

POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

**Corso di Laurea Magistrale
in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili**

Tesi di Laurea Magistrale

Ottimizzazione delle condizioni chimico-fisiche di
un processo di bonifica a supporto del
monitoraggio geofisico



Relatori

Prof.ssa Fulvia Chiampo

Prof. Alberto Godio

Candidata

Carla Maria Raffa

Luglio 2019

Indice

1. Introduzione.....	1
1.1 Tecniche di bonifica e di monitoraggio di siti contaminati	1
1.2 Scopo del lavoro di tesi	3
1.2.1 Monitoraggio del processo di biostimolazione	3
1.2.2 Ottimizzazione delle condizioni chimico-fisiche adeguate al processo di biostimolazione	3
1.3 Struttura del lavoro di tesi	4
2. Materiali e Metodi.....	5
2.1 Tipi di materiali utilizzati e proprietà chimico-fisiche	5
2.1.1 Suolo.....	5
2.1.2 Microrganismi	6
2.1.3 Gasolio	6
2.1.4 Soluzione nutritiva	6
2.2 Prove di biodegradazione	8
2.2.1 Microcosmi con 800 g di terreno	8
2.2.2 Microcosmi con 200 g di terreno	10
2.2.3 Mesocosmi con 3400 g di terreno	11
2.3 Metodi analitici.....	13
2.3.1 Analisi respirometrica	13
2.3.2 Analisi dell'attività microbica tramite l'idrolisi del diacetato di fluoresceina... ..	13
2.3.3 Estrazione degli idrocarburi	15
2.3.4 Analisi degli idrocarburi residui tramite il gascromatografo	15
2.3.5 Campionamento del terreno	16
2.3.6 Analisi della carica microbica	19
2.3.7 Cinetica di degradazione degli idrocarburi	19
2.3.8 Analisi al microscopio elettronico a scansione (SEM)	20
2.4 Analisi fattoriale	21
2.4.1 Analisi di regressione a due vie e superficie di risposta (RSM)	21
2.4.2 Analisi della varianza a due vie (ANOVA)	21
2.5 Misure geofisiche	23
2.5.1 Sonda geofisica	23

2.5.2	Grandezze misurate dalla sonda.....	25
3.	Risultati e discussione	29
3.1	Analisi respirometrica.....	29
3.1.1	Microcosmi con 800 g di terreno	29
3.1.2	Microcosmi con 200 g di terreno	32
3.1.3	Mesocosmi con 3400 g di terreno	36
3.2	Analisi dell'attività microbica	37
3.2.1	Microcosmi con 800 g di terreno	37
3.2.2	Microcosmi con 200 g di terreno	39
3.2.3	Mesocosmi con 3400 g di terreno	44
3.3	Rimozione degli idrocarburi.....	46
3.3.1	Microcosmi con 800 g di terreno	48
3.3.2	Microcosmi con 200 g di terreno	50
3.3.3	Mesocosmi con 3400 g di terreno	52
3.4	Cinetica di degradazione	55
3.5	Analisi fattoriale	57
3.5.1	Analisi della varianza (ANOVA) e superficie di risposta (RMS) per la percentuale di rimozione del diesel	57
3.5.2	Analisi della varianza (ANOVA) e superficie di risposta (RMS) per la concentrazione di fluoresceina prodotta.....	60
3.6	Misure geofisiche	63
3.7	Analisi della carica microbica	66
3.8	Analisi al microscopio elettronico a scansione (SEM).....	69
3.8.1	Microcosmo con 800 g di terreno	69
3.8.2	Mesocosmi con 3400 g di terreno	70
4.	Conclusioni.....	73
	Microcosmi con 800 g di terreno	73
	Microcosmi con 200 g di terreno	73
	Mesocosmi con 3400 g di terreno	74
	Bibliografia	76
	Ringraziamenti	78

1. Introduzione

1.1 Tecniche di bonifica e di monitoraggio di siti contaminati

Una delle principali problematiche ambientali degli ultimi anni è l'inquinamento del suolo. Per fronteggiare questo problema si cerca di sviluppare tecnologie efficaci per il trattamento dei siti contaminati.

La contaminazione del terreno può essere causata da: fonti dirette di origine agricola e industriale (concimazioni minerali e organiche, somministrazione di fitofarmaci, attività legate alla gestione dei rifiuti e ai processi industriali) e fonti indirette (fall-out atmosferico, acque di irrigazione contaminate), che portano all'alterazione chimico-fisica dell'ambiente.

Secondo una stima fatta in Europa, alcuni degli inquinanti presenti nei siti contaminati sono: metalli pesanti (37.3%); oli minerali (33.7%); idrocarburi aromatici policiclici (PAH) (13.3%); idrocarburi aromatici (BTEX) (6%); fenoli (3.6%); idrocarburi clorurati (CHC) (2.4%); cianidi (0.1%) e altri (3.6%) (van Liedekerke *et al.*, 2014).

Il documento legislativo italiano che sancisce le norme sulla tutela ambientale è il *D.Lgs. 3 aprile 2006, n. 152*, entrato in vigore il 29 aprile 2006 ed in particolare nel Titolo V della Parte Quarta sono delineate le norme relative alla bonifica dei siti contaminati.

Il decreto definisce:

- sito contaminato: *“un sito nel quale i valori delle concentrazioni soglia di rischio (CSR) risultano superati”*;
- concentrazioni soglia di rischio (CSR): *“i livelli di contaminazione delle matrici ambientali, da determinare caso per caso con l'applicazione della procedura di analisi di rischio [...], il cui superamento richiede la messa in sicurezza e la bonifica. I livelli di concentrazione così definiti costituiscono i livelli di accettabilità per il sito”*.

Secondo l'ultima stima, fatta dalla European Environment Agency (EEA) nel 2014, i siti in Europa che dovrebbero essere bonificati sono circa 340000.

L'Italia conta circa 12500 siti contaminati, dei quali si fa una distinzione tra siti di interesse nazionale (SIN), la cui bonifica è di competenza dal Ministero dell'ambiente e tutti i restanti, di competenza regionale.

I SIN sono zone dove il tasso di inquinamento è talmente elevato da comportare un rischio sanitario. Infatti, vengono classificati sulla base dell'entità della contaminazione ambientale, del rischio sanitario e dell'allarme sociale.

Prendendo in considerazione, tra i vari inquinanti, la classe degli idrocarburi come TPH (idrocarburi totali presenti nel petrolio) e PAH (idrocarburi policiclici aromatici) si è dimostrato che un'esposizione prolungata del suolo a tali sostanze ha come conseguenza la riduzione dell'affinità della superficie del suolo con le molecole d'acqua. La presenza di gasolio nel terreno, infatti, può influenzare direttamente le proprietà di ritenzione idrica, a causa delle

caratteristiche idrofobe dell'inquinante, e indirettamente modificando la struttura del suolo. I potenziali meccanismi che contribuiscono ai cambiamenti della bagnabilità del suolo sono: (1) rivestimento superficiale dell'interfaccia aria-solido da parte dell'olio e (2) ostruzione dei macro e micro-canali del suolo con conseguente distruzione degli aggregati del suolo stesso (Hyun *et al.*, 2008).

Per rendere meno invasive le tecniche di bonifica e non alterare l'ambiente soggetto al processo di risanamento, negli ultimi anni si è posta l'attenzione sull'utilizzo di processi biologici che risultano essere competitivi sia in termini economici che ambientali con quelli puramente chimico-fisici. Il biorisanamento è una tecnologia di bonifica ambientale che sfrutta il metabolismo microbico per biodegradare le sostanze inquinanti (Mcintosh *et al.*, 2017).

Gli interventi di bonifica possono essere effettuati in-situ (biosparging, bioventing, bioaugmentation, biostimulation, phytoremediation e natural attenuation), effettuati senza movimentazione o rimozione del suolo, utilizzando microrganismi non patogeni, che lavorano in condizioni di aerobiosi. Le sostanze nutritive vengono iniettate nel terreno e l'ossigeno viene fornito tramite bioventing o agenti chimici, come perossido di idrogeno. Questa tipologia risulta essere efficace e meno costosa rispetto alla bonifica ex-situ, ma le velocità di degradazione sono meno elevate. Tale tecnica viene applicata soprattutto per i terreni contaminati da petrolio.

Il biorisanamento in ex-situ (land farming, composting, bioreactors, biofilters, pump, treat), invece, prevede la movimentazione e la rimozione dei materiali e del suolo inquinato, che vengono successivamente trattati nell'area del sito stesso oppure fuori dal sito, usufruendo degli impianti di trattamento autorizzati. Si possono avere principalmente due tipi di biorisanamento ex-situ: in sospensione, dove il terreno viene miscelato con acqua, nutrienti, ossigeno ed altri reagenti all'interno di un bioreattore che fornisce le condizioni di crescita ideali per i microrganismi, o in fase solida con l'allestimento di sistemi esterni, come biopile o zone di compostaggio (Sharma, Dangi and Shukla, 2018).

Tra i vari metodi di biorisanamento, la biostimolazione favorisce lo sviluppo della componente microbica contenuta nel terreno attraverso l'introduzione nel sistema di una soluzione nutritiva adeguata e il mantenimento di condizioni fisico-chimiche opportune per il metabolismo dei microrganismi. È noto che i microrganismi hanno bisogno di nutrienti come azoto, fosforo, carbonio ed energia per sopravvivere e moltiplicarsi. La loro velocità di biodegradazione, inoltre, dipende anche dalle condizioni ambientali circostanti, come la temperatura e l'umidità (Horel and Schiewer, 2009).

Al fine di determinare le condizioni ottimali di biorisanamento di un sito si possono eseguire, su piccola scala, analisi fattoriali facendo variare i parametri di processo: il contenuto di umidità, la concentrazione di inquinante nel suolo e la quantità di biomassa presente nel terreno contaminato (Lahel *et al.*, 2016). Oppure, si può far variare il rapporto carbonio-azoto (C/N), il rapporto carbonio-fosforo (C/P) e il contenuto d'acqua (Ramírez *et al.*, 2009), in modo tale da stabilire la quantità e la qualità dei nutrienti che favoriscano al meglio la degradazione dell'inquinante.

Uno dei punti delicati del processo di bonifica è definire l'efficacia del processo stesso. Tra i vari metodi di verifica in sito, la geofisica permette di monitorare tramite l'utilizzo di opportune sonde, parametri caratteristici del terreno che sono correlati alla biodegradazione degli inquinanti. Rispetto ai classici strumenti di caratterizzazione del sito, basati principalmente

sulla perforazione e sul campionamento, la maggior parte dei metodi geofisici non è invasiva e consente di caratterizzare le proprietà fisiche del sottosuolo che potrebbero essere potenzialmente sensibili alla presenza di contaminanti o all'attività microbica. Due di questi parametri sono la permittività dielettrica e la conducibilità elettrica (Álvarez *et al.*, 2017).

L'implementazione sul campo delle tecniche di indagine geofisica, relativamente facile e veloce, consente di coprire vaste aree senza il rischio di contaminazione incrociata (spesso causata dalla perforazione). Tra questi, i metodi elettrici come la resistività a corrente continua (DC) e la polarizzazione indotta (IP) sono i più utilizzati per la caratterizzazione dei siti contaminati (Masy *et al.*, 2016).

1.2 Scopo del lavoro di tesi

L'obiettivo del lavoro di tesi è la messa a punto, a scala di laboratorio, del monitoraggio delle proprietà geofisiche interessate durante il processo di biostimolazione e delle condizioni chimico-fisiche ottimali per il processo biodegradativo. Il terreno in analisi è contaminato da gasolio.

1.2.1 Monitoraggio del processo di biostimolazione

Durante il processo di biostimolazione si formano co-metaboliti e/o biofilm che portano all'alterazione delle proprietà geofisiche del suolo. Pertanto, è possibile valutare il processo degradativo in maniera efficace e poco invasiva tramite l'utilizzo di strumenti geofisici. Per questo motivo, si è cercato di affiancare lo studio biochimico con quello geofisico e di correlare i risultati sperimentali dei due metodi. In questo modo, sarà possibile ampliare tale studio al monitoraggio del biorisanamento a scala di campo, cercando di perturbare il meno possibile l'ambiente.

I parametri geofisici che sono stati valutati per lo studio del processo degradativo, relativo a un suolo contaminato da inquinanti organici, sono: la permittività dielettrica e la conducibilità elettrica. Entrambe le grandezze variano in funzione della concentrazione del contaminante, in particolare la permittività dielettrica aumenta al diminuire della quantità di gasolio presente nel sistema (Comegna *et al.*, 2013), mentre un andamento inverso ha la conducibilità elettrica, che aumenta con il procedere del processo di biorisanamento (Masy *et al.*, 2016).

Le prove preliminari in laboratorio dei parametri geofisici sono a scopo metodologico per lavori futuri in larga scala e anche con diversi tipi di contaminante.

1.2.2 Ottimizzazione delle condizioni chimico-fisiche adeguate al processo di biostimolazione

Per valutare le condizioni operative ottimali per il processo di biostimolazione è stata utilizzata l'analisi fattoriale e successiva Superficie di Risposta (Response Surface Methodology-RSM),

in funzione della variazione di due parametri influenti per la degradazione: le sostanze nutritive, nella fattispecie rapporto carbonio-azoto (C/N), e l'umidità del suolo ($u\%$).

Per avere un adeguato contenuto di nutrienti, necessari allo sviluppo della componente microbica, è importante definire il tipo di soluzione salina da utilizzare. La soluzione salina deve essere, quindi, studiata in modo specifico per il suolo contaminato da bonificare, poiché ogni suolo ha una propria composizione chimica e biologica. Al fine di ottenere risultati ottimali, quindi, la quantità e il tipo di nutrienti devono essere testati poiché sono determinanti per l'attività metabolica dei microrganismi. Un'aggiunta eccessiva di nutrienti può inibire l'attività biologica, mentre, una carenza di nutrienti non permette lo sviluppo adeguato dei microrganismi. Pertanto, l'ottimizzazione della soluzione salina è un passo fondamentale prima dell'applicazione sul campo (Álvarez *et al.*, 2017).

Nello stesso tempo, anche il ruolo dell'umidità è fondamentale nel creare condizioni favorevoli alla biodegradazione. Un adeguato contenuto d'acqua favorisce la dispersione degli aggregati nel suolo, aumentando l'area superficiale, e la diffusione del contaminante nella fase acquosa, migliorando così la biodisponibilità degli idrocarburi ai microrganismi e l'aerazione del suolo stesso (Zapie *et al.*, 2009).

1.3 Struttura del lavoro di tesi

Il lavoro di tesi è strutturato, oltre al capitolo *1 Introduzione*, in tre capitoli principali.

Nel capitolo *2 Materiali e Metodi* vengono illustrati i tipi di materiali utilizzati (*2.1 Tipi di materiali utilizzati e proprietà chimico-fisiche*) nelle prove svolte su tre sistemi differenti: Microcosmi con 800 g di terreno, Microcosmi con 200 g di terreno e Mesocosmi con 3400 g di terreno (*2.2 Prove di biodegradazione*). Si definiscono i principali metodi (*2.3 Metodi analitici*) impiegati in questo lavoro per valutare il processo degradativo: l'analisi respirometrica valutata tramite la CO_2 prodotta in ogni sistema; l'analisi dell'attività microbica tramite la valutazione del quantitativo di fluoresceina prodotta durante la reazione di idrolisi del diacetato di fluoresceina; l'analisi del contenuto di gasolio residuo tramite l'uso del gascromatografo; la conta microbica dei microrganismi che si nutrono di gasolio (*2.6 Analisi della carica microbica*); l'ottimizzazione della soluzione nutritiva con un modello matematico di regressione (*2.4 Analisi fattoriale*); l'analisi al SEM per la valutazione della popolazione microbica (*2.3.8 Analisi SEM*) e le misure geofisiche per il monitoraggio dei parametri geofisici che variano durante il processo biodegradativo (*2.5 Misure geofisiche*).

Nel capitolo *3 Risultati e discussione* vengono messi in luce i principali risultati ottenuti in ogni analisi, portando alla stima delle condizioni di processo che favoriscono la migliore percentuale di degradazione del gasolio, che è risultata essere pari al 39% dopo 84 giorni per i microcosmi con 800 g di terreno, mentre pari a 33% dopo 35 giorni per i microcosmi con 200 g di terreno. Si è stimato che il rapporto massico ottimale di C/N è tra 100 e 120, mentre la condizione favorevole di umidità è tra 8-12%. Il monitoraggio dei parametri geofisici è risultato essere particolarmente adatto nello studio del processo degradativo, ma lo studio di tale tecnica deve essere perfezionato.

Nel capitolo *4 Conclusioni* si riassumono le considerazioni sul processo di biostimolazione e i principali risultati ottenuti.

2. Materiali e Metodi

Nel capitolo seguente verranno definiti i principali materiali utilizzati nelle prove di biodegradazione con le corrispettive proprietà chimico-fisiche. Si descriverà l'allestimento delle tre prove realizzate (Microcosmi con 800 g di terreno, Microcosmi con 200 g di terreno e Mesocosmi con 3400 g di terreno). Nella parte finale del capitolo, verranno illustrate le principali analisi e misure effettuate per la stima del processo degradativo.

2.1 Tipi di materiali utilizzati e proprietà chimico-fisiche

I sistemi analizzati sono costituiti da tre fasi principali: una matrice solida porosa, un contaminante organico (gasolio) e una soluzione acquosa salina. Il processo degradativo è ad opera di microrganismi indigeni del terreno che utilizzano come fonte di carbonio il contaminante stesso.

2.1.1 Suolo

Il suolo utilizzato nello studio del processo di biostimolazione è stato prelevato da un sito contaminato a Trecate, in provincia di Novara, a circa tre metri di profondità, ed è stato setacciato, tramite il metodo ASTM C 136, per ottenere una frazione con granulometria compresa tra 0.15 e 2 mm.

Le analisi di caratterizzazione effettuate in precedenza (Casale *et al.*, 2018) hanno riportato una densità reale pari a 2700 kg/m^3 , una densità apparente pari a 1620 kg/m^3 e una porosità del 40% (Tabella 2.1.1). Il contenuto di carbonio nel suolo è stato stimato pari a 1.21% in peso, mentre i nitrati presenti sono 68 mg/kg di suolo.

Tabella 2.1.1 Proprietà chimico-fisiche del suolo (Casale *et al.*, 2018)

SUOLO	
Densità reale (kg/m^3)	2700
Densità apparente (kg/m^3)	1620
Porosità	40-42% v/v
Permittività elettrica	2.5-3

2.1.2 Microrganismi

I microrganismi atti al processo di biodegradazione sono microrganismi indigeni del terreno: batteri, funghi, actinomiceti, sia aerobici che anaerobici, autotrofi ed eterotrofi (Sharma, Dangi and Shukla, 2018).

La specie microbica che è stata stimolata tramite l'aggiunta di una soluzione nutritiva specifica è di tipo batterica aerobica, poiché permette una degradazione del gasolio più rapida rispetto alla specie anaerobica e rende più facile il controllo del processo stesso (Mcintosh *et al.*, 2017).

La concentrazione media di colonie microbiche, come verrà illustrato nel paragrafo relativo 3.7 *Analisi della carica microbica*, è dell'ordine di 10^4 UFC/g_{suolo} (UFC-Unità formanti colonie). Nei mesocosmi con 3400 g di suolo, come verrà spiegato nel paragrafo 2.2.3 *Mesocosmi con 3400 g di suolo*, si inserisce un inoculo di microrganismi ($1.25 \cdot 10^4$ UFC/g_{suolo}) prelevato da microcosmi contaminati con il 7.5% di gasolio e con un'umidità del 15% in peso.

2.1.3 Gasolio

Il gasolio è una miscela di idrocarburi (40% n-alcani; 40% isoalcani e cicloalcani; 20% idrocarburi aromatici e in piccole tracce isoprenoidi, composti di zolfo, di azoto e ossigenati) che si ottiene per distillazione del greggio nell'intervallo di ebollizione tra 270-320 °C a pressione atmosferica. Il numero di atomi di carbonio è compreso tra C-8 e C-24 e il peso molecolare medio può essere considerato in prima approssimazione pari a 245 u.

Nel sistema analizzato si è utilizzato un gasolio commerciale con densità tra 815-875 kg/m³, che corrisponde ad una densità API tra 30-42 (*Tabella 2.1.2*).

Tabella 2.1.2 Proprietà chimico-fisiche del gasolio (Casale *et al.*, 2018)

GASOLIO	
Densità (kg/m ³) a 15 °C	815-875
PM medio (kg/kmol)	245
Permittività elettrica	2.1-2.3

2.1.4 Soluzione nutritiva

La soluzione nutritiva è composta da acqua distillata e dai sali dei principali nutrienti, utilizzati dai microrganismi nei processi di degradazione di sostanze organiche. È stata considerata la soluzione impiegata nel lavoro di Maddela *et al.* (2015), riportata in *Tabella 2.1.3*, adatta alla stimolazione dei batteri (Mineral Salt Medium-Bacteria- MSMB).

Al fine di ottenere sistemi con diversi rapporti tra il carbonio degradabile e i nutrienti forniti dalla soluzione, si sono apportate modifiche alla soluzione salina MSMB.

Infatti, se si considerano 3.4 kg di suolo contenente il 7% in peso di gasolio e il 12% in peso di soluzione nutritiva MSMB, il rapporto C/N che si ottiene ha un valore pari a 465.94 w/w. Per quanto concerne il rapporto carbonio-fosforo, C/P, è risultato essere di circa 3018.74 w/w.

Tali rapporti indicano che si è in carenza di azoto e fosforo, poiché secondo i dati riportati in letteratura i valori ottimali sono per C/N=20-100 e per N/P=10, in modo tale da garantire un'adeguata attività microbica.

Ad esempio, nel lavoro di Margesin, Zimmerbauer and Schinner (2000) si è studiato il processo di degradazione di un suolo con il 12.5% di umidità e contaminato con 6.5% in peso di gasolio, che prevede l'utilizzo di un rapporto C/N pari a 20 e di un rapporto N/P pari a 10. Nello studio condotto da Lahel *et al.* (2016) si utilizza una concentrazione di nutrienti tale da avere un rapporto C:N:P pari a 100:1:0.2.

Per le ragioni appena evidenziate, si è modificata la soluzione nutritiva MSMB aggiungendo il fosfato di diammonio ((NH₄)₂HPO₄) e aumentando la concentrazione del nitrato di ammonio (NH₄NO₃), in modo tale da avere un rapporto C/N tra 20 w/w e 100 w/w ed un rapporto N/P pari a 10 w/w.

Tabella 2.1.3 Composizione e proprietà chimico-fisiche della soluzione acquosa nutritiva MSMB (Casale *et al.*, 2018)

SOLUZIONE ACQUOSA NUTRITIVA	
Densità (kg/m³)	1000
NH₄NO₃ (g/l)	3
KH₂PO₄ (g/l)	0.5
K₂HPO₄·H₂O (g/l)	0.5
MgSO₄·7H₂O (g/l)	0.008
CuSO₄·4H₂O (g/l)	0.002
MnSO₄·H₂O (g/l)	0.002
FeSO₄·7H₂O (g/l)	0.002
CaCl₂·2H₂O (g/l)	0.002
Permittività elettrica	78-79

2.2 Prove di biodegradazione

Il processo di biostimolazione è stato studiato su tre sistemi, che differiscono per il quantitativo di suolo trattato, per il rapporto carbonio-azoto e per il contenuto di umidità.

2.2.1 Microcosmi con 800 g di terreno

La valutazione della degradazione del gasolio ad opera dei microrganismi indigeni è stata condotta in microcosmi contenenti 800 g di terreno, in condizioni tali da avere un rapporto massico tra gasolio e suolo pari a 7% e un contenuto di umidità pari al 12% in peso.

I sistemi in cui sono stati allestiti i microcosmi sono in vetro con una capienza di circa 1 l e sono dotati di una chiusura con tappo ermetico, in modo tale da garantire la tenuta.

Si è proceduto inserendo 712 g di suolo secco, precedentemente setacciato tra 0.15 e 2 mm, 57.17 g di gasolio e 97.7 g di soluzione nutritiva. Si è miscelato il suolo con il gasolio e in seguito è stata inserita la soluzione nutritiva, mescolando il sistema per qualche minuto, in modo tale da ottenere un'unica fase omogenea e non avere la formazione di sacche di gasolio o una netta separazione tra le due fasi liquide.

Il materiale occupa uno spazio in altezza di circa 6 cm, lasciando così un opportuno spazio di testa per favorire l'accumulo di CO₂ prodotta (*Figura 2.2.1*).

All'interno di ogni sistema è stato posizionato un contenitore in plastica, riempito con una soluzione di soda caustica, NaOH 1.5 M, per permettere l'assorbimento della CO₂ sviluppata ed effettuare un'analisi respirometrica.

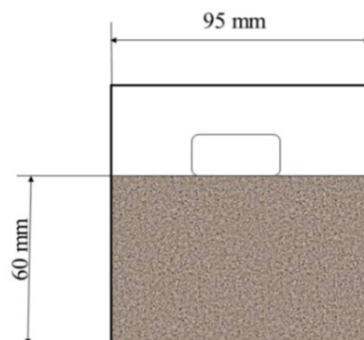


Figura 2.2.1 Sezione verticale del microcosmo con 800 g di terreno e rappresentazione del contenitore per la soda caustica (NaOH 1.5 M) posto sopra il terreno

Per favorire l'aerazione, il terreno è stato miscelato tre volte a settimana.

Si sono allestiti tre microcosmi (*Figura 2.2.2*), che differiscono per il diverso contenuto di azoto, in modo tale da poter valutare la condizione ottimale che favorisce la rimozione del diesel.

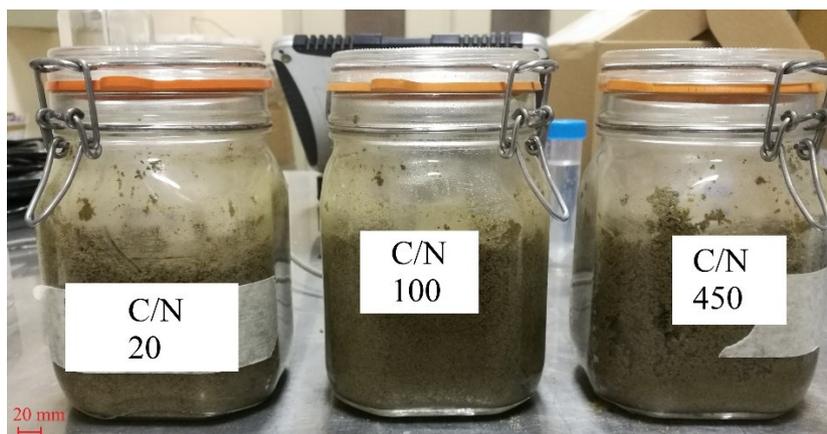


Figura 2.2.2 Microcosmi C/N=20, C/N=100 e C/N=450 con 800 g di terreno contaminato con il 7% in peso di gasolio e con il 12% in peso di umidità

Si sono valutati i rapporti C/N pari a 20, 100 e 450, ottenuti con tre soluzioni nutritive differenti.

Il primo microcosmo è stato preparato in modo tale da avere un rapporto C/N=20 aggiungendo alla soluzione MSMB il fosfato di diammonio e aumentando il nitrato di ammonio. La composizione di tale soluzione acquosa nutritiva è riportata in *Tabella 2.2.4*. Nel secondo microcosmo è stata inserita una soluzione salina tale da avere un rapporto C/N pari a 100, diluendo 1 a 5 la soluzione con $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Infine, il terzo microcosmo con C/N=450 è stato preparato con la soluzione MSMB.

Tabella 2.2.4 Composizione della soluzione acquosa nutritiva 2

SOLUZIONE ACQUOSA NUTRITIVA 2	
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (g/l)	11.62
NH_4NO_3 (g/l)	75.97
KH_2PO_4 (g/l)	0.5
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (g/l)	0.5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/l)	0.008
$\text{CuSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (g/l)	0.002
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (g/l)	0.002
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/l)	0.002
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (g/l)	0.002

Il processo di biorisanamento è stato condotto in condizioni neutre. Si è verificato il pH delle tre soluzioni acquose tramite pH-metro (METTLER TOLEDO n° 51343161):

- MSMB: pH 6.7 (utilizzata nel microcosmo con C/N=450);
- soluzione salina acquosa 2: pH 7.2 (utilizzata nel microcosmo con C/N=20);

- soluzione salina acquosa 3: pH 7.4 (utilizzata nel microcosmo con C/N=100).

La conducibilità delle tre soluzioni saline è stata misurata tramite conduttimetro (CONDUCTIVITY METER WTW LF538) a 25°C:

- MSMB 5.4 mS/cm;
- soluzione salina acquosa 2: 101.9 mS/cm;
- soluzione salina acquosa 3: 24.5 mS/cm.

2.2.2 Microcosmi con 200 g di terreno

I microcosmi con 200 g di terreno sono stati allestiti per effettuare l'analisi fattoriale, in modo tale da valutare le condizioni ottimali per il processo di biodegradazione a partire dai risultati ottenuti con i microcosmi da 800 g.

Si è deciso di variare su 2 livelli, $k = 2$ parametri, ossia rapporto C/N e umidità, realizzando così un design del tipo 2^k e aggiungendo dei punti intermedi, come verrà spiegato nel paragrafo 2.4 *Analisi fattoriale*.

In questo modo sono stati realizzati 12 microcosmi, posti in sistemi in vetro con tappo ermetico di capienza di 0.2 l, riempiti fino a 3 cm di altezza, *Tabella 2.2.5 e Figura 2.2.3*.

Tabella 2.2.5 Microcosmi con 200 g di terreno al variare dell'umidità e del rapporto carbonio-azoto

U% in peso	8%	12%	15%
C/N	60	60	60
C/N	120	120	120
C/N	180	180	180
C/N	300	300	300



Figura 2.2.3 Microcosmi con 200 g di terreno contaminato con il 7% in peso di gasolio al variare del contenuto di umidità (8%-12%-15%) e del rapporto carbonio-azoto (60-120-180-300)

Si sono presi in considerazione come rapporto C/N=60, 120, 180 e 300 (estremi: 60 e 180; punto centrale: 120 e punto assiale: 300) in modo tale da avere delle correlazioni con i microcosmi da 800 g e definire l'ottimale.

L'umidità è stata variata considerando la condizione scelta nei microcosmi da 800 g, ossia il 12%, e definendo così i punti 8%, 12% e 15%.

La preparazione dei microcosmi con 200 g di terreno è stata la medesima di quella eseguita per i microcosmi con 800 g di terreno, ossia si è proceduto miscelando in ordine, suolo, gasolio e soluzione acquosa.

In particolare, in ogni campione sono stati aggiunti 13 g di gasolio, in modo tale da garantire il rapporto massico gasolio-suolo fissato (7%), e 15 g, 22 g e 28 g di soluzione salina per avere, rispettivamente, un'umidità di 8%, 12%, 15%. La quantità di sali disciolta in ogni soluzione è stata variata in modo tale da avere il giusto rapporto tra substrato e nutrienti.

Per effettuare l'analisi respirometrica, anche in questi sistemi è stato aggiunto un contenitore in plastica contenente 20 ml di NaOH 1.5 M.

Per colmare un'eventuale carenza di ossigeno, i microcosmi sono stati miscelati due volte a settimana.

2.2.3 Mesocosmi con 3400 g di terreno

Sono stati allestiti dei sistemi di più grandi dimensioni, per studiare se la rimozione del gasolio da parte dei microrganismi inducesse una variazione dei due parametri geofisici: permittività e conducibilità elettrica.

Questi mesocosmi sono stati realizzati in colonne dalla geometria cilindrica, con dimensioni riportate in *Tabella 2.2.5* e in *Figura 2.2.4*.

Tabella 2.2.5 Caratteristiche geometriche dei mesocosmi con 3400 g di terreno

CARATTERISTICHE GEOMETRICHE	
Diametro (m)	0.138
Altezza (m)	0.19
Altezza del riempimento (m)	0.14
Volume del riempimento (m³)	2.09·10 ⁻³

I mesocosmi 1 e 2 contengono 3400 g di terreno, 240 g di gasolio e 410 g di soluzione acquosa salina, ossia le stesse condizioni chimico-fisiche del microcosmo da 800 g con un rapporto C/N pari a 450, un'umidità del 12% in peso e un rapporto massico gasolio-suolo del 7%.

Il mesocosmo 1 è stato inoculato (400 g) con dei microrganismi indigeni prelevati da microcosmi contaminati con gasolio, simili a quelli analizzati in questo studio, in modo tale da

garantire in tutto il sistema una concentrazione di microrganismi media pari a $1.25 \cdot 10^3$ UFC/g di suolo.

Il mesocosmo 2 privo di inoculo è stato utilizzato come controllo.

Entrambe le colonne sono state monitorate con una sonda Campbell CS655, che è stata piantata all'interno del riempimento, a circa due centimetri di distanza dal fondo della colonna e al centro in modo tale da non avere consistenti effetti di bordo sulle misure. Ogni sonda è legata ad un datalogger che raccoglie i dati e li invia ad un computer.

Anche su questi sistemi si è voluta monitorare la respirazione dei microcosmi collegando al tappo di chiusura una drechsel contenente la soluzione caustica necessaria all'assorbimento della CO₂ prodotta. Per l'aerazione del mesocosmo 1 è stato inserito sul fondo della colonna un tubo di 4 mm di diametro collegato ad una mandata di aria.

Nella *Tabella 2.2.6* si riassumono i principali sistemi presenti nei mesocosmi.

Tabella 2.2.6 Sistemi presenti nei mesocosmi

Mesocosmi	Inoculo	Sistema di aerazione	Sonda geofisica	Sistema per l'analisi respirometrica
1	Si	Si	Si	Si
2	No	No	Si	Si

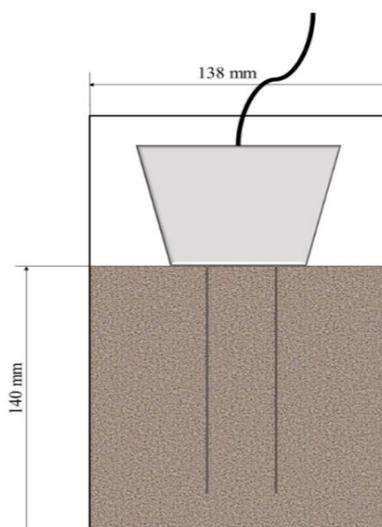


Figura 2.2.4 Sezione verticale del mesocosmo con 3400 g di terreno, caratterizzato da un rapporto carbonio-azoto pari a 450, un'umidità del 12% in peso e rappresentazione della sonda CS655

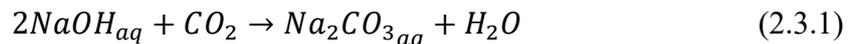
Nella *Figura 2.2.4* è rappresentata la sonda che permette di misurare i parametri geofisici (permittività dielettrica e conducibilità elettrica) che verrà descritta nel paragrafo 2.5 *Misure geofisiche*.

2.3 Metodi analitici

I metodi analitici utilizzati permettono di stimare: la quantità di CO₂ prodotta dai microrganismi durante il processo di degradazione; l'attività microbica presente nei campioni di suolo prelevati dai sistemi analizzati; la concentrazione di gasolio residuo in funzione del tempo di degradazione e la cinetica di degradazione. Inoltre, verrà descritto come sono stati campionati i sistemi per effettuare le analisi.

2.3.1 Analisi respirometrica

L'analisi respirometrica è stata condotta valutando la quantità di CO₂ prodotta in ogni sistema. Per determinare la concentrazione di CO₂ prodotta si effettua la titolazione della soluzione di NaOH (1.5 M), la quale assorbe chimicamente il gas prodotto, secondo la reazione:



Si utilizza come acido una soluzione di HCl (1.5 M) e come indicatore la fenolftaleina.

Si valuta la concentrazione di CO₂ dal bilancio di materia,

$$m_{CO_2} = 22 \cdot M_{NaOH} \cdot (V_0 - V) \quad (2.3.2)$$

Dove,

m_{CO_2} , massa di CO₂ prodotta (mg);

M , molarità della soluzione di NaOH (M);

V_0 , volume di HCl privo di CO₂ (ml);

V , volume di HCl necessario per la titolazione (ml).

2.3.2 Analisi dell'attività microbica tramite l'idrolisi del diacetato di fluoresceina

Per determinare l'attività microbica si possono utilizzare diverse tecniche, in questo studio si utilizza l'idrolisi del diacetato di fluoresceina, FDA.

Il FDA è idrolizzato da diversi tipi di enzimi, come proteasi, lipasi ed esterasi, che sono presenti nel terreno, e il prodotto di questa conversione enzimatica è la fluoresceina, che può essere visualizzata tramite spettrofotometria, dato il suo colore giallo intenso.

La reazione in step è visualizzata in *Figura 2.2.5*.

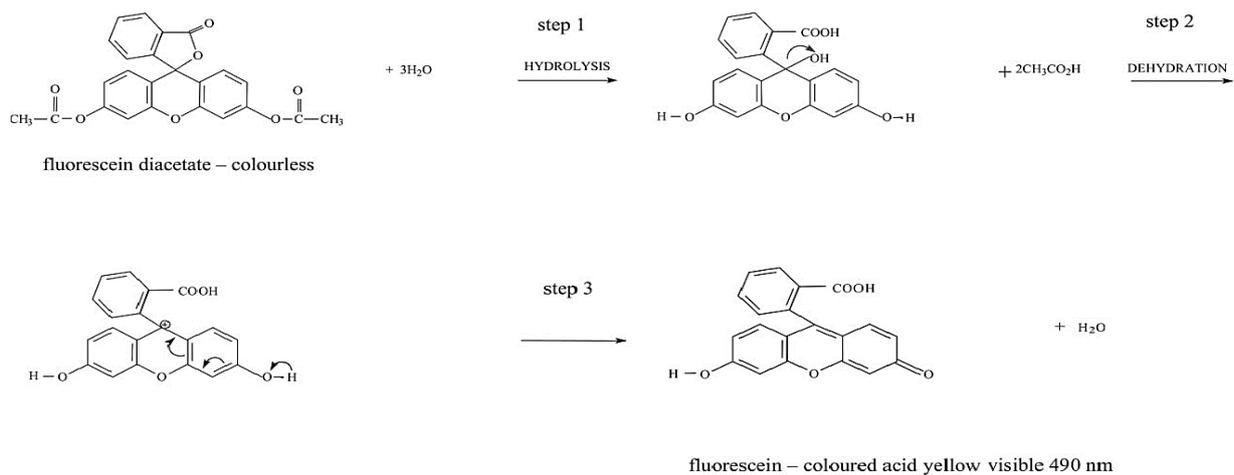


Figura 2.2.1 Reazione di idrolisi del FDA (Fonte: (Adam and Duncan, 2001))

La determinazione dell'idrolisi del FDA ha il vantaggio di essere una tecnica semplice, rapida e sensibile (Schnurer, 1982).

La tecnica con FDA, però, fornisce una stima complessiva dell'attività microbica presente nel campione poiché non permette di differenziare gli specifici consorzi microbici.

Si è proceduto utilizzando la metodica di Schnurer (1982), modificata secondo Adam e Duncan (2001).

Si impiegano due soluzioni:

- tampone di fosfato di potassio: 4.35 g di K₂HPO₄ e 0.65 g di KH₂PO₄ disciolti in 500 ml di acqua deionizzata. Il pH della soluzione è 7.57, che ricade nel range di accettabilità per favorire la reazione di idrolisi (pH 7-8);
- soluzione madre di FDA e acetone ad una concentrazione 2 mg/ml: 0.1 g di FDA in 50 ml di acetone.

Si prelevano 2 g di suolo (su base umida), si aggiungono 15 ml di tampone fosfato e 100 µl di soluzione madre di FDA in acetone. Ogni campione viene agitato per 1 h a 50 rpm.

Per bloccare la reazione di idrolisi, dato il consistente numero di campioni, che non permette di effettuare un'analisi allo spettrofotometro in tempi molto rapidi, si aggiunge acetone in 50% v/v. La scelta di tale solvente è dovuta al fatto che l'acetone è il più efficace solvente nell'arrestare la reazione di idrolisi (Adam and Duncan, 2001).

In seguito, prima di procedere con l'analisi spettrofotometrica, si inseriscono i campioni in centrifuga (MPW-352) a 6000 rpm per 5 minuti e successivamente si filtrano le soluzioni tramite filtro in nylon da 1.2 µm per eliminare eventuali particelle colloidali.

L'assorbanza viene misurata tramite spettrofotometro (UNICAM Heλros α) a 490 nm. Si sono preparate due repliche per ogni campione e un bianco contenente solo la soluzione di fosfato di sodio.

Applicando la legge di Lambert e Beer si determina la quantità di FDA idrolizzato:

$$A = \varepsilon \cdot C \cdot l \quad (2.3.3)$$

Dove,

$$A = \log \left(\frac{I_0}{I_1} \right) \quad (2.3.4)$$

con I_0 e I_1 , rispettivamente, le intensità di luce iniziale e trasmessa;

ε , il coefficiente di estensione molare ($M^{-1}cm^{-1}$);

C , la concentrazione molare della sostanza analizzata (M);

l , il cammino ottico, ossia la lunghezza della cuvetta (cm).

Dato che il coefficiente di estensione molare della sostanza non è noto, si costruisce la retta di taratura tra assorbanza e concentrazione.

Si prepara una serie di campioni a concentrazioni note della sostanza in analisi pura (fluoresceina) disciolta in solvente (tampone di fosfato di potassio); il bianco è realizzato con la cuvetta piena del solo solvente, necessario per l'azzeramento del valore dell'assorbanza data dallo strumento, e si leggono le assorbanze delle varie concentrazioni note. Si determina così la retta di taratura, ponendo A sull'asse delle ascisse e C sull'asse delle ordinate.

Nota la retta di taratura, si determina la concentrazione di fluoresceina incognita del campione in analisi.

2.3.3 Estrazione degli idrocarburi

L'estrazione viene eseguita tramite la metodica EPA 3546 moisture 15-30% in microonde che prevede: 15 minuti di riscaldamento fino a 110 °C con potenza massima di 1100 W; 10 minuti di mantenimento a 110 °C con potenza massima di 1100 W e 20 minuti di raffreddamento.

In particolare, per la preparazione dei campioni, si prelevano 2 g di suolo contaminato, su base umida, e si pongono in delle provette in vetro con 2 g di solfato di sodio, necessario a disidratare il suolo, e 15 ml di solvente. Quest'ultimo è composto da acetone ed esano in rapporto 1:1 v/v. Le provette vengono inserite nel microonde (MILESTONE) con rotore da 24 posizioni, dove viene eseguito il programma di estrazione.

Alla fine del trattamento, ogni campione viene filtrato tramite un filtro in nylon da 0.45 μm .

2.3.4 Analisi degli idrocarburi residui tramite il gascromatografo

Il gascromatografo permette di valutare quanto gasolio è rimasto nei vari campioni, determinando così la percentuale di degradazione. A tal fine è stato analizzato il terreno dei campioni dei microcosmi con 800 g di terreno dopo 16, 28, 37, 84 giorni dall'inizio della prova

e dopo 19 e 35 giorni per i microcosmi con 200 g di terreno, in modo tale da monitorare l'andamento del quantitativo di diesel rimosso.

Il campione estratto tramite la metodica EPA 3546 viene iniettato in quantità pari a 1 μ l nella colonna del gascromatografo dove viene mantenuto per 1 minuto alla temperatura di 50 °C, successivamente si porta a 320 °C con una rampa di 8 °C/min per circa 40 minuti.

In questo modo con il software Clarity si valuta il cromatogramma del campione, che riporta la tensione del segnale in funzione del tempo di ritenzione nella colonna. A seconda del tipo di sostanza si registrano picchi con tempo di ritenzione differente, mentre la maggior o minor ampiezza di ogni picco è proporzionale alla concentrazione di quella sostanza nella miscela. Il primo picco rappresenta il solvente, che essendo il componente più volatile fuoriesce per primo dalla colonna, mentre, proseguendo verso tempi di ritenzione più elevati, gli altri picchi rappresentano gli idrocarburi che compongono il gasolio a catena via via più lunga e più complessa, dato che la volatilità di una molecola diminuisce all'aumentare della lunghezza della catena stessa e alla presenza di ramificazioni.

Per determinare il quantitativo di diesel presente in ogni campione si è stimata l'area sottesa da ogni picco, tramite un'integrazione di tipo "Valley", e si è determinata la quantità di gasolio tramite la retta di taratura, costruita grazie a campioni a concentrazioni di gasolio note, in cui viene diagrammata la concentrazione di gasolio in funzione dell'area dei picchi.

2.3.5 Campionamento del terreno

Tutti i microcosmi sono stati campionati per poter effettuare le relative analisi di: attività microbica, gasolio residuo, fotografie al SEM, conta microbica.

Per i microcosmi (con 800 g e con 200 g di terreno) i campioni sono stati prelevati dopo aver omogenizzato il terreno, in modo tale da avere una stima su tutto il terreno presente.

Per i mesocosmi, invece, si è proceduto con una metodica di campionamento per livelli, data la formazione di strati (*Figura 2.2.6* e *Figura 2.2.7*). I prelievi sono stati fatti a 20, 80 e 140 mm dalla superficie.

Nel mesocosmo 1 si è osservata una stratificazione più definita: zona superficiale (10-40 mm); zona centrale (40-90 mm) di colore più giallognolo, come ad indicare una maggiore presenza di gasolio e quindi una maggiore condizione di saturazione, e zona di fondo (90-140 mm).

Si sono osservate delle colonie microbiche in prossimità delle pareti laterali e delle basi delle colonne. Inoltre, nel primo strato superficiale si erano formati numerosi consorzi microbici.

All'interno dei singoli strati, escludendo la presenza di colonie microbiche, il sistema si è presentato uniforme.

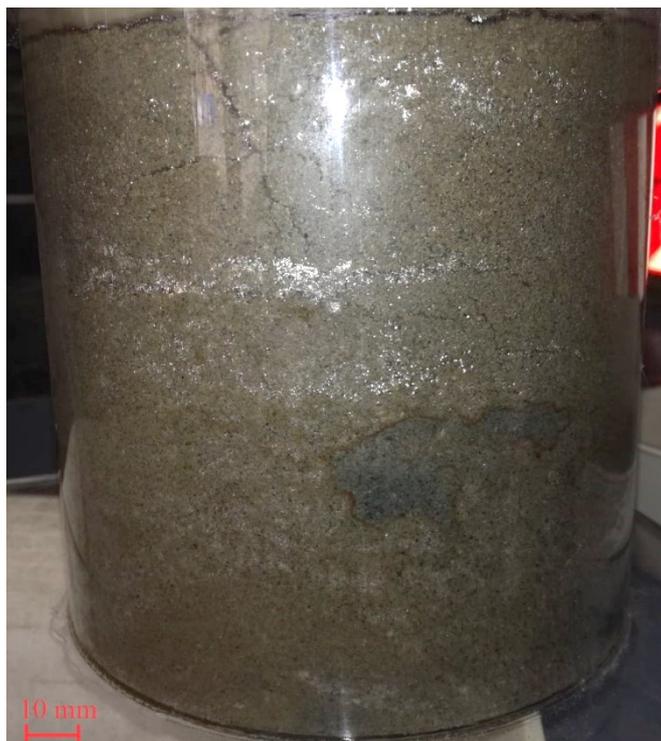


Figura 2.2.2 Mesocosmo 1 con 3400 g di terreno contaminato con 7% di gasolio dopo 90 giorni

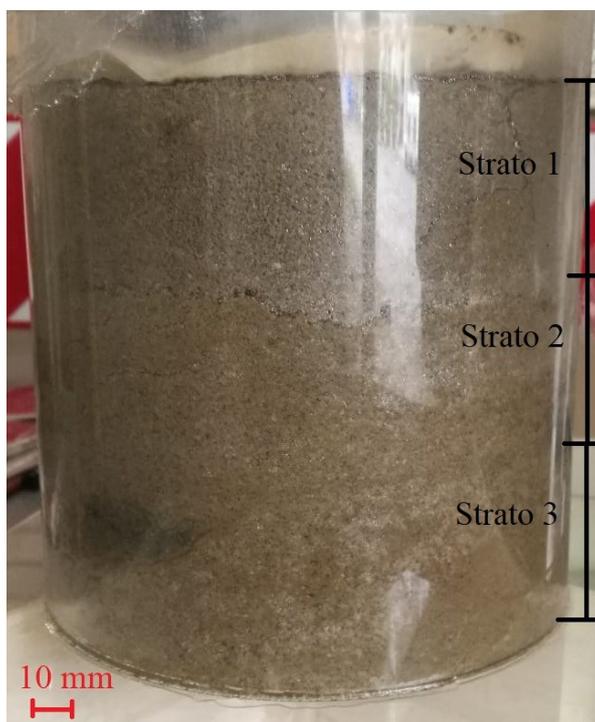


Figura 2.2.3 Stratificazione del mesocosmo 1: strato 1 (0-40 mm), strato 2 (40-90 mm) e strato 3 (90-140 mm)

Riassumendo, i prelievi effettuati nel mesocosmo 1 sono:

- 20 mm di distanza dalla superficie;
- 80 mm di distanza dalla superficie;
- 100 mm di distanza dalla superficie in prossimità della colonia microbica;
- 115 mm di distanza dalla superficie in prossimità della colonia microbica;
- 140 mm di distanza dalla superficie in prossimità della colonia microbica (fondo).



Figura 2.2.4 Colonia microbica presente a 100 mm di profondità (strato 2) nel mesocosmo 1 definita da un contorno netto e da una zona interna più scura rispetto al resto del suolo presente nel sistema



Figura 2.2.8 Colonia microbica presente a 115 mm di profondità (strato 2) nel mesocosmo 2 definita da un contorno netto e da una zona interna più scura rispetto al resto del suolo presente nel sistema

I prelievi effettuati nel mesocosmo 2 sono:

- 20 mm di distanza dalla superficie;
- 20 mm di distanza dalla superficie in prossimità della colonia microbica;
- 80 mm di distanza dalla superficie;
- 100 mm di distanza dalla superficie in prossimità della colonia microbica;
- 140 mm di distanza dalla superficie.

2.3.6 Analisi della carica microbica

L'analisi della carica microbica è stata effettuata con il metodo di inclusione su piastra Petri. Tale metodo favorisce la crescita e lo sviluppo delle colonie microbiche, permettendone così la conta dopo alcuni giorni.

Per ogni campione di suolo, prelevato dai sistemi studiati, sono state preparate le piastre Petri in tre repliche.

Si è utilizzato un terreno liquido MSMB a pH 7 a cui viene aggiunto l'agente gelificante Agar (20 g/l), in modo tale da fornire i nutrienti necessari per la crescita dei microrganismi. Tale terreno viene sterilizzato in autoclave.

Ogni campione è stato preparato inserendo 50 mg di suolo nelle piastre vuote sterili sotto cappa biologica, aggiungendo e miscelando dell'acqua sterile. Si è disperso nella parte opposta della piastra in gocce il diesel (40 µl), filtrato con un filtro da 0.22 µm. Infine, si è aggiunto il medium liquido sterilizzato. Dopo circa sette giorni, è stato possibile identificare le colonie microbiche puntiformi presenti sulle piastre.

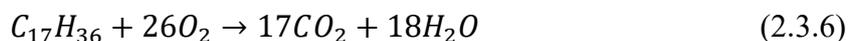
Per definire la concentrazione di colonie UFC (Unità formanti colonie) si è utilizzata la relazione (2.3.5):

$$\text{Concentrazione} \left(\frac{\text{UFC}}{\text{g di suolo}} \right) = \frac{\text{UFC}}{\text{massa del suolo}_{\text{piastra}}} \quad (2.3.5)$$

2.3.7 Cinetica di degradazione degli idrocarburi

La cinetica di degradazione del gasolio da parte dei microrganismi è stata valutata tramite un metodo integrale, basato sulla quantità di substrato ancora disponibile (Horel and Schiewer, 2009).

La reazione può essere rappresentata come



e la cinetica di reazione può essere considerata del primo ordine o del secondo ordine, rispettivamente:

$$C_t = C_0 \cdot e^{-kt} \quad (2.3.7)$$

$$\frac{1}{C_t} = \frac{1}{1+kC_0t} \quad (2.3.8)$$

Dove

C_t , la concentrazione del contaminante in un dato momento t , valutata tramite l'analisi al gascromatografo ($\text{g/kg}_{\text{suolo}}$);

C_0 , la concentrazione iniziale del contaminante ($\text{g/kg}_{\text{suolo}}$);

k , la costante di velocità di degradazione (d^{-1}).

Per valutare la cinetica che meglio interpreta il sistema analizzato si effettua un'interpolazione dei valori ottenuti sperimentalmente.

Si rappresenta un grafico $\ln C_t$ in funzione del tempo, se è valida la cinetica del primo ordine, si ottiene una retta, la cui pendenza è $-k$. In questo modo la velocità di degradazione è proporzionale alla quantità residua di contaminante in qualsiasi tempo t .

Se, invece, è valida la cinetica del secondo ordine, si ottiene una retta $1/C_t$ in funzione del tempo, la cui pendenza è k . La velocità di degradazione è proporzionale al quadrato della concentrazione residua di gasolio.

2.3.8 Analisi al microscopio elettronico a scansione (SEM)

I campioni di suolo prelevati sono stati analizzati al microscopio elettronico a scansione, SEM, per determinare le caratteristiche morfologiche e visualizzare la popolazione microbica.

Il microscopio a scansione sfrutta un fascio di elettroni generato da una sorgente, solitamente un filamento di Tungsteno, che colpisce il campione. In questo modo dato che la lunghezza d'onda degli elettroni è minore rispetto a quella dei fotoni, si ha una risoluzione maggiore in confronto al microscopio ottico, consentendo così di ottenere un'immagine migliore.

I campioni vengono mantenuti sottovuoto e successivamente metallizzati, per rendere possibile l'osservazione.

Gli elettroni primari generati dalla sorgente colpiscono il campione e le loro interazioni vengono lette da un rivelatore che li converte in impulsi elettrici. Quest'ultimi vengono trattati e amplificati, in modo tale da ottenere un segnale televisivo (pixel). Si genera così un'immagine in bianco e nero.

2.4 Analisi fattoriale

L'analisi fattoriale permette di valutare l'effetto congiunto di variabili indipendenti su una variabile obiettivo. Le variabili indipendenti considerate sono:

- Rapporto carbonio-azoto (C/N);
- Contenuto di umidità ($u\%$).

Le variabili obiettivo valutate sono:

- Percentuale di gasolio degradato;
- Concentrazione di fluoresceina cumulata.

2.4.1 Analisi di regressione a due vie e superficie di risposta (RSM)

In questo studio si è applicata un'analisi di regressione a due vie, dato che si è scelto di far variare le due variabili indipendenti (rapporto C/N e $u\%$), su due livelli (alto e basso). Inoltre, per un'analisi più completa sono stati aggiunti dei punti intermedi.

Tramite questo design fattoriale di tipo 2^k è possibile valutare in modo completo, con un numero minimo di esperienze, tutti i potenziali fattori che influenzano il sistema. Dato che si considerano solo due livelli, si assume che la risposta del sistema nell'intervallo considerato è approssimativamente lineare.

Dai dati ricavati con il design di tipo 2^k si è determinato, utilizzando il software Matlab, il polinomio di regressione del terzo ordine e la superficie di interpolazione (RMS).

2.4.2 Analisi della varianza a due vie (ANOVA)

La tabella ANOVA (Analisi della Varianza a due vie) permette di valutare con dati statistici l'influenza dei due fattori considerati (C/N e $u\%$) sulla variabile obiettivo.

L'analisi della varianza è un test basato su ipotesi. Si definisce sempre l'ipotesi nulla, definita come H_0 e l'ipotesi inversa definita come H_1 . L'obiettivo dell'ANOVA a due vie è quello di confermare le ipotesi nulle per ogni fattore (o nel caso contrario, di smentirle) (Montgomery, 2003).

Le ipotesi che possono essere considerate per le variabili rappresentate nelle righe (C/N) e nelle colonne ($u\%$) sono:

- H_0 : le medie di ogni riga (o colonna) sono uguali;
- H_1 : la media di almeno una riga (o colonna) è diversa.

In questo modo, stabilendo un fattore di accettabilità α , che generalmente assume un valore pari a 1, si valuta la validità dell'ipotesi confrontando tale fattore con la probabilità, p , di ottenere un valore uguale o differente rispetto a quello osservato, supposta vera l'ipotesi nulla. Pertanto, se $p > \alpha$ la differenza tra le variabili considerate non è statisticamente significativa,

mentre se $p \leq \alpha$ la differenza tra le variabili considerate è statisticamente significativa e l'ipotesi nulla non può essere considerata valida.

In letteratura sono presenti vari studi che utilizzano l'analisi fattoriale per valutare gli effetti di diversi parametri su opportune variabili. Ad esempio, nello studio condotto da Ramírez *et al* (2009) si utilizza tale metodo per stimare l'effetto del contenuto di azoto, di fosforo e di umidità sulla velocità di biodegradazione degli idrocarburi in un terreno inquinato. Invece, nel lavoro di Lahel *et al* (2016), si valuta l'influenza della concentrazione di diesel iniziale, del contenuto di umidità e della quantità di biomassa sulla concentrazione di CO₂ prodotta e sulla quantità di diesel rimosso.

2.5 Misure geofisiche

Per monitorare l'avanzamento del processo di biodegradazione, nei mesocosmi è stata inserita una sonda CS655 Soil Water Content Reflectometers CAMPBELL (*Figura 2.5.1*), che misura il contenuto di acqua medio presente nel sistema, la permittività dielettrica del bulk, la conducibilità del bulk e la temperatura del sistema.

2.5.1 Sonda geofisica

Le caratteristiche geometriche della sonda e gli intervalli di misura sono riportate in *Tabella 2.5.1* e in *Tabella 2.5.2*

Tabella 2.5.1 Caratteristiche geometriche della sonda CS655

Dimensioni CS655	
Aste degli elettrodi	Lunghezza: 120 mm Diametro: 3.2 mm Spazio tra i due elettrodi: 32 mm
Testa del sensore	Lunghezza: 85 mm Altezza: 63 mm Profondità: 18 mm



Figura 2.5.1 Sonda CS655 (Fonte: Instruction manual CS650 e CS655 Water Content Reflectometers)

Tabella 2.5.2 Intervallo di misura delle grandezze misurate dalla sonda CS655

Grandezze misurate	Range
Conducibilità elettrica del suolo	0 - 8 $\frac{dS}{m}$
Permittività dielettrica relativa	1-81
Contenuto di acqua volumetrico	0 – 100%
Temperatura del suolo	-50 - 70 °C

La sonda CS655 misura il contenuto di acqua volumetrico (*VWC*) e utilizza un oscillatore differenziale di tipo ECL (emitter-coupled logic), collegato alle due aste parallele in acciaio inossidabile.

Le aste formano una linea di trasmissione a estremità aperta in cui la velocità di propagazione dell'onda dipende dalla permittività dielettrica del mezzo che circonda le aste stesse. Con l'aumentare del contenuto di acqua, la velocità di propagazione diminuisce a causa dell'aumento della permittività dielettrica e di conseguenza si impiega più tempo a rilevare il segnale.

L'oscillatore ECL viene attivato dal ritorno del segnale riflesso dalla fine di una delle aste e la sua uscita, ad alta velocità, viene ridimensionata dal circuito digitale a una frequenza appropriata per essere misurata dal microprocessore.

Gli aumenti del periodo di oscillazione risultanti dall'attenuazione del segnale vengono corretti utilizzando una misurazione della conducibilità elettrica. Un'equazione di calibrazione permette di valutare tramite il periodo e la conducibilità elettrica la permittività dielettrica del sistema.

La misura del contenuto d'acqua nel suolo è influenzata principalmente dalla variazione della permittività dielettrica, ma anche dalla conducibilità elettrica. Gli ioni liberi nella soluzione acquosa presente nel suolo provocano l'attenuazione del segnale ad alta frequenza sulle barre del sensore, riducendone così l'ampiezza e la larghezza della banda. L'attenuazione riduce la frequenza di oscillazione poiché richiede un tempo maggiore per raggiungere la soglia di scatto dell'oscillatore. Per questo motivo è necessario avere una misura della conducibilità.

2.5.2 Grandezze misurate dalla sonda

La permittività del sistema si valuta tramite il modello CRIM (Complex Refractive Index Model) (Comegna *et al.*, 2013):

$$\epsilon = (\phi \cdot \sqrt{\epsilon_w} + (1 - \phi) \cdot \sqrt{\epsilon_m} + \phi \cdot (1 - S) \cdot \sqrt{\epsilon_d})^2 \quad (2.5.1)$$

Dove,

ϵ , la permittività relativa della miscela liquida (gasolio e soluzione salina acquosa) e della matrice porosa (suolo);

ϕ , la porosità del sistema;

ϵ_w , la permittività dielettrica della soluzione salina acquosa;

ϵ_m , la permittività dielettrica della matrice solida;

S , la saturazione d'acqua;

ϵ_d , la permittività dielettrica del diesel.

In *Tabella 2.5.3* si riportano i valori caratteristici di permittività:

Tabella 2.5.3 Permittività dielettrica (Casale *et al.*, 2018)

Permittività dielettrica	
Materiale	Valore
Suolo sabbioso secco	2.5-3
Suolo sabbioso saturo in acqua	25-30
Acqua (a 20°C)	78-79
Olio diesel	2.1-2.3

Il contenuto d'acqua è una grandezza scalare propria dei terreni e viene largamente utilizzato nella geotecnica e nella geologia soprattutto a causa della sua influenza sulle caratteristiche di resistenza meccanica dei terreni.

Esso è definito come la quantità, solitamente espressa in percentuale, di acqua presente nel terreno, M_w , rispetto alla fase solida M_s .

$$WC_w = \frac{M_w}{M_s} \cdot 100 \quad (2.5.2)$$

La sonda misura la permittività dielettrica quindi per determinare il contenuto d'acqua volumetrico viene utilizzata l'equazione di Topp *et al.* (1980):

$$\theta_V = -5.3 \cdot 10^{-2} + 2.92 \cdot 10^{-2} \cdot \epsilon - 5.5 \cdot 10^{-4} \cdot \epsilon^2 + 4.3 \cdot \epsilon^3 \quad (2.5.3)$$

Dove,

θ_V , contenuto di acqua volumetrico;

ϵ , permittività dielettrica del bulk.

Riportando il contenuto di acqua volumetrico in massico

$$WC_w = \theta_V \frac{d_w}{d_s} \quad (2.5.4)$$

Dove,

d_w , densità acqua (kg/m³);

d_s , densità apparente suolo (kg/m³).

È importante distinguere tra conducibilità elettrica del terreno, EC_{bulk} , e conducibilità elettrica della soluzione salina acquosa, EC_w . La loro relazione può essere espressa tramite l'equazione di Rhoades *et al* (1976)

$$EC_{bulk} = EC_w \cdot \theta_V \cdot T + EC_{solido} \quad (2.5.5)$$

Dove,

EC_{bulk} , conducibilità elettrica del terreno (suolo saturo in acqua e gasolio) (dS/m);

EC_w , conducibilità elettrica della soluzione acquosa con sali disciolti presente nel suolo (dS/m);

EC_{solido} , conducibilità del solido (dS/m);

T , coefficiente di trasmissione specifico per il suolo che tiene conto della tortuosità e del percorso del flusso all'interno della struttura porosa al variare del contenuto di acqua.

L'equazione di calibrazione nel sistema operativo CS655 corregge la frequenza di oscillazione per gli effetti di EC_w fino a 10 dS/m. Ciò equivale a valori EC_{bulk} di circa 2,7 dS/m (Instruction manual CS650 e CS655 Water Content Reflectometers).

Nel sistema in esame il contributo elettrolitico può essere considerato dato solo dalla soluzione acquosa, in quanto la conducibilità sia del solido che dell'olio è circa zero.

Non avendo quindi fenomeni di superficie è possibile applicare anche il modello di Archie per valutare l'efficacia della misura di conducibilità rilevata dalla sonda.

Il modello di Archie (1942) è una correlazione empirica, come la relazione vista in precedenza, tra la conducibilità del solido, la porosità e il grado di saturazione:

$$EC_{bulk} = a \cdot EC_w \cdot \rho^n \cdot S_w^m \quad (2.5.6)$$

Dove,

a , fattore di tortuosità (approssimato ad 1);

ρ , porosità del sistema (0.4);

S_w , saturazione della soluzione salina (0.49);

n , grado di cementazione della roccia;

m , esponente di saturazione (solitamente prossimo a 2 se il suolo è bagnato da acqua, mentre tra 3 e 4 se bagnato dall'olio).

L'esponente di cementazione n tiene conto di come la resistività elettrica aumenta al diminuire dell'interconnessione dei pori, poiché si assume che la superficie solida è non conduttiva. Per un sistema non tortuoso, l'esponente di cementazione è $n = 1$. Ma data la presenza di cammini preferenziali nella struttura si ha che $n > 1$. Quindi all'aumentare dell'esponente di cementazione n , la permeabilità della roccia diminuisce e la differenza tra conducibilità del bulk e della soluzione aumenta (Archie, 1941).

3. Risultati e discussione

I risultati, che di seguito verranno illustrati, hanno permesso di stimare l'avanzamento del processo di biostimolazione, valutando l'andamento di degradazione del gasolio presente nel suolo contaminato in 88 giorni per i microcosmi con 800 g di terreno, in 35 giorni per i microcosmi con 200 g di terreno e in 90 giorni per i mesocosmi con 3400 g di terreno.

3.1 Analisi respirometrica

L'analisi respirometrica della CO₂ prodotta permette di valutare la degradazione del diesel, tenendo in considerazione la reazione (2.3.6).



Tale analisi è stata condotta ogni due giorni.

3.1.1 Microcosmi con 800 g di terreno

Si analizzano i tre mesocosmi con 800 g di terreno, di seguito indicati come C/N=20, C/N=100, C/N=450, dato che il parametro che li contraddistingue è il differente apporto di nutrienti.

La quantità di CO₂ prodotta dai singoli campioni dopo 88 giorni è riportata nella *Figura 3.1.1*:

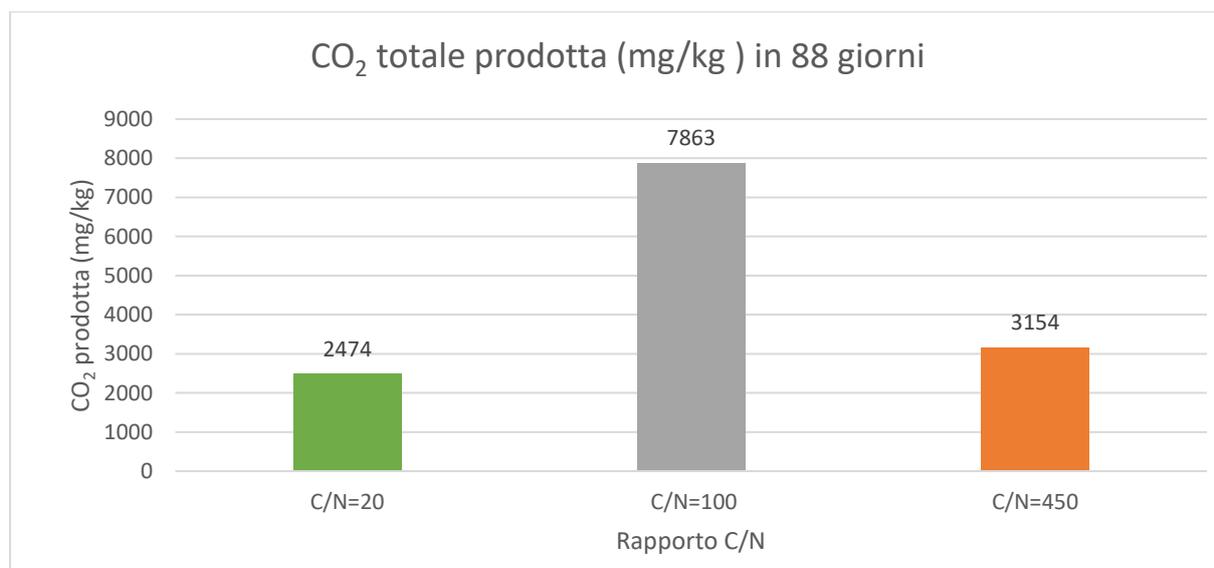


Figura 3.1.1 Quantità di CO₂ prodotta dai microcosmi con 800 g di terreno in 88 giorni

Da un'analisi della *Figura 3.1.1*, si nota come il quantitativo di azoto influisce sul processo di degradazione, in maniera negativa sia quando si è in carenza (C/N=450) che in eccesso (C/N=20).

Per il terreno analizzato il valore migliore risulta essere C/N=100, in quanto permette una produzione di CO₂ pari a 7.9 g/kg di suolo. Con C/N=20 si ha un valore di CO₂ pari a 2.5 g/kg, ossia un 1/3 del valore di C/N=100. Con C/N=450 si ha valore di CO₂ pari a 3.1 g/kg, ossia 2/5 del valore di C/N=100.

Dalla produzione di CO₂, mostrata nella *Figura 3.1.2*, si può notare che nei primi due giorni dall'allestimento delle prove non è stata osservata produzione di CO₂, che potrebbe indicare una mancata degradazione attribuibile all'adattamento dei microrganismi all'ambiente.

In tutti e tre i casi la produzione di CO₂ aumenta per 55 giorni, in seguito si è assistito ad una diminuzione della quantità prodotta e un assestamento al valore finale.

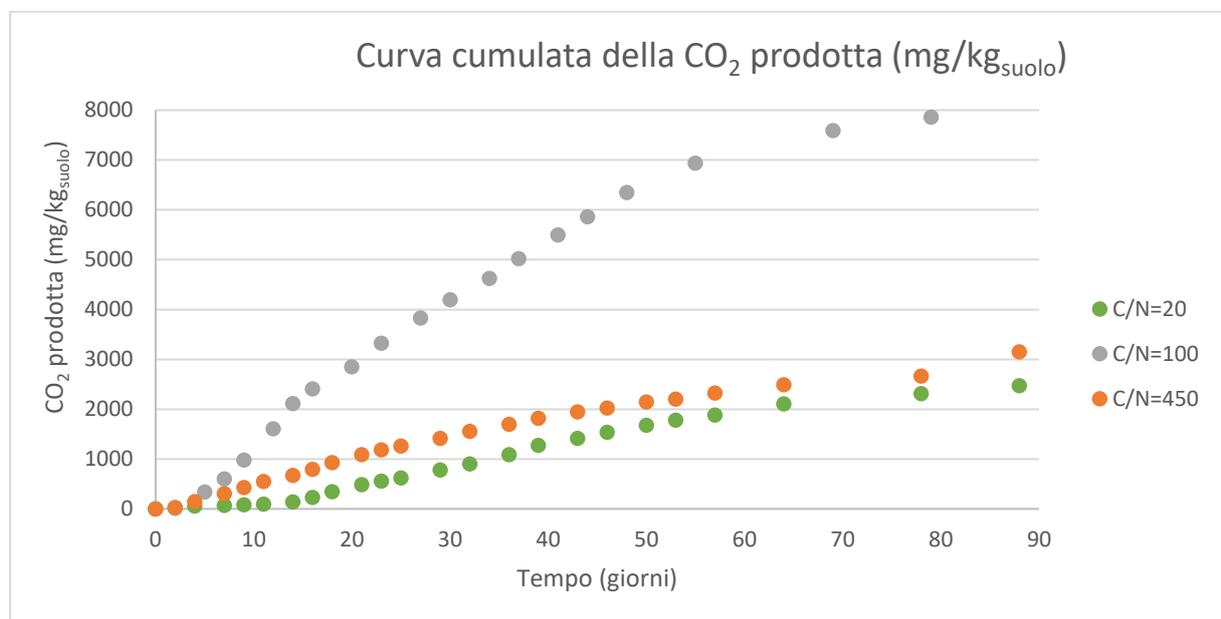


Figura 3.1.2 CO₂ cumulata in 88 giorni dai microcosmi con 800 g di terreno

La produzione di CO₂ è lineare. Per il C/N=100 si ha una produzione maggiore già dai primi giorni, che si può notare dalla maggiore pendenza della curva, rispetto agli altri due sistemi.

Nel caso del C/N=20 si nota una fase di latenza più lunga in quanto nei primi 14 giorni la velocità di produzione della CO₂ è minore rispetto ai giorni successivi.

Nell'ultimo tratto delle curve di tutti i microcosmi si assiste ad una diminuzione di pendenza segno che l'attività microbica è in calo, dovuta probabilmente al minor quantitativo di substrato nutritivo e/o alla riduzione della popolazione microbica.

Nelle figure seguenti (*Figure 3.1.3, 3.1.4, 3.1.5*) si mostra la fase di alta attività microbica di ogni campione, mettendo in evidenza l'andamento lineare.

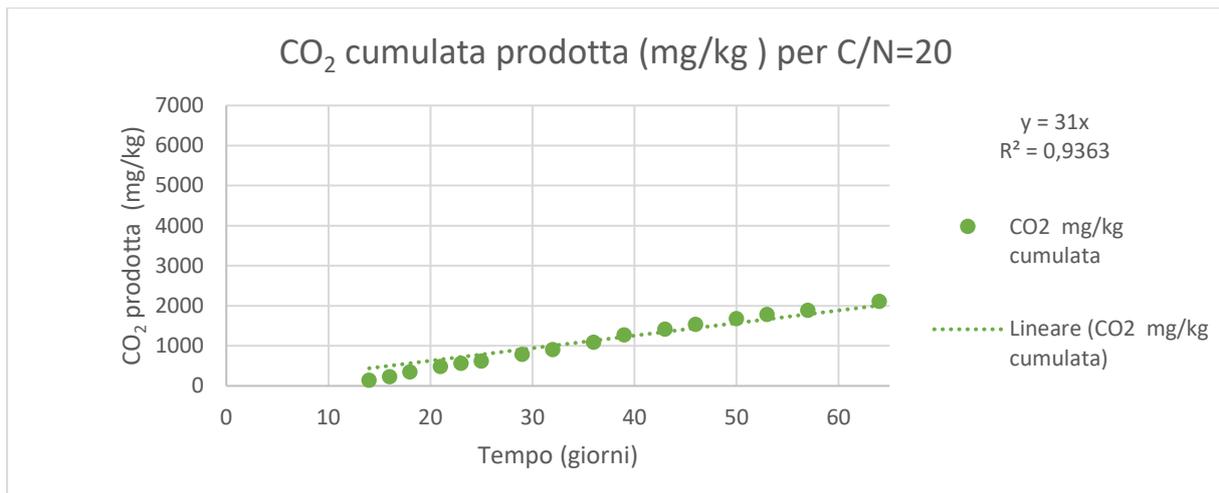


Figura 3.1.3 CO₂ cumulata per C/N=20

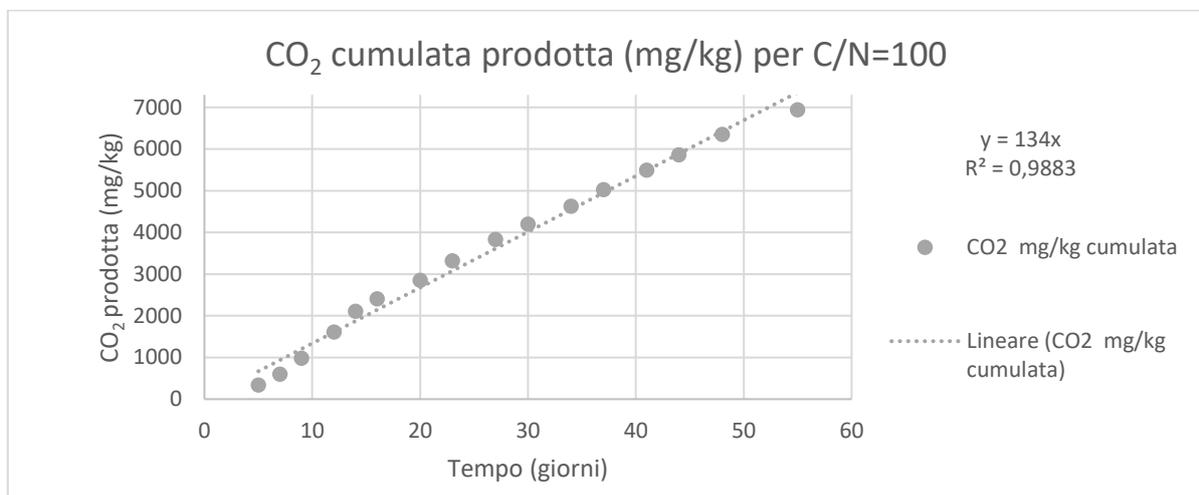


Figura 3.1.4 CO₂ cumulata per C/N=100

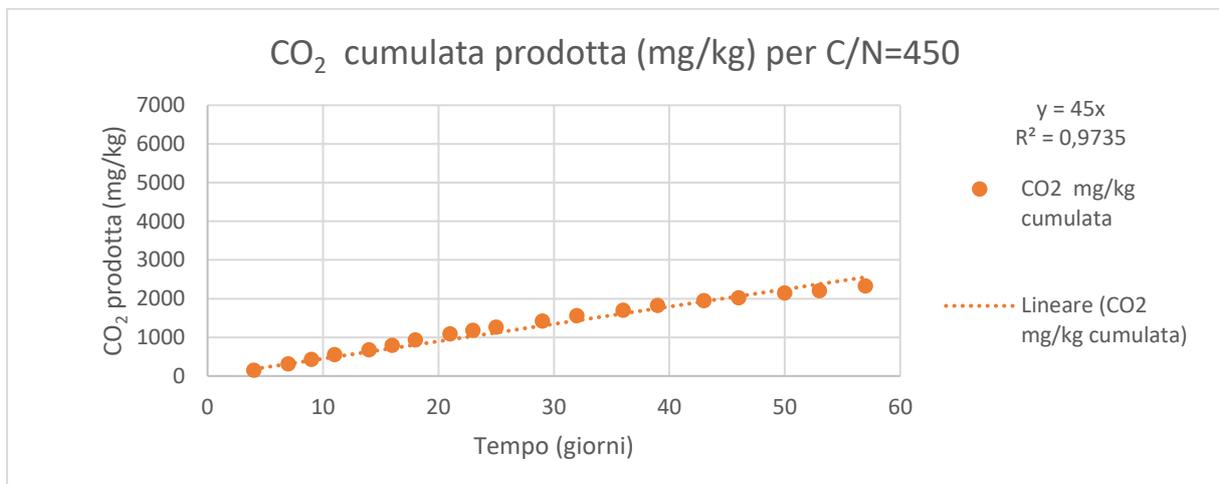


Figura 3.1.5 CO₂ cumulata per C/N=450

Dalle pendenze delle rette di interpolazione, m , si nota come C/N=100 ha una velocità di produzione di CO₂ nettamente superiore agli altri sistemi ($m_{C/N=100} = 134 \frac{mg}{kg \cdot d}$ contro $m_{C/N=20} = 31 \frac{mg}{kg \cdot d}$ e $m_{C/N=450} = 45 \frac{mg}{kg \cdot d}$). Osservando che la durata della fase dell'alta attività microbica è la medesima, mentre la produzione di CO₂ è sostanzialmente differente, risulta evidente che la definizione del rapporto C/N ottimale è un'operazione necessaria per avere una resa elevata del processo di degradazione.

Bisogna tenere in considerazione che la quantità di CO₂ misurata tramite titolazione non è una misura precisa della reale ossidazione degli idrocarburi presenti nel terreno, poiché si possono avere sovrastime o sottostime del quantitativo di gasolio rimosso. Ciò è dovuto a diverse cause: non tutto il substrato è completamente mineralizzato, si può avere una degradazione incompleta oppure si utilizza il substrato per la formazione di nuova biomassa (Horel and Schiewer, 2009).

3.1.2 Microcosmi con 200 g di terreno

I microcosmi con 200 g di terreno, che variano per il rapporto C/N e per l'umidità (si riporta la *Tabella 2.2.5*) sono stati analizzati per un periodo minore (35 giorni) rispetto ai precedenti microcosmi con 800 g di terreno.

Tabella 2.2.5 Microcosmi con 200 g di terreno al variare dell'umidità e del rapporto carbonio-azoto

U% in peso	8%	12%	15%
C/N	60	60	60
C/N	120	120	120
C/N	180	180	180
C/N	300	300	300

Si mostrano nelle *Figure 3.1.6 3.1.7 3.1.8* gli andamenti della CO₂ cumulata durante tutto il periodo di analisi. Si nota dalle curve che sono necessari due giorni per l'adattamento dei microrganismi all'ambiente, dopo di che si ha un aumento lineare della produzione di CO₂. Dato che i sistemi sono stati analizzati per 35 giorni, essi non raggiungono la fase di stazionarietà, pertanto non si osserva una diminuzione della pendenza delle curve nel tratto finale.

Dalle analisi respirometriche, si evince che i campioni che hanno prodotto una maggiore quantità di CO₂ sono quelli con C/N compresi tra 100 e 200, ossia 120 e 180.

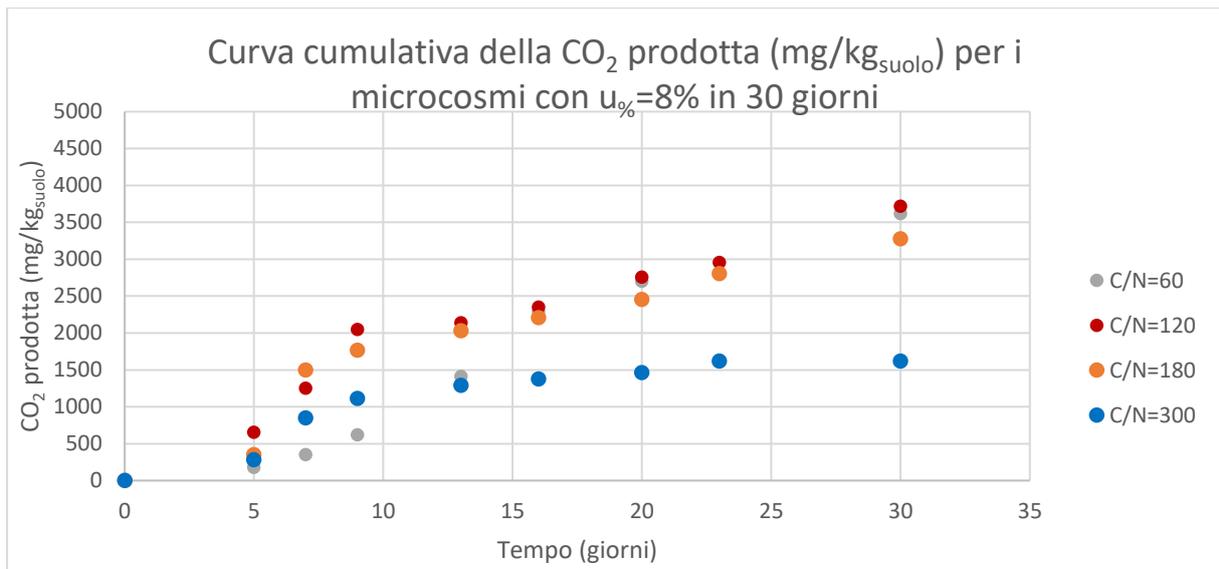


Figura 3.1.6 CO₂ cumulata per i sistemi con u_%=8%

Considerando i sistemi con umidità 8%, si nota che la velocità di produzione della CO₂ risulta essere più elevata per il sistema C/N=120, seguito da C/N=60 e da C/N=180. Si nota che la differenza tra i tre sistemi non è elevata, infatti si raggiunge una produzione di CO₂ dell'ordine dei 3000 mg/kg. Il C/N=60 ha un andamento caratterizzato da una fase iniziale più lunga, ma successivamente si ha un incremento della produzione di CO₂ fino al sedicesimo giorno. Dopo questa fase, la CO₂ prodotta risulta essere paragonabile a quella del C/N=180. Questo ritardo può essere dovuto alla maggiore quantità di nutrienti presenti nel terreno e che pertanto vengono consumati in tempi più lunghi.

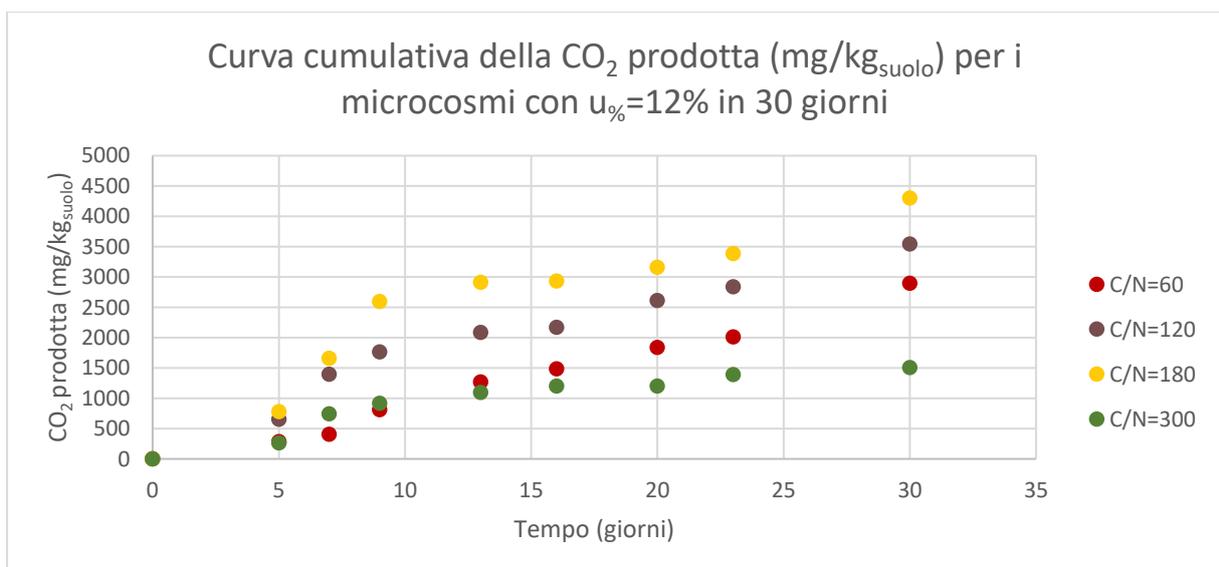


Figura 3.1.7 CO₂ cumulata per i sistemi con u_%=12%

In questi sistemi con umidità pari a 12%, la CO₂ prodotta è maggiore per C/N=180.

Anche in questo caso il microcosmo con C/N=60 impiega più tempo rispetto agli altri sistemi per raggiungere la fase con maggiore produzione di CO₂ ed avere un andamento simile agli altri sistemi. Il microcosmo con C/N=300, dopo una fase iniziale simile al C/N=60, riduce lo sviluppo di CO₂, a causa possibilmente di una minore quantità di nutrienti.

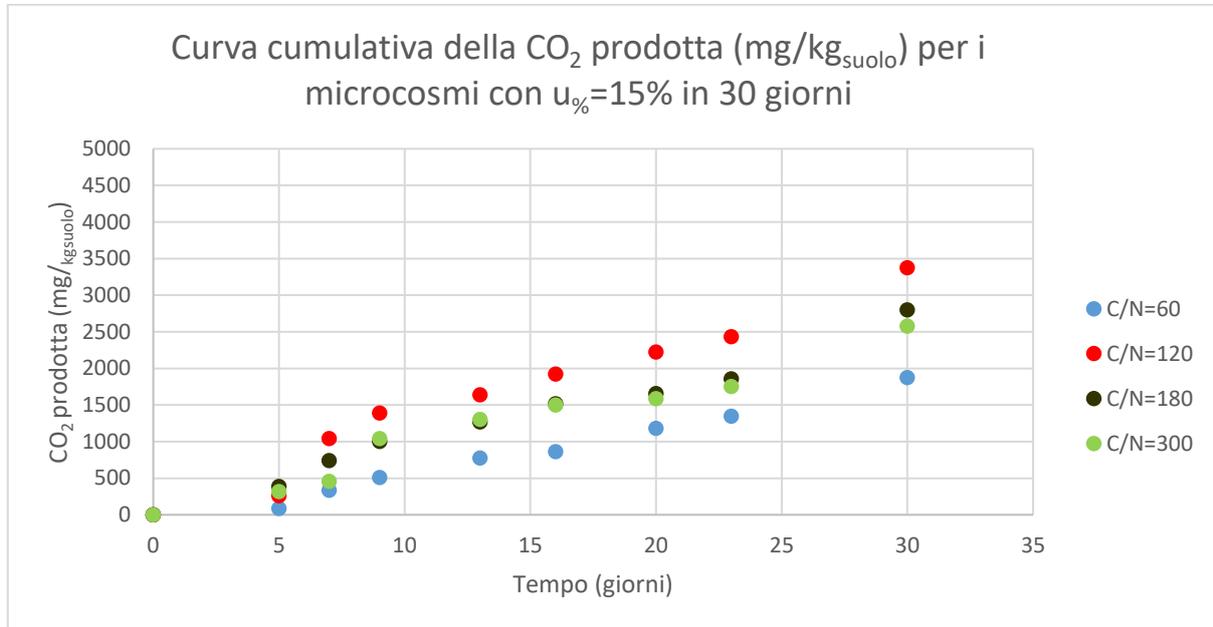


Figura 3.1.8 CO₂ cumulata per i sistemi con u_%=15%

Nei sistemi con u_%=15%, il C/N=120 è quello che presenta una maggiore produzione di CO₂, mentre il C/N=180 e il C/N=300 hanno degli andamenti simili dopo 9 giorni dall'inizio delle prove. Il sistema con C/N=60 produce la minore quantità di CO₂ possibilmente a causa dell'effetto congiunto dell'elevata umidità e dell'elevata concentrazione di nutrienti.

L'istogramma seguente (Figura 3.1.9) riassume in termini di CO₂ prodotta (mg/kg_{suolo}) in 30 giorni le analisi respirometriche dei singoli sistemi analizzati, al variare dell'umidità e del rapporto C/N.

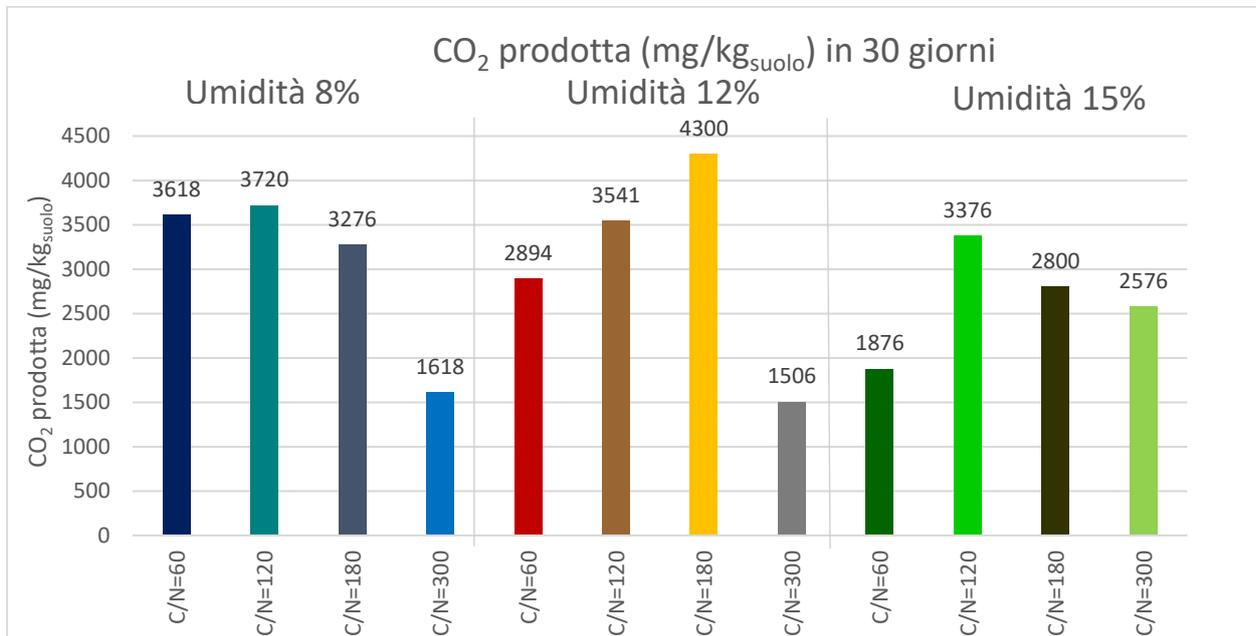


Figura 3.1.9 CO₂ prodotta (mg/kg_{suolo}) in 35 giorni dai microcosmi con 200 g di terreno

Si evince che il sistema migliore dal punto di vista dell'analisi respirometrica è il C/N=180 con umidità del 12%. Le condizioni più sfavorevoli si hanno con un'umidità pari a 15%, questo poiché la presenza di acqua nella struttura porosa, se in eccessive quantità, può rendere più difficoltosa la diffusione dell'ossigeno necessario ai microrganismi e portare alla formazione di un film liquido tra l'interfaccia substrato-biomassa, che può sfavorire così l'aerazione (Lahel *et al.*, 2016).

Le variazioni di produzione di CO₂ risultano per alcuni sistemi modeste, in un'ottica di ottimizzazione si preferisce selezionare il sistema con C/N=180 e umidità del 12%.

Paragonando i campioni migliori delle due prove, ossia il C/N=100 con u₀=12% e il C/N=180 con u₀=12%, per lo stesso tempo di degradazione (30 giorni), si osserva che il C/N=100 produce 4.2 g/kg di CO₂, contro i 4.3 g/kg di CO₂ prodotta dal C/N=180. Nella valutazione non si è tenuto in considerazione la differente geometria dei sistemi.

3.1.3 Mesocosmi con 3400 g di terreno

Le analisi respirometriche sui mesocosmi non hanno consentito di valutare la CO₂ prodotta dai microrganismi durante il processo degradativo. I fattori che hanno condizionato la misura della CO₂ possono essere l'elevato spazio di testa presente nelle colonne, necessario per alloggiare la sonda geofisica, che quindi non ha permesso il fluire della CO₂ nella drechsel, oppure l'eccessiva saturazione in acqua e gasolio del suolo, che non rende ottimali le condizioni per la crescita e lo sviluppo dei microrganismi.

Inoltre, come si è osservato grazie alla sperimentazione sui microcosmi, nei mesocosmi le condizioni nutritive (il rapporto C/N è pari a 450) non sono ottimali per lo sviluppo dei microrganismi e di conseguenza per la rimozione del contaminante.

3.2 Analisi dell'attività microbica

Nella prima fase di analisi si è misurata l'assorbanza dei campioni in cui è avvenuta la reazione di idrolisi del FDA (diacetato di fluoresceina) tramite lo spettrofotometro e solo successivamente si è correlato tale valore con la quantità di fluoresceina prodotta.

La fluoresceina si presenta di colore giallo, infatti anche già a livello visivo è possibile in prima approssimazione distinguere i campioni con maggiore attività (*Figura 3.2.1*).

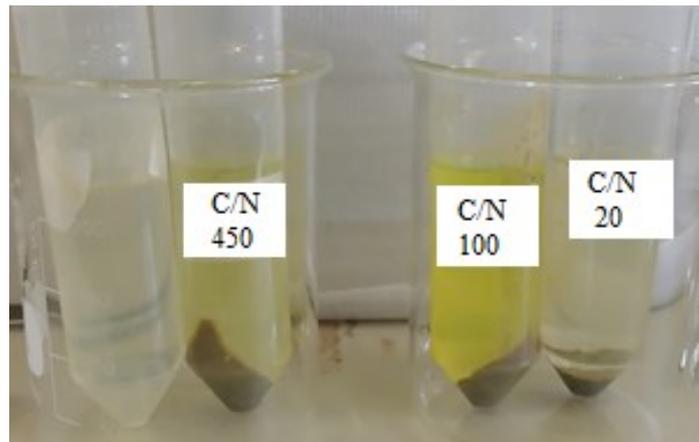


Figura 3.2.1 Confronto tra i campioni C/N=20, C/N=100, C/N=450 relativi all'analisi dell'attività microbica. Il colore della soluzione è dato dalla fluoresceina, maggiore è la concentrazione di fluoresceina, più gialla è la soluzione.

3.2.1 Microcosmi con 800 g di terreno

L'analisi del FDA è stata effettuata a partire dal ventesimo giorno per C/N=100 e dal ventinovesimo giorno per C/N=20 e C/N=450 dall'allestimento delle prove.

I valori misurati indicano che i vari campioni hanno un'elevata attività microbica e risultano essere pressoché costanti durante tutto il periodo di analisi, come mostrato nella *Tabella 3.2.1*.

I picchi più alti si sono registrati dopo 37 giorni per il C/N=100, dopo 32 giorni per il C/N=20 e dopo 78 giorni per C/N=450.

Il sistema con maggiore attività microbica è C/N=100 con un valore di assorbanza medio pari a 0.842; C/N=20 sembra avere una minore attività microbica con $\bar{A} = 0.058$; mentre per C/N=450 si ha $\bar{A} = 0.181$.

Tabella 3.2.1 Assorbanza dei microcosmi C/N=20, C/N=100 e C/N=450

	Assorbanza			
Tempo, giorni	C/N=20	C/N=450	Tempo, giorni	C/N=100
29	0.160	0.135	20	0.397
32	0.180	0.064	23	0.450
36	0.026	0.071	27	0.745
39	0.014	0.098	30	0.973
43	0.101	0.132	34	0.873
46	0.041	0.121	37	1.724
50	0.039	0.163	41	1.400
53	0.018	0.098	44	0.853
57	0.014	0.117	48	0.710
64	0.015	0.085	55	0.773
78	0.059	0.207	69	1.100
88	0.033	0.112	79	0.88

3.2.2 Microcosmi con 200 g di terreno

L'attività microbica dei microcosmi con 200 g di terreno è stata analizzata dal primo giorno di allestimento delle prove. Si riscontrano valori più bassi nei primi giorni di analisi, mentre si hanno valori più elevati con il proseguire del tempo. In media i valori risultano costanti, ciò significa che non si ha una netta crescita e/o diminuzione della popolazione microbica, ma si ha una situazione stazionaria. I valori più alti di assorbanza si hanno, anche in questo caso, in media tra il quattordicesimo e venticinquesimo giorno.

Tabella 3.2.2 Valori dell'assorbanza media dei microcosmi con 200 g di terreno al variare dell'umidità

u% in peso	Assorbanza media			
	C/N=60	C/N=120	C/N=180	C/N=300
8%	0.076	0.075	0.277	0.180
12%	0.040	0.201	0.349	0.089
15%	0.027	0.322	0.139	0.134

Dal confronto tra i valori medi di assorbanza di tutti i campioni con umidità differente (*Tabella 3.2.2*), si nota che il campione con minore attività microbica è il C/N=60 ($\bar{A} = 0.047$), successivamente si ha C/N=300 ($\bar{A} = 0.135$), C/N=120 ($\bar{A} = 0.199$) e infine il campione con maggiore attività è il C/N=180 ($\bar{A} = 0.255$).

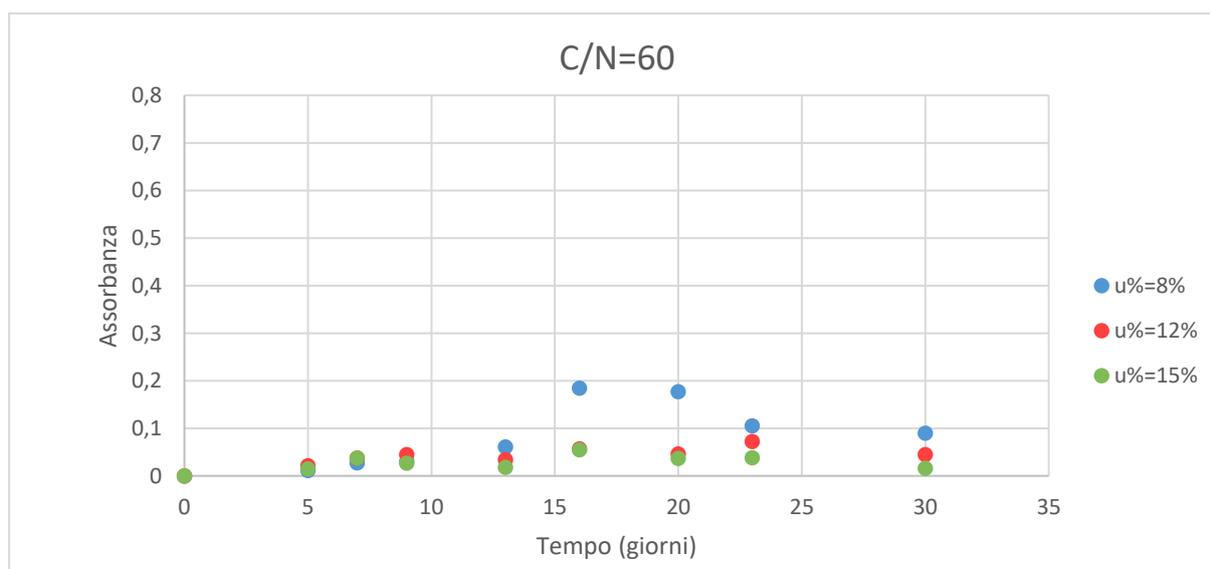


Figura 3.2.2 Assorbanza del microcosmo con C/N=60 al variare dell'umidità

Dalla *Figura 3.2.2* si osserva che il microcosmo con C/N=60, come già illustrato, presenta valori di assorbanza più bassi rispetto agli altri microcosmi, segno di una minore attività

microbica, soprattutto nei primi nove giorni. Come riscontrato nelle analisi respirometriche, la fase iniziale risulta essere più lunga, pertanto i valori di assorbanza intorno a 0.050 sono in linea con questa fase di latenza. Dopo circa 15 giorni, si nota una maggiore attività microbica soprattutto in condizioni di umidità pari ad 8%.

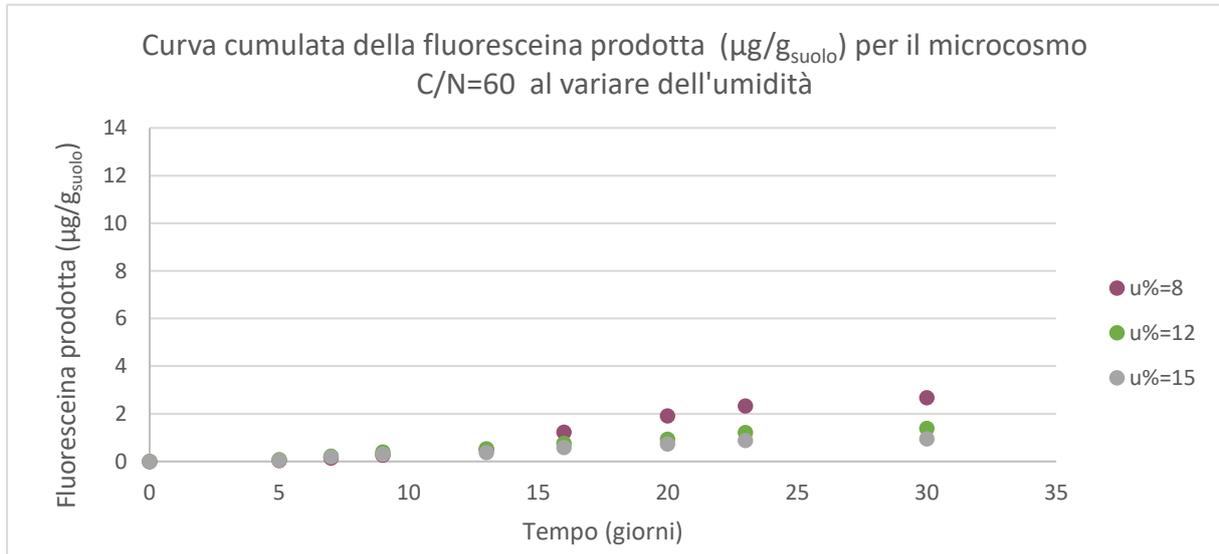


Figura 3.2.3 Fluoresceina del microcosmo con C/N=60 al variare dell'umidità

L'andamento della curva della fluoresceina prodotta (Figura 3.2.3) è in linea con i valori di assorbanza misurati, infatti, il microcosmo con umidità dell'8% produce una quantità di fluoresceina maggiore. Tra i tre microcosmi, però, non si nota una netta differenza e la concentrazione di fluoresceina prodotta è bassa rispetto agli altri sistemi con differente rapporto C/N.

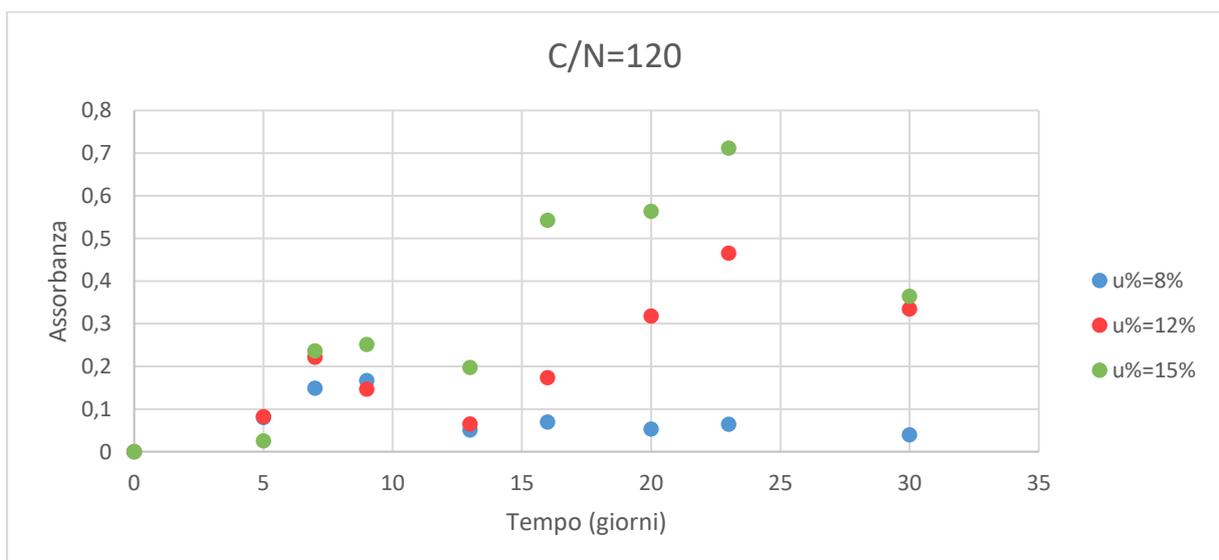


Figura 3.2.4 Assorbanza del microcosmo con C/N=120 al variare dell'umidità

In *Figura 3.2.4* è riportata l'assorbanza misurata per C/N=120. Tali valori di assorbanza non rispecchiano l'andamento delle misure della CO₂ prodotta, in quanto si notano valori più elevati con un'umidità del 15%, mentre per quanto riguarda l'analisi respirometrica risulta essere la condizione peggiore. Complessivamente le misure danno dei valori superiori a 0.050, già dopo due giorni, e i picchi si hanno in corrispondenza del ventitreesimo giorno per $u_{\%} = 15\%$ con $A = 0.712$ e per $u_{\%} = 12\%$ con $A = 0.466$, invece, del nono giorno per $u_{\%} = 8\%$ con $A = 0.147$.

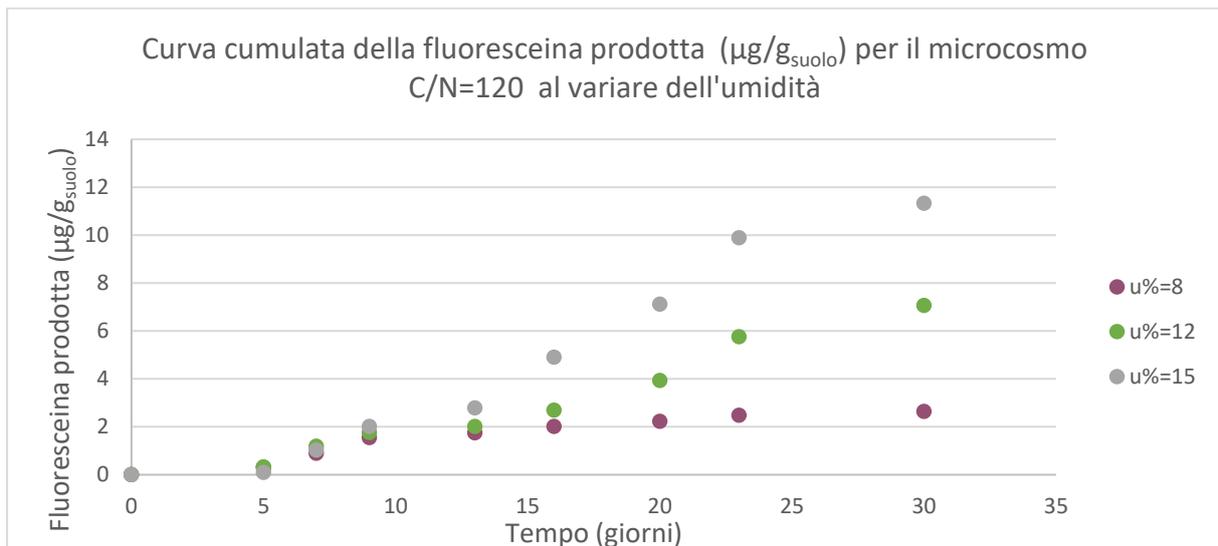


Figura 3.2.5 Fluoresceina del microcosmo con C/N=120 al variare dell'umidità

Si osserva dalla *Figura 3.2.5* che il quantitativo di fluoresceina prodotta è elevato. Il microcosmo con $u_{\%}=15\%$ produce circa $11 \mu\text{g/g}_{\text{suolo}}$ di fluoresceina, mentre i microcosmi con $u_{\%}=12\%$ e con $u_{\%}=8\%$ producono, rispettivamente, $7 \mu\text{g/g}_{\text{suolo}}$ e $3 \mu\text{g/g}_{\text{suolo}}$, segno che l'attività microbica in tali sistemi è alta. Infatti, sia dall'analisi respirometrica, che, come verrà illustrato nel capitolo 3.3 *Rimozione degli idrocarburi*, dall'analisi del gasolio residuo, nei microcosmi con C/N=120 il processo degradativo è efficace.

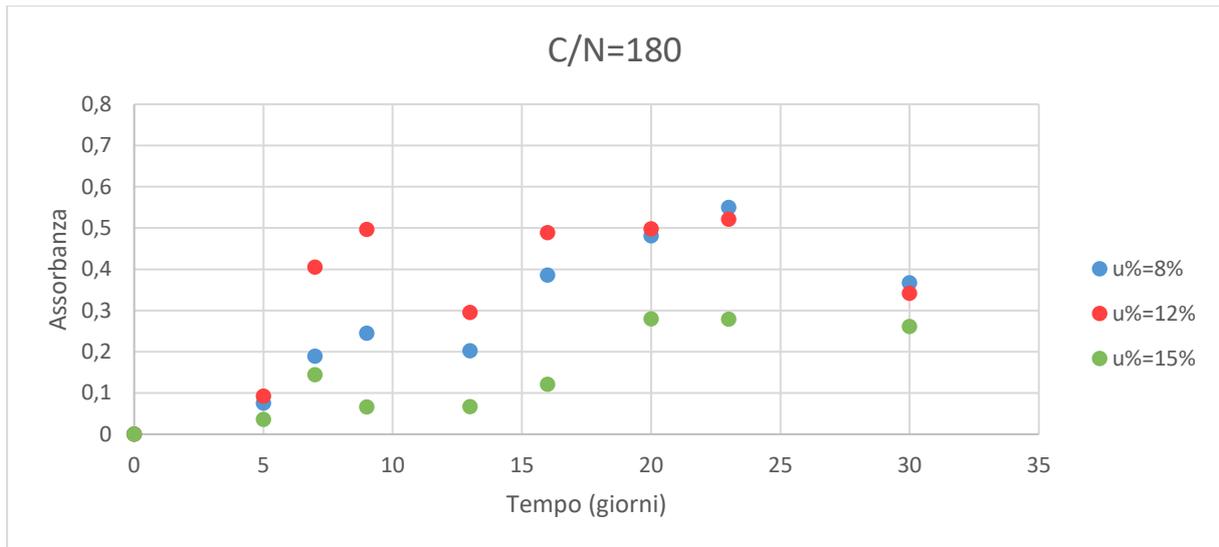


Figura 3.2.6 Assorbanza del microcosmo con C/N=180 al variare dell'umidità

Nella *Figura 3.2.6* si nota che i microcosmi con C/N=180 sono soggetti ad una maggiore attività microbica, raggiungendo valori elevati di assorbanza in pochi giorni. Il campione con l'umidità del 12% mantiene un'attività microbica costante dopo 13 giorni, mentre l'attività dei campioni con umidità del 8% cresce in maniera più graduale, registrando il valore più alto ($A = 0.550$) dopo 23 giorni.

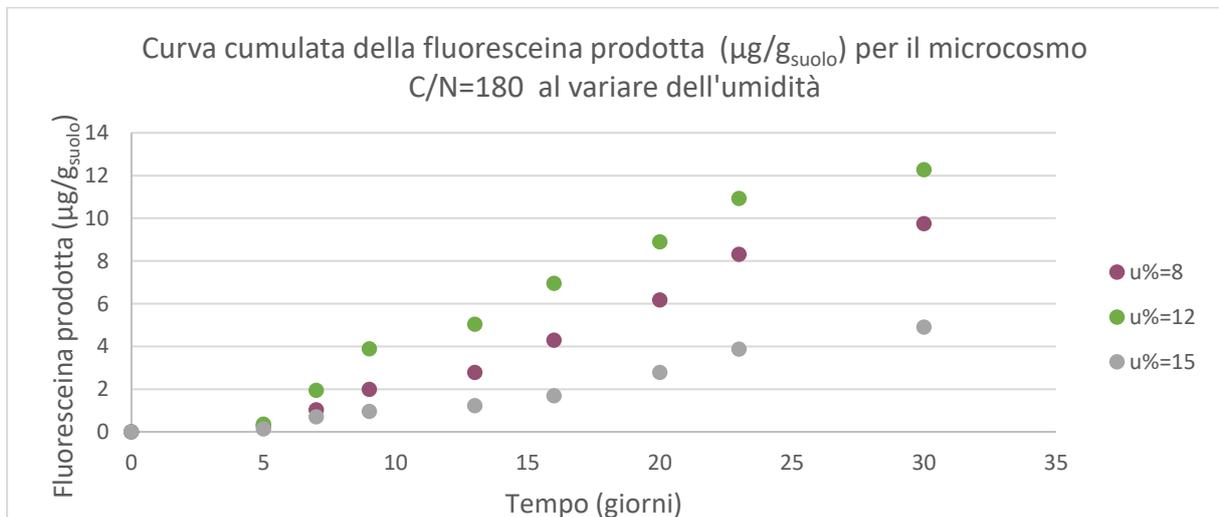


Figura 3.2.7 Fluoresceina del microcosmo con C/N=180 al variare dell'umidità

Si osserva dalla *Figura 3.2.7* che l'attività microbica dei microcosmi con $u\%=12\%$ e con $u\%=8\%$ è molto elevata, infatti la velocità di produzione della fluoresceina è maggiore rispetto agli altri microcosmi con differente rapporto C/N.

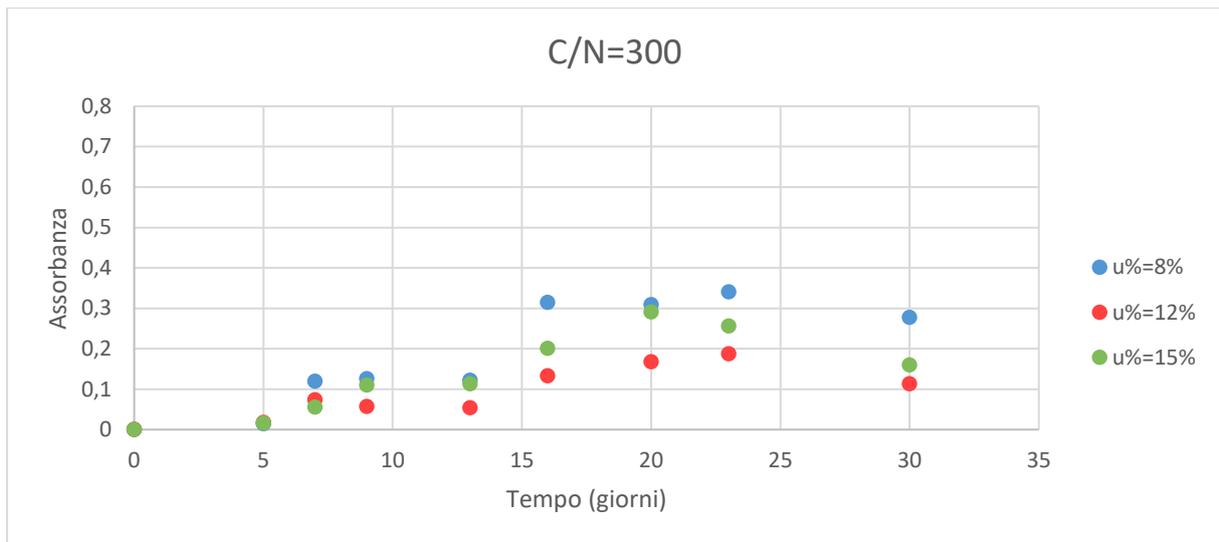


Figura 3.2.8 Assorbanza del microcosmo con C/N=300 al variare dell'umidità

I microcosmi con C/N=300, mostrati in *Figura 3.2.8* registrano una minore attività microbica rispetto agli altri campioni. In questo caso si nota come l'attività microbica tende ad essere la medesima per tutte e tre le condizioni di umidità, con piccole oscillazioni nelle misure dell'assorbanza (± 0.05).

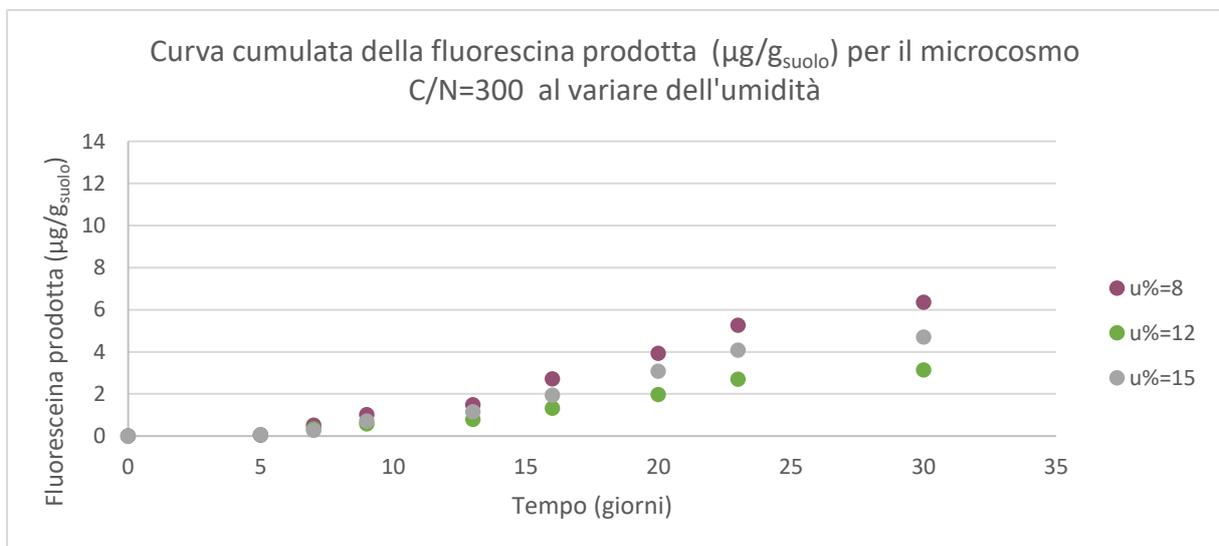


Figura 3.2.9 Fluoresceina del microcosmo con C/N=300 al variare dell'umidità

Le curve cumulate della fluoresceina prodotta dei microcosmi con C/N=300 (*Figura 3.2.9*) hanno gli stessi andamenti. Rispetto agli altri microcosmi la produzione di fluoresceina è minore, eccetto i sistemi con C/N=60, dove l'attività microbica risulta essere più bassa.

3.2.3 Mesocosmi con 3400 g di terreno

Per i mesocosmi con 3400 g di terreno i valori di assorbanza e di fluoresceina prodotta, mostrati in *Figura 3.2.10* e in *Figura 3.2.11*, sono stati misurati prelevando i campioni nei diversi strati della colonna, come illustrato nel paragrafo 2.3 *Campionamento terreno*. Le analisi sono state condotte solo al termine della prova durata 90 giorni.

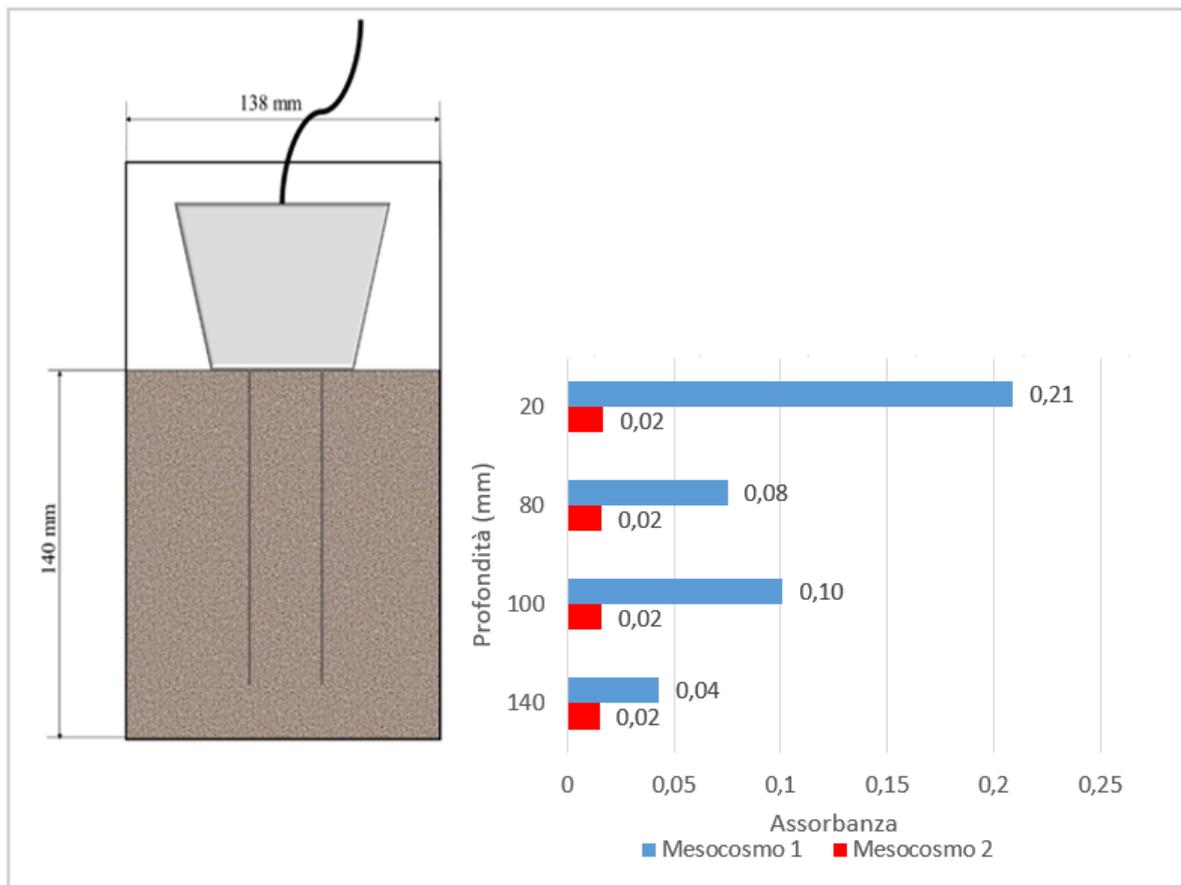


Figura 3.2.10 Assorbanza dei mesocosmi in funzione della profondità a t=90 giorni

L'assorbanza misurata nel mesocosmo 1 varia a seconda della profondità. In particolare, la maggiore attività microbica si è registrata in superficie ed è paragonabile a quella presente nei microcosmi, soprattutto con C/N=450 che ha le medesime condizioni ($\bar{A}_{C/N=450} = 0.181$ e $\bar{A}_{Mes\ 1} = 0.107$).

L'attività microbica della mesocosmo 2 risulta essere più bassa rispetto a quella del mesocosmo 1 e omogenea in tutti gli strati, anche nel prelievo effettuato a 100 mm dalla superficie in corrispondenza di una colonia microbica. Le cause possono essere differenti come la mancanza di ossigeno, dato che tale mesocosmo non è stata aerato e/o la non perfetta miscelazione delle fasi liquide.

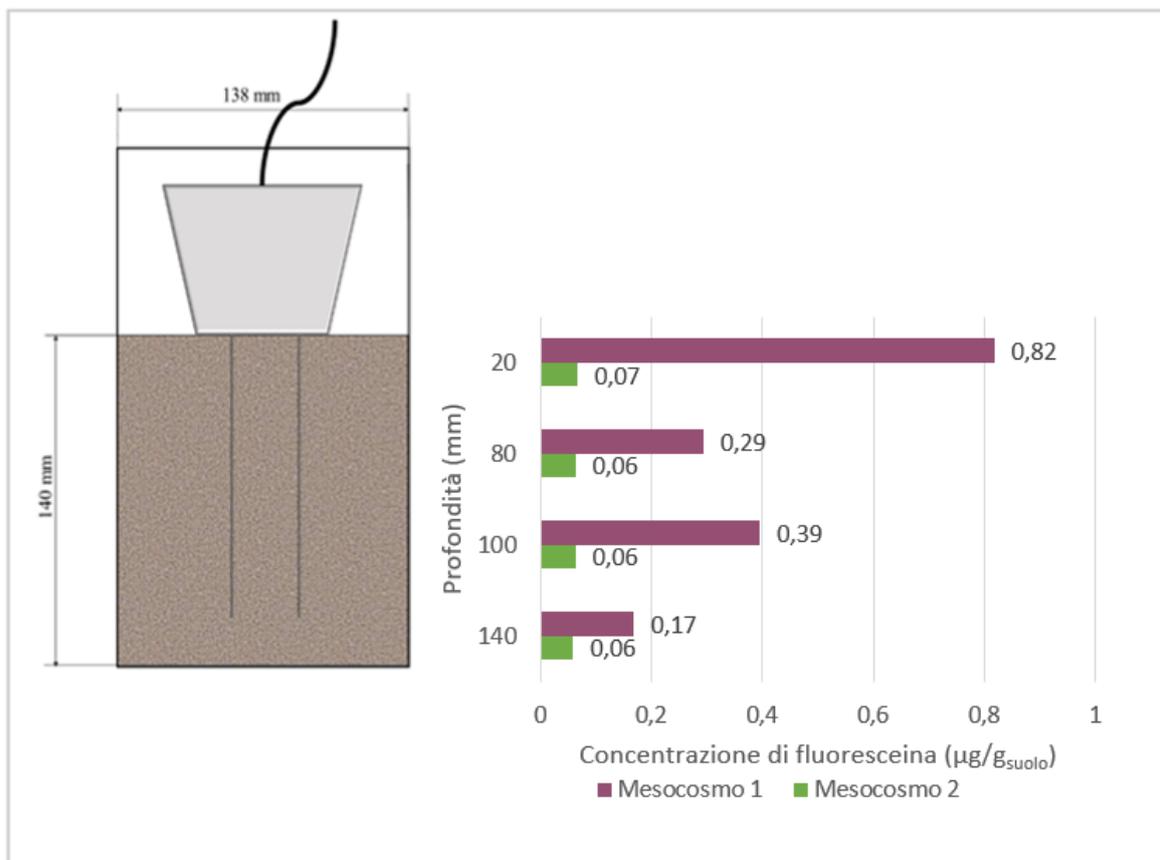


Figura 3.2.11 Fluoresceina prodotta ($\mu\text{g}/\text{g}_{\text{suolo}}$) dei mesocosmi in funzione della profondità a $t=90$ giorni

La fluoresceina prodotta nei vari strati delle colonne è concorde con i valori di assorbanza misurati. Nel mesocosmo 1 si ha una maggiore attività microbica in superficie, infatti si producono $0.82 \mu\text{g}/\text{g}_{\text{suolo}}$ di fluoresceina, mentre nel mesocosmo 2 la produzione di fluoresceina è uniforme nei vari strati ed è pari a $0.06 \mu\text{g}/\text{g}_{\text{suolo}}$.

3.3 Rimozione degli idrocarburi

Una valutazione più specifica della concentrazione di diesel degradato è stata fatta tramite l'analisi al gascromatografo (GC), che ha permesso di determinare la concentrazione di gasolio residuo in ogni sistema, paragonando i campioni provenienti dalla procedura di estrazione, a soluzioni di diesel in acetone ed esano a concentrazione nota.

Si riporta nella *Figura 3.3.1*, come esempio, una retta di taratura utilizzata durante l'analisi.

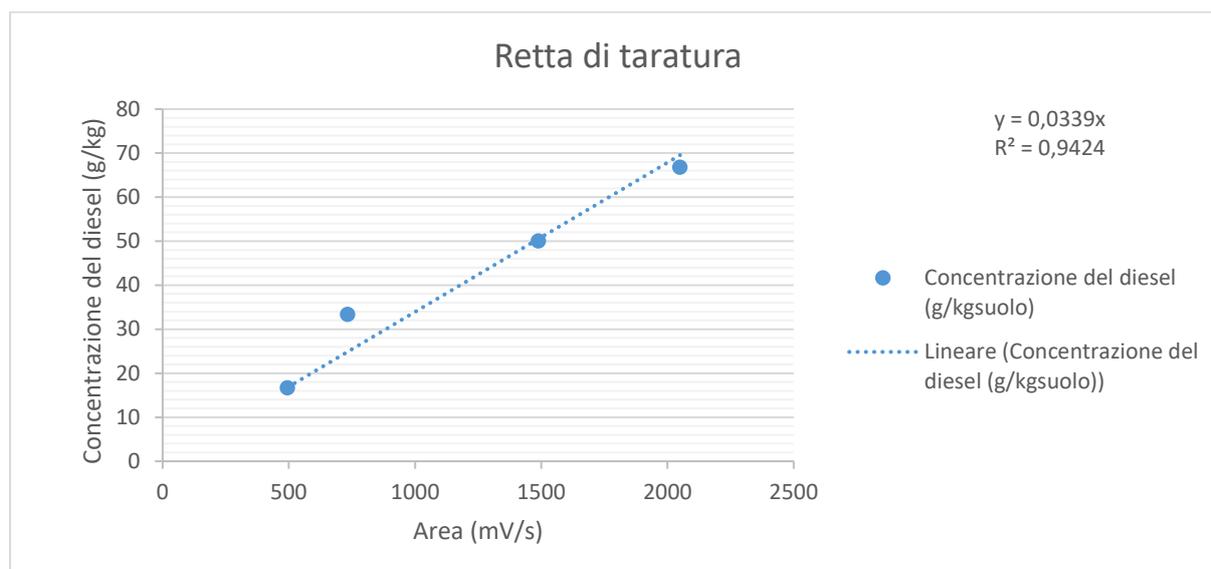


Figura 3.3.1 Retta di taratura

Grazie all'utilizzo degli standard per l'analisi al GC è stato possibile identificare gli idrocarburi saturi dal C-7 al C-30 e gli aromatici PAH che rappresentano la miscela idrocarburica di cui è costituito il diesel.

Si sono presi in considerazione i composti presenti nell'intervallo di ritenzione tra 6 e 33 minuti, poiché meglio rappresentano il gasolio presente nei sistemi, escludendo i picchi dell'intervallo da 4 a 5 minuti poiché sono dovuti a sostanze organiche presenti nel terreno. Infatti, analizzando un campione di terreno non contaminato nell'intervallo di ritenzione compreso tra 4-5 minuti, si sono registrati due picchi non presenti nei campioni con solo solvente e gasolio.

Si riporta in *Figura 3.3.2* il cromatogramma del punto iniziale, confrontato con lo standard degli idrocarburi saturi e in *Figura 3.3.3* lo stesso cromatogramma confrontato con lo standard degli idrocarburi policiclici aromatici. Il punto iniziale è un campione contaminato con gasolio al 7% che non ha subito degradazione, pertanto presenta una concentrazione di diesel pari a 7 g/kg_{suolo}.

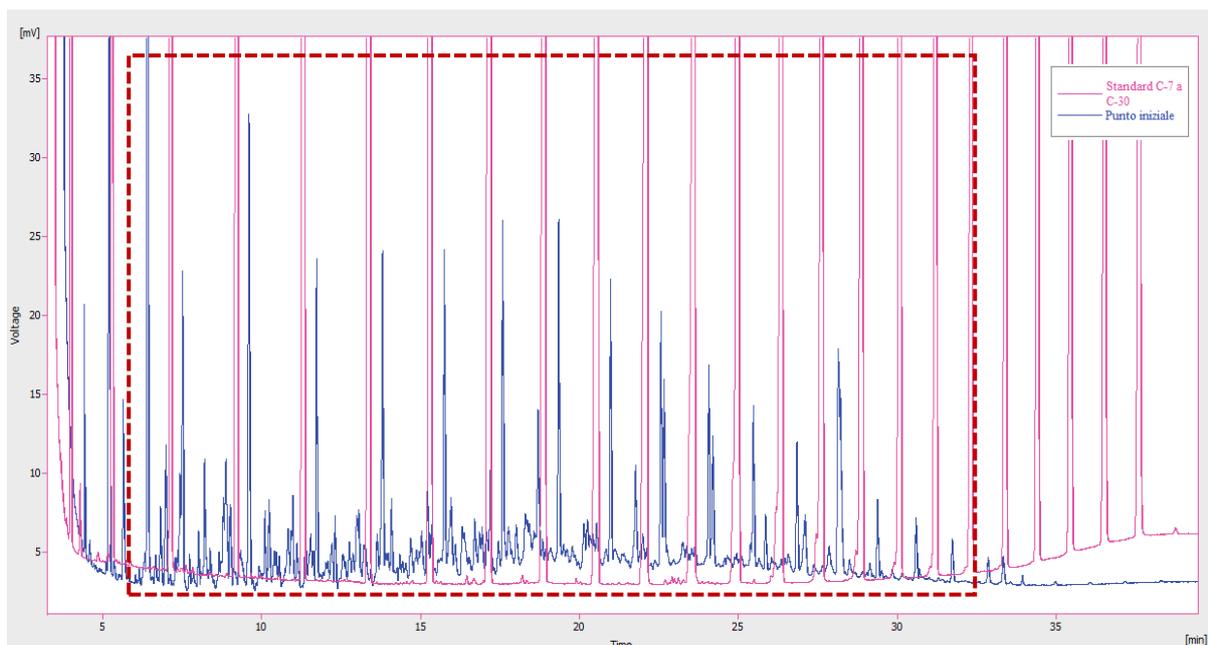


Figura 3.3.2 Confronto tra il cromatogramma del punto iniziale e dello standard degli idrocarburi da C-7 a C-30

Dal confronto tra i due cromatogrammi, si nota come gli idrocarburi di cui è composto il diesel sono quelli compresi tra C-8 e C-24 (evidenziati con il riquadro tratteggiato), tra questi quelli che sono in maggiore quantità sono gli idrocarburi compresi tra C-11 e C-20 dato che si registrano dei picchi più elevati.

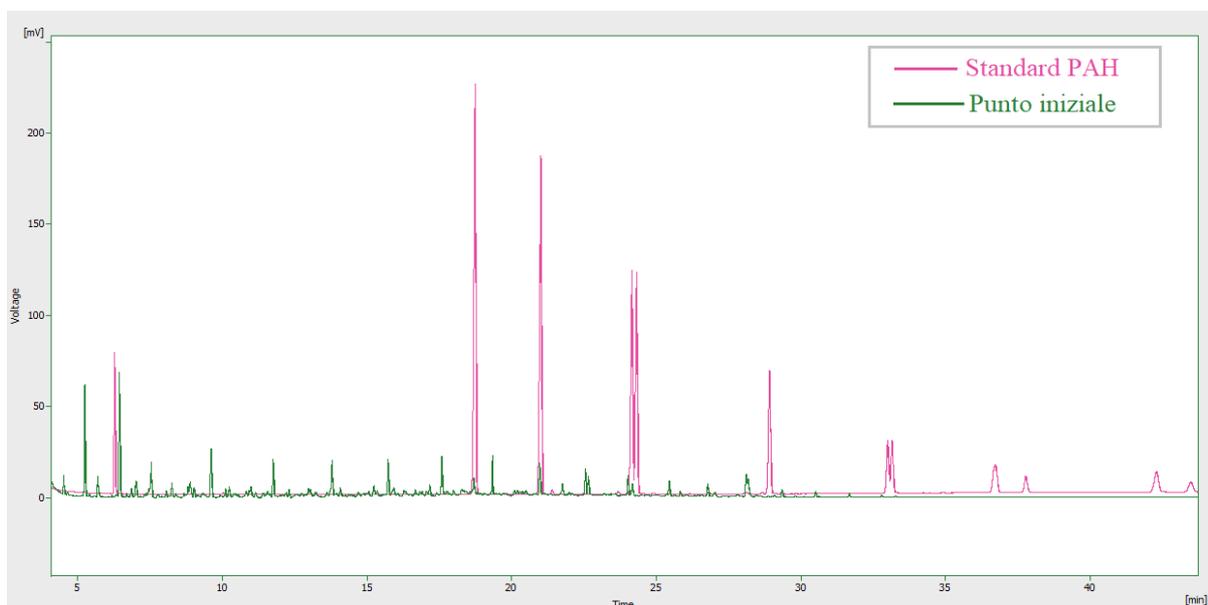


Figura 3.3.3 Confronto tra il cromatogramma del punto iniziale e dello standard dei PAH

Dalla *Figura 3.3.3* si osserva che gli idrocarburi policiclici aromatici presenti nel diesel sono: Acenafilene ($C_{12}H_8$), Fluorene ($C_{13}H_{10}$), Fenantrene ($C_{14}H_{10}$), Antracene ($C_{14}H_{10}$), Pirene ($C_{16}H_{10}$), Benzo(a)antracene ($C_{18}H_{12}$).

3.3.1 Microcosmi con 800 g di terreno

La percentuale di gasolio degradato per i microcosmi con 800 g di terreno, considerando un tempo di degradazione pari a 84 giorni, risulta essere del 33.7% per C/N=20, del 38.7% per C/N=100 e del 34.2% per C/N=450, come mostrato nella *Figura 3.3.4*.

Questi dati sono stati ottenuti valutando il quantitativo di diesel residuo al tempo di analisi e quello presente nel campione al tempo zero, secondo l'*Equazione 3.3.1*.

$$\text{Diesel rimosso} = \frac{C_0 - C_t}{C_0} \cdot 100 \quad (3.3.1)$$

Dove,

C_0 , concentrazione diesel a $t = 0$ (g/kg_{suolo});

C_t , concentrazione diesel al tempo di analisi t (g/kg_{suolo}).

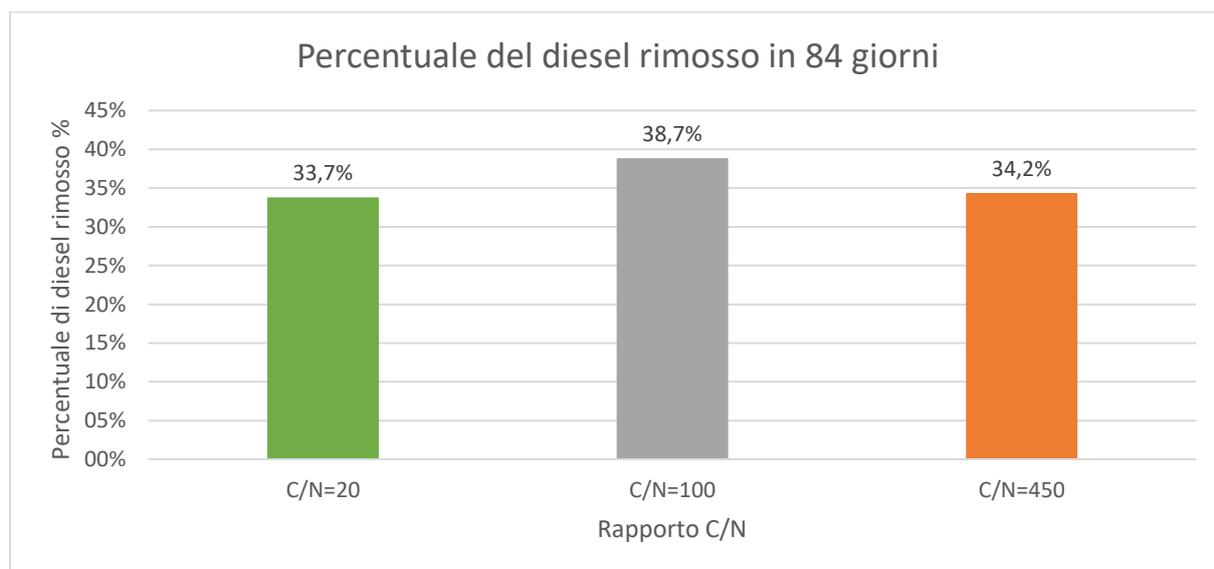


Figura 3.3.4 Percentuale del diesel rimosso in 84 giorni per i microcosmi con C/N=20, C/N=100 e C/N=450

La quantità di diesel rimossa risulta essere concorde con le altre analisi effettuate, ossia il sistema in cui la biostimolazione si è rilevata più efficace risulta essere il C/N=100.

Al contrario dell'analisi respirometrica, però, non si riscontra un'elevata differenza tra i tre sistemi, poiché la percentuale di inquinante degradato risulta essere per tutti dell'ordine del 30%, mentre secondo le analisi respirometriche la CO₂ prodotta per C/N=20 è 1/3 del valore di C/N=100 e per C/N=450 è 2/5 del valore di C/N=100.

Facendo un calcolo teorico della CO₂ degradata (considerando la reazione (2.3.6)), si ha che la CO₂ prodotta nell'ossidazione del diesel per C/N=20 è 72 g/kg_{suolo}, per C/N=100 è 83 g/kg_{suolo}

e per C/N=450 è 73 g/kg_{suolo}, contro, rispettivamente, 2 g/kg_{suolo}, 8 g/kg_{suolo} e 3 g/kg_{suolo} di CO₂ misurata con l'analisi respirometrica. Questa grande variazione della concentrazione di CO₂ dimostra come l'analisi respirometrica sia solo indicativa della cinetica di degradazione, come già evidenziato nel paragrafo 3.1 *Analisi respirometriche*.

I singoli idrocarburi sono stati identificati, noti i tempi di ritenzione, utilizzando gli standard.

Nella *Figura 3.3.5* è rappresentata la percentuale di idrocarburi rimossi nei differenti campioni, prendendo come riferimento solo gli idrocarburi rappresentati con gli standard e non considerando tutti i picchi del cromatogramma. Si nota come il composto in media maggiormente degradato è il C-8, proprio perché il componente più volatile. All'aumentare della complessità della molecola, si ha una minore percentuale di degradazione.

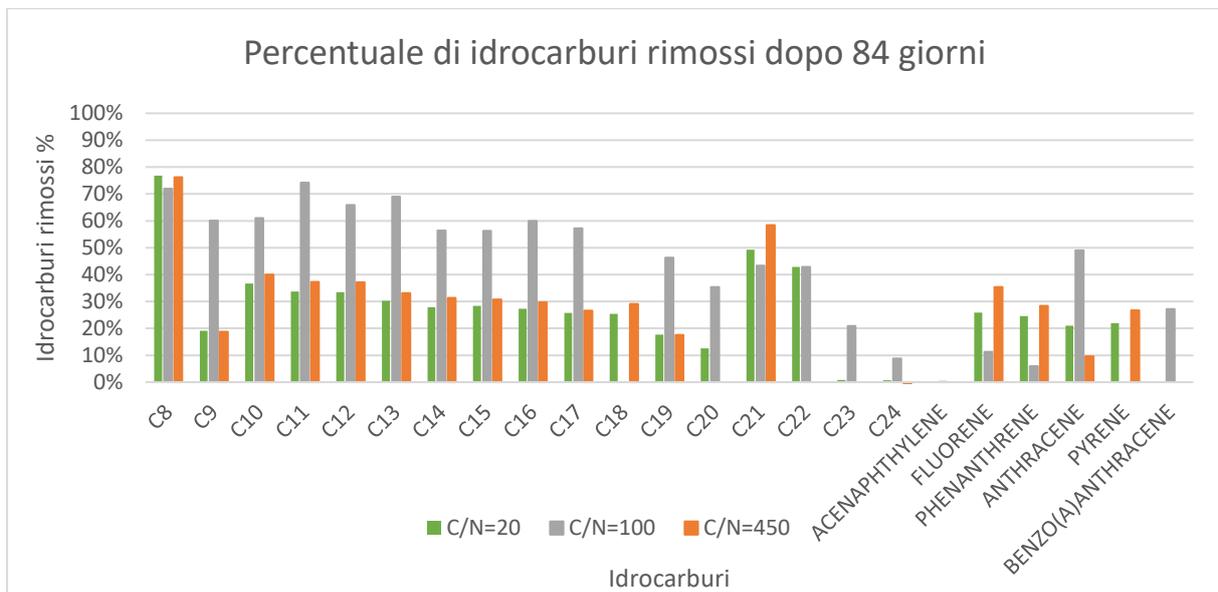


Figura 3.3.5 Percentuale di degradazione dei singoli idrocarburi in 84 giorni per i microcosmi con C/N=20, C/N=100 e C/N=450

3.3.2 Microcosmi con 200 g di terreno

La percentuale di gasolio degradato in 35 giorni per i microcosmi con 200 g di terreno è stata determinata secondo l'Equazione 3.3.1 ed è riportata nella Figura 3.3.7:

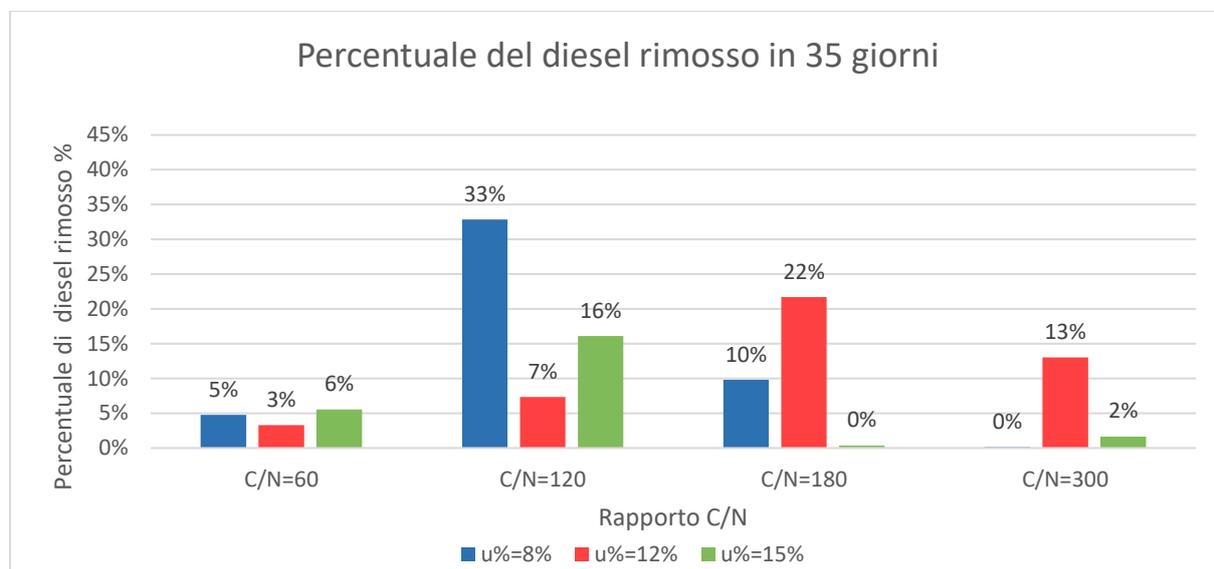


Figura 3.3.7 Percentuale del diesel rimosso in 35 giorni per i microcosmi con 200 g di terreno

Nel microcosmo con C/N=120 e contenuto di umidità del 8% si ha una degradazione del diesel confrontabile con i microcosmi con 800 g di terreno, ossia dell'ordine del 30%, anche se il tempo di degradazione è minore. Invece, la concentrazione di gasolio rimosso negli altri sistemi risulta essere molto più bassa.

La correlazione con le altre analisi è anche in questo caso evidente, infatti i sistemi C/N=120 u%=8% e C/N=180 u%=12% sono quelli che presentano una maggiore percentuale di degradazione. C/N=60 e C/N=300 hanno delle percentuali di degradazione molto basse, dovute anche al breve tempo di degradazione.

Negli istogrammi seguenti (Figure 3.3.8, 3.3.9, 3.3.10) si mostrano le percentuali di degradazione dei singoli idrocarburi per tutti i campioni analizzati.

In generale, si osserva che il composto più volatile (C-8) è rimosso in maggiori quantità con una percentuale di rimozione dell'ordine dell'80% in tutti i microcosmi. Le percentuali di rimozione degli altri idrocarburi, invece, variano a seconda delle condizioni chimico-fisiche presenti, ossia rapporto C/N e contenuto di umidità.

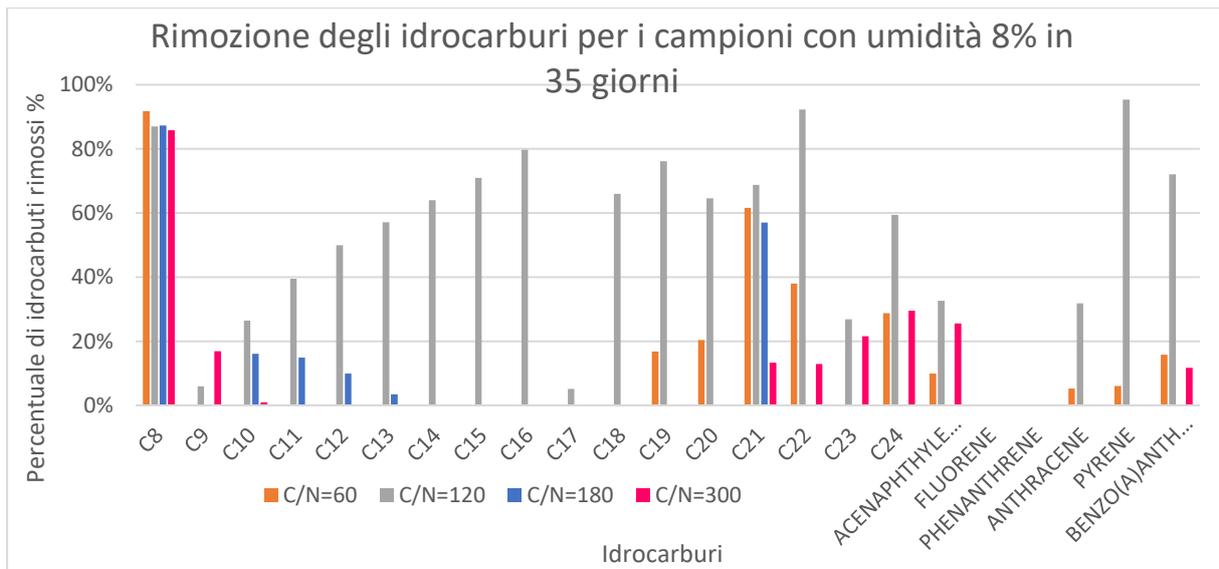


Figura 3.3.8 Percentuale di rimozione degli idrocarburi per i microcosmi con $u_0=8\%$

Nella *Figura 3.3.8* si rappresenta la percentuale di rimozione dei microcosmi con un contenuto di umidità pari a 8%. Si nota come il microcosmo interessato da una maggiore riduzione di idrocarburi è il C/N=120, per gli altri sistemi si ha una minore variazione rispetto alla condizione iniziale. Inoltre, i composti che sono maggiormente presenti nel suolo sono gli idrocarburi compresi tra C-13 e C-20. Contrariamente a quanto ci si aspetti, i composti con catena idrocarburica più corta e quindi più volatili, risultano essere maggiormente resistenti alla degradazione. I composti aromatici sembrano essere difficili da degradare, ma essendo molecole più complesse è possibile che sia necessario un tempo di degradazione più elevato.

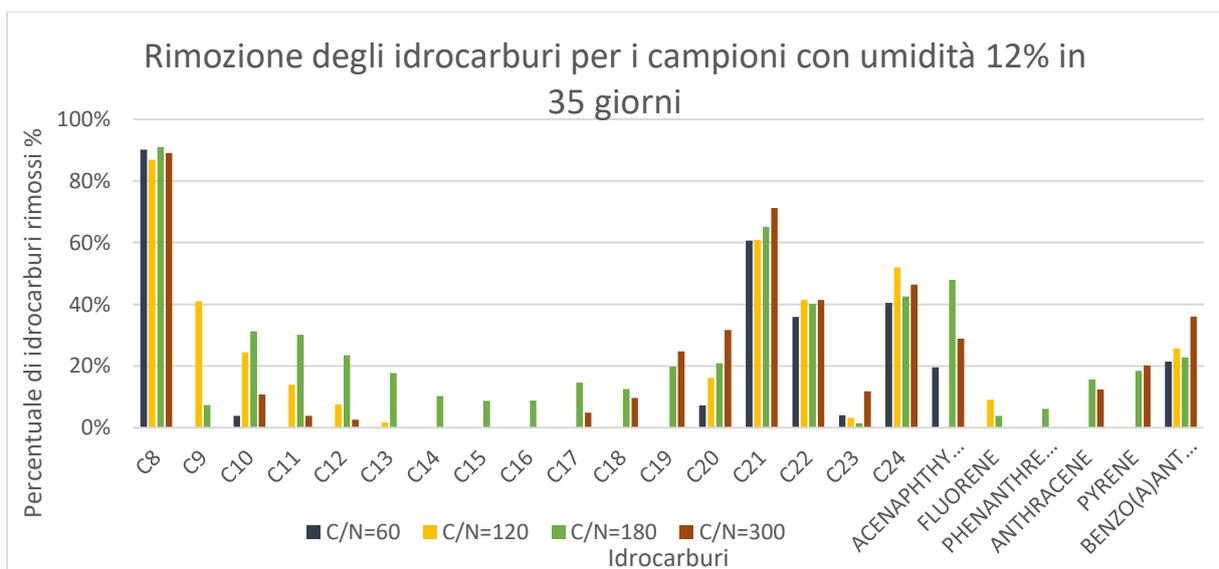


Figura 3.3.9 Percentuale di rimozione degli idrocarburi per i campioni con $u_0=12\%$

Dalla *Figura 3.3.9*, riferito ai microcosmi con umidità del 12%, si nota come gli idrocarburi più degradati sono quelli più leggeri, fatta eccezione per C-20, C-21, C-22 e C-24. Nel microcosmo con C/N=180 la contrazione degli idrocarburi presenti nel suolo è minore, mentre il microcosmo più contaminato è quello con C/N=60. Anche in questo caso le molecole che sono maggiormente presenti sono quelle da C-13 a C-20.

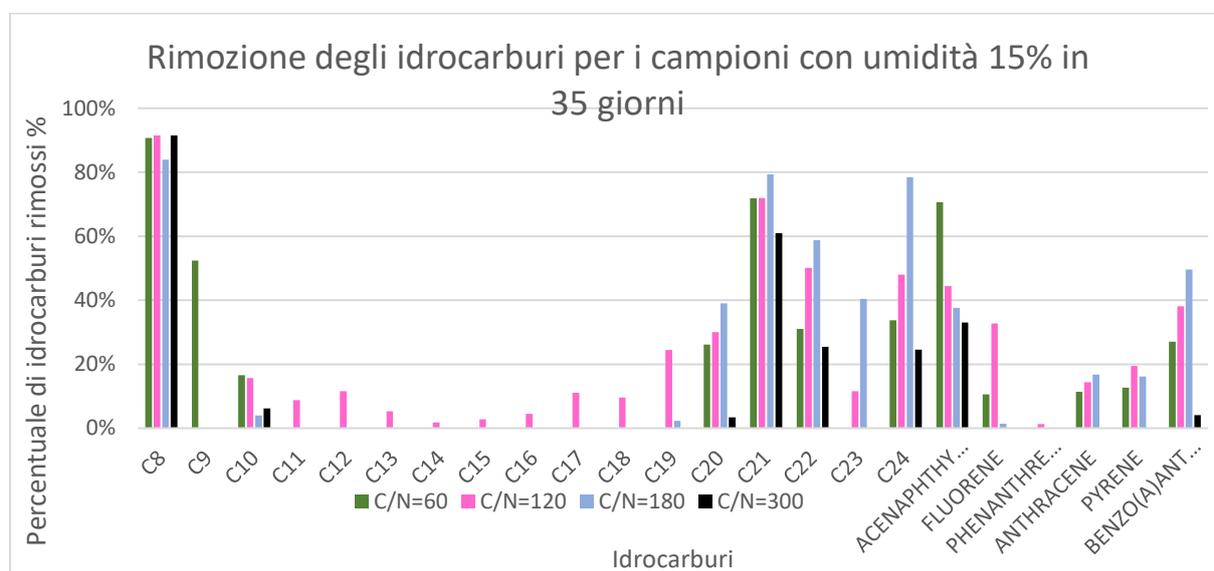


Figura 3.3.10 Percentuale di rimozione degli idrocarburi per i campioni con $u_{\%}=15\%$

Dalla *Figura 3.3.10*, riferita ai microcosmi con $u_{\%}=15\%$, si nota che la percentuale di rimozione degli idrocarburi a catena più corta (C-9, C-10, C-11) è minore rispetto agli altri microcosmi con umidità più bassa, mentre la percentuale di rimozione dei PAH e degli idrocarburi a catena più lunga (da C-21 a C-24) risulta maggiore. Dunque, anche dall'analisi al gascromatografo si ha una conferma che la condizione peggiore per la biostimolazione si ha con un contenuto di umidità del 15%.

3.3.3 Mesocosmi con 3400 g di terreno

Gli idrocarburi estratti dai mesocosmi sono stati analizzati al gascromatografo dopo 90 giorni dall'allestimento della prova. Dall'analisi è emerso che la quantità di diesel lungo tutta la colonna non è variata rispetto alla massa di diesel iniziale, segno che la degradazione non è avvenuta.

Considerando il mesocosmo 1, si nota dalla *Figura 3.3.11* che in superficie (20 mm di profondità) e nello strato centrale (80 mm di profondità) si ha una concentrazione più bassa di diesel rispetto alla condizione iniziale (70 g/kg_{suolo}), che in parte può essere dovuta al processo di degradazione, in accordo anche con la maggiore attività microbica, ma è possibile che il diesel sia percolato al fondo della colonna, non garantendo così una condizione omogenea. Infatti, si nota che la concentrazione di diesel al fondo della colonna (140 mm) è più elevata rispetto a quella iniziale.

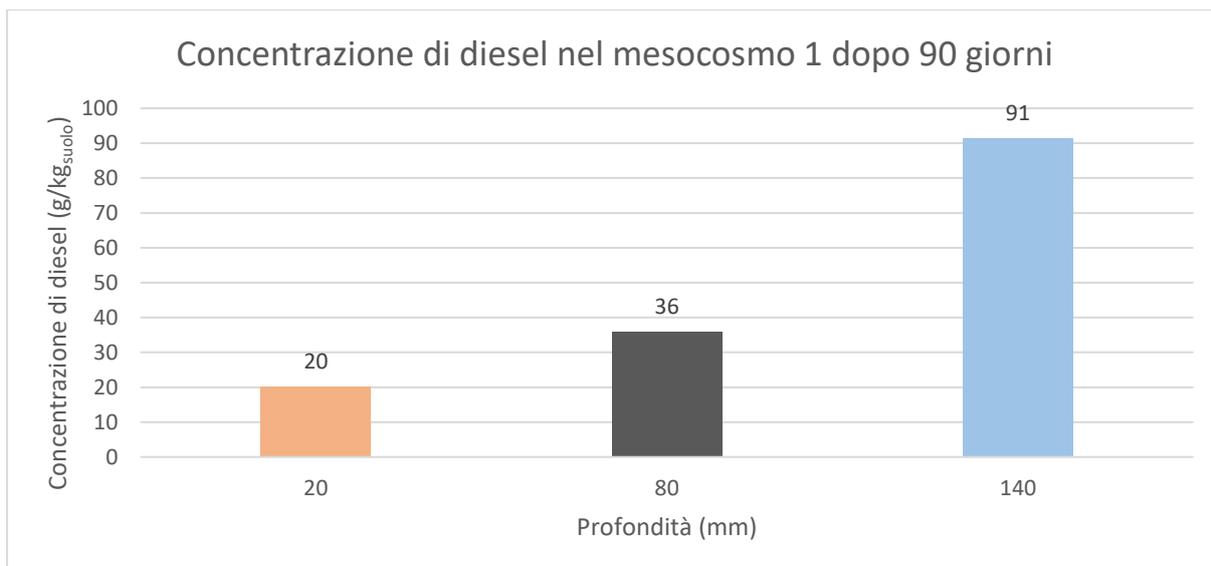


Figura 3.3.11 Concentrazione di diesel presente nel mesocosmo 1 dopo 90 giorni

Nel mesocosmo 2, si ha che la concentrazione di diesel è più bassa nella zona superficiale e nella zona di fondo, mentre nella zona centrale risulta essere prossima a 70 g/kg_{suolo}, come si evince dalla *Figura 3.3.12*. A differenza del mesocosmo 1, nel mesocosmo 2 la concentrazione dei diesel è rimasta omogenea. In particolare, la minore concentrazione di inquinante nella zona superficiale può essere dovuta al processo degradativo e/o all'evaporazione del gasolio stesso.

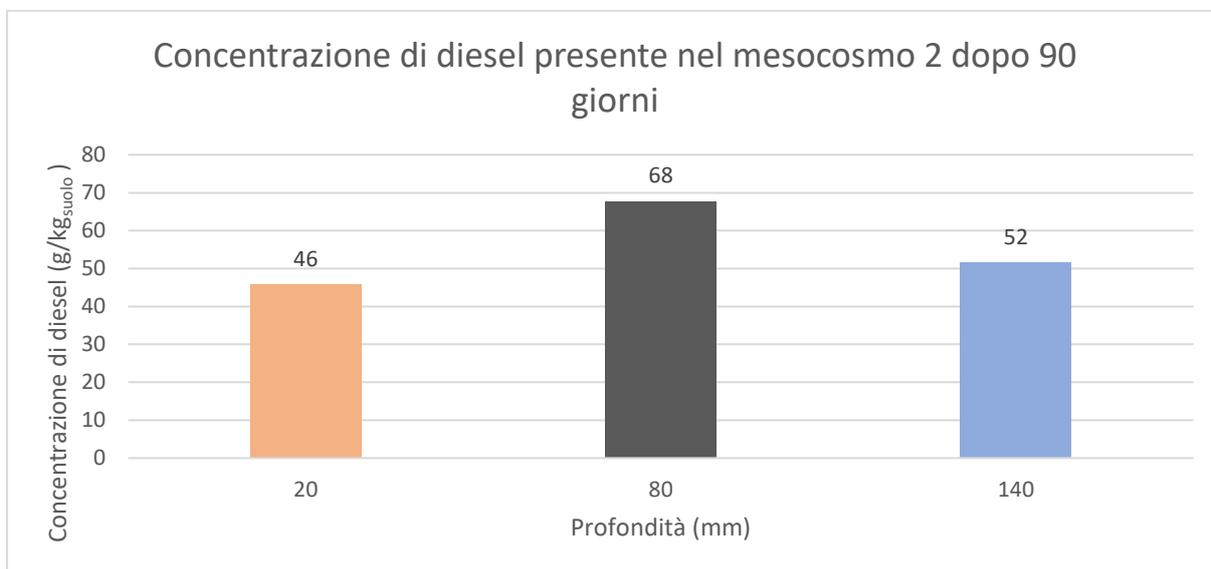


Figura 3.3.12 Concentrazione di diesel presente nel mesocosmo 2 dopo 90 giorni

Per i due mesocosmi non è possibile stabilire se sia avvenuta degradazione o meno. Però, secondo l'analisi dell'idrolisi del FDA (paragrafo 3.2 *Analisi dell'attività microbica*) la concentrazione di fluoresceina prodotta nel mesocosmo 1 è confrontabile con quella prodotta dal microcosmo con C/N=60 e u_%=15%, ossia circa 1 µg/kg_{suolo}. Inoltre, secondo l'analisi della

conta microbica (paragrafo 3.7 *Conte microbiche*) nei mesocosmi si è riscontrata una crescita della popolazione microbica. Infatti, la concentrazione di colonie microbiche è aumentata di oltre un ordine di grandezza rispetto alla condizione iniziale ($UFC_{t=0}=1.25 \cdot 10^3$ UFC/g_{suolo}).

3.4 Cinetica di degradazione

La cinetica di degradazione dei sistemi analizzati è stata valutata considerando il gasolio residuo, determinato con l'analisi al gascromatografo (3.4 Rimozione degli idrocarburi).

Si sono confrontate la cinetica del primo ordine e del secondo ordine, in modo tale da stabilire quale delle due rappresenti meglio la degradazione dell'agente inquinante.

In questa analisi, si considerano le cinetiche dei microcosmi con 800 g di terreno C/N=20 e C/N=450 e del microcosmo con 200 g di terreno C/N=120 u_%=12%.

Nella *Figura 3.4.1* si rappresenta l'andamento di C/N=20 e C/N=450, considerando l'Equazione 3.4.1

$$\ln C_t = \ln C_0 - k \cdot t \quad (3.4.1)$$

Dove,

C_0 , concentrazione diesel a $t = 0$ (g/kg_{suolo});

C_t , concentrazione diesel al tempo di analisi t (g/kg_{suolo});

k , costante di degradazione (d⁻¹).

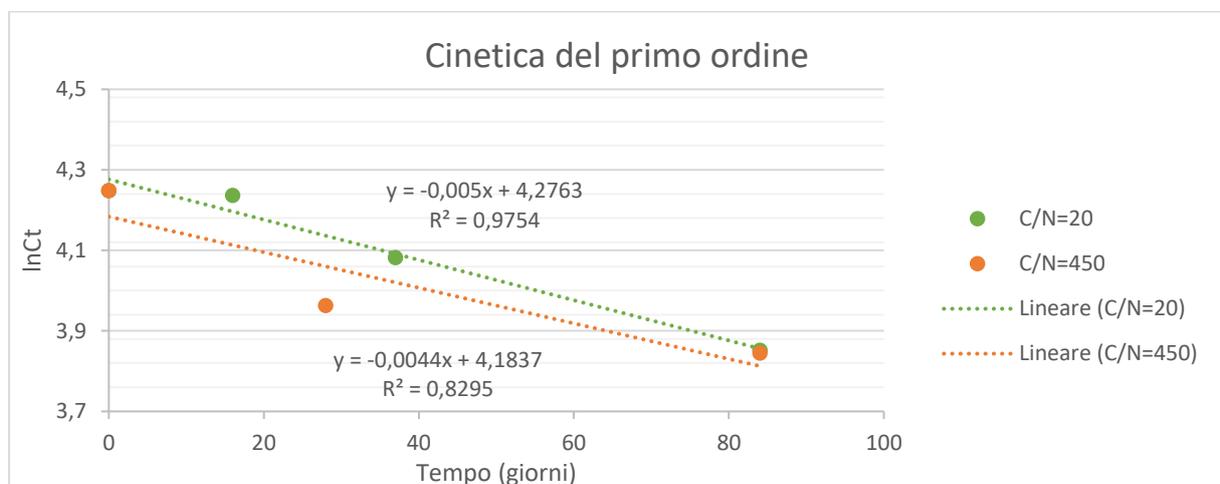


Figura 3.4.1 Cinetica del primo ordine per i microcosmi C/N=20 e C/N=450

Le costanti di degradazione risultano essere pari a $k_{20} = 0.005 \frac{1}{d}$ e $k_{450} = 0.0044 \frac{1}{d}$, tali valori sono concordi con i dati presenti in letteratura (Horel and Schiewer, 2009).

Si nota come le due costanti abbiano valori molto simili, quindi la velocità di degradazione dei due sistemi è pressoché uguale, come già riscontrato nelle altre analisi.

Considerando, invece, la cinetica del secondo ordine secondo l'Equazione (3.4.2) e riportata nella *Figura 3.4.2* si nota come l'andamento delle rette sia più piatto, infatti si hanno costanti

di degradazione più basse rispetto alla cinetica del primo ordine, ossia $k_{20} = 0.00009 \frac{1}{d}$ e $k_{450} = 0.00008 \frac{1}{d}$.

$$\frac{1}{C_t} = \frac{1}{C_0} + k \cdot t \quad (3.4.2)$$

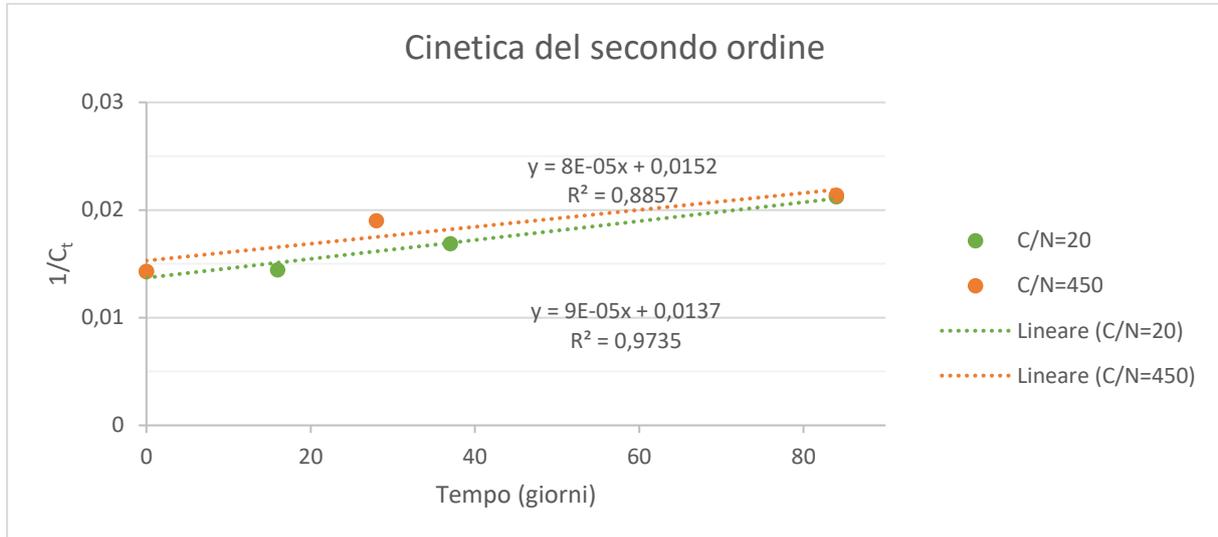


Figura 3.4.2 Cinetica del secondo ordine per i microcosmi C/N=20 e C/N=450

Mettendo a confronto i due tipi di cinetica di reazione del microcosmo con C/N=120 u_%=12%, si ha che $k_{I \text{ ordine}} = 0.0019 \frac{1}{d}$ e $k_{II \text{ ordine}} = 0.0001 \frac{1}{d}$ (Figura 3.4.3).

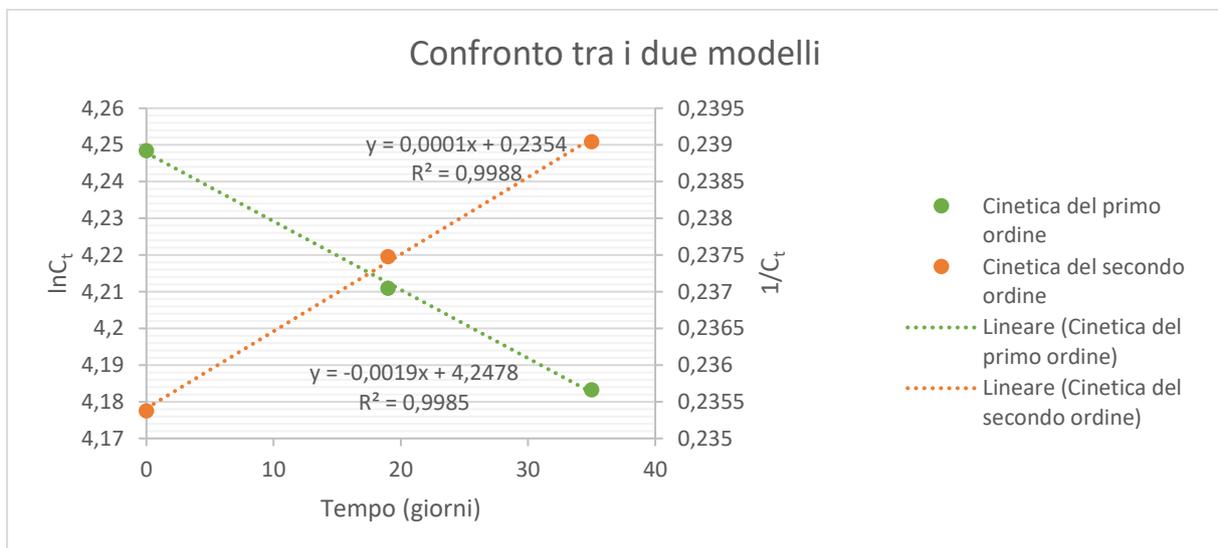


Figura 3.4.3 Cinetica del primo e del secondo ordine per il microcosmo C/N=120 u_%=12%

Si evince che entrambe le equazioni cinetiche ipotizzate per i microcosmi (con 800 g di terreno e con 200 g di terreno) sono valide, in quanto i dati sperimentali vengono ben interpretati con delle rette sia nel caso del modello del primo ordine che nel caso del modello del secondo ordine.

3.5 Analisi fattoriale

L'analisi fattoriale è stata condotta sui microcosmi con 200 g di terreno al fine di valutare l'influenza delle due variabili indipendenti considerate (rapporto C/N e u%) su due variabili obiettivo, ossia la percentuale di rimozione del gasolio e la concentrazione di fluoresceina cumulata, che è indice dell'attività microbica.

Si è utilizzato un modello matematico che interpola i dati raccolti con un polinomio, in modo tale da definire la superficie di interazione e avere una stima delle condizioni ottimali per ottenere la massima percentuale di riduzione del contaminante e la maggiore attività microbica.

3.5.1 Analisi della varianza (ANOVA) e superficie di risposta (RMS) per la percentuale di rimozione del diesel

Considerando l'analisi ANOVA a due vie senza replica, ossia non considerando le interazioni tra le due variabili si ottiene la *Tabella 3.5.1*.

Tabella 3.5.1 Analisi della varianza per la percentuale di rimozione del diesel

ANALISI DELLA VARIANZA					
Origine della variazione	SQ	Gdl	MQ	F	p
Righe C/N	0.0387	3	0.0129	1.271	0.3663
Colonne u%	0.0046	2	0.0043	0.42	0.6741
Errore	0.06	6	0.0101		
Totale	0.108	11			

I parametri rappresentati sono:

SQ, la somma dei quadrati dei fattori (rispettivamente riga e colonna);

Gdl, i gradi di libertà del sistema;

MQ, la media dei quadrati dei singoli fattori;

F, il coefficiente di Fischer;

p, la probabilità di ottenere un risultato uguale o differente rispetto a quello osservato.

Tenendo in considerazione che il valore per l'accettabilità dell'ipotesi nulla è stato impostato pari a $\alpha = 1$ si ha che, per entrambe le variabili, *p* risulta essere minore di α . Tale risultato significa che non è valida l'ipotesi nulla (le medie di ogni riga (rapporto C/N) sono uguali) e che quindi i rapporti C/N sono statisticamente differenti con un intervallo di confidenza del 95%. La stessa considerazione può essere fatta per u%.

Pertanto, in base ai parametri F e p, l'effetto di C/N sulla variabile obiettivo è maggiore rispetto a quello di u%.

Il polinomio di regressione di terzo grado (*Equazione 3.5.1*) è stato determinato considerando la percentuale di degradazione ottenuta al termine della prova sui microcosmi, ossia dopo 35 giorni.

$$\begin{aligned} \%Diesel\ rimosso = & 50.28 - 21.36 \cdot X + 1.011 \cdot Y + \\ & + 1.029 \cdot X^2 + 0.1244 \cdot X \cdot Y - 0.01006 \cdot Y^2 + \\ & - 0.007591 \cdot X^2 \cdot Y + 0.0001458 \cdot X \cdot Y^2 + 0.0000147 \cdot Y^3 \end{aligned} \quad (3.5.1)$$

Dove,

X, variabile umidità;

Y, variabile rapporto C/N.

I coefficienti di regressione sono stati determinati con un intervallo di confidenza del 95%.

Considerando i termini lineari, la concentrazione di nutrienti influisce positivamente sulla rimozione del gasolio, al contrario della variabile umidità che ha un effetto negativo. I termini di secondo ordine influiscono molto meno nella determinazione della concentrazione del gasolio residuo, mentre i termini di terzo ordine sono trascurabili, in accordo con l'ipotesi alla base dell'analisi, ossia che è possibile considerare la risposta lineare.

L'interazione tra le due variabili u% e C/N ha un effetto positivo sulla percentuale di diesel rimosso. Effetti analoghi sono stati ottenuti nel lavoro di Lahel *et al.* (2016).

La superficie interpolante è riportata nella *Figura 3.5.1*, definita con i seguenti parametri statistici:

$$R^2 = 0.7;$$

$$R_{corretto}^2 = -0.13;$$

$$RMSE = 10.52.$$

R^2 non è prossimo all'unità, ma in un range accettabile per l'interpolazione dei dati; $R_{corretto}^2$ tiene conto dei gradi di libertà del modello pari a 3 e può assumere valori negativi, come in questo caso ed infine $RMSE$ (la radice quadrata dell'errore quadratico medio) ha lo stesso ordine di grandezza dei dati misurati, quindi può essere accettato.

La superficie ha un massimo in prossimità di C/N=120 e di un'umidità dell'8%, come già evidenziato dalle precedenti analisi, tali condizioni, insieme a C/N=180 e u%=12%, sono quelle ottimali.

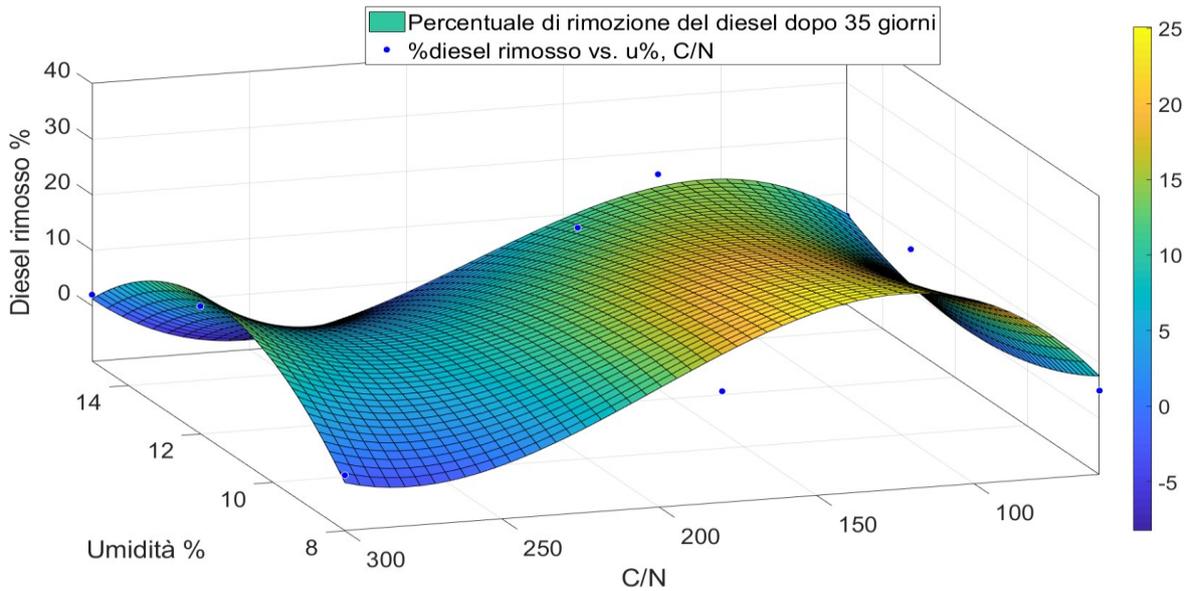


Figura 3.5.1 Superficie interpolante della percentuale di diesel rimosso in funzione di C/N e $u\%$ dopo 35 giorni

Considerando la Color Map in 2D (*Figura 3.5.2*), si osserva che la zona di colore giallo rappresenta tutti i punti che garantiscono una riduzione del gasolio del 25% dopo 35 giorni. Le condizioni ottimali si hanno per bassi valori di umidità (8-10%) e per rapporti C/N compresi tra 100-180. Le condizioni peggiori, invece, sono evidenziate da zone di colore blu, dove la riduzione del diesel è inferiore al 5%.

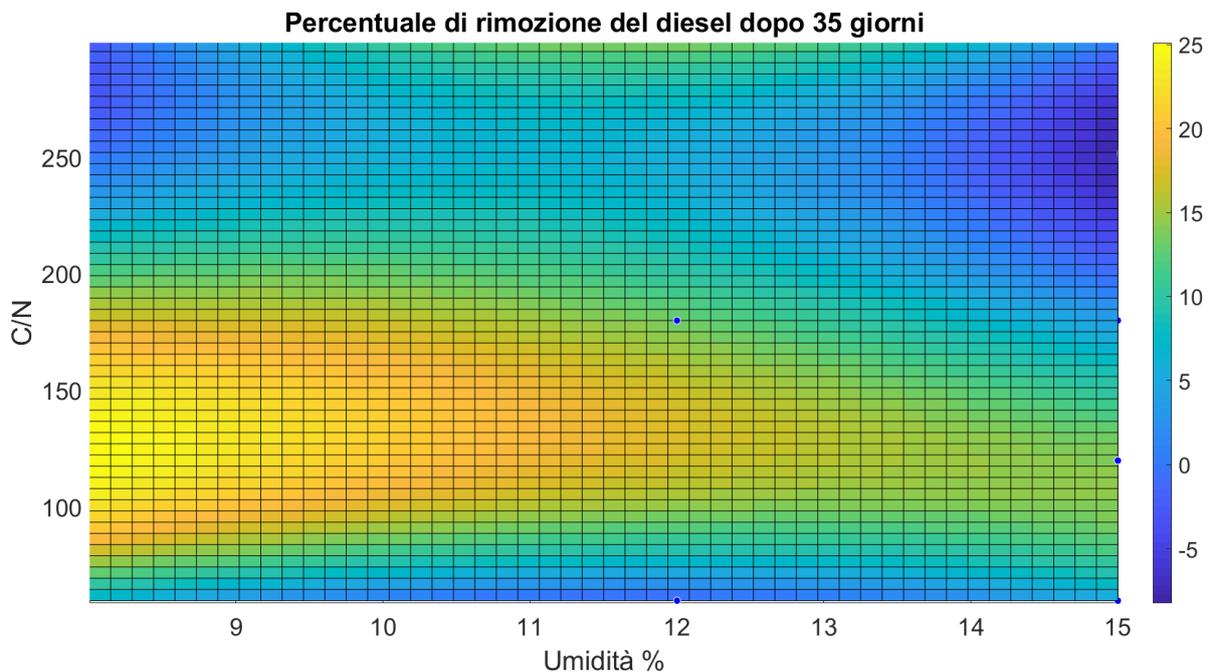


Figura 3.5.2 Superficie interpolante in 2D per la percentuale di rimozione del diesel

3.5.2 Analisi della varianza (ANOVA) e superficie di risposta (RMS) per la concentrazione di fluoresceina prodotta

Si è valutato come le due variabili considerate (C/N e u%) influenzano la concentrazione di fluoresceina prodotta nei sistemi. La determinazione della fluoresceina permette di valutare l'attività microbica presente in ogni campione.

L'analisi ANOVA a due vie senza replica è riportata in *Tabella 3.5.2*:

Tabella 3.5.2 Analisi della varianza per la fluoresceina prodotta

ANALISI DELLA VARIANZA					
Origine della variazione	SQ	Gdl	MQ	F	p
Righe C/N	88.66	3	29.55	2.472	0.16
Colonne u%	0.86	2	0.43	0.036	0.96
Errore	71.73	6	11.95		
Totale	161.25	11			

Dato che il valore della probabilità p per il rapporto C/N è minore del fattore di accettabilità $\alpha = 1$, la differenza tra i valori di C/N considerati è statisticamente significativa e pertanto l'ipotesi nulla non può essere considerata valida. Il valore di probabilità per la variabile u% è prossima all'unità, quindi potrebbe essere considerata valida l'ipotesi nulla. Pertanto, la variazione del contenuto di umidità non influisce sulla concentrazione di fluoresceina prodotta.

Dal confronto tra F e p delle due variabili indipendenti, si nota che il rapporto C/N determina maggiormente l'attività microbica rispetto al contenuto di umidità.

Il polinomio di regressione (*Equazione 3.5.2*) è stato determinato considerando la fluoresceina cumulata prodotta dai microcosmi con 200 g di terreno dopo 30 giorni.

$$\begin{aligned}
 & \text{Concentrazione di fluoresceina cumulata } (\mu\text{g}/\text{g}_{\text{suolo}}) \\
 & = -21.29 + 2.674 \cdot X + 0.1879 \cdot Y + \\
 & \quad + 0.1207 \cdot X^2 - 0.005597 \cdot X \cdot Y - 0.0004 \cdot Y^2 + \\
 & \quad + 0.0004 \cdot X^2 \cdot Y - 0.000013 \cdot X \cdot Y^2 + 0.0000004 \cdot Y^3 \quad (3.5.2)
 \end{aligned}$$

Dove,

X, variabile umidità;

Y, variabile rapporto C/N.

Dai coefficienti del polinomio di regressione si nota che sia il rapporto carbonio-azoto che il contenuto di umidità influiscono positivamente sulla concentrazione di fluoresceina prodotta. Inoltre, i termini di secondo e di terzo grado sono trascurabili, come nel caso della percentuale di rimozione del diesel.

In *Figura 3.5.3* è rappresentata la superficie di risposta (RMS). Si osserva che il contenuto di umidità influisce meno rispetto al rapporto C/N, come dimostrato dall'analisi ANOVA.

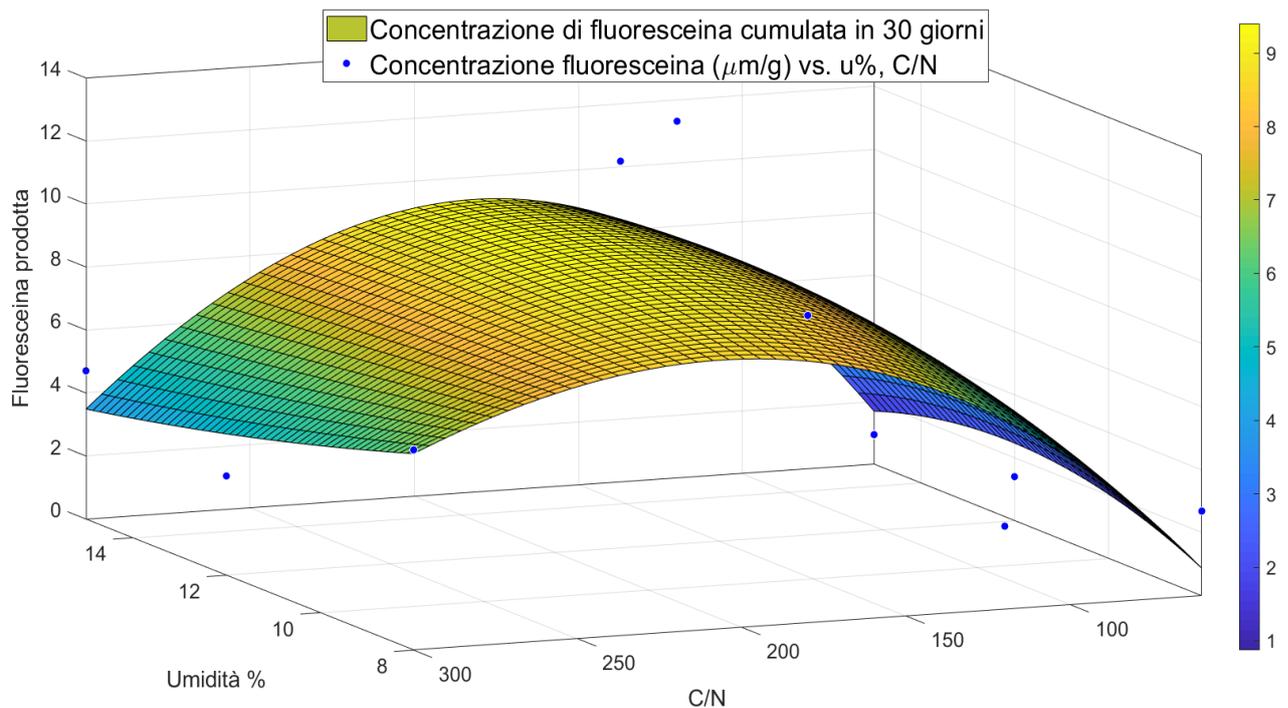


Figura 3.5.3 Superficie interpolante della concentrazione di fluoresceina cumulata in funzione di C/N e u% dopo 30 giorni.

$$R^2 = 0.6;$$

$$R_{\text{corretto}}^2 = -0.5;$$

$$RMSE = 4.7.$$

Dalla *Figura 3.5.4* si può osservare che la maggiore concentrazione di fluoresceina si ottiene con valori di C/N compresi tra 180 e 220. Tale range di valori garantisce la massima produzione di fluoresceina ($10 \mu\text{g}/\text{g}_{\text{suolo}}$) in 30 giorni. Il contenuto di umidità, invece, non incide sulla concentrazione di fluoresceina prodotta.

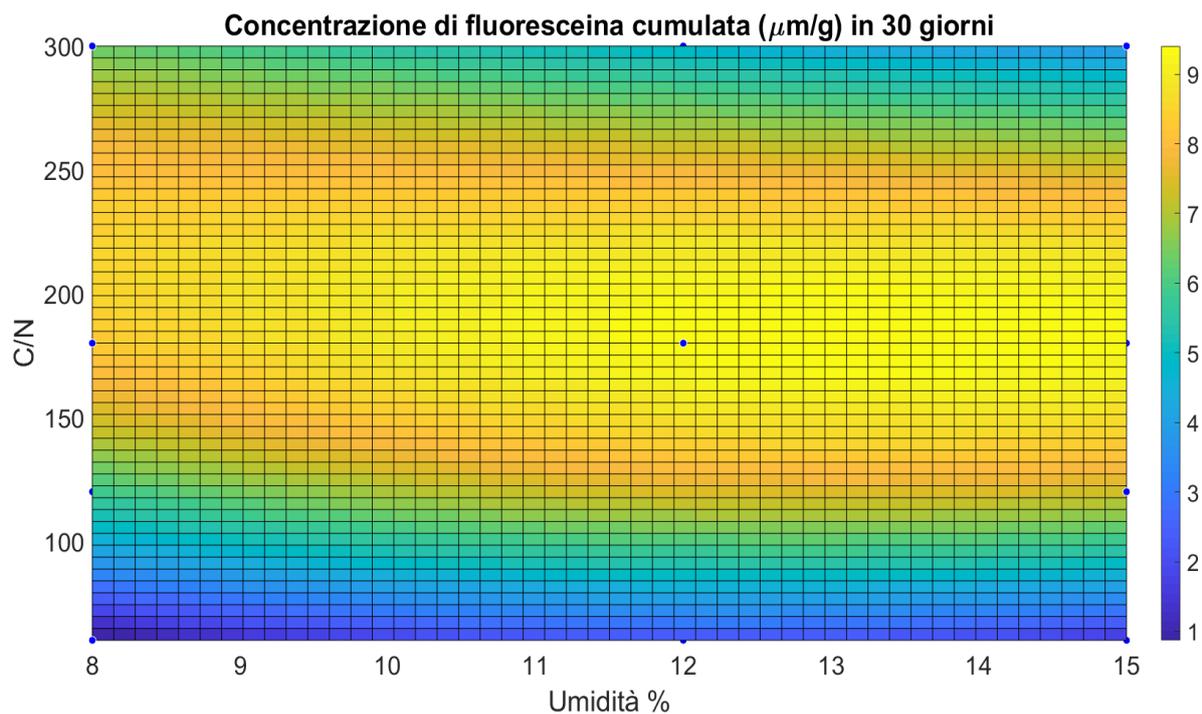


Figura 3.5.4 Superficie interpolante in 2D per la fluoresceina prodotta

A differenza dell'analisi fatta sulla percentuale di degradazione del diesel, la zona delle condizioni ottimali nel caso della concentrazione di fluoresceina è più ampia ed influenzata da un unico parametro.

3.6 Misure geofisiche

I parametri geofisici sono stati misurati sui mesocosmi con 3400 g di terreno tramite le sonde CS655, e tali misure hanno permesso di valutare l'andamento della conducibilità e della permittività del sistema all'avanzare del processo di degradazione.

La permittività del sistema si valuta tramite il modello CRIM (Complex Refractive Index Model) (Comegna *et al.*, 2013), come illustrato nel capitolo 2.5 *Misure geofisiche*:

$$\epsilon = (\phi \cdot \sqrt{\epsilon_w} + (1 - \phi) \cdot \sqrt{\epsilon_m} + \phi \cdot (1 - S) \cdot \sqrt{\epsilon_d})^2 \quad (3.6.1)$$

Dove,

ϵ , la permittività relativa della miscela liquida (gasolio e soluzione salina acquosa) e della matrice porosa (suolo);

ϕ , la porosità del sistema pari a 0.4;

ϵ_w , la permittività dielettrica della soluzione salina acquosa pari a 79;

ϵ_m , la permittività dielettrica della matrice solida pari a 3;

S , la saturazione d'acqua pari a 0.5 v/v;

ϵ_d , la permittività dielettrica del diesel pari a 2.3.

La conducibilità elettrica, invece, viene valutata tramite

l'equazione di Rhoades:

$$EC_{bulk} = EC_w \cdot \theta_V \cdot T + EC_{solido} \quad (2.5.4)$$

Dove,

EC_{bulk} , conducibilità elettrica del terreno (suolo saturo in acqua e gasolio);

EC_w , conducibilità elettrica della soluzione acquosa con sali disciolti presente nel suolo;

EC_{solido} , condicibilità del solido;

T , coefficiente di trasmissione specifico per il suolo.

Oppure tramite il modello di Archie (2.5.5):

$$EC_{bulk} = a \cdot EC_w \cdot \rho^n \cdot S_w^m \quad (2.5.5)$$

Dove,

a , fattore di tortuosità (approssimato ad 1);

ρ , porosità del sistema (0.4);

S_w , saturazione della soluzione acquosa salina (0.49);

n , grado di cementazione della roccia;

m , esponente di saturazione.

I valori misurati dalle sonde non si sono mostrati utili al fine dell'analisi sulla biostimolazione, poiché gli andamenti ottenuti non sono risultati concordi con quelli presenti in letteratura, ad esempio nel lavoro di Masy *et al.* (2016).

Il discostamento più significativo si è riscontrato nel mesocosmo 1, in quanto l'invio dell'aria per garantire l'adeguato approvvigionamento di ossigeno rende non idonee le misure rilevate dalla sonda. Si crea, infatti, una forte isteresi che invalida la prova. Alcuni dei motivi possono essere legati alla formazione di microporosità e/o di un sottile film liquido nelle zone prossime ai sensori.

Si riporta nella *Figura 3.6.1* l'andamento della permittività dielettrica dei due mesocosmi.

Si nota come l'andamento della curva del mesocosmo 2 rimane piatto nel tempo, ciò indica che non sta avvenendo il processo degradativo. Infatti, la permittività dielettrica aumenta se diminuisce il contenuto di gasolio (Comegna *et al.*, 2013).

Nella mesocosmo 1, invece, si assiste ad una variazione della curva in prossimità dei giorni in cui viene inviata l'aria (portata stimata $\dot{V}_{aria} = 1.7 \cdot 10^{-5} \frac{m^3}{s}$), ossia una volta a settimana per 30 minuti, come evidenziato nella *Figura 3.6.1*. In particolare, si ha una variazione del valore di permittività che non ritorna alla condizione iniziale neanche dopo un certo intervallo di tempo.

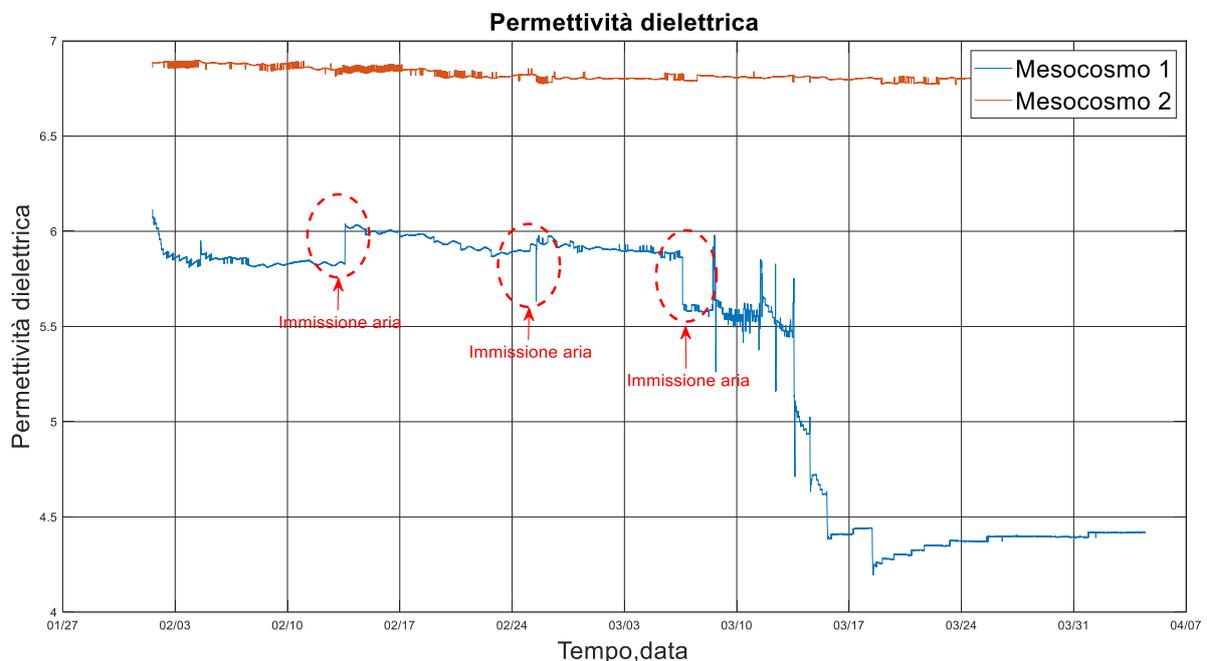


Figura 3.6.1 Variazione della permittività dielettrica nel mesocosmo 1 con invio dell'aria e nel mesocosmo 2

Nella *Figura 3.6.2* è riportata la variazione della conducibilità elettrica dei mesocosmi. Si può osservare che non si hanno elevate variazioni del valore di conducibilità nel mesocosmo 2, mentre come già osservato per l'andamento delle permittività dielettrica, l'invio dell'aria influenza negativamente anche le misure di conducibilità elettrica.

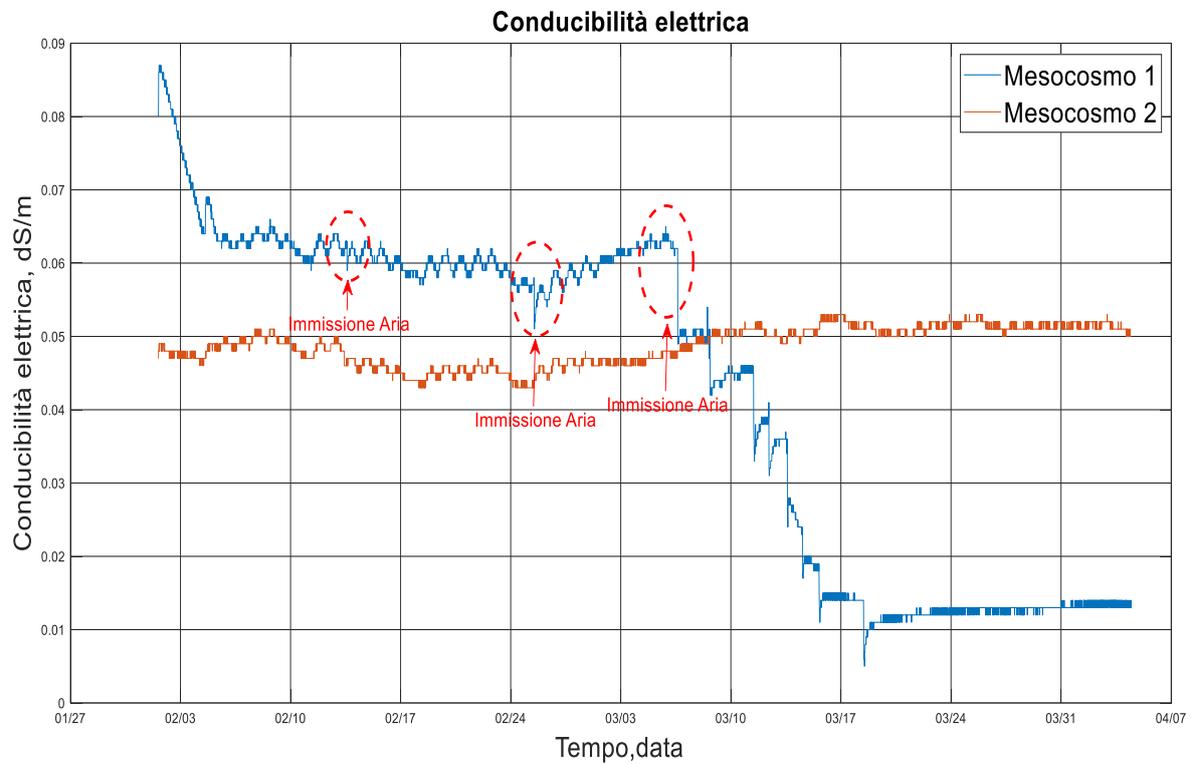


Figura 3.6.2 Variazione della conducibilità elettrica nel mesocosmo 1 con invio dell'aria e nel mesocosmo 2

3.7 Analisi della carica microbica

Le conte microbiche sono state effettuate utilizzando come fonte di carbonio il gasolio, in modo tale da permettere di determinare solo le colonie microbiche che si sviluppano nei sistemi analizzati.

Le conte sono state effettuate dopo sette giorni dalla preparazione delle piastre Petri.

Nella *Figura 3.7.1* è mostrata la concentrazione delle colonie microbiche dei mesocosmi in funzione della profondità in cui è stato fatto il prelievo.

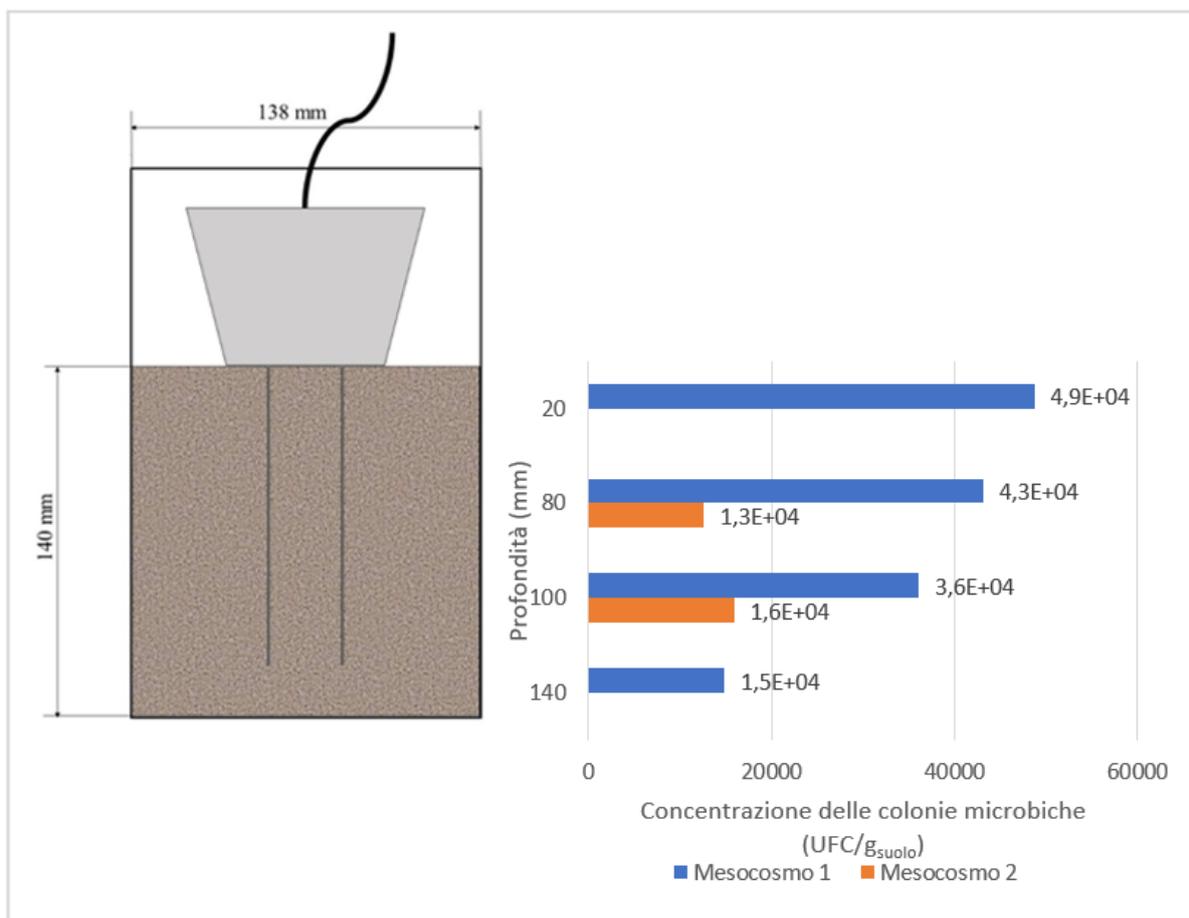


Figura 3.7.1 Concentrazione delle colonie microbiche (UFC/g_{suolo}) in funzione della profondità a t=90 giorni

Dal numero di colonie microbiche determinato, si è osserva una discreta attività microbica. Infatti, rispetto alla condizione iniziale ($1,25 \cdot 10^3$ UFC/g_{suolo}) la concentrazione di colonie è aumentata di oltre un ordine di grandezza, raggiungendo valori pari a 10^4 UFC/g_{suolo}.

Nel mesocosmo 1, si nota una maggiore attività microbica in superficie e nella zona centrale, mentre all'aumentare della profondità il numero di colonie microbiche diminuisce. Tale andamento è concorde con l'analisi dell'idrolisi del FDA.

Il mesocosmo 2, invece, registra una minore attività microbica in accordo con le altre analisi e una concentrazione microbica uniforme lungo tutta la colonna.

I campioni prelevati a 100 mm sono stati presi in corrispondenza di colonie microbiche che si differenziavano rispetto al resto del sistema, ma sia il tipo di colonie sviluppate che la concentrazione delle colonie sono simili a quelli presenti negli altri campioni analizzati.

A differenza degli altri campioni, nella piastra del campione del mesocosmo 2 si osserva la formazione di ceppi non ben identificati. Tale colonia non ha una forma puntiforme, ma allungata simile a delle spore, come si nota dalla *Figura 3.7.2* e nell'ingrandimento riportato in *Figura 3.7.3*.

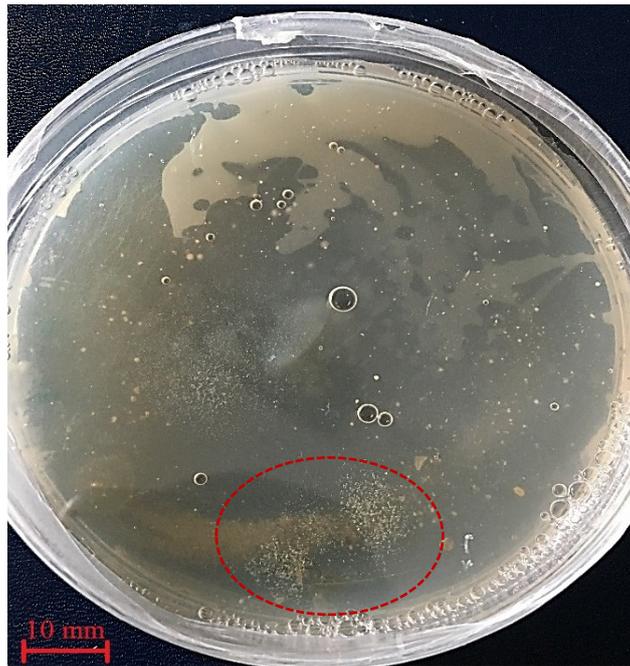


Figura 3.7.2 Piastra Petri del campione prelevato a 100 mm di profondità nel mesocosmo 2 con colonie microbiche puntiformi e colonia non puntiforme

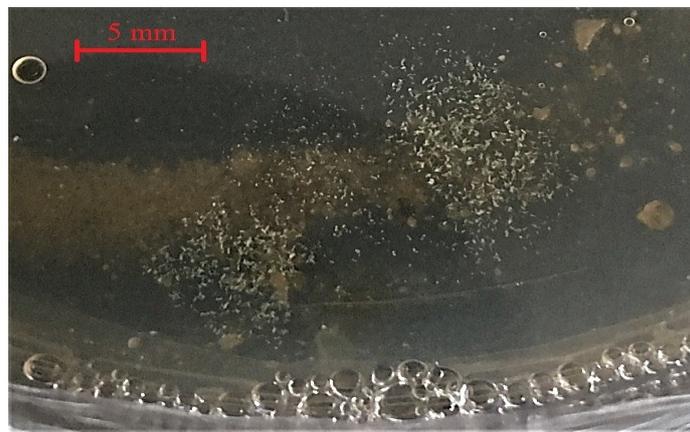


Figura 3.7.3 Ingrandimento della colonia non puntiforme formata nella piastra del campione prelevato a 100 mm nel mesocosmo 2

Nella *Tabella 3.7.1* sono mostrate le concentrazioni delle colonie presenti nei microcosmi con 800 g di terreno dopo 80 giorni per C/N=20 e dopo 71 giorni per C/N=100.

Tabella 3.7.1 Conte microbiche dei microcosmi con C/N=20 e C/N=100

	Numero di UFC	Concentrazione (UFC/g_{suolo})
C/N=20	950	$1.69 \cdot 10^4$
C/N=100	$4.4 \cdot 10^4$	$8.51 \cdot 10^5$

Si nota come la concentrazione delle colonie microbiche (UFC/g_{suolo}) rispecchia l'andamento ottenuto con le analisi dell'idrolisi del FDA. Infatti, il sistema con maggiore attività microbica è il C/N=100 che ha una concentrazione di UFC/g dell'ordine di 10^5 . Il microcosmo con C/N=20 ha una concentrazione di colonie microbiche su grammo di suolo contaminato dell'ordine di 10^4 , lo stesso valore osservato nei mesocosmi, dove però non è stato possibile accertare l'avvenuta degradazione del contaminante.

3.8 Analisi al microscopio elettronico a scansione (SEM)

Le analisi al SEM sono state fatte sul campione C/N=100 e sui mesocosmi 1 e 2.

Dall'analisi si vede la popolazione microbica presente nel suolo, formata prevalentemente da microrganismi batterici di tipo cocchi e bacilli.

3.8.1 Microcosmo con 800 g di terreno

Il campione C/N=100 è stato analizzato dopo 50 giorni dall'inizio della prova. Si nota dalle *Figure 3.8.1 e 3.8.2* come il terreno ha una numerosa popolazione microbica, che occupa la struttura solida. In accordo con l'analisi della carica microbica dalla quale si è stimata una concentrazione di colonie microbiche pari a $8.51 \cdot 10^5$ UFC/g_{suolo}, che risulta essere il valore più alto misurato in questo studio. L'elevata popolazione microbica giustifica anche la maggiore velocità di degradazione di tale sistema rispetto agli altri microcosmi con rapporto carbonio-azoto differente.

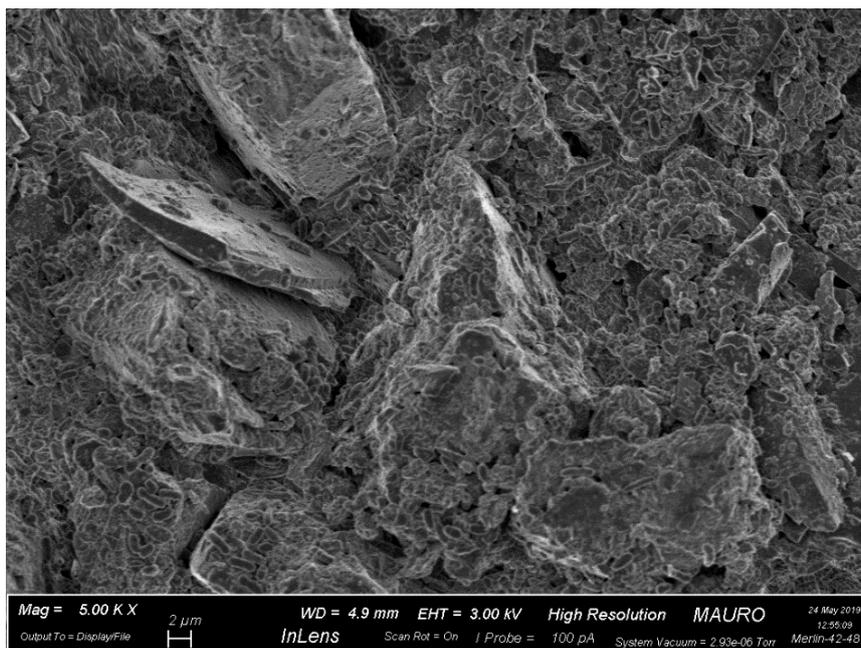


Figura 3.8.1 Microcosmo con C/N=100 con ingrandimento 5000 X. Si nota la struttura solida ricoperta da un'elevata concentrazione di microrganismi

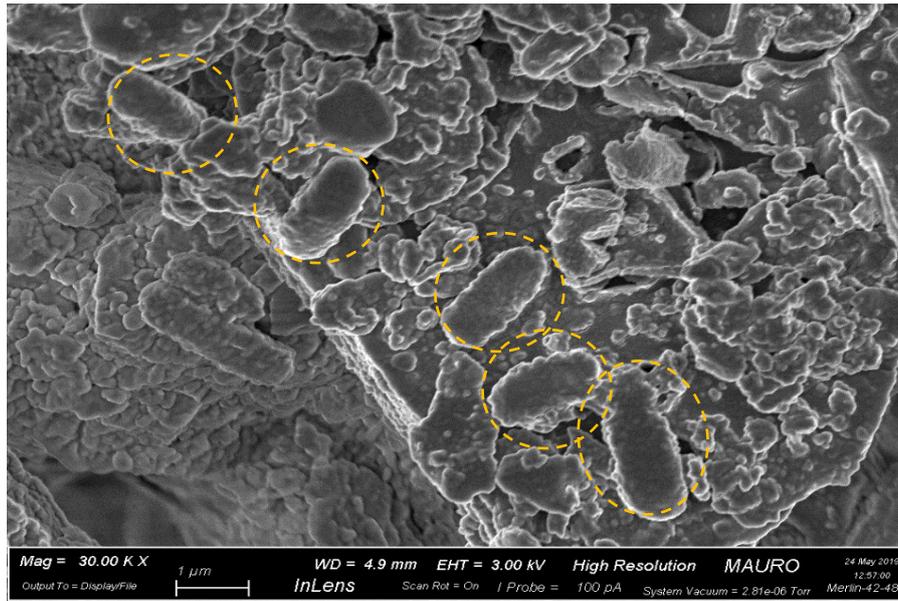
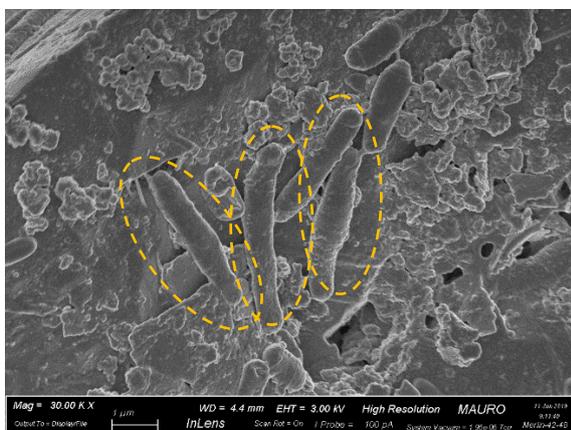


Figura 3.8.2 Microcosmo con C/N=100 con ingrandimento 30000 X. Sono evidenziati i microrganismi di tipo cocci e bacilli.

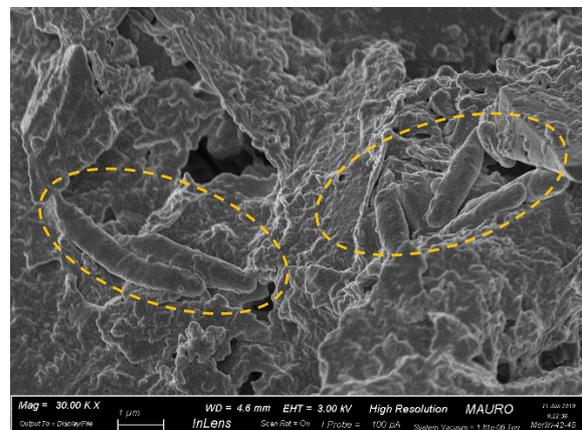
3.8.2 Mesocosmi con 3400 g di terreno

Nel mesocosmo 1 si è osservata una concentrazione di colonie microbiche dell'ordine di 10^4 UFC/g_{suolo} e le analisi fatta al SEM, riportate nelle *Figure 3.8.3 (a), (b), (c)* confermano tale densità. Dalle figure si nota come la presenza di colonie microbiche, in particolare di bacilli, è maggiore nella superficie della colonna, mentre si ha una riduzione all'aumentare della profondità. In particolare, sul fondo della colonna (140 mm) sembra non esserci attività microbica, ma la presenza di una struttura porosa non ben definita.

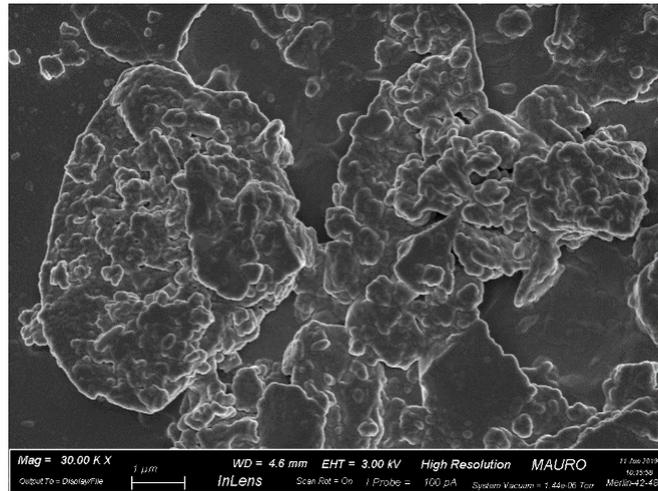
La differenza rispetto al microcosmo con C/N=100 è evidente, infatti, dalle figure si osserva che la struttura solida è meno popolata.



a) prelievo a 20 mm dalla superficie



b) prelievo a 80 mm dalla superficie

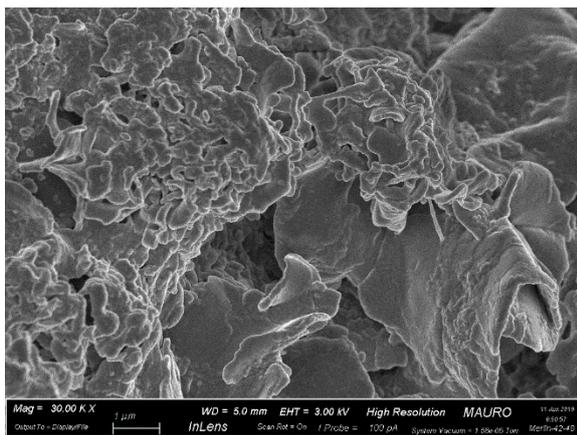


c) prelievo a 140 mm dalla superficie

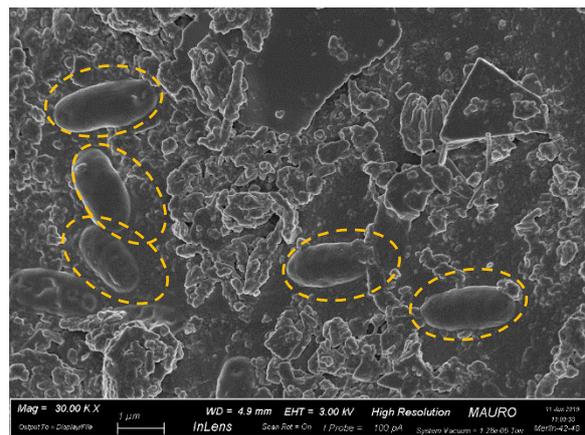
Figura 3.8.3 Campioni del mesocosmo 1 con ingrandimento 30000 X al variare della profondità di prelievo. Si evidenziano in figura (a) la presenza di microrganismi di tipo bacilli, presenti anche in figura (b) ma in minore quantità, in figura (c) non si nota la presenza di microrganismi.

Nel mesocosmo 2 la popolazione microbica è molto ridotta, inferiore rispetto al mesocosmo 1, in accordo con le conte microbiche. Inoltre, la concentrazione di colonie microbiche è uniforme in tutti gli strati della colonna ed è in media pari a $1.5 \cdot 10^4$ UFC/g_{suolo}.

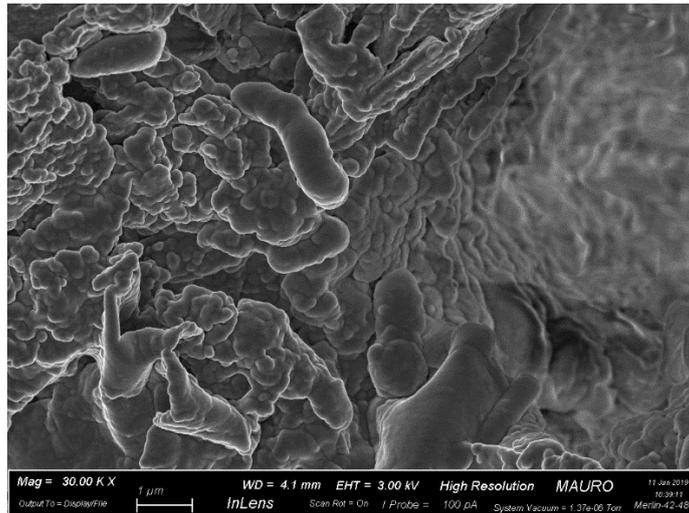
Si nota nelle *Figure 3.8.4 (a), (b) e (c)*, che la concentrazione è circa la medesima per tutti e tre i livelli, anche se nel campione prelevato a 80 mm si vedono alcuni microrganismi, che invece non sono presenti negli altri campioni.



a) prelievo a 20 mm dalla superficie



b) prelievo a 80 mm dalla superficie



c) prelievo a 120 mm dalla superficie

Figura 3.8.4 Campioni del mesocosmo 2 con ingrandimento 30000 X al variare della profondità di prelievo. Si nota che in figura (a) e in figura (c) non si osservano microrganismi, mentre in figura (b) sono evidenziati dei microrganismi di tipo bacilli.

4. Conclusioni

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato lo studio dell'utilizzo combinato di metodi geofisici e biologici per la valutazione del processo di degradazione in un terreno inquinato da gasolio. In particolare, si è operato a scala di laboratorio attraverso una serie di prove su microcosmi.

I principali risultati ottenuti sono sintetizzati e analizzati di seguito.

Microcosmi con 800 g di terreno

Lo studio condotto sui microcosmi con 800 g di terreno ha permesso di valutare il quantitativo ottimale di nutrienti necessario per il processo degradativo. Si sono considerati tre sistemi, rispettivamente con C/N=20, C/N=100 e C/N=450 e con un contenuto di umidità pari a 12% in peso. Sulla base dei risultati ottenuti, la condizione migliore è quella relativa al microcosmo con un rapporto carbonio-azoto pari a 100. Dalle analisi respirometriche si evince che la velocità di produzione della CO₂ per C/N=100 è $134 \frac{mg}{kg_{suolo} \cdot d}$, mentre per C/N=20 è $31 \frac{mg}{kg_{suolo} \cdot d}$ e per C/N=450 è $45 \frac{mg}{kg_{suolo} \cdot d}$. Anche dall'analisi dell'attività microbica si riscontra una maggiore attività con C/N=100.

Inoltre, nel microcosmo con C/N=100 si è registrata una percentuale di rimozione del diesel dopo 84 giorni pari a 38.7%, mentre negli altri sistemi la percentuale di rimozione è pari a 33,7% e 34.2%, rispettivamente per C/N=20 e C/N=450. La concentrazione microbica ($8.51 \cdot 10^5$ UFC/g_{suolo}) nel microcosmo con C/N=100 è risultata la più elevata rispetto a tutti i campioni analizzati. Tale risultato è supportato dalle analisi fatte al SEM, che mostrano la matrice solida ricoperta da una densa popolazione microbica.

Pertanto, la valutazione del quantitativo di nutrienti da fornire ai microrganismi è importante per il processo degradativo, poiché sia per condizioni di carenza di azoto rispetto al carbonio (C/N=450) che di eccesso (C/N=20), l'attività degradativa risulta non ottimizzata.

Microcosmi con 200 g di terreno

Data l'importanza della scelta delle condizioni chimico-fisiche per il processo degradativo, lo studio condotto sui microcosmi con 200 g di terreno ha permesso di valutare tramite l'analisi fattoriale (ANOVA) e la superficie di risposta (RMS), l'influenza del contenuto di umidità e del rapporto C/N sulla resa di rimozione dell'inquinante rappresentato da olio diesel in questo studio.

L'analisi fattoriale è stata condotta su due variabili obiettivo:

- la percentuale di olio diesel rimosso;
- la concentrazione di fluoresceina cumulata, che permette di stimare l'attività microbica presente nel campione.

L'analisi è stata effettuata facendo variare l'umidità percentuale del microcosmo tra 8% e 12% e il rapporto C/N tra 60 e 300, tenendo in considerazione i risultati ottenuti dai microcosmi con 800 g di terreno.

Entrambe le analisi hanno confermato che il rapporto C/N influisce maggiormente sul processo degradativo, mentre il contenuto di umidità ha un effetto secondario.

Considerando la percentuale di rimozione del diesel, secondo la RMS, il rapporto ottimale C/N ricade nell'intervallo tra 100-180, mentre i valori di umidità ottimali sono compresi tra 8-10%.

Secondo la superficie di risposta, determinata per la concentrazione di fluoresceina prodotta, si ottiene una zona in cui le condizioni ottimali variano tra C/N=180 e C/N=220. Invece, si riscontra che l'umidità non incide sulla produzione di fluoresceina.

Dato che, al fine del processo degradativo, l'analisi della percentuale di rimozione del diesel è una misura diretta, si considera come condizione ottimale C/N=120 e $u_{\%}=8\%$.

In questo microcosmo si è avuta una degradazione complessiva del 33% di gasolio dopo 35 giorni. Dalle analisi al gascromatografo è emerso che durante il processo degradativo si ha la formazione di co-metaboliti; tale formazione può giustificare la maggiore degradazione degli idrocarburi con catene più lunghe e complesse. Lo studio sulla cinetica di degradazione ha dimostrato che sia il modello del primo ordine che del secondo ordine interpretano bene i dati sperimentali.

Mesocosmi con 3400 g di terreno

Nei mesocosmi con 3400 g di terreno si è monitorato il processo degradativo tramite i parametri geofisici, quali conducibilità elettrica e permittività dielettrica. Tali parametri geofisici possono essere utilizzati come indicatori indiretti del processo di degradazione; inoltre le tecniche geofisiche sono poco invasive e particolarmente adatte al monitoraggio on-site, in quanto richiedono l'installazione di sonde in grado di misurare in continuo i parametri geofisici.

Si è avuta una crescita microbica, poiché la concentrazione di colonie microbiche è aumentata di un ordine di grandezza rispetto alla condizione iniziale ($1.25 \cdot 10^3$ UFC/g_{suolo}). Dalle analisi al SEM si ha una conferma che il numero di colonie microbiche formate nel mesocosmo 1, ossia il sistema aerato, aumenta con la profondità della colonna. Nel mesocosmo 2, invece, la popolazione microbica rimane pressoché costante e inferiore ai valori ottenuti con il sistema aerato.

Dopo 90 giorni, la concentrazione di gasolio residua è variata in funzione della profondità. In particolare, nel mesocosmo 1 si è registrata una diminuzione della concentrazione di gasolio nella zona superficiale. Tuttavia, la concentrazione di inquinante al fondo della colonna risulta più elevata, segno che il gasolio è percolato in tale zona della colonna. Nel mesocosmo 2, invece, il quantitativo di gasolio presente è rimasto uniforme. Ciò ha determinato un'invarianza dei due parametri geofisici.

Nel mesocosmo 1, l'andamento dei due parametri geofisici è stato influenzato dall'invio dell'aria, che ha provocato un'isteresi nella misura dei dati. Pertanto, non è stato possibile monitorare in maniera efficace l'avanzamento del processo degradativo. Tale metodo geofisico,

quindi, deve essere perfezionato per poter essere impiegato nel monitoraggio del processo di biostimolazione.

Bibliografía

- Adam, G. and Duncan, H., 2001, Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils, *Soil Biology and Biochemistry*, **33**(7–8), pp. 943–951.
- Álvarez M., Ruberto L., Balbo L., Cormack M., 2017, Bioremediation of hydrocarbon-contaminated soils in cold regions : Development of a pre-optimized biostimulation biopile-scale field assay in Antarctica, *Science of the Total Environment*, **591**, pp. 194–203.
- Archie, G. E., 1941, The Electrical Resistivity Log as an Aid in Determining Some Reservoir Characteristics, *Petroleum Technology*, **1422**, pp. 54–62.
- Casale A., Bosco F., Chiampo F., Franco D., Ruffino B., Godio A., Pujari P. R., 2018, Soil microcosm set up for a bioremediation study, *Proceedings of the Sixth International Conference on Advances in Bio-Informatics, Bio-Tecnology and Environmental Engineering* , pp. 12–15.
- Comegna, A., Coppola A., Dragonetti G., Sommella A., 2013, Dielectric response of a variable saturated soil contaminated by Non-Aqueous Phase Liquids (NAPLs), *Procedia Environmental Sciences*, **19**, pp. 701–710.
- Horel, A. and Schiewer, S., 2009, Investigation of the physical and chemical parameters affecting biodegradation of diesel and synthetic diesel fuel contaminating Alaskan soils, *Cold Regions Science and Technology*. Elsevier B.V., **58**, pp. 113–119.
- Hyun, S., Ahn M., Zimmerman A. R., Kim M., Kim J., 2008, Implication of hydraulic properties of bioremediated diesel-contaminated soil, *Chemosphere*, **71**, pp. 1646–1653.
- Lahel, A., Fanta A. B., Sergienko N., Shakya M., Lòpez M.E., Behera S. K., Rene E. R., Park, H., 2016, Effect of process parameters on the bioremediation of diesel contaminated soil by mixed microbial consortia, *International Biodeterioration and Biodegradation*, **113**, pp. 375–385.
- van Liedekerke, M., Prokop G., Rabl-Berger S., Kibblewhite M., Louwagie G., 2014, *Progress in the management of contaminated sites in Europe. Reference Report by the Joint Research Centre (JRC) of the European Commission*.
- Maddela, N. R., Scalvenzi L., Pérez M., Montero C., Gooty J.M, 2015, Efficiency of Indigenous Filamentous Fungi for Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons in Medium and Soil: Laboratory Study from Ecuador', *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **95**, pp. 385–394.
- Margesin, R., Zimmerbauer, A. and Schinner, F., 2000, Monitoring of bioremediation by soil biological activities, *Chemosphere*, **40**, pp. 339–346.
- Masy, T., Caterina D., Tromme O., Lavigne B., Thonart P., Hiligsmann S., Nguyen F., 2016, Electrical resistivity tomography to monitor enhanced biodegradation of hydrocarbons with *Rhodococcus erythropolis* T902.1 at a pilot scale, *Journal of Contaminant Hydrology*, Elsevier, **184**, pp. 1–13.
- Mcintosh, P., Schulthess C. P., Kuzovkina Y. A., Guillard K., 2017, Bioremediation and phytoremediation of total petroleum hydrocarbons (TPH) under various conditions, *International Journal of Phytoremediation*. Taylor & Francis, **19**, pp. 755–764.
- Montgomery D. C. and Runger G. C., 2003, *Applied Statistics and Probability for Engineers*, John Wiley & Sons, Inc., New York, USA. [ISBN 0-471-20454-4].

Ramírez, M. E., Zapién B., Zegarra H.G., Rojas N.G., Fernández L.C., 2009, Assessment of hydrocarbon biodegradability in clayed and weathered polluted soils, *International Biodeterioration and Biodegradation*, **63**, pp. 347–353.

Schnurer, J. and Rosswall T., 1982, Fluorescein Diacetate Hydrolysis as a Measure of Total Microbial Activity in Soil and Litter, *Applied and Environmental Microbiology*, **43**, pp. 1256–1261.

Sharma, B., Dangi, A. K. and Shukla, P., 2018, Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: A review, *Journal of Environmental Management*. Elsevier, **210**, pp. 10–22.

Ringraziamenti

Alla fine di questo lavoro di tesi, vorrei ringraziare la mia relatrice, la prof.ssa Chiampo, per la disponibilità e l'attenzione dimostratemi durante tutto il periodo di lavoro e per avermi dato la possibilità di crescere professionalmente. Ringrazio il mio relatore, il prof. Godio, che mi ha guidato nella parte geofisica e nella realizzazione dei sistemi analizzati.

Un ringraziamento particolare va alla prof.ssa Ruffino e alla prof.ssa Bosco per il supporto durante le prove di laboratorio; al dottor Diego Franco che si è mostrato sempre disponibile e gentile durante tutti questi mesi di lavoro.

Un grazie particolare al dottor Andrea Vergnano che mi ha affiancato durante tutto questo periodo, consigliandomi e sostenendomi nelle scelte prese, e che mi ha aiutato nell'affrontare questo lavoro di tesi.