analogico o digitale. I rivelatori che trovano più impiego negli spettrofotometri sono: le celle fotovoltaiche, le celle fotoconduttive, i fototubi, i fotomoltiplicatori. L'applicazione analitica delle misure di assorbimento effettuate attraverso lo spettrofotometro si basano sulla legge di Lambert-Beer. Essa afferma che l'assorbimento (A) di una radiazione elettromagnetica monocromatica a lunghezza d'onda λ da parte di una soluzione che contiene N specie chimiche, capaci di assorbire a quella lunghezza d'onda, è proporzionale alla somma pesata delle loro concentrazioni (Balducci, n.d.). La relazione è espressa dalla formula xx:

$$A = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) = d \sum_{i=1}^N \varepsilon_i^\lambda c_i$$

Dove:

A: assorbanza [-]

I_0 : intensità della radiazione in uscita dalla cuvetta di riferimento

I: intensità della radiazione in uscita dalla cuvetta in analisi

d: cammino ottico [cm]

ε_i^λ : coefficiente di estinzione o coefficiente di assorbimento molare della specie i alla lunghezza d'onda λ $\left[\frac{cm^2}{mol}\right]$

c_i : concentrazione molare della specie i $\left[\frac{mol}{l}\right]$

L'espressione $\frac{I}{I_0}$ prende il nome di trasmittanza (T). La legge di Lambert – Beer è una legge limite, verificata solo a basse concentrazioni (Amandola & Terreni, 1976). Lo schema ottico semplificato (monoraggio) prevede la generazione di fascio policromatico dalla sorgente luminosa. Tale fascio, attraversando il monocromatore, esce ad una sola lunghezza d'onda definita e viene successivamente reindirizzato attraverso la cuvetta per giungere infine al rivelatore di radiazioni. L'elaboratore del segnale trasforma il segnale elettrico in un valore di assorbanza applicando la legge di Lambert – Beer.

Esistono sistemi ottici, come quelli utilizzati nel seguente elaborato, più complessi. Essi sono chiamati spettrofotometri a doppio raggio e consentono di effettuare misure di assorbanza in “contemporanea” tra la soluzione da analizzare e quella di riferimento. Vi

sono due tipi di sistemi a doppio raggio: nello spazio e nel tempo. I primi consentono di mantenere, tramite la divisione del raggio, una misura di assorbanza costante nel tempo sia sulla cuvetta di riferimento che sulla cuvetta di analisi (Fig B.7). I secondi effettuano una misura temporizzata alternando il fascio tra le due cuvette (Fig B.8).

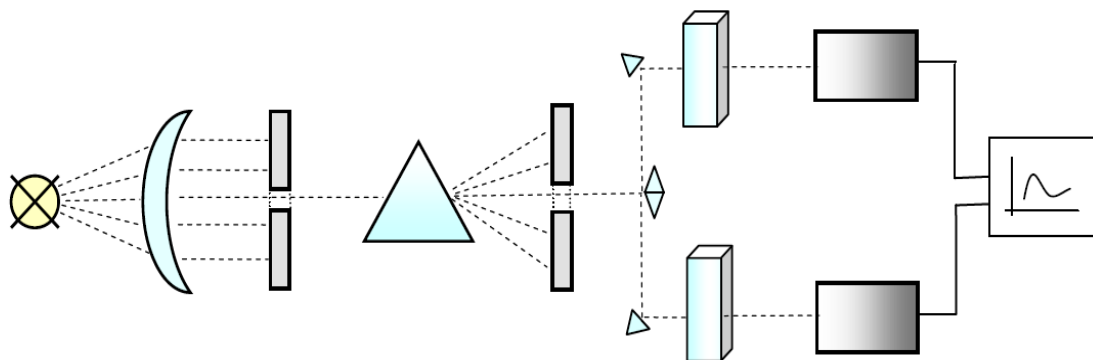


Fig B.7 - Schema ottico di uno spettrofotometro a doppio raggio nello spazio

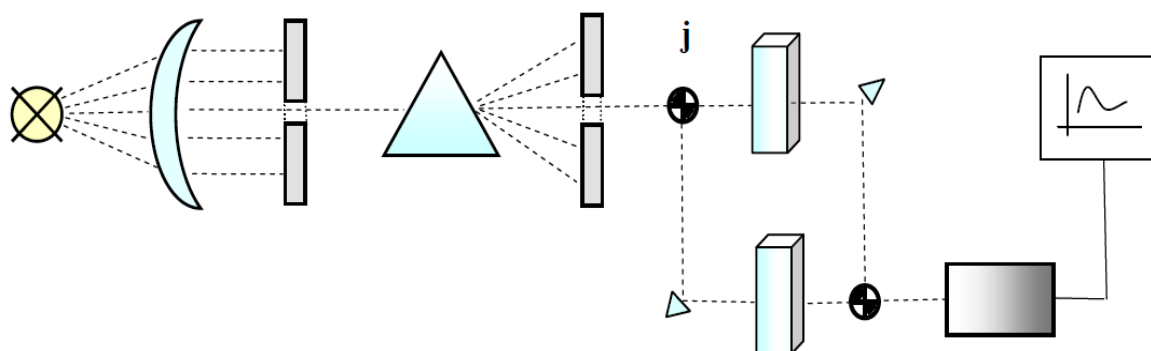


Fig B.8 - Schema ottico di uno spettrofotometro a doppio raggio nello spazio

Lo schema ottico dell'UNICAM UV2-300 è di tipo spaziale.

MESSA A PUNTO DEL METODO

Si procede in questo sotto capitolo alla descrizione dei passaggi relativi all'estrazione della curva di taratura del metodo colorimetrico e alla valutazione di eventuali interferenze delle matrici reali che potrebbero influire sui risultati dell'analisi.

RETTA DI TARATURA

Si è indagata la relazione di linearità intercorrente tra i valori di assorbanza e di concentrazione di cromo esavalente dei campioni analizzati. Le concentrazioni di Cr(VI) per la validazione del metodo secondo APAT – IRSA sono 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/L. Poiché si prevede che le concentrazioni risultanti a seguito dell'abbattimento biologico siano minori del limite inferiore previsto dal metodo si è deciso di modificare il campo di applicazione e testarne la linearità in un range compreso tra 8,4 e 350 µg/L. In particolare i punti a concentrazione nota utilizzati per la taratura della curva sono: 8,4, 17,5, 35, 140, 252 e 350 µg/L. La strumentazione necessaria per la realizzazione della curva, si compone di:

- 1) matracci graduati di volume pari a 50 mL
- 2) micropipette P100 e P1000
- 3) pipette da 10 mL e 0,5 mL
- 4) spruzzette
- 5) Beckers in vetro e in plastica
- 6) cuvette con passo ottico di 4 cm
- 7) spettrofotometro

Prima di procedere all'allestimento dei matracci per la determinazione della curva di taratura, è necessario effettuare una pulizia accurata di tutta la vetreria necessaria. I solventi utilizzabili per la pulizia non devono contenere specie cromatiche, in quanto potrebbero alterare la bontà dell'analisi. Per evitare contaminazioni è inoltre richiesto l'avvinamento di tutte le pipette e cuvette utilizzate; per quanto riguarda i puntali delle micropipette devono essere sostituiti ad ogni dosaggio in quanto monouso.

I reagenti e solventi utilizzati per la messa a punto del metodo sono:

- 1) acqua ultra pura
- 2) soluzione di difenilcarbazide
- 3) soluzione di acido solforico
- 4) soluzione di cromo

Prima di procedere con l'analisi spettrofotometrica è necessario impostare la lunghezza d'onda dello spettrofotometro sul valore 540nm e realizzare un matraccio contenente una soluzione necessaria per l'azzeramento della macchina. Tale soluzione è composta da 50

mL di acqua ultra pura alla quale viene aggiunto 0,5 mL di acido solforico. Lo zero macchina è fondamentale in quanto, utilizzando uno spettrofotometro a doppio raggio, la lettura dell'assorbanza dei campioni viene effettuata per confronto con questo riferimento. Vengono quindi preparate entrambe le cuvette contenenti tale soluzione, poste all'interno dello spettrofotometro, rispettivamente nel porta campione "reference" e "sample", e tramite la pressione del tasto dello zero base si procede all'azzeramento. La cuvetta "reference" viene mantenuta all'interno nello strumento come soluzione di confronto mentre il contenuto della cuvetta "sample" viene smaltito opportunamente e sostituito con campioni che dovranno essere analizzati.

Per la curva di taratura è necessario allestire il seguente numero di campioni:

- 3 bianchi reattivi (3 campioni)
- 3 repliche per 6 concentrazioni differenti come previsto da metodo (18 campioni)

I bianchi reattivi sono preparati portando a volume con acqua ultra pura 3 matracci da 50 mL ciascuno e verranno trattati in fase di analisi analogamente ai campioni contaminati da cromo.

Si è realizzata una batteria composta da 3 matracci per ognuna delle concentrazioni precedentemente stabilite; ogni replicato è stato realizzato in maniera indipendente, ovvero è stato contaminato singolarmente. La procedura da applicare ad ogni matraccio per realizzare la contaminazione e il dosaggio dei reagenti è riassunta come segue:

- 1) aggiunta nel matraccio da 50 mL, senza portare a volume, di una quota di acqua ultra pura tramite spruzzetta
- 2) attraverso l'utilizzo della micropipetta si realizza uno spike della soluzione di cromo per ottenere ognuno dei 6 valori di concentrazione. Vengono riportati qui di seguito i passaggi algebrici per il calcolo del volume di soluzione di cromo (0,035 g/L) da prelevare. Tramite bilancio di massa espresso è possibile ricavare il volume iniziale (V_{spike}) come segue:

$$C_i * V_{spike} = C_f * V_f$$

$$V_{spike} = \frac{C_f * V_f}{C_i}$$

Dove:

C_i : concentrazione di cromo esavalente della soluzione di cromo (0,035 g/L)

C_f : concentrazione di cromo esavalente che si vuole ottenere nel matraccio

V_f : volume della soluzione finale, coincidente con il volume del matraccio (50 mL)

V_{spike} : volume da prelevare con micropipetta dalla soluzione di cromo (0,035 g/L)

In Tab B.14 sono riportati i volumi degli spike (V_{spike}) effettuati per ognuna delle concentrazioni del metodo

$C_f \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{L}} \right]$	8,4	17,5	35	140	252	350
$V_{spike} [\mu\text{L}]$	12	25	50	200	360	500

Tab B.14 - Concentrazioni e relativi volumi per la realizzazione della retta di taratura

Le concentrazioni finali sono dipendenti dalla possibilità, con gli strumenti di laboratorio a nostra disposizione, di prelevare volumi noti secondo la sensibilità della micropipetta.

- 3) portare a volume il matraccio aggiungendo acqua ultra pura

L'analisi colorimetrica può essere quindi effettuata previa aggiunta dei reagenti necessari per preparare il campione. I reagenti, precedentemente preparati come descritto in 'preparazione reagenti', devono essere dosati nel seguente ordine:

- a. 0,5 mL di soluzione di acido solforico (H_2SO_4)
- b. 1 mL di soluzione di difenilcarbazide

Prima di effettuare l'analisi del campione così preparato, tramite spettrofotometro, è necessario attendere un tempo pari a 5 minuti per consentire la formazione completa del composto cromo – carbazone nei campioni in cui è presente il cromo (Fig B.9).



Fig B.9 - Attività sperimentale per la preparazione degli standard reattivi per la tracciatura della retta di taratura

L'analisi dei bianchi risulta utile per capire l'interferenza provocata dai reagenti stessi. Ovviamente, le misure effettuate sono veritiere se tra una misura e l'altra lo strumento e il campione non hanno subito alcuna variazione: temperatura, intensità della sorgente, tensione di rete, etc (La Fortezza, 2000). In Tab B.15 vengono presentati i valori di assorbanza letti dallo spettrofotometro per ognuna della sei concentrazioni teoriche con le quali è stata costruita la curva di taratura; per ogni concentrazione è stata effettuata una triplice misura. Vengono inoltre riportate le concentrazioni calcolate con i parametri della curva a partire dalle letture di assorbanza nonché lo scostamento percentuale tra le concentrazioni teoriche e quelle rilevate.

Batteria	Assorbanza	Concentrazioni	Concentrazioni reali	Percentuale variazione
	[-]	[ug/l]	[ug/l]	[-]
1	0,941	350	359,35	2,67%
	0,935	350	357,04	2,01%
	0,947	350	361,65	3,33%
2	0,645	252	245,50	2,58%
	0,654	252	248,96	1,21%
	0,656	252	249,73	0,90%
3	0,345	140	130,12	7,06%
	0,340	140	128,19	8,43%
	0,332	140	125,12	10,63%
4	0,111	35	40,12	14,62%
	0,108	35	38,96	11,32%
	0,110	35	39,73	13,52%
5	0,062	17,5	21,27	21,54%

	0,069	17,5	23,96	36,92%
	0,060	17,5	20,50	17,14%
6	0,032	8,4	9,73	15,84%
	0,032	8,4	9,73	15,84%
	0,029	8,4	8,58	2,11%

Tab B.15 - Assorbanze e concentrazioni relative alla costruzione della retta di taratura

In Fig B.10 è rappresentato l'andamento della retta di taratura, ottenuta come interpolazione dei dati precedentemente tabulati in Tab B.15.

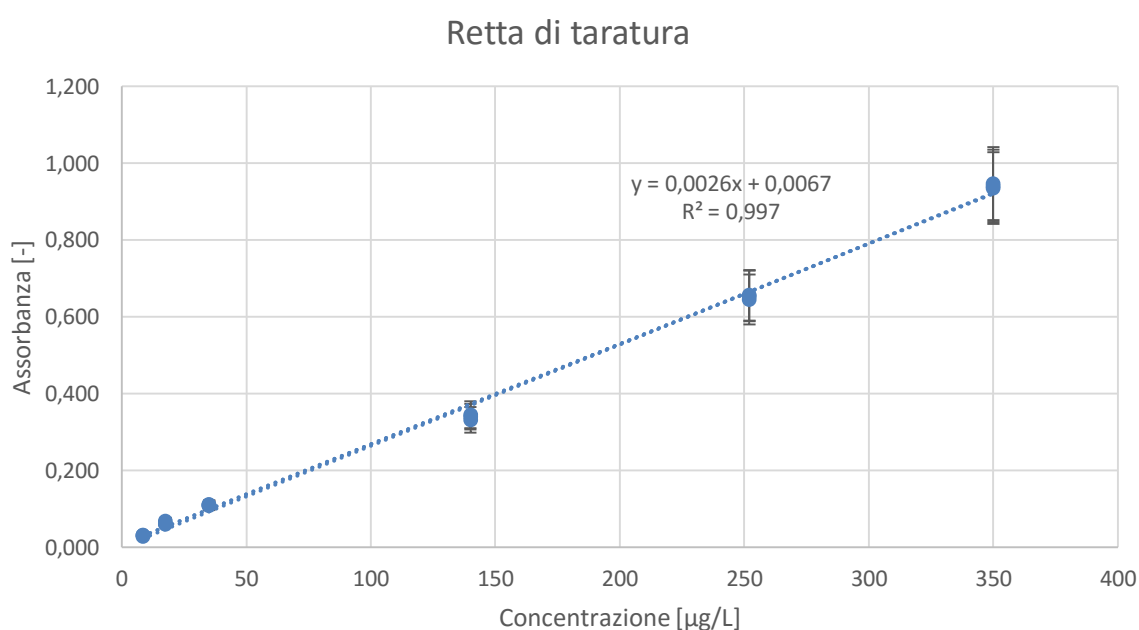


Fig B.10 - Retta di taratura

Si è deciso di operare in un range di concentrazioni compreso tra 17,5µgCr(VI)/L e 350 µgCr(VI)/L per garantire una maggiore affidabilità di lettura. I valori con concentrazione minore del limite inferiore verranno analizzati in ICPMS. Come verrà spiegato nella sezione calcolo delle interferenze, tutti i campioni che presentano valori di assorbanza che non rientrano nel campo di esistenza della retta di taratura ($< 0,947$) necessitano di un pretrattamento di diluizione con acqua ultrapura. Il valore di concentrazione così ottenuto verrà poi moltiplicato per un opportuno fattore moltiplicativo per ottenere la concentrazione realmente presente nel microcosmo.

VALUTAZIONE DELLE INTERFERENZE

Poiché i microcosmi non verranno allestiti in acqua ultra pura, ma riprodurranno il più possibile una matrice reale, è necessaria una fase di valutazione delle possibili interferenze causate dalle sostanze costitutive del microcosmo. Le matrici su cui è stata effettuata una prova di interferenza sono:

- acqua di rete
- Fe(II)
- permeato di siero di latte
- melasso da barbabietola
- substrato di scarto da birrificazione
- soluzioni per la stabilizzazione del campione (*buffer* e soluzione di soda 5N)

La valutazione delle interferenze è valutata mediante il calcolo del fattore di recupero (F_{rec}). Esso fornisce la percentuale di scostamento, dalla concentrazione teorica di Cr(VI), della concentrazione ottenuta tramite curva di taratura a partire da una lettura dell'assorbanza scontata della concentrazione misurata sulla matrice non inquinata. Tale fattore è espresso come segue:

$$F_{rec} = \frac{C_{a+x} - C_x}{C_a} * 100$$

Dove:

F_{rec} : fattore di recupero

C_{a+x} : è la concentrazione ricavata, mediante la curva di taratura, a partire dal valore di assorbanza misurato dal campione contenete cromo

C_x : è la concentrazione ricavata, mediante la curva di taratura, a partire dal valore di assorbanza misurato dal campione non contenente cromo

C_a : è la concentrazione teorica di cromo immessa nel campione

ACQUA DI RETE

Prima di poter effettuare il prelievo dell'acqua di rete è necessario far scorrere l'acqua dal rubinetto per un tempo minimo pari a 30 minuti. Questa operazione consente alle ai parametri chimico fisici dell'acqua di raggiungere valori stabili e rappresentativi. Sono state stoccate due taniche da 20 L ciascuna in cella frigorifera a 4 °C per potere effettuare tutte le prove, aventi come solvente l'acqua di rete, con una matrice avente le stesse caratteristiche del giorno del prelievo. Per valutare l'interferenza dell'acqua di rete si sono preparati 5 replicati per ognuno dei seguenti set:

- 1) acqua di rete senza l'aggiunta della contaminazione di cromo
- 2) acqua di rete con l'aggiunta di 150 µg/L di Cr(VI)
- 3) acqua di rete con l'aggiunta di 800 µg/L di Cr(VI)

A differenza delle prove per la realizzazione della curva nelle quali la contaminazione in ogni matraccio è stata effettuata in maniera indipendente, l'interferenza è stata valutata a partire da un'unica contaminazione. Si è preparato perciò un matraccio con volume pari a 250 mL nel quale sono stati effettuati gli spike di soluzione cromo (0,035 g/L) riportati in Tab B.16 per ottenere le contaminazioni di 150 µg/L e 800 µg/L di Cr(VI).

$C_f \left[\frac{\mu g}{L} \right]$	147	805
$V_{spike} [\mu L]$	1050	5750

Tab B.16 - Volumi di soluzione di cromo da iniettare in un matraccio da 200mL per ottenere le rispettive concentrazioni finali C_f di Cr(VI). Analogamente alla curva di taratura, a causa della sensibilità dello strumento dosatore, le concentrazioni realmente in s

Il contenuto di tale matraccio è stato poi ripartito nei 5 matracci da 50 mL. Su tali campioni, come nel caso della curva di taratura, bisogna additivare 0,5mL di soluzione di acido solforico e 1mL di soluzione di difenilcarbazide in modo da attivare la reazione. Trascorsi 5 minuti si è proceduto alla lettura di assorbanza. Le concentrazioni a 800 µg/L richiedono, non appartenendo al campo di validità della retta di taratura, una diluizione prima di effettuare l'analisi con metodo colorimetrico in quanto vi è necessità di riportarsi a valori di assorbanza inferiori a 0,947. In Tab B.17 sono tabulati i valori di assorbanza relativi alle diverse prove con relativi fattori di recupero.

Letture	No Cr(VI)		150 $\left[\frac{\mu\text{g}}{\text{L}}\right]$ Cr(VI)			800 $\left[\frac{\mu\text{g}}{\text{L}}\right]$ Cr(VI)				
	Ass,	Conc	Ass,	Conc	F _{rec}	Ass,	Conc letta	F _{molt}	Conc reale	F _{rec}
	[-]	$\left[\frac{\mu\text{g}}{\text{L}}\right]$	[-]	$\left[\frac{\mu\text{g}}{\text{L}}\right]$	[%]	[-]	$\left[\frac{\mu\text{g}}{\text{L}}\right]$		$\left[\frac{\mu\text{g}}{\text{L}}\right]$	[%]
1	0,028	8,19	0,445	168,58	109	0,57	216,65	4	866,62	107
2	0,029	8,58	0,447	169,35	109	0,56	212,81		851,23	105
3	0,030	8,96	0,446	168,96	109	0,57	216,65		866,62	107
4	0,031	9,35	0,447	169,35	109	0,57	216,65		866,62	107
5	0,032	9,73	0,447	169,35	109	0,56	212,81		851,23	105

Tab B.17 - Valori di assorbanza risultati dalle analisi dei campioni con acqua di rete effettuate con lo spettrofotometro, viene inoltre riportata la concentrazione corrispondente calcolata mediante la curva di taratura nonché il fattore di recupero e l'errore percentuale

Si conclude che, poiché il fattore di recupero è compreso tra 100% ± 10%, l'acqua di rete non è una matrice interferente con il metodo colorimetrico in quanto l'errore di stima della concentrazione di Cr(VI) è inferiore al 10% previsto dal metodo

FERRO BIVALENTE - Fe(II)

In condizioni anossiche e anaerobiche vi è la possibilità che il terreno rilasci dei cationi di Fe(II) che possono interferire sia sulle misure di assorbanza sia sulle cineti del Cr(VI). Si è indagato una concentrazione di Fe(II) iniziale di 10 mgFe(II)/L da effettuarsi per 3 replicati. Per raggiungere la concentrazione desiderata di ferro è necessario disporre di una soluzione concentrata di ferro preparata a partire da cloruro ferroso tetra idrato ($FeCl_2 * 4H_2O$). Si sono quindi disciolti 115 mg di $FeCl_2 * 4H_2O$ in 100mL di acqua ultra pura per ottenere una soluzione concentrata a 323,03 mgFe(II)/L. Aggiungendo 6,2 mL di tale soluzione in un matraccio da 200mL e portandolo a volume con acqua di rete si ottiene una concentrazione di 10,01 mgFe(II)/L. Anche per il Fe(II) si è testata la sua interferenza nei seguenti casi:

- acqua di rete con concentrazione di 10.01mgFe(II)/L senza aggiunta di cromo
- acqua di rete con concentrazione di 10.01mgFe(II)/L con l'aggiunta di 150 µg/L cromo
- acqua di rete con concentrazione di 10.01mgFe(II)/L con l'aggiunta di 800 µg/L cromo

Dalla tabella (Tab B.18) si può apprezzare come i valori del fattore di recupero siano prossimi allo 0%; questo è indicativo del fatto che il Fe(II) interferisce con la lettura colorimetrica del Cr(VI). Sulla base di queste considerazioni si è indagato riguardo la

concentrazione limite di Fe(II) e di Cr(VI) in modo da prevenirne l'interferenza. La prima prova è stata effettuata mantenendo una concentrazione di cromo pari a 150 µg/L e, a partire da una concentrazione di 50 µg/L di Fe(II), si sono effettuate diverse prove aumentando progressivamente la concentrazione di Fe(II) fino a raggiungere un valore per il fattore di recupero prossimo all'80%, considerato il valor limite di possibile interferenza. Ogni prova è stata realizzata con un solo replicato in un matraccio da 50m L e per il raggiungimento di concentrazione di ferro così basse è stato necessario diluire 1:100 la soluzione concentrata di partenza. La nuova soluzione di ferro è stata preparata prelevando 1mL della soluzione concentrata (323,03 mgFe(II)/L) e portando a volume in un matraccio da 100mL con acqua ultrapura ottenendo una concentrazione finale di 3,23 mgFe(II)/L. Una volta raggiunta la concentrazione di ferro che genera un fattore di recupero prossimo all'80% si è tenuta costante la concentrazione di Fe(II) così trovata e si è fatta variare la quantità di Cr(VI) in soluzione. Si è modificata la concentrazione di cromo allo scopo di trovare il rapporto minimo tra ferro e cromo che provoca interferenza. Vengono riportati i risultati delle prove analitiche in Tab B.18 relative a una concentrazione di ferro bivalente pari a 10 mg/L.

Letture	No Cr(VI) + 10 mgFe(II)/L		150 $\left[\frac{\mu g}{L}\right]$ Cr(VI) + 10 mgFe(II)/L			800 $\left[\frac{\mu g}{L}\right]$ Cr(VI) + 10 mgFe(II)/L		
	Ass,	Conc	Ass,	Conc	Frec	Ass,	Conc	F _{rec}
	[-]	$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$	[-]	$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$	[%]	[-]	$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$	[%]
1	0,026	7,42	0,04	12,81	4	0,037	11,65	1
2	0,027	7,81	0,038	12,04	3	0,04	12,81	1
3	0,027	7,81	0,039	12,42	3	0,037	11,65	0

Tab B.18 - Valori di assorbanza risultati dalle analisi dei campioni con acqua di rete ed una concentrazione di Fe(II) di 10 mg/L effettuate con lo spettrofotometro, viene inoltre riportata la concentrazione corrispondente calcolata mediante la curva di taratura

Come si può osservare dalla tabella, a qualsiasi concentrazione di cromo testata, non è possibile effettuare una lettura spettrofotometrica in quanto il fattore di recupero è prossimo a 0%. Questo significa che il Fe(II) apporta una significativa interferenza alla misura. Nelle Tab B.19 sottostante sono raccolti i dati relativi alla ricerca del rapporto minimo tra ferro e cromo che provoca interferenza.

Letture	No Cr(VI) + 50 µgFe(II)/L		150 $\left[\frac{\mu g}{L}\right]$ Cr(VI) + 50 µgFe(II)/L		
	Ass,	Conc	Ass,	Conc	F _{rec}
	[-]	$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$	[-]	$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$	[%]
1	0,022	5,885	0,356	134,35	87

Letture	No Cr(VI) + 100 µgFe(II)/L		150 $\left[\frac{\mu g}{L}\right]$ Cr(VI) + 100 µgFe(II)/L		
	Ass,	Conc	Ass,	Conc	F _{rec}
	[-]	$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$	[-]	$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$	[%]
1	0,016	3,577	0,331	124,73	82

Letture	No Cr(VI) + 150 µgFe(II)/L		150 $\left[\frac{\mu g}{L}\right]$ Cr(VI) + 150 µgFe(II)/L		
	Ass,	Conc	Ass,	Conc	F _{rec}
	[-]	$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$	[-]	$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$	[%]
1	0,011	1,654	0,254	95,115	64

Tab B.19 - Ricerca del rapporto minimo di interferenza tra cromo e ferro bivalente, mantenendo costante la concentrazione di Cr(VI) si è aumentata progressivamente la concentrazione di Fe(II).

Risulta perciò evidente come la concentrazione limite di Fe(II), tenendo costante la concentrazione di Cr(VI) a 150 µgCr(VI)/L, sia pari a 100 µgFe(II)/L. Tenendo quindi costante la concentrazione di Fe(II) si è fatta variare la quantità di Cr(VI) in soluzione analizzando i relativi fattori di recupero (Tab B.20).

Letture	No Cr(VI) + 100 µgFe(II)/L		100 $\left[\frac{\mu g}{L}\right]$ Cr(VI) + 100 µgFe(II)/L		
	Ass,	Conc	Ass,	Conc	F _{rec}
	[-]	$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$	[-]	$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$	[%]
1	0,016	3,58	0,275	103,19	99

Letture	No Cr(VI) + 100 µgFe(II)/L		70 $\left[\frac{\mu g}{L}\right]$ Cr(VI) + 100 µgFe(II)/L		
	Ass,	Conc	Ass,	Conc	F _{rec}
	[-]	$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$	[-]	$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$	[%]
1	0,016	3,58	0,187	69,35	94

Letture	No Cr(VI) + 10 µgFe(II)/L		50 $\left[\frac{\mu g}{L}\right]$ Cr(VI) + 100 µgFe(II)/L		
	Ass,	Conc	Ass,	Conc	F _{rec}
	[-]	$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$	[-]	$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$	[%]
1	0,02	5,12	0,145	53,19	96

Tab B.20 - Ricerca del rapporto minimo di interferenza tra cromo e ferro bivalente, mantenendo costante la concentrazione di Fe(II) precedentemente trovata, si è diminuita progressivamente la concentrazione di Fe(II)

PERMEATO DI SIERO DI LATTE

Per i dosaggi del permeato di siero di latte non sterilizzato si è fatto riferimento alla concentrazione calcolata relativa al consumo di accettori di elettroni pari a 3,4 mL/L di siero. Questo valore è stato aumentato solo del 50% in quanto i microcosmi realizzati costituiscono un sistema chiuso, non risulta perciò necessario utilizzare i fattori di sicurezza (5÷20) comunemente applicati in campo. Il valore che dovrà essere dosato nei microcosmi è pari quindi a 5 mL/L, le prove di interferenza vengono però effettuate sulle concentrazioni di siero pari a 1 mL/L, 5 mL/L e 10 mL/L. Avendo utilizzato anche in questo caso un matraccio da 200 mL per condurre prove dipendenti, i volumi di spike di permeato di siero necessari a creare le concentrazioni desiderate sono riportati in Tab B.21:

$C_f \left[\frac{mL}{L} \right]$	1	5	10
$V_{spike} [mL]$	0,2	1	2

Tab B.21 - Volume degli spike di permeato di siero di latte per il matraccio da 200mL

Per ognuna delle tre concentrazioni si è realizzato un set analitico come segue:

- 3 replicati di acqua di rete con siero di latte senza aggiunta di cromo
- 3 replicati di acqua di rete con siero con l'aggiunta di 150 µg/L cromo
- 3 replicati di acqua di rete con siero di con l'aggiunta di 800 µg/L cromo

Nelle tabelle sottostanti è possibile apprezzare i risultati relative alle concentrazioni di siero di 1 mL/L (Tab B.22), 5 mL/L (Tab B.23) e 10 mL/L (Tab B.24)

Lettura	No Cr(VI) + 1 mL/L		150 $\left[\frac{\mu g}{L} \right]$ Cr(VI) + 1 mL/L			800 $\left[\frac{\mu g}{L} \right]$ Cr(VI) + 1 mL/L				
	Ass,	Conc	Ass,	Conc	F _{rec}	Ass,	Conc letta	F _{molt}	Conc reale	F _{rec}
	[]	$\left[\frac{\mu g}{L} \right]$	[]	$\left[\frac{\mu g}{L} \right]$	[%]	[]	$\left[\frac{\mu g}{L} \right]$		$\left[\frac{\mu g}{L} \right]$	[%]
1	0,029	8,58	0,436	165,12	106	0,561	213,92	4	852,77	105
2	0,029	8,58	0,434	164,35	106	0,560	212,81		851,23	105
3	0,030	8,96	0,434	164,35	106	0,558	212,04		848,15	104

Tab B.22 - Valori di assorbanza risultati dalle analisi dei campioni per la valutazione dell'interferenza del siero di latte (1 mL/L), viene inoltre riportata la concentrazione corrispondente calcolata mediante la curva di taratura nonché il fattore di recupero e l'errore percentuale

Letture	No Cr(VI) + 5 mL/L		150 $\left[\frac{\mu g}{L}\right]$ Cr(VI) + 5 mL/L			800 $\left[\frac{\mu g}{L}\right]$ Cr(VI) + 5 mL/L				
	Ass,	Conc	Ass,	Conc	F _{rec}	Ass,	Conc letta	F _{molt}	Conc reale	F _{rec}
	[-]	$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$	[-]	$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$	[%]	[-]	$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$		$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$	[%]
1	0,034	10,5	0,441	167,04	106	0,566	215,12	4	860,46	106
2	0,034	10,5	0,442	167,42	107	0,565	214,73		858,92	105
3	0,034	10,5	0,442	167,42	107	0,566	215,12		860,46	106

Tab B.23 - Valori di assorbanza risultati dalle analisi dei campioni per la valutazione dell'interferenza del siero di latte (5 mL/L), viene inoltre riportata la concentrazione corrispondente calcolata mediante la curva di taratura nonché il fattore di recupero e l'errore percentuale

Letture	No Cr(VI) + 10 mL/L		150 $\left[\frac{\mu g}{L}\right]$ Cr(VI) + 10 mL/L			800 $\left[\frac{\mu g}{L}\right]$ Cr(VI) + 10 mL/L				
	Ass,	Conc	Ass,	Conc	F _{rec}	Ass,	Conc letta	F _{molt}	Conc reale	F _{rec}
	[-]	$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$	[-]	$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$	[%]	[-]	$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$		$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$	[%]
1	0,036	11,27	0,446	168,96	107	0,574	218,19	4	872,77	107
2	0,035	10,89	0,446	168,96	108	0,573	217,81		871,23	107
3	0,036	11,27	0,450	170,5	108	0,573	217,81		871,23	107

Tab B.24 - Valori di assorbanza risultati dalle analisi dei campioni per la valutazione dell'interferenza del siero di latte (10 mL/L), viene inoltre riportata la concentrazione corrispondente calcolata mediante la curva di taratura nonché il fattore di recupero e l'errore percentuale

Per nessun valore di concentrazione provato è riscontrata interferenza in quanto risultano fattori di recupero compresi tra il 90% e il 110%.

MELASSO DA BARBABIETOLA

Il valore calcolato per il consumo degli accettori di elettroni 500 mg/L è stato preso come riferimento per le prove di interferenza del melasso da barbabietola. La valutazione delle interferenze è stata in maniera dipendente, con matracci da 50 mL riempiti a partire da una soluzione unica di volume pari a 200 mL. Anche in questo caso è stato ampliato il range di concentrazioni di substrato da analizzare; le concentrazioni indagate sono: 250 mg/L, 500 mg/L e 1000 mg/L. In Tab B.25 sono riportati i valori in peso del melasso disciolto nel matraccio da 200mL per ottenere le rispettive concentrazioni.

$C_f \left[\frac{mg}{L}\right]$	251,3	502,35	1000,45
Peso[mg]	50,26	100,47	200,09

Tab B.25 – Pesi e relative concentrazioni in matraccio da 200mL per il melasso da barbabietola

Viene riportato per chiarezza il set analitico per l'analisi del melasso da barbabietola anche se analogo a quello relativo al siero di latte, sono prodotti 3 replicati per:

- acqua rete con 251,3 mg/L di melasso senza cromo
- acqua rete con 251,3 mg/L di melasso con 150 µg/L di Cr(VI)
- acqua rete con 251,3 mg/L di melasso con 800 µg/L di Cr(VI)
- acqua rete con 502,35 mg/L di melasso senza cromo
- acqua rete con 502,35 mg/L di melasso con 150 µg/L di Cr(VI)
- acqua rete con 502,35 mg/L di melasso con 800 µg/L di Cr(VI)
- acqua rete con 1000,45 mg/L di melasso senza cromo
- acqua rete con 1000,45 mg/L di melasso con 150 µg/L di Cr(VI)
- acqua rete con 1000,45 mg/L di melasso con 800 µg/L di Cr(VI)

Nelle tabelle Tab B.26, Tab B.27 e Tab B.28 è possibile apprezzare i risultati relative alle concentrazioni di melasso da barbabietola di 251,3mg/L, 502,35mg/L e 1000,45 mg/L.

Lettura	No Cr(VI) + 251,3 mg/L		150[µg/L] Cr(VI) + 251,3 mg/L			800[µg/L] Cr(VI) + 251,3 mg/L				
	Ass,	Conc	Ass,	Conc	F _{rec}	Ass,	Conc letta	F _{molt}	Conc reale	F _{re c}
	[-]	$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$	[-]	$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$	[%]	[-]	$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$	4	$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$	[%]
1	0,028	8,19	0,303	113,96	72	0,505	191,65		766,62	94
2	0,028	8,19	0,301	113,19	71	0,506	192,04		768,54	94
3	0,025	7,04	0,303	113,96	73	0,505	191,65		766,62	94

Tab B.26 - Valori di assorbanza risultati dalle analisi dei campioni per la valutazione dell'interferenza del melasso da barbabietola 251,3 mg/L, viene inoltre riportata la concentrazione corrispondente calcolata mediante la curva di taratura nonché il fattore di recupero e l'errore percentuale

Lettura	No Cr(VI) + 502,35 mg/L		150 $\left[\frac{\mu g}{L}\right]$ Cr(VI) + 502,35 mg/L			800 $\left[\frac{\mu g}{L}\right]$ Cr(VI) + 502,35 mg/L				
	Ass,	Conc	Ass,	Conc	F _{rec}	Ass,	Conc letta	F _{molt}	Conc reale	F _{re c}
	[-]	$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$	[-]	$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$	[%]	[-]	$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$	4	$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$	[%]
1	0,038	12,04	0,209	77,81	45	0,459	173,96		695,85	85
2	0,037	12,65	0,210	78,19	45	0,470	178,19		712,77	87
3	0,038	12,04	0,213	79,35	46	0,433	163,96		655,85	80

Tab B.27 - Valori di assorbanza risultati dalle analisi dei campioni per la valutazione dell'interferenza del melasso da barbabietola 502,35 mg/L, viene inoltre riportata la concentrazione corrispondente calcolata mediante la curva di taratura nonché il fattore di recupero e l'errore percentuale

Letture	No Cr(VI) + 1000,45 mg/L		150 $\left[\frac{\mu g}{L}\right]$ Cr(VI) + 1000,45 mg/L			800 $\left[\frac{\mu g}{L}\right]$ Cr(VI) + 1000,45 mg/L				
	Ass,	Conc	Ass,	Conc	F _{rec}	Ass,	Conc letta	F _{molt}	Conc reale	F _{re c}
	[-]	$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$	[-]	$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$	[%]	[-]	$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$		$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$	[%]
1	0,067	23,19	0,116	42,04	13	0,354	133,58	4	534,31	63
2	0,069	23,96	0,115	41,65	12	0,353	133,19		532,77	63
3	0,066	22,81	0,118	42,81	14	0,354	133,58		534,31	64

Tab B.28 - Valori di assorbanza risultati dalle analisi dei campioni per la valutazione dell'interferenza del melasso da barbabietola 1000,45 mg/L, viene inoltre riportata la concentrazione corrispondente calcolata mediante la curva di taratura nonché il fattore di recupero e l'errore percentuale.

Come risulta dai valori tabulati il melasso da barbabietola è fortemente interferente rendendo impossibile l'analisi tramite metodo colorimetrico. Il metodo spettrofotometrico potrebbe essere utilizzato solo per contaminazioni di cromo elevate a basse concentrazioni di melasso, gli unici fattori di recupero accettabili si riscontrano con un cromo pari a 800 $\mu g/L$ e con una concentrazione di melasso pari a 251,3 mg/L.

SUBSTRATO DA BIRRIFICIO

Le concentrazioni, espresse come mgCOD/L, testate per valutare l'interferenza causata dal substrato scarto da birrificio sono pari a: 59,7 mgCOD/L, 298,5 mgCOD/L e 597 mgCOD/L.

Queste concentrazioni, come già detto in 'calcolo degli accettori di elettroni e dosaggi', corrispondono al COD contenuto rispettivamente in 1 mL/L, 5 mL/L e 10 mL/L di siero di latte. Conoscendo il valore di COD del substrato di scarto del birrificio, pari a 121800 mgCOD/Lbirra, è possibile risalire al volume di substrato da iniettare nel matraccio da 200 mL per ottenere le concentrazioni desiderate. Il substrato da birrificio deve essere diluito per poter ottenere dei volumi di prelievo accettabili, la diluzione effettuata è stata pari a 1:10 ($C_i = 12180 \text{ mgCOD/L}$). Applicando la relazione $V_i C_i = V_f C_f$ è possibile ricavare i volumi iniziali riportati in Tab B.29.

$C_f \left[\frac{mgCOD}{L}\right]$	59,7	298,5	597
$V_{spike} [mL]$	0,98	4,90	9,80

Tab B.29 - Volume degli spike di permeato di siero di latte per il matraccio da 200mL

Per ognuna delle tre concentrazioni si è realizzato un set analitico come segue:

- 3 replicati di acqua di rete con scarto da birrificio senza aggiunta di cromo
- 3 replicati di acqua di rete con scarto da birrificio con l'aggiunta di 150µg/L cromo
- 3 replicati di acqua di rete con scarto da birrificio con l'aggiunta di 800µg/L cromo

Nelle tabelle sottostanti è possibile apprezzare i risultati relativi alle tre concentrazioni testate di substrato (Tab B.30 Tab B.31 e Tab B.32):

Letture	No Cr(VI) + 59,7 mgCOD/L		150 $\left[\frac{\mu g}{L}\right]$ Cr(VI) + 59,7 mgCOD/L			800 $\left[\frac{\mu g}{L}\right]$ Cr(VI) + 59,7 mgCOD/L				
	Ass,	Conc	Ass,	Conc	F _{rec}	Ass,	Conc letta	F _{molt}	Conc reale	F _{rec}
	[-]	$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$	[-]	$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$	[%]	[-]	$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$	4	$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$	[%]
1	0,032	9,73	0,429	162,42	104	0,558	212,04		848,15	104
2	0,035	10,89	0,428	162,04	103	0,552	209,73		838,92	103
3	0,033	10,12	0,429	162,42	104	0,557	211,65		846,62	104

Tab B.30 - Valori di assorbanza risultati dalle analisi dei campioni per la valutazione dell'interferenza del substrato da birrificio 59,7 mgCOD/L, viene inoltre riportata la concentrazione corrispondente calcolata mediante la curva di taratura nonché il fattore di recupero e l'errore percentuale

Letture	No Cr(VI) + 298,5 mgCOD/L		150 $\left[\frac{\mu g}{L}\right]$ Cr(VI) + 298,5 mgCOD/L			800 $\left[\frac{\mu g}{L}\right]$ Cr(VI) + 298,5 mgCOD/L				
	Ass,	Conc	Ass,	Conc	F _{rec}	Ass,	Conc letta	F _{molt}	Conc reale	F _{rec}
	[-]	$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$	[-]	$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$	[%]	[-]	$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$	4	$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$	[%]
1	0,034	10,5	0,435	164,73	105	0,565	214,73		858,92	105
2	0,036	11,27	0,432	163,58	104	0,564	213,35		857,39	105
3	0,032	9,73	0,439	166,27	106	0,564	213,35		857,39	105

Tab B.31 - Valori di assorbanza risultati dalle analisi dei campioni per la valutazione dell'interferenza del substrato da birrificio 298,5 mgCOD/L, viene inoltre riportata la concentrazione corrispondente calcolata mediante la curva di taratura nonché il fattore di recupero e l'errore percentuale

Letture	No Cr(VI) + 298,5 mgCOD/L		150 $\left[\frac{\mu g}{L}\right]$ Cr(VI) + 298,5 mgCOD/L			800 $\left[\frac{\mu g}{L}\right]$ Cr(VI) + 298,5 mgCOD/L				
	Ass,	Conc	Ass,	Conc	F _{rec}	Ass,	Conc letta	F _{molt}	Conc reale	F _{rec}
	[-]	$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$	[-]	$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$	[%]	[-]	$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$	4	$\left[\frac{\mu g}{L}\right]$	[%]
1	0,036	11,27	0,446	168,96	107	0,574	218,19		872,77	107
2	0,035	10,89	0,446	168,96	108	0,573	217,81		871,23	107
3	0,036	11,27	0,450	170,5	108	0,573	217,81		871,23	107

Tab B.32 - Valori di assorbanza risultati dalle analisi dei campioni per la valutazione dell'interferenza del substrato da birrificio 597 mgCOD/L, viene inoltre riportata la concentrazione corrispondente calcolata mediante la curva di taratura nonché il fattore di recupero e l'errore percentuale

I valori dei fattori di recupero non evidenziano una sostanziale influenza da parte del substrato sulla lettura spettrofotometrica in quanto i valori sono compresi tra 80 e 120 punti percentuali.

SOLUZIONI PER LA STABILIZZAZIONE DEL CAMPIONE

Per rendere esaustiva l'analisi delle interferenze sono stati valutati i possibili effetti sulla misura di assorbanza della soluzione buffer e della soda 5N utilizzate per la stabilizzazione del campione. Sono state eseguite 3 tipi di prove dove l'unica differenza sta nel quantitativo aggiunto di acido solforico per effettuare le analisi a diversi valori di pH:

- 1) 200 ml di acqua di rete con una concentrazione di cromo pari a 147 µg/L. A seguito dello sversamento in 3 matracci da 50 mL in ognuno sono stati aggiunti 500 µl di soluzione buffer (punto j del metodo SM) e 300 µl di NaOH 5N. Non è stato aggiunto acido solforico in quanto si vuole effettuare la lettura in condizioni alcaline (9,3÷9,5 come da metodo).
- 2) 200 ml di acqua di rete con una concentrazione di cromo pari a 147 µg/L. A seguito dello sversamento in 3 matracci da 50 mL in ognuno sono stati aggiunti 500 µl di soluzione buffer (punto j del metodo SM) e 300 µl di NaOH 5N più 3 gocce di soluzione di acido solforico. Il pH di questa prova assume valori prossimi alla neutralità.
- 3) 200 ml di acqua di rete con una concentrazione di cromo pari a 147 µg/L. A seguito dello sversamento in 3 matracci da 50 mL in ognuno sono stati aggiunti 500 µl di soluzione buffer (punto j del metodo SM), 300 µl di NaOH 5N più 0,5 mL di soluzione di acido solforico. Il pH, così facendo, viene portato all'interno del range previsto dal metodo (circa pH pari a 2)

Nelle tabelle Tab B.33 Tab B.34 e Tab B.35 vengono riportati i dati relativi alle tre prove condotte in tre differenti regimi di pH.

Letture	Assorbanza	Conc $\frac{\mu\text{g}}{\text{L}}$
1	0,18	66,65
2	0,15	55,12
3	0,163	60,12

Tab B.33 - Valori di assorbanza risultati dalle analisi dei campioni per la valutazione dell'interferenza della soluzione buffer e soda

Letture	Assorbanza	Conc $\left[\frac{\mu\text{g}}{\text{L}}\right]$
1	0,006	-0,269
2	0,008	0,5
3	0,006	-0,269

Tab B.34 - Valori di assorbanza risultati dalle analisi dei campioni per la valutazione della validità del metodo a pH 7

Letture	Assorbanza	Conc $\left[\frac{\mu\text{g}}{\text{L}}\right]$
1	0,401	151,65

Tab B.35 - Valori di assorbanza risultati dalle analisi dei campioni per la valutazione della validità del metodo a pH 2

In nessun caso si osservano interferenze significative da parte dei reagenti utilizzati per la stabilizzazione.

SIGLE E ABBREVIAZIONI

ADP – Adenosina Difosfato

AGI – Associazione Geotecnici Italiani

AN – Attenuazione Naturale

APAT – Agenzia per la Protezione dell'Ambiente e per i servizi Tecnici

APDC ammonio pirrolidinditiocarbammato

ARPAV– Agenzia Regionale per la Prevenzione e protezione Ambientale del Veneto

ASTM – American Society Standard Material

ATP – Adenosina Trifosfato

BHIB – Brain Heart Infusion Broth

BLV– Biological Limit Values

CEC – Cation Exchange Capacity

CFE – Cell Free Extract

CIMAL – Centro Italiano Medicina Ambiente e Lavoro

CL – Compact Layer

CNR – Consiglio Nazionale delle Ricerche

COD – Chemical Oxygen Demand

CSA – Capacità di Scambio Anionico

CSC – Capacità di Scambio Cationico

DL – Diffuse Layer

EC – Elettrocoagulazione

EDL – Electric Double Layers

EN – Norma Europea

GAC – Granular Activated Carbon

IARC – International Agency for Research on Cancer

IRSA – Istituto di Ricerca Sulle Acque

ISO – International Organization for Standardization

LA – Lutria Agar

LB – Luria Bacteria

M9 – Minimum Broth

MIC– Minimum Inhibitory Concentration

NADH – Nicotinammide Adenina Dinucleotide
NADPH – Nicotinammide Adenina Dinucleotide Fosfato
NAS – Nuclei Antisofisticazioni e Sanità dell'Arma
OD – Oxygen Dissolved
ORP – Oxygen Reduction Potential
OSHA – Occupational Safety & Health Administration
P&T– Pump and Treat
PEL – Permissible Exposure Limit
ppm – Parti per milione
PRB – Permeable Reactive barrier
PZC – Point of Zero Charge
REACH – Registration, Evaluation, Authorisation of Chemicals
ROS – Reactive Oxygen Species
S/S – Stabilizzazione e Solidificazione
TLV – Threshold Limit Value
TRK – Technische Richt Konzentrationen
TSB – Tryptic Soy Broth
TWA – Time Weighted Average
UNI – Ente Nazionale Italiano di Unificazione
USEPA– United States Environmental Protection Agency
WPC – Whey Protein Concentrate
WPI – Whey Protein Isolate
ZVI – Zero Valent Iron

INDICE DELLE FIGURE

Fig 1.1 – Diagramma di Pourbaix dell'elemento cromo (C D Palmer & Wittbrodt, 1991)	15
Fig 1.2 - Ciclo del cromo (Bartlett, 1991)	16
Fig 1.3 - Molecola di acido umico con gruppo funzionale idrochinone	17
Fig 2.1 - Esempio di realizzazione di vasca di contenimento	30
Fig 2.2 - Visione globale del sistema di reazioni coinvolte in un processo di elettrocoagulazione (Vepsalainen, 2012).....	51
Fig 2.3 - Configurazione del sistema di elettrocoagulazione in batch utilizzata per test di laboratorio (Bazrafshan et al., 2008)	52
Fig 2.4 - Schema reattivo della cella di elettrocoagulazione quando gli elettrodi sono sottoposti a d.d.p (Holt et al., 2002)	53
Fig 2.5 - Concentrazione di prodotti monomerici solubili di ferro e di Alluminio in equilibrio con idrossidi amorfi a 25°C e a potenziale 0 (Vepsalainen, 2012)	54
Fig 2.6 - Diagrammi di Pourbaix del ferro e alluminio.....	55
Fig 2.7 - Efficienza di rimozione percentuale in funzione della densità di corrente applicata a un sistema ad elettrodi in alluminio (Hamdan & El-Naas, 2014).....	56
Fig 2.8 - Efficienza di rimozione percentuale in funzione del materiale con cui sono realizzati gli elettrodi. Sono stati eseguiti tre test: con entrambi gli elettrodi di alluminio, con entrambi gli elettrodi in ferro e elettrodi misti (alluminio, ferro) (Hamdan & El-Naas, 2014)	57
Fig 2.9 - Effetto della forma iniziale del cromo sotto campo elettrico di 1V/cm.....	59
Fig 2.10 - Elettro osmosi in una matrice argillosa porosa.....	61
Fig 2.11 - A sinistra si ha la rappresentazione grafica dello strato diffuso. A destra viene rappresentato l'andamento del potenziale Z in funzione della distanza dallo ione metallico, secondo legge di Boltzmann	64
Fig 2.12 - Meccanismi di resistenza al cromo della cellula batterica. (A) meccanismo di assorbimento del cromo tramite il sistema di trasporto del solfato. (B) riduzione extracellulare del Cr(VI) a Cr(III). (C) riduzione intracellulare del Cr(VI) a Cr(III) tramite cromato reductasi. (D) funzione di risposta allo stress ossidativo. (E) pompa di efflusso del cromato con origine nei plasmidi. (F) meccanismo di formazione dei ROS e relativo stress ossidativo (Modificata da (Thatoi et al., 2014).....	69
Fig 2.13 - Similarità tra la forma ionica solfato e cromato	69
Fig 2.14 - Schema raffigurante le principali interazioni cellulari con lo zolfo che influenzano l'effetto di tossicità del cromo (Holland & Avery, 2011).....	70
Fig 2.15 - Differenti processi metabolici responsabili della riduzione del Cr(VI) in Cr(III) (Cheung & Gu, 2007).	72
Fig 2.16 - riduzione del Cr(VI) che coinvolge l'interazione tra catena respiratoria e Cr(VI) tramite proteine transmembratiche (pompe protoniche).....	75
Fig 2.17 - Effetto degli elettroni donatori sulle attività delle cromato reductasi estratte dal CFE del <i>A. crystallopoietes</i> ES 32	77
Fig 2.18 - Meccanismo di sporulazione della cellula vegetativa.....	84
Fig 2.19 - Schema semplificato del processo batterico di riduzione anaerobica diretto (Decorosi, 2010).....	89
Fig 2.20 - Processi di riduzione anaerobica indiretta a partire da batteri ferro riduttori (A) e solfato riduttori (B)	89
Fig 2.21 - Struttura molecolare del 3-D Microemulsion (3DMe®).....	106
Fig 2.22 - Formazione dell'unità micellare del 3-D Microemulsion (3DMe®)	106
Fig 2.23 - Sequenzialità e archi temporali dei rilasci degli elettroni-donatori	107

Fig 2.24 - Composto a lento rilascio di acido lattico (HRC®).....	108
Fig 2.25 - molecole principali che compongono l'MRC	109
Fig 2.26 - <i>Andamento dei differenti ceppi batterici in funzione del prodotto utilizzato. (1) Methylophilus, (2) Sphingobacterium, (3) Oxalobacter, (4) Arthrobacter, (5) Bacteriovorax, (6) Mesorhizobium, (7) Ramlibacter, (8) Chitinophaga, (9) unclassified Burkholderiales, (10) Dechloromonas, (11) Pseudomonas, (12) Rhizobium, (13) Azoarcus, (14) Sporomusa, (15) Acidovorax, (16) Sinorhizobium, (17) Desulfosporosinus, (18) unclassified gamma proteobacteria, (19) Variovorax, (20) Vogesella, (21) Rhodoferrax, (22) Clostridium, (23) Serratia. (Brodie et al., 2011)</i>	110
Fig 2.27 - Tipica consistenza dopo miscelazione dell'EHC-M	111
Fig 2.28 - Schema concettuale di un'unità di ultrafiltrazione. Si riconosce un flusso di permeato che attraversa la membrana e un flusso di retentato a cui viene impedito il passaggio.....	114
Fig 2.29 - Molecola del lattosio	115
Fig 2.30 - Consistenza del melasso black-strap.....	116
Fig 3.1 - Configurazione generica di una barriera reattiva	121
Fig 3.2 - Barriera permeabile di tipo continuo (sx) e funnel & gate (dx) (USEPA, 1998)	123
Fig 3.3 - Iniezione per gravità dei reagenti (sx) e iniezioni a più profondità (dx) (E. S. S. Suthersan, 1999).....	127
Fig 3.4 - Tecnologia Geoprobe.....	128
Fig 3.5 - Iniezione con ricircolo del reagente (Y. T. He & Su, 2015)	128
Fig 3.6 - Iniezione di idrogeno in corrente di azoto per la creazione di condizioni riducenti in falda. Modificata da (Danish Environmental Protection Agency, 2002).....	130
Fig 3.7 - Layout del sistema di iniezione di gas riducenti nel suolo, esso consta di punti di iniezione e di monitoraggio (Edward C Thornton & Amonette, 1999)	131
Fig 4.1 - Replicati con additivazione di resazurina per le prove per l'analisi del rilascio del ferro nel tempo	149
Fig 4.2 - Vista dell'allestimento del criostato per la conduzione delle prove a temperatura costante	150
Fig 4.3 - Vista del sistema MARTINA utilizzato per il campionamento continuo di dati redox, ossigeno disciolto e temperatura	150
Fig 4.4 - Replicati in bottiglia di vetro compatibile con sistema MARTINA opportunamente schermate dalla luce solare con film nero plastico.....	151
Fig 4.5 - Bottiglie di monitoraggio in vetro collegate al sistema MARTINA	155
Fig 4.6 - Vista dei replicati in plastica per ogni tipo di microcosmo.....	155
Fig 4.7 - Andamento del potenziale redox dei microcosmi contenuti sabbia, permeato di siero di latte (5mL/L) ed concentrazione di Cr(VI) pari rispettivamente a 5000 µg/L (curva blu) e 10000 µg/L (curva arancione).	156
Fig 4.8 - Andamento dell'ossigeno disciolto nel microcosmo con sabbia, permeato di siero di latte e concentrazione di Cr(VI) pari a 5000 µg/L.....	156
Fig 4.9 - Andamento del potenziale redox dei microcosmi contenuti sabbia, substrato da birrifico (298,5 mgCOD/L) e concentrazione di Cr(VI) pari rispettivamente a 5000 µg/L (curva blu) e 10000 µg/L (curva rossa).....	157
Fig 4.10 - Andamento dell'ossigeno disciolto (curva blu) nel microcosmo con sabbia, substrato da birrifico e concentrazione di Cr(VI) pari a 5000 µg/L.....	157
Fig 4.11 - Andamento delle curve ORP alle diverse concentrazioni di cromo e con diversi substrati dei sistemi realizzati con sabbia per lo studio della cinetica di rimozione.....	162

Fig 4.12 - Andamento dell'ossigeno nel tempo nei microcosmi realizzati con substrato scarto da birrificazione, sabbia e con una concentrazione iniziale pari a 5 mgCr(VI)/L.	163
Fig 4.13 - Andamento dell'ossigeno nel tempo nei microcosmi realizzati con permeato di siero di latte, sabbia e con una concentrazione iniziale pari a 5 mgCr(VI)/L.	164
Fig 4.14 - Andamento delle cinetiche di rimozione del Cr(VI) nei microcosmi con sabbia	165
Fig 4.15 - Andamento dei valori di pH per i microcosmi realizzati con sabbia per lo studio della cinetica di rimozione del Cr(VI).....	168
Fig 4.16 - Andamento delle curve ORP alle diverse concentrazioni di cromo e con diversi substrati dei sistemi realizzati con terreno d'acquifero per lo studio delle cinetiche di rimozione del contaminante	169
Fig 4.17 - Confronto negli andamenti dell'ossigeno disciolto tra i microcosmi realizzati con terreno d'acquifero e sabbia con substrato permeato di siero di latte alla concentrazione iniziale di 5 mgCr(VI)/L.....	170
Fig 4.18 - Confronto negli andamenti dell'ossigeno disciolto tra i microcosmi realizzati con terreno d'acquifero e sabbia con substrato scarto da birrificazione e concentrazione iniziale pari a 5 mgCr(VI)/L.....	170
Fig 4.19 - Andamento delle cinetiche di rimozione del Cr(VI) nei microcosmi con terreno d'acquifero	171
Fig 4.20 - Andamento dei valori di pH per i microcosmi realizzati con terreno d'acquifero per lo studio della cinetica di rimozione del contaminante.....	174
Fig A.1 - Attività di laboratorio- forno per il riscaldamento dei campioni a 105 °C per 24h	179
Fig A.2 - Attività di laboratorio- Porta campioni in alluminio (capsule).....	180
Fig A.3 - Attività di laboratorio - Campioni dopo il trattamento	180
Fig A.4 - Vista di un campione proveniente dall'acquifero.....	183
Fig A.5 - Attività di laboratorio- allestimento della prova granulometrica mediante l'utilizzo di setacci posti in serie con luce di passaggio decrescente	183
Fig A.6 - Attività di laboratorio- setacciatore con pedana vibrante in funzione per 15 minuti per effettuare l'analisi granulometrica.....	184
Fig A.7 - Andamento della distribuzione granulometrica della sabbia.....	185
Fig A.8 - Andamento della distribuzione granulometrica media cumulata per il terreno d'acquifero	187
Fig A.9 - Prova di laboratorio per la determinazione della porosità del terreno	189
Fig A.10 - Vista dei tre agitatori magnetici utilizzati per l'analisi del pH.....	191
Fig A.11 - Metodo delle diluizioni successive	192
Fig B.1 - Difenicarbazide e difenicarbazone	197
Fig B.2 - Soluzione di cromo diluita.....	199
Fig B.3 - Spettrofotometro UNICAM – UV2.....	201
Fig B.4 - Configurazione per la misura di assorbimento nel campo UV-VIS	202
Fig B.5 - Configurazione di Bunsen per dividere un fascio policromatico in più fasci monocromatici aventi lunghezza d'onda λ_1 e λ_2	203
Fig B.6 – Cuvette	203
Fig B.7 - Schema ottico di uno spettrofotometro a doppio raggio nello spazio	205
Fig B.8 - Schema ottico di uno spettrofotometro a doppio raggio nello spazio	205
Fig B.9 - Attività sperimentale per la preparazione degli standard reattivi per la tracciatura della retta di taratura.....	209
Fig B.10 - Retta di taratura	210

INDICE DELLE TABELLE

Tab 1.1 - Forme più comuni di composti ionici in cui si trova il cromo esavalente (Deltcombe et al. in Marks, 1997).....	14
Tab 1.2 - Proprietà tossicologiche del Cr(III) messe a confronto con quelle del Cr(VI) .	24
Tab 1.3 - Tabella riassuntiva dei limiti legislativi previsti dalle tabelle 1 e 2 dell'allegato V del D.Lgs 152/2006 per quanto riguarda acque e terreni in funzione della loro fruizione	24
Tab 2.1 - Vantaggi e limiti dello scavo e smaltimento.....	30
Tab 2.2 - Caratteristiche delle soluzioni estraenti.....	32
Tab 2.3 - Applicabilità del soil washing in funzione della natura ea e del tipo di contaminante	32
Tab 2.4 - Ione e rispettivo meccanismo di immobilizzazione nel processo di SS	34
Tab 2.5 - Parametri fisico chimici del contaminante e relativa influenza sul trattamento	36
Tab 2.6 - soluzioni estraenti tipicamente utilizzate per il soil flushing e tipologia di inquinanti rimovibili con esse	36
Tab 2.7 - aspetti negati e positivi degli agenti chelanti rispetto agli agenti estraenti acidi e/o basici	37
Tab 2.8 - Classi di specie riducenti utilizzate in matrici contaminate da cromo esavalente	38
Tab 2.9 - Rielaborazione della tabella degli studi di Palmer & Puls, 1994	40
Tab 2.10 - Reazioni coinvolte con Fe(0) in stato aerobico e anaerobico	41
Tab 2.11 - Accettori di elettroni in funzione del pH nei processi a ZVI	42
Tab 2.12 - Influenza dei parametri di una riduzione ad opera di ZVI.....	43
Tab 2.13 - Prodotti ZVI commerciali (Gheju, 2011).....	46
Tab 2.14 - tabella riassuntiva delle reazioni che avvengono in un processo di elettrocoagulazione.....	54
Tab 2.15 - Coefficienti di diffusione non efficace e coefficienti di mobilità ionica per tipiche specie anioniche e cationiche presenti in acquifero	62
Tab 2.16 - Principali geni dell'E.coli che inducono le funzioni SOS per la protezione del codice genetico (Janion, 2008).....	71
Tab 2.17 - Meccanismi di trasferimento elettronico e relativa formazione di ROS	74
Tab 2.18 - Principali ceppi batterici in grado di ridurre il Cr(VI) in Cr(III) in aerobiosi	76
Tab 2.19 - Effetto dei differenti substrati organici sulla riduzione del Cr(VI) ad opera del Bacillus Sp. A pH 7, temperatura di 37°C ed una concentrazione iniziale di cromo esavalente pari a 60 mg/L. (Murugavelh & Mohanty, 2013)	78
Tab 2.20 - Ceppi batterici relativi al batterio B.maroccanus. Modificata da Viti et al. 2003	79
Tab 2.21 - Comparazione tra l'assorbimento apportato da cellule vegetative vs endospore @pH 2.....	84
Tab 2.22 - Confronto tra il trend di adsorbimento delle cellule vegetative e delle endospore, valutato a pH e temperatura ottimi	85
Tab 2.23 - Principali ceppi batterici in grado di ridurre il Cr(VI) in Cr(III) in anaerobiosi	90
Tab 2.24 - Principali ceppi batterici in grado di ridurre il Cr(VI) in Cr(III) in aerobiosi e anaerobiosi.....	96
Tab 2.25 - Ratei di riduzione in funzione del tipo di substrato in alimento	96
Tab 2.26 - Efficienza di rimozione del P.Fluorescens. Elaborata da (Devi et al., 2012)	101
Tab 2.27 - Riduzione del cromo ad opera di celle in ambiente aerobico	103
Tab 2.28 - Riduzione del cromo ad opera di celle in ambiente anaerobico.....	103

Tab 2.29 - Valori medi dei principali componenti del siero di latte vaccino e ovino. ...	113
Tab 2.30 - Classificazione del siero di latte vaccino in funzione dell'acidità e volari medi per ogni componente principale	113
Tab 2.31 - Caratteristiche dei principali derivati del siero e valori medi di ogni componente	114
Tab 2.32 - Principale utilizzo del permeato e lattosio	115
Tab 2.33 - composizione media del melasso da barbabietola e da canna da zucchero (divini.net).....	117
Tab 2.34 - Caratteristiche degli scarti organici dell'industria della birra	118
Tab 2.35 - Descrizione dei principali vantaggi e svantaggi apportati dall'attenuazione naturale.....	120
Tab 3.1 - Materiali di riempimento per PRB in funzione del contaminante metallico ..	124
Tab 3.2 - Sostanze organiche e relative caratteristiche di iniettabilità per la realizzazione di fronti reattivi (Y. T. He & Su, 2015)	126
Tab 3.3 - Influenza dei parametri geologici e idrogeologici sulla progettazione degli interventi di iniezione (USEPA, 2000).....	127
Tab 3.4 - Parametri caratteristici di un impianto ad idrogeno Sapio	131
Tab 4.1 - Caratteristiche dell'acqua di rete e dell'acqua di prima falda milanese (zona Bovisa - Milano).....	133
Tab 4.2 - Caratteristiche dei due terreni usati nella sperimentazione.....	135
Tab 4.3 - Composizione media del melasso da barbabietola	137
Tab 4.4 - Andamento relativo al consumo di accettori degli elettroni in fase liquida....	138
Tab 4.5 - Concentrazione degli accettori degli elettroni costituenti l'acqua utilizzata per la realizzazione dei microcosmi	139
Tab 4.6 - Quantitativo di idrogeno molecolare necessario al completo consumo dell'accettore di elettroni.....	140
Tab 4.7 - METODO 1: Idrogeno prodotto da ogni unità della molecola di riferimento e concentrazione di principio attivo da dosare per il completo consumo dell'accettore di elettroni	141
Tab 4.8 - METODO 2: idrogeno prodotto da ogni unità della molecola di riferimento e concentrazione di principio attivo da dosare per il completo consumo dell'accettore di elettroni	142
Tab 4.9 - METODO 3: idrogeno ipoteticamente rilasciato dalla molecola di principio attivo	142
Tab 4.10 - METODO 3: idrogeno prodotto da ogni unità della molecola di riferimento e concentrazione di lattosio da dosare per il completo consumo dell'accettore di elettroni	143
Tab 4.11 - METODO 3: idrogeno prodotto da ogni unità della molecola di riferimento e concentrazione di saccarosio da dosare per il completo consumo dell'accettore di elettroni	143
Tab 4.12 - Specifiche dei microcosmi per le prove preliminari con sabbia senza aggiunta di ferro.....	146
Tab 4.13 - Specifiche dei campioni realizzati con sabbia per le prove preliminari con aggiunta di Fe(II).....	147
Tab 4.14 - Specifiche dei microcosmi per le prove preliminari con terreno d'acquifero	148
Tab 4.15 - Composizione in sintesi dei microcosmi con sabbia realizzati per il tracciamento della cinetica di abbattimento del Cr(VI).....	152
Tab 4.16 - Composizione in sintesi dei microcosmi con terreno d'acquifero realizzati per il tracciamento della cinetica di abbattimento del Cr(VI).....	153

Tab 4.17 - Caratterizzazione iniziale delle soluzioni in alimento dei microcosmi	154
Tab 4.18 - Valori di pH, redox e temperatura iniziali per i microcosmi realizzati con sabbia per la cinetica di rimozione	154
Tab 4.19 - Valori di pH, redox e temperatura iniziali per i microcosmi realizzati con terreno d'acquifero per la cinetica di rimozione	154
Tab 4.20 - pH e temperatura iniziali per le quattro configurazioni di microcosmi delle prove per la rimozione	158
Tab 4.21 - Concentrazione a 7 d di incubazione in microcosmo di tipo 1 (5 mg Cr(VI)/L iniziali, siero, sabbia).....	158
Tab 4.22 - Concentrazione a 7 d di incubazione in microcosmo di tipo 2 (10 mg Cr(VI)/L iniziali, siero, sabbia).....	158
Tab 4.23 - Concentrazione a 7 d di incubazione in microcosmo di tipo 3 (5 mg Cr(VI)/L iniziali, birra, sabbia).....	158
Tab 4.24 - Concentrazione a 7 d di incubazione in microcosmo di tipo 4 (10 mg Cr(VI)/L iniziali, birra, sabbia).....	158
Tab 4.25 - Concentrazioni del replicato 2 per ciascuna tipo di microcosmo senza aggiunta di ferro. Le percentuali di abbattimento si riferiscono ad un periodo di tempo pari a 38 giorni dall'allestimento	159
Tab 4.26 - Concentrazioni per ciascuna tipo di microcosmo senza aggiunta di ferro realizzato con sabbia per le prove preliminari. Le percentuali di abbattimento si riferiscono ad un periodo di tempo pari a 38 giorni dall'allestimento	159
Tab 4.27 - Concentrazioni e rese ottenute nei microcosmi con terreno d'acquifero dopo 7 giorni dall'inizio della prova.....	160
Tab 4.28 - Concentrazioni e rese ottenute nei microcosmi con terreno d'acquifero dopo 29 giorni dall'inizio della prova	160
Tab 4.29 - Rilascio di ferro bivalente e manganese per sabbia e terreno d'acquifero	161
Tab 4.30 - Andamento nel tempo della concentrazione di Cr(VI) nel tempo dei diversi replicati realizzati con sabbia e substrato scarto da birrificazione alla concentrazione iniziale di 5 mgCr(VI)/L. Vengono riportate le percentuali di abbattimento l'errore del metodo colorimetrico	166
Tab 4.31 - Variazione della concentrazione di Cr(VI) nel tempo dei diversi replicati realizzati con sabbia e substrato permeato di siero di latte alla concentrazione iniziale di 5mgCr(VI)/L. Vengono riportate le percentuali di abbattimento l'errore del metodo colorimetrico	166
Tab 4.32 - Andamento nel tempo della concentrazione di Cr(VI) nel tempo dei diversi replicati realizzati con sabbia e substrato scarto da birrificazione alla concentrazione iniziale di 10 mgCr(VI)/L. Vengono riportate le percentuali di abbattimento l'errore del metodo colorimetrico	167
Tab 4.33 - Andamento nel tempo della concentrazione di Cr(VI) nel tempo dei diversi replicati realizzati con sabbia e substrato permeato di siero di latte alla concentrazione iniziale di 10 mgCr(VI)/L. Vengono riportate le percentuali di abbattimento l'errore del metodo colorimetrico	167
Tab 4.34 - Andamento nel tempo della concentrazione di Cr(VI) nel tempo dei diversi replicati realizzati con terreno d'acquifero e substrato scarto da birrificazione alla concentrazione iniziale di 5 mgCr(VI)/L. Vengono riportate le percentuali di abbattimento l'errore del metodo colorimetrico	172
Tab 4.35 - Andamento nel tempo della concentrazione di Cr(VI) nel tempo dei diversi replicati realizzati con terreno d'acquifero e substrato permeato di siero di latte alla concentrazione iniziale di 5 mgCr(VI)/L. Vengono riportate le percentuali di abbattimento l'errore del metodo colorimetrico	172

Tab 4.36 - Andamento nel tempo della concentrazione di Cr(VI) nel tempo dei diversi replicati realizzati con terreno d'acquifero e substrato permeato di siero di latte alla concentrazione iniziale di 10 mgCr(VI)/L. Vengono riportate le percentuali di abbattimento l'errore del metodo colorimetrico.....	173
Tab 4.37 - Andamento nel tempo della concentrazione di Cr(VI) nel tempo dei diversi replicati realizzati con terreno d'acquifero e substrato permeato di siero di latte alla concentrazione iniziale di 10 mgCr(VI)/L. Vengono riportate le percentuali di abbattimento l'errore del metodo colorimetrico.....	174
Tab A.1 - Dati acquisti necessari al calcolo dell'umidità della sabbia	180
Tab A.2 - Dati acquisti necessari al calcolo dell'umidità per il terreno d'acquifero	180
Tab A.3 - dati acquisti necessari al calcolo della frazione di carbonio organico per la sabbia	181
Tab A.4 - dati acquisti necessari al calcolo della frazione di carbonio organico per il terreno d'acquifero	182
Tab A.5 - Metodo di valutazione secondo ARPAV per la sostanza organica	182
Tab A.6 - Dati acquisiti necessari al calcolo della distribuzione granulometrica. I dati in tabella si riferiscono alla prima di tre prove	184
Tab A.7 - Dati acquisiti necessari al calcolo della distribuzione granulometrica. I dati in tabella si riferiscono alla seconda di tre prove	185
Tab A.8 - Dati acquisiti necessari al calcolo della distribuzione granulometrica. I dati in tabella si riferiscono alla terza di tre prove	185
Tab A.9 - Tabella classificazione AGI 1	186
Tab A.10 - Dati acquisiti necessari al calcolo della distribuzione granulometrica. I dati in tabella si riferiscono alla prima di tre prove per il terreno d'acquifero	186
Tab A.11 - Dati acquisiti necessari al calcolo della distribuzione granulometrica. I dati in tabella si riferiscono alla seconda di tre prove per il terreno d'acquifero.....	187
Tab A.12 - Dati acquisiti necessari al calcolo della distribuzione granulometrica. I dati in tabella si riferiscono alla terza di tre prove per il terreno d'acquifero.....	187
Tab A.13 - Tabella per la classificazione AGI 2.....	188
Tab A.14 - Dati acquisti necessari al calcolo della densità apparente della sabbia.....	188
Tab A.15 - Dati acquisti necessari al calcolo della densità apparente del terreno da acquifero	188
Tab A.16 - Dati acquisti necessari al calcolo della porosità della sabbia	190
Tab A.17 - Dati acquisti necessari al calcolo della porosità del terreno d'acquifero	190
Tab A.18 - Risultati relativi al test in triplicato per la ricerca del pH medio della sabbia	191
Tab A.19 - Risultati relativi al test in triplicato per la ricerca del pH medio del terreno d'acquifero	191
Tab A.20 - Classificazione ARPAV per i terreni in funzione del pH	191
Tab A.21 - Composizione media dell'L.D. Agar. La composizione può variare in funzione delle performance desiderate	192
Tab A.22 - Conta batterica dei terreni utilizzati nei microcosmi	193
Tab B.1 - Caratteristiche chimico fisiche dell'idrossido di ammonio estrapolate dalla scheda di sicurezza secondo regolamento europeo N° 1907/2006 (REACH).....	195
Tab B.2 - Caratteristiche chimico fisiche dell'ammonio solfato estrapolate dalla scheda di sicurezza secondo regolamento europeo N° 1907/2006 (REACH)	195
Tab B.3 - Caratteristiche chimico fisiche dell'idrossido di sodio estrapolate dalla scheda di sicurezza secondo regolamento europeo N° 1907/2006 (REACH)	196
Tab B.4 - Caratteristiche chimico fisiche dell'acido solforico estrapolate dalla scheda di sicurezza secondo regolamento europeo N° 1907/2006 (REACH)	196

Tab B.5 - Caratteristiche chimico fisiche della difenilcarbazide estrapolate dalla scheda di sicurezza secondo regolamento europeo N° 1907/2006 (REACH)	197
Tab B.6 - Valori di pH, temperatura e redox del campione in diverse modalità di preparazione della bottiglia siero 5 mgCr(VI)/L.....	199
Tab B.7 - Concentrazione della bottiglia siero 5 mgCr(VI)/L nelle diverse modalità di preparazione	199
Tab B.8 - Valori di pH, temperatura e redox del campione in diverse modalità di preparazione della bottiglia birra 5 mgCr(VI)/L.....	200
Tab B.9 - Concentrazione della bottiglia birra 5 mgCr(VI)/L nelle diverse modalità di preparazione	200
Tab B.10 - Valori di pH, temperatura e redox del campione in diverse modalità di preparazione della bottiglia siero 10 mgCr(VI)/L.....	200
Tab B.11 - Concentrazione della bottiglia siero 10 mgCr(VI)/L nelle diverse modalità di preparazione	200
Tab B.12 - Valori di pH, temperatura e redox del campione in diverse modalità di preparazione della bottiglia birra 10 mgCr(VI)/L.....	200
Tab B.13 - Valori di pH, temperatura e redox del campione in diverse modalità di preparazione della bottiglia birra 10 mgCr(VI)/L.....	200
Tab B.6 - Concentrazioni e relativi volumi per la realizzazione della retta di taratura..	208
Tab B.15 - Assorbanze e concentrazioni relative alla costruzione della retta di taratura	210
Tab B.16 - Volumi di soluzione di cromo da iniettare in un matraccio da 200mL per ottenere le rispettive concentrazioni finali Cf di Cr(VI). Analogamente alla curva di taratura, a causa della sensibilità dello strumento dosatore, le concentrazioni realmente in s	212
Tab B.17 - Valori di assorbanza risultati dalle analisi dei campioni con acqua di rete effettuate con lo spettrofotometro, viene inoltre riportata la concentrazione corrispondente calcolata mediante la curva di taratura nonché il fattore di recupero e l'errore percentuale.....	213
Tab B.18 - Valori di assorbanza risultati dalle analisi dei campioni con acqua di rete ed una concentrazione di Fe(II) di 10 mg/L effettuate con lo spettrofotometro, viene inoltre riportata la concentrazione corrispondente calcolata mediante la curva di taratura	214
Tab B.19 - Ricerca del rapporto minimo di interferenza tra cromo e ferro bivalente, mantenendo costante la concentrazione di Cr(VI) si è aumentata progressivamente la concentrazione di Fe(II).....	215
Tab B.20 - Ricerca del rapporto minimo di interferenza tra cromo e ferro bivalente, mantenendo costante la concentrazione di Fe(II) precedentemente trovata, si è diminuita progressivamente la concentrazione di Fe(II)	215
Tab B.21 - Volume degli spike di permeato di siero di latte per il matraccio da 200mL	216
Tab B.22 - Valori di assorbanza risultati dalle analisi dei campioni per la valutazione dell'interferenza del siero di latte (1 mL/L), viene inoltre riportata la concentrazione corrispondente calcolata mediante la curva di taratura nonché il fattore di recupero e l'errore percentuale.....	216
Tab B.23 - Valori di assorbanza risultati dalle analisi dei campioni per la valutazione dell'interferenza del siero di latte (5 mL/L), viene inoltre riportata la concentrazione corrispondente calcolata mediante la curva di taratura nonché il fattore di recupero e l'errore percentuale.....	217
Tab B.24 - Valori di assorbanza risultati dalle analisi dei campioni per la valutazione dell'interferenza del siero di latte (10 mL/L), viene inoltre riportata la	

concentrazione corrispondente calcolata mediante la curva di taratura nonché il fattore di recupero e l'errore percentuale	217
Tab B.25 – Pesi e relative concentrazioni in matraccio da 200mL per il melasso da barbabietola	217
Tab B.26 - Valori di assorbanza risultati dalle analisi dei campioni per la valutazione dell'interferenza del melasso da barbabietola 251,3 mg/L, viene inoltre riportata la concentrazione corrispondente calcolata mediante la curva di taratura nonché il fattore di recupero e l'errore percentuale	218
Tab B.27 - Valori di assorbanza risultati dalle analisi dei campioni per la valutazione dell'interferenza del melasso da barbabietola 502,35 mg/L, viene inoltre riportata la concentrazione corrispondente calcolata mediante la curva di taratura nonché il fattore di recupero e l'errore percentuale	218
Tab B.28 - Valori di assorbanza risultati dalle analisi dei campioni per la valutazione dell'interferenza del melasso da barbabietola 1000,45 mg/L, viene inoltre riportata la concentrazione corrispondente calcolata mediante la curva di taratura nonché il fattore di recupero e l'errore percentuale	219
Tab B.29 - Volume degli spike di permeato di siero di latte per il matraccio da 200mL	219
Tab B.30 - Valori di assorbanza risultati dalle analisi dei campioni per la valutazione dell'interferenza del substrato da birrificio 59,7 mgCOD/L, viene inoltre riportata la concentrazione corrispondente calcolata mediante la curva di taratura nonché il fattore di recupero e l'errore percentuale	220
Tab B.31 - Valori di assorbanza risultati dalle analisi dei campioni per la valutazione dell'interferenza del substrato da birrificio 298,5 mgCOD/L, viene inoltre riportata la concentrazione corrispondente calcolata mediante la curva di taratura nonché il fattore di recupero e l'errore percentuale	220
Tab B.32 - Valori di assorbanza risultati dalle analisi dei campioni per la valutazione dell'interferenza del substrato da birrificio 597 mgCOD/L, viene inoltre riportata la concentrazione corrispondente calcolata mediante la curva di taratura nonché il fattore di recupero e l'errore percentuale	220
Tab B.33 - Valori di assorbanza risultati dalle analisi dei campioni per la valutazione dell'interferenza della soluzione buffer e soda	221
Tab B.34 - Valori di assorbanza risultati dalle analisi dei campioni per la valutazione della validità del metodo a pH 7.....	222
Tab B.35 - Valori di assorbanza risultati dalle analisi dei campioni per la valutazione della validità del metodo a pH 2.....	222

BIBLIOGRAFIA

- Abskharon, R. N. N., El-Rab, G. S. M. F., Hassan, S. H. a, & Shoreit, a a M. (2009). Reduction of toxic hexavalent chromium by E. coli. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, 4(2), 98–103. Retrieved from [http://www.idosi.org/gjbb/gjbb4\(2\)09/6.pdf](http://www.idosi.org/gjbb/gjbb4(2)09/6.pdf)
- Abskharon, R N N, Gad El-rab S.M.F., H. and S. a. a. M. (2010). Reduction of chromium by E.coli. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*.
- Acar, Y. B., & Alshawabkeh, A. N. (1993). Principles of electrokinetic remediation. *Environmental Science & Technology*, 27(13), 2638–2647. <http://doi.org/10.1021/es00049a002>
- Ackerley, D. F., Gonzalez, C. F., Keyhan, M., Blake, R., & Matin, a. (2004). Mechanism of chromate reduction by the Escherichia coli protein, NfsA, and the role of different chromate reductases in minimizing oxidative stress during chromate reduction. *Environmental Microbiology*, 6, 851–860. <http://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00639.x>
- Ackerley, D. F., Gonzalez, C. F., Park, C. H., Ii, R. B., Matin, a, & Keyhan, M. (2004). Chromate-Reducing Properties of Soluble Flavoproteins from Pseudomonas putida and Escherichia coli Chromate-Reducing Properties of Soluble Flavoproteins from Pseudomonas putida and Escherichia coli, 70(2), 873–882. <http://doi.org/10.1128/AEM.70.2.873>
- Aertsen, A., & Michiels, C. W. (2004). Stress and how bacteria cope with death and survival. *Critical Reviews in Microbiology*, 30(4), 263–73. <http://doi.org/10.1080/10408410490884757>
- Aguilera, S., Aguilar, M. E., Chávez, M. P., López-Meza, J. E., Pedraza-Reyes, M., Campos-García, J., & Cervantes, C. (2004). Essential residues in the chromate transporter ChrA of Pseudomonas aeruginosa. *FEMS Microbiology Letters*, 232, 107–112. [http://doi.org/10.1016/S0378-1097\(04\)00068-0](http://doi.org/10.1016/S0378-1097(04)00068-0)
- Ahn, J. S., Chon, C. M., Moon, H. S., & Kim, K. W. (2003). Arsenic removal using steel manufacturing byproducts as permeable reactive materials in mine tailing containment systems. *Water Research*, 37(10), 2478–2488. [http://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00637-1](http://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00637-1)

- Alam, M. Z., & Malik, A. (2008). Chromate resistance, transport and bioreduction by *Exiguobacterium* sp. ZM-2 isolated from agricultural soil irrigated with tannery effluent. *Journal of Basic Microbiology*, 48(Vi), 416–420.
<http://doi.org/10.1002/jobm.200800046>
- Alidokht, L., Khataee, A. R., Reyhanitabar, A., & Oustan, S. (2011). Cr(VI) Immobilization Process in a Cr-Spiked Soil by Zerovalent Iron Nanoparticles: Optimization Using Response Surface Methodology. *Clean - Soil, Air, Water*, 39(7), 633–640. <http://doi.org/10.1002/clen.201000461>
- Amandola, G., & Terreni, V. (1976). *Analisi chimica strumentale e tecnica*. Tamburini. Retrieved from <https://books.google.it/books?id=edymnQEACAAJ>
- Andrade, M. R., & Costa, J. a V. (2007). Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. *Aquaculture*, 264(1-4), 130–134.
<http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.11.021>
- Arias, Y. M., & Tebo, B. M. (2003). Cr (VI) Reduction by Sulfidogenic and Nonsulfidogenic Microbial Consortia Cr (VI) Reduction by Sulfidogenic and Nonsulfidogenic Microbial Consortia, 69(3), 1847–1853.
<http://doi.org/10.1128/AEM.69.3.1847>
- Badar, U., Ahmed, N., Beswick, a. J., Pattanapitpaisal, P., & Macaskie, L. E. (2000). Reduction of chromate by microorganisms isolated from metal contaminated sites of Karachi, Pakistan. *Biotechnology Letters*, 22(Vi), 829–836.
<http://doi.org/10.1023/A:1005649113190>
- Bae, W. C., Kang, T. G., Kang, I. K., Won, Y. J., & Jeong, B. C. (2000). Reduction of Hexavalent Chromium by *Escherichia coli* ATCC 33456 in Batch and Continuous Cultures. *The Journal of Microbiology*, 38(1), 36–39.
- Bae, W.-C., Lee, H.-K., Choe, Y.-C., Jahng, D.-J., Lee, S.-H., Kim, S.-J., ... Jeong, B.-C. (2005). Purification and characterization of NADPH-dependent Cr(VI) reductase from *Escherichia coli* ATCC 33456. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, 43(1), 21–27.
- Bailey, S. E., Olin, T. J., Bricka, R. M., & Adrian, D. D. (1999). A review of potentially low-cost sorbents for heavy metals. *Water Research*, 33(11), 2469–2479.
[http://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00475-8](http://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00475-8)
- Baker, A. J. M., & Proctor, J. (1990). The influence of cadmium, copper, lead, and zinc on the distribution and evolution of metallophytes in the British Isles. *Plant Systematics and Evolution*, 173, 91–108.

- Balducci, G. (n.d.). La legge di Lambert-Beer.
- Barak, Y., Thorne, S. H., Ackerley, D. F., Lynch, S. V., Contag, C. H., & Matin, a. (2006). New enzyme for reductive cancer chemotherapy, YieF, and its improvement by directed evolution. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(January), 97–103. <http://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-05-0365>
- Barcelona, M. J., & Holm, T. R. (1992). Oxidation-reduction capacities of aquifer solids. *Environmental Science & Technology*, 26(12), 2540–2540. <http://doi.org/10.1021/es00036a033>
- Bartlett, R. J. (1991). Chromium cycling in soils and water: links, gaps, and methods. *Environmental Health Perspectives*, 92, 17–24. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1519379&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Bazrafshan, E., Mahvi, A. H., Naseri, S., & Mesdaghinia, A. R. (2008). Performance evaluation of electrocoagulation process for removal of chromium (VI) from synthetic chromium solutions using iron and aluminum electrodes. *Turkish Journal of Engineering and Environmental Sciences*, 32, 59–66.
- Belchik, S. M., Kennedy, D. W., Dohnalkova, A. C., Wang, Y., Sevinc, P. C., Wu, H., ... Shi, L. (2011). Extracellular reduction of hexavalent chromium by cytochromes MtrC and OmcA of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(12), 4035–4041. <http://doi.org/10.1128/AEM.02463-10>
- Ben Sasson, M., Calmano, W., & Adin, A. (2009). Iron-oxidation processes in an electroflocculation (electrocoagulation) cell. *Journal of Hazardous Materials*, 171(1-3), 704–9. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.06.057>
- Bestetti, G., & Galli, E. (2008). *Microbiologia ambientale ed elementi di ecologia microbica*. Retrieved from http://books.google.it/books/about/Microbiologia_ambientale_ed_elementi_di.html?id=vwR3PgAACAAJ&pgis=1
- Bincoletto, T. (2007). *Le barriere reattive permeabili: sperimentazioni sul materiale cu/al per la decontaminazione di acque da solventi clorurati*. Università degli Studi di Trieste.
- Blowes, D. W., Ptacek, C. J., & Jambor, J. L. (1997). In-situ remediation of Cr(VI)-contaminated groundwater using permeable reactive walls: Laboratory studies. *Environmental Science and Technology*, 31(12), 3348–3357. <http://doi.org/10.1021/es960844b>

- Boneschi, V., & Boniardi, M. (2008). Gli acciai inox e la resistenza alla corrosione. *Lamiera*.
- Boni, M. R., & Scaffoni, S. (2009). The potential of compost-based biobarriers for Cr(VI) removal from contaminated groundwater: Column test. *Journal of Hazardous Materials*, 166, 1087–1095. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.12.036>
- Bonomo L., Saponaro S., R. F. (2005). *Bonifica dei Siti, Caratterizzazione e Tecnologie di Risanamento*. (McGraw-Hill, Ed.).
- Bopp, L. H., & Ehrlich, H. L. (1988). Chromate resistance and reduction in *Pseudomonas fluorescens* strain LB300. *Archives of Microbiology*, 150, 426–431. <http://doi.org/10.1007/BF00422281>
- Brodie, E. L., Joyner, D. C., Faybishenko, B., Conrad, M. E., Rios-Velazquez, C., Malave, J., ... Hazen, T. C. (2011). Microbial community response to addition of polylactate compounds to stimulate hexavalent chromium reduction in groundwater. *Chemosphere*, 85(4), 660–665. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.07.021>
- Brown, S. D., Thompson, M. R., Verberkmoes, N. C., Chourey, K., Shah, M., Zhou, J., ... Thompson, D. K. (2006). Molecular dynamics of the *Shewanella oneidensis* response to chromate stress. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 5(Vi), 1054–1071. <http://doi.org/10.1074/mcp.M500394-MCP200>
- Camargo, F. a O., Bento, F. M., Okeke, B. C., & Frankenberger, W. T. (2004). Hexavalent chromium reduction by an actinomycete, arthrobacter crystallopoietes ES 32. *Biological Trace Element Research*, 97, 183–194. <http://doi.org/10.1385/BTER:97:2:183>
- Camargo, F. a O., Okeke, B. C., Bento, F. M., & Frankenberger, W. T. (2003). In vitro reduction of hexavalent chromium by a cell-free extract of *Bacillus* sp. ES 29 stimulated by Cu²⁺. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62, 569–573. <http://doi.org/10.1007/s00253-003-1291-x>
- Cao, X., Guo, J., Mao, J., & Lan, Y. (2011). Adsorption and mobility of Cr(III)-organic acid complexes in soils. *Journal of Hazardous Materials*, 192(3), 1533–1538. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.06.076>
- Carey, M. a, Fretwell, B. a, Mosley, N. G., Smith, J. W. N., & Court, O. (2002). Guidance on the use of permeable reactive barriers for remediating contaminated groundwater. *Environment Agency, NC/01/51*.
- Cecchinato, M. (2013). *Metodi alternativi per la riduzione in situ di cromo esavalente . Un caso di studio*. Università Ca'Foscari Venezia.

- Cefalu, W. T., & Hu, F. B. (2004). Role of chromium in human health and in diabetes. *Diabetes Care*, 27(11), 2741–2751. <http://doi.org/10.2337/diacare.27.11.2741>
- Cervantes, C., Campos-García, J., Devars, S., Gutiérrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzmán, J. C., & Moreno-Sánchez, R. (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology Reviews*, 25, 335–347. [http://doi.org/10.1016/S0168-6445\(01\)00057-2](http://doi.org/10.1016/S0168-6445(01)00057-2)
- Chardin, B., Dolla, A., Chaspoul, F., Fardeau, M. L., Gallice, P., & Bruschi, M. (2002). Bioremediation of chromate: thermodynamic analysis of the effects of Cr(VI) on sulfate-reducing bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(3), 352–60. <http://doi.org/10.1007/s00253-002-1091-8>
- Chen, G. (2004). Electrochemical technologies in wastewater treatment. *Separation and Purification Technology*, 38(1), 11–41. <http://doi.org/10.1016/j.seppur.2003.10.006>
- Chen, J. L., Al-Abed, S. R., Ryan, J. a., & Li, Z. (2001). Effects of pH on dechlorination of trichloroethylene by zero-valent iron. *Journal of Hazardous Materials*, 83(3), 243–254. [http://doi.org/10.1016/S0304-3894\(01\)00193-5](http://doi.org/10.1016/S0304-3894(01)00193-5)
- Chen, Q. (2003). Examination of hydrated and accelerated carbonated cement-heavy metal mixtures. University of Greenwich. Retrieved from <http://ethos.bl.uk/OrderDetails.do?uin=uk.bl.ethos.399357>
- Cheng, C. J., Lin, T. H., Chen, C. P., Juang, K. W., & Lee, D. Y. (2009). The effectiveness of ferrous iron and sodium dithionite for decreasing resin-extractable Cr(VI) in Cr(VI)-spiked alkaline soils. *Journal of Hazardous Materials*, 164(2-3), 510–516. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.08.037>
- Cheung, K. H., & Gu, J. D. (2005). Chromate reduction by *Bacillus megaterium* TKW3 isolated from marine sediments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 213–219. <http://doi.org/10.1007/s11274-004-3619-9>
- Cheung, K. H., & Gu, J. D. (2007). Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: A review. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 59, 8–15. <http://doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.05.002>
- Chirwa, E. M. N., & Wang, Y.-T. (1997). Chromium(VI) Reduction by *Pseudomonas fluorescens* LB300 in Fixed-Film Bioreactor. *Journal of Environmental Engineering*, 123(8), 760–766. [http://doi.org/10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(1997\)123:8\(760\)](http://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(1997)123:8(760))
- Chirwa, E., & Molokwane, P. (2011). Biological Cr(VI) reduction: Microbial diversity,

- kinetics and biotechnological solutions to pollution. *Biodiversity*, (Vi), 75–100.
Retrieved from <http://www.unibas.it/utenti/sofo/Sofo - Biodiversity InTech.pdf#page=85>
- CIMAL, (Centro Italiano Medicina Ambiente e Lavoro) (Ed.). (2009). *Salute e sicurezza nella verniciatura* (Vol. D). Cremona: Edizioni CIMAL.
- Cullinane, M. J., Jones, L. W., Malone, P. G., Laboratory., H. W. E. R., & Station., U. S. A. E. W. E. (1986). *Handbook for stabilization/solidification of hazardous waste*. Hazardous Waste Engineering Research Laboratory, Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency Cincinnati, Ohio.
- Czakó-Vér, K., Batiè, M., Raspor, P., Sipiczki, M., & Pesti, M. (1999). Hexavalent chromium uptake by sensitive and tolerant mutants of *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Microbiology Letters*, 178, 109–115. [http://doi.org/10.1016/S0378-1097\(99\)00342-0](http://doi.org/10.1016/S0378-1097(99)00342-0)
- Da Silva, M. L. B., Johnson, R. L., & Alvarez, P. J. J. (2007). Microbial Characterization of Groundwater Undergoing Treatment with a Permeable Reactive Iron Barrier. *Environmental Engineering Science*, 24(8), 1122–1127. <http://doi.org/10.1089/ees.2007.0016>
- Danish Environmental Protection Agency. (2002). Guidelines on Remediation of Contaminated Sites, 7(7), 290.
- Das, S., Mishra, J., Das, S. K., Pandey, S., Rao, D. S., Chakraborty, A., ... Thatoi, H. (2014). Investigation on mechanism of Cr(VI) reduction and removal by *Bacillus amyloliquefaciens*, a novel chromate tolerant bacterium isolated from chromite mine soil. *Chemosphere*, 96, 112–121. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.08.080>
- Decorosi, F. (2010). *Studio di ceppi batterici per il biorisanamento di suoli contaminati da Cr(VI)*. Firenze University Press. Retrieved from <https://books.google.it/books?id=UFSkXVUe-d8C>
- Desogus, P. (2012, March 27). *Trattamento di stabilizzazione-solidificazione mediante leganti idraulici e additivi applicato agli sterili mineralurgici: il caso di Masua*. Retrieved from http://veprints.unica.it/741/1/PhD_Desogus_Paolo.pdf
- Devi, B. D., Thatheyus, a J., & Ramya, D. (2012). Bioremeoval of hexavalent chromium , using *Pseudomonas Fluorescens*, 2(5), 727–735.
- Dey, S., & Paul, a K. (2014). Reduction of Hexavalent Chromium by Immobilized Viable Cells of *Arthrobacter* sp. SUK 1201. *Bioremediation Journal*, 18(January), 1–11. <http://doi.org/10.1080/10889868.2013.834866>

- Dhal, B., Das, N. N., Thatoi, H. N., & Pandey, B. D. (2012). Bacterial Reduction of Hexavalent Chromium from Contaminated Overburden Soil, *I*(5), 83–87. <http://doi.org/10.5923/j.ijmee.20120105.03>
- Dhal, B., Thatoi, H., Das, N., & Pandey, B. D. (2010). Reduction of hexavalent chromium by *Bacillus* sp. isolated from chromite mine soils and characterization of reduced product. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *85*(11), 1471–1479. <http://doi.org/10.1002/jctb.2451>
- Dutta, D., Bhattacharyya, S., Roychowdhury, A., Biswas, R., & Das, A. K. (2013). Crystal structure of hexanoyl-CoA bound to β -ketoacyl reductase FabG4 of *Mycobacterium tuberculosis*. *The Biochemical Journal*, *450*(1), 127–39. <http://doi.org/10.1042/BJ20121107>
- Dutta, R., Mohammad, S. S., Chakrabarti, S., Chaudhuri, B., Bhattacharjee, S., & Dutta, B. K. (2010). Reduction of hexavalent chromium in aqueous medium with zerovalent iron. *Water Environment Research : A Research Publication of the Water Environment Federation*, *82*(2), 138–46. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20183980>
- Elangovan, R., Abhipsa, S., Rohit, B., Ligy, P., & Chandraraj, K. (2006). Reduction of Cr(VI) by a *Bacillus* sp. *Biotechnology Letters*, *28*, 247–252. <http://doi.org/10.1007/s10529-005-5526-z>
- Faisal, M., & Hasnain, S. (2004). Comparative study of Cr(VI) uptake and reduction in industrial effluent by *Ochrobactrum intermedium* and *Brevibacterium* sp. *Biotechnology Letters*, *26*(Vi), 1623–1628. <http://doi.org/10.1007/s10529-004-3184-1>
- Fawell, J. K., & Lund, U. (1996). Chromium in Drinking-water. *Health Criteria and Other Supporting Information, World Health Organization*, *2*, 1–13.
- Fein, J. B., Fowle, D. A., Cahill, J., Kemner, K., Boyanov, M., & Bunker, B. (2002). Nonmetabolic Reduction of Cr(VI) by Bacterial Surfaces Under Nutrient-Absent Conditions. *Geomicrobiology Journal*, *19*(3), 369–382. <http://doi.org/10.1080/01490450290098423>
- Fendorf, S. E. (1995). Surface reactions of chromium in soils and waters. *Geoderma*, *67*(94), 55–71. [http://doi.org/10.1016/0016-7061\(94\)00062-F](http://doi.org/10.1016/0016-7061(94)00062-F)
- Fendorf, S. E., Fendorf, M., Sparks, D. L., & Gronsky, R. (1992a). Inhibitory mechanisms of Cr(III) oxidation by δ -MnO₂. *Journal of Colloid and Interface Science*, *153*(1), 37–54. [http://doi.org/10.1016/0021-9797\(92\)90296-X](http://doi.org/10.1016/0021-9797(92)90296-X)

- Fendorf, S. E., & Zasoski, R. J. (1992b). Chromium(III) Oxidation By Delta-Mno₂ .1. Characterization. *Environmental Science & Technology*, 26(1), 79–85. Retrieved from http://apps.isiknowledge.com/InboundService.do?product=WOS&action=retrieve&SrcApp=Papers&UT=A1992GY59000014&SID=3BeIMg75O1G6P2@pa2c&Init=Yes&SrcAuth=mekentosj&mode=FullRecord&customersID=mekentosj&DestFail=http://access.isiproducts.com/custom_images/wok_f
- Flury, B., Eggenberger, U., & Mäder, U. (2009). First results of operating and monitoring an innovative design of a permeable reactive barrier for the remediation of chromate contaminated groundwater. *Applied Geochemistry*, 24(4), 687–696. <http://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2008.12.020>
- Focardi, S., Pepi, M., & Focardi, S. E. (2013). Microbial Reduction of Hexavalent Chromium as a Mechanism of Detoxification and Possible Bioremediation Applications. *Biodegradation - Life of Science*, (Iii). <http://doi.org/10.5772/56365>
- Francis, C. A., Obraztsova, A. Y., & Tebo, B. M. (2000). Dissimilatory Metal Reduction by the Facultative Anaerobe *Pantoea agglomerans* SP1. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2), 543–548. <http://doi.org/10.1128/AEM.66.2.543-548.2000>
- Fredrickson, J. K., Kostandarithes, H. M., Li, S. W., Plymale, a. E., & Daly, M. J. (2000). Reduction of Fe(III), Cr(VI), U(VI), and Tc(VII) by *Deinococcus radiodurans* R1. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 2006–2011. <http://doi.org/10.1128/AEM.66.5.2006-2011.2000>
- Fruchter, J. (2002). In situ treatment of chromium-contaminated groundwater. *Environmental Science & Technology*, 36, 464A–472A. <http://doi.org/10.1021/es022466i>
- Gadd, G., & Griffiths, a J. (1978). Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microbial Ecology*, 4, 303–317.
- Gadd, G. M. (1992). Metals and microorganisms: A problem of definition. *FEMS Microbiology Letters*, 100(1-3), 197–203. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb14040.x>
- Ganguli, a., & Tripathi, a. K. (2002). Bioremediation of toxic chromium from electroplating effluent by chromate-reducing *Pseudomonas aeruginosa* A2Chr in two bioreactors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58, 416–420. <http://doi.org/10.1007/s00253-001-0871-x>
- Garbisu, C., Alkorta, I., Llama, M. J., & Serra, J. L. (1998). Aerobic chromate reduction

- by *Bacillus subtilis*. *Biodegradation*, 9(182483), 133–141.
<http://doi.org/10.1023/A:1008358816529>
- Garg, S. K., Tripathi, M., Singh, S. K., & Singh, A. (2013). Pentachlorophenol dechlorination and simultaneous Cr⁶⁺ reduction by *Pseudomonas putida* SKG-1 MTCC (10510): Characterization of PCP dechlorination products, bacterial structure, and functional groups. *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 2288–2304. <http://doi.org/10.1007/s11356-012-1101-z>
- Gavaskar, A., Gupta, N., Sass, B., Janosy, R., & Hicks, J. (2000). Design Guidance for Application of Permeable Reactive Barriers for Groundwater Remediation Prepared for Groundwater Remediation. Air Force Research Laboratory. *U.S. Air Force, Air Force Research Laboratory*.
- Geomicrobiology, Fifth Edition*. (2008). CRC Press. Retrieved from <https://books.google.com/books?id=GerdDmwMTLkC&pgis=1>
- Gheju, M. (2011). Hexavalent chromium reduction with zero-valent iron (ZVI) in aquatic systems. *Water, Air, and Soil Pollution* (Vol. 222). <http://doi.org/10.1007/s11270-011-0812-y>
- Giandon, P., & Bortolami, P. (2007). *L'Interpretazione delle analisi del terreno*.
- Gillen, M. (2006). *The Use of Electrokinetics for Remediation of Contaminated Groundwater in Low Permeability Sediments*. Current. The University Of Western Australia.
- Goulhen, F., Gloter, A., Guyot, F., & Bruschi, M. (2006). Cr(VI) detoxification by *Desulfovibrio vulgaris* strain Hildenborough: Microbe-metal interactions studies. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 892–897.
<http://doi.org/10.1007/s00253-005-0211-7>
- Guha, H., Jayachandran, K., & Maurrasse, F. (2001). Kinetics of chromium (VI) reduction by a type strain *Shewanella* alga under different growth conditions. *Environmental Pollution*, 115, 209–218. [http://doi.org/10.1016/S0269-7491\(01\)00108-7](http://doi.org/10.1016/S0269-7491(01)00108-7)
- Guha, H., Jayachandran, K., & Maurrasse, F. (2003). Microbiological reduction of chromium(VI) in presence of pyrolusite-coated sand by *Shewanella* alga Simidu ATCC 55627 in laboratory column experiments. *Chemosphere*, 52(1), 175–183. [http://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00104-8](http://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00104-8)
- Hall, J. L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53(366), 1–11.

<http://doi.org/10.1093/jexbot/53.366.1>

- Hamdan, S. S., & El-Naas, M. H. (2014). Characterization of the removal of Chromium(VI) from groundwater by electrocoagulation. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 20(5), 2775–2781. <http://doi.org/10.1016/j.jiec.2013.11.006>
- Hasin, A. a L., Gurman, S. J., Murphy, L. M., Perry, A., Smith, T. J., & Gardiner, P. H. E. (2010). Remediation of chromium(VI) by a methane-oxidizing bacterium. *Environmental Science and Technology*, 44(1), 400–405. <http://doi.org/10.1021/es901723c>
- Hawley, L., & Deeb, A. (2004). *Treatment technologies for chromium (VI)*. *Chromium (VI) ...* <http://doi.org/10.1002/chin.200614270>
- He, Y. T., & Su, C. (2015). Use of Additives in Bioremediation of Contaminated Groundwater and Soil. In *Advances in Bioremediation of Wastewater and Polluted Soil*. InTech. <http://doi.org/10.5772/60915>
- He, Z., Gao, F., Sha, T., Hu, Y., & He, C. (2009). Isolation and characterization of a Cr(VI)-reduction Ochrobactrum sp. strain CSCr-3 from chromium landfill. *Journal of Hazardous Materials*, 163, 869–873. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.07.041>
- Henry, B. (2010). *Loading Rates and Impacts of Substrate Delivery for Enhanced Anaerobic Bioremediation*.
- Holland, S. L., & Avery, S. V. (2011). Chromate toxicity and the role of sulfur. *Metallomics*, 3(since 2000), 1119. <http://doi.org/10.1039/c1mt00059d>
- Holt, P. K., Barton, G. W., Wark, M., & Mitchell, C. a. (2002). A quantitative comparison between chemical dosing and electrocoagulation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 211(2-3), 233–248. [http://doi.org/10.1016/S0927-7757\(02\)00285-6](http://doi.org/10.1016/S0927-7757(02)00285-6)
- Hu, P., Brodie, E., & Suzuki, Y. (2005). Whole-genome transcriptional analysis of heavy metal stresses in *Caulobacter crescentus*. *Journal of ...*, 187(24), 8437–8449. <http://doi.org/10.1128/JB.187.24.8437>
- Hua, B. I. N., & Deng, B. (2003). Influences of Water Vapor on Cr (VI) Reduction by Gaseous Hydrogen Sulfide. *Environmental Science & Technology*, 37(20), 4771–4777.
- IRSA -CNR. (2003). IRSA-CNR Metodi analitici per le acque Volume Primo.
- Ishibashi, Y., Cervantes, C., & Silver, S. (1990). Chromium reduction in *Pseudomonas putida*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(7), 2268–2270.
- ISPESL. (2008). Cromo esavalente, (Iii).

- Itrc. (2011). Technical / Regulatory Guidance Permeable Reactive Barrier : Technology Update PRB-5. *-Interstate Technology & Regulatory Council*, (June), www.itrcweb.org.
- Jacobs, J., Hardison, R., & Rose, J. (2001). In situ remediation of heavy metals using sulfur-based treatment technologies. *Hydrovisions*. Retrieved from <http://www.fast-tek.com/Article-HV01-In-Situ-MetalsRemediation.pdf>
- James, B. R., Petura, J. C., Vitale, R. J., & Mussoline, G. R. (2008). Oxidation-reduction chemistry of chromium: Relevance to the regulation and remediation of chromate-contaminated soils. Retrieved from <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15320389709383590#.VST3GhhqK1k>
- Janion, C. (2008). Inducible SOS response system of DNA repair and mutagenesis in *Escherichia coli*. *International Journal of Biological Sciences*, 4(6), 338–344. <http://doi.org/10.7150/ijbs.4.338>
- Jean-Soro, L., Bordas, F., & Bollinger, J. C. (2012). Column leaching of chromium and nickel from a contaminated soil using EDTA and citric acid. *Environmental Pollution*, 164, 175–181. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.01.022>
- Jeyasingh, J., Somasundaram, V., Philip, L., & Bhallamudi, S. M. (2011). Pilot scale studies on the remediation of chromium contaminated aquifer using bio-barrier and reactive zone technologies. *Chemical Engineering Journal*, 167(1), 206–214. <http://doi.org/10.1016/j.cej.2010.12.024>
- Kamaludeen, S. P. B., Arunkumar, K. R., Avudainayagam, S., & Ramasamy, K. (2003). Bioremediation of chromium contaminated environments. *Indian Journal of Experimental Biology*, 41(V I), 972–985.
- Kavita, B., & Keharia, H. (2012). Reduction of hexavalent chromium by *Ochrobactrum intermedium* BCR400 isolated from a chromium-contaminated soil. *3 Biotech*, 2, 79–87. <http://doi.org/10.1007/s13205-011-0038-0>
- Klonowska, a., Clark, M. E., Thieman, S. B., Giles, B. J., Wall, J. D., & Fields, M. W. (2008). Hexavalent chromium reduction in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough causes transitory inhibition of sulfate reduction and cell growth. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78, 1007–1016. <http://doi.org/10.1007/s00253-008-1381-x>
- Kwak, Y. H., Lee, D. S., & Kim, H. B. (2003). *Vibrio harveyi* nitroreductase is also a chromate reductase. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8), 4390–4395. <http://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4390-4395.2003>

- La Fortezza, D. (2000). Spettrofotometria Ultravioletta E Visibile, 1–30.
- Lee, S.-E., Konopka, A., & Chon, H.-T. (2007). Reduction of Chromium(VI) by *Cellulomonas* Sp. and *Propionibacterium* Sp. in Anaerobic Soil Microcosms. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 71(15(S)), 557.
- Lee, T. R., & Wilkin, R. T. (2010). Iron hydroxy carbonate formation in zerovalent iron permeable reactive barriers: characterization and evaluation of phase stability. *Journal of Contaminant Hydrology*, 116(1-4), 47–57.
<http://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2010.05.009>
- Lim, T.-T., Tay, J.-H., & Wang, J.-Y. (2004). Chelating-Agent-Enhanced Heavy Metal Extraction from a Contaminated Acidic Soil. *Journal of Environmental Engineering*, 130(1), 59–66. [http://doi.org/10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(2004\)130:1\(59\)](http://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(2004)130:1(59))
- Lin, Y.-T., & Huang, C.-P. (2008). Reduction of chromium(VI) by pyrite in dilute aqueous solutions. *Separation and Purification Technology*, 63(1), 191–199.
<http://doi.org/10.1016/j.seppur.2008.05.001>
- Liu, Y.-G., Xu, W.-H., Zeng, G.-M., Li, X., & Gao, H. (2006). Cr(VI) reduction by *Bacillus* sp. isolated from chromium landfill. *Process Biochemistry*, 41(9), 1981–1986. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.04.020>
- Llovera, S., Bonet, R., Simon-Pujol, M. D., & Congregado, F. (1993). Chromate reduction by resting cells of *Agrobacterium radiobacter* EPS-916. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(10), 3516–3518.
<http://doi.org/10.1007/BF00192105>
- Lookman, R., Verbeeck, M., Gemoets, J., Van Roy, S., Crynen, J., & Lambié, B. (2013). In-situ zinc bioprecipitation by organic substrate injection in a high-flow, poorly reduced aquifer. *Journal of Contaminant Hydrology*, 150, 25–34.
<http://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2013.03.009>
- Lovley, D. R. (1995). Bioremediation of organic and metal contaminants with dissimilatory metal reduction. *Journal of Industrial Microbiology*, 14, 85–93.
<http://doi.org/10.1007/BF01569889>
- Ludwig, R. D., Su, C., Lee, T. R., Wilkin, R. T., Acree, S. D., Ross, R. R., & Keeley, A. (2007). In situ chemical reduction of Cr(VI) in groundwater using a combination of ferrous sulfate and sodium dithionite: a field investigation. *Environmental Science & Technology*, 41(15), 5299–5305.
- Ma, Z., Zhu, W., Long, H., Chai, L., & Wang, Q. (2007). Chromate reduction by resting cells of *Achromobacter* sp. Ch-1 under aerobic conditions. *Process Biochemistry*,

- 42, 1028–1032. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.03.007>
- Maccà, P. (2014). *Processi innovativi per la sintesi del grafene*. Università di Padova.
- Macnair, M. R. (1993). The genetics of metal tolerance in vascular plants. *New Phytologist*, 124(49), 541–559. <http://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1993.tb03846.x>
- Maier, W. D., Barnes, S.-J., & Groves, D. I. (2013). The Bushveld Complex, South Africa: formation of platinum–palladium, chrome- and vanadium-rich layers via hydrodynamic sorting of a mobilized cumulate slurry in a large, relatively slowly cooling, subsiding magma chamber. *Mineralium Deposita*, 48(1), 1–56. <http://doi.org/10.1007/s00126-012-0436-1>
- Marks, C. O. (1997). *Removal of Hexavalent Chromium from a Contaminated Soil by Electroremediation*. Massachusetts Institute of Technology.
- Masood, F., & Malik, A. (2011). Hexavalent chromium reduction by *Bacillus* sp. strain FM1 isolated from heavy-metal contaminated soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 86, 114–119. <http://doi.org/10.1007/s00128-010-0181-z>
- Matteson, M. J., Dobson, R. L., Glenn, R. W., Kukunoor, N. S., Waits, W. H., & Clayfield, E. J. (1995). Electrocoagulation and separation of aqueous suspensions of ultrafine particles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 104(1), 101–109. [http://doi.org/10.1016/0927-7757\(95\)03259-G](http://doi.org/10.1016/0927-7757(95)03259-G)
- Mattson, E. D., & Lindgren, E. R. (1994). *Electrokinetics: An Innovative Technology for In-Situ Remediation of Heavy Metals*.
- Mccall, P. J., & Bagby, L. a. (2010). *In Situ Groundwater Remediation of Heavy Metals at an Active Manufacturing Facility*, (May).
- Mclean, J., & Beveridge, T. J. (2001). Chromate Reduction by a *Pseudomonad* Isolated from a Site Contaminated with Chromated Copper Arsenate. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(3), 1076–1084. <http://doi.org/10.1128/AEM.67.3.1076-1084.2001>
- Megharaj, M., Avudainayagam, S., & Naidu, R. (2003). Toxicity of hexavalent chromium and its reduction by bacteria isolated from soil contaminated with tannery waste. *Current Microbiology*, 47, 51–54. <http://doi.org/10.1007/s00284-002-3889-0>
- Middleton, S. S., Latmani, R. B., Mackey, M. R., Ellisman, M. H., Tebo, B. M., & Criddle, C. S. (2003). Cometabolism of Cr(VI) by *Shewanella oneidensis* MR-1 produces cell-associated reduced chromium and inhibits growth. *Biotechnology and Bioengineering*, 83(Vi), 627–637. <http://doi.org/10.1002/bit.10725>

- Mishra, R. R., Dhal, B., Dutta, S. K., Dangar, T. K., Das, N. N., & Thatoi, H. N. (2012). Optimization and characterization of chromium(VI) reduction in saline condition by moderately halophilic *Vigribacillus* sp. isolated from mangrove soil of Bhitarkanika, India. *Journal of Hazardous Materials*, 227-228, 219–226.
<http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.05.063>
- Molokwane, P., & Nkhalambayausi-Chirwa, E. (2009). Microbial culture dynamics and chromium (VI) removal in packed-column microcosm reactors. Retrieved from <http://www.iwaponline.com/wst/06002/wst060020381.htm>
- Mouedhen, G., Feki, M., Wery, M. D. P., & Ayedi, H. F. (2008). Behavior of aluminum electrodes in electrocoagulation process. *Journal of Hazardous Materials*, 150(1), 124–135. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.04.090>
- Mueller, J., Przepiora, A., & Petounis, D. (2014). Immobilization of Arsenic and other Heavy Metals in Groundwater using EHC-M ®.
- Mullet, M., Boursiquot, S., & Ehrhardt, J.-J. (2004). Removal of hexavalent chromium from solutions by mackinawite, tetragonal FeS. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 244(1-3), 77–85.
<http://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2004.06.013>
- Murugavelh, S., & Mohanty, K. (2013). Isolation, identification and characterization of Cr(VI) reducing *Bacillus cereus* from chromium contaminated soil. *Chemical Engineering Journal*, 230, 1–9. <http://doi.org/10.1016/j.cej.2013.06.049>
- Myers, C. R., Carstens, B. P., Antholine, W. E., & Myers, J. M. (2000). Chromium(VI) reductase activity is associated with the cytoplasmic membrane of anaerobically grown *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Journal of Applied Microbiology*, 88(Vi), 98–106. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00910.x>
- Naidu, R., & Birke, V. (2014). *Permeable Reactive Barrier: Sustainable Groundwater Remediation*. CRC Press. Retrieved from <https://books.google.it/books?id=YYjSBQAAQBAJ>
- National Academy of Sciences (NAS). (1974). *Chromium*. (N. A. Press, Ed.). Washington D.C.
- Neilands, J. B. (1995). Siderophores : Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds Siderophores : Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds *, (Iii), 26723–26726. <http://doi.org/10.1074/jbc.270.45.26723>
- Ngwenya, N., & Chirwa, E. M. N. (2011). Biological removal of cationic fission products from nuclear wastewater. *Water Science and Technology : A Journal of the*

- International Association on Water Pollution Research*, 63(1), 124–8.
<http://doi.org/10.2166/wst.2011.021>
- Nies, H. (1990). Nucleotide Resistance Sequence and Expression of a Plasmid-encoded Determinant from *Akaligenes eutrophus* * Chromate. *Biochemistry*, 265(10), 5648–5653.
- Noubactep, C. (2010). The fundamental mechanism of aqueous contaminant removal by metallic iron, 36(5), 663–670.
- Noubactep, C., Schöner, A., & Woafu, P. (2009). Metallic iron filters for universal access to safe drinking water. *Clean - Soil, Air, Water*, 37(12), 930–937.
<http://doi.org/10.1002/clen.200900114>
- Oehha. (2011). Public health goals for chemicals in drinking water: Hexavalent chromium (Cr VI), (Cr VI).
- Okeke, B. C., Laymon, J., Crenshaw, S., & Oji, C. (2008). Environmental and kinetic parameters for Cr(VI) Bioreduction by a bacterial monoculture purified from Cr(VI)-resistant consortium. *Biological Trace Element Research*, 123(1-3), 229–241. <http://doi.org/10.1007/s12011-008-8098-7>
- Ollivier, B., Cord-Ruwisch, R., Hatchikian, E. C., & Garcia, J. L. (1988). Characterization of *Desulfovibrio fructosovorans* sp. *Arch Microbiol*, 149, 447–450.
- Paillat, T., Moreau, E., Grimaud, P. O., & Touchard, G. (2000). Electrokinetic phenomena in porous media applied to soil decontamination. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, 7(5), 693–704.
<http://doi.org/10.1109/94.879363>
- Palmer, C. D., & Puls, R. W. (1994). EPA Ground Water Issue Natural Attenuation of Hexavalent Chromium in Groundwater and Soils. *Environmental Research*, 1–12.
- Palmer, C. D., & Wittbrodt, P. R. (1991). Processes affecting the remediation of chromium-contaminated sites. *Environmental Health Perspectives*, 92, 25–40.
Retrieved from
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1519387&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Papassiopi, N., Vaxevanidou, K., Christou, C., Karagianni, E., & Antipas, G. S. E. (2014). Synthesis, characterization and stability of Cr(III) and Fe(III) hydroxides. *Journal of Hazardous Materials*, 264, 490–497.
<http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.09.058>
- Park, C. H., Keyhan, M., Wielinga, B., Fendorf, S., & Matin, a. (2000). Purification to

- homogeneity and characterization of a novel *Pseudomonas putida* chromate reductase. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 1788–1795.
<http://doi.org/10.1128/AEM.66.5.1788-1795.2000>
- Park, C.-H., Gonzalez, C., Ackerley, D., Keyhan, M., & Matin, A. (2001). Molecular engineering of soluble bacterial proteins with chromate reductase activity. *Remediation and Beneficial Reuse of Contaminated Sediments*, 103–112.
- Pattanapitpaisal, P., Brown, N. L., & Macaskie, L. E. (2001). Chromate reduction and 16s rRNA identification of bacteria isolated from a Cr(VI)-contaminated site. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, 257–261.
<http://doi.org/10.1007/s002530100758>
- Pflaum, R., & Howick, L. (1956). The Chromium-Diphenylcarbazine Reaction. ... *of the American Chemical Society*, 111(10), 4862–4866. Retrieved from
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja01600a014>
- Powell, R. M., Puls, R. W., Hightower, S. K., & Sabatini, D. a. (1995). Coupled iron corrosion and chromate reduction: Mechanisms for subsurface remediation. *Environmental Science and Technology*, 29(8), 1913–1922.
<http://doi.org/10.1021/es00008a008>
- Pratt, A. R., Blowes, D. W., & Ptacek, C. J. (1997). Products of chromate reduction on proposed subsurface remediation material. *Environmental Science and Technology*, 31(9), 2492–2498. <http://doi.org/10.1021/es9607897>
- Provvidenza, M. A. (2010). *Stress ossidativo ed adattamenti morfo-funzionali e biomolecolari in due condizioni opposte : denervazione ed esercizio fisico*. Università degli Studi di Bologna.
- Ramírez-Díaz, M. I., Díaz-Pérez, C., Vargas, E., Riveros-Rosas, H., Campos-García, J., & Cervantes, C. (2008). Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *BioMetals*, 21, 321–332. <http://doi.org/10.1007/s10534-007-9121-8>
- Richard, F. C., & Bourg, A. C. M. (1991). Aqueous geochemistry of chromium: A review. *Water Research*, 25(7), 807–816. [http://doi.org/10.1016/0043-1354\(91\)90160-R](http://doi.org/10.1016/0043-1354(91)90160-R)
- Richardson, J., & Biernacki, J. (2002). Stoichiometry of slag hydration with calcium hydroxide. *Journal of the American Ceramic Society*, 85(4), 947–953. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1151-2916.2002.tb00197.x/abstract>
- Roote, D. S. (1997). In Situ Flushing. *GWRTAC O Series Technology Overview Report*,

TO-97-02(412), 1–24.

- Ross, D. S., Sjogren, R. E., & Bartlett, R. J. (1981). Behavior of Chromium in Soils: IV. Toxicity to Microorganisms¹. *Journal of Environment Quality*, *10*(2), 145.
<http://doi.org/10.2134/jeq1981.00472425001000020004x>
- Şahin, Y., & Öztürk, A. (2005). Biosorption of chromium(VI) ions from aqueous solution by the bacterium *Bacillus thuringiensis*. *Process Biochemistry*, *40*, 1895–1901.
<http://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.07.002>
- Saichek, R. E., & Reddy, K. R. (2005). Surfactant-enhanced electrokinetic remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in heterogeneous subsurface environments. *Journal of Environmental Engineering and Science*, *4*(5), 327–339.
<http://doi.org/10.1139/s04-064>
- Salnikow, K., & Zhitkovich, A. (2008). Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: Nickel, arsenic, and chromium. *Chemical Research in Toxicology*, *21*, 28–44. <http://doi.org/10.1021/tx700198a>
- Sani, R., Peyton, B., Smith, W., Apel, W., & Petersen, J. (2003). Dissimilatory reduction of Cr(VI), Fe(III), and U(VI) by *Cellulomonas* isolates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *60*, 192–199. <http://doi.org/10.1007/s00253-002-1069-6>
- Sapio. (n.d.). Tecnologia di bonifica per il trattamento di siti contaminati da cromo esavalente.
- Schmidt, R. A., Wiebe, M. G., & Eriksen, N. T. (2005). Heterotrophic high cell-density fed-batch cultures of the phycocyanin-producing red alga *Galdieria sulphuraria*. *Biotechnology and Bioengineering*, *90*(1), 77–84. <http://doi.org/10.1002/bit.20417>
- Schroeder, D. C., & Lee, G. F. (1975). Potential transformations of chromium in natural waters. *Water, Air, and Soil Pollution*, *4*(3-4), 355–365.
<http://doi.org/10.1007/BF00280721>
- Seaman, J. C., Bertsch, P. M., & Schwallie, L. (1999). In Situ Cr (VI) Reduction within and Aquifer Systems Using Fe (II) Solutions. *Environ. Sci. Technol.*, *33*(6), 938–944.
- Seo, H., Lee, M., & Wang, S. (2013). Equilibrium and Kinetic Studies of the Biosorption of Dissolved Metals on *Bacillus drentensis* Immobilized in Biocarrier Beads, *18*(1), 45–53.
- Shafieiyoun, S., Ebadi, T., Tiwari, A. K., Upadhyay, V. K., Rangsidek, R., Jekel, M. R., ... Puls, R. W. (2013). “Fenton’s reagent dose calculation with respect to COD value and the process requirement optimization for effective oxidation of Aqueous Mother

- Liquor Effluent of an API manufacturing industry” at large scale. *Water Research*, 16(2320), 158–164. [http://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00315-7](http://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00315-7)
- Shaker, M. a., & Albishri, H. M. (2014). Dynamics and thermodynamics of toxic metals adsorption onto soil-extracted humic acid. *Chemosphere*, 111, 587–595. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.04.088>
- Shakoori, a R., Makhdoom, M., & Haq, R. U. (2000). Hexavalent chromium reduction by a dichromate-resistant gram-positive bacterium isolated from effluents of tanneries. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53, 348–351. <http://doi.org/10.1007/s002530050033>
- Sharma, N., & Rai, A. (2011). Algal Particles in the Atmosphere. *Encyclopedia of Environmental Health*, 1, 64–70. Retrieved from [http://www.researchgate.net/publication/234834535_Sharma_NK_Rai_AK_\(2011\)_Algal_Particles_in_the_Atmosphere._In_Nriagu_JO_\(ed.\)_Encyclopedia_of_Environmental_Health_volume_1_6470_Burlington_Elsevier._ISBN-13_978-0-444-52273-3](http://www.researchgate.net/publication/234834535_Sharma_NK_Rai_AK_(2011)_Algal_Particles_in_the_Atmosphere._In_Nriagu_JO_(ed.)_Encyclopedia_of_Environmental_Health_volume_1_6470_Burlington_Elsevier._ISBN-13_978-0-444-52273-3)
- Shi, Y., Chai, L., Yang, Z., Jing, Q., Chen, R., & Chen, Y. (2012). Identification and hexavalent chromium reduction characteristics of *Pannonibacter phragmitetus*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35, 843–850. <http://doi.org/10.1007/s00449-011-0668-y>
- Sims, J. L., Suflita, J. M., & Russell, H. H. (1991). EPA Ground Water Issue. *Environmental Research*, 1–12.
- Singh, R., Kumar, A., Kirrolia, A., Kumar, R., Yadav, N., Bishnoi, N. R., & Lohchab, R. K. (2011). Removal of sulphate, COD and Cr(VI) in simulated and real wastewater by sulphate reducing bacteria enrichment in small bioreactor and FTIR study. *Bioresource Technology*, 102(2), 677–682. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.08.041>
- Skinner, S. J. W., & Schutte, C. F. (2006). The feasibility of a permeable reactive barrier to treat acidic sulphate- and nitrate-contaminated groundwater. *Water Sa*, 32(2), 129–135.
- Stanin, F. T., & Pirnie, M. (2004). *The transport and fate of Cr(VI) in the Environment. Chromium (VI) Handbook*. <http://doi.org/10.1201/9780203487969.ch5>
- Sultan, S., & Hasnain, S. (2007). Reduction of toxic hexavalent chromium by *Ochrobactrum intermedium* strain SDCr-5 stimulated by heavy metals. *Bioresource Technology*, 98, 340–344. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.12.025>

- Suthersan, E. S. S. (1999). *Remediation engineering: design concepts*. Boca Raton: CRC Press.
- Suthersan, S. S., & Payne, F. C. (2004). *In Situ Remediation Engineering*. CRC Press.
Retrieved from <https://books.google.it/books?id=zM2P8CddpJIC>
- Suzuki, T., Miyata, N., Horitsu, H., & Kawai, K. (1992). NAD (P) H-Dependent Chromium (VI) Reductase of *Pseudomonas ambigua* G-1 : a Cr (V) Intermediate Is Formed during the Reduction of Cr (VI) to Cr (III), *174*(16), 5340–5345.
- Thacker, U., Parikh, R., Shouche, Y., & Madamwar, D. (2006). Hexavalent chromium reduction by *Providencia* sp. *Process Biochemistry*, *41*, 1332–1337.
<http://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.01.006>
- Thatoi, H., Das, S., Mishra, J., Rath, B. P., & Das, N. (2014). Bacterial chromate reductase, a potential enzyme for bioremediation of hexavalent chromium: A review. *Journal of Environmental Management*, *146*, 383–399.
<http://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.07.014>
- Thornton, E. C., & Amonette, J. E. (1999). Hydrogen Sulfide Gas Treatment of Cr (VI) - Contaminated Sediment Samples from a Plating-Waste Disposal Sites Implications for in-Situ Remediation. *Environmental Science & Technology*, *33*(22), 4096–4101.
- Thornton, E. C., Gilmore, T. J., Olsen, K. B., Giblin, J. T., & Phelan, J. M. (2007). Treatment of a Chromate-Contaminated Soil Site by in situ Gaseous Reduction, (1), 56–64.
- Thornton, E. C., & Jackson, R. L. (1994). *Laboratory and field evaluation of the gas treatment approach for insitu remediation of chromate-contaminated soils*.
- Threeprom, J., Purachaka, S., & Potipan, L. (2005). Simultaneous determination of Cr(III)-EDTA and Cr(VI) by ion interaction chromatography using a C18 column. *Journal of Chromatography A*, *1073*, 291–295.
<http://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.09.053>
- Tratnyek, P. G. (2002). Keeping Up with All That Literature: The IronRefs Database Turns 500. *Ground Water Monitoring & Remediation*, *22*(3), 92–94.
<http://doi.org/10.1111/j.1745-6592.2002.tb00757.x>
- U.S. EPA. (1989). EPA Superfund Record of Decision : *Management*.
- U.S. EPA. (2000). Data Quality Objectives. Process for Hazardous Waste Site Investigations, *EPA QA/G-4*, 23.
- USEPA. (1998). Permeable Reactive Barrier Technologies for Contaminant Remediation. *Epa/600/R-98/125*, 113. <http://doi.org/EPA/600/R-98/125>

- USEPA. (2000). In Situ Treatment of Soil and Groundwater Contaminated with Chromium. *USEPA Technical Resource Guide*, 1–82. [http://doi.org/EPA 625/R-00/005](http://doi.org/EPA_625/R-00/005)
- Vega, A., Fiuza, A., & Guimarães, F. (2010). Insight into the phenomenology of the Cr(VI) reduction by metallic iron using an electron probe microanalyzer. *Langmuir*, 26(7), 11980–11986. <http://doi.org/10.1021/la1014175>
- Venil, C. K., Mohan, V., Lakshmanaperumalsamy, P., & Yerima, M. B. (2011). Optimization of Chromium Removal by the Indigenous Bacterium *Bacillus* spp. REP02 Using the Response Surface Methodology. *ISRN Microbiology*, 2011, 1–9. <http://doi.org/10.5402/2011/951694>
- Vepsäläinen, M. (2012). *Electrocoagulation in the treatment of industrial waters and wastewaters*.
- Verma, T., Garg, S. K., & Ramteke, P. W. (2009). Genetic correlation between chromium resistance and reduction in *Bacillus brevis* isolated from tannery effluent. *Journal of Applied Microbiology*, 107(iii), 1425–1432. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04326.x>
- Verma, T., & Singh, N. (2013). Isolation and process parameter optimization of *Brevibacterium casei* for simultaneous bioremediation of hexavalent chromium and pentachlorophenol. *Journal of Basic Microbiology*, 53, 277–290. <http://doi.org/10.1002/jobm.201100542>
- Viamajala, S., Smith, W. a., Sani, R. K., Apel, W. a., Petersen, J. N., Neal, A. L., ... Peyton, B. M. (2007). Isolation and characterization of Cr(VI) reducing *Cellulomonas* spp. from subsurface soils: Implications for long-term chromate reduction. *Bioresource Technology*, 98, 612–622. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.02.023>
- Viti, C., & Giovannetti, L. (2005). Characterization of cultivable heterotrophic bacterial communities in Cr-polluted and unpolluted soils using Biolog and ARDRA approaches. *Applied Soil Ecology*, 28, 101–112. <http://doi.org/10.1016/j.apsoil.2004.07.008>
- Viti, C., Pace, A., & Giovannetti, L. (2003). Characterization of Cr(VI)-resistant bacteria isolated from chromium-contaminated soil by tannery activity. *Current Microbiology*, 46, 1–5. <http://doi.org/10.1007/s00284-002-3800-z>
- Voitkun, V., Zhitkovich, A., & Costa, M. (1998). Cr(III)-mediated crosslinks of glutathione or amino acids to the DNA phosphate backbone are mutagenic in human

- cells. *Nucleic Acids Research*, 26(8), 2024–2030.
<http://doi.org/10.1093/nar/26.8.2024>
- Wang, P. C., Mori, T., Komori, K., Sasatsu, M., Toda, K., & Ohtake, H. (1989). Isolation and characterization of an *Enterobacter cloacae* strain that reduces hexavalent chromium under anaerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(7), 1665–1669.
- Wang, P. C., Mori, T., Toda, K., & Ohtake, H. (1990). Membrane-associated chromate reductase activity from *Enterobacter cloacae*. *Journal of Bacteriology*, 172(3), 1670–1672.
- Wang, Y.-T. (2000). *Environmental Microbe-Metal Interactions*. (D. R. Lovley, Ed.). American Society of Microbiology. <http://doi.org/10.1128/9781555818098>
- Wani, R., Kodam, K. M., Gawai, K. R., & Dhakephalkar, P. K. (2007). Chromate reduction by *Burkholderia cepacia* MCMB-821, isolated from the pristine habitat of alkaline crater lake. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75, 627–632.
<http://doi.org/10.1007/s00253-007-0862-7>
- Wasay, S. A., Barrington, S. F., & Tokunaga, S. (2010). Remediation of Soils Polluted by Heavy Metals using Salts of Organic Acids and Chelating Agents. Retrieved from <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09593331908616692#.VSZ4jhhqK1k>
- Weller, D. M. (1988). Biological Control of Soilborne Plant Pathogens in the Rhizosphere with Bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 26(1), 379–407.
<http://doi.org/10.1146/annurev.py.26.090188.002115>
- West, T. P. (2007). Regulation of pyrimidine nucleotide biosynthesis in *Pseudomonas synxantha*. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 92, 353–358. <http://doi.org/10.1007/s10482-007-9164-4>
- Wierzbicki, D., Bohan, D., & Mullin, S. (2004). Hexavalent chromium reduction and immobilization using hydrogen release compound. *Proceedings of the Seventh International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium*.
- Xia, W., Gao, H., Wang, X., Zhou, C., Liu, Y., Fan, T., & Wang, X. (2009). Application of EDTA decontamination on soils affected by mining activities and impact of treatment on the geochemical partition of metal contaminants. *Journal of Hazardous Materials*, 164(2-3), 936–40. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.08.092>
- Xu, W., Liu, Y., Zeng, G., Li, X., Tang, C., & Yuan, X. (2005). Enhancing effect of iron on chromate reduction by *Cellulomonas flavigena*. *Journal of Hazardous Materials*, 126, 17–22. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.03.056>

- Yang, F., Guo, J., Dai, R., & Lan, Y. (2014). Oxidation of Cr(III)-citrate/tartrate complexes by δ -MnO₂: Production of Cr(VI) and its impact factors. *Geoderma*, 213, 10–14. <http://doi.org/10.1016/j.geoderma.2013.07.022>
- Yeung, A. T. (2005). Contaminant Extractability by Electrokinetics. Retrieved from <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ees.2006.23.202?journalCode=ees>
- Zachara, J. M., Ainsworth, C. C., Cowan, C. E., & Resch, C. T. (1989). Adsorption of Chromate by Subsurface Soil Horizons. *Soil Science Society of America Journal*, 53(2), 418. <http://doi.org/10.2136/sssaj1989.03615995005300020018x>
- Zambotti, L. (2000). *Sezione II Determinazioni del cromo esavalente nelle acque destinate al Introduzione*. Treviglio.
- Zawadzka, A. M., Crawford, R. L., & Paszczyński, A. J. (2007). Pyridine-2,6-bis(thiocarboxylic acid) produced by *Pseudomonas stutzeri* KC reduces chromium(VI) and precipitates mercury, cadmium, lead and arsenic. *BioMetals*, 20, 145–158. <http://doi.org/10.1007/s10534-006-9022-2>
- Zheng, Z., Li, Y., Zhang, X., Liu, P., Ren, J., Wu, G., ... Li, X. (2015). A *Bacillus subtilis* strain can reduce hexavalent chromium to trivalent and an *nfrA* gene is involved. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 97, 90–96. <http://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.10.017>
- Zhitkovich, a. (2011). Chromium in Drinking Water: Sources, Metabolism, and Cancer Risks. *Chemical Research in Toxicology*, 24(Vi), 1617–1629. <http://doi.org/Doi.10.1021/Tx200251t>
- Zhong, L., Thornton, E. ., Oostrom, M., & Deng, B. (2004). In situ gaseous treatment and reoxidation studies - Implications for vadose zone remediation. *American Geophysical Union*, 85(70).
- Zhu, W., Chai, L., Ma, Z., Wang, Y., Xiao, H., & Zhao, K. (2008). Anaerobic reduction of hexavalent chromium by bacterial cells of *Achromobacter* sp. Strain Ch1. *Microbiological Research*, 163, 616–623. <http://doi.org/10.1016/j.micres.2006.09.008>
- Zuchi, S. (2008). *Studio della relazione tra la nutrizione solfatica e ferrica in piante a strategia I e a strategia II*. Università degli Studi della Tuscia di Viterbo.

SITOGRAFIA

<http://it.silvateam.com/Prodotti-e-Servizi/Leather/Processi-di-concia/Concia-al-cromo.>

<http://www.iss.it/binary/publ/publi/94-19-2.1132308710.pdf>