

Consorzio BASI

Ambiente Acquater

CONTRATTO  
DI3419/00/FG/1

REL. 02/ALL. 3

Fg. 1 di 1

Rev.

0				

## Allegato 3

Rel. 04 – Fattibilità di interventi di bonifica con metodi chimico fisici e biologici –  
Pianrocchetta – Consorzio BASI – Luglio 1997.

<b>Consorzio BASI</b> Ambiente Aquater	<b>CLIENTE</b> ACNA C.O. (in liquidazione)	<b>CONTRATTO</b> G699117/GI		
	<b>LOCALITÀ</b> Cengio (SV)	<b>REL. 04</b>		
	<b>PROGETTO</b> Indagini e progetto di fattibilità per la bonifica discarica di Pian Rocchetta	Fg. 1 di 73	<b>Rev.</b>	
		0		

- FATTIBILITÀ DI INTERVENTI DI BONIFICA CON  
METODI CHIMICO-FISICI E BIOLOGICI -

<b>Aquater</b>	Comm.	258400	<i>Ermoli</i>	<i>Giusti</i>	<i>Costa</i>
	REL.	6004	Ermoli	Giusti	Costa
	Rev. 0	Luglio '97	Elaborato	Verificato	Approvato

				<i>Ermoli</i>	
0	Emissione		Aquater	Aquater	Ermoli
Rev.	Descrizione		Elaborato	Verificato	Approvato
					Data

CONTRATTO G69911/7/GI	
<b>REL. 04</b>	
Fig. 2 di 73	Rev.
	0

<b>0 RIASSUNTO E CONCLUSIONI DELLO STUDIO DI FATTIBILITA'</b>	<b>4</b>
<b>1 PREMESSA E SCOPO DEL LAVORO</b>	<b>6</b>
<b>2 CAMPIONAMENTO DEI MATERIALI</b>	<b>7</b>
<b>3 TEST DI TRATTABILITÀ CHIMICO-FISICA</b>	<b>8</b>
3.1 TECNOLOGIE TESTATE	8
3.2 DESCRIZIONE DEI MATERIALI	8
3.3. SOLIDIFICAZIONE-INERTIZZAZIONE-STABILIZZAZIONE	14
3.4 STRIPPAGGIO DEI COMPOSTI ORGANICI VOLATILI	23
3.5 DILAVAMENTO DEI COMPOSTI ORGANICI	27
3.6 VERIFICHE PER L'INVIO DEI MATERIALI A TERMODISTRUZIONE	28
3.7 CONCLUSIONI FATTIBILITA' DI INTERVENTI CHIMICO-FISICI	31
<b>4 TEST DI TRATTABILITÀ BIOLOGICA</b>	<b>33</b>
4.1 SCOPO DEL LAVORO	33
4.2 STATO DELL'ARTE SULLA BIODEGRADAZIONE DI CONTAMINANTI XENOBIOTICI	34
4.3 MATERIALI E METODI	38
4.3.1 Caratterizzazione chimica dei campioni	38
4.3.2 Caratterizzazione microbiologica ed allestimento dei test di trattabilità	39
4.4 RISULTATI DELLE CARATTERIZZAZIONI INIZIALI	44
4.4.1 Caratterizzazione chimica	44
4.5 RISULTATI FINALI	48
4.5.1 Analisi chimiche	48
4.5.2 Caratterizzazione Microbiologica Finale	54
4.6 DISCUSSIONE DEI DATI	60
4.7 CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE	63
<b>RICERCA BIBLIOGRAFICA</b>	<b>64</b>

CONTRATTO G69911/7/GI	
<b>REL. 04</b>	
Fg. 3 di 73	Rev.
	0

**ALLEGATI**

**TERRENI UTILIZZATI NEL CORSO DELLA SPERIMENTAZIONE PER LA TRATTABILITA' BIOLOGICA**

**FIGURE**

**FOTOGRAFIE**

CONTRATTO G69911/7/G			
REL. 04			
Fg. 4 di 73	Rev.		
	0		

## 0 RIASSUNTO E CONCLUSIONI DELLO STUDIO DI FATTIBILITA'

Nell'ambito delle attività eseguite dal Consorzio B.A.S.I. a seguito dell'incarico acquisito da ACNA C.O. in liq. (contratto G69911/7/GI) è stata sviluppata anche una valutazione di carattere preliminare relativa alla fattibilità di bonifica con metodi chimico-fisici e biologici dei materiali presenti nella discarica di Pian Rocchetta.

Tale studio di fattibilità, di cui al presente rapporto, è stato eseguito parallelamente alla fase di indagine quali/quantitativa del sito, che ha individuato un quadro qualitativo molto complesso e compromesso a seguito della elevata presenza di materiale contaminato da inquinanti organici e inorganici<sup>1</sup>.

Tale situazione ha portato a giudicare l'ammasso di fatto indifferenziabile da un punto di vista operativo, anche se i materiali hanno livelli a maggiore o minore inquinamento e con differente natura e caratteristiche merceologiche.

Ritornando al presente rapporto, è stata investigata la praticabilità delle seguenti tecnologie:

- stabilizzazione/inertizzazione dei materiali
- strippaggio degli inquinanti presenti nei materiali
- estrazione per lavaggio degli inquinanti presenti nei materiali
- termodistruzione dei materiali

è stata inoltre effettuata una prima verifica e valutazione dell'efficacia dell'attività biogradativa per gli inquinanti presenti nei materiali.

Tali indagini e studi sono state effettuate a livello di laboratorio.

Le metodologie investigate rappresentano un panorama sufficientemente completo nell'ambito delle possibili soluzioni ad oggi proponibili per il trattamento di terreni contaminati e rifiuti<sup>2</sup>. Si ritiene pertanto che tale panorama sia ragionevolmente esaustivo al fine di effettuare una prima valutazione di praticabilità ed efficacia di bonifica dei materiali individuati nell'ambito del sito.

I risultati ottenuti dalle prove eseguite (punti 3.7 e 4.7 seguenti), valutati alla luce delle situazioni di qualità riscontrate in sito e sopra descritte, non individuano come applicabili le tecnologie saggate:

<sup>1</sup> lo studio ha inoltre evidenziato che la tipologia dei materiali è notevolmente variabile ed eteropica in senso sia areale che verticale; ad esempio e con riferimento alla classificazione dei materiali ai sensi della Delibera Comm. Interm. 27/7/84 per uno smaltimento successivo ed una eventuale rimozione, in più punti indagati (cfr. punti BA17, BA14, BA23) sulla stessa verticale di campionamento è stata riscontrata una successione di materiali alternativamente classificabili in termini di 2B, 2Bs e 2C.

<sup>2</sup> cfr. US-EPA – "Remediation Technologies Screening Matrix and Reference Guide", 1994

CONTRATTO G69911/7/G			
REL. 04			
Fg. 5 di 73	Rev.		
	0		

- l'inertizzazione è risultata relativamente efficace per la stabilizzazione degli inorganici laddove non sussista contemporaneamente una concentrazione di organici superiore al 2-3% (che peraltro corrisponde ad un limite intrinseco della tecnologia);
- la possibilità di termodistruzione dei materiali, efficace per gli organici, ha severe limitazioni in funzione del contenuto in inquinanti inorganici presenti nei materiali (in particolare mercurio);
- strippaggi e lavaggi determinano più problemi esecutivi e inquinanti secondari che una efficace azione disinquinante sui materiali;
- una certa potenzialità biodegradativa "spontanea" è stata individuata, ovviamente finalizzata agli organici e comunque da verificare ulteriormente, ma non tale da garantire macroscopiche evidenze di risultati a livello di qualità globale dell'ammasso dei rifiuti.  
Ciò significa che per gli inquinanti organici è prevedibile nel tempo una attenuazione naturale della contaminazione attraverso l'attività biodegradativa spontanea delle colonie batteriche autoctone già presenti in sito.

Riguardo alle metodologie chimico-fisiche testate, i risultati ottenuti a livello di laboratorio non permettono pertanto di coprire la fattibilità tecnica globale di un intervento di bonifica dei materiali, avendo individuato dei limiti di batteria in applicabilità per ciascuna tecnica.

In conclusione, considerando che per la specifica situazione riscontrata nella discarica di Pian Rocchetta un intervento di bonifica *ex-situ* dovrebbe comunque essere articolato su una selezione pressochè puntuale dei materiali e il loro successivo trattamento, alla luce della quantità, giacitura dei materiali di riporto e caratteristiche di distribuzione degli inquinanti, i risultati ottenuti dai test effettuati non indicano perseguibile una applicazione a livello industriale di una bonifica basata sui trattamenti testati (al netto di considerazione legate ai rischi verso operatori e al rischio di inquinanti secondari verso l'ambiente circostante).

CONTRATTO G69911/7/GI	
<b>REL. 04</b>	
Fg. 6 di 73	Rev.
	0

## 1 PREMESSA E SCOPO DEL LAVORO

Nel periodo febbraio-giugno 1997 il Consorzio Bonifica Aree e Siti Inquinati (B.A.S.I.) ha condotto un' indagine ambientale del sito di Pian Rocchetta, di proprietà ACNA Chimica Organica in Liquidazione, in passato utilizzato come discarica di materiali, in parte anche provenienti dalle attività produttive ACNA.

I risultati dello studio di caratterizzazione sono stati riportati nella relazione BASI Rel 03 "Indagine di caratterizzazione", giugno 1997 .

Nell'ambito di tale indagine è stata eseguita anche una valutazione di carattere preliminare relativa alla fattibilità di bonifica dei materiali presenti nella discarica di Pian Rocchetta, attraverso l'applicazione di metodi chimico-fisici e biologici.

Le modalità di tale studio e le valutazioni conclusive a cui si è giunti sono oggetto del presente rapporto.

CONTRATTO G69911/7/GI			
REL. 04			
Fg. 7 di 73	Rev.		
	0		

## 2 CAMPIONAMENTO DEI MATERIALI

Il campionamento dei materiali per l'esecuzione dei test è stato effettuato in 4 punti all'interno della discarica (denominati BAT 1-4), scelti opportunamente sulla base delle evidenze di campo alla fine dei lavori di caratterizzazione del sito. I campionamenti sono stati effettuati con benna meccanica nei punti definiti nella Fig. 1.

Si rimanda alla Rel 03 per l'ubicazione dei punti BAT nel quadro qualitativo ricostruito della discarica.

I campioni da destinare alle prova di trattabilità chimico-fisica e biologica sono stati prelevati in quantità pari a circa 40 kg e collocati in contenitori chiusi e sigillati in PET.

I campioni da inviare alle determinazioni di accettazione per il trattamento termico sono stati prelevati in aliquote di circa 1-2 kg e posti all'interno di barattoli di vetro opportunamente isolati e sigillati.

I campioni così raccolti sono stati mantenuti a temperatura ambiente, non refrigerata né riscaldata, in luoghi oscurati, evitando l'esposizione a raggi solari, luce e fonti di calore, e sono stati prontamente inviati ai laboratori predisposti per l'esecuzione dei test.

I campioni di terreno prelevati come precedentemente descritto, sono stati così identificati:

1. sigla identificativa corrispondente al punto di prelievo;
2. data e ora di prelievo;
3. numero progressivo del campione;
4. quota di prelievo;

CONTRATTO G69911/7/GI				
REL. 04				
Fg. 8 di 73	Rev.			
	0			

### 3 TEST DI TRATTABILITÀ CHIMICO-FISICA

#### 3.1 TECNOLOGIE TESTATE

Il quadro delle tecnologie chimico-fisiche verificate e relativi campioni analizzati è:

1. stabilizzazione con miscele cementizie con leganti idraulici (BAT2 e BAT4);
2. strippaggio degli inquinanti presenti nei materiali (BAT2 e BAT4);
3. estrazione per lavaggio degli inquinanti presenti nei materiali (BAT2 e BAT4);
4. termodistruzione dei materiali (BAT 1 e BAT 2).

All'atto del campionamento, per quanto riguarda la termodistruzione sono stati selezionati direttamente i campioni BAT1 e BAT2 mentre si era inizialmente previsto di testare BAT2, BAT3 e BAT4 per le altre tecnologie.

Le prime evidenze di laboratorio (vedere punto seguente) hanno poi selezionato i campioni come sopra riportato.

#### 3.2 DESCRIZIONE DEI MATERIALI

Sono state eseguite preventivamente le determinazioni chimiche analitiche sui campioni BAT2, BAT3 e BAT4.

Nella tabella 1 sono riportati i risultati di tali analisi di base. In questa fase sono stati inoltre eseguiti anche test di cessione all'acido acetico per la verifica della solubilità e della conseguente potenziale mobilità dei metalli pesanti nei campioni tal quali.

Le foto in allegato riprodocono i materiali tal quali oggetto dello studio (Foto 1 - Foto 2): si evidenzia anche visivamente un differente aspetto tra il campione BAT3 e gli altri (rappresentati in foto dal BAT2), confermati dai risultati analitici in Tab.1.

I campioni, una volta seccati in stufa a 105° C si presentano già ben diversi:

- il materiale costituente BAT 3 a seguito del riscaldamento tende a fondere e, durante il raffreddamento, a riaggregarsi formando concrezioni dalla frattura vitrea;
- il campione BAT 2, come BAT 4, si presenta falsamente granulare; sottoposto a leggerissima macinazione si è frantumato in polvere finissima (Foto 3 - Foto 4).

Sottoponendo i campioni a riscaldamento a 600 °C, BAT3 ha avuto una perdita in peso pari al 41.8%, contro valori di 7.1% e 3.9% circa di BAT2 e BAT4.

Queste analisi preventive hanno permesso di evidenziare come il campione BAT 3 differisca decisamente dagli altri, contenendo oltre il 35% di materiale organico. Sulla base di quanto riscontrato dal comportamento termico a 105 e 600°C e dalle

CONTRATTO G69911/7/GI	
<b>REL. 04</b>	
Pg. 9 di 73	Rev.
	0

risultanze analitiche delle analisi di laboratorio, tale campione è costituito da resine plastiche polimeriche associate ed elevati livelli di composti organici (in particolare ammine aromatiche, cloro e nitro derivati del benzene, IPA); tale tipologia di campione è pertanto subito risultata trattabile solo previa termodistruzione.

Oltretutto, i materiali organici in esso contenuti sottoposti ad eventuali procedimenti chimico-fisici potrebbero dare origine a intermedi di processo imprevedibili e di difficile controllo.

A seguito di quanto sopra, le prove relative alle tecnologie chimico-fisiche (stabilizzazione-strippaggio-lavaggio) sono state eseguite solo sui campioni BAT2 e BAT4, mentre il campione BAT3 è stato tralasciato e giudicato fin da queste prime fasi non di interesse per i trattamenti chimico-fisici.

CONTRATTO G69911/7/GI					
REL. 04					
Fig. 10 di 73	Rev.				
	0				

TABELLA 1 ANALISI CHIMICHE FISICHE DEI RIFIUTI PER TEST DI TRATTABILITA'		BAT 2	BAT 3	BAT 4
<b>Denominazione dei campioni</b>				
Umidità a 105°C	%	19,4	18,9	25,6
Ceneri a 600°C	%	92,9	58,2	96,1
Perdita a 600°C	%	7,1	41,8	3,9
Calcare totale	% s.s.	5,1	6,2	1,0
Sostanza organica	% s.s.	2	35	2,9
Fenoli totali (C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> OH)	mg/Kg	2,7	10,1	1,42
Idrocarburi totali I.R.	mg/Kg	278	1028	321
<b>Ammine aromatiche</b>				
Anilina	µg/Kg	<0,5	<0,5	<0,5
Difenilammina	µg/Kg	107	<0,5	155
o-toluidina	µg/Kg	<0,5	8157	<0,5
2,6-dietilanilina	µg/Kg	<0,5	<0,5	<0,5
o-anisidina	µg/Kg	<0,5	<0,5	<0,5
Betanaftilammina	µg/Kg	<0,5	<0,5	<0,5
o-nitroanilina	µg/Kg	628	15247	845
m-nitroanilina	µg/Kg	936	1769	1736
p-nitroanilina	µg/Kg	548	<0,5	676
<b>Aromatici non alogenati</b>				
Benzene	µg/Kg	11	85,0	<0,1
Toluene	µg/Kg	43	137	<0,1
Etilbenzene	µg/Kg	76	195	<0,1
Xileni	µg/Kg	111	5,0	<0,1
<b>Composti alifatici alogenati</b>				
Cloroformio	µg/Kg	137	175	87,1
Tetracloruro di carbonio	µg/Kg	22,5	198	49,3
Tricloroetilene	µg/Kg	36,9	87,3	16,5
1,1,2-tricloroetano	µg/Kg	0,1	<0,1	<0,1
Tetracloroetilene	µg/Kg	385	263	641
1,1,1,2-tetracloroetano	µg/Kg	<0,1	<0,1	<0,1
1,1,2,2-tetracloroetano	µg/Kg	<0,1	<0,1	<0,1
Pentacloroetano	µg/Kg	<0,1	<0,1	<0,1
Esaclorobutadiene	µg/Kg	<0,1	<0,1	<0,1
Esacloroetano	µg/Kg	<0,1	<0,1	655
Esaclorobutano	µg/Kg	<0,1	<0,1	<0,1
Esaclorobenzene	µg/Kg	<0,1	<0,1	<0,1
1,2-dicloroetilene	µg/Kg	<0,1	114	<0,1
1,2-dicloroetano	µg/Kg	<0,1	<0,1	<0,1

CONTRATTO G69911/7/GI			
REL. 04			
Fg. 11 di 73	Rev.		
	0		

Denominazione dei campioni		BAT 2	BAT 3	BAT 4
<b>Cloro-derivati e nitro-derivati del benzene</b>				
1,2,4-triclorobenzene	µg/Kg	237	1218	164
Clorobenzene	µg/Kg	172	1137	7
1,2-diclorobenzene	µg/Kg	47	<1	21
1,3-diclorobenzene	µg/Kg	38	<1	16
Nitrobenzene	µg/Kg	<1	<1	3
2,5-dicloronitrobenzene	µg/Kg	<1	133	<1
3,4-dicloronitrobenzene	µg/Kg	<1	<1	<1
Pentacloronitrobenzene	µg/Kg	197	<1	<1
o-nitroclorobenzene	µg/Kg	<1	134	85
m-nitroclorobenzene	µg/Kg	<1	278	2
p-nitroclorobenzene	µg/Kg	<1	1049	<1
o-dinitrobenzene	µg/Kg	<1	<1	<1
<b>IPA</b>				
Naftalene	µg/Kg	186	97219	41,6
Acenaftilene	µg/Kg	2,7	44,5	1,3
Acenaftene	µg/Kg	34,5	343	10,6
Fluorene	µg/Kg	0,9	34,8	0,3
Fenantrene	µg/Kg	7,4	27,5	4,4
Antracene	µg/Kg	2,7	6,9	1,0
Fluorantene	µg/Kg	13,9	18,4	6,9
Pirene	µg/Kg	16,8	93,1	6,4
Benzo(a)antracene	µg/Kg	3,4	3497	3,2
Crisene	µg/Kg	7,4	3552	4,7
Benzo(b)fluorantene	µg/Kg	3,6	83,4	1,2
Benzo(k)fluorantene	µg/Kg	0,8	84,1	0,9
Benzo(j)fluorantene	µg/Kg	<0,1	<0,1	<0,1
Benzo(a)pirene	µg/Kg	<0,1	72,1	<0,1
Dibenzo(ae)pirene	µg/Kg	<0,1	<0,1	<0,1
Benzo(ghi)perilene	µg/Kg	<0,1	53,7	<0,1
Dibenzo(ah)antracene	µg/Kg	<0,1	11,6	<0,1
Indeno-1,2,3-(cd)pirene	µg/Kg	<0,1	14,4	<0,1
<b>Ammine aromatiche clorate</b>				
2,3-dicloroanilina	µg/Kg	<0,5	3726	<0,5
3,4-dicloroanilina	µg/Kg	1027	543	2175
3,5-dicloroanilina	µg/Kg	<0,5	267	<0,5
2,6-dicloroanilina	µg/Kg	<0,5	104	<0,5
o-cloroanilina	µg/Kg	<0,5	<0,5	<0,5
m-cloroanilina	µg/Kg	<0,5	<0,5	<0,5
p-cloroanilina	µg/Kg	<0,5	<0,5	<0,5
2-nitro-4-cloroanilina	µg/Kg	<0,5	2651	<0,5
4-nitro-2-cloroanilina	µg/Kg	<0,5	<0,5	<0,5
2,6-dicloro-4-nitroanilina	µg/Kg	136	6325	<0,5
5-cloro-2-toluidina	µg/Kg	1364	2753	785
4-cloro-2-anisidina	µg/Kg	<0,5	<0,5	<0,5

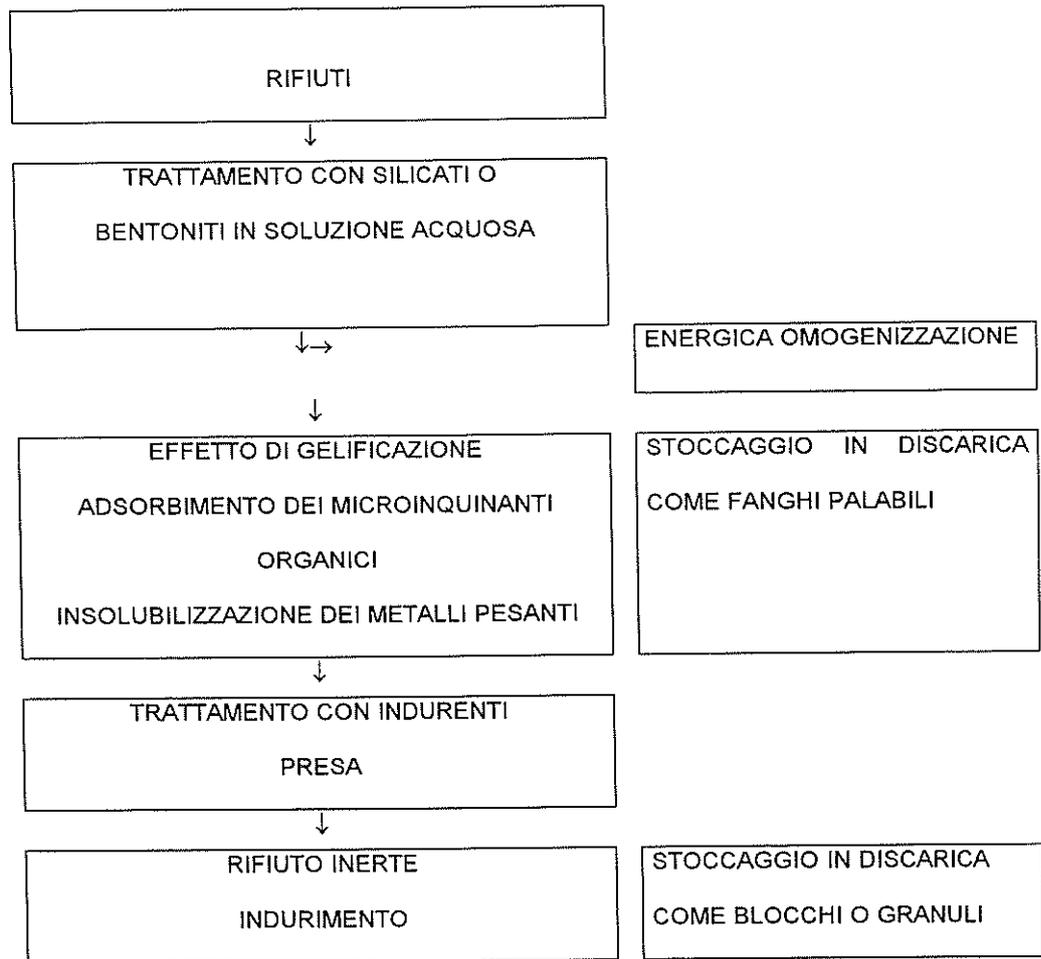
CONTRATTO G69911/7/GI			
<b>REL. 04</b>			
Fig. 12 di 73	Rev.		
	0		

Denominazione dei campioni		BAT 2	BAT 3	BAT 4
<b>Metalli totali</b>				
Piombo (Pb)	mg/Kg	94	400	143
Rame totale (Cu)	mg/Kg	486	1692	332
Cromo totale (Cr)	mg/Kg	146	35	87
Cromo esavalente (Cr VI)	mg/Kg	I.L.	I.L.	I.L.
Cadmio (Cd)	mg/Kg	1,84	1,2	1,72
Nichel (Ni)	mg/Kg			
Tallio (Tl)	mg/Kg	24	9,2	20
Berillio (Be)	mg/Kg	I.L.	I.L.	I.L.
Arsenico (As)	mg/Kg	65,0	18,8	97
Mercurio (Hg)	mg/Kg	57,0	4,6	26
<b>Test di cessione all'acido acetico 0,5 M</b>				
Piombo (Pb)	mg/l	I.L.	0,81	0,29
Rame solubile (Cu)	mg/l	0,163	0,137	0,544
Cromo totale (Cr)	mg/l	I.L.	I.L.	I.L.
Cromo esavalente (Cr VI)	mg/l	I.L.	I.L.	I.L.
Cadmio (Cd)	mg/l	I.L.	I.L.	0,02
Nichel (Ni)	mg/l	0,8	0,3	0,69
Mercurio (Hg)	mg/l	0,0027	I.L.	0,0017

CONTRATTO G69911/7/GI			
REL. 04			
Fig. 14 di 73		Rev.	
		0	

### 3.3. SOLIDIFICAZIONE-INERTIZZAZIONE-STABILIZZAZIONE

Il seguente diagramma a blocchi riporta lo schema di flusso delle operazioni effettuate e verificate nei risultati.



CONTRATTO G69911/7/G			
REL. 04			
Fg. 15 di 73	Rev.		
	0		

Come precedentemente sottolineato, i rifiuti industriali oggetto della prova contengono sia metalli pesanti che microinquinanti organici e sono costituiti da particelle di granulometria finissima che tendono a disperdersi con facilità sia in aria ed in acqua.

L'inertizzazione (o fissazione chimica) con materiali assorbenti ed indurenti ha come obiettivo l'insolubilizzazione dei metalli, la formazione di una massa permanentemente cementata, l'adsorbimento dei composti organici, la riduzione delle polveri e della loro possibilità di disperdersi.

I test hanno permesso di ottenere risultati globalmente positivi a livello di laboratorio, producendo conglomerati cementizi di buona consistenza, discretamente resistenti alla compressione e con una riduzione pressochè totale della frazione respirabile delle polveri ed un consistente contenimento dell'effetto odorigeno dovuto ai composti organici volatili presenti (naftaleni, fenoli, nitrobenzeni).

Sono comunque emerse delle criticità a livello di processo ma che devono essere tenute ben presenti e superate in una successiva fase di eventuale fattibilità impiantistica:

- come illustrato nel precedente schema a blocchi, il procedimento di inertizzazione e consolidamento deve necessariamente essere preceduto da un pre-trattamento con l'impiego preventivo di quantitativi di sostanze assorbenti (come bentonite o silicati di sodio); ciò ha permesso di ottenere un efficace abbattimento a livello di laboratorio della sensazione odorigena. L'utilizzo di questi materiali deve comunque essere soppesato in termini di costi e benefici in funzione dell'inevitabile incremento ponderale della massa totale di materiale;
- è inoltre emersa la necessità assoluta di avere un intimo e totale contratto tra il rifiuto micronizzato ed il legante idraulico (cemento) attraverso una completa disgregazione preventiva degli eventuali grumi presenti nel rifiuto; deve essere pertanto creato un gel omogeneo in fase di impasto con l'impiego di un giusto rapporto tra acqua e materiali impiegati. In laboratorio ciò è stato possibile solo attraverso una preventiva e accurata preparazione delle miscele a secco, avvenuta pastellando cautamente in mortaio di porcellana il rifiuto preventivamente seccato a 105°C in stufa. Successivamente è stato aggiunto il legante e si è proceduto all'idratazione della miscela;
- per quanto riguarda il trattamento del rifiuto umido non sono state trovate soluzioni sufficientemente energiche con centrifughe standard da laboratorio per disgregare completamente i grumi ed ottenere un impasto di adeguata omogeneità. Dopo la presa e come conseguenza della permanenza di grumi, all'interno dei conglomerati cementizi si possono osservare ancora glomeruli disomogenei di rifiuto non consolidato (foto 5). Nella foto, scattata dopo la presa del materiale, è possibile osservare come questi grumi si siano conservati pressochè inalterati all'interno di una massa comunque ben cementata. Questa situazione ha poi avuto ripercussioni negative sia sui testi di cessione dei metalli, che sulla loro solidità complessiva del materiale cementificato.

CONTRATTO G69911/7/GI			
REL. 04			
Fig. 16 di 73	Rev.		
	0		

In un ottica di processo industriale la micronizzazione del rifiuto e l'intima miscelazione tra rifiuto e legante rappresentano pertanto due punti molto delicati per ottenere un buon risultato.

Una volta superati tali problemi, l'aggiunta di legante idraulico e inerte nell'impasto con una adeguata idratazione e mescolamento determina il consolidamento in tempi analoghi a quelli delle comuni malte cementizie, dando origine a blocchi manipolabili (foto 6).

Si è testato con alcune prove specifiche anche l'impiego di additivi di cementificazione (acceleranti di presa) che riducono a meno di 20' la prima fase di presa. I successivi test di cessione all'acido acetico hanno manifestato l'inadeguatezza di questo procedimento, che ha determinato la mobilità di alcuni metalli pesanti rendendoli solubili.

### SCHEMA DELLA PROVA E RISULTATI OTTENUTI

I test sono stati eseguiti con diversi rapporti tra rifiuto e inertizzanti, al fine di individuare soluzioni economiche ma nello stesso tempo efficaci.

La tabella seguente riporta lo schema dei test seguiti:

TAB. 2

		PROVA 1,3,6	PROVA 2,4,7	PROVA 5,8	PROVA 9,10	PROVA 11,12
Rifiuto	Kg	1	1	1	1	1
Sabbia	Kg	0.2	0.3	0.4	0	0
Portland	Kg	0.1	0.2	0.6	0.3	0
Sodio	Kg	--	--	0.05	0.05	0.1
Silicato						
Bentonite	Kg	--	--	0.05	0	0.1

E' stato utilizzato cemento idraulico normale silico-alluminoso tipo "Portland 325" come da caratteristiche riportate nel D.M. 3.6.1968, con l'aggiunta di sabbia in proporzioni opportune.

A distanza di 18/24 ore dall'idratazione e mescolamento il materiale diviene manipolabile in quanto già ben consolidato.

Trascorso il periodo di indurimento, il rifiuto presenta una struttura omogenea reticolare e cristallina; avendo inglobato anche le particelle più fini che

CONTRATTO G69911/7/GI	
<b>REL. 04</b>	
Fg. 17 di 73	Rev.
	0

precedentemente al trattamento si trovavano in condizioni amorfe (fangose se umide, polverulente se secche).

Anche l'osservazione al microscopio ottico dimostra l'efficacia del fenomeno, (foto 7 - foto 7a).

Nel manufatto di foto 8, la sostanza organica residua costituisce poco più dell'1% del totale e non ha influito particolarmente nella presa del cemento, che appare sufficientemente omogenea e strutturata.

I blocchi di risulta hanno manifestato una buona consistenza (come da risultati riportati in Tab. 3), con i valori più bassi riscontrati nelle prove 1,3 e 6 (con dosaggi minori di cemento e sabbia).

Si è comunque ben al di sotto dei valori ottenibili da manufatti cementizi non contenenti il rifiuto.

I frammenti che si ottengono dalla rottura del manufatto, macinati al mortaio di ceramica, sono relativamente friabili ma si presentano completamente trasformati rispetto alle caratteristiche originarie. Sospesi in acqua tendono a precipitare rapidamente e non cedono particelle pigmentanti al liquido che resta limpido.

La tabella 4 riporta i risultati analitici ottenuti su campioni di rifiuti inertizzati a 6 e 24 giorni.

Si può osservare che i valori dei metalli pesanti solubili nell'eluato nel test di cessione a 6 giorni ed a 24 giorni sono abbondantemente entro i limiti richiesti per lo smaltimento in discarica di 2ª categoria tipo B, mentre i microinquinanti organici risultano praticamente solo diluiti.

I risultati qualitativamente migliori sono stati ottenuti per le prove che hanno fornito i migliori risultati in termini di resistenza alla compressione meccanica (prove 2 e 4), mentre le prove 1 e 3 hanno fornito risultati qualitativamente meno evidenti.

Per quanto concerne invece i metalli pesanti totali (la loro presenza in alcuni casi è risultata superiore ai valori iniziali) è utile ricordare che tali composti sono presenti negli stessi materiali inertizzanti.

E' pertanto opportuno verificarne preventivamente il contenuto nel cemento e nelle sabbie che si intende utilizzare.

## **CONSIDERAZIONI**

In un'ottica operativa (dopo aver valutato in termini di processo la criticità della fase di preparazione della miscela come precedentemente descritto) si consiglia di adottare apporti di cemento compresi tra 100 e 200 kg per tonnellata di rifiuto, oltre a circa 50 kg di silicato di sodio e 200-300 kg di sabbia, procedendo poi a idratazione e miscelazione meccanica adeguata dell'impasto così ottenuto.

CONTRATTO G69911/7/GI					
REL. 04					
Fg. 18 di 73	Rev.				
	0				

Tali dosaggi a livello di laboratorio permettono di ottimizzare la presa, ridurre considerevolmente l'eluizione di inorganici e ottenere una buona manipolabilità dei blocchi di risulta, anche con una discreta resistenza alla compressione.

Da tale miscela si ottiene a presa avvenuta un incremento ponderale del 20-30%.

CONTRATTO G699117/GI	
<b>REL. 04</b>	
Fig. 19 di 73	Rev.
	0

**Tab. 3 CARATTERISTICHE DELLE MISCELE TESTATE E CONFRONTO CON UNA MALTA DI SOLO CEMENTO E SABBIA.**

Campione Matrice	Indurente Portland %	Inerti sabbia %	Sodio silicato %	Bentonite %	Densità apparente	Densità reale	Compressione a 28 gg. Kg/cm <sup>2</sup>	Compressione a 60 gg. Kg/cm <sup>2</sup>
1 mix BAT 2	7.7	15.4	no	no	2.10	2.63	57	63
3 mix BAT 4	7.7	15.4	no	no	2.00	2.60	66	80
6 mix BAT 2 + BAT	7.7	15.4	no	no	2.00	2.60	51	54
7 mix BAT 2	7.7	20	no	no	1.75	2.34	162	207
4 mix BAT 4	13.5	20	no	no	1.87	2.31	187	193
7 mix BAT 2 + BAT	13.5	20	no	no	1.84	2.36	180	193
5 mix BAT 2	28.6	19	2.5	2.8	2.23	2.70	92	66
8 mix BAT 4	28.6	19	2.5	2.8	2.30	2.73	86	94
9 mix BAT 2	28.5	-	3.7	no	2.10	2.46	n.a.	n.a.
10 mix BAT 4	28.5	-	3.7	no	2.17	2.48	n.a.	n.a.
11 mix BAT 2	no	no	8.3	8.3	2.38	2.47	n.a.	n.a.
12 mix BAT 4	no	no	8.3	8.3	2.46	2.50	n.a.	n.a.
Riferimento	25	75	n.a.	n.a.	2,4	n.a.	325	375

I test di compressione sono determinati su provini confezionati nelle proporzioni descritte in tabella, ponendo poi la malta in appositi stampi e vibrandoli rigorosamente. I provini cilindrici sono sformati dopo 24 ore e bagnati ripetutamente. Le prove sono ripetute su tre provini assumendo come dato finale la media delle ripetizioni

CONTRATTO G69911/7/GI	
<b>REL. 04</b>	
Fg. 27 di 73	Rev.
	0

### 3.5 DILAVAMENTO DEI COMPOSTI ORGANICI

Le prove di dilavamento sono state eseguite con tre prove diverse: la prima ha previsto l'impiego di semplice acqua distillata, nel secondo caso è stata utilizzata una soluzione basica a pH 10 con soda, la terza una soluzione acida a pH 2 con acido solforico.

Ancora una volta, anche per questa prova, la struttura del rifiuto è stata determinante in quanto l'estrema finezza delle particelle presenti satura i filtri e impedisce il passaggio delle soluzioni acquose.

La prova è stata quindi eseguita sospendendo il rifiuto in abbondante soluzione acquosa e attendendo la decantazione della fase solida.

Il surnatante è stato eliminato e reintegrato per tre volte consecutive fino a eluire ogni 100 g. di rifiuto con almeno 2 litri di soluzione acquosa; al termine il rifiuto è stato addensato per centrifugazione.

Dall'analisi si è potuto notare che, pur avendo utilizzato abbondanti volumi di soluzione acquosa, l'asportazione di composti organici è risultata ridotta. Oltre a ciò si ha il deleterio effetto di creare solo un incremento del rifiuto per formazione di consistenti volumi di liquido di risulta, comunque da depurare, senza che ciò risolva minimamente nessuna problematica connessa ai microinquinanti organici ed ai metalli presenti nel rifiuto.

C'è inoltre da sottolineare che il rifiuto in oggetto è dotato di una certa percentuale di carbonati di calcio che reagendo con la soluzione acida tamponano la soluzione a pH neutro (7/7.2) producendo quindi schiume e vapori indesiderabili.

CONTRATTO G69911/7/GI	
REL. 04	
Fg. 28 di 73	Rev.
	0

### 3.6 VERIFICHE PER L'INVIO DEI MATERIALI A TERMODISTRUZIONE

I campioni BAT1 e BAT2 sono stati sottoposti a diverse caratterizzazioni analitiche preventive presso il centro di termodistruzione Ambiente di Ferrara per poterne verificare il possibile invio a termodistruzione.

Sebbene il prelievo di un campione in un unico punto di una zona abbia potenzialmente dei limiti di rappresentatività per il volume circostante (ancor più in un contesto di notevole anisotropia dei materiali quale quello riscontrato nell'ambito della discarica del Pian Rocchetta) si può ritenere che comunque l'analisi dei campioni BAT1 e BAT2 sia significativa per il caso specifico.

L'attuazione dell'alternativa di alienazione di materiali di riporto tramite incenerimento viene definita attraverso una fase preliminare di attività analitiche di caratterizzazione, volta a identificare e a verificare aspetti secondari e concatenati al processo termico di termodistruzione che potrebbero inficiare la possibilità stessa di invio a termodistruzione.

Attraverso tale caratterizzazione analitica vengono pertanto definite:

- le concentrazioni di contaminanti, indesiderati se presenti ad elevate concentrazioni,
- i valori di alcuni parametri chimico-fisici principali, la cui quantificazione è utile per gli sviluppi del processo di incenerimento,
- la concentrazione di alcuni elementi chimici, necessari per l'individuazione di reazioni secondarie indesiderate nei processi termici.

I risultati ottenuti dalle determinazioni analitiche dei campioni BAT1 e BAT2 sono di seguito commentati.

#### Campione BAT1

A seguito della caratterizzazione effettuata, il campione BAT1 non presenta particolari problematiche in prospettiva di una possibile alienazione dello stesso tramite trattamento di termodistruzione.

Infatti i principali parametri chimico-fisici presentano valori ammissibili per l'incenerimento: il residuo secco a 600 °C ha dei valori intorno al 70 % in peso (tale parametro viene associato all'eventuale produzione di ceneri del materiale dopo trattamento termico) e il contenuto d'acqua risulta avere dei tenori intorno al 23 % in peso.

I contaminanti inorganici, metalli pesanti, presenti risultano avere delle concentrazioni decisamente inferiori ai livelli di ammissibilità per un trattamento di termodistruzione; in particolare le concentrazioni dei metalli pesanti con maggiore capacità di volatilizzazione, quali arsenico e mercurio, sono globalmente basse.

Per quanto riguarda la contaminazione organica, si specifica quanto segue:

- ◇ la contaminazione di composti organici azotati, nella fattispecie ammine aromatiche, presenta concentrazioni per singoli composti analizzati inferiore ai

CONTRATTO G69911/7/GI	
REL. 04	
Fg. 29 di 73	Rev.
	0

limiti di sensibilità strumentale, tali componenti risultano essere poco desiderati non nel processo di smaltimento termico quanto nelle attività operative di predisposizione del rifiuto stesso per l'incenerimento, come la movimentazione e la sistemazione del materiale per il trattamento, ciò dovuto alle caratteristiche di tossicità dei contaminanti appartenenti a tale famiglia;

◇ i valori di cloro organico totale risultano essere < 0,1% in peso, indicando la ridotta presenza di composti organici clorurati, che richiedono particolari accorgimenti impiantistici dei forni di incenerimento e specifiche autorizzazioni per il loro incenerimento, specialmente se superiori al 2 %; infatti la termodistruzione di un composto organico clorurato produce come sottoprodotto acido cloridrico gassoso, il cui rilascio in atmosfera non è accettabile;

◇ il tenore di zolfo organico totale, quale indicatore della contaminazione di eventuali composti organici solfonati (tipici della produzione ACNA), si attesta su valori < 0,1 % in peso, decisamente irrilevanti per le problematiche connesse alla presenza di una tale tipologia di composti, dato che la presenza del gruppo solfonico risulta essere indesiderato per il verificarsi di processi di corrosione del refrattario, innescati proprio dalla presenza del gruppo solfonico;

◇ la contaminazione di composti organici aromatici sia monociclici (BTEX) che policiclici (IPA) risulta essere del tutto trascurabile, visto che i valori sono tutti inferiori ai limiti di sensibilità strumentale.

Il materiale di riporto, posizionato in prossimità del punto di prelievo del campione BAT1, risulta essere quindi destinabile per lo smaltimento presso impianto di termodistruzione.

### Campione BAT2

Il campione, denominato BAT2, presenta dei valori simili a BAT1 per quanto riguarda i parametri chimico-fisici di interesse, cioè il residuo secco a 600°C (pari a circa il 78 % in peso) e il contenuto d'acqua (pari a circa il 21 % in peso), indicativi dei possibili flussi di materia dei diversi prodotti sviluppabili a valle del processo di incenerimento.

La contaminazione di composti organici fa rilevare quanto segue:

◇ la contaminazione di composti organici azotati, nella fattispecie ammine aromatiche, presenta concentrazioni per singoli composti analizzati inferiore ai limiti di sensibilità strumentale, del tutto simili a quelle del campione precedente, ricordando che le motivazioni della loro indesiderata presenza sono le medesime descritte precedentemente per il campione BAT1;

◇ i valori di cloro organico totale si attestano su valori prossimi a ~ 0,01% in peso, del tutto irrilevanti per le problematiche ambientali, precedentemente menzionate e connesse alla loro presenza;

◇ il tenore di zolfo organico totale, quale indicatore della contaminazione di eventuali composti organici solfonati si attesta su valori intorno a ~ 0,2 % in peso, che, sebbene superiore alla concentrazione riportata dal campione BAT1, risulta essere ancora sostenibile da un impianto di termodistruzione senza alcun problema di corrosione del refrattario, come spiegato nel precedente campione;

CONTRATTO G69911/7/GI	
<b>REL. 04</b>	
Fg. 30 di 73	Rev.
	0

◇ la contaminazione di composti organici aromatici sia monociclici (BTEX) che policiclici (IPA) risulta essere del tutto trascurabile, visto che i valori sono tutti inferiori ai limiti di sensibilità strumentale,

La contaminazione di composti inorganici, nella fattispecie metalli pesanti, risulta essere superiore ai livelli di contaminazione riscontrati per il campione BAT1; soprattutto le concentrazioni dei metalli pesanti ad elevata capacità di volatilizzazione, quali mercurio e arsenico, sono notevolmente superiori rispetto a BAT1.

Ciò rende il campione non accettabile per un trattamento di termodistruzione a seguito del rischio di superamento dei limiti autorizzativi sull'emissioni dell'impianto, determinando emissioni inquinanti in atmosfera.

CONTRATTO G69911/7/G			
REL. 04			
Fg. 31 di 73	Rev.		
	0		

### 3.7. CONCLUSIONI FATTIBILITA' DI INTERVENTI CHIMICO-FISICI

Delle metodologie chimico-fisiche testate, solo le prove relative all'inertizzazione hanno fornito indicazioni utilizzabili per un eventuale intervento di bonifica di tipo *ex-situ*, preceduta comunque da una adeguata fase di cernita e selezione dei materiali. Di fatto irrealizzabile per motivi tecnici che di sicurezza e igiene ambientale.

Le operazioni elementari sarebbero quelle di movimentare, selezionare, disidratare, macinare e impastare con leganti idraulici il materiale individuato dallo studio di caratterizzazione. Il risultato finale sarebbe un volume di materiale incrementato del 30% con densità 1,8-2,0 ton/m<sup>3</sup>.

Si ricorda che l'indagine di caratterizzazione ha mostrato una notevole disomogeneità ed eteropia delle distribuzioni quali/quantitative dei materiali presenti nella discarica di Pian Rocchetta (cfr. Rel. 03).

Dal presente studio è comunque risultata non applicabile la stabilizzazione per materiali con un contenuto totale di sostanze organiche superiore al 2-3%.

Nel sito di Pian Rocchetta materiali a contenuto organico maggiore sono presenti e sono stati individuati nel corso delle indagini (probabilmente associati a residui di prodotti puri di produzione industriale).

Per tali volumi sarebbe comunque necessario ricorrere ad una termodistruzione, sempre però che non si ricada nei limiti riscontrati per tale soluzione, riassumibili in:

- ⇒ i materiali di riporto rappresentati dal campione BAT1 possono essere inviati a termodistruzione;
- ⇒ i materiali di riporto rappresentati dal campione BAT2 potrebbero essere non accettati da un impianto di termodistruzione (per la presenza di mercurio in concentrazioni eccessive e tali da determinare emissioni inquinanti in atmosfera).

Si potrebbe pertanto configurare anche il caso di avere dei volumi di materiali non trattabili termicamente né stabilizzabili, per i quali andrebbe selezionata una ulteriore soluzione.

Consorzio BASI

Ambiente Aquater

CONTRATTO G69911/7/G					
REL. 04					
Fg. 32 di 73		Rev.			
		0			

Considerando quindi le enormi difficoltà di cernita e selezione dei materiali e, non ultime, le problematiche certamente notevolissime di sicurezza ambientale e igiene del lavoro della manutenzione di tali materiali, il risultato generale di una fattibilità di intervento di bonifica basato su un approccio misto di inertizzazione e termodistruzione risulta attualmente confinato solo a scala di laboratorio e non praticabile nell'implementazione operativa a livello di ammasso globale dei rifiuti.

CONTRATTO G69911/7/GI	
<b>REL. 04</b>	
Fg. 33 di 73	Rev.
	0

#### 4 TEST DI TRATTABILITÀ BIOLOGICA

##### 4.1 SCOPO DEL LAVORO

E' ormai diffusa la richiesta di recupero e risanamento ambientale dei siti contaminati dai diversi tipi di inquinanti e inoltre non è mai stata così evidente come oggi la necessità di impiegare tecnologie sicure per l'ambiente e a costi contenuti.

Ben si colloca fra queste esigenze l'utilizzazione del biorisanamento, cioè l'uso di agenti biologici per rimuovere inquinanti dall'ambiente.

Fra le tecniche del biorisanamento, la maggiormente interessante, sia per i risultati raggiunti, sia per l'impatto sull'ecosistema, è la tecnica che prevede il rafforzamento, tramite condizioni di crescita adeguate e applicazioni di fertilizzanti, della attività di microrganismi autoctoni e/o selezionati con potenzialità degradative degli inquinanti presenti.

Diversamente dall'aria e dall'acqua, il suolo rappresenta un complesso sistema multifase, che complica il recupero di campioni significativi sia dal punto di vista microbiologico che chimico, inoltre la quantità e l'attività dei microrganismi del suolo sono altamente influenzate dal tipo di terreno e da vari parametri chimici e fisici.

Per effettuare un processo efficace è pertanto necessario effettuare una estesa ricerca per valutare l'applicabilità in pratica al sito. Tale ricerca prevede studi in laboratorio, prove pilota in laboratorio e successivamente sul campo.

I test di trattabilità biologica, descritti in questo capitolo, rappresentano un primo tentativo per valutare la degradabilità biologica degli inquinanti. Essi permettono di effettuare una valutazione preliminare della potenzialità di questa tecnica nell'applicarla al sito ed ai contaminanti in esame.

CONTRATTO G69911/7/GI	
REL. 04	
Fg. 34 di 73	Rev.
	0

#### 4.2 STATO DELL'ARTE SULLA BIODEGRADAZIONE DI CONTAMINANTI XENOBIOTICI

La distribuzione di microrganismi con capacità di degradare composti xenobiotici organici sembra essere in contraddizione con l'accumulo di questi in natura. I fattori limitanti sono costituiti dalla concentrazione a cui i composti tossici sono presenti e dai substrati addizionali, quali ad esempio l'ossigeno, nel caso si utilizzino ceppi aerobici e dallo sbilanciamento nutrizionale indotto localmente dalla elevata concentrazione dell'inquinante.

Inoltre se non viene osservata biodegradazione anche dopo inoculo con microrganismi specializzati la causa è da ricercarsi nella presenza di fattori abiotici quali, ad esempio, i metalli pesanti.

I microrganismi utilizzati nel corso della sperimentazione eseguita, e citati in letteratura, sono sottolineati nel testo.

Rif. Bibliografici: art. 4, 6.

##### COLORANTI AZOICI

I Coloranti Azoici presentano una grande varietà strutturale così che, come classe di composti, non sono uniformemente suscettibili all'attacco microbico.

Tipicamente non sono degradati in condizioni aerobiche, ma in condizioni di anaerobiosi il legame azoico può essere ridotto per formare ammine aromatiche che sono incolori ma possono essere tossiche e cancerogene.

In questo contesto si è rivelato interessante il sistema ligninolitico del fungo *Phanerochaete chrysosporium* che biodegrada aerobicamente diversi tipi di coloranti e potrebbe rivelarsi competitivo con le metodiche tradizionali.

Infatti nei sistemi di trattamento dei rifiuti l'eliminazione degli effluenti derivanti dalla lavorazione di coloranti non è basata sulla biodegradazione ma piuttosto su processi chimici e fisici, quali adsorbimento, concentrazione, trasformazione chimica ed incenerimento. Il *Phanerochaete chrysosporium* degrada gli acidi umici come pure le molecole xenobiotiche legate agli acidi umici e le condizioni naturali idonee alla degradazione sono simili a quelle richieste per la degradazione della lignina.

Considerata la vasta versatilità di questo fungo (è in grado di mineralizzare almeno parzialmente e a volte completamente una varietà di inquinanti ambientali persistenti quali DDT, PCBs, idrocarburi clorurati, la 3,4-dicloroanilina, pararosnilina, l'insetticida clorurato dieldrina, il benzopirene) è stato impiegato nella sperimentazione in oggetto in condizioni tali da stimolare la sua attività ligninolitica (vedere formulazione terreno utilizzato).

Capacità degradative riguardo i coloranti azosolfonati, vengono descritte anche per ceppi di *Pseudomonas* tra i quali il *cepacia*, consorzi batterici e ceppi di streptomiceti che possiedono perossidasi extracellulari, riferendoci a questi microrganismi nelle tabelle allegate nella relazione abbiamo messo in evidenza la presenza di batteri appartenenti alla classe degli Actinomycetes, in quanto potenziali degradatori dei composti xenobiotici presenti.

Rif. Bibliografici: Art 9, 14, 15.

##### IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI

CONTRATTO G69911/7/GI				
REL. 04				
Fg. 35 di 73	Rev.			
	0			

Gli IPA, prodotti ad alto peso molecolare, sono fortemente persistenti negli ecosistemi e la persistenza è tanto maggiore quanto maggiore è il numero di anelli della molecola che presenta una bassa solubilità in acqua. Il sistema enzimatico ligninolitico di varie specie di funghi catalizza dagli IPA la formazione di chinoni che possono coniugare con le sostanze umiche del suolo. La degradazione è dovuta alla somiglianza di questi contaminanti alla struttura della lignina e alla bassa specificità del sistema enzimatico.

Il *P. chrysosporium* ad esempio metabolizza il fenantrene a composti più polari conseguentemente questi prodotti sono più prontamente metabolizzati dalla flora nativa del suolo.

Degradazione si è osservata tramite popolazione microbiche autoctone dopo quattro settimane di incubazione in bioreattori airlift. E' stata dimostrata la degradazione di fenantrene anche da parte di *Rhodococcus sp. Sm-1*.

I batteri gram-negativi fra i quali *Ps. putida* e *Acinetobacter calcoaceticus*, degradano il naftalene, ma la biochimica e la genetica del processo differiscono da quelle dei gram-positivi. Fra i Gram-negativi ricordiamo anche *Alcaligenes odorans* che può crescere su antracene, fenantrene, dibenzotiofene, fluorene, fluorantene, pirene e crisene.

Rif. Bibliografici: Art 4, 8, 19, 25

#### COMPOSTI AROMATICI E IDROCARBURI ALOGENATI

Culture pure e miste di batteri hanno dimostrato la capacità di degradare idrocarburi alifatici clorurati e aromatici, ricordiamo quale esempio *Pseudomonas putida*, *Ps. fluorescens*, *Ps. mendocina* e *Ps. cepacia G4*.

Per quanto riguarda il tricloroetilene nessun microrganismo può crescere su questo composto che viene degradato attraverso il cometabolismo catalizzato da ossigenasi. Con cometabolismo intendiamo la trasformazione di una sostanza (che non supporta la crescita) tramite la necessaria presenza di un substrato di crescita che può essere a sua volta uno xenobiotico degradabile del microrganismo in esame o una sostanza naturale.

Ad esempio nel caso del *Pseudomonas cepacia G4* il tricloroetilene è degradato aerobicamente se vengono forniti toluene o altri composti aromatici come fonte di carbonio e di energia.

Anche gli attinomiceti sono noti per trasformare una grande varietà di substrati, inclusi quelli appena menzionati. Infatti sospensioni cellulari di *Rhodococcus sp. (ceppi Sm-1 e Wrink)* e *R. rhodochrous* sono in grado di degradare idrocarburi alogenati contenenti tre o quattro gruppi cloro e sono in grado di utilizzare come substrati di crescita: benzene, toluene, benzoato e naftalene.

Il *Rhodococcus Sm-1* è stato isolato da un consorzio microbico degradante il tricloroetilene. Si pensa che la capacità di degradare tricloroetilene (TCE) ed altri composti clorurati possa essere una caratteristica di parecchie specie di *Rhodococcus* che possiedono gli enzimi monossigenasi.

Un ceppo di *Pseudomonas* cresce su clorobenzene o paradichlorobenzene come unica fonte di carbonio e di energia tramite l'utilizzo di diossigenasi e diidrodiole deidrogenasi che portano alla formazione di catecoli.

Rif. Bibliografici: Art, 4, 19, 21.

CONTRATTO G69911/7/GI	
REL. 04	
Fg. 36 di 73	Rev.
	0

### I FENOLI

L' *Acinetobacter calcoaceticus* utilizza il fenolo come sola fonte di carbonio ed energia tramite una fenol-idrossilasi indotta dal suo stesso substrato. Questo enzima mostra una vasta specificità di substrato, infatti permette l' idrossilazione di cresoli, clorofenoli e clorofenoli metilati. Il pirogallolo ed il resorcinolo sono anch'essi metabolizzati, ma come gli altri substrati citati non supportano la crescita. Viene riportato in letteratura la degradazione di miscele di policlorobifenili da parte di *Acinetobacter sp.* con il conseguente accumulo di acidi clorobenzoici. A loro volta questi possono essere metabolizzati da *Pseudomonas sp.*

Il *P. chryso sporium* può essere applicato in campo per la mineralizzazione di pentaclorofenolo.

*Rhodococcus sp.* (ceppi *Sm-1* e *Wrink*) e *R. rhodochrous* sono in grado di utilizzare come substrati di crescita fenolo e 4-clorobifenile.

Anche per i clorofenoli siamo di fronte ad un processo cometabolico in quanto la trasformazione di questi presuppone la degradazione del fenolo. Questo processo è stato osservato in ceppi di *Penicillium*.

La presenza di attività degradative anche da parte di muffe giustifica la ricerca di queste nel corso della sperimentazione nonché la scelta di terreni selettivi per il loro recupero.

Nel caso del *Ps. cepacia G4* l'utilizzo del fenolo consente di degradare cometabolicamente il TCE.

Rif. Bibliografici: Art 4, 8, 19.

### AMMINE

L'anilina è un intermedio chimico industriale fra i maggiori che insieme ai derivati clorurati e solfonati viene utilizzata nella produzione di erbicidi e coloranti.

Parecchi microrganismi che degradano l'anilina o in qualche caso aniline clorate sono stati isolati. L'anilina è metabolizzata attraverso una deaminazione ossidativa a catecolo e ammonio seguita da una fissione dell'anello tramite la diossigenasi il catabolismo è indotto dalla anilina stessa.

La biodegradazione dei composti primari e delle cloroaniline è stata studiata in molti microrganismi inclusi gli attinomiceti, varie specie di *Pseudomonas* e *Moraxella*. Nel caso di quest'ultima, nel corso della biodegradazione di un erbicida (2 cloro-N-isopropil acetanilide) si forma un metabolita rilasciato nel medium, che viene degradato da un altro microrganismo autoctono del suolo (*Xanthobacter sp.*).

Nell'ambiente naturale i microbi che degradano l'anilina sono a contatto con altri substrati organici, sebbene questi altri substrati possono portare a più alti livelli di biomassa altresì possono inibire il metabolismo dell'anilina. Ad esempio *Ps. multivorans* utilizza carboidrati, acidi organici e amminoacidi al posto dell'anilina in culture a substrato misto.

Anche l' *Acinetobacter calcoaceticus* è in grado di crescere su anilina.

Rif. Bibliografici: Art 13.

### IDROCARBURI LINEARI E RAMIFICATI

CONTRATTO G69911/7/GI	
REL. 04	
Fg. 37 di 73	Rev.
	0

L' *Acinetobacter calcoaceticus* è in grado di metabolizzare sottoprodotti del petrolio in quanto, come l' *Alcaligenes odorans*, è in grado di crescere su n-alcani fino a 33 atomi di C, compreso il pristano, ma entrambi non possono crescere su cicloalcani. L' *A. calcoaceticus* è in grado di sintetizzare un biopolimero extracellulare capace di emulsionare il substrato idrocarburico fonte di carbonio per lo stesso microrganismo in quanto si lega fortemente alla superficie delle gocce idrocarburiche.

Da ricordare inoltre che l' *A. calcoaceticus* è in grado di degradare vari composti nitroderivati, quali l'acrilonitrile.

Rif. Bibliografici: Art 3.

#### MONOALCHILBENZENI E BENZOATO

Ceppi di *Ps. putida* sono in grado di metabolizzare toluene, etilbenzene, benzoato essendo in possesso del plasmide TOL (ricordiamo che il toluene, insieme con benzene e xilene sono in grado di contaminare le falde acquifere poste nelle vicinanze di discariche). Tale plasmide produce come intermedio il benzoato, che viene ulteriormente degradato.

Lo *Ps. cepacia G4* possiede due plasmidi catabolici, il più grande dei quali (pTOM) codifica la toluene monossigenasi e la catecol 2,3-diossigenasi. Ricordiamo che grazie a questo plasmide il ceppo possiede la capacità di metabolizzare toluene, fenolo e tricloroetilene. Anche questo ceppo è in grado di crescere su benzoato, come l' *Acinetobacter*, i *Rhodococcus* sp. Ceppi Sm-1 e Wrink e *rhodochrous*.

Anche il *Ph. chrysosporium* (in condizioni non ligninolitiche) ed il *Rhodococcus rhodochrous* degradano i BTEX.

Rif. Bibliografici: Art 5, 11, 19, 21, 22, 24.

CONTRATTO G69911/7/GI				
REL. 04				
Fg. 38 di 73	Rev.			
	0			

#### 4.3 MATERIALI E METODI

Sono stati condotti, come previsto dal programma di lavoro, test di trattabilità biologica sui rifiuti industriali, prelevati nel corpo della discarica

Sono stati prelevati 2 campioni di rifiuti, denominati BAT2, BAT3, che inizialmente sono stati caratterizzati dal punto di vista chimico e microbiologico. Successivamente sono stati sottoposti ai test di trattabilità biologica: per ogni campione sono stati allestiti 8 reattori (roller bottles), mantenuti in agitazione continua per 3 settimane, in modo da accelerare la velocità di biodegradazione. In ogni reattore il terreno era sottoposto a condizioni diverse con l'aggiunta di ammendati, di soluzioni acquose di nutrienti e di inoculi di diversi ceppi batterici che, da dati di letteratura, sono noti per le capacità biodegradative.

I risultati del test sono stati ricavati dal confronto fra i dati delle analisi chimiche e microbiologiche prima e dopo le 3 settimane di test.

##### 4.3.1 Caratterizzazione chimica dei campioni

Il materiale, ricevuto in laboratorio era contenuto in fustini sigillati da 30 kg circa.

Si è proceduto alla quartatura ed alla omogeneizzazione in modo da ottenere un campione il più rappresentativo possibile. Una aliquota è stata sottoposta ad analisi biologica ed un'altra ad analisi chimica per la determinazione dei seguenti composti:

- 1)- CLORURATI ALIFATICI
- 2)- AMMINE AROMATICHE, AMMINE AROMATICHE CLORURATE
- 3)- FENOLI
- 4)- CLORO-NITRO-BENZENI
- 5)- IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI
- 6)- METALLI PESANTI

Le determinazioni analitiche hanno seguito le seguenti procedure di estrazione ed analisi:

##### 1) Clorurati alifatici:

disgregazione del campione in bagno ad ultrasuoni per due ore mediante esano, precedentemente testato per via gascromatografica, ed esecuzione analisi gascromatografica su colonna capillare e detector ECD. La quantificazione dei singoli componenti è stata effettuata mediante l'uso di standard esterno. I clorurati alifatici sono stati singolarmente confermati.

Per i punti 2,3,4,5 si è proceduto all'estrazione in Soxhlet per otto ore impiegando come solvente cloruro di metilene.

L'estratto, in base alla tipologia di prodotti da ricercare, è stato trattato come segue:

- 2) Una aliquota dell'estratto viene trattata con acido cloridrico al 10% per salificare le ammine. La massa liquida è composta da due fasi: organica ed inorganica in cui sono presenti le ammine; separazione della fase acquosa e trasferimento in imbuto separatore.

CONTRATTO G69911/7/GI	
REL. 04	
Pg. 39 di 73	Rev.
	0

La soluzione acquosa, contenente le ammine, fortemente acida (pH 1) è stata resa basica con aggiunta di idrossido di sodio fino a pH 14. La soluzione alcalina è stata trattata con cloroformio per estrarne le ammine.

Sono stati eseguiti n. 3 lavaggi successivi, concentrazione mediante evaporatore rotante a circa 10 ml, successiva concentrazione con flusso di azoto fino a 2 ml esatti.

Si sono quindi determinate le ammine mediante analisi gascromatografica su colonna capillare e detector FID. La quantificazione dei singoli componenti è stata effettuata mediante l'uso di standard esterno. Le ammine sono state singolarmente confermate.

3) La fase organica, da cui sono state estratte le ammine è stata trattata con idrossido di sodio al 5% per trasformare i fenoli in fenati, quindi trasferimento della fase inorganica in imbuto separatore, acidificazione con acido cloridrico concentrato per riottenere i fenoli (pH 1), estrazione degli stessi mediante lavaggi successivi utilizzando cloroformio come solvente, concentrazione del cloroformio a circa 10 ml, successiva concentrazione con flusso di azoto fino a 2 ml esatti.

Si sono quindi determinati i fenoli mediante analisi gascromatografica su colonna capillare e detector FID. La quantificazione dei singoli componenti è stata effettuata mediante l'uso di standard esterno. I fenoli sono stati singolarmente confermati.

La soluzione organica da Soxhlet priva di ammine e fenoli, per poter essere purificata su colonna di Florisil, è stata additivata con una soluzione di isottano e toluolo, successivamente concentrata a volume noto in evaporatore rotante per eliminare il cloruro di metilene che avrebbe interferito nel clean-up.

4) Una aliquota del campione in isottano è stato purificata su colonna di Florisil eluendo prima con 30 ml di esano scartando l'eluato; eluizione con 30 ml di esano/acetone 1:1 per recuperare i nitro-benzeni.

Si sono quindi determinati i nitro-benzeni mediante analisi gascromatografica su colonna capillare e detector FID dopo concentrazione fino a volume noto. La quantificazione dei singoli componenti è stata effettuata mediante l'uso di standard esterno. I nitro-benzeni sono stati singolarmente confermati.

5) Una aliquota del campione in isottano è stato purificata su colonna di gel di silice eluendo prima con 50 ml di isottano scartando l'eluato; eluizione con 80 ml di cloroformio per recuperare gli IPA.

Si sono quindi determinati gli IPA mediante analisi gascromatografica su colonna capillare e detector FID dopo concentrazione a volume noto. La quantificazione dei singoli componenti è stata effettuata mediante l'uso di standard esterno. Gli IPA sono stati singolarmente confermati.

6) I metalli sono stati determinati mediante lettura a spettrofotometro per assorbimento atomico dopo mineralizzazione secondo metodi IRSA.

#### 4.3.2 Caratterizzazione microbiologica ed allestimento dei test di trattabilità



CONTRATTO G69911/7/GI	
REL. 04	
Fg. 41 di 73	Rev.
	0

#### 4.3.2.2 Allestimento ed esecuzione dei test di trattabilità

##### Preparazione dei campioni

I campioni di terreno, denominati BAT2 e BAT3, sono stati omogeneizzati manualmente. Il pietrame di diametro considerevole è stato scartato.

Per determinare la quantità di acqua necessaria per lo svolgimento dell'operazione, ad una frazione del campione in esame è stata aggiunta acqua in modo tale da ottenere una consistenza fangosa; dai risultati ottenuti si è visto che occorre aggiungere circa il 30-35% di acqua sul peso di terra in esame.

La quantità di liquido è mantenuta costante in tutti i campioni, nel corso della sperimentazione.

##### Apparato

È stato eseguito un processo di simulazione di trattamento a lotti (Batch), utilizzando apparecchiatura "Roller", per l'esecuzione di prove accelerate di degradazione.

Lo scopo di questa metodologia è quello di simulare il processo di biorisanamento in sistema controllato, su piccola scala, in un buon numero di condizioni.

In questo apparato è stato possibile testare, per ogni campione, 8 diverse condizioni di trattamento aerobico, in quanto le bottiglie ruotando, alla velocità di 15 rpm, consentono la formazione di uno strato sottile di fango con la massima superficie di esposizione all'aria.

Le bottiglie sono dotate di chiusura ermetica al fine di minimizzare l'evaporazione e la perdita di frazioni leggere e sono state mantenute a temperatura ambiente, in locale non riscaldato, per tre settimane.

##### Microrganismi utilizzati:

N° 2 cloni di ***Pseudomonas*** :

Gram -, aerobici, flagellati polari.

***Ps. cepacia G 4*** per la degradazione di tricloroetilene

***P. putida*** per la degradazione di toluene, m-p toluati, m-p xileni, benzoato.

N° 1 clone di ***Rhodococcus sp.*** Strain Sm -1

Gram +, aerobio obbligato, non mobile, pigmentato, ord. Actinomycetales per la degradazione di idrocarburi, solfo e cloroderivati, cloroformio.

N° 1 clone di ***Acinetobacter sp.***

Gram -, aerobio stretto, non mobile, non pigmentato.

per la degradazione di toluene, benzaldeide, benzene, benzoato, alcool benzilico etilbenzene, 3-metil catecolo, m-cresolo.

CONTRATTO G69911/7/GI	
REL. 04	
Pg. 42 di 73	Rev.
	0

N° 1 clone di *Phanerochaete chrysosporium*

fungo "white rot "

per la degradazione di coloranti solfonati all'anilina, pesticidi e clorurati, IPA, pentaclorofenolo.

I microrganismi sopracitati sono stati coltivati in coltura pura, in shake flask e/o in terreno agarizzato, e addizionati, ove previsto, ai suoli, previa opportuna diluizione in terreno minimo. Al momento dell'inoculo la densità di ognuno è stata rapportata all'indice turbidometrico standard Mc Farland 2 pertanto, dopo la diluizione, nel campione di terra la densità reale è di Mc Farland circa 0,5 (approssimativamente circa  $10^3$ - $10^4$  cell/g).

Condizioni di coltivazione

A motivo della notevole eterogeneità chimica delle sostanze presenti sono state scelte condizioni di trattamento comprendenti l'impiego di microrganismi dotati di vaste capacità metaboliche, come si ricava dalla bibliografia allegata.

La specie selezionate sono state aggiunte al terreno non sterilizzato, in quanto la sterilizzazione di terreni da sottoporre a biorisanamento non è un processo applicabile industrialmente. Le specie aggiunte devono costituire una nicchia metabolica che si integra con quella già naturalmente presente nel terreno, potenziandone l'effetto catabolico.

Sono state approntate n° 8 roller bottle da 1 litro per ciascun campione contenenti 100 gr di terra del campione in esame, additivata come segue:

CONTRATTO G69911/7/GI			
<b>REL. 04</b>			
Fg. 43 di 73	Rev.		
	0		

Suolo tal quale + 30 ml di acqua	campione di riferimento per valutare, dopo trattamento, il grado di decontaminazione, dovuto all'attività dei microrganismi addizionati, rispetto alla flora autoctona presente <b>senza</b> fertilizzanti
Suolo sterilizzato con formaldeide al 4%	campione per valutare il grado di perdite dovuto a motivi abiotici nel corso della sperimentazione ed estrazione
Suolo + fertilizzanti	campione per valutare, dopo trattamento, il grado di decontaminazione dovuto all'attività della flora autoctona presente <b>con</b> fertilizzanti
Suolo + fertilizzanti + <i>Pseudomonas</i> N°1	
Suolo + fertilizzanti + <i>Pseudomonas</i> N°2	
Suolo + fertilizzanti + <i>Rhodococcus</i>	
Suolo + fertilizzanti + <i>Acinetobacter</i>	
Suolo + fertilizzanti + <i>Phanerochaete</i>	

CONTRATTO G69911/7/GI			
REL. 04			
Fg. 44 di 73	Rev.		
	0		

#### 4.4 RISULTATI DELLE CARATTERIZZAZIONI INIZIALI

##### 4.4.1 Caratterizzazione chimica

La tabella seguente illustra i risultati della caratterizzazione chimica iniziale per entrambi i campioni. Dati riferiti al tal quale.

Tab. 4.4.1: Risultati analitici iniziali

FENOLI	U.M.	BAT 2	BAT 3
fenolo	mg/kg	n.d.	3.0
2cloro fenolo	mg/kg	n.d.	3.4
2metil fenolo	mg/kg	n.d.	n.d.
3metil fenolo	mg/kg	n.d.	n.d.
4 metil fenolo	mg/kg	n.d.	n.d.
2nitro fenolo	mg/kg	n.d.	n.d.
2.4dimetil fenolo	mg/kg	n.d.	n.d.
2.4dicloro fenolo	mg/kg	n.d.	n.d.
2.6dicloro fenolo	mg/kg	0.4	1.9
4cloro 3metil fenolo	mg/kg	n.d.	n.d.
245tricloro fenolo	mg/kg	n.d.	1.8
246tricloro fenolo	mg/kg	n.d.	n.d.
2.4 dinitro fenolo	mg/kg	n.d.	n.d.
4 nitro fenolo	mg/kg	n.d.	n.d.
2.3.4.6tetracloro fenolo	mg/kg	n.d.	n.d.
2metil 4.6dicloro fenolo	mg/kg	n.d.	n.d.
pentacloro fenolo	mg/kg	n.d.	n.d.
2secbutil 4.6dinitro fenolo	mg/kg	0.4	n.d.
4butil1,2 diidrossibenzene	%p	n.d.	0.84
AMMINE	U.M.	BAT 2	BAT 3
anilina	mg/kg	n.d.	n.d.
paratoluidina	mg/kg	0.3	n.d.
2cloro anilina	mg/kg	n.d.	5.7
3cloro anilina	mg/kg	n.d.	1.6
4cloro anilina	mg/kg	0.4	2.4
2.6dicloro anilina	mg/kg	n.d.	3.4
5cloro 2metil anilina	mg/kg	n.d.	n.d.
2.6dietil anilina	mg/kg	n.d.	n.d.
2.3dicloro anilina	mg/kg	n.d.	n.d.
5cloro 2metossi anilina	mg/kg	n.d.	n.d.
3.5dicloro anilina	mg/kg	n.d.	5.9
2nitro anilina	mg/kg	n.d.	n.d.
3.4dicloro anilina	mg/kg	5.6	1.0
3 nitro anilina	mg/kg	0.5	n.d.
2 naftil ammina	mg/kg	n.d.	n.d.
4cloro 2 nitro anilina	mg/kg	n.d.	7.7
4 nitro anilina	mg/kg	1.4	n.d.
2cloro 4nitro anilina	mg/kg	0.1	n.d.
2.6dicloro 4nitro anilina	mg/kg	n.d.	n.d.

CONTRATTO G69911/7/GI			
REL. 04			
Fig. 45 di 73	Rev.		
	0		

continua Tab. 4.4.1

<b>NITRO-BENZENI</b>	<b>U.M.</b>	<b>BAT 2</b>	<b>BAT 3</b>
mononitrobenzolo	mg/kg	0.1	0.2
1cloro 3nitro benzolo	mg/kg	n.d.	n.d.
1cloro 4nitro benzolo	mg/kg	n.d.	2.0
1cloro 2nitro benzolo	mg/kg	n.d.	n.d.
2.5 dicloro nitrobenzolo	mg/kg	n.d.	n.d.
3.5 dicloro nitrobenzolo	mg/kg	n.d.	1.0
1.3 dinitrobenzolo	mg/kg	n.d.	n.d.
2.6 dinitrotoluolo	mg/kg	n.d.	n.d.
ortodinitrobenzolo	mg/kg	0.2	0.6
2.4 dinitrotoluolo	mg/kg	n.d.	n.d.
pentacloronitrobenzolo	mg/kg	n.d.	9.0
<b>IDROCARBURI POLICICLICI</b>	<b>U.M.</b>	<b>BAT 2</b>	<b>BAT 3</b>
<b>AROMATICI</b>			
naftalene	mg/kg	n.d.	240
acenaftilene	mg/kg	n.d.	n.d.
acenaftene	mg/kg	n.d.	n.d.
fluorere	mg/kg	n.d.	n.d.
fenantrene	mg/kg	0.4	n.d.
antarcene	mg/kg	n.d.	n.d.
fluorantene	mg/kg	n.d.	n.d.
pirene	mg/kg	n.d.	n.d.
benzo a antracene	mg/kg	n.d.	115
crisene	mg/kg	n.d.	3.8.
benzo b fluorantene	mg/kg	n.d.	n.d.
benzo k fluorantene	mg/kg	n.d.	n.d.
benzo a pirene	mg/kg	n.d.	n.d.
indeno 1.2.3 pirene	mg/kg	n.d.	490
dibenzo a.h antracene	mg/kg	n.d.	n.d.
benzo g.h.i perilene	mg/kg	n.d.	n.d.
<b>CLORURATI ALIFATICI</b>	<b>U.M.</b>	<b>BAT 2</b>	<b>BAT 3</b>
cloroformio	mg/kg	0.05	0.02
1.1.1. tricloroetano	mg/kg	0.01	0.01
tetracloro metano	mg/kg	n.d.	0.03
tricloro etilene	mg/kg	0.07	0.04
tetracloroetilene	mg/kg	2.7	0.23
esaclorobutadiene	mg/kg	n.d.	1.2
<b>METALLI</b>	<b>U.M.</b>		
rame solubile	mg/kg	0.8	0.7
rame totale	mg/kg	660	2431
cromo VI	mg/kg	0.8	1.0
cromo totale	mg/kg	220	112
cadmio	mg/kg	2.2	1.9
piombo totale	mg/kg	90	131
mercurio	mg/kg	36	0.4

CONTRATTO G69911/7/GI			
REL. 04			
Fg. 46 di 73	Rev.		
	0		

#### 4.4.2 Risultati analisi microbiologiche

La caratterizzazione microbiologica effettuata sui terreni tal quali, prima dell'esecuzione dei test ha evidenziato la presenza di una discreta biomassa microbica, come risulta dalle tabelle seguenti. Nella prima tabella sono indicati i risultati della selezione iniziale, dove sono stati utilizzati diversi terreni di cultura e la stessa quantità di inoculo per ogni campione

tab 4.4.2:

	Campione Bat 2 Fattore di diluizione $10^{-1}$	Campione Bat 3 Fattore di diluizione $0.66 \times 10^{-1}$
TERRENO		
MSM	Crescita confluyente	Crescita confluyente
NUTRIENT	Crescita confluyente	Crescita confluyente
PCA	Crescita confluyente	Crescita confluyente
TRYPTIC	Crescita confluyente	Crescita confluyente
POTATO	Crescita confluyente	Crescita confluyente
VIOLET RED	Crescita confluyente	Crescita confluyente

Come già descritto nei metodi, osservando elevata crescita, sono poi state eseguite delle diluizioni decimali per effettuare delle conte più accurate. Le diluizioni scelte sono state da  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  per BAT2 e da  $10^{-4}$  a  $10^{-7}$  per BAT3. Di seguito sono riportati i risultati delle conte iniziali per i due campioni.

Tab 4.4.3: Risultati delle conte iniziali per il campione BAT2

I numeri indicano le UFC di microrganismi per gr. di campione Presenti muffe (M), attinomiceti (A), streptomiceti (S), assenti lieviti.

	Fattore di diluizione $10^{-3}$	Fattore di diluizione $10^{-4}$	Fattore di diluizione $10^{-5}$
TERRENO			
MSM	119 + 20 S + 8 M	94 + 10 S + 1 M	1 + 7 S
NUTRIENT	Crescita confluyente + 8 M	184	42 + 1 M
PCA	Crescita confluyente	175	35
TRYPTIC	Crescita confluyente	182	38
POTATO	81 + 8 M + 1 S	58 + 5 A + 5 S + 2 M	4 + 1 M
VIOLET RED	46 + 1 M	15	6

CONTRATTO G69911/7/GI			
REL. 04			
Fg. 47 di 73	Rev.		
	0		

**Tab. 4.4.4: Risultati conte iniziali per il campione BAT3**

I numeri indicano le UFC di batteri per gr. di campione. Assenti muffe e lieviti.

	Fattore di diluizione $10^{-4}$	Fattore di diluizione $10^{-5}$	Fattore di diluizione $10^{-6}$	Fattore di diluizione $10^{-7}$
TERRENO				
MSM	Crescita confluente	350	40	4
NUTRIENT	Crescita confluente	Crescita confluente	75	9
PCA	Crescita confluente	Crescita confluente	58	9
TRYPTIC	Crescita confluente	Crescita confluente	111	1
POTATO	Crescita confluente	Crescita confluente	70	6
VIOLET RED	Crescita confluente	345	41	3

Dall'analisi microbiologica si evince che il campione BAT2 presenta all'origine una flora microbica inferiore di circa un ordine di grandezza rispetto a BAT3 (ved. grafici). Comunque sia la presenza di Proto ed Eumiceti-Attinomiceti, nonché di muffe indica che il terreno conserva un ecosistema equilibrato (vedi tabelle relative).

Sulla base dei dati analitici in possesso può essere ipotizzata una inibizione da metalli pesanti, in particolare il mercurio, o una limitata quantità di frazione organica assimilabile, poiché la quantità totale dei composti organici in BAT2 è bassa (relativamente alle analisi effettuate).

CONTRATTO G69911/7/GI					
REL. 04					
Fg. 48 di 73	Rev.				
	0				

#### 4.5 RISULTATI FINALI

Al termine della prova sono state prelevate dai campioni di roller bottles, aliquote di materiale che in parte sono state inviate al laboratorio chimico per l'analisi della concentrazione finale dei contaminanti ed in parte sono state utilizzate per le analisi microbiologiche, dopo le opportune diluizioni, indicate nelle tabelle dei risultati.

##### 4.5.1 Analisi chimiche

Di seguito nelle tabelle 4.5.1 e 4.5.2 sono riportati i risultati delle analisi chimiche sui campioni prelevati da ciascuno degli 8 reattori, rispettivamente per BAT2 e BAT3. Le tabelle riportano anche i dati iniziale per il confronto.

Nelle tabelle le caselle con n.r. indicano che l'analisi è stata eseguita, ma il composto in esame è in concentrazione non rilevabile; la sigla n.d. indica la non esecuzione delle analisi. In appendice sono riportati i certificati analitici e le analisi relative ai metalli pesanti. I dati sono riferiti al peso secco.

Tab. 4.5.1 Risultati analitici iniziali e finali per il campione BAT2

FENOLI	U.M.	t=0	BAT 2/1	BAT 2/2	BAT 2/3	BAT 2/4	BAT 2/5	BAT 2/6	BAT 2/7	BAT 2/8
fenolo	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.
2cloro fenolo	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.
2metil fenolo	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.
3metil fenolo	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.
4 metil fenolo	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.
2nitro fenolo	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.
2.4dimetil fenolo	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.
2.4dicloro fenolo	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.
2.6dicloro fenolo	mg/kg	0.5	0.8	0.83	n.d.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.
4cloro 3metil fenolo	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.
245tricloro fenolo	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.
246tricloro fenolo	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.
2.4 dinitro fenolo	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.
4 nitro fenolo	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.
2.3.4.6tetracloro fenolo	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.
2metil 4.6dicloro fenolo	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.
pentacloro fenolo	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.
2 secbutil 4.6dinitro fenolo	mg/kg	0.5	0.6	1.1	n.d.	1.4	1.1	n.d.	n.r.	n.d.
4butil1,2 diidrossibenzene	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.

CONTRATTO G69911/7/GI			
REL. 04			
Fg. 49 di 73	Rev.		
	0		

continua Tab. 4.5.1

AMMINE	U.M.	t=0	bat 2/1	bat 2/2	bat 2/3	bat 2/4	bat 2/5	bat 2/6	bat 2/7	bat 2/8
anilina	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.	n.d.	n.r.
paratoluidina	mg/kg	0.4	0.4	0.5	0.26	n.d.	0.45	n.d.	n.d.	0.29
2cloro anilina	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.	n.d.	n.r.
3cloro anilina	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.	n.d.	n.r.
4cloro anilina	mg/kg	0.5	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.	n.d.	n.r.
2,6dicloro anilina	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.	n.d.	n.r.
5cloro 2metil anilina	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.	n.d.	n.r.
2,6dietil anilina	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.	n.d.	n.r.
2,3dicloro anilina	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.	n.d.	n.r.
5cloro 2metossi anilina	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.	n.d.	n.r.
3,5dicloro anilina	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.	n.d.	n.r.
2nitro anilina	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.	n.d.	n.r.
3,4dicloro anilina	mg/kg	6.9	5	5.4	3.7	n.d.	4.3	n.d.	n.d.	3.1
3 nitro anilina	mg/kg	0.6	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.	n.d.	n.r.
2 naftil ammina	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.	n.d.	n.r.
4cloro 2 nitro anilina	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.	n.d.	n.r.
4 nitro anilina	mg/kg	1.7	1	1.1	0.5	n.d.	0.6	n.d.	n.d.	0.7
2cloro 4nitro anilina	mg/kg	0.1	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.	n.d.	n.r.
2,6dicloro 4nitro anilina	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.	n.d.	n.r.
NITRO-BENZENI	U.M.	t=0	BAT 2/1	BAT 2/2	BAT 2/3	BAT 2/4	BAT 2/5	BAT 2/6	BAT 2/7	BAT 2/8
mononitrobenzolo	mg/kg	0.1	0.5	0.6	n.d.	n.d.	n.d.	0.3	0.3	0.12
1cloro 3nitro benzolo	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	n.r.	n.r.	n.r.
1cloro 4nitro benzolo	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	n.r.	n.r.	n.r.
1cloro 2nitro benzolo	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	n.r.	n.r.	n.r.
2,5 dicloro nitrobenzolo	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	n.r.	n.r.	n.r.
3,5 dicloro nitrobenzolo	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	n.r.	n.r.	n.r.
1,3 dinitrobenzolo	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	n.r.	n.r.	n.r.
2,6 dinitrotoluolo	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	n.r.	n.r.	n.r.
ortodinitrobenzolo	mg/kg	0.2	n.r.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	n.r.	n.r.	n.r.
2,4 dinitrotoluolo	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	n.r.	n.r.	n.r.
pentacloronitrobenzolo	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	n.r.	n.r.	n.r.

CONTRATTO G69911/7/GI			
REL. 04			
Fig. 50 di 73	Rev.		
	0		

continua Tab. 4.5.1

IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI	U.M.	t=0	BAT 2/1	BAT 2/2	BAT 2/3	BAT 2/4	BAT 2/5	BAT 2/6	BAT 2/7	BAT 2/8
naftalene	mg/kg	n.r.	0.5	0.3	0.3	0.3	n.d.	n.d.	n.d.	1
acenaftilene	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	n.r.
acenaftene	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	n.r.
fluorene	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	n.r.
fenantrene	mg/kg	0.5	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	n.r.
antarcene	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	n.r.
fluorantene	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	n.r.
pirene	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	n.r.
benzo a antracene	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	n.r.
crisene	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	n.r.
benzo b fluorantene	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	n.r.
benzo k fluorantene	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	n.r.
benzo a pirene	mg/kg	n.r.	5	6	7.5	5.9	n.d.	n.d.	n.d.	2.6
indeno 1.2.3 pirene	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	n.r.
dibenzo a.h antracene	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	n.r.
benzo g.h.i perilene	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	n.r.
<b>COMPOSTI ALOGENATI ALIFATICI</b>	<b>U.M.</b>	<b>t=0</b>	<b>BAT 2/1</b>	<b>BAT 2/2</b>	<b>BAT 2/3</b>	<b>BAT 2/4</b>	<b>BAT 2/5</b>	<b>BAT 2/6</b>	<b>BAT 2/7</b>	<b>BAT 2/8</b>
cloroformio	mg/kg	0.06	0.21	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.	n.d.
tetracloruro di carbonio	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.	n.d.
tricloroetilene	mg/kg	0.08	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.	n.d.
tetracloroetilene	mg/kg	3.3	0.46	0.59	0.46	0.16	n.d.	0.46	n.d.	n.d.
esaclorobutadiene	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.	n.d.

CONTRATTO G69911/7/GI			
REL. 04			
Fg. 51 di 73		Rev.	
		0	

Tab. 4.5.2 Risultati analitici iniziali e finali per il campione BAT3

FENOLI	U.M.	t=0	BAT 3/1	BAT 3/2	BAT 3/3	BAT 3/4	BAT 3/5	BAT 3/6	BAT 3/7	BAT 3/8
fenolo	mg/kg	3.7	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.
2cloro fenolo	mg/kg	4.2	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.
2metil fenolo	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.
3metil fenolo	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.
4 metil fenolo	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.
2nitro fenolo	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.
2.4dimetil fenolo	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.
2.4dicloro fenolo	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.
2.6dicloro fenolo	mg/kg	2.3	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.
4cloro 3metil fenolo	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.
245tricloro fenolo	mg/kg	2.2	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.
246tricloro fenolo	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.
2.4 dinitro fenolo	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.
4 nitro fenolo	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.
2.3.4.6tetracloro fenolo	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.
2metil 4.6dicloro fenolo	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.
pentacloro fenolo	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.
2secbutil4.6dinitro fenolo	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.
4butil1,2 diidrossibenzene	mg/kg	10000	1007	2516	n.d.	776	554	n.d.	1682	n.d.

CONTRATTO G699117/GI			
REL. 04			
Fig. 52 di 73	Rev.		
	0		

continua Tab. 4.5.2

AMMINE	U.M.	t=0	BAT 3/1	BAT 3/2	BAT 3/3	BAT 3/4	BAT 3/5	BAT 3/6	BAT 3/7	BAT 3/8
anilina	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.	n.d.	n.r.
paratoluidina	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.	n.d.	n.r.
2cloro anilina	mg/kg	7.1	5.5	6.9	5.5	n.d.	7.3	n.d.	n.d.	3.9
3cloro anilina	mg/kg	2	1.6	1.6	1.4	n.d.	1.4	n.d.	n.d.	1.5
4cloro anilina	mg/kg	3	5.5	5.4	4.2	n.d.	5.4	n.d.	n.d.	3.5
2,6dicloro anilina	mg/kg	4.2	3.8	6.9	5	n.d.	4	n.d.	n.d.	1.7
5cloro 2metil anilina	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.	n.d.	n.r.
2,6dietil anilina	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.	n.d.	n.r.
2,3dicloro anilina	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.	n.d.	n.r.
5cloro 2metossi anilina	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.	n.d.	n.r.
3,5dicloro anilina	mg/kg	7.3	1	2.4	0.9	n.d.	n.r.	n.d.	n.d.	0.4
2nitro anilina	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.	n.d.	n.r.
3,4dicloro anilina	mg/kg	1.2	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.	n.d.	n.r.
3 nitro anilina	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.	n.d.	n.r.
2 naftil ammina	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.	n.d.	n.r.
4cloro 2 nitro anilina	mg/kg	9.5	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.	n.d.	n.r.
4 nitro anilina	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.	n.d.	n.r.
2cloro 4nitro anilina	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.	n.d.	n.r.
2,6dicloro 4nitro anilina	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.	n.d.	n.r.
NITRO-BENZENI	U.M.	t=0	BAT 3/1	BAT 3/2	BAT 3/3	BAT 3/4	BAT 3/5	BAT 3/6	BAT 3/7	BAT 3/8
mononitrobenzolo	mg/kg	0.2	n.r.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	n.r.	n.r.	n.r.
1cloro 3nitro benzolo	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	n.r.	n.r.	n.r.
1cloro 4nitro benzolo	mg/kg	2.5	2.8	2.9	n.d.	n.d.	n.d.	2.1	2.3	n.r.
1cloro 2nitro benzolo	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	n.r.	n.r.	n.r.
2,5 dicloro nitrobenzolo	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	n.r.	n.r.	n.r.
3,5 dicloro nitrobenzolo	mg/kg	1.2	n.r.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	n.r.	n.r.	n.r.
1,3 dinitrobenzolo	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	n.r.	n.r.	n.r.
2,6 dinitrotoluolo	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	n.r.	n.r.	n.r.
ortodinitrobenzolo	mg/kg	0.7	1.7	3.5	n.d.	n.d.	n.d.	1.2	2.1	1.3
2,4 dinitrotoluolo	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	n.r.	n.r.	n.r.
pentacloronitrobenzolo	mg/kg	11.1	6.8	9.4	n.d.	n.d.	n.d.	8.5	4.2	n.r.

CONTRATTO G699117/GI			
<b>REL. 04</b>			
Fg. 53 di 73	Rev.		
	0		

continua Tab. 4.5.2

IDROCARBURI POLICICLICI ROMATICI	U.M.	t=0	BAT							
			3/1	3/2	3/3	3/4	3/5	3/6	3/7	3/8
naftalene	mg/kg	297	271	682	484	276	n.d.	n.d.	n.d.	139
acenaftilene	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	n.r.
acenaftene	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	n.r.
fluorene	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	n.r.
fenantrene	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	n.r.
antarcene	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	n.r.
fluorantene	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	n.r.
pirene	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	n.r.
benzo a antracene	mg/kg	142	198	368	304	233	n.d.	n.d.	n.d.	124
crisene	mg/kg	4.7	10.2	7.6	5.2	11.3	n.d.	n.d.	n.d.	2.4
benzo b fluorantene	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	n.r.
benzo k fluorantene	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	n.r.
benzo a pirene	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	n.r.
indeno 1.2.3 pirene	mg/kg	607	541	442	420	512	n.d.	n.d.	n.d.	210
dibenzo a.h antracene	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	n.r.
benzo g.h.i perilene	mg/kg	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.d.	n.d.	n.r.
<b>COMPOSTI ALOGENATI ALIFATICI</b>	<b>U.M.</b>	<b>t=0</b>	<b>BAT</b>							
			<b>3/1</b>	<b>3/2</b>	<b>3/3</b>	<b>3/4</b>	<b>3/5</b>	<b>3/6</b>	<b>3/7</b>	<b>3/8</b>
cloroformio	mg/kg	0.02	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.	n.d.
tetracloruro di carbonio	mg/kg	0.04	0.02	n.r.	0.07	n.r.	n.d.	0.09	n.d.	n.d.
tricloroetilene	mg/kg	0.05	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.d.	n.r.	n.d.	n.d.
tetracloroetilene	mg/kg	0.28	0.17	0.48	0.59	0.4	n.d.	0.47	n.d.	n.d.
esaclorobutadiene	mg/kg	1.5	0.19	1.06	0.48	0.62	n.d.	0.95	n.d.	n.d.

CONTRATTO G69911/7/GI	
REL. 04	
Fg. 54 di 73	Rev.
	0

#### 4.5.2 Caratterizzazione Microbiologica Finale

Al termine della prova sono state prelevate dai campioni di roller bottles, aliquote di materiale, che sono state diluite secondo lo schema riportato nelle tabelle e nei grafici delle pagine seguenti.

Per poter effettuare le diluizioni, sono stati considerati i risultati precedenti, eliminando i terreni di coltura che non davano risultati significativi ed inserendone altri in grado di ampliare la conoscenza della flora microbica presente.

E' possibile osservare che la concentrazione di batteri Gram- per entrambi i campioni risulta essere il 10% della flora totale, ad eccezion fatta per i campioni della serie 8, ove tale percentuale sale a circa il 20%. In generale alla frazione di Gram- è associata la maggior capacità biodegradativa.

In particolare per quanto riguarda la serie BAT2, è stato possibile reisolare, nei campioni 4 e 5 cloni degli *Pseudomonas* aggiunti ed analogamente, nel campione 8 è stato possibile reisolare il fungo *Phanerochaete chrysosporium*, indice di sopravvivenza e integrazione con la microflora presente.

L'identificazione è stata effettuata sulla base delle caratteristiche morfologiche delle colonie, nelle varie condizioni colturali, produzione o meno di fluorescina ed in particolare, per quanto riguarda il *Phanerochaete chrysosporium*, sulla base della morfologia microscopica dei micro e macroconidi nei diversi terreni.

La concentrazione di muffe risulta essere circa  $10^3$ - $10^4$  per grammo di terreno.

Per quanto riguarda la serie BAT3, è stata isolata una popolazione autoctona di *Pseudomonas* fluorescenti, che risulta maggiormente adattata al campione in esame, rispetto alle specie aggiunte e batteri e muffe che crescono su benzoato.

Anche in questo campione è stato possibile reisolare sia lo *Ps. putida* che il *Phanerochaete ch.*, a conferma della grande adattabilità di queste specie e della versatilità metabolica, come affermata dalla letteratura allegata.

Per semplificare la lettura dei risultati delle conte batteriche totali, nei grafici seguenti è riportata la media dei valori ottenuti sul campione tal quale e dopo trattamento con roller.

Sono stati scelti i terreni con maggior risposta numerica.

CONTRATTO G69911/7/GI			
<b>REL. 04</b>			
Fg. 55 di 73	Rev.		
	0		

**Tab. 4.5.3 Campione BAT2 (U.F.C./g di suolo), fine processo**

Terreno	Dilui zione	1 + H <sub>2</sub> O	2 Steriliz zato	3 + Fertiliz zanti	4 + Pseudo monas G4	5 + P. putida	6 + Rhodo coccus	7+ Acineto bacter	8 + Phanero chaete.
<b>MSM</b>	10 <sup>-4</sup>	332 (10 S) 1 M	0	208 (5 S)	325 (2 A) (20 G4) 2 M	310 (3 S) (45 P.) 1 M	422 (43 S)	346 (10 S)	>1000  2 M
	10 <sup>-5</sup>	55	0	31	47	52 (4 S)	49	46	544  2 M 1 M
<b>Tryp. soy</b>	10 <sup>-4</sup>	conflue nza (sporig eni)*	0	247 1 M	conflue nza 3 M	conflue nza	275 (5 S)	243 (30 S) (sporig eni) 1 M	conflue nza 4 M
	10 <sup>-6</sup>	10	0	4	9	13 (1 P.)	4 (1 A)	3	122
<b>Violet red</b>	10 <sup>-4</sup>	13	0	28	30	33 (19 P.)	16	48	> 500
	10 <sup>-5</sup>	2	0	3	3	5	0	2	92
<b>Potato acido</b>	10 <sup>-4</sup>	1 M	0	0	0	1 M	1 M	1 M	13 M  (12 Ph ch)
	10 <sup>-5</sup>	0	0	0	0	0	0	0	1 Ph ch
<b>Potato</b>	10 <sup>-4</sup>			110 (26 S)					
	10 <sup>-5</sup>			19					558  1 Ph ch + 2 M
<b>Fluore scence</b>	10 <sup>-4</sup>								
	10 <sup>-5</sup>				7 G4	17 P			
<b>Benzoato</b>	10 <sup>-4</sup>								
	10 <sup>-5</sup>					0		0	

CONTRATTO G69911/7/GI			
<b>REL. 04</b>			
Fig. 56 di 73	Rev.		
	0		

Tab. 4.5.4 Campione BAT3 (U.F.C./g di suolo), fine processo

Terreno	Dilui zione	1 + H <sub>2</sub> O	2 Steriliz ato	3 + Fertiliz zanti	4 + Pseudo monas G4	5 + P. putida	6 + Rhodo coccus	7+ Acineto bacter	8 + Phanero chaete.
MSM	10 <sup>-6</sup>	91	0	202	223	159	155	172	58
					(1 F)	(5 F)			(4 F)
	10 <sup>-7</sup>	32	0	20	23	22	20	13	31
						(1 F)			
Tryp. soy	10 <sup>-6</sup>	94	0	292	76	133	169	113	60
					(b.stris cianti)*				
	10 <sup>-7</sup>	7	0	31	43	29	30	6	9
									2 lieviti
Violet red	10 <sup>-6</sup>	2	0	16	5	16	4	9	12
	10 <sup>-7</sup>	0	0	0	0	3	2	0	1
Potato acido	10 <sup>-3</sup>	3 M	0	5 M	6 M	2 M	1 M	2M	3 Ph ch
	10 <sup>-6</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0
Potato	10 <sup>-3</sup>								con fluente (2M)
	10 <sup>-6</sup>			32					48
Fluore scence	10 <sup>-6</sup>				1 F	7 F + 1 P			
	10 <sup>-7</sup>			0	1 F				
Benzoato	10 <sup>-3</sup>					0		14 + 9 M	
	10 <sup>-6</sup>					0			
	10 <sup>-7</sup>							0	

Fig. 4.5.1

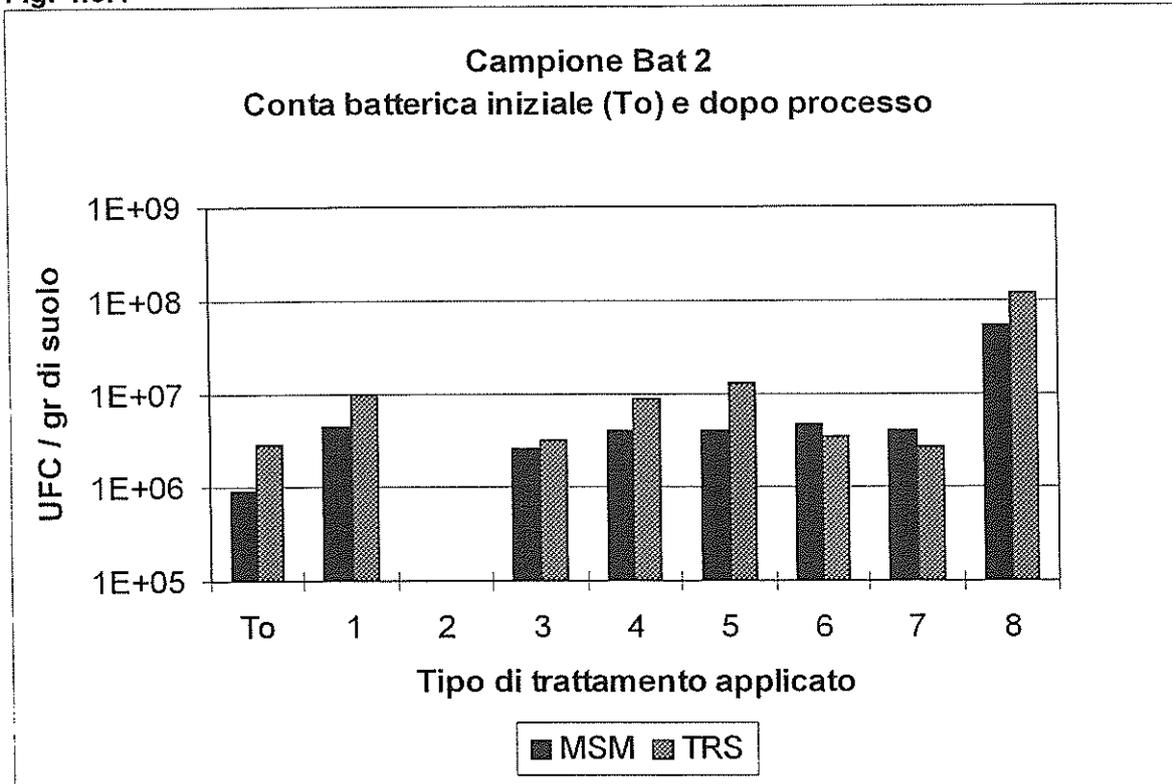
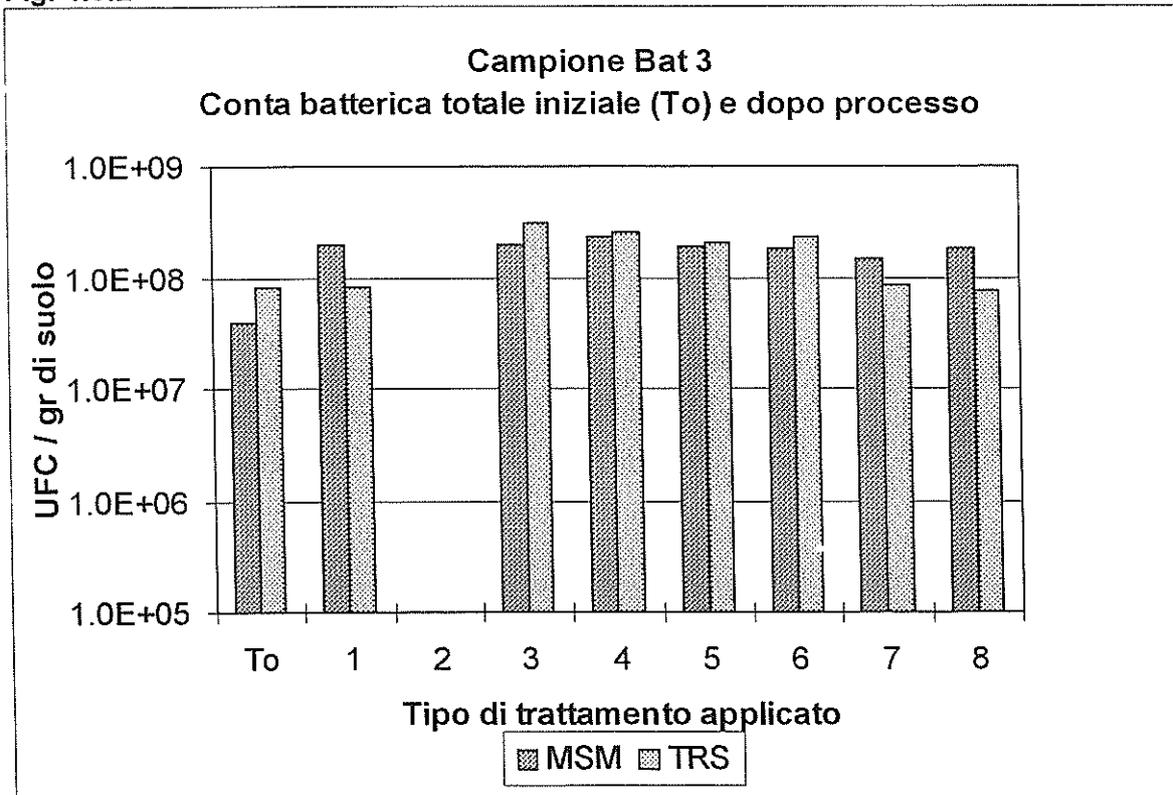


Fig. 4.5.2



CONTRATTO G69911/7/GI			
REL. 04			
Fg. 58 di 73	Rev.		
	0		

I grafici mostrano i valori medi di crescita batterica ottenuti con i terreni non selettivi: **Minimal salts medium agar (MSM)** e **Tryptone soia brodo agarizzato (TRS)**. Fra i terreni complessi è stato scelto quest'ultimo per la notevole carica riscontrata ed il maggior valore nutritivo.

I dati ottenuti risultano dalla media dei valori riportati in tabella per ogni bottiglia roller. Da notare che i coefficienti di diluizione per ogni singolo terreno sono diversi. Per BAT2 sono stati considerati i valori riferiti alle diluizioni su MSM  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e su TRS  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ , per il campione Bat 3 i valori riferiti alle diluizioni su MSM e su TRS  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ .

I valori tra parentesi indicano il numero di ceppi microbici, fra quelli conteggiati, appartenenti alla classe degli Actinomycetes genere Actinomyces (A) e Streptomyces (S).

Per ogni diluizione riportata in tabella, nella riga sottostante al valore della conta batterica, sono indicate le colonie di miceti, se presenti. Inoltre sono indicati ceppi sporigeni, ossia bacilli gram+ formanti endospore (come da osservazione microscopica) e batteri "striscianti" che limitano la crescita in piastra di altri ceppi microbici.

Per quanto riguarda il To, i valori si riferiscono ai campioni analizzati prima del trattamento; anche in questo caso i dati derivano dalla media dei valori riportati nelle tabelle delle conte sui medesimi terreni.

In particolare, per quanto riguarda BAT2 sono stati considerati i valori riscontrati nelle piastre alle diluizioni  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ , per BAT3 alle diluizioni  $10^{-4}$ ,  $10^{-7}$ .

Per completezza vengono riportati anche i valori assoluti delle conte relative al terreno Violet Red Bile Agar, che permette, come già indicato nelle tabelle relative ai terreni, di calcolare la frazione di Gram- presenti rispetto alla flora totale.

### Campione BAT2

Conta batterica totale iniziale (To) e dopo processo  
Tipo di trattamento applicato

	MSM	TRS	Violet
To	9,2E+05	2,8E+06	3,7E+05
1	4,4E+06	1,0E+07	1,6E+05
2	n.r.	n.r.	n.r.
3	2,6E+06	3,2E+06	2,9E+05
4	4,0E+06	9,0E+06	3,0E+05
5	4,1E+06	1,3E+07	4,1E+05
6	4,6E+06	3,4E+06	1,6E+05
7	4,0E+06	2,7E+06	3,4E+05
8	5,4E+07	1,2E+08	9,2E+06

CONTRATTO G69911/7/GI			
REL. 04			
Fg. 59 di 73	Rev.		
	0		

### Campione BAT3

Conta batterica totale iniziale (To) e dopo processo  
Tipo di trattamento applicato

	MSM	TRS	Violet
To	4,0E+07	6,0E+07	3,5E+07
1	2,0E+08	8,2E+07	2,0E+06
2	n.r.	n.r.	n.r.
3	2,0E+08	3,1E+08	1,6E+07
4	2,3E+08	2,5E+08	5,0E+06
5	1,9E+08	2,1E+08	2,3E+07
6	1,8E+08	2,3E+08	1,2E+07
7	1,5E+08	8,6E+07	9,0E+06
8	1,8E+08	7,5E+07	1,1E+07

Gli altri terreni sono stati utilizzati per una valutazione quali-quasi quantitativa della flora microbica, essendo selettivi, come evidenziato in allegato (sezione: terreni utilizzati nel corso della sperimentazione).

Considerazioni numeriche assolute sono valide solo ove si cerchi di conteggiare il numero di colonie ascrivibili ai ceppi addizionati in partenza.

Come già indicato in tabella, dopo la sperimentazione in roller, sono stati reperiti i seguenti ceppi fra quelli inoculati (concentrazione di UFC per grammo di suolo):

	Bat 2	BAT3	Terreni utilizzati ①	
			BAT 2	BAT 3
<b>Phanerochaete chrysosporium</b>	1,1*10 <sup>5</sup>	3*10 <sup>3</sup>	Pot.acido+Pot.	Potato
<b>Pseudomonas putida</b>	1,3*10 <sup>6</sup>	1*10 <sup>6</sup>	TRS+Fluoresc.	Fluorescence
<b>Pseudomonas cepacia G4</b>	4,5*10 <sup>5</sup>	< 10 <sup>6</sup>	MSM+Fluoresc.	

① I terreni indicati sono quelli utilizzati per calcolare il numero più elevato di colonie reperite della specie in oggetto per grammo di suolo .E' stata effettuata la media dei valori nel caso il microorganismo fosse presente su terreni diversi (vedi tabella relazione).

CONTRATTO G69911/7/GI	
REL. 04	
Fg. 60 di 73	Rev.
	0

#### 4.6 DISCUSSIONE DEI DATI

Dall'analisi microbiologica si evince che il campione BAT2 presenta all'origine una flora microbica inferiore di circa un ordine di grandezza rispetto a BAT3 (ved. grafici). Comunque sia la presenza di Proto ed Eumiceti-Attinomiceti, nonché di muffe indica che il terreno conserva un ecosistema equilibrato (vedi tabelle relative).

Sulla base dei dati di analisi in possesso può essere ipotizzata una inibizione da metalli pesanti, in particolare il mercurio; anche la limitata quantità di frazione organica assimilabile può avere funzione inibente. Infatti la quantità totale dei composti organici in BAT2 è bassa (relativamente alle analisi effettuate).

Nel campione BAT2/3 diminuisce la concentrazione di ammine: paratoluidina, 3,4-dicloroanilina, 4-nitroanilina.

Il campione BAT2/4 evidenzia diminuzione della concentrazione di tetracloroetilene. Il campione BAT2/5 mostra la diminuzione della concentrazione di 2,6 diclorofenolo e 4 cloro anilina.

Il campione BAT2/6 evidenzia assenza di cloroformio, ma nel campione tal quale la concentrazione di questo composto era già molto bassa, pertanto non necessariamente il risultato è da attribuirsi all'attività microbica.

Il campione BAT2/7 evidenzia assenza di fenoli.

Il campione BAT2/8 mostra l'incremento di crescita probabilmente associato alla diversa formulazione di terreno additivato, rispetto agli altri campioni e la conseguente degradazione delle ammine: paratoluidina, 3,4-dicloroanilina e 2-cloro-4 nitro anilina e l'IPA benzopirene.

Il campione BAT3/3 evidenzia una carica microbica iniziale notevole, indice di suolo già nutrizionalmente bilanciato.

In generale, relativamente a tutti i campioni della serie BAT3, si evidenzia una diminuzione del contenuto di fenoli, mentre, relativamente a Bat 3/8, si ha inoltre una degradazione di ammine, nitrobenzeni e IPA.

Allo scopo di eseguire la stima della prefattibilità del biorisanamento sulla base della totalità dei risultati, si esegue la sommatoria delle concentrazioni dei singoli componenti classe per classe. (Vedere tabella 4.5.5, Sommatoria)

Per poter valutare i risultati in modo omogeneo, con riferimento specifico all'effetto dell'attività metabolica dei microrganismi, i campioni t=0 e quelli addizionati di sola acqua e i campioni sterilizzati (serie 1 e 2), al termine del processo sono comparati con i campioni 3,4,5,6,7 ed 8.

Nel caso di diminuzione rispetto a questi due campioni di riferimento, l'effetto è verosimilmente da attribuirsi all'azione dei fertilizzanti e dei microrganismi, in quanto le condizioni di agitazione, ossigenazione e temperatura erano identiche.

La tabella 4.5.5 illustra la sommatoria dei contaminati per classi di composti, che è stata utilizzata per calcolare il tasso di biodegradazione percentuale (tab. 4.5.6), relativa al t=0. I dati si riferiscono al peso secco.

CONTRATTO G69911/7/GI			
<b>REL. 04</b>			
Fg. 61 di 73	Rev.		
	0		

**Tab 4.5.5: Sommatoria dei valori relativi a ciascuna classe di composti**

U.M: mg/Kg	t=0	BAT 2/1	BAT 2/2	BAT 2/3	BAT 2/4	BAT 2/5	BAT 2/6	BAT 2/7	BAT 2/8
FENOLI	1	1.4	1.93	n.d.	1.4	1.1	n.d.	N.R	n.d.
AMMINE	10.2	6.4	7	4.46	n.d.	5.35	n.d.	n.d.	4.09
NITRO-BENZENI	0.3	0.5	0.6	n.d.	n.d.	n.d.	0.3	0.3	0.12
IDROCARB. POLI. AROM	0.5	5.5	6.3	7.8	6.2	n.d.	n.d.	n.d.	3.6
COMP. ALOGENATI ALIFATICI	3.44	0.67	0.59	0.46	0.16	n.d.	0.46	n.d.	n.d.

U.M: mg/Kg	t=0	BAT 3/1	BAT 3/2	BAT 3/3	BAT 3/4	BAT 3/5	BAT 3/6	BAT 3/7	BAT 3/8
FENOLI	10012	1007	2516	n.d.	776	554	n.d.	1682	n.d.
AMMINE	34.3	17.4	23.2	17	n.d.	18.1	n.d.	n.d.	11
NITRO-BENZENI	15.7	11.3	15.8	n.d.	n.d.	n.d.	11.8	8.6	1.3
IDROCARB. POLI. AROM	1051	1020	1500	1213	1032	n.d.	n.d.	n.d.	475.4
COMP. ALOGENATI ALIFATICI	1.89	0.38	1.54	1.14	1.02	n.d.	1.51	n.d.	n.d.

**Tab. 4.5.6: Tasso di biodegradazione in rapporto al t=0**

	BAT 2/1	BAT 2/2	BAT 2/3	BAT 2/4	BAT 2/5	BAT 2/6	BAT 2/7	BAT 2/8
FENOLI	0%	0%	n.d.	0%	0%	n.d.	100%	n.d.
AMMINE	37%	31%	56%	n.d.	47%	n.d.	n.d.	60%
NITRO-BENZENI	0%	0%	n.d.	n.d.	n.d.	0%	0%	60%
IDROCARB. POLI. AROM.	0%	0%	0%	0%	n.d.	n.d.	n.d.	0%
COMP. ALOGENATI ALIFATICI	80%	83%	87%	95%	n.d.	87%	n.d.	n.d.

	BAT 3/1	BAT 3/2	BAT 3/3	BAT 3/4	BAT 3/5	BAT 3/6	BAT 3/7	BAT 3/8
FENOLI	90%	75%	n.d.	92%	94%	n.d.	83%	n.d.
AMMINE	49%	32%	50%	n.d.	47%	n.d.	n.d.	68%
NITRO-BENZENI	28%	0%	n.d.	n.d.	n.d.	25%	45%	92%
IDROCARB. POLI. AROM.	0%	0%	0%	0%	n.d.	n.d.	n.d.	55%
COMP. ALOGENATI ALIFATICI	80%	18%	40%	46%	n.d.	20%	n.d.	n.d.

CONTRATTO G69911/7/GI	
<b>REL. 04</b>	
Fg. 62 di 73	Rev.
	0

Dall'esame della tabella Sommatoria si può osservare, relativamente alla serie BAT2, impiegando come riferimento il campione BAT2(t=0) e come campione test le altre condizioni, il seguente effetto, con percentuale approssimata, per ciascuna classe di composti:

BAT2/3 diminuzione del contenuto di Ammine intorno al 50%.

BAT2/4 diminuzione del contenuto di Idrocarburi Alifatici compresa tra il 90-95%

BAT2/5 diminuzione del contenuto di Ammine del 47%.

BAT2/6 diminuzione del contenuto di Alogenuri alifatici di circa 90%

Bat 2/7 la scomparsa dei Fenoli.

BAT2/8 diminuzione del contenuto di Nitrobenzeni maggiore del 50%, la diminuzione del contenuto di Ammine del 50%.

Relativamente alla serie BAT3 è stato osservato, impiegando come riferimento il campione t=0 e come campione test le altre condizioni, il seguente effetto, con percentuale approssimata, per ciascuna classe di composti:

BAT3/3 diminuzione del contenuto di Ammine compresa del 50% e di Alogenati Alifatici del 40%.

BAT3/4 diminuzione del contenuto di Fenoli del 90 e di Alogenati Alifatici del 40%.

BAT3/5 diminuzione del contenuto di Fenoli del 90% e di Ammine del 40%

BAT3/6 nessun effetto evidente.

BAT3/7 diminuzione del contenuto di Nitrobenzeni e Ammine

BAT3/8 diminuzione del contenuto di Nitrobenzeni maggiore del 90%, la diminuzione del contenuto di Ammine compresa tra 50-60%, la diminuzione del contenuto di IPA compresa tra 50-60%.

Bisogna notare che in molti casi un abbattimento notevole si è anche avuto nel campione tal quale, senza ceppi aggiunti. Ciò evidenzia la buona capacità degradatrice della flora autoctona, bene adattata alla presenza dei contaminati.

CONTRATTO G699117/G			
REL. 04			
Fg. 63 di 73	Rev.		
	0		

#### 4.7. CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

A conclusione di questo studio di prefattibilità, si può considerare che il processo di biorisanamento considerandone la limitata durata del test di trattabilità, non abbia fornito macroscopiche evidenze di risultati.

I valori osservati al termine della prova sono generalmente diminuiti, seppur con le limitazioni ed incertezze discusse precedentemente.

La flora autoctona, presente in quantità notevoli, se si considera la potenziale tossicità dei composti presenti, è in grado di degradare solamente alcuni dei contaminanti.

In generale una certa spontaneità degradativa è stata riscontrata. L'aggiunta di ceppi noti per le capacità degradative di composti xenobiotici, potrebbe forse favorire la biodegradazione.

Si ricorda che l'indagine di caratterizzazione ha mostrato una notevole disomogeneità ed eteropia delle distribuzioni quali/quantitative dei materiali presenti nella discarica di Pian-Rocchetta (cfr. Rel. 03).

Considerando poi le già citate difficoltà di cernita e selezione dei materiali è comunque certamente sconsigliabile l'implementazione operativa di trattamenti di tipo biologico ex-situ come biopile, land farming ecc.. a livello di ammasso globale dei rifiuti.

CONTRATTO G69911/7/GI			
REL. 04			
Fig. 64 di 73	Rev.		
	0		

### RICERCA BIBLIOGRAFICA

La ricerca bibliografica consiste in una raccolta di articoli e abstract ordinati per classi di composti, con indicazione dei microrganismi degradatori relativi. Di seguito vengono indicate, con il numero di riferimento bibliografico, le citazioni riportate nel capitolo 4.1.

COMPOSTI	N° bibliografico/ Autore	rif. MICRORGANISMI CITATI
COLORANTI AZO-SOLFONATI	9	Phanerochaete chrysosporium
	14	Phanerochaete chrysosporium Streptomyces chromofuscus
	15	Phanerochaete chrysosporium Streptomyces spp.
IDROCARBURI AROMATICI	POLICICLICI 4	Phanerochaete chrysosporium
		Trametes versicolor Pleurotus ostreatus
		6 popolazione microbica autoctona
		8 Phanerochaete chrysosporium
	10	Phanerochaete chrysosporium Cunninghamella elegans
	16	Phanerochaete chrysosporium
	17	Phanerochaete chrysosporium Phanerochaete sordida
	18	Pseudomonas stutzeri
	19	Rhodococcus sp. strain Sm-1 e Rhodococcus sp. strain Wrink
	25	Pseudomonas putida Rhodococcus sp.

CONTRATTO G6991 1/7/GI			
<b>REL. 04</b>			
Fg. 65 di 73	Rev.		
	0		

COMPOSTI	N° bibliografico/ Autore	Rif. MICRORGANISMI CITATI
IDROCARBURI ALOGENATI	ALIFATICI 1	Pseudomonas fluorescens
		Pseudomomas G4
		Pseudomonas putida
	19	Rhodococcus sp. strain Sm-1 e
		Rhodococcus sp. strain Wrink
		Rhodococcus rhodochrous
		Mycobacterium aurum
		Nitrosomonas europaea
		Pseudomomas putida
		Pseudomomas fluorescens
IDROCARBURI ALOGENATI	21	Pseudomomas mendocina
	23	batteri metanotrofi - ossidanti il propano
	20	Pseudomomas G4
		Pseudomomas G4
		Rhodococcus strain Sm-1
IDROCARBURI ALOGENATI	AROMATICI 4	Pseudomonas sp.
		Alcaligenes eutrophus
	12	Pseudomonas sp.
FENOLI	4	Penicillium sp.
	7	Rhodococcus chlorophenolicus
	11	Pseudomomas putida
	23	Pseudomomas G4
	13	Acinetobacter calcoaceticus
AMMINE	<b>Autore</b>	
	13	Pseudomomas sp.
		Pseudomomas putida
		Acinetobacter calcoaceticus
		Rhodococcus sp.
		Moraxella sp.
	14	Phanerochaete chrysosporium

CONTRATTO G69911/7/GI			
REL. 04			
Fg. 66 di 73	Rev.		
	0		

COMPOSTI	N°	Rif.	MICROORGANISMI CITATI
		bibliografico/	
MONOALCHILBENZENI/ BENZOATO	5		Pseudomonas putida
	11		Pseudomonas putida
	19		Rhodococcus sp.
	21		Pseudomonas G4
	22		Pseudomonas G4
	24		Phanerochaete chrysosporium
	2		Acinetobacter
	11		Pseudomonas putida
IDROCARBURI RAMIFICATI	LINEARI	E 3	Acinetobacter
			Alcaligenes odorans

CONTRATTO G699117/GI	
REL. 04	
Fg. 67 di 73	Rev.
	0

## Bibliografia

- Vandenberghand Kunka**  
**Appl. Env. Micr. Vol.54, 1988. Pag 2578-2579**  
**Metabolism Of Volatile Chlorinated Aliphatic Hydrocarbons By *Ps. fluorescens***  
Un ceppo di *Ps. fluorescens.*, isolato dal suolo e dall'acqua contaminati da vari idrocarburi alifatici clorurati, è in grado di metabolizzare anche il tricloroetilene
- Hao and Chang**  
**Biotechnology and Bioengineering. Vol.29, 1987. Pag 819-831**  
**Kinetics Of Growth and Phosphate Uptake in Pure Culture Studies of *Acinetobacter Species***  
*Acinetobacter* riveste un importante ruolo nell'ecologia dei fanghi attivi, in quanto può produrre un polisaccaride extracellulare e degradare una varietà di composti comprendenti acidi grassi a corta catena, alcani ad alto peso molecolare e benzoati aromatici.
- Wang and Wang**  
**Biotechnology and Bioengineering. Vol.36, 1990. Pag 402-410**  
**Mechanism For Biopolymer Accumulation in Immobilized *Acinetobacter calcoaceticus* System**  
Il biopolimero prodotto da *Acinetobacter* è altresì conosciuto per legarsi fortemente alla superficie delle goccioline idrocarburiche.
- Fritsche**  
**Proceedings of the 6th European Congress Of Biotechnology, 1994. Pag 1213-1221**  
**The potential of microorganisms for bioremediation**  
I microrganismi sono in grado di degradare composti idrocarburi alifatici saturi ed insaturi, benzene, toluene, xilene. Una ampia varietà di batteri possiede queste capacità metaboliche: specie di *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter* e *Corynebacterium*, *Rhodococcus*. Sono stati isolati alcuni funghi e lieviti con lo stesso tipo di attività: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Candida*.
- Ray and Loser**  
**Acta Biotechnol. Vol 14, 1994. Pag 243-250**  
**Aerobic Degradation Of Toluene in a Closed Chemostat with and without a Head Space Outlet**  
Coltivazione di *Pseudomonas* con toluene come substrato. Gli idrocarburi aromatici benzene, toluene e xileni sono relativamente facili da degradare biologicamente in condizioni aerobiche.
- Weissenfels et al.**  
**Proc. 5th Eur. Con. Biotechnology Vol.2. Pag 931-934**  
**Rapid Testing System for Assessing the Suitability of the Biological Reclamation for PAH-contaminated Soil.**  
Biodegradazione di IPA con popolazione microbica autoctona dopo quattro settimane
- Middeldorp et al**  
**Proc. 5th Eur. Con. Biotechnology Vol.2. Pag 927-930**  
**Biodegradation and Transformation of Polychlorinated Phenols In Soil.**  
Degradazione di policlorurati a livello di laboratorio e in campo con *Rhodococcus*.
- Brodkorb and Legge**  
**Appl. Environ. Microbiol. Vol 58, 1992. Pag. 3117-3121**  
**Enhanced Biodegradation Of Phenanthrene in Oil Tar-Contaminated Soils Supplemented with *Phanerochaete chrysosporium*.**  
I sistemi enzimatici esocellulari del *Phanerochaete chrysosporium* possono degradare una varietà di composti, tra cui gli IPA ed avere azione sinergica con quella dei batteri
- Cripps et al.**  
**Appl. Environ. Microbiol. Vol 56, 1990. Pag. 1114-1118**

CONTRATTO G69911/7/GI	
REL. 04	
Fg. 68 di 73	Rev.
	0

**Biodegradation Of Azo And Heterocyclic Dyes By *Phanerochaete chrysosporium***

Si dimostra la biodegradazione di coloranti azoici tramite il fungo *Phanerochaete chrysosporium*.

10. **Dhawale et al.**  
**Appl. Environ. Microbiol. Vol 58, 1992. Pag. 3000-3006**  
**Degradation Of Phenanthrene By *Phanerochaete chrysosporium* Occurs under Ligninolytic as well as Nonligninolytic Conditions**  
La degradazione del fenantrene tramite funghi è stata descritta, inoltre la mineralizzazione di questa sostanza è stata osservata in tutte le fasi metaboliche del ciclo cellulare, quindi sia in fase ligninolitica che non ligninolitica.
11. **Eaton and Timmis.**  
**Journal Bacteriol. Vol 168, 1986. Pag.123-131**  
**Characterization of a Plasmid-Specified Pathway for Catabolism of Isopropylbenzene in *Pseudomonas putida* RE204**  
Il metabolismo batterico del toluene avviene secondo due differenti vie metaboliche: una codificata da un plasmide è iniziata tramite una ossidazione del gruppo metilico che fornisce benzoato.
12. **Haigler and Spain**  
**Appl. Environ. Microbiol. Vol 55, 1989. Pag. 372-379**  
**Degradation of p-Chlorotoluene by a Mutant of *Pseudomonas* sp. Strain JS6**  
Batteri che crescono su clorotoluene e altri cloro e diclorotolueni sono stati descritti. *Pseudomonas* sp. cresce su clorobenzene o paradiclorobenzene.
13. **Konopka et al.**  
**Appl. Environ. Microbiol. Vol 55, 1989. Pag. 385-389**  
**Characterization of a *Pseudomonas* sp. Capable Of Aniline Degradation in the Presence of Secondary Carbon Sources**  
Sono stati isolati alcuni microrganismi che degradano l'anilina o le aniline clorate. Il catabolismo dell'anilina è stato indotto tramite l'esposizione all'anilina.
14. **Paszczynski et al.**  
**Appl. Environ. Microbiol. Vol 58, 1992. Pag. 3598-3604**  
**Mineralization of Sulfonated Azo Dyes and Sulfanilic Acid by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus***  
Viene dimostrato che i funghi lignocellulolitici possono essere utilizzati per la biodegradazione dei coloranti azoici anionici.
15. **Pasti-Grigsby et al.**  
**Appl. Environ. Microbiol. Vol 58, 1992. Pag. 3605-3613**  
**Influence of Aromatic Substitution Patterns on Azo Dye Degradability by *Streptomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*.**  
E' stata studiata la specificità di attacco enzimatico su 22 diversi coloranti da parte di specie di *Streptomyces* e di *Phanerochaete chrysosporium*.
16. **Bogan et al.**  
**Appl. Environ. Microbiol. Vol 62, 1996. Pag. 3697-3703**  
**Expression of *lip* Genes during Growth and Oxidation Of Anthracene by *Phanerochaete chrysosporium*.**  
La trasformazione dell'antracene avveniva in un periodo di 25 gg.
17. **Bogan et al.**  
**Appl. Environ. Microbiol. Vol 62, 1996. Pag. 2381-2386**  
**Manganese Peroxidase mRNA and Enzyme Activity Levels during Bioremediation of Polinuclear Aromatic Hydrocarbon-Contaminated Soil with *Phanerochaete chrysosporium*.**  
E' stata esaminata l'espressione dei geni *mnp* durante un esperimento di bioremediation su scala di laboratorio. *Phanerochaete chrysosporium* coltivato nel suolo causa la trasformazione del fluorene e la scomparsa del crisene durante la prima fase di colonizzazione.
18. **Grimberg et al.**  
**Appl. Environ. Microbiol. Vol 62, 1996. Pag. 2387-2392**

CONTRATTO G69911/7/GI	
REL. 04	
Fg. 69 di 73	Rev.
	0

**Quantifying the Biodegradation of Phenantrene by *Pseudomonas stutzeri* P16 in the Presence of a Nonionic Surfactant**

La bassa solubilità dei IPA in acqua si ritiene che limiti la loro disponibilità ai microrganismi. E' stato suggerito l'impiego di surfattanti per aumentare la biodisponibilità dei composti idrofobici.

19. **Malachowsky *et al.***

**Appl. Environ. Microbiol. Vol 60, 1994. Pag. 542-548**

**Aerobic Mineralization of Trichloroethylene, Vinyl Chloride, and Aromatic Compounds by *Rhodococcus* Species**

Questo studio dimostra la capacità di ceppi di *Rhodococcus* (tra cui il ceppo Sm-1) di degradare una miscela di idrocarburi clorurati aromatici ed alifatici.

20. **Phelp *et al.***

**Appl. Environ. Microbiol. Vol 57, 1991. Pag. 1252-1254**

**Aerobic Mineralization of Vinyl chloride by a Bacterium of the Order Actinomycetales.**

Degradazione di cloroderivati con l'impiego di *Rhodococcus* (ceppo Sm-1)

21. **Mars *et al.***

**Appl. Environ. Microbiol. Vol 62, 1996. Pag. 886-891**

**Degradation of Toluene and Trichloroethylene by *Burkholderia cepacia* G4 in Growth-Limited Fed-Batch Culture**

Codegradazione di toluene e triclorobenzene mediante *Burkholderia cepacia* G4

22. **Shields *et al.***

**Appl. Environ. Microbiol. Vol 61, 1995. Pag. 1352-1356**

**TOM, a New Aromatic Degradative Plasmid from *Burkholderia cepacia* G4.**

Nuove capacità metaboliche in funzione della degradazione del toluene

23. **Krumme *et al.***

**Appl. Environ. Microbiol. Vol 59, 1993. Pag. 2746-2749**

**Degradation of Trichloroethylene by *Pseudomonas cepacia* G4 and the Constitutive Mutant Strain G4 5223 PR1 in Aquifer Microcosms**

*Pseudomonas cepacia* G4 degrada il tricloroetilene con fenolo come cometabolita.

24. **Yadav and Reddy.**

**Appl. Environ. Microbiol. Vol 59, 1993. Pag. 756-762**

**Degradation of Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylenes (BTEX) by the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium***

L'organismo degrada i composti, sia da soli che miscelati, fino a CO<sub>2</sub>.

25. **Allen *et al.***

**Appl. Environ. Microbiol. Vol 63, 1997. Pag. 151-155**

**Metabolism of Naphthalene, 1-Naphthol, Indene, and Indole by *Rhodococcus* sp. Strain NCIMB 12038**

La biochimica della degradazione del naftalene in questo ceppo è identica a quella del *Ps. putida*.

CONTRATTO G69911/7/GI			
REL. 04			
Fg. 70 di 73	Rev.		
	0		

## ALLEGATI

**Terreni utilizzati nel corso della sperimentazione** (Modalità di sterilizzazione: 121° C per 15 minuti)

**1 - POTATO AGAR:** terreno indicato per la ricerca ed il conteggio di lieviti e muffe, **non selettivo**.

Terreno	<b>Potato Agar</b>
pH	<b>5.6±0.2</b>
Componenti	Concentrazione g/L
patate (infuso da)	200
Bacto - destrosio	20
Bacto - Agar	15

**2 - POTATO AGAR ACIDO:** Terreno indicato per la ricerca ed il conteggio di lieviti e muffe, **selettivo**.

Terreno	<b>Potato Agar Acido</b>	Commenti
pH	<b>3,5±0.1</b>	vengono addizionati, dopo sterilizzazione 16 ml / L di una soluz di acido tartarico al 10%
Componenti	Concentrazione g/L	
Infusione di patate	200	
Bacto - destrosio	20	
Bacto - Agar	15	

**3 - TRIPTONE SOIA BRODO AGARIZZATO (TRYP.SOY):** Terreno di uso generale **altamente nutritivo** indicato per la ricerca ed il conteggio di microrganismi fastidiosi e non, compresi i funghi, conforme US P.

Terreno	<b>Triptone soia brodo agarizzat (TRYP.SOY)</b>	Commenti
pH	<b>7.3 ± 0.2</b>	correggere con NaOH 1M
Componenti	Concentrazione g/L	
triptone	17	
digerito papainico di farina di soia	3	
sodio cloruro	5	
potassio fosfato monoacido	2.5	
destrosio	2.5	
Bacto - Agar	15	

**4 - PLATE COUNT AGAR STANDARD (PCA):** Terreno indicato per il conteggio di batteri, secondo gli standard APHA.

Terreno	<b>Plate count agar standard (PCA)</b>	Commenti
---------	--	----------

CONTRATTO G69911/7/GI			
REL. 04			
Fg. 71 di 73	Rev.		
	0		

pH	7,0±0.2	corretto con NaOH 0,1 N
Componenti	Concentrazione g/L	
estratto di lievito	2.5	
digerito pancreatico di caseina	5	
destrosio	1	
Bacto - Agar	15	

**5 - NUTRIENT AGAR:** Terreno indicato per microrganismi non troppo esigenti dal punto di vista nutrizionale, secondo gli standard APHA.

Terreno	Nutrient agar	Commenti
pH	7,4±0.1	corretto con NaOH 0,1 N
Componenti	Concentrazione g/L	
estratto di carne	1	
estratto di lievito	2	
peptone	5	
sodio cloruro	5	
Bacto - Agar	15	

**6 - VIOLET RED BILE AGAR Modificato:** Terreno indicato per la ricerca ed il conteggio di batteri Gram -, selettivo per la presenza di sali biliari e cristal violetto, variante del terreno originale solido di MacConkey.

Terreno	Violet Red Bile Agar Modificato
pH	7,2±0.2
Componenti	Concentrazione g/L
peptone	20
estratto di lievito	3
lattosio	10
sali biliari N° 2	1.5
sodio cloruro	5
cristal violetto	0.001
rosso neutro	0.05
Agar	15

**7 - MINIMAL SALTS MEDIUM AGAR (MSM):** Terreno a composizione minerale per il conteggio non selettivo di microrganismi tellurici.

Terreno	Minimal Salts Medium Agar (MSM)
pH	7±0.1
Componenti	Concentrazione g/L
NH <sub>4</sub> Cl	0,5
estratto di lievito	0,1
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,67
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.340
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0.112
CaCl <sub>2</sub>	0.014
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0.005
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0.0025

CONTRATTO G699117/GI			
REL. 04			
Fg. 72 di 73	Rev.		
	0		

FeCl3	0.00013
acetato di sodio	1.5
Agar nobile	15

**8 - FLUORESCENCE AGAR:** Questo terreno è una modifica del terreno di King et al. formulato per la dimostrazione del pigmento fluoresceina prodotto da molti ceppi di *Pseudomonas*. Le piastre devono essere incubate per almeno 3 giorni ed osservate alla luce normale e con lampada U V ( 366 nm ). Le colonie che hanno prodotto fluoresceina, quando osservate alla luce normale, possono essere non colorate o tendenti al giallo, quando osservate sotto luce ultravioletta sono giallo fluorescenti.

I microrganismi addizionati ai campioni di terra , *Ps. putida* e *Ps. G4*, producono tale pigmento.

Terreno	Fluorescence Agar	Commenti
pH	7.2±0.2	
Componenti	Concentrazione g/L	
NZ case plus	12	
estratto di carne	8	
K2HPO4	1.5	
glicerina	10 ml	
MgSO4 x 7 H2O	3	
Agar	12	

**9 - BENZOATE MEDIUM:** Terreno per la coltivazione di microrganismi in grado di usare il benzoato come fonte di carbonio primaria.

Terreno	Benzoate Medium	Commenti
pH	7.1±0.1	
Componenti	Concentrazione g/L	
estratto di lievito	0.5	
(NH4)2HPO4	3	
KH2PO4	1.2	
sodio cloruro	5	
MgSO4 x 7 H2O	0.2	
sodio benzoato	3	(sterilizzato per filtrazione)
Agar nobile	20	

**10 - TERRENI UTILIZZATI COME FERTILIZZANTI NELLE ROLLER BOTTLES :** Terreno minimo a formulazione minerale, per il supporto della crescita di microrganismi residenti, additivato a tutti i campioni.

Terreno	Medium Minimo per Roller Bottles	Commenti
pH	7.0±0.1	Corretto con NaOH
Componenti	concentrazione g/L	
NH4Cl	0.5	
Na2HPO4 x 12 H2O	0.89	
KH2PO4	0.34	
estratto di lievito	0.1	
KNO3	0.505	
MgSO4 x 7 H2O	0.112	
CaCl2	0.014	
ZnSO4 x 7H2O	0.005	
Na2MoO4	0.0025	
FeCl3 x 6 H2O	0.00022	
CuSO4 x 5 H2O	0.0002	

CONTRATTO G69911/7/GI			
REL. 04			
Fig. 73 di 73	Rev.		
	0		

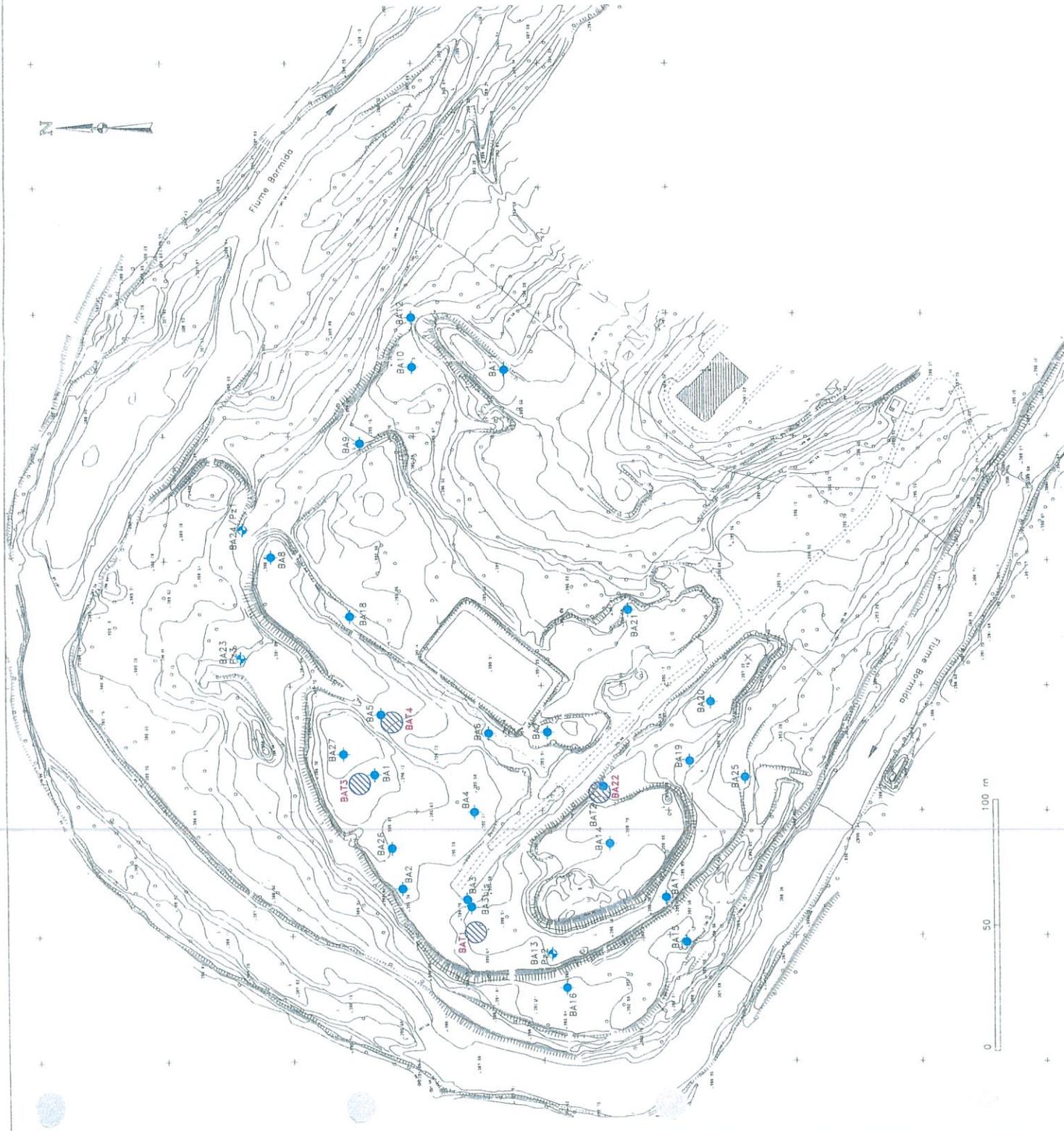
MnSO<sub>4</sub> x 4 H<sub>2</sub>O                      0.00026  
CoCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O                      0.0005

**11 - MEDIUM** ADDITIVATO AI CAMPIONI **BAT 2/8** E **BAT 3/8**: Terreno per *Phanerochaete Chrysosporium* a basso contenuto di azoto, per favorire l'espressione dell'attività ligninolitica, necessaria alla degradazione dei composti xenobiotici dei campioni di suolo. (Vedi nota bibliogr. Cripps et al. 1990).

Terreno	<b>Low Nitrogen Basal III Medium</b>	Commenti
pH	<b>5</b>	Componenti sciolti in sodio acetato buffer 10 mM

Componenti	Concentrazione g/L
glucosio	10
ammonio tartrato	0.22
tiamina	0.001
3- 4 dimetossibenzilalcol	0.25
tween 80	0.5

**FIGURE**



- Sondaggi BASI  
BA10  
BA24/Pz1
- Piezometri BASI  
BA8  
BA18  
BA23  
BA27  
BA1  
BA25  
BA2  
BA4  
BA5  
BA3  
BA15  
BA16  
BA13  
BA14  
BA17  
BA19  
BA20  
BA21  
BA22  
BA23  
BA24/Pz1  
BA27  
BA28  
BA29  
BA30  
BA31  
BA32  
BA33  
BA34  
BA35  
BA36  
BA37  
BA38  
BA39  
BA40  
BA41  
BA42  
BA43  
BA44  
BA45  
BA46  
BA47  
BA48  
BA49  
BA50  
BA51  
BA52  
BA53  
BA54  
BA55  
BA56  
BA57  
BA58  
BA59  
BA60  
BA61  
BA62  
BA63  
BA64  
BA65  
BA66  
BA67  
BA68  
BA69  
BA70  
BA71  
BA72  
BA73  
BA74  
BA75  
BA76  
BA77  
BA78  
BA79  
BA80  
BA81  
BA82  
BA83  
BA84  
BA85  
BA86  
BA87  
BA88  
BA89  
BA90  
BA91  
BA92  
BA93  
BA94  
BA95  
BA96  
BA97  
BA98  
BA99  
BA100
- Punto di prelievo campione per test di trattabilità  
BAT3

Consorzio B.A.S.I. <b>Ambiente - Aquifer</b>	C. G699117/GI
ACNA C.O. Discarica Pian Rocchetta	Fig. 1 REL/04
Ubicazione punti di prelievo campioni per test di trattabilità	
Giugno 1997	



RAT 2

MAG.97

FOTO 1



RAT 2

MAG.97

FOTO 2



FOTO 3



FOTO 4



FOTO 5



FOTO 6

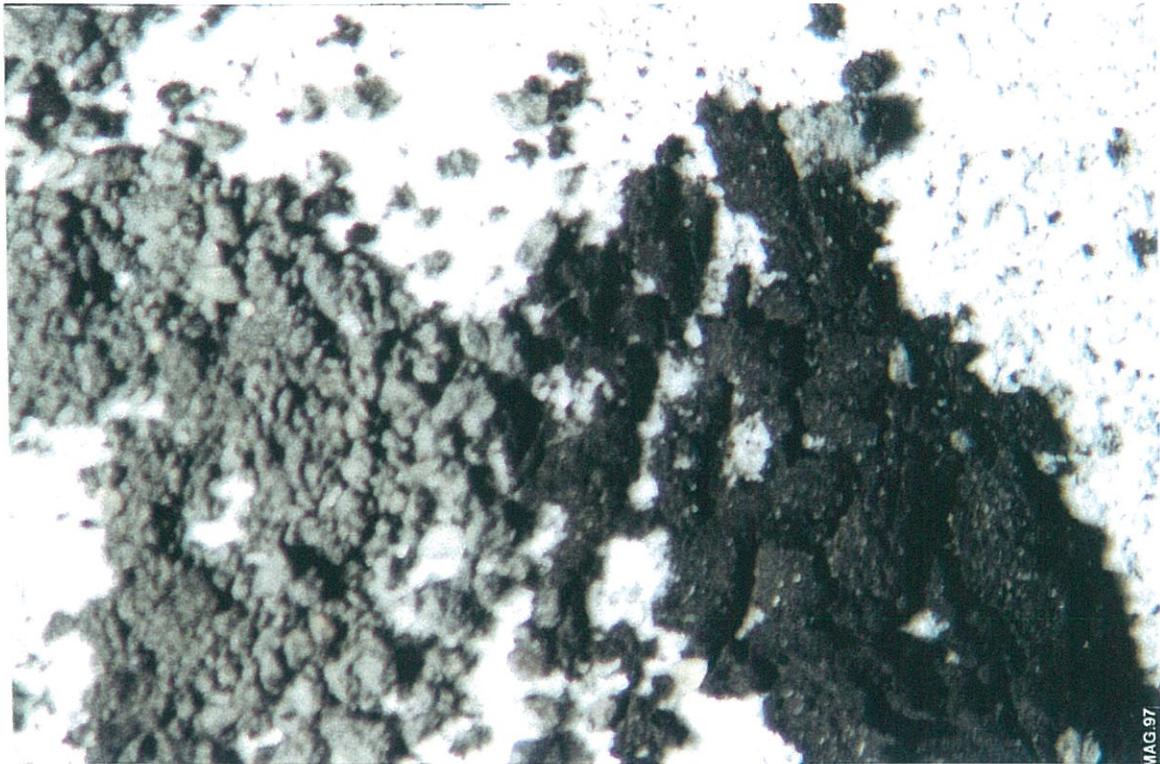


FOTO 7

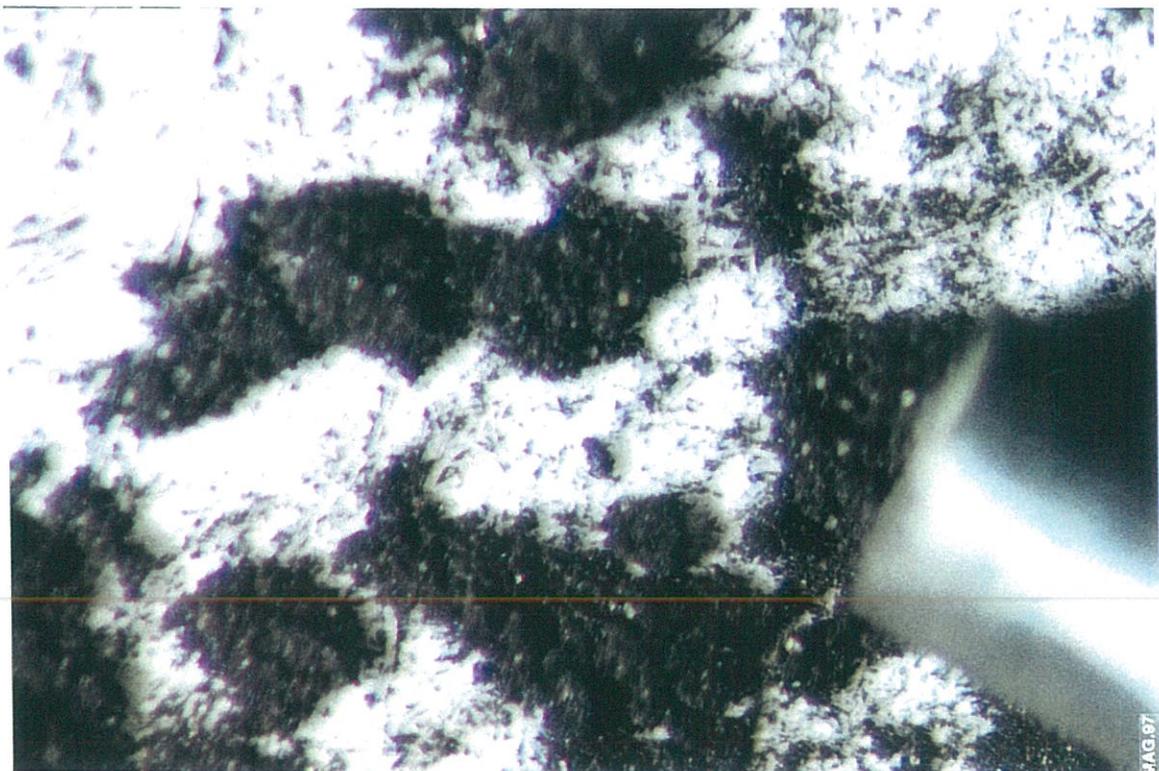


FOTO 7a

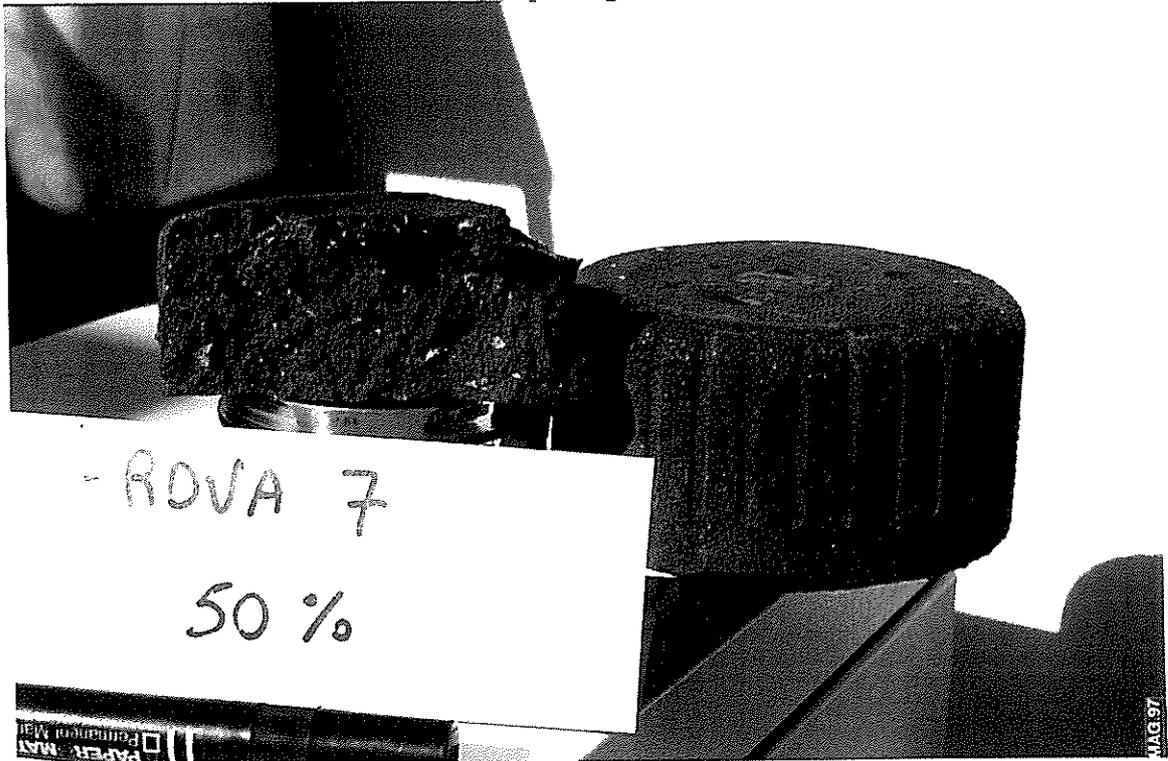


FOTO 8