

# **Università degli Studi di Napoli “Federico II”**

DOTTORATO DI RICERCA IN VALORIZZAZIONE E GESTIONE

DELLE RISORSE AGRO-FORESTALI

-Bonifica e Difesa del Suolo-

## **“Uso di sostanze chimiche esogene per il risanamento di suoli contaminati”**

Docente guida  
Chiar.mo Prof.  
**Alessandro Piccolo**

Candidata  
**Dr. Anna Agretto**

Il Coordinatore  
Chiar.mo Prof.  
**Antonio Cioffi**

**Anni Accademici 2001-2004**

## INDICE

<b>CAPITOLO 1. Introduzione</b>	4
Inquinamento del suolo	4
Eterogeneità geochimica della SOM	7
Applicabilità delle diverse tecnologie di risanamento	15
1.1 Lavaggio di suoli inquinati	22
Uso di surfattanti sintetici nella remediation di suoli contaminati	25
Interazione dei composti xenobiotici con la SOM	28
1.2 Lavaggio di suolo con acido umico esogeno per il recupero di suoli contaminati	31
1.3 Le metalloporfirine	36
1.4 Un esempio di applicazione del D.M. 471/99 in Liguria	39
<b>CAPITOLO 2. Obiettivi della tesi</b>	41
2.1 Studio della fattibilità del lavaggio di suolo con acido umico come surfattante	41
2.2 Comparazione di due tecnologie estrattive	43
2.3 Effetti delle metalloporfirine sulla degradazione di contaminanti organici e sulla loro interazione con le sostanze umiche	45
<b>CAPITOLO 3. Parte Sperimentale: Materiali e Metodi di Analisi sui suoli</b>	48
3.1 Campionamento	48
3.2 Reagenti e standard	48
3.3 Analisi chimico-fisiche	48
3.4 Determinazione degli inquinanti organici	49
3.4.1 Estrazione Soxhlet	49
3.4.2 Ultrasonificazione	49
3.5 Pretrattamento dei campioni	50
3.6 Analisi GC-MS degli estratti dei suoli contaminati	50
3.7 Influenza dello standard interno sui risultati delle analisi	51
3.8 Trattamento dati	52

<b>CAPITOLO 4. Parte Sperimentale: Esperimenti di Bonifica</b>	<b>53</b>
4.1 Lavaggio del suolo (Soil Washing)	53
4.1.1 Surfattanti selezionati	53
4.1.2 Materiale umico	54
4.1.3 Lavaggio del suolo con acqua e tensioattivi sintetici e naturali	55
4.1.4 Lavaggio del suolo con acidi umici	56
4.2 Sintesi del catalizzatore	56
4.2.1 Sintesi della meso-tetra-(2,6-dicloro-3-solfato-fenil)porfirina	57
4.2.2 Sintesi della meso-tetra-(2,6-dicloro-3-solfato-fenil) porfirinato di Fe(III) cloruro	61
4.3 Copolimerizzazione ossidativa di contaminanti organici per catalisi biomimetica in presenza di sostanze umiche	62
4.3.1 Soluzioni preparate per valutare l'effetto del catalizzatore biomimetico in presenza di acido umico esogeno	62
4.3.2 Reazioni di polimerizzazione su suolo contaminato	63
4.4 Copolimerizzazione catalitica in sostanze umiche su suoli dopo lavaggio con HA	65
4.5 Fotocatalisi ossidativa	67
<b>CAPITOLO 5. Risultati e Discussione</b>	<b>68</b>
5.1 Il suolo	68
5.1.1 Caratterizzazione quali-quantitativa dei contaminanti organici	68
5.1.2 Effetto della tessitura sull'estrattibilità dei contaminanti	81
5.2 Lavaggio chimico con tensioattivi	82
5.2.1 Capacità solubilizzante dei surfattanti	82
5.2.2. Effetto della tessitura sull'efficienza estrattiva dei surfattanti	86
5.2.3 Lavaggio del suolo A con acido umico	93
5.3 Sistema catalitico biomimetico	95
5.3.1 Copolimerizzazione ossidativa dei contaminanti in acido umico catalizzata da ferro-porfirina.	95
5.3.2 Rese di estrazione dei contaminanti organici nel suolo controllo e nel suolo sottoposto a vari trattamenti	104

5.3.2.1 Effetti della ferroporfirina in presenza di H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sull'estrattibilità dei contaminanti dal suolo A	104
5.3.2.2 Riduzione catalitica della contaminazione nel suolo A in presenza di acido umico	107
5.3.2.3 Effetto di un precedente ciclo di lavaggio con acido umico esogeno sulla riduzione catalitica della contaminazione	112
5.3.2.4 Comportamento fotocatalitico della ferroporfirina sulla riduzione della contaminazione	114
<b>CAPITOLO 6. Conclusioni</b>	<b>116</b>
6.1 Uso della sonicazione come tecnica estrattiva per una procedura determinazione analitica dei contaminanti organici nei suoli inquinati	116
6.2 Lavaggio del suolo con acido umico esogeno per la riduzione della contaminazione dei suoli	118
6.3 Catalisi biomimetica come tecnologia innovativa per la copolimerizzazione ossidativa dei contaminanti nelle strutture molecolari delle sostanze umiche	119
<b>Bibliografia</b>	<b>123</b>
<b>Appendice: Abstract della tesi</b>	<b>141</b>
<b>Ringraziamenti</b>	
<b>Appendice (lavoro accettato)</b>	
Bozza del lavoro accettato per la stampa su Environmental Pollution: "Soil remediation: humic acids as natural surfactants in the washings of highly contaminated soils" di P. Conte, A. Agretto, R. Spaccini, A. Piccolo	

# CAPITOLO 1

## INTRODUZIONE

### **Inquinamento del suolo**

L'immissione nell'ambiente di quantità massive di prodotti chimici, organici e inorganici, provenienti da attività urbane (incendi agricoli e forestali, combustione di combustibili fossili) (Simcik et al., 1999; Venkataraman et al., 2002), industriali (sversamenti, rilasci accidentali, rilasci nel sottosuolo da serbatoi di stoccaggio) (Ballarin-Denti et al., 1999; Lee et al., 2002; Kiem et al., 2003) e agrarie, porta ad un'alterazione profonda degli equilibri chimici e biologici del suolo. Molti sono anche gli elementi e le sostanze che arrivano al suolo tramite riciclaggio di fanghi provenienti dalla depurazione di acque reflue, di rifiuti, di effluenti di allevamenti zootecnici o provenienti da vari tipi di attività terziarie.

Alcuni di questi composti e i loro prodotti di degradazione, una volta entrati nell'ambiente, possono permanervi per lungo tempo. I complessi fenomeni di trasformazione chimica, fotochimica e biologica cui essi possono andare incontro nella biosfera, rendono difficile la previsione dell'impatto ambientale di un dato inquinante rilasciato nei vari comparti dell'ecosistema. Molti di essi presentano una tossicità immediata, altri lenta nel tempo o imputabile a prodotti di degradazione o interazione. Le complesse interazioni trofiche che esistono tra i vari livelli delle catene alimentari e i conseguenti fenomeni di

biomagnificenza fanno sì che questi inquinanti si ritrovino in organismi di diversa scala evolutiva.

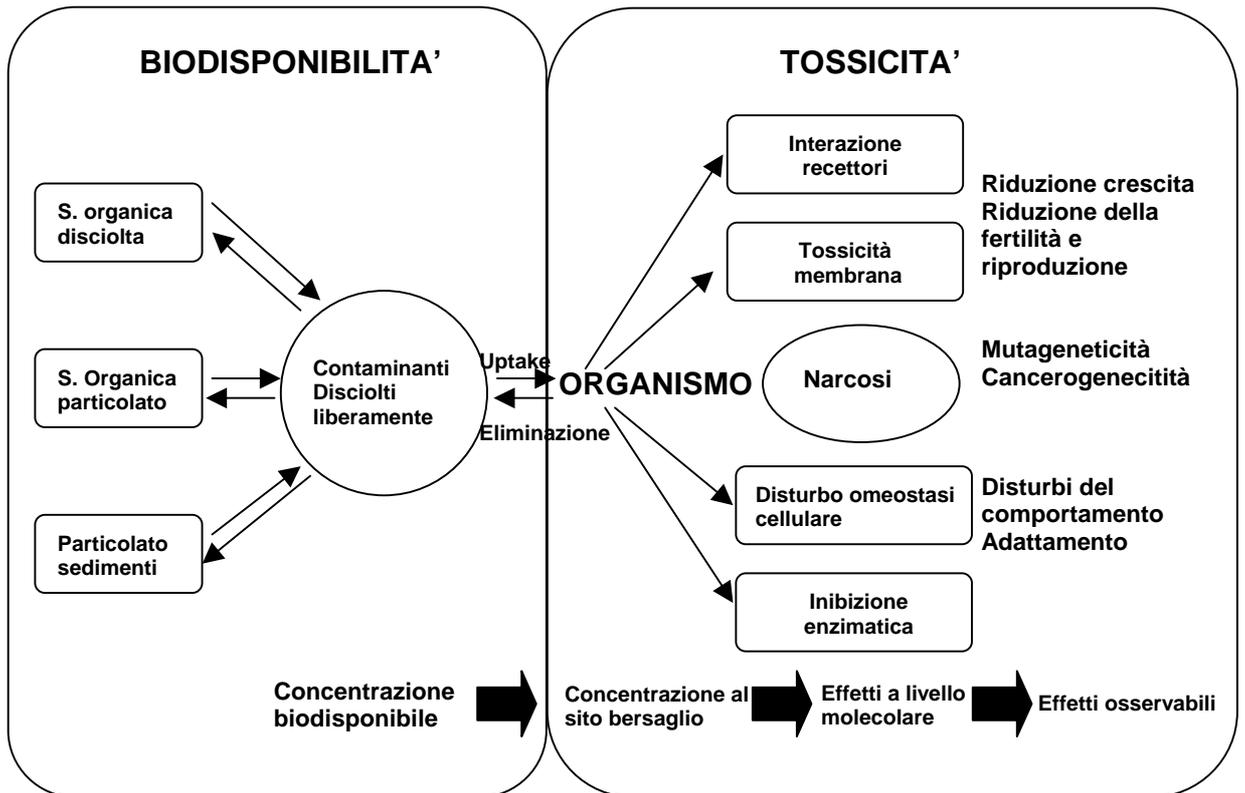
Ogni ambiente presenta una diversa capacità di resistenza alle tensioni prodotte dalle attività umane, che si ripercuotono direttamente o indirettamente su di esso determinando fattori di squilibrio e criticità. Di qui la necessità di porre rimedio ai fenomeni di contaminazione *puntuale* (siti contaminati) e *diffusa*.

La contaminazione diffusa del suolo, se pure non appariscente in tempi brevi, può risultare comunque grave perché può interessare ampi territori ed è spesso connessa alla stessa evoluzione del substrato.

I siti contaminati, rappresentano una significativa minaccia per gli ecosistemi acquatici e terrestri a causa delle conseguenze ecotossicologiche cui possono dar luogo e che riguardano non solo effetti acuti, ma anche possibili effetti cronici a lungo termine (Fent, 2003), non solo su alcuni tipi di organismi, ma sugli ecosistemi nel loro complesso. Gli effetti tossici di composti antropogenici sul biota e sugli ecosistemi sono considerati in relazione al loro comportamento chimico e al loro destino nell'ambiente. I contaminanti nei siti con contaminazione diffusa, esibiscono spesso proprietà critiche, quali la tossicità, l'alta persistenza ambientale, alta mobilità incline alla contaminazione delle falde e, inoltre, alta lipofilicità che si risolve, infine, con la loro bioaccumulazione negli alimenti. La situazione appare più complicata considerando che nei siti contaminati si verifica la presenza contemporanea di sostanze di natura e complessità diverse e le interazioni tra i singoli composti possono assumere una certa importanza.

La biodisponibilità delle sostanze chimiche, che è dipendente dai processi biogeochimici e fisiologici, è un importante fattore, spesso trascurato nella valutazione ecotossicologica e nella stima del rischio. La frazione biodisponibile è critica per l'assimilazione e, infine, per la concentrazione dei contaminanti negli organismi finali (Fent, 2002). La risposta di un organismo

a una sostanza tossica è determinata dalla quantità della sostanza che raggiunge l'organo o il tessuto bersaglio. Le relazioni che intercorrono tra questa quantità e la concentrazione nell'ambiente esterno, è controllato dai fenomeni di bioaccumulazione (Mackay & Fraser, 2000) (Fig 1.1).



**Figura 1.1** Effetti ecotossicologici dipendenti dalla frazione biodisponibile dei contaminanti e la cui concentrazione nell'organismo finale induce effetti molecolari che si propagano fino a una varietà di manifestazioni tossiche negli organismi (Mackay & Fraser, 2000).

La decontaminazione dei siti interessati appare allora di fondamentale importanza per limitare la diffusione dell'inquinante anche in altri siti non direttamente esposti all'inquinante stesso.

Secondo una recente indagine, nell'Unione Europea (EU) sono presenti più di 500.000 siti, spesso precedenti siti industriali (*brownfields*), contaminati da inquinanti organici e/o metalli pesanti, e in genere localizzati in aree situate

all'interno o vicino a città densamente popolate. Perciò, presi insieme, questi siti costituiscono un enorme problema ambientale di cui l'UE dovrà occuparsi nei prossimi anni.

### **Eterogeneità geochimica della SOM**

La sostanza organica del suolo (SOM) rappresenta il comparto ambientale più importante di carbonio organico (CO) all'interno della biosfera, poiché il suo contenuto è stimato intorno ai  $1400 \times 10^{15}$  g, circa il doppio del carbonio presente nella CO<sub>2</sub> atmosferica (Schlesinger, 1997). Di conseguenza, la sostanza organica del suolo è l'unico serbatoio di carbonio organico che potenzialmente è in grado di fissare a lungo termine il carbonio immesso nell'atmosfera dal continuo aumento della combustione dei carburanti fossili e di contribuire a limitare i cambiamenti globali relativi all'aumento dei gas serra.

Sulla base alla diversa stabilità biochimica, la SOM si distingue in gruppi eterogenei di sostanze, identificate attraverso i loro tempi di permanenza e residenza nel suolo, le quali vanno dai residui organici indecomposti che giungono al terreno in frazione labile, la parte attiva della SOM, fino ai complessi più recalcitranti, che costituiscono la frazione stabile, ossia il nucleo principale di accumulo della sostanza organica (Andreux, 1996).

Da un punto di vista chimico, la frazione labile della SOM è costituita da biopolimeri cellulari come carboidrati, aminoacidi, peptidi, amminozuccheri, lipidi e da strutture più difficilmente metabolizzabili come cere, grassi, resine, lignine ed emicellulose (Piccolo, 1996). Essi derivano dalla degradazione chimica e biochimica dei residui degli organismi vegetali e animali che pervengono al suolo in seguito a morte o a senescenza e dalla risintesi operata dalla flora microbica (Cheshire & Hayes, 1990). Essi vanno a costituire la

lettiera o l'orizzonte più superficiale nei suoli indisturbati e fungono da substrato per la crescita della fauna del suolo.

In particolare, i carboidrati del suolo sono qualitativamente e quantitativamente la componente più importante della frazione labile (Cambardella & Elliot, 1992). Essi costituiscono il 25% della sostanza organica totale (Stevenson, 1994) e sono considerati un'importante fonte di energia per lo sviluppo dell'attività pedo-microbiologica (Insam, 1996). Un'importante azione svolta dai carboidrati è la stabilizzazione degli aggregati del suolo, sia a livello di macroaggregazione (Oades & Waters, 1991) che di microaggregazione (Chenu & Guèrif, 1991).

E'fondamentale, tuttavia, l'azione stabilizzatrice svolta dai polisaccaridi nel processo di formazione e mantenimento degli aggregati che è, altrimenti considerato temporaneo (Piccolo, 1996), dovuta alla specifica interazione con la sostanza umificata (Chesire et al., 1992).

La frazione umificata rappresenta la componente più ubiquitaria (Andreux, 1996), stabile e recalcitrante della sostanza organica, con un tempo di residenza media che varia nei diversi ecosistemi da decine a diverse centinaia d'anni. Allo stesso tempo queste frazioni sono poste in stretta relazione con le parti labili della sostanza organica, essendo direttamente coinvolte nei processi di accumulo, dinamica e stabilizzazione della sostanza organica stessa (Piccolo, 1996).

A fronte del rilascio di CO<sub>2</sub> dai suoli dovuto ad un'agricoltura intensiva, sempre maggiore attenzione è riservata all'approfondimento della conoscenza della sostanza organica e del suo comportamento nel suolo, al fine di definire le pratiche volte al mantenimento ed al miglioramento dell'azione esercitata dalla componente organica. Vi è considerevole evidenza che un aumentato sequestro di carbonio organico dal suolo, ottenibile mediante innovative pratiche di gestione del suolo con l'impiego di sostanze umiche idrofobiche (Piccolo, Spaccini *et al.*, 1999), possa ristabilire l'equilibrio dinamico nel

ciclo del C.O. (Smith & Shugart, 1993), stante una perdita corrente dai suoli convertiti ad uso agricolo di  $0.8 \times 10^{15}$  g C/anno (Paustian *et al.*, 1997). Numerosi studi hanno dimostrato, altresì, come il contenuto di sostanza organica del suolo sia inversamente correlato alla disponibilità di composti organici, in particolare contaminanti, e come il fenomeno del “sequestro”, possa avere influenza sulla valutazione all’esposizione di siti contaminati (Bennett *et al.*, 2001).

Di conseguenza la sostanza organica del suolo (SOM) può essere considerata una delle direttrici fondamentali nell’ambito dei cambiamenti ambientali, agendo alternativamente come fonte o riserva di accumulo principale di CO (Piccolo, 1998).

Della sostanza organica umificata, le sostanze umiche sono i composti organici dominanti nel suolo e nei sedimenti (Schnitzer, 1978; Stevenson, 1994). La struttura del suolo, l’attività biologica, la biodisponibilità chimica, sono solo alcuni dei processi principali influenzati dalle sostanze umiche.

Numerosi studi confermano che le sostanze umiche influiscono enormemente sul destino degli inquinanti organici nel suolo e nelle acque (Chin *et al.*, 1990). La presenza di numerosi e diversi gruppi funzionali nella struttura consente loro di legare contaminanti organici sia non polari sia leggermente polari (Piccolo *et al.*, 1996a, 1998). Tuttavia, i processi di accumulo e di decomposizione delle sostanze umiche nei diversi comparti ambientali (Piccolo, 1996) sono ancora in gran parte ancora incerti.

La maggior parte delle difficoltà incontrate riguardanti la definizione chimica della struttura delle sostanze umiche e la reattività nei riguardi dei pesticidi e di altri contaminanti ambientali, deriva in gran parte dalla loro eterogeneità e variabilità geografica. In realtà, uno dei problemi non ancora completamente risolti sulla struttura dell’humus è relativo alla sua dimensione molecolare, ma è certo che i risultati ottenuti nel campo della chimica supramolecolare delle sostanze umiche non rendono più adatta la classica definizione di biopolimero

e la maggior parte degli esperti preferisce il termine di “ biomateriale ”. L’attuale comportamento delle sostanze umiche nei comparti ambientali suolo e acqua, è il riflesso delle proprietà conformazionali e, dunque della loro struttura molecolare, che ha importanti implicazioni per la mobilità del contaminante, l’aggregazione, e l’adesione alle superfici argillose (Steelink, 2002).

Dipendendo dalla loro estraibilità in soluzioni basiche diluite e dalla loro solubilità in soluzioni acide diluite, le tre frazioni umiche, acido fulvico, acido umico, e umina, sono ulteriormente definite operativamente (Stevenson, 1994). Sono chiamati acidi umici quei materiali che si solubilizzano in soluzione alcalina ma, che precipitano in soluzioni acide ( $\text{pH} < 3$ ), mentre sono acidi fulvici quei materiali che si solubilizzano in soluzioni alcaline ma anche in condizioni acide. Si chiama poi umina la frazione insolubile a qualsiasi condizioni di pH. Le strutture degli acidi fulvici sono più alifatiche e meno aromatiche degli acidi umici; paragonato all’acido umico, l’acido fulvico ha un più alto contenuto di gruppi carbossilici e fenolici, un più alto contenuto di H rispetto al carbonio (H/C) e un più alto rapporto atomico tra l’O e il C (O/C) (Aiken *et al.*, 1985). Tutto ciò è responsabile della loro solubilità in acqua e a tutti i valori di pH. Gli acidi umici, essendo più altamente aromatici, diventano insolubili quando i gruppi carbossilati sono protonati a bassi valori di pH. Questa struttura permette alle sostanze umiche di funzionare come *surfattanti*, con la capacità di legare sia sostanze idrofobiche che idrofiliche. Questa funzione in combinazione con le loro proprietà colloidali fa delle sostanze umiche degli agenti efficaci nel trasporto sia di contaminanti organici che inorganici nell’ambiente (Gaffney *et al.*, 1996).

Quasi tutte le proprietà chimiche, fisiche e ambientali delle sostanze umiche derivano, in realtà, dai loro gruppi funzionali ossigenati. Esse possono contenere gruppi carbossilici, alcolici, amminici, ammidici, aldeidici, chetonici, eteri, esteri, carbonilici, anidridici, chinonici, amminici, lattone,

carbonile, idrossile, fenolico, ma tutte hanno una straordinaria affinità per l'acqua, rendendo alquanto complicata l'analisi relativa al contenuto di ossigeno. Per questo, risultati riproducibili riguardo al contenuto d'ossigeno possono essere ottenuti principalmente mediante analisi dei gruppi funzionali ossigenati (Stevenson, 1994).

Il gruppo carbossilico è probabilmente il più importante nelle sostanze umiche poiché è responsabile dell'attività tampone, della complessazione di ioni metallici, della ritenzione dell'acqua, della capacità di scambio e dell'acidità.

Le tecniche di indagine chimico-fisica messe a punto negli ultimi venti anni hanno consentito di individuare non solo la composizione delle sostanze umiche e, quindi di spiegare le loro caratteristiche chimiche, ma hanno permesso anche la chiarificazione delle loro proprietà conformazionali.

In generale, le sostanze umiche sono tradizionalmente considerate in letteratura come eteropolimeri aventi complessità e composizione estremamente variabili (Ghosh & Schnitzer, 1980; Wershaw, 1986; Stevenson, 1994), le cui dimensioni sono funzione delle caratteristiche chimico-fisiche del mezzo (Ghosh & Schnitzer, 1980; Piccolo *et al.*, 1996a,b). Wershaw (1986, 1993) ha proposto modelli plausibili con strutture secondarie caratterizzate da aggregazioni e/o associazioni semplici a peso molecolare limitato. In tali modelli, le molecole si aggregano tramite interazioni deboli, quali legami van der Waals, legami idrogeno, interazioni idrofobiche, formando strutture micellari simili alle membrane naturali, con una parte interna idrofobica e una esterna idrofilica, piccole particelle colloidali in soluzione e strutture di tipo laminare più estese aderenti alle superfici dei minerali.

Una dettagliata caratterizzazione delle sostanze umiche mediante metodi cromatografici e spettroscopici è stata sempre ostacolata dall'eterogeneità di questa classe di sostanze. Spettri di massa di varie sostanze umiche sono stati

ottenuti usando l'elettrospray ionisation (ESI) e la cromatografia ad esclusione molecolare (SEC) combinata con la spettrometria di massa (Pfeifer *et al.*, 2001; Piccolo e Spiteller, 2003) per differenti frazioni eluite.

I profili di eluizione ottenuti mediante cromatografia ad esclusione molecolare evidenziano una forte dipendenza dal pH della soluzione di analita, sicchè l'autoassociazione di sostanze umiche può essere frammentata dall'aggiunta di acidi organici laddove l'unica frazione eluita a pH alcalino è dovuta all'autoassociazione di piccole molecole umiche in aggregati più grandi invece di vere e proprie unità macromolecolari umiche (Piccolo *et al.*, 1996; Conte & Piccolo, 1999). Questo è un aspetto importante per una migliore comprensione del molteplice comportamento delle sostanze umiche nell'ambiente.

Questi ed altri risultati (Piccolo *et al.*, 1996b, c; Piccolo *et al.*, 1999a; Cozzolino *et al.*, 2000; Piccolo & Conte, 2000; Piccolo *et al.*, 2001a,b; Piccolo *et al.*, 2002) hanno indicato che le sostanze umiche in soluzione si comportano come associazioni supramolecolari di piccole molecole eterogenee che si autoaggregano ed hanno masse molecolari ben inferiori (<2000 Daltons) a quanto comunemente riportato in letteratura (50K-1000K Dalton) e sono tenute insieme in dimensioni molecolari solo apparentemente grandi da forze di legame di natura prevalentemente idrofobica. La stabilità termodinamica di tale conformazione in soluzione, è attribuita alla tendenza, guidata da entropia, ad escludere molecole d'acqua dalle reversibili associazioni umiche con una diminuzione dell'energia molecolare totale (Piccolo, 2002).

I domini idrofobici e idrofilici contigui consentono l'incorporazione di materiale organico di varia natura per affinità strutturale. Tali conformazioni spiegano la capacità delle sostanze umiche di interagire e di incorporare stabilmente contaminanti di natura idrofobica.

Ulteriori misure mediante cromatografia ad esclusione molecolare (HPSEC) hanno mostrato che la presenza di acidi organici può ridurre notevolmente la dimensione molecolari di materiali umici di diversa origine e che tale variazione avviene in funzione delle caratteristiche chimiche delle sostanze umiche e di quelle degli acidi organici addizionati (Piccolo *et al.*, 1999; Cozzolino *et al.*, Piccolo *et al.*, 2003). Al variare del pH gli acidi organici possono alterare le forze di coesione idrofobica favorendo la formazione di aggregati di dimensioni inferiori rispetto agli originali. L'entità della disaggregazione è funzione della natura idrofobica delle sostanze umiche e degli acidi organici addizionati. E' stata riscontrata una correlazione tra la lunghezza della catena di atomi di carbonio dell'acido organico addizionato e l'entità della disaggregazione

Lavori di caratterizzazione di frazioni umiche con la pirolisi-gascromatografia/spettrometria di massa (Pir-GC-MS) e la spettroscopia <sup>1</sup>HNMR hanno mostrato che i trattamenti con acido acetico (AcOH) possono alterare la distribuzione delle componenti molecolari umiche in frazioni di taglia molecolare inferiore, mentre le frazioni di taglia maggiore, più ricche in catene alchiliche, hanno confermato che le molecole umiche sono stabilizzate in associazioni supramolecolari mediante deboli interazioni tra gruppi apolari come catene alchiliche o gruppi aromatici (Piccolo *et al.*, 2002)

Questa innovativa descrizione della struttura molecolare delle sostanze umiche apre nuove possibilità per ampliare le conoscenze sul controllo della chimica e della reattività della sostanza organica naturale nel suolo e nell'ambiente.

Ulteriori studi di analisi conformazionale sulle sostanze umiche basati su tecniche spettroscopiche quali, NMR, IR, spettroscopia ESR insieme alla microscopia a forza atomica (AFM) (Liu and Huang, 1999; Minemy *et al.*, 1999), hanno ampliato enormemente la possibilità di trarre un'immagine completa della struttura molecolare secondaria delle sostanze umiche.

La metilazione delle sostanze umiche seguita da analisi spettroscopiche  $^{13}\text{C}$  NMR ha permesso la separazione e la misura del relativo ammontare dei gruppi carbossilici e fenolici, ha fornito misure più precise del carattere aromatico, ha individuato caratteristici picchi polimetilenici-(CH<sub>2</sub>) (Tombacz & Rice, 1999; Hu et al., 2000). Le proprietà attribuite alle lunghe catene alchiliche laterali risiedono nella capacità di abbassare la tensione superficiale dell'acqua, di legarsi a composti non polari e di formare micelle, confermando la natura surfattante delle sostanze umiche. La maggior parte degli studi NMR ha indicato che queste funzioni alchiliche costituiscono il 20-25% del carbonio totale contenuto negli acidi umici.

Negli ultimi 20 anni la spettrometria NMR è diventata infatti uno degli strumenti analitici più potenti per la rivelazione e la quantificazione di entità strutturali e per altre utili informazioni sui gruppi funzionali (Preston, 1996). I valori del contenuto di carbonio ottenuti dall'elaborazione matematica di aree spettrali  $^{13}\text{C}$ -CPMAS-NMR (NMR allo stato solido) di composti organici di struttura nota e di differenti sostanze umiche non sono stati significativamente diversi da quelli ottenuti per determinazione diretta per analisi elementare quantitativa (Conte *et al.*, 2002). Perciò, le informazioni spettroscopiche CPMAS-NMR di sostanze umiche, pur fornendo segnali di risonanza complessi e scarsamente risolti, offrono una attendibile rappresentazione quantitativa del contenuto totale di carbonio presente nelle sostanze umiche (Conte *et al.*, 2002).

## **Applicabilità delle diverse tecnologie di risanamento**

La scarsa conoscenza, perdurata fino a pochi anni fa, degli effetti pericolosi degli inquinanti e della loro mobilità e diffusione nell'ambiente, la mancanza di metodiche di rilevamento adeguatamente sensibili, l'assenza di vincoli ambientali allo sviluppo industriale ed agricolo, hanno lasciato sul territorio una pesante eredità che conferisce al problema dell'inquinamento dimensioni drammatiche a livello sia locale che nazionale.

La pubblicazione del D.M. 471/99, emanato quale regolamento specifico per la piena applicazione dell'articolo 17 (L. 426/98) ha individuato i criteri con cui effettuare interventi di bonifica e ripristino ambientale di siti inquinati indicando, tra l'altro, i valori limite di concentrazione di elementi o composti organici ed inorganici inquinanti per le acque superficiali, sotterranee, per il suolo ed il sottosuolo. Tali limiti sono stabiliti in base alla tossicità delle sostanze considerate, la loro bioaccumulabilità e l'utilizzo previsto del sito.

Le principali classificazioni delle tecniche di trattamento utilizzabili sono state effettuate sulla base degli obiettivi raggiungibili, del luogo in cui avviene il trattamento e della matrice ambientale su cui si interviene.

Una prima classificazione, riferibile agli obiettivi ultimi che si intende raggiungere, prevede la distinzione in *interventi di messa in sicurezza* e in *interventi di bonifica in senso stretto*.

Per quanto riguarda i primi, essi consistono nell'applicazione di metodologie atte a contenere o controllare la migrazione dei contaminanti nell'ambiente, destinando a fasi successive la soluzione alla radice del problema e possono essere sintetizzati in:

1) tecniche di contenimento statico - si basa sull'uso di "barriere fisiche impermeabili" (diaframmi plastici) realizzate al fine di incapsulare con uno strato a permeabilità molto bassa la zona in cui è presente il suolo o la falda contaminata. Altra tecnica di messa in sicurezza è il "capping" (ricoprimento

superficiale), adottata soprattutto in presenza di discariche di rifiuti al fine di ridurre l'infiltrazione di acqua dalla superficie con successiva presa in carico degli inquinanti o un loro trasporto in superficie da parte delle acque meteoriche;

2) tecniche di contenimento dinamico – si attua attraverso il drenaggio o la ricarica da pozzi e trincee drenanti e serve per operare un controllo dei contaminanti disciolti in falda modificandone dinamicamente la superficie; le più usate sono le tecniche di drenaggio attraverso “pozzi di contenimento” (spurgo su uno o più pozzi idonei) che obbediscono alla necessità di arrestare la propagazione degli inquinanti e conseguentemente di disinquinare l'acquifero a valle o in profondità; molto utilizzato è inoltre il metodo della “barriera idraulica” che si opera immettendo acqua in falda e creando un gradiente idraulico inverso che blocca quindi la propagazione nell'acquifero a valle;

3) reazioni chimiche e/o biologiche in situ – si inducono in sito al fine di neutralizzare ed immobilizzare l'inquinante; una recente tecnica sono le “barriere reattive permeabili” all'interno delle quali i processi chimico-fisici che avvengono consentono di degradare, immobilizzare o adsorbire il contaminante nella fase di attraversamento.

Gli interventi di bonifica in senso stretto consentono la riduzione delle concentrazione delle sostanze inquinanti al di sotto dei valori limite previsti per la destinazione d'uso a cui s'intende riconvertire quel sito. Le principali tecnologie fino ad oggi utilizzate su scala reale o su scala pilota sono riportata in figura 1.2.

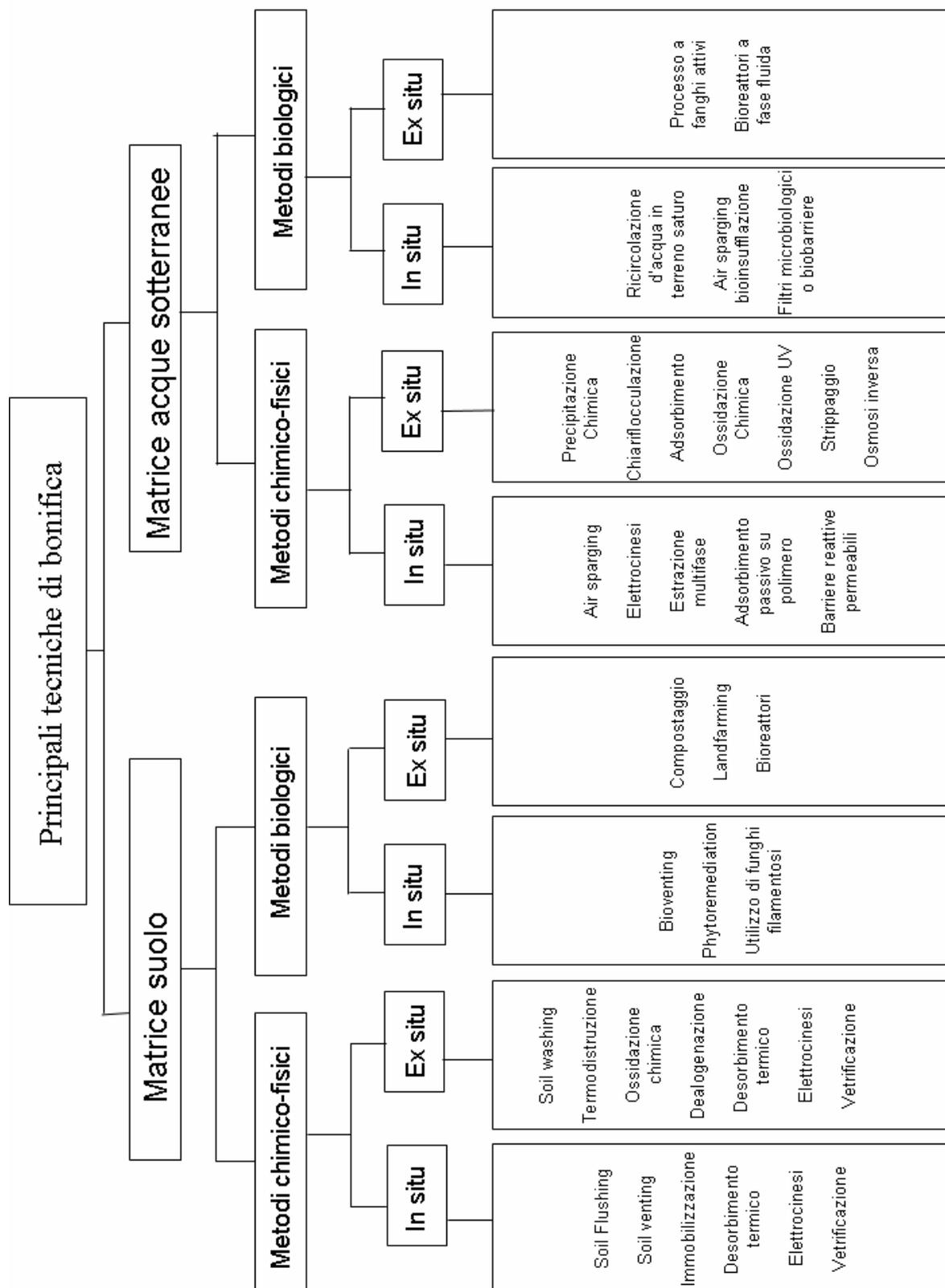


Figura 1.2 – Principali tecnologie di bonifica

Sulla base del luogo nel quale viene effettuato il trattamento di bonifica e/o messa in sicurezza, la terminologia adottata prevede la seguente suddivisione:

- interventi *in-situ*
- interventi *ex-situ* a loro volta suddivisi in:
  - interventi *on-site*
  - interventi *off-site*

1) interventi in situ – Consentono di rimuovere, distruggere o isolare la contaminazione senza rimuovere il terreno; l'applicazione di questi metodi è guidata principalmente dalle caratteristiche geolitologiche ed idrogeologiche dei terreni e del loro substrato. Questa metodologia risulta vantaggiosa perché oltre ad essere economicamente competitiva, permette di intervenire senza modificare la struttura delle opere fuori terra; il problema principale invece è costituito dalla complessità dell'ambiente sotterraneo in cui si opera che può portare ad un ridotto controllo del contaminante con il rischio di propagazioni indesiderate.

I processi di bonifica in-situ più comuni sono: “estrazione” del contaminante allo stato puro o in fase libera (utilizzo di pozzi o trincee drenanti), “soil venting” con ventilazione forzata del terreno e recupero dei contaminanti volatili della zona insatura (utilizzo di pozzi di estrazione), “bioventing” con ventilazione forzata del terreno allo scopo di stimolare la crescita batterica nella zona insatura per la biodegradazione dei contaminanti organici, “air sparging” utilizzato per strappare i componenti volatili presenti in soluzione nella falda acquifera, “biosparging” con l'applicazione dello sparging per stimolare la crescita batterica nella zona satura favorendo la degradazione biologica del contaminante organico.

2) interventi on-site – il trattamento del terreno rimosso viene effettuato nello stesso sito da bonificare, eliminando costi di trasporto e smaltimento; il terreno contaminato rimosso viene trattato usando impianti mobili, di cui i più

comuni sono i “sistemi di lavaggio” (lavaggio di suolo: acqua con saponi o solventi lavano il terreno per allontanare i contaminanti in esso presenti) e i “trattamenti termici” (si usano temperature medio-alte per modificare la struttura chimica del contaminante ed estrarlo sotto forma di vapore). Entrambe sono ottime tecniche, molto rapide, ma presentano costi di installazione degli impianti molto elevati; pertanto sono usate solo per ingenti volumi di terreno. Inoltre sono da annoverare le tecniche biologiche di “biodegradazione” (bioremediation: applicata su contaminanti organici biodegradabili come oli minerali), di “bioaddizione” (inoculazione di ceppi batterici selezionati in laboratorio che trasformino il contaminante in acqua, anidride carbonica e materiale cellulare), di “biostimolazione” (utilizza batteri indigeni presenti naturalmente nel terreno sviluppandone la crescita con aggiunta di nutrienti ed ossigeno);

3) interventi off-site – si mette in atto la rimozione del suolo contaminato trasferendolo in discarica od inviandolo ad un impianto di trattamento; esso non è però efficace per la contaminazione presente eventualmente in falda e presenta costi elevati a causa della sempre più difficile disponibilità di siti da adibire a discarica. Per tali motivi le bonifiche off-site sono sempre meno frequenti e destinate, in un futuro, all’applicazione su ridotti volumi di terreno;

In generale, l’applicabilità delle diverse tecnologie va valutata, in funzione di una serie di parametri connessi non solo alla tipologia degli inquinanti, ma anche alle caratteristiche della matrice, alla distribuzione spaziale della contaminazione, alla natura dell’area, alle condizioni operative degli impianti deputati al risanamento, ma va considerata anche in relazione all’impatto economico che grava sul soggetto chiamato a rispondere della bonifica, ossia, subordinata alla dimostrazione del non superamento dei limiti tabellari *a costi sostenibili*, di cui all’art.5 del D.M. 471/99.

Il D.M. 471/99 fornisce, tra l'altro, delle indicazioni di carattere generale, ad indirizzo dei criteri da adottare nella scelta delle diverse possibili tecnologie. Tali indicazioni suggeriscono una preferenza per le tecniche di bonifica tendenti a trattare e riutilizzare il suolo nel sito, mediante trattamenti *in situ* ed *on site*, con conseguente riduzione dei rischi derivanti dal trasporto e messa a discarica del terreno inquinato.

I sistemi che meglio rispondono a tali requisiti sono quelli di natura biologica, dato che, le tecniche più comunemente utilizzabili di natura chimico-fisica e termica (estrazione di vapori, lavaggio chimico, desorbimento termico e simili) si basano essenzialmente sull'allontanamento degli inquinanti dal suolo e sulla loro successiva trasformazione. Le tecnologie biologiche del resto, ben si prestano in genere ad applicazioni sul sito da risanare, rispondendo quindi all'ulteriore indicazione di ridurre i rischi derivanti dal trasporto di materiale contaminato.

Va peraltro rilevato che l'applicazione di metodi biologici incontra spesso pesanti limitazioni, anche per tipologie di inquinamento teoricamente con essi compatibili. I tempi di risanamento sono in genere prolungati, comportando lunghi tempi di recupero, e richiedendo, nel caso di trattamenti *ex-situ*, installazioni di grosse dimensioni e, per i trattamenti *in-situ*, monitoraggi a lungo termine.

La comparazione economica tra diverse soluzioni di risanamento fa riferimento ai costi unitari delle diverse tecnologie, espressi come costo dell'applicazione rapportato alla quantità di materiale trattato o rimosso (ad esempio come Euro/m<sup>3</sup> di terreno o Euro/kg di inquinante).

Di seguito sono presentati, per alcune delle più diffuse tecnologie, dati di costo unitari ricavati dalla letteratura, facendo riferimento ai dati europei raccolti nell'ambito di un'indagine recentemente condotta da CLARINET (Contaminated Land Rehabilitation Network for Environmental Technology) su 15 Paesi dell'Unione Europea.

TECNOLOGIA	COSTO UNITARIO	
Impermeabilizzazione	25 - 50	Euro m <sup>-2</sup>
Escavazione e smaltimento in discarica	80	Euro m <sup>-3</sup>
Biorisanamento	60 - 75	Euro t <sup>-1</sup>
Vetrificazione	65	Euro t <sup>-1</sup>
Declorurazione	165 - 500	Euro t <sup>-1</sup>
Estrazione di vapori	65 - 100	Euro m <sup>-3</sup>
Lavaggio	50 - 60	Euro t <sup>-1</sup>
Ossidazione chimica <i>in situ</i>	65 - 130	Euro t <sup>-1</sup>
Estrazione con solvente e incenerimento	650	Euro t <sup>-1</sup>
Desorbimento termico (incluso escavazione e pre-trattamento)	60 - 250	Euro t <sup>-1</sup>

**Tabella 1.1.** Costi unitari di trattamento di alcune delle principali tecnologie (CLARINET, 2000)

La comparazione tra i costi presentati in Tabella 1.1 conferma in generale per l'Europa, ed in analogia con quanto finora avvenuto in Italia, la persistente maggior convenienza della messa in discarica, a fronte di tecnologie di vero e proprio trattamento. Tale situazione potrà auspicabilmente evolvere in futuro a fronte, da un lato, delle economie di scala connesse alla maggior diffusione dei sistemi di trattamento, e dall'altro per l'incremento dei costi di messa in discarica.

## 1.1 Lavaggio di suoli inquinati

I trattamenti chimico-fisici sono in genere quelli che presentano le maggiori efficienze di rimozione dei contaminanti e tempi di bonifica relativamente brevi, tuttavia sono anche i più costosi.

Tra questi, il lavaggio del suolo (*soil flushing* o *soil washing*), consiste nel trattamento con acqua o soluzioni in grado di estrarre i contaminanti presenti nel suolo.

Il *soil washing*, il trattamento di lavaggio applicato ex-situ/on-site, è, in realtà, un insieme di unità operative assemblate più che un singolo processo, il cui risultato finale è quello di separare e concentrare l'inquinante (Figura 1.3).

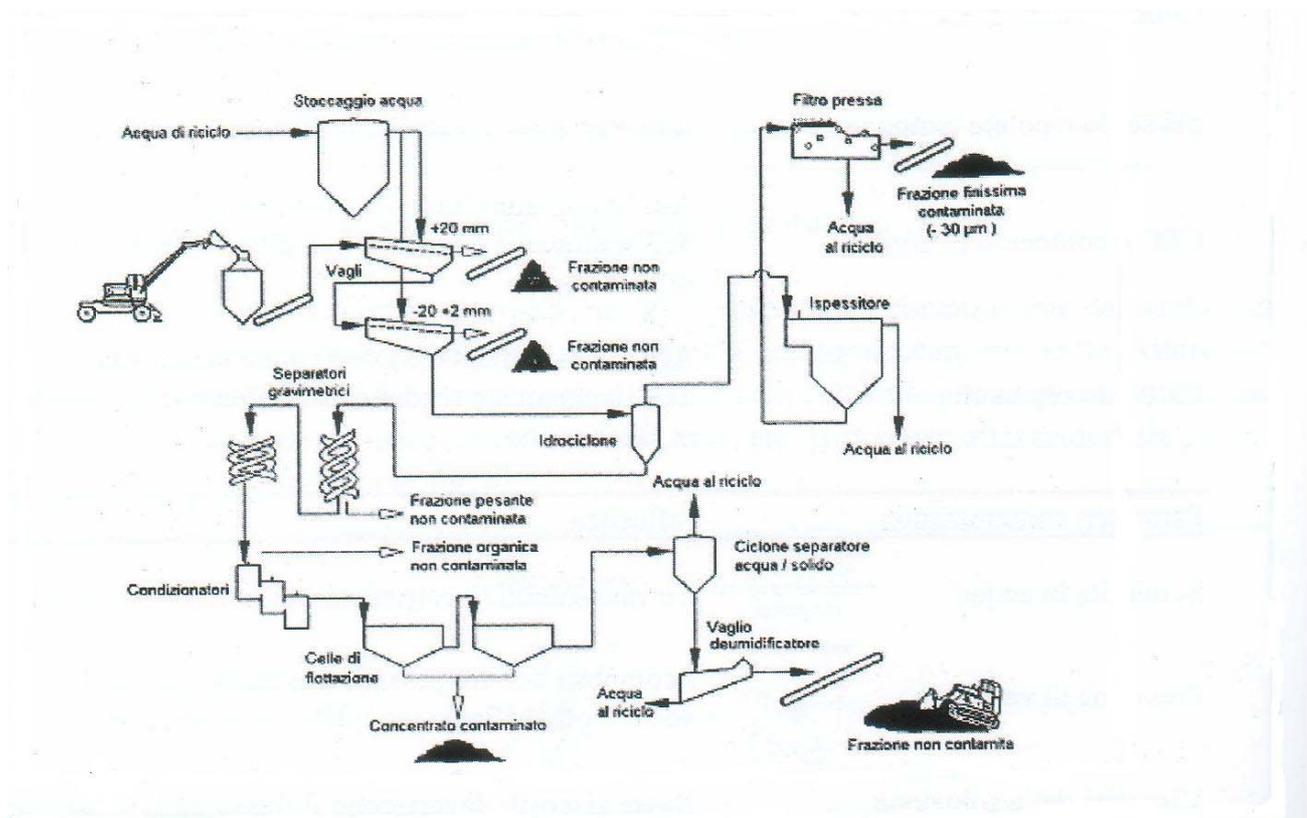


Figura 1.3 Schema di un generico processo di lavaggio di suolo

Esso impiega principalmente tecniche fisiche (vaghiatura, sfregamento, attrito, separazione per gravità) per separare particelle di differenti dimensioni e per isolare particelle sottili contaminate da quelle di maggiori dimensioni non contaminate (generalmente sabbia e ghiaia) che possono essere poi restituite al sito (USEPA, 1993).

Il suolo, successivamente viene messo in contatto, in condizioni di turbolenza spinte, con la soluzione di lavaggio, costituita da acqua e additivi che facilitano l'estrazione degli inquinanti dal suolo. I vantaggi di questa tecnica rispetto al soil flushing, che è la trasposizione in-situ del lavaggio di suolo, consiste nel fatto che avvenendo ex-situ il processo può essere più facilmente controllato. Il processo ex-situ, realizzato mediante unità operative che hanno la funzione di pretrattare il suolo, consente maggiori efficienze di rimozione e tempi di trattamento più brevi anche se i costi di gestione e di impianto sono molto superiori alla corrispondente tecnica *in-situ*.

I suoli con un'elevata percentuale ( $> 20\%$  w/w) di argilla o di frazioni con particelle di dimensioni superiori ai  $63 \mu\text{m}$  significativamente contaminate possono essere difficilmente risanate attraverso questa tecnologia (USEPA, 1991).

La matrice sabbiosa costituisce, peraltro, il substrato adatto ad una tipologia di trattamento coinvolgente operazioni di lavaggio in quanto le particelle che la costituiscono sono caratterizzate da bassi valori di porosità ovvero da bassa capacità adsorbente.

In alcuni casi, il processo è reso più efficiente dalla mescolanza di acqua con sostanze chimiche adatte allo scopo di promuovere l'estrazione di contaminante dal suolo dopo il suo trasferimento nella soluzione di lavaggio. Sia la cinetica che l'efficienza del processo di estrazione dipendono, oltre che dalla (1) caratteristiche della matrice suolo e (2) dalla concentrazione e proprietà chimico-fisiche del contaminante, da fattori quali (3) l'*aging* del suolo, (4) dalle proprietà chimico-fisiche e concentrazione dell'agente

estrattivo e (5) da parametri di processo (tempo di contatto, rapporto solido/liquido, miscelazione, temperatura, pH).

L'intenso contatto tra le particelle di suolo e il fluido di lavaggio, reso possibile da getti d'acqua ad alta pressione, causa la dissoluzione dei contaminanti adsorbiti e la loro dispersione nell'acqua dopo un appropriato tempo di contatto (USEPA, 1991).

La soluzione di lavaggio viene riciclata durante il processo dopo una fase di trattamento avente lo scopo di rimuovere i contaminanti estratti dal suolo (GWRTAC, 1999).

Pur essendo spesso richiesti più cicli di lavaggio per raggiungere i livelli di concentrazione stabiliti dall'uso di tale tecnologia, l'intero processo di lavaggio sia esso semplice o sofisticato, deve essere ben elaborato allo scopo di abbinare l'alta produttività con costi di impianto e di gestione relativamente contenuti (Kuhlmann and Greenfield, 1999).

## Uso di surfattanti sintetici nella remediation di suoli contaminati

Il lavaggio di suolo con surfattanti, è, attualmente, una tecnologia emergente per aumentare la rimozione di contaminanti organici dai suoli (Deshpande et al., 1998).

Il lavaggio di suolo *ex situ* è, in realtà, un processo di risanamento semplice basato essenzialmente, fin dall'inizio, sul desorbimento dei contaminanti dal suolo attraverso la semplice azione dell'acqua (Griffiths, 1995). Agenti chimici come i surfattanti possono essere aggiunti all'acqua per migliorare l'efficienza di lavaggio (USEPA, 1991).

Il trattamento è di norma fortemente inibito dalla scarsa biodisponibilità di contaminanti organici idrofobici (HOPs), come gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA), i quali, fortemente lipofili, tendono ad essere adsorbiti alla sostanza organica presente sulle frazioni fini del suolo (limo e argilla) limitando l'efficienza del trattamento soprattutto quando tali contaminanti sono presenti in elevate concentrazioni. Tuttavia, se la loro concentrazione è ugualmente elevata anche sulle particelle più grandi, il lavaggio di suolo "fisico" con agenti complessanti, può essere una valida soluzione alternativa.

In questo caso i surfattanti aggiunti alla soluzione di lavaggio, alla concentrazione di pochi  $\text{gL}^{-1}$ , possono aumentare il tasso di desorbimento degli HOPs e il loro trasferimento in massa dal suolo (Despande *et al.*, 1999; Grimberg *et al.*, 1995; Laha *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 1991; Yeom *et al.*, 1996).

I surfattanti sono particolarmente attrattivi per questo processo poiché hanno potenzialmente bassa tossicità e vantaggiosa biodegradabilità e possono essere, così, più compatibili ambientalmente di altri sistemi basati su solventi organici (Despande *et al.*, 1999).

Chu & So (2001) hanno suggerito un modello di lavaggio di suolo assistito da surfattanti in cui la perdita di surfattante dal mezzo suolo e la formazione di

una fase micellare del surfattante sono i principali fattori determinanti le prestazioni del lavaggio di suolo.

I surfattanti sono molecole anfifiliche mediando, quindi, tra fasi immiscibili, e, per accumulo in superficie e all'interfaccia, diminuendo la tensione superficiale e interfacciale (Edwards *et al.*, 1991; Tiehm, 1994).

Al di sopra di una certa soglia, nota come concentrazione micellare critica (CMC), le molecole di surfattante formano aggregati micellari nella fase acquosa. Le parti idrofiliche dei surfattanti sono dirette verso la fase acquosa e le parti idrofobiche sono dirette al centro delle micelle formando una pseudofase interna idrofoba. L'incorporazione dei composti idrofobici nelle micelle è definita solubilizzazione e all'equilibrio l'ammontare di composto solubilizzato è linearmente correlato alla concentrazione di surfattante al di sopra della CMC.

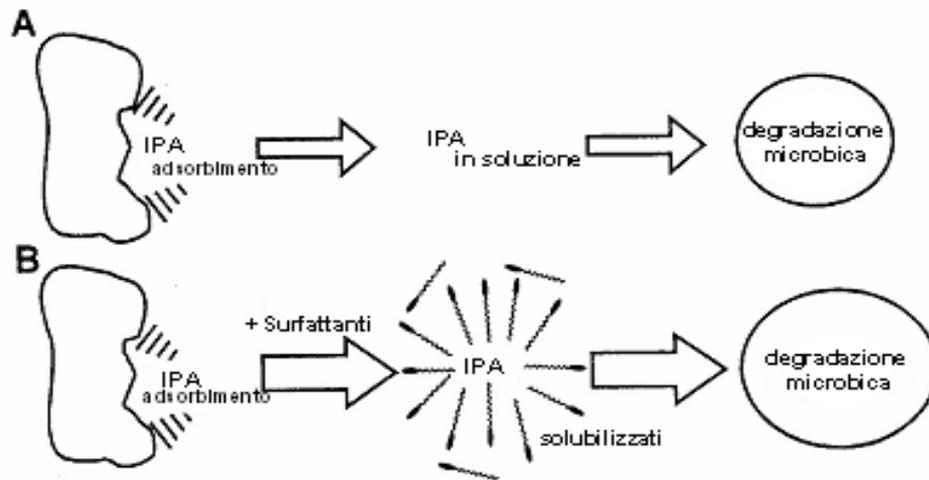
Sia l'abbassamento di tensione superficiale che la solubilizzazione determina un aumento del tasso di desorbimento dei contaminanti idrofobici da cui deriva un aumento della biodisponibilità alla biodegradazione (Tiehm *et al.*, 1997).

La figura 1.4 illustra il meccanismo di aumentata biodisponibilità degli IPA per mediante surfattanti.

Diverse classi di contaminanti sono impiegate per il lavaggio di suolo dipendendo dalla natura del contaminante che deve essere rimosso. L'esame della letteratura suggerisce l'uso di surfattanti non ionici per la rimozione di pesticidi, come il Triton X-100 (TX-100), un tensioattivo commerciale sintetico già saggiato, con successo, nella bioremediation di suoli contaminati da idrocarburi (Rouse *et al.*, 1994) e di agenti solubilizzanti biogeni come i ramnolipidi (Mata-Sandoval *et al.*, 2002).

Numerosi studi dimostrano che gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) possono essere solubilizzati da surfattanti non ionici, come un alchilfenol etossilato (Garon *et al.*, 2002), un estere, il Tween 80, tra i sintetici, e da

idrossipropil- $\beta$ -ciclodestrine (Cuypers *et al.*, 2002) tra i biosurfattanti, ma anche da surfattanti anionici sintetici come il sodio dodecil solfato (SDS), il sodio dodecilbenzen sulfonato (SDDBS), l'ossido difenil monoalchilato disulfonato (MADS-C12) e l'ossido difenil dialchilato disulfonato (DADS-C12)(Chun *et al.*, 2002).



**Figura 1.4.** Rappresentazione schematica di aumentata biodisponibilità degli IPA mediante surfattanti. (A). Il limitato trasferimento massa nella fase acquosa limita il tasso di degradazione microbica. (B) Aumentato trasferimento in massa e biodegradazione degli IPA in presenza di micelle di surfattanti (Tiehm *et al.*, 1997).

In generale i surfattanti solubili in acqua disperdono tutti i solidi e i liquidi immiscibili in acqua, ma rendono difficile la rimozione dell'acqua. I surfattanti che formano microemulsioni solubilizzano idrocarburi quando usati ad elevate concentrazioni e in presenza di cosolventi, mentre i surfattanti solubili in oli lavorano a basse concentrazioni e facilitano il riciclaggio dell'acqua (Kuhlman and Greenfield, 1999).

Questi agenti hanno in genere mostrato un ottimo effetto solubilizzante, migliorando l'efficacia della biodegradazione, soprattutto quando impiegati in

concentrazioni superiori alla loro CMC, ma spesso sono anche risultati tossici per la produzione di metabolici tossici nella matrice ammendata (Rouse *et al.*, 1994; Billing *et al.*, 1999).

La riferita tossicità dei surfattanti nei riguardi di alcuni batteri, relativa ai valori HLB (Hydrophil-Lipophil-Balance), insieme alla sottile tessitura del suolo, può limitare l'efficacia dei surfattanti e l'ulteriore biodegradazione di contaminanti in suoli inquinati (Sandbacka *et al.*, 2000). Risultati recenti indicano, tra l'altro, che il contenuto di argilla nel suolo gioca un importante ruolo nell'adsorbimento dei surfattanti. Infatti, per concentrazioni inferiori alla loro CMC i surfattanti adsorbiti sul suolo, possono indurre un aumento della sua idrofobicità e, quindi, un aumento dell'adsorbimento dei pesticidi (Mata-Sandoval *et al.*, 2002).

Qualsiasi tecnologia di risanamento che utilizzi l'estrazione favorita da surfattanti, comunque, deve includere nello schema di processo, oltre a una soddisfacente modalità di concentrazione e decomposizione dei contaminanti, un metodo accettabile di recupero del surfattante (Chu *et al.*, 2001).

### **Interazione dei composti xenobiotici con la SOM**

Attualmente contaminanti derivati dalle attività antropiche, quali pesticidi, molecole fenoliche, combustibili fossili, vengono immessi nell'ambiente in quantità considerevoli e in modo continuo e indiscriminato. La maggior parte di tali sostanze, come già evidenziato, costituisce un rischio di contaminazione di notevoli proporzioni e di non facile soluzione (Cheng, 1990).

I contaminanti organici idrofobici hanno una bassa solubilità in acqua e tendono ad essere adsorbiti dai particolati sospesi, un processo estremamente

importante che può influenzare drammaticamente il destino e l'impatto di molte sostanze chimiche sia organiche che inorganiche, nell'ambiente (Karickhoff, 1984; Schwarzenbach *et al.*, 1993). Gli studi finalizzati alla valutazione della contaminazione organica di suoli inquinati da attività industriali ed agricole risulta più complesso di quello di altri inquinanti, quali i metalli pesanti, tenuto conto che i contaminanti organici sono soggetti nella pedosfera a processi di degradazione chimica e biologica con formazione di prodotti intermedi, spesso caratterizzati da elevata tossicità. Nel suolo, i costituenti della fase solida adsorbono e rilasciano le molecole dei contaminanti organici secondo equilibri dinamici, influenzandone la mobilità e disponibilità ad essere traslocati nelle acque di falda ed intervenendo, spesso, come catalizzatori nelle trasformazioni chimiche.

L'adsorbimento è uno dei più importanti processi chimici che avviene nei suoli.

In particolare, l'adsorbimento di composti organici, inclusi i pesticidi, nel suolo è stato ampiamente studiato e il consenso generale è che la SOM è il sorbente predominante, particolarmente per i composti organici idrofobici (HOC) (Xing, 2001); comunque, il meccanismo di adsorbimento rimane scarsamente compreso, anche se per le passate due decadi, è stato semplificato trattando il processo come un fenomeno di partizione, pur non trattandosi sempre di un singolo semplice meccanismo (Karickhoff, 1984; Schwarzenbach *et al.*, 1993). Questo modello tratta la sostanza organica come un mezzo omogeneo di partizione, simile a un liquido organico come l'ottanolo. I coefficienti di adsorbimento sono spesso messi in relazione con i coefficienti di partizione ottanolo-acqua attraverso una relazione lineare di tipo log-log:

$$\log K_{oc} = a + b \log K_{ow}$$

dove  $K_{oc}$  è il coefficiente di adsorbimento normalizzato al contenuto di carbonio, a e b sono costanti. Questa equazione è stata ampiamente usata in modelli predittivi per il destino e il trasporto di contaminanti organici nel suolo e nei sedimenti. La SOM è eterogenea in natura (Grathwohl, 1990; Xing *et al.*, 1994) e può variare grandemente in funzione del tempo, diagenesi e modalità di trasformazione (Rullkotter & Michaelis, 1989; Chen and Pawluk, 1995). Variazioni nella SOM influenzano fortemente la capacità di adsorbimento, fino a più di tre ordini di grandezza (Grathwohl, 1990; Xing *et al.*, 1994; Xing, 1997). Il coefficiente di ripartizione  $K_{oc}$  dipende dal contenuto di gruppi funzionali polari che mostrano una correlazione inversa con la polarità del suolo (Kile *et al.*, 1999). La percentuale della frazione aromatica aumenta con la profondità all'interno di un singolo profilo di un suolo e i coefficienti di partizione sono talvolta indipendenti dal suo valore (Kile *et al.*, 1999), talvolta ne dipendono (Ahmad *et al.*, 2001).

Una semplice ripartizione conduce a una isoterma lineare. Tuttavia questa è stata raramente osservata (Xing *et al.*, 1996). Sono state riportate isoterme non lineari e assorbimenti competitivi (Xing *et al.*, 1996; White *et al.*, 1999), in particolare per fenoli, alifatici alogenati, IPA e benzeni sostituiti. Ma questi risultati sono coerenti con una doppia modalità di assorbimento, dove la SOM è postulata avere sia domini condensati (rigidi) e domini espansi (flessibili), e mentre l'adsorbimento ha luogo solo nei domini condensati, la partizione si verificherebbe in entrambi i domini (Xing, 2001).

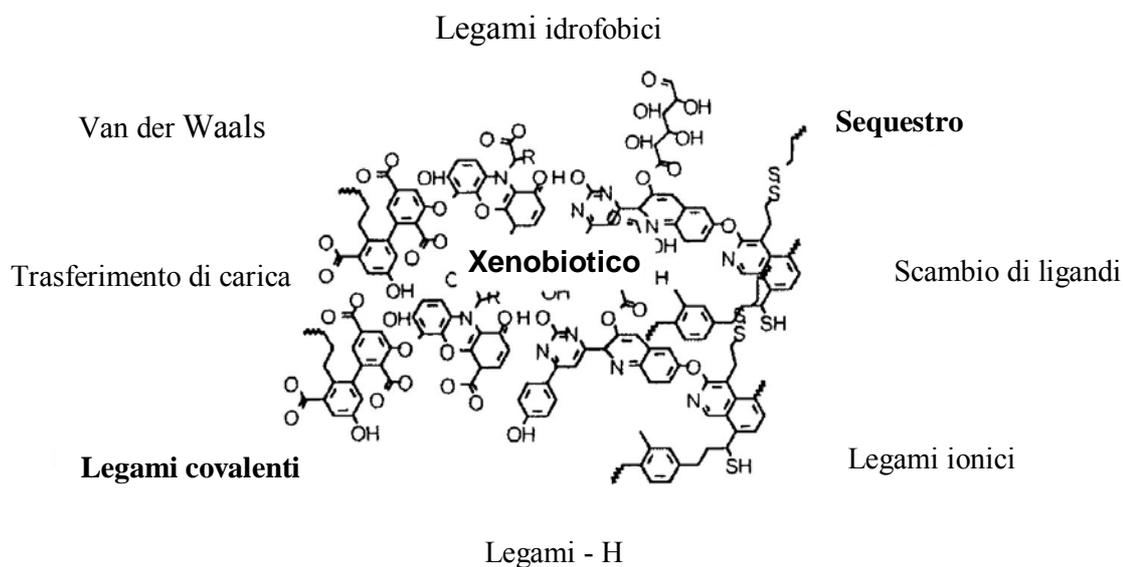
Si deve aggiungere a questa complessità l'osservazione di fenomeni di isteresi con cinetiche molto lente di assorbimento/desorbimento (Xing, 2001) che se hanno molta importanza per l'evoluzione ambientale dei contaminanti, ne hanno altrettanta per il processo analitico di estrazione.

## **1.2 Lavaggio di suolo con acido umico esogeno per il recupero di suoli contaminati**

Le sostanze umiche sono un importante substrato di interazione con gli xenobiotici. Vari modelli concettuali hanno proposto le sostanze umiche come complessi colloidali del suolo con struttura micellare (Hayes *et al.*, 1989; Piccolo, 2002) dove la presenza di nuclei idrofobici e gruppi funzionali idrofilici modificano le proprietà chimiche delle sostanze umiche per l'interazione con le sostanze xenobiotiche. Più specificamente, i gruppi funzionali reattivi possono agire come siti di legame adatti per reazioni chimiche con gli xenobiotici idrofilici, mentre i siti idrofobici sono importanti per l'adsorbimento di composti idrofobici.

I contaminanti organici possono essere adsorbiti o legati alla sostanza organica del suolo in un modo reversibile o irreversibile (figura 1.5) (Haider & Schaffer, 2000).

L'adsorbimento che, in prima approssimazione avviene quando l'energia libera della reazione di assorbimento è equivalente alla stabilità dell'associazione neoformata, è considerato essere un processo reversibile e porta alla formazione di un'associazione relativamente instabile tra gli xenobiotici e la sostanza organica naturale nei suoli (Hassett & Banwart, 1989). Sebbene i processi di adsorbimento siano generalmente reversibili, essi possono influenzare la biodisponibilità e la tossicità delle sostanze chimiche nei suoli (Kastner & Ricknoff, 2001), e, soprattutto, un lungo tempo di contatto (*aging*) può esserne un fattore limitante.



**Figura 1.5.** Possibili interazioni tra gli xenobiotici e le sostanze umiche (Haider & Schaffer, 2000).

Vi è evidenza, infatti, che le sostanze assorbite tendono a diventare più resistenti all'estrazione e alla degradazione quanto più a lungo interagiscono con la matrice del suolo (Hatzinger and Alexander, 1995). D'altra parte, l'isteresi di adsorbimento-desorbimento di composti xenobiotici nel corso dell'interazione dei contaminanti organici nei suoli è stato osservato solo in qualche caso (Kan *et al.*, 1994). L'adsorbimento idrofobico può essere guidato da forze di van der Waals, legami idrogeno, attrazione dipolo-dipolo e forze elettrostatiche (Hassett & Banwart, 1989). Oltre a ciò, la causa delle

reazioni di assorbimento risiede nei complessi trasferimenti di carica mediante una parziale sovrapposizione di orbitali e un parziale scambio di densità elettronica. In particolare, legami  $\pi$  per mezzo della sovrapposizione di sistemi di elettroni  $\pi$  possono essere rilevanti per l'associazione di alcheni e composti aromatici con le molecole umiche (Hassett & Banwart, 1989).

Dal momento che l'adsorbimento è considerato essere principalmente un processo reversibile, la maggior parte delle sostanze rimane disponibile ed estraibile con solvente (Bollag *et al.*, 1992; Richnow *et al.*, 1994).

Associazioni più stabili derivano dalla formazione di legami covalenti tra le molecole xenobiotiche e/o i loro metaboliti e la sostanza organica del suolo, dove il frammento xenobiotico una volta legato diventa parte integrante del materiale umico (Bollag and Loll, 1983). Si suppone che queste associazioni riducano ampiamente la biodisponibilità e la tossicità di xenobiotici mediante la formazione, nei suoli, di residui legati persistenti non estraibili di pesticidi e di altre sostanze chimiche antropogeniche. I principali componenti dei residui legati consistono principalmente di frammenti xenobiotici o di loro metaboliti legati covalentemente alla matrice organica del suolo. Tali associazioni persistenti si differenzerebbero in legami facilmente idrolizzabili come legami esterei e peptidici e legami covalenti più stabili come legami eterei, C-C e C-N.

I legami covalenti sono formati per reazioni chimiche che richiedono una reattività sia degli xenobiotici che della sostanza organica del suolo. Il modo di legarsi dipende sia dai gruppi funzionali dei composti affini o dai metaboliti che si sono formati per degradazione microbica (Richnow *et al.*, 1994; Kastner, 2000). L'assenza di gruppi funzionali richiede l'introduzione di gruppi reattivi prima dell'instaurarsi di legami covalenti con la sostanza organica. Si è supposto che gli xenobiotici legati covalentemente diventino parte integrante della sostanza umica del suolo (Bollag *et al.*, 1992; Bollag, 1992).

Il sequestro fisico di contaminanti nelle macromolecole del materiale umico colloidale è descritto, invece, come una lenta partizione di xenobiotici nei micropori della matrice del suolo (Alexander, 1997), ossia in cavità derivanti dall'espansione delle molecole per la mutua repulsione di gruppi acidi ionizzati, in cui i contaminanti potrebbero essere trattenuti (Engbrestson & Wandruszka, 1994). Nei sistemi colloidali, consistenti probabilmente in associazioni supramolecolari tridimensionali e in lunghe catene carboniose (C8-C34) avvolte, le reazioni chimiche e fisiche generalmente aumentano per l'ampia area di superficie delle particelle colloidali.

La presenza di materiale umico può anche promuovere la solubilizzazione di composti idrofobici non polari. Ciò comporta una diminuzione dell'adsorbimento di queste sostanze al suolo o ai sedimenti oppure una diminuzione del tasso di volatilizzazione dei composti organici più volatili (ad es. PCB), influenzando, ulteriormente, la mobilità, la fotolisi, la degradazione chimica, l'uptake biologico dei contaminanti organici. Da tempo, la riconosciuta capacità, in presenza anche di piccole quantità di acidi umici e/o fulvici in soluzione acquosa, di aumentare significativamente l'apparente solubilità in acqua di composti organici idrofobici, è stata attribuita alla presenza di micelle umiche (Hayase, K. & Tsubota, H., 1983).

Guetzloff & Rice (1994) hanno dimostrato per primi che gli acidi umici formerebbero micelle in soluzioni acquose alcaline, ma non alla concentrazione rilevabile negli ambienti naturali, ma ad una concentrazione pari a  $10\text{g.L}^{-1}$ , definita come la concentrazione micellare critica delle sostanze umiche (CMC).

Secondo questa teoria i gruppi non polari all'interno delle molecole umiche formano una struttura micellare o una struttura doppio strato creando un ambiente microscopico idrofobico nel quale i contaminanti organici non polari possono ripartirsi, mostrando, in tal modo, un'attività di superficie simile a quella dei surfattanti.

Guetzloff & Rice, hanno dimostrato successivamente, che il più basso aumento di solubilità di alcuni composti organici (HOC) nelle micelle di acidi fulvici (FA) rispetto agli acidi umici (HA) a una concentrazione maggiore della CMC, suggerisce che la più piccola dimensione delle micelle che formano gli FA, può influenzare i fenomeni di solubilizzazione. Inoltre i bruschi cambiamenti di dimensione per concentrazioni superiori alla CMC, dimostrano che solo una parte delle molecole che comprendono gli HA sono coinvolti nei fenomeni di micellizzazione.

Numerosi studi (Chiou *et al.*, 1987; Johnson-Logan *et al.*, 1992) hanno mostrato che gli effetti delle sostanze umiche sulla solubilità di contaminanti organici, in particolare di idrocarburi aromatici, dipendono, tra l'altro, non solo dalla loro idrofobicità, ma anche dalla massa delle molecole e dalla loro capacità ad entrare nei domini idrofobici delle sostanze umiche.

Recenti risultati dimostrano che la biodisponibilità dei IPA (Holman, *et al.*, 2002) e dei policlorobifenili (Fava & Piccolo, 2002) appare aumentata dall'aggiunta di acido umico esogeno ai suoli contaminati. Tali studi suggeriscono che le sostanze umiche, così come i prodotti umo-simili possono essere agenti chimici di grande interesse per la bioremediation di suoli altamente contaminati in quanto aumentano la biodisponibilità e influenzano l'attività della biomassa specializzata alla degradazione di idrocarburi policiclici aromatici (Tiehm *et al.*, 1997) e in particolare di inquinanti organici clorurati. L'importanza delle sostanze umiche come surfattanti naturali è ampliata dall'essere tossicologicamente sicure e significativamente meno costose (<0.5 USD per kg) dei surfattanti sintetici commerciali (Fava & Piccolo, 2002).

Processi basati sull'uso di sostanze umiche disciolte (DHS) sono stati proposti per ridurre l'adsorbimento di contaminanti organici attraverso legami idrofobici e facilitare così il desorbimento e le operazioni di risanamento di processi come il "pump and treat" o il flushing *in situ* nei siti contaminati

(Rebhun *et al.*, 1996). L'influenza delle DHS nel ridurre l'adsorbimento dei contaminanti organici al suolo, anche a basse concentrazioni, determina una riduzione del tempo delle operazioni di processo e dei volumi d'acqua necessari per completare il trattamento, rendendo altamente efficiente il loro contributo al processo di risanamento.

Tuttavia, nonostante dall'ampia letteratura emerga la notevole influenza delle sostanze umiche nei complessi processi che coinvolgono le sostanze chimiche antropogeniche nei suoli, nessuno studio ha riportato l'applicazione delle sostanze umiche come surfattanti nel lavaggio di suolo di siti altamente contaminati, dove spesso l'efficienza di processi di recupero può essere limitata dalla copresenza di più inquinanti (Chun *et al.*, 2002).

### **1.3 Le metallo-porfirine**

Le metallo-porfirine vengono definite catalizzatori biomimetici, in quanto la loro azione catalitica è simile a quella di catalizzatori biologici come le perossidasi, o hanno un meccanismo di azione simile a quello del citocromo P450 (Sheldon, 1994; Meunier & Meunier, 1985). Proprio sulla base delle conoscenze dei meccanismi di azione delle perossidasi e del citocromo P450 si sono iniziati studi che utilizzano i catalizzatori biomimetici, quali le metalloporfirine, che hanno un efficace azione dechlorurante. Difatti le metalloporfirine (ferro-porfirina, manganese porfirina) hanno mostrato la capacità di degradare sistemi aromatici clorurati, con la formazione di prodotti stabili e meno tossici dei clorofenoli di partenza (Labat & Meunier, 1989; Song *et al.*, 1997).

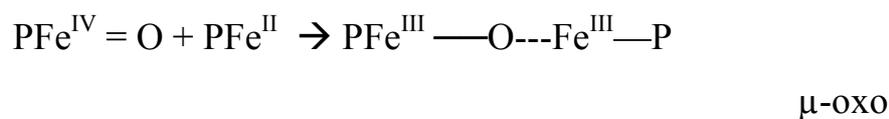
Sono costituite da un anello tetrapirrolico a cui si coordina un atomo di metallo centrale, che è il sito attivo della molecola. I sostituenti laterali variano a seconda del tipo e degli scopi per cui vengono sintetizzate. Ad

esempio, i sostituenti possono essere quattro anelli fenolsolfonici nelle posizioni *meso*, che a causa della repulsione sterica con gli anelli pirrolici, giacciono perpendicolarmente al piano e non partecipano alla delocalizzazione degli elettroni  $\pi$ . Il ruolo centrale di questi gruppi è prevenire la formazione irreversibile di  $\mu$ -oxocomplessi cataliticamente non reattivi, cioè dimeri dei catalizzatori che potrebbero formarsi a temperatura ambiente. Infatti, il complesso ferro-porfirina – ossigeno o manganese-porfirina – ossigeno può subire l'attacco di una seconda molecola di porfirina formando un perossidimero del ferro (III) o del manganese (III), come illustrato di seguito per la ferroporfirina:



dove la P indica l'anello pirrolico della porfirina.

Il complesso si trasforma rapidamente, forse attraverso un intermedio ferrico, in un  $\mu$ -oxo- complesso, in cui il ferro è ossidato irreversibilmente alla forma ferrica, provocando la disattivazione del catalizzatore:

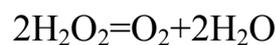


La presenza di questi quattro anelli fenolsolfonici, invece, previene questi processi e, in aggiunta, protegge le posizioni *meso* dall'ossidazione. Infatti, bloccando stericamente una o entrambe le facce della porfirina, si ostacola l'avvicinamento dei due macrocicli e, quindi, la formazione del complesso  $\mu$ -oxo. Di conseguenza, l'accesso al centro metallico è limitato selettivamente dalla costruzione di tale tasca protettiva che svolge il ruolo che, negli enzimi con un simile gruppo prostetico, è ricoperto dalla matrice proteica. Inoltre, gli

anelli fenolsolfonici presentano 2 atomi di cloro in posizione 2,6. L'aggiunta di tali sostituenti elettron-attrattori riduce, per effetto induttivo, la densità elettronica del macrociclo (inibendo la reazione di ossidazione) ed aumenta l'elettrofilicità e, quindi, la reattività delle corrispondenti specie metallo – oxo. Inoltre, gli atomi di cloro in posizione orto aumentano la protezione sterica degli atomi di carbonio delle posizioni meso dell'anello porfirinico, prevenendone la rapida demolizione ossidativa. Anche la sesta posizione di coordinazione del ferro viene soddisfatta da un atomo di cloro.

Anche per le metalloporfirine, come per molti enzimi biologici, la reattività aumenta in presenza di ossigeno in ambiente acido.

L'O<sub>2</sub> prodotto dalla reazione:



si lega al metallo della metallo-porfirina formando una specie metallo-oxo altamente reattiva. L'ossigeno reattivo, nel caso dell'ossidazione catalitica dei clorofenoli, sostituisce progressivamente gli atomi di cloro nei clorofenoli formando i corrispondenti benzochinoni (Schwarzenbach et al., 1993).

L'uso di catalizzatori organici come le metallo-porfirine offre il vantaggio della economicità (Labat & Meunier, 1989), poiché l'isolamento e la purificazione degli enzimi con funzioni simili sono molto dispendiosi.

Lo scopo di questo tipo di decontaminazione è quella di diminuire la pericolosità e la tossicità dell'inquinante mediante la sua incorporazione nella sostanza organica naturale attraverso reazioni di copolimerizzazione per catalisi ossidativa.

Questo aspetto risulta essere di grande interesse al fine della inattivazione di contaminanti organici in presenza di sostanza organica naturale come le sostanze umiche.

#### **1.4 Un esempio di applicazione del D.M. 471/99 in Liguria**

Lo studio sperimentale ha riguardato l'insediamento industriale della ex-ACNA di Cengio, che si estende nei comuni di Cengio, in provincia di Savona, di Saliceto, in provincia di Cuneo, e sul fiume Bormida, esattamente sul meandro del fiume posto al confine la Liguria e il Piemonte. Il sito industriale dell'Acna Chimica Organica, sorto nel 1882 come dinamiteificio (Società Italiana Prodotti Esplosivi), dal 1990 dell'Enichem, occupa un'area di circa 50 ettari di terreno oggi altamente contaminato. L'insediamento industriale diventato ACNA (Aziende Chimiche Nazionali Associate) successivamente, fu convertito in impianto per la produzione di intermedi organici prevalentemente destinati al settore coloranti e pigmenti. Dalla seconda metà degli anni '70, anche a seguito del sorgere di problemi ambientali ad esso connessi, l'insediamento è stato interessato da una progressiva riduzione delle attività produttive fino a giungere alla cessazione di ogni attività nel corso del 1998. Nel giugno 1999, sono cominciati i lavori per la perimetrazione dell'area ed è stato redatto il Piano della Caratterizzazione, nel caso ACNA, distinto in due parti: quello delle aree esterne, di competenza pubblica, svolto dalle strutture pubbliche, avvalendosi del sistema Anpa-Arpa Liguria e Arpa Piemonte e quello delle aree interne allo stabilimento, di competenza privata (Enichem). Il caso dell'ACNA di Cengio, è stato individuato tra le bonifiche di interesse nazionale in base alla L. 426 del 9/12/1998 e per il quale sono stati istituiti fondi nazionali per la piena applicazione (all'art. 17) secondo i criteri definiti nel D.M. 471/99. Il Ministero dell'Ambiente, data la molteplicità e la complessità di contaminanti presenti sul sito di Cengio, ha deciso di finanziare il "Progetto Sisifo", proposto dal Consorzio Interuniversitario Nazionale "la Chimica per l'Ambiente", nell'ambito del quale è rientrata l'attività di ricerca della tesi, e nato, non solo per l'individuazione delle tecnologie di bonifica più

appropriate per la decontaminazione delle aree in questione, ma anche per implementare tutte le attività di sviluppo tecnologico e di ricerca scientifica per la bonifica dei siti contaminati.

## **CAPITOLO 2**

### **OBIETTIVI DELLA TESI**

#### **2.1 Studio della fattibilità del lavaggio di suolo contaminato con acido umico come surfattante**

Concetti non tradizionali di architettura molecolare sono stati proposti nell'ultima decade per esaminare la struttura delle sostanze umiche (HAs).

L'idea che le sostanze umiche non sono polimeri macromolecolari, così come sono stati descritti per lungo tempo, ma superstrutture costituite di piccole molecole eterogenee di dimensione solo apparentemente grande, tenute insieme da forze di natura idrofobica, apre nuove possibilità per ampliare la conoscenza della loro struttura chimica e per predirne la reattività nell'ambiente. Sono proprio tali forze di natura idrofobica che stabilizzano la conformazione delle sostanze umiche e che consentono di limitare la disponibilità di molti contaminanti organici mediante una parziale immobilizzazione nel substrato umico.

C'è considerevole evidenza che i composti organici rilasciati nei suoli subiscono nel tempo una riduzione nel desorbimento (Pignatello, 1990), nell'estrazione (Hatzinger & Alexander, 1997), biodegradazione (Guerin & Boid, 1993; Hatzinger & Alexander, 1997), tossicità e nell'assimilazione da

parte degli organismi (Kelsey & Alexander, 1997) e crescente consapevolezza degli effetti che questo fenomeno di *sequestro*, può avere sulla valutazione del rischio all'esposizione di siti contaminati (Kottler *et al.*, 2000).

E' ormai ampiamente accettato che tale fenomeno esiste nel suolo, nei sedimenti e nelle acque (Alexander, 1995; Luthy *et al.*, 1997) e che la sostanza organica del suolo (SOM) gioca un ruolo dominante nell'adsorbimento di contaminanti organici persistenti (POPs) agendo come un media all'interno del quale i contaminanti possono ripartirsi (Chiou, 1990) anche quando il contenuto di carbonio organico nei suoli è meno dello 0.1% (Ball *et al.*, 1991; Piatt *et al.*, 1996).

Numerosi risultati presenti nella letteratura nel passato hanno mostrato che la sostanza organica disciolta o sospesa nella fase acquosa può ridurre la biodisponibilità (McCarthy, 1983; Kukkonen *et al.*, 1990) e aumentare la solubilità (Carter & Suffet, 1982; Chiou *et al.*, 1986; Chiou *et al.*, 1987) di composti organici idrofobici.

L'importanza dei composti umici idrofobici nei fenomeni di solubilizzazione è ben documentata da Wershaw (1999). Gli acidi umici del suolo sono diversi dalle sostanze umiche disciolte nelle acque di superficie (DOM), poiché le molecole della DOM sono generalmente più piccole e non esibiscono le stesse proprietà di attività superficiale delle molecole di acidi umici del suolo. Tuttavia, pur essendo presenti in concentrazioni che sono almeno di due ordini di grandezza inferiori alla concentrazione micellare critica degli acidi umici del suolo, le molecole DOM formano aggregazioni molecolari premicellari a concentrazioni naturali già in grado di aumentare la solubilità di composti idrofobici (Wershaw & Hayes, 2001).

Sulla base della possibilità di interazione di contaminanti idrofobici con le sostanze umiche in soluzione, quando presenti al di sopra della loro CMC, e per la loro limitata biotossicità, è stata qui considerata la possibilità di applicazione di un acido umico esogeno (HA) come surfattante naturale per

la rimozione della contaminazione organica dei suoli inquinati dell'ACNA di Cengio. Si è voluto, inoltre, confrontare l'efficienza surfattante dell'HA con quella ottenuta per azione di due comuni surfattanti sintetici (Sodio dodecil-solfato e Triton X-100) e della sola acqua, nel lavaggio di due suoli altamente contaminati provenienti dall'area industriale dello stabilimento chimico ex-ACNA.

## 2.2 Comparazione di due tecnologie estrattive

La determinazione analitica di componenti organiche nei suoli, soprattutto in suoli con contaminazione storica, può essere alquanto problematica e dipendente, in gran misura, dalla possibilità che questi composti vengano estratti efficacemente.

La procedura di estrazione determina la resa di estrazione e influenza, quindi, il risultato di tutta la procedura analitica.

Tuttavia, le problematiche analitiche connesse alla caratterizzazione dei macro e microinquinanti organici nei suoli dipendono non solo dal tipo di tecnica estrattiva, ma anche dalla fase di pretrattamento del campione e, soprattutto, dal tempo di contatto con il suolo (*aging*).

L'*aging* del contaminante può limitare sia il trasferimento di massa al solvente estraente, come conseguenza del suo sequestro fisico (*hole filling*), sia comportarne la degradazione per azione della biomassa microbica.

Quasi tutti i metodi tradizionali di estrazione (*Shake-flask*, *Soxhlet*, etc..) sono molto dispendiosi poiché richiedono un eccessivo consumo di solvente (da 50 ml fino a 400 ml per campione) e lunghi tempi di estrazione implicanti la possibilità di degradazione degli analiti (Babic *et al.*, 1998).

La sonicazione, fornendo un contatto più efficiente tra il solido e il solvente, permette di solito un recupero maggiore di analita (Poole *et al.*, 1990) con un consumo ridotto di solvente.

Inoltre, nel settore ambientale, spicca la tecnica di estrazione di contaminanti da campioni di suolo con il metodo EPA 3550, più rapido ed economico della tecnica *Soxhlet*, che rimane, comunque, il metodo di riferimento.

Babic *et al.*, hanno mostrato che l'estrazione sonochimica è un metodo più rapido rispetto ai metodi tradizionali: *Soxhlet* e *shaking* manuale. L'efficienza di estrazione in funzione del tempo è indicata con un massimo di 15 min. Infatti, tempi più lunghi di estrazione determinano una diminuzione della resa di estrazione, dovuta, probabilmente, alla degradazione dei substrati a causa dell'energia prodotta dalle onde ultrasoniche, pur non essendo questi ultimi ugualmente suscettibili alla degradazione sonochimica (Catallo & Junk, 1994; Catallo & Junk, 1995).

Influiscono sul rendimento di estrazione la concentrazione di substrato, il tipo e il volume di solvente, mentre sembra essere poco influente il numero totale di estrazioni. In aggiunta, gli estratti provenienti dalla sonicazione non sempre rendono necessaria la successiva fase di purificazione, riducendo, in tal modo, i tempi di analisi (Babic *et al.*, 1998).

Questa parte della ricerca ha avuto come oggetto lo studio comparativo dell'efficienza di due metodi estrattivi, scelti per questo studio sperimentale, la tecnica ultrasonica e l'estrazione *Soxhlet*, allo scopo di individuare la migliore procedura estrattiva per la definizione di una appropriata procedura analitica per la determinazione degli inquinanti organici nei suoli studiati e, in generale, nei suoli contaminati.

### **2.3 Effetti delle metalloporfirine sulla degradazione di contaminanti organici e sulla loro interazione con le sostanze umiche**

Precedenti lavori, hanno dimostrato, l'efficacia di catalizzatori biologici, quali perossidasi e fenolossidasi, nel trasformare substrati di natura fenolica (Bollag, 1995). Le per ossidasi, inoltre, si sono dimostrate altamente efficaci nel promuovere la polimerizzazione delle componenti presenti nelle associazioni supramolecolari di sostanze umiche (Piccolo *et al.*, 2000; Cozzolino e Piccolo, 2002)

Tuttavia poche sono le evidenze sperimentali sulle capacità catalitiche di catalizzatori biotici e abiotici quando contaminanti di diversa natura chimica sono presenti contemporaneamente nel sistema.

D'altra parte lo studio della decontaminazione dei siti inquinati non può prescindere dall'analisi delle complesse interazioni tra gli inquinanti e la sostanza organica stessa e dal ruolo chiave svolto dalle sostanze umiche sul destino e sul trasporto degli inquinanti da un comparto ecosistemico all'altro.

Uno dei maggiori problemi ambientali di cui tener conto nella valutazione del rischio di esposizione ai siti contaminati è il possibile rilascio nel tempo dei contaminanti adsorbiti alle sostanze umiche, per variazioni sia delle condizioni chimico-fisiche sia biologiche dei mezzi circolanti, rendendo difficile ogni previsione circa l'entità effettiva della frazione biodisponibile nel sito contaminato.

La conoscenza supramolecolare delle sostanze umiche ha suggerito la possibilità di aumentare le dimensioni delle molecole umiche stesse mediante reazioni di polimerizzazione impiegando catalizzatori biomimetici che contengono un anello attivo metallo-porfirinico, specificamente attivate da perossido d'idrogeno o dalla luce solare, invece di enzimi di natura ossidativa, più dispendiosi e più suscettibili alla denaturazione e alla degradazione microbica.

Dati riportati in letteratura dimostrano che le metalloporfirine, catalizzatori biomimetici, sono in grado di dechlorurare e accoppiare ossidativamente clorofenoli (Labat *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1999; Fukushima, *et al.*, 2003) e altri composti organici (Chen *et al.*, 1999; Traylor *et al.*, 1984; Song *et al.*, 1997). Studi recenti di fotocatalisi dimostrano l'efficienza dei complessi metalloporfirinici nell'indurre l'ossidazione catalitica di idrocarburi utilizzando anche la luce come agente attivante (Maldotti, *et al.*, 1996; Maldotti, *et al.*, 2002; Suslik & Watson, 1992).

Quest'ulteriore fase dell'attività di ricerca è stata dedicata alla possibilità di applicazione di una tecnica catalitica per il controllo dell'inquinamento del suolo nei casi di contaminazione organica complessa.

In particolare si è voluto verificare il potenziale applicativo di un catalizzatore biomimetico, una ferro-porfirina di sintesi solubile in acqua, sulla capacità di inattivare contaminanti di natura chimica diversa mediante una reazione di copolimerizzazione ossidativa con la sostanza organica naturale indotta da perossido d'idrogeno e verificandone, inoltre, l'influenza prodotta in presenza di acido umico esogeno sulla capacità di rimozione della contaminazione, nei sistemi considerati, da parte dell'agente catalitico.

## **CAPITOLO 3**

### **MATERIALI**

#### **E**

### **METODI DI ANALISI SUI SUOLI**

#### **3.1 Campionamento e trattamento dei suoli**

La sperimentazione è stata condotta su due diversi campioni di suolo (denominati A e B) appartenenti a due sondaggi diversi e campionati in tempi diversi nel sito contaminato di interesse nazionale ACNA.

I campioni di suolo, dopo essiccamento all'aria, sono stati setacciati (<2mm), tenuti in contenitori di vetro e conservati al buio, a 4 °C, fino al momento dell'impiego.

#### **3.2 Reagenti e standard**

Tutti i reagenti utilizzati, acetone, nesano, diclorometano, solfato di sodio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), sono stati di grado di purezza analitico.

Le soluzioni sono state preparate utilizzando acqua ultrapura (Milli Q System, Millipore).

L'octafluoronaftalene è stato impiegato come standard interno per le analisi quantitative GC-MS.

### 3.3 Analisi chimico-fisiche

Le caratteristiche chimico-fisiche sono state determinate utilizzando la frazione <2mm per i due campioni di suolo sottoposti a trattamento.

L'analisi della tessitura è stata eseguita con i metodi ufficiali della Repubblica Italiana (GU, 1992), mentre la determinazione del contenuto di carbonio organico e di azoto è stata condotta con un analizzatore elementare del tipo Fysons EA11 Elemental Analyzer.

I risultati ottenuti sono riportati in tabella I.

**Tabella 3.1.** Caratteristiche dei suoli A e B campionati nel sito contaminato ACNA di Cengio.

Proprietà	Suolo A	Suolo B
Sabbia grossolana (%)	21,2±0,6	12,8±0,4
Sabbia fine (%)	35,6±0,8	38,8±0,5
Limo (%)	39,6±0,5	43,6±0,7
Argilla (%)	3,6±0,2	4,8±0,3
Carbonio (%)	2,8±0,1	2,7±0,2
Azoto (%)	1,2±0,1	0,13±0,02

### **3.4 Determinazione degli inquinanti organici**

#### 3.4.1. Estrazione Soxhlet

Ciascun campione (10 g) di entrambi i suoli è stato accuratamente pesato in ditali di cellulosa da estrazione, trasferito in una camera interna di un apparato Soxhlet e sottoposto ad estrazione (metodo EPA 3540) per 48 ore con 100 ml di una miscela di acetone/nesano (1:1) (Dean, 1999). Il processo di estrazione, relativamente lento, è determinato dal ricircolo, attraverso il campione, del solvente condensato mediante un condensatore a riflusso. In accordo con il metodo EPA SW 3630 B (Usepa, 1994),

Icontaminanti organici acidi (come acidi organici e fenoli) sono stati rimossi dall'estratto mediante estrazione liquido-liquido con una soluzione di NaOH 1M a pH 11. La fase organica residua è stata poi trattata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> per la rimozione dell'acqua residua e filtrata attraverso filtri Whatman 40.

#### 3.4.2. Ultrasonicazione

Ciascun campione (10 g ) di entrambi i suoli è stato accuratamente pesato, sospeso in una soluzione (100 ml) di acetone/nesano (1:1) ed estratto mediante sonicazione con un sonicatore Misonix XL2020 (Metodo EPA 3550). Alla sospensione è stata applicata una potenza di 55 Watt per 12 minuti ottenendo un'energia totale di 39.6 kJ.

Dopo sonicazione, la sospensione è stata filtrata attraverso filtri di carta Whatman 40, allo scopo di separare il residuo dall'estratto.

### 3.5 Pretrattamento dei campioni

Dopo filtrazione, gli estratti organici provenienti dalla sonicazione o dalla soxhlet, sono stati prima portati a secco al rotavapor a 40°C e i residui disciolti in 5 ml di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Una aliquota di 1 ml di tale soluzione è stata purificata su colonnine Bond-Elut SPE C-18 (500mg 3ml, Varian) previamente attivate con 30 ml di n-esano, in accordo con il metodo EPA SW 8270 B (Usepa, 1994). L'eluizione della cartuccia, effettuata con 30 ml di n-esano, consente di recuperare i contaminanti apolari e polari non acidi assorbiti sulla stessa.

L'eluato in n-esano è stato portato a secco al rotavapor a 40°C, di nuovo disciolti con 1 mL di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e 1mL di una soluzione di octafluoronaftalene 100 µg/mL in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

### 3.6 Analisi GC-MS

Le analisi gas-cromatografiche sono state effettuate mediante un gas-cromatografo Perkin-Elmer Autosystem<sup>TM</sup> XL equipaggiato con un iniettore di tipo Split/Splitless Programmed-Temperature tenuto, mediante controllo programmato, a una temperatura costante di 250°C ed unacolonna capillare Restek Rtx<sup>©</sup>- 5MS (5% difenil-95% dimetilpolisilossano; lunghezza 30m x 0.25 mm ID, 0.25µm df). Un rivelatore a spettrometria di mass Perkin-Elmer TurboMass-Gold Mass-Spectrometer è stato utilizzato per la determinazione qualitativa e quantitativa dei composti contaminanti estratti dai suoli prima e dopo il trattamento di lavaggio. Le condizioni operative per le analisi GC-MS sono state le seguenti: temperatura iniziale del forno di 40° C per 5 minuti e, quindi, aumentata a 250° C con una velocità di 3°C min<sup>-1</sup>. La temperatura di 250°C è mantenuta costante per 20 minuti. Tempo totale di analisi GC 95

min. L'Elio è stato usato come gas di trasporto ad un flusso di  $1.5 \text{ mL min}^{-1}$ , mentre il flusso era fissato a  $30 \text{ ml min}^{-1}$  per lo split. La temperatura della sorgente MS è stata mantenuta a  $180^\circ \text{ C}$ . Il volume di iniezione è stato di  $5 \text{ }\mu\text{L}$ . I cromatogrammi sono stati acquisiti per impatto elettronico positivo utilizzando come rivelatore lo spettrometro di massa Perkin-Elmer Turbomass-Gold Mass-Spectrometer ed ottenendo gli spettri di massa per ciascun composto separato mediante gas-cromatografia. I limiti inferiori e superiori dei valori  $m/z$  dello spettrometro di massa sono stati tra 50 e 600 uma, rispettivamente. Tutti i cromatogrammi acquisiti dallo spettrometro di massa sono stati analizzati mediante un software Perkin-Elmer Turbomass 4.0 e l'identificazione di ciascun analita è avvenuta per confronto degli spettri di massa sottesi ad ogni picco cromatografico con quelli contenuti nella libreria NIST98<sup>®</sup> versione 1.7.

### **3.7 Influenza dello standard interno sui risultati delle analisi**

Sono state calcolate le concentrazioni incognite di tutti i contaminanti usando l'area dello standard interno come riferimento mediante il rapporto tra l'area del picco dell'analita e l'area di quello dello standard interno per varie concentrazioni di analita.

Per le analisi quantitative la modalità con standard interno è da preferire poiché corregge gli errori dovuti alla preparazione del campione o alla quantità di campione iniettato.

Lo standard interno è un composto a quantità nota e costante, non presente nei componenti del campione da analizzare, pur appartenendo alla stessa famiglia, e con un tempo di ritenzione diverso da quello degli analiti.

### **3.8 Trattamento dati**

Le estrazioni per Soxhlet e sonicazione sono state condotte in triplicato per ciascun campione prima e dopo i vari trattamenti di lavaggio. Ciascun estratto organico è stato analizzato in duplicato mediante analisi GC-MS. La riproducibilità è stata stimata dal calcolo delle rese medie e dalla deviazione standard relativa. I risultati delle analisi quantitative sono state calcolate sulla media pesata per stabilire l'errore sperimentale.

## CAPITOLO 4

### ESPERIMENTI DI BONIFICA

#### 4.1 Lavaggio del suolo

##### 4.1.1 Surfattanti selezionati

L'esame della letteratura (Chu & Kwan, 2003; Lee et al., 2002; Billingsley et al., 1999; Grimberg et al., 1995) ha suggerito la tipologia dei surfattanti selezionati per questo studio, principalmente sulla base delle loro capacità solubilizzanti, della loro biodegradabilità (Lee et al., 2002) e tossicità (Cserhati et al., 1991; Singer et al., 2000).

Il Triton X-100 (TX-100,  $C_{30}H_{32}N_4O_8$ , 624 amu), un tensioattivo sintetico non ionico, riconducibile alla famiglia degli alchil-fenol etossilati, è stato scelto per l'efficace capacità solubilizzante (Rouse et al., 1994; Lajoie et al., 1997) poiché a bassa concentrazione micellare critica (CMC) ( $0,25gL^{-1}$ ) implica una più alta concentrazione di micelle di surfattante e quindi un'aumentata capacità solubilizzazione dei contaminanti organici dai suoli. Tuttavia il basso valore di HLB (Hydrophil-Lipophil-Balance) (13.5), da cui dipende la tossicità dei surfattanti, lo rende ben tollerato solo da pochi batteri, in particolare, quando impiegato in concentrazione superiore alla CMC.

Per questo studio è stato anche selezionato il sodio dodecil solfato (SDS,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4\text{Na}$ ), un surfattante anionico facilmente biodegradabile dai microrganismi del suolo e delle acque (Lee *et al.*, 2002). I surfattanti anionici sono di solito scelti per i metodi di risanamento basati su lavaggio a causa del loro basso grado di adsorbimento sul suolo (Rouse *et al.*, 1993). Il peso molecolare dell'SDS è 288, bassa CMC (8 mmol/l), mentre l'HLB è 40. Questo surfattante presenta, pertanto, bassa tossicità nei confronti delle comunità microbiche. Il Triton e l'SDS sono stati forniti dalla Sigma<sup>®</sup> (Milano, Italy) ed usati senza ulteriore purificazione.

Le caratteristiche del Triton X-100 e dell'SDS sono mostrati in Tabella 4.1.

#### 4.1.2 Materiale Umico

E' stato isolato un acido umico (HA) da lignite del Nord Dakota (Mammoth, Int.Chem.Co., Houston, Texas) e purificato con procedura standard (Conte & Piccolo, 1999). L'acido umico è stato poi sospeso in acqua distillata, titolato a pH 7.0 con una soluzione NaOH 1M, mediante titolatore automatico (VIT 909 Videotitrator, Radiometer, Copenhagen) sotto flusso continuo di  $\text{N}_2$ . L'umato di sodio risultante è stato poi filtrato attraverso un filtro millipore 0.45  $\mu$  e nuovamente liofilizzato. Si è ottenuto, in tal modo, un umato di sodio idrosolubile, subito disponibile per il successivo lavaggio del suolo contaminato.

**Tabella 4.1.** Caratteristiche dei surfattanti usati

Nome commerciale	Triton X-100	SDS
Composto	Polietossietene <sub>(10)</sub> isooctil Feniletere	Sodio dodecilsolfato
Peso molecolare	625	288
HLB	13.5	40
CMC(mM)	0.24	8
Formula Molecolare	(C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> )C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> OH n~10	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> SO <sub>4</sub> Na
Tipo	Non ionico	Anionico

#### 4.1.3 Lavaggio del suolo con acqua e tensioattivi sintetici e naturali

Sono state eseguite prove di lavaggio in triplicato sui campioni di suolo contaminato con tre diverse soluzioni di lavaggio utilizzando i surfattanti selezionati per questo studio sperimentale: soluzioni acquose di: 1. 4% (w/v) sodio dodecilsolfato (SDS); 2. 4% (v/v) Triton X-100 (TX 100); 3. 10 g.L<sup>-1</sup> di acido umico (HA). Quest'ultima concentrazione per l'acido umico è riportata in letteratura come la concentrazione micellare critica delle sostanze umiche (CMC) (Guetzloff & Rice, 1996). Un ulteriore test di desorbimento è stato eseguito usando semplicemente: 4. acqua MilliQ, come confronto con il processo di desorbimento favorito dai surfattanti sintetici e naturali.

I campioni di suolo (10 g) sono stati sospesi in 100 ml di ciascuna soluzione di lavaggio e sono stati sottoposti ad agitazione per 24 ore, in agitatore rotante con velocità di rotazione ca. 10 rpm. Le sospensioni sono state poi trasferite in tubi da centrifuga di vetro e centrifugate a 10000 rpm per 10 min. per separare il residuo solido dalla soluzione di lavaggio. I residui solidi sono stati essiccati in stufa ventilata a 40°C e successivamente trattati secondo la procedura di estrazione e purificazione già descritta. Gli estratti seccati provenienti dal lavaggio con HA, SDS, TX-100 e H<sub>2</sub>O, sono stati analizzati mediante GC-MS per determinare la concentrazione di ciascun analita.

#### 4.1.4 Lavaggio del suolo con acidi umici

Sono state condotte anche prove di lavaggio con acido umico (HA) su suolo A mirate a valutare l'efficienza di più cicli di estrazione. È stato perciò misurato l'abbattimento del contenuto di contaminanti dopo 3 estrazioni sequenziali. In particolare, un campione di suolo A (10 g) è stato estratto per tre volte consecutive con 100 ml della soluzione dell'umato di sodio con concentrazione pari a  $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Dopo ogni estrazione la sospensione è stata centrifugata, come già descritto, allo scopo di separare la soluzione di lavaggio dal residuo solido.

L'esperimento ciclico è stato condotto, anche in questo caso, in prove triplicate.

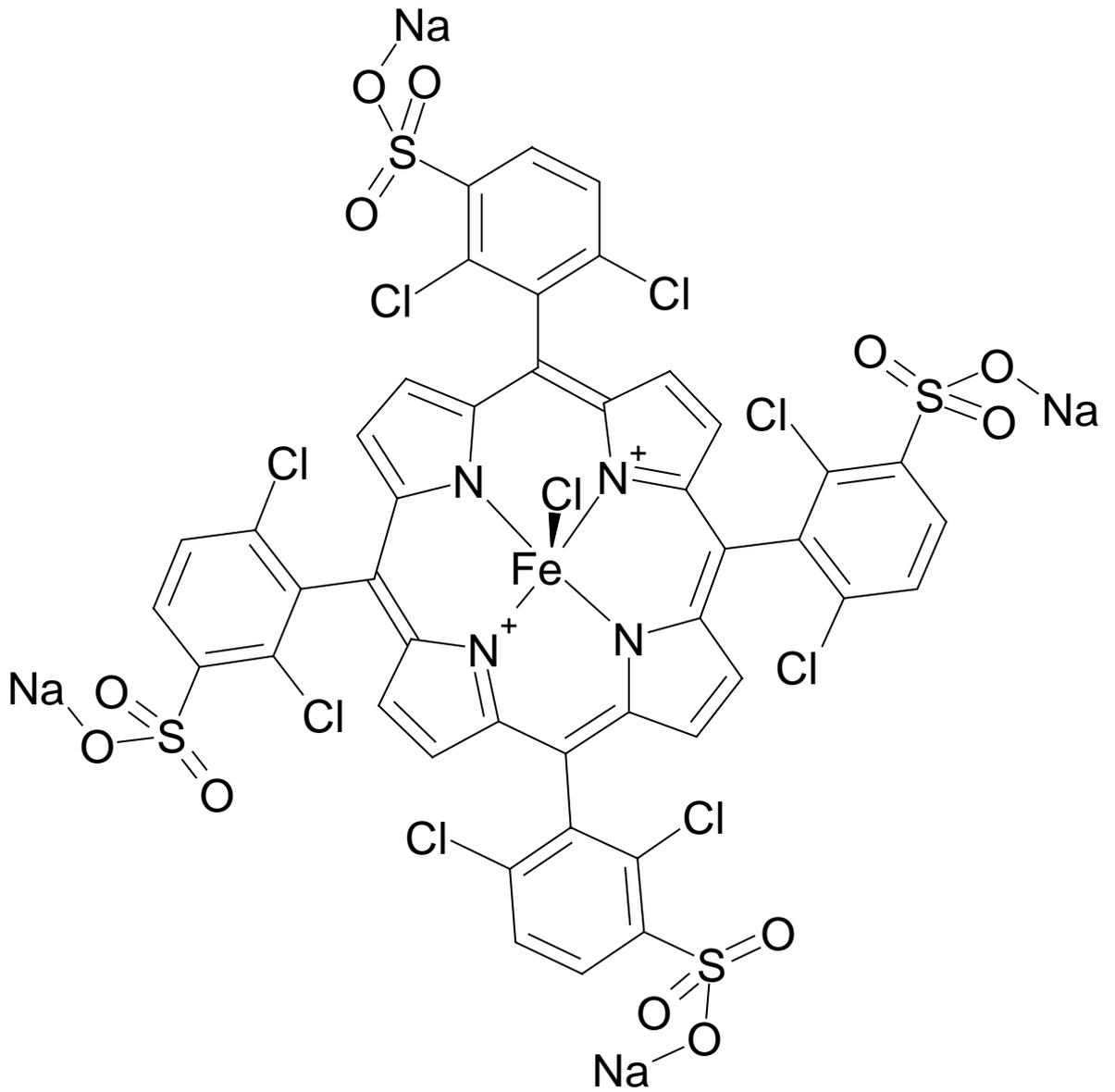
## 4.2 Sintesi del catalizzatore

La sintesi di ferroporfirina (FePha),  $\text{Fe}(\text{TDCPPS})\text{Cl}$ , è avvenuta in due fasi distinte. In una prima fase si è proceduto alla sintesi della *meso-tetra-2,6-dicloro-fenil-porfirina*, seguendo il metodo riportato da Traylor et al. (1984), mentre la fase successiva è consistita nel processo di funzionalizzazione del macrociclotetrapirrolico con sostituenti diversi e con atomi di Fe coordinati nel centro. In figura 4.1 è riportata la struttura della *meso-tetra-(2,6-dicloro-3-solfato-fenil) porfirinato di Fe (III) cloruro* (FePha) la cui sintesi è descritta nei due paragrafi successivi.

#### 4.2.1 Sintesi della meso-tetra-(2,6-dicloro-3-solfato-fenil) porfirina

La sintesi della meso-tetra-(2, 6-dicloro-3-solfato-fenil) porfirina è stata ottenuta secondo lo schema riportato in figura 4.2

200mg della meso-tetra-2, 6- dicloro- fenil- porfirina sono stati disciolti in 8mL di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fumante e messi in agitazione per 12 ore a 160° sotto atmosfera inerte di Argon. Il prodotto di reazione è stato recuperato in acqua fredda e la soluzione è stata mantenuta a bassa temperatura immergendo la beuta nel ghiaccio. Il pH è stato elevato a 7 con una soluzione satura di NaOH. La miscela è stata essiccata usando un Rotavapor a 60-70°C. Il residuo è stato recuperato con CH<sub>3</sub>OH, nuovamente essiccato, ridissolto in metanolo e cristallizzato in etere etilico, allo scopo di eliminare i Sali. Il prodotto viene fatto passare attraverso una resina a scambio cationico (Aldrich Chemicals), precedentemente condizionata con una soluzione al 10% di acido cloridrico. Il prodotto di interesse è stato fluito con acqua e la frazione raccolta liofilizzata. Il prodotto finale è stato ricristallizzato in CH<sub>3</sub>OH ed acetone. La resa di reazione è stata del 75%.



**Figura 4.1** Struttura della ferroporfirina

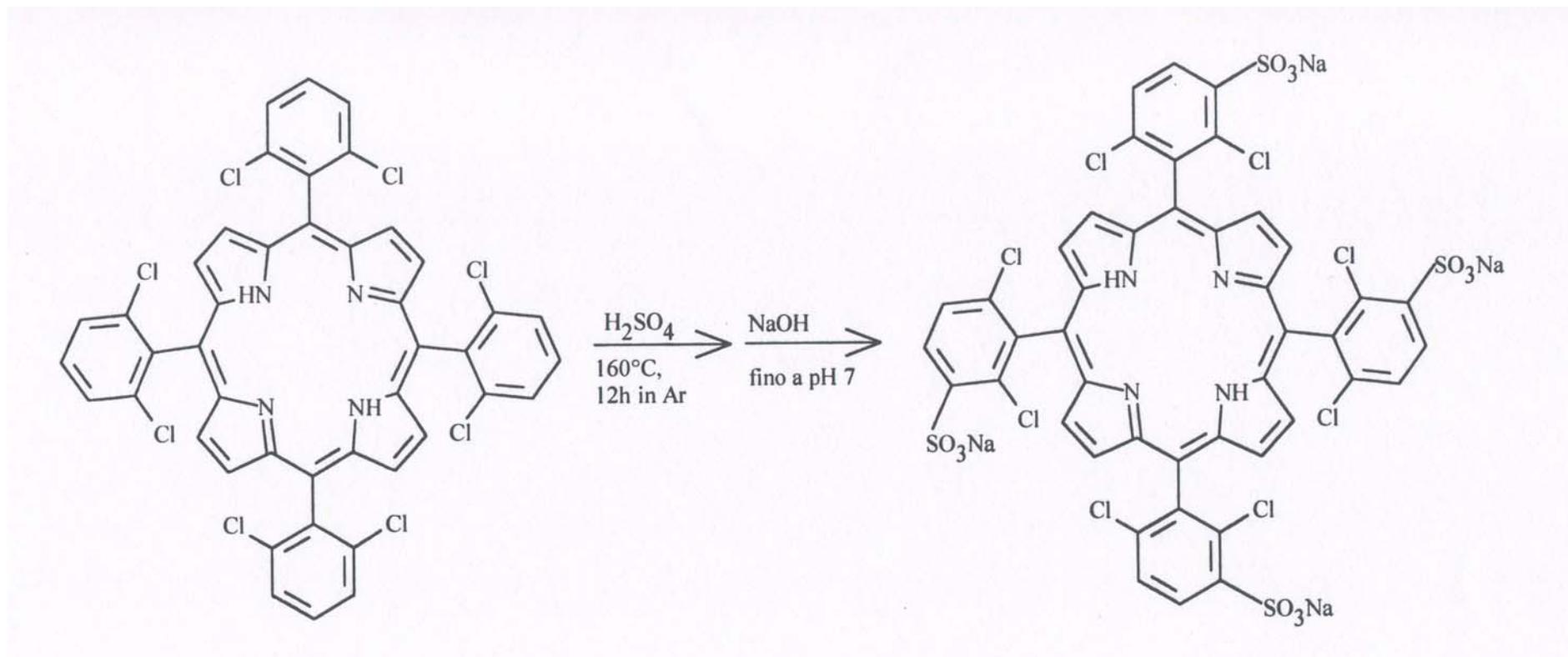


Figura 4.2 Sintesi di meso-tetra-(2,6-dicloro-3-sulfonato fenil) porfirina

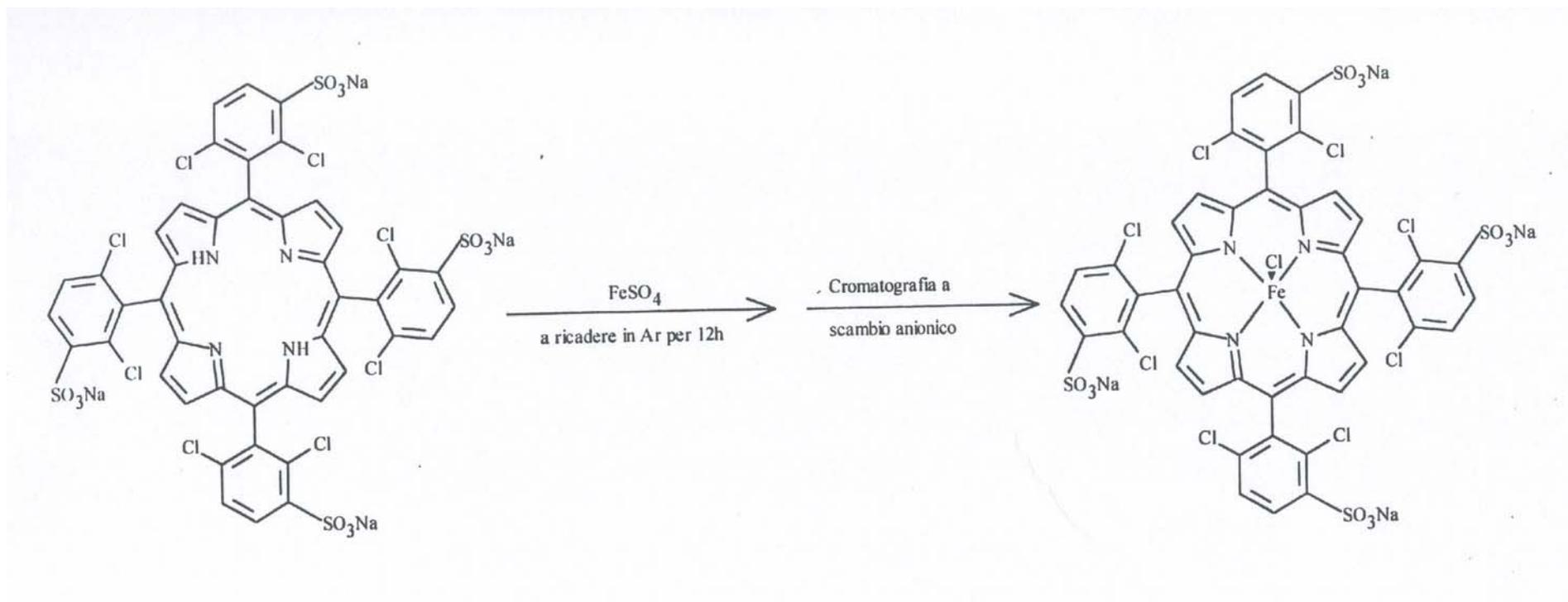


Figura 4.3 Funzionalizzazione con Fe(III) della meso-tetra-(2,6-dicloro3-sulfonatofenil)porfirina

#### 4.2.2 Sintesi della meso-tetra-(2, 6-dicloro-3-solfato-fenil) porfirinato di Fe (III) cloruro

La sintesi della meso-tetra-(2,6-dicloro-3-sulfonato-fenil) porfirinato di Fe (III) cloruro è stata ottenuta secondo lo schema riportato in figura 4.3.

200mg di meso-tetra-(2, 6-dicloro-3-solfato-fenil) porfirina e 100mg di FeSo<sub>4</sub> sono stati disciolti in 200mL di acqua MilliQ. La soluzione è stata degassata e lasciata per 12 ore sotto atmosfera inerte di Argon. Successivamente, il campione è stato liofilizzato e poi ridissolto in acqua per consentirne il passaggio attraverso una resina a scambio cationico (Aldrich Chemicals), condizionata con una soluzione al 10% di acido cloridrico. Il prodotto è stato fluito con acqua e la frazione raccolta è stata liofilizzata. Il residuo finale è stato sottoposto a cicli di purificazione da sali, con l'uso di metanolo e di acetone. La resa di reazione è stata dell' 80%.

### **4.3 Copolimerizzazione ossidativa di contaminanti organici per catalisi biomimetica in presenza di sostanze umiche**

#### 4.3.1. Soluzioni preparate per valutare l'effetto del catalizzatore biomimetico in presenza di acido umico esogeno

Per lo studio dell'effetto delle metalloporfirine sulla degradazione di inquinanti in presenza di acido umico sono state utilizzate tre soluzioni distinte per i vari trattamenti effettuati sul suolo A. A tale scopo è stata utilizzata Ferroporfirina,  $(\text{H}_2\text{TDCPPS})\text{Cl}$  in quantità calcolata in rapporto al contenuto di CO (3%) presente nel suolo A, risultando essere, nel caso specifico, lo 0.25% in peso del CO contenuto nel campione di suolo sottoposto a trattamento. Come agente ossidante è stata utilizzata  $\text{H}_2\text{O}_2$  che ha consentito di accelerare la reazione di polimerizzazione a temperatura ambiente. La soluzione madre di  $\text{H}_2\text{O}_2$  8.1M è stata preparata ogni volta di fresco in modo da essere certi del suo titolo, partendo da  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30% in vol. (Ashland). Per la soluzione umica è stata utilizzata una quantità di umato di sodio in ragione dell'1% in peso del CO presente nel suolo e in considerazione del contenuto di ceneri presente nell'acido umico da lignite fin qui utilizzato e che, una volta determinato, è risultato essere circa il 40%.

Le soluzioni così preparate (3.2 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  (8.1M)/20ml; 20 mg HA/20 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ; 3 mg FePha/20 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ) sono state utilizzate per la predisposizione dei trattamenti descritti nel paragrafo successivo.

#### 4.3.2 Reazioni di polimerizzazione sul suolo contaminato

Sono stati pesati 40g del suolo A e posti in piastre Petri di vetro (Duran Scott) dal diametro di 12 cm. Su queste aliquote sono stati effettuati vari trattamenti eseguiti in tre prove parallele come riportato in Tabella 4.1 utilizzando le soluzioni opportunamente predisposte.

In un primo trattamento, a 40g di suolo A è stata aggiunta una soluzione preparata con 3.2 ml di  $H_2O_2$  (8.1M) e portata a volume con 20 ml di  $H_2O$  deionizzata. Tale soluzione è stata distribuita sul campione di suolo in modo da ottenere una bagnatura uniforme.

In un secondo esperimento, il suolo A è stato sottoposto all'azione della soluzione di FePha in presenza dell'agente ossidante ( $H_2O_2$ ) senza la preventiva aggiunta di acido umico. In particolare, il suolo (D) è stato trattato con 20 ml della soluzione di FePha, distribuita uniformemente, cui sono stati aggiunti successivamente 3.2 ml di  $H_2O_2$  (8.1M). L'azione di questi componenti di reazione è stata confrontata con quella ottenuta trattando il suolo con la sola soluzione di FePha (trattamento C).

In un altro trattamento, condotto in due prove parallele (E-F), il suolo A (40g) è stato sottoposto ad aggiunta con una soluzione umica preparata con 20 mg di acido umico (HA) da lignite sciolto in 20 ml di  $H_2O$  deionizzata. I campioni di suolo sono stati poi lasciati essiccare all'aria per circa 10 giorni. Il trattamento con acido umico esogeno è stato seguito dall'aggiunta di 20 ml di una soluzione di Ferroporfirina preparata disciogliendo 3 mg di FePha in 20 ml di  $H_2O$  deionizzata. Nel secondo trattamento tale soluzione è stata distribuita in maniera uniforme sul suolo con una pipetta Pasteur, mentre nell'altro esperimento il trattamento con HA e FePha è proseguito con l'aggiunta di 3.2 ml di  $H_2O_2$  (8.1M).

Tutti i campioni così trattati sono stati incubati per circa 30 giorni a temperatura ambiente e al buio, in modo da evitare reazioni di ossidazione

fotocatalitica, sottoposti ad estrazione Soxhlet, secondo la procedura già descritta, e successivamente analizzati.

Tabella 4.2. Trattamenti effettuati su suolo A con le soluzioni preparate per la verifica delle reazioni catalitiche di polimerizzazione

Trattamenti	Composizione
A	40g soil Acna A
B	A + 3.2 ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (8.1M)/ 20 ml H <sub>2</sub> O
C	A + 3 mg FePha / 20 ml H <sub>2</sub> O
D	A + 3 mg FePha / 20 ml H <sub>2</sub> O + 3.2ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (8.1M)
E	A + 20 mg HA / 20 ml H <sub>2</sub> O + 3 mg FePha / 20 ml H <sub>2</sub> O
F	A + 20 mg HA / 20 ml H <sub>2</sub> O + 3 mg FePha / 20 ml H <sub>2</sub> O + 3.2ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (8.1M)

#### **4.4 Copolimerizzazione catalitica in sostanze umiche su suoli dopo lavaggio con HA**

In un altro gruppo di esperimenti, il suolo A, dopo trattamento di lavaggio con acido umico (HA) esogeno, secondo la normale procedura, è stato sottoposto all'azione catalitica della ferroporfirina in presenza di perossido d'idrogeno come agente ossidante. In particolare, il residuo di suolo dopo essiccamento in stufa, è stato prelevato, pesato e trasferito in piastre Petri di vetro (Duran Scott) dal diametro di 12 cm. Questo materiale è stato così sottoposto a due prove parallele, consistite in: 1. aggiunta del solo catalizzatore biomimetico (FePha); 2. il residuo solido addizionato con la miscela di reazione (FePha più  $H_2O_2$ ). Ogni esperimento è stato eseguito in triplicato. I campioni così trattati sono stati incubati fino a completo essiccamento (circa 15 giorni) a temperatura ambiente e al riparo dalla luce.

Lo schema completo dei trattamenti è illustrato in Tabella 4.3.

Tabella 4.3. Trattamenti effettuati su suolo A per una valutazione dell'effetto di un precedente ciclo di lavaggio con acido umico sulla riduzione catalitica della contaminazione con o senza H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e successiva estrazione soxhlet

Trattamento	Composizione
A	40g soil A
G	A + SW HA + 3 mg FePha / 20 ml H <sub>2</sub> O
H	A + SW HA + 3 mg FePha / 20 ml H <sub>2</sub> O + 3.2ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (8.1M)

## 4.5 Fotocatalisi ossidativa

In un'ultimo set di prove sperimentali (Tabella 4.4), il primo di una serie attualmente in fase di svolgimento, il suolo A è stato sottoposto all'azione catalitica della ferroporfirina, utilizzando la luce solare come attivatore per l'ossidazione dei composti inquinanti presenti nel campione di suolo A analizzato.

Aliquote di 40g di suolo A sono state trasferite in piastre Petri di vetro Duran Scott e dopo aggiunta di 20 ml della soluzione di ferroporfirina, i campioni sono stati esposti alla luce solare per circa 1 mese.

Dopo completo essiccamento, i campioni di suolo A sono stati estratti alla Soxhlet e analizzati mediante GC-MS, così come si è proceduto per gli altri trattamenti con la ferroporfirina precedentemente descritti.

Le prove condotte in triplicato, delle quali ciascuna in doppio, assicurano la fondatezza del dato analitico.

L'efficienza del catalizzatore abiotico in presenza di luce solare sarà valutata rispetto a quella ottenuta con lo stesso trattamento, ma utilizzando  $H_2O_2$  come agente attivante.

Tabella 4.4. Trattamenti effettuati sul campione di suolo A utilizzando luce solare per la riduzione catalitica della contaminazione.

Trattamento	Composizione
A	40g soil A
G	A + 3 mg FePha / 20 ml $H_2O$ + 3.2ml $H_2O_2$ (8.1M)
H	A + 3 mg FePha / 20 ml $H_2O$ + luce solare

## CAPITOLO 5

### **RISULTATI E DISCUSSIONE**

#### **5.1 Il suolo**

##### 5.1.1 Caratterizzazione quali-quantitativa dei contaminanti organici

I risultati delle analisi chimico-fisiche, come evidenziato dalla tabella 3.1, mostrano una significativa differenza, dal un punto di vista tessiturale, tra i due suoli campionati. Infatti, il suolo A contiene una più elevata percentuale di sabbia grossa rispetto al suolo B, che, al contrario, è caratterizzato da un più alto contenuto di componenti granulometriche di taglia inferiore quali sabbia fine, limo e argilla. Nello stesso tempo, i due suoli mostrano una differente resa di estrazione dei contaminanti organici quando estratti sia mediante estrazione soxhlet che sonicazione (Tabella 5.1). Le concentrazioni sono espresse in mg di contaminanti per Kg di suolo.

I risultati delle analisi quali-quantitative mediante GC-MS, mostrano che, nel suolo A, gli idrocarburi policiclici aromatici, costituiscono la classe di composti inquinanti presente a più elevata concentrazione, seguiti da sistemi monoaromatici alogenati e nitrogenati, quali clorobenzeni e cloroaniline variamente sostituite, meno rappresentativi da un punto di vista quantitativo.

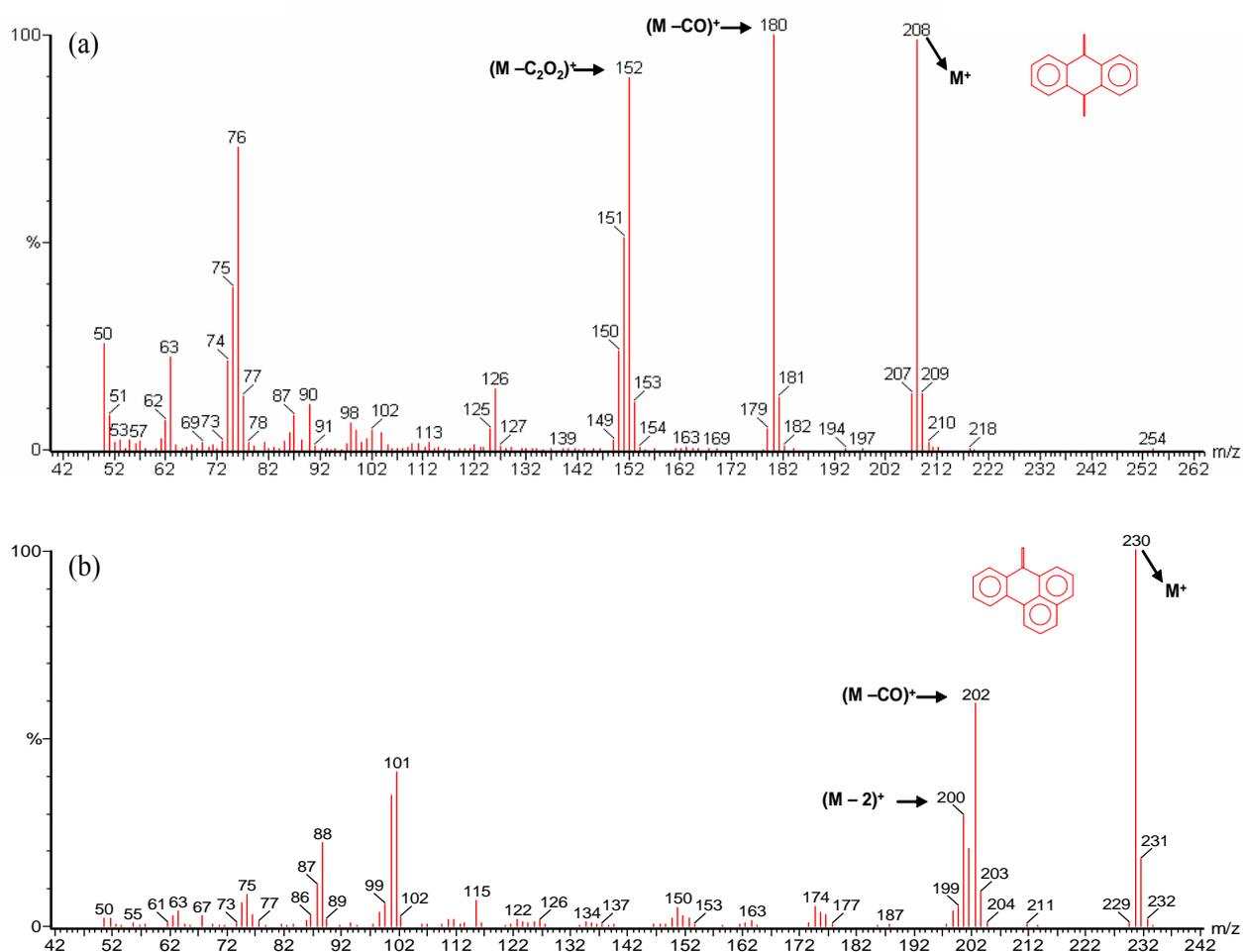
Il suolo B ha un più elevato contenuto di tiofeni, sulfoni e, bifenili. Tale differenza, tra i suoli A e B, risulta più evidente quando si confrontano le rese di estrazione delle diverse classi di contaminanti per entrambi i metodi selezionati per questo studio, soxhlet e sonicazione. Di fatto, i valori totali di concentrazione dei relativi contaminanti estratti dal suolo A con soxhlet e sonicazione non risultano significativamente diversi, laddove dal confronto di tali risultati, nel suolo B, emerge la migliore efficienza di estrazione ottenuta con la tecnica ultrasonica (Tabella 5.1).

**Tabella 5.1:** Valori totali ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) delle singole classi di contaminanti estratti dai suoli A e B mediante soxhlet e sonicazione.

Contaminanti	Soxhlet	Sonicazione	Soxhlet	Sonicazione
	Suolo A	Suolo A	Suolo B	Suolo B
IPA	4562±445	3792±130	986±129	1337±152
Composti monoaromatici alogenati e nitrogenati	407±22	426±19	97±3	222±14
Tiofeni	37±4	28±2	233798±	2815±344
Sulfoni	211±27	227±10	243±12	360±41
Bifenili	108±16	95±7	16±1	152±7
Altro	78±6	96±6	31±10	47±5

Nelle figure 5.1 e 5.2 sono mostrati esempi di cromatogrammi degli estratti organici ottenuti dai suoli A e B senza trattamento di lavaggio mediante estrazione soxhlet e sonicazione. Dall'analisi dei profili GC-MS dei due suoli, è risultato che le aree dei picchi degli analiti identificati sono state maggiori quando ottenute mediante sonicazione che non mediante soxhlet anche se tale differenza è apprezzabile solo con una migliore risoluzione gas cromatografica.

Attraverso la tecnica della co-eluzione con standard specifico(OCFN) per gli analiti presenti nella matrice contaminata, è stato possibile identificare, la presenza di 2,6-dicloroanilina (31.23 e 31.22 min nei suoli A e B rispettivamente), difenilettere (34.23 e 34.22 min), dinaftilsulfone (89.41 e 89.34 min), tra i composti rilevanti, mentre gli altri picchi sono riferibili ai composti organici che forniscono il maggiore contributo alla contaminazione, il 9,10- antracenedione (54.81 e 54.75 min) e il 7[H]-benz[DE]-antracen-7-one (69.64 e 69.54 min), ritenuti come sottoprodotti di degradazione dell'antracene (Steinarth *et al.*, ) e i cui spettri di massa sono mostrati in figura 5.3.



**Figura 5.3.** Spettri di massa del 9,10 Antracenedione (a) e del 7[H]benzo[DE]antracene-7-one (b).

Le figure 5.5-5.9 sono cromatogrammi parziali del suolo A (figura 5.4) tal quale, dopo estrazione soxhlet, ottenuti con un miglioramento della risoluzione gascromatografica e dove i singoli picchi hanno rivelato l'esistenza di altrettanti composti inquinanti.

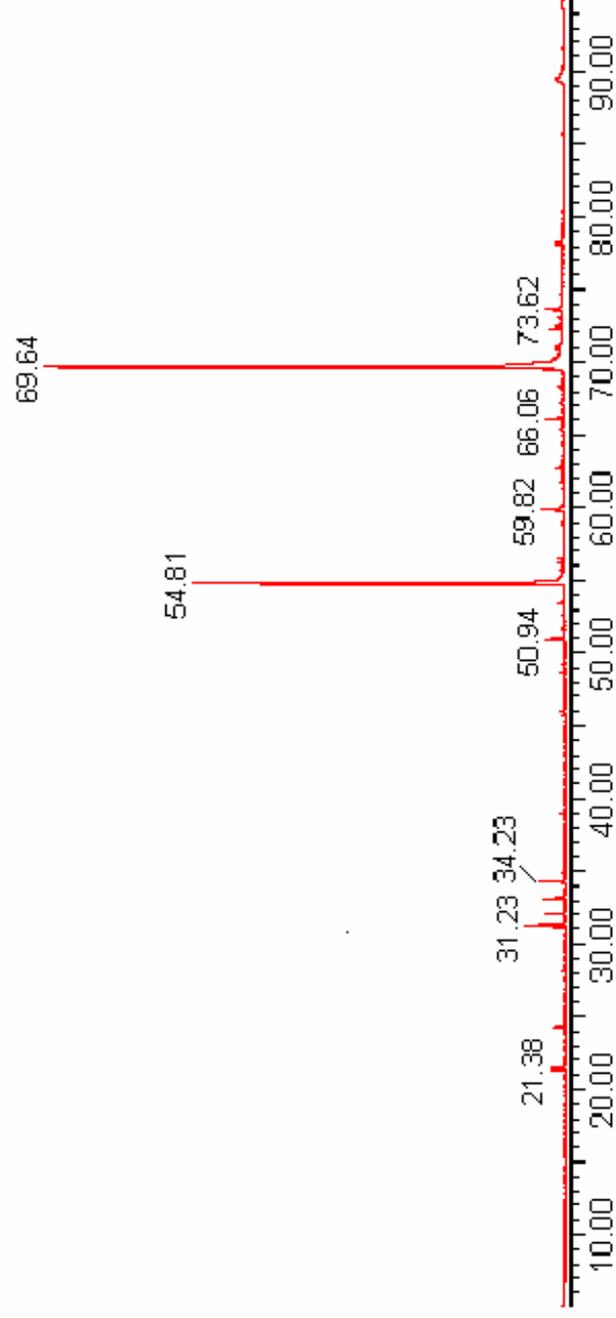
I tempi di ritenzione e i valori del rapporto  $m/z$  (massa/carica) dello ione molecolare,  $M^+$ , utilizzato per l'individuazione degli analiti degli estratti organici analizzati, sono mostrati nella Tabella 5.2.

La combinazione della gascromatografia ad alta risoluzione con la spettrometria di massa ha permesso la separazione e la specifica

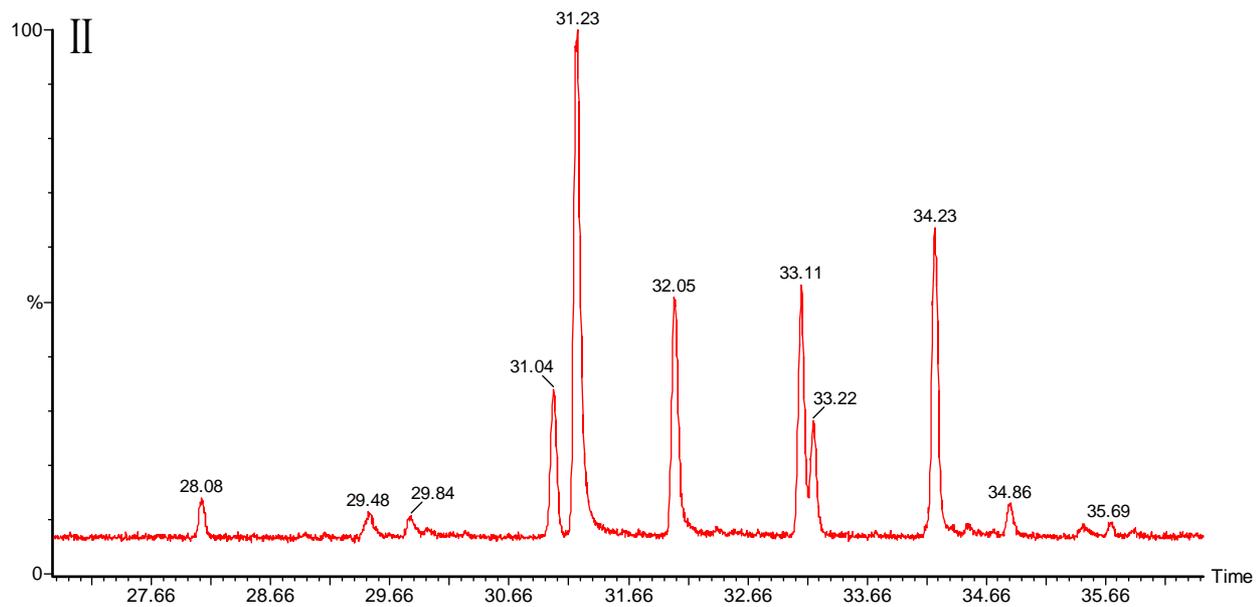
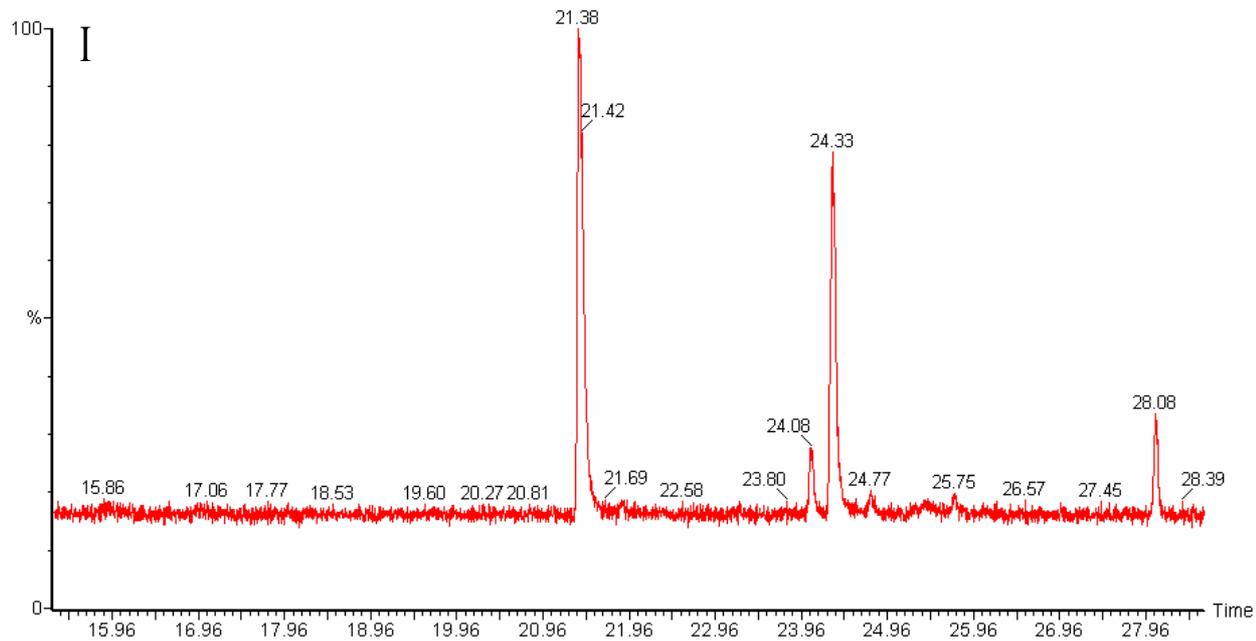
identificazione di isomeri, che, soprattutto negli IPA, sono spesso indistinguibili gli uni dagli altri.

Per distinguere tra vari isomeri può essere usato, in tali casi, il rapporto tra lo ione molecolare protonato ( $M^{+1}$ )<sup>+</sup> e lo ione molecolare  $M^+$ , il cui valore è caratteristico per ciascun analita considerato (Sweetman & Karasek, ).

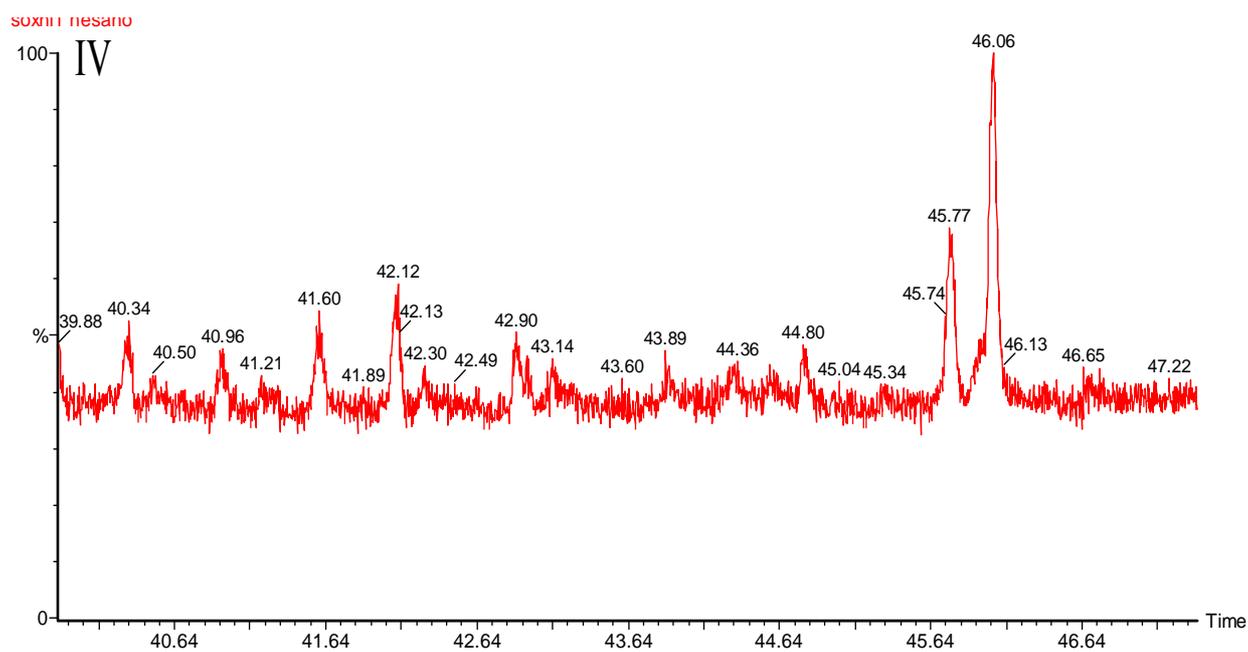
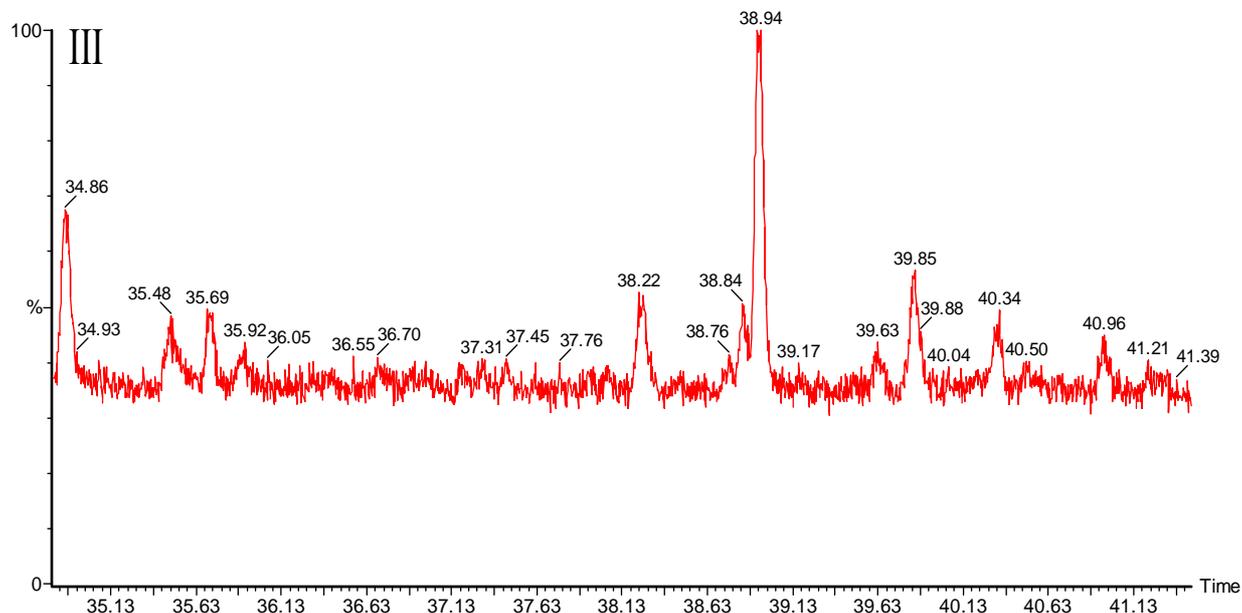
Contaminanti	Soxhlet	Sonicazione	Soxhlet	Sonicazione
	Suolo A	Suolo A	Suolo B	Suolo B
IPA	4562±445	3792±130	986±129	1337±152
Composti monoaromatici alogenati e nitrogenati	407±22	426±19	97±3	222±14
Tiofeni	37±4	28±2	233798±	2815±344
Solfoni	211±27	227±10	243±12	360±41
Bifenili	108±16	95±7	16±1	152±7
Altro	78±6	96±6	31±10	47±5



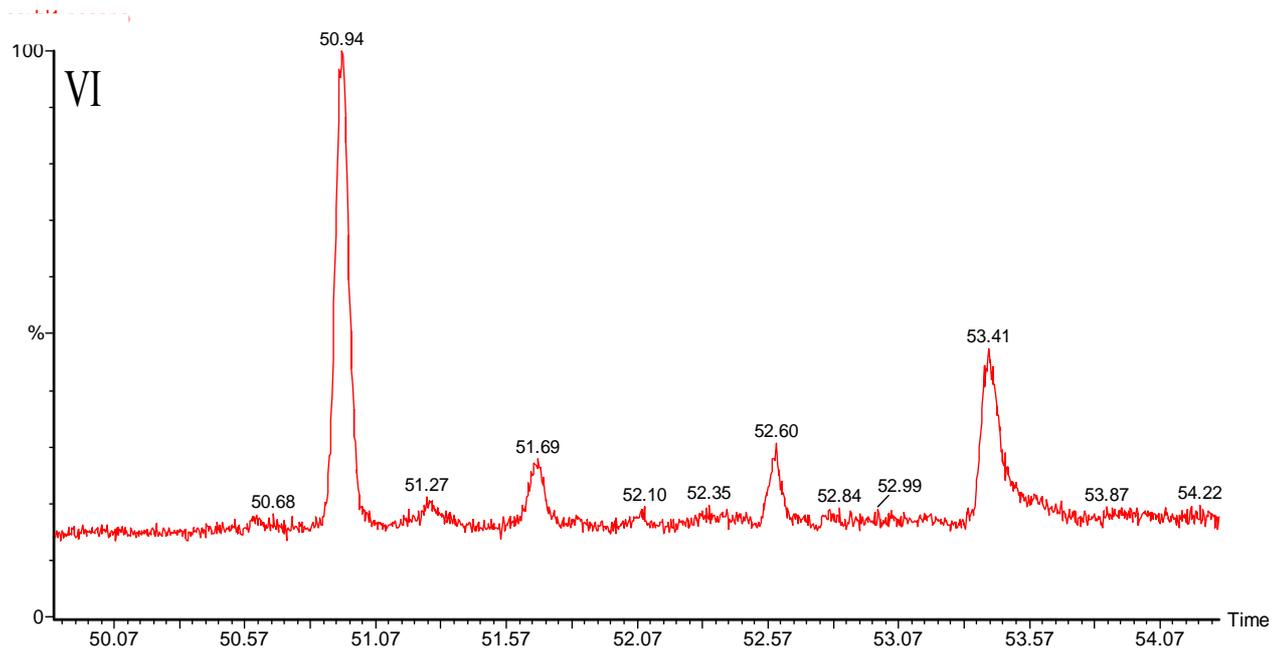
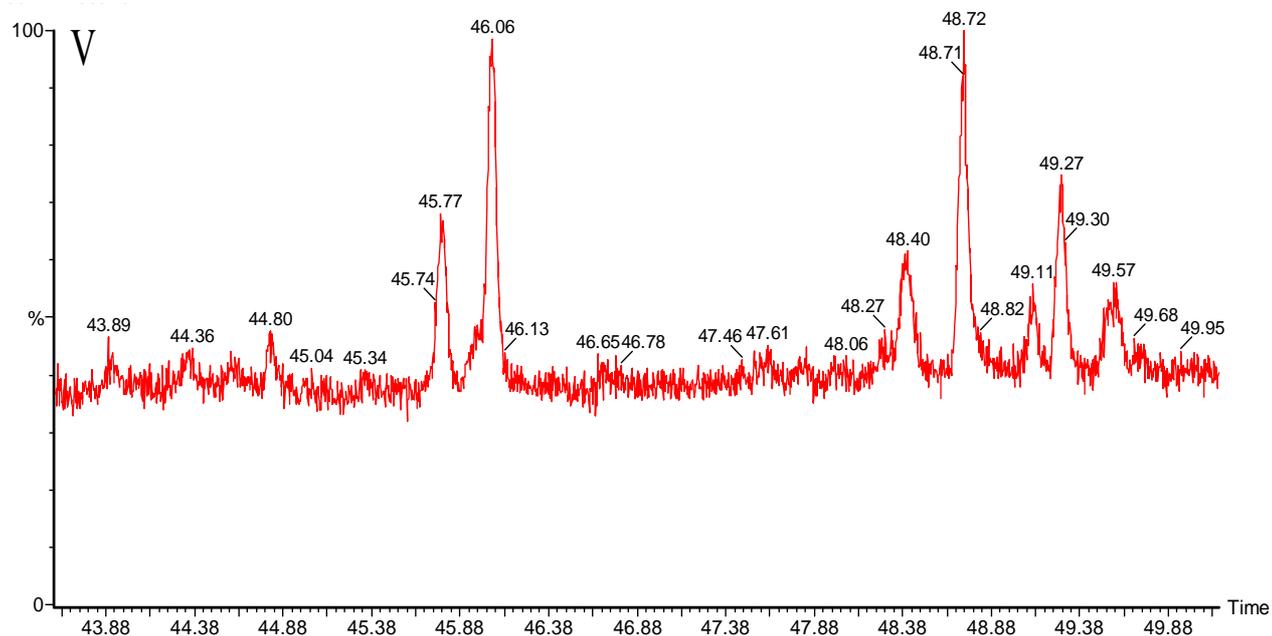
**Figura 5.4** Cromatogramma GC-MS dell'estratto organico ottenuto dopo estrazione soxhlet del suolo A



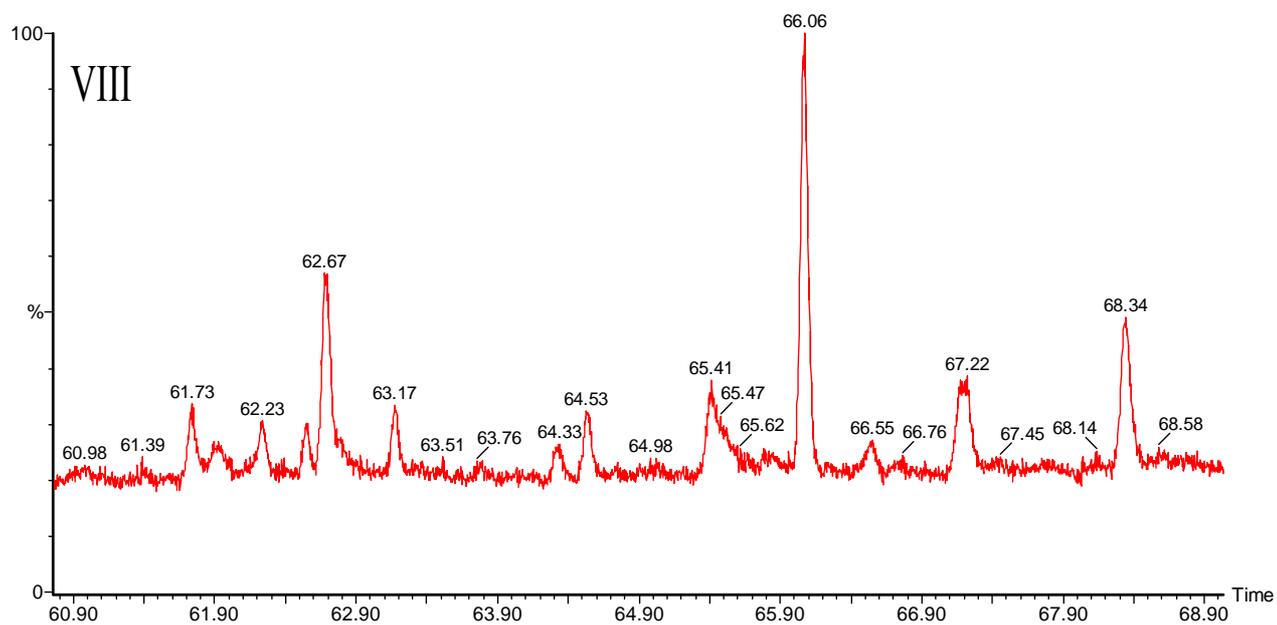
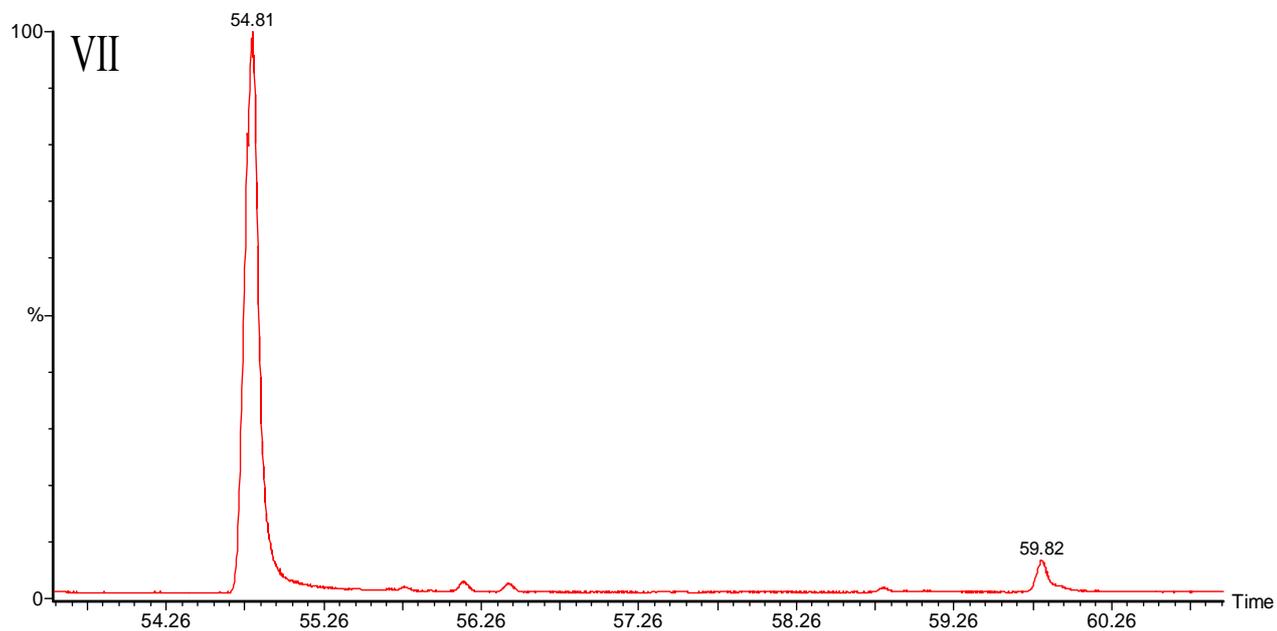
**Figura 5.5.** Cromatogrammi parziali (da 15.46 a 36.06 min) dell'estratto organico ottenuto dopo estrazione Soxhlet del suolo A. Per l'identificazione dei picchi e i relativi tempi di ritenzione si rimanda in tabella 5.2



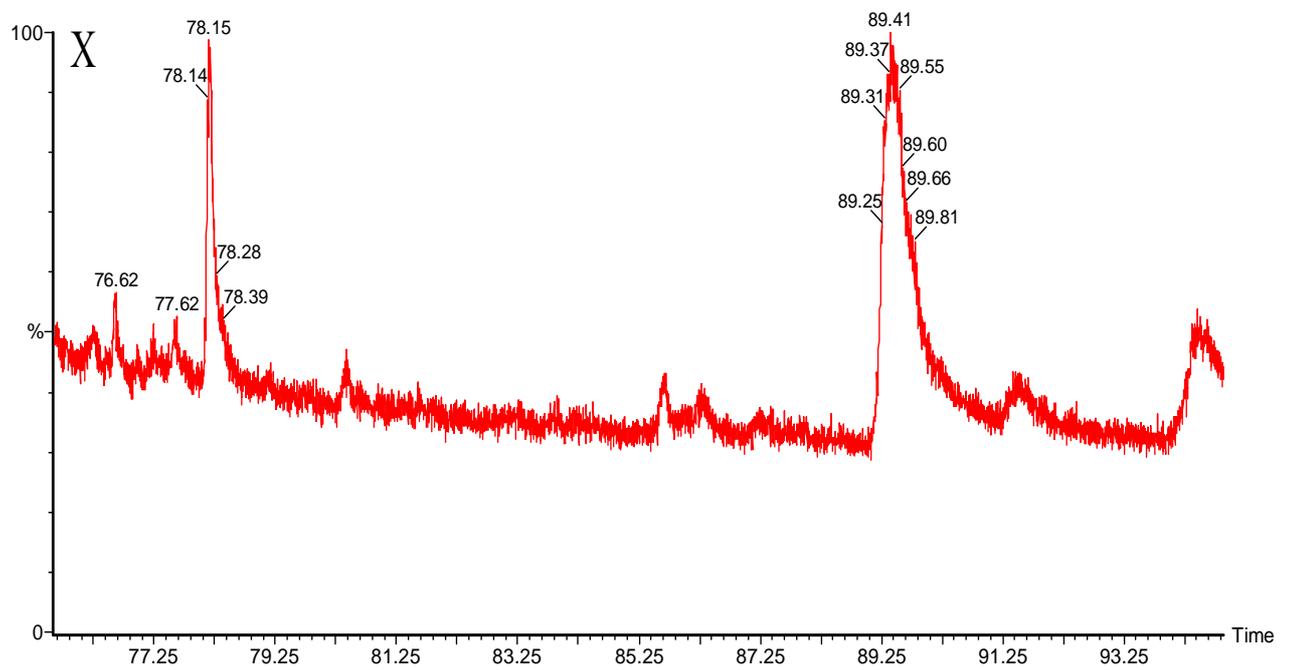
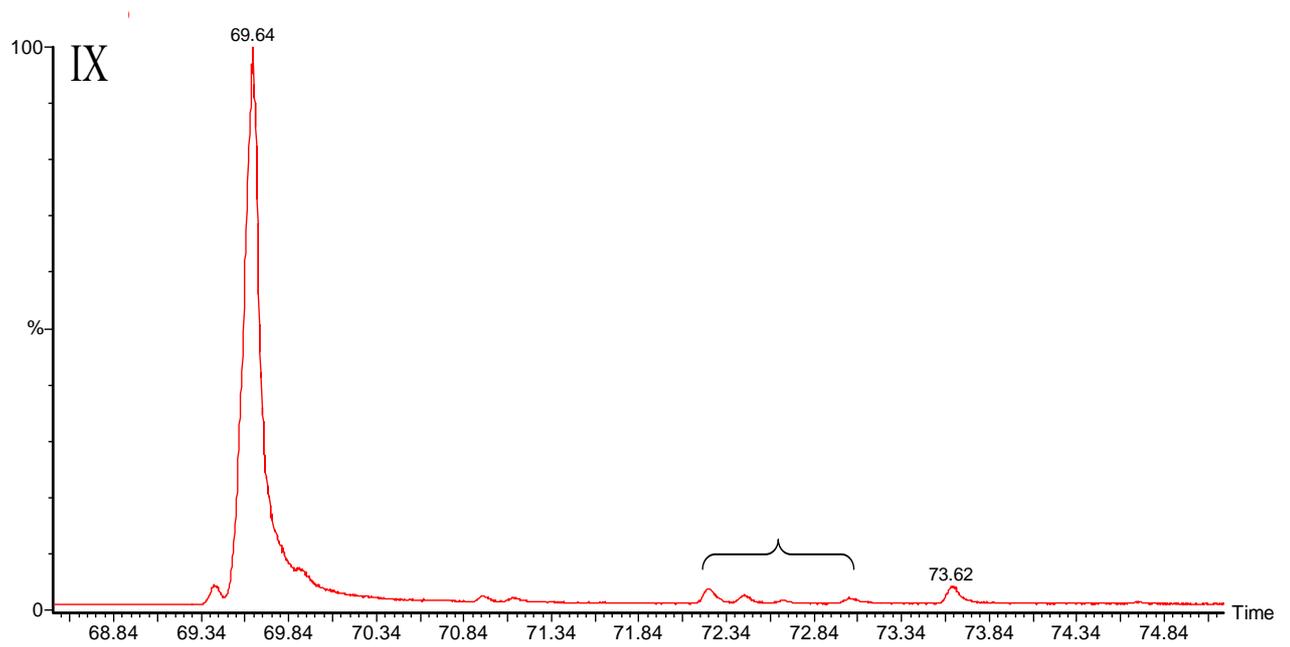
**Figura 5.6.** Cromatogrammi parziali (da 34.83 a 47.24 min) dell'estratto organico ottenuto dopo estrazione Soxhlet del suolo A



**Figura 5.7.** Cromatogrammi parziali (da 43.68 a 54.27 min) dell'estratto organico ottenuto dopo estrazione Soxhlet del suolo A



**Figura 5.8.** Cromatogrammi parziali (da 53.96 a 68.90 min) dell'estratto organico ottenuto dopo estrazione Soxhlet del suolo A



**Figura 5.9.** Cromatogrammi parziali (da 68.54 a 93.65 min) dell'estratto organico ottenuto dopo estrazione Soxhlet del suolo A

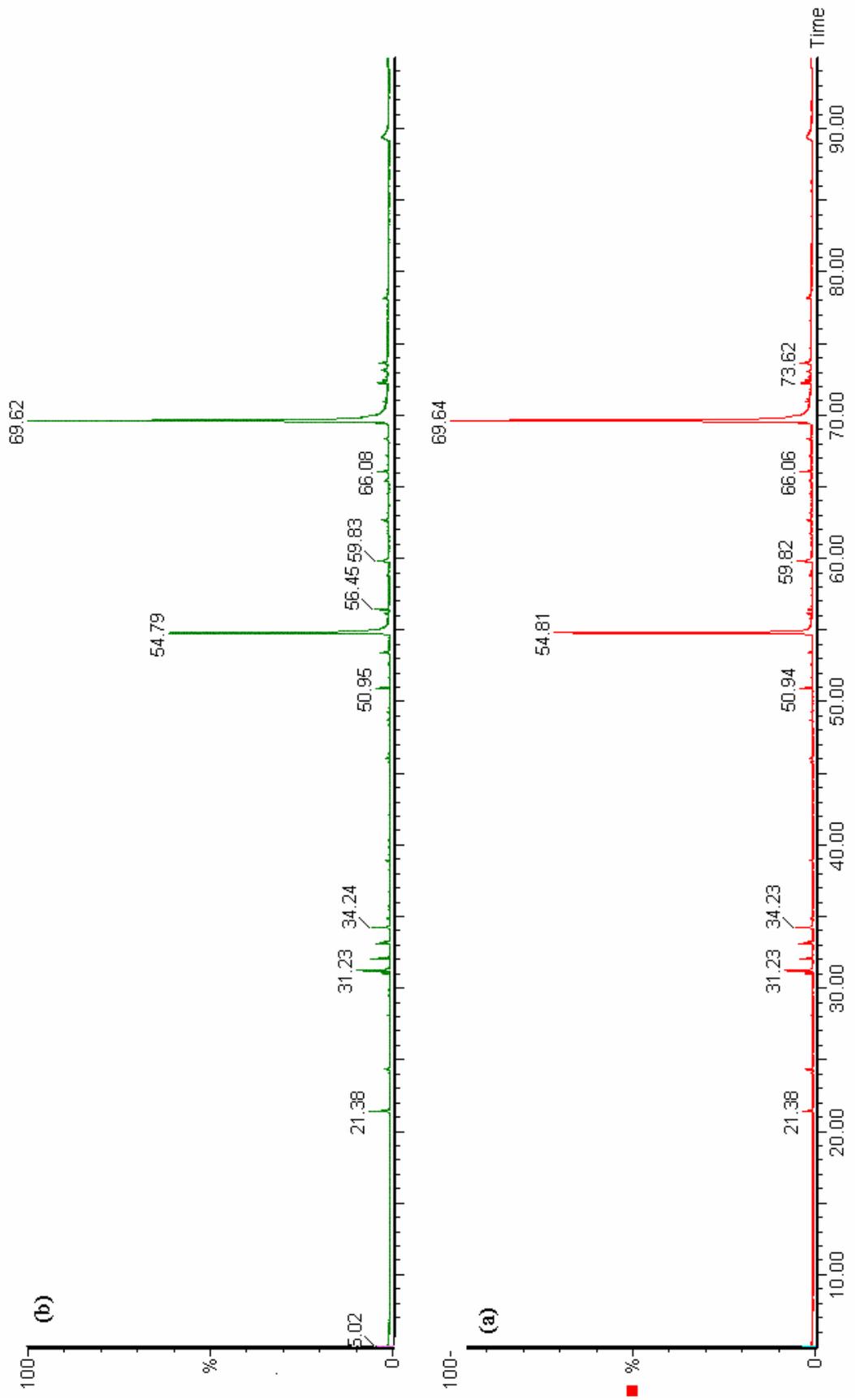


Figura 5.10 Cromatogrammi G-C-MS degli estratti ottenuti dopo estrazione Soxhlet (a) e sonicazione (b) del suolo A

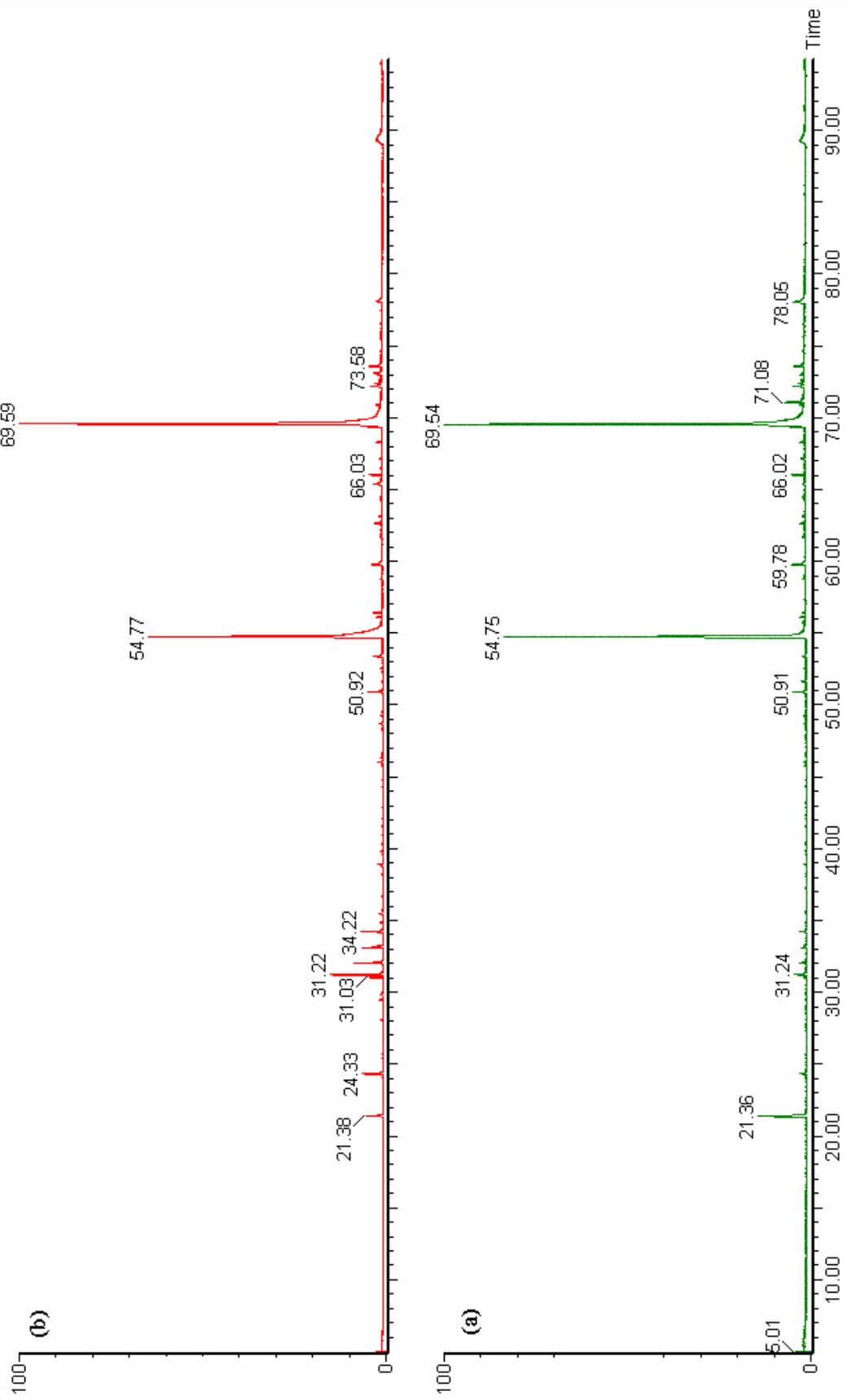


Figura 5.11 Cromatogrammi GC-MS degli estratti ottenuti dopo estrazione soxhlet (a) e sonicazione (b) del suolo B

**Tabella 5.2.** Tempi di ritenzione (min) e valori  $m/z$  degli ioni molecolari identificati mediante analisi GC-MS dell'estratto da suolo A

No.	Composto	Tempo di ritenzione (min)	$m/z$
01	Standard interno (Octafluoronaftalene)	21.38	272
02	Triclorobenzene	24.09	180
03	Naftalene	24,35	128
04	Tetraclorotiofene	28.08	228
05	3-cloro-2-metil-benzenammina	29.50	141
06	3-cloro-2-metil-benzenammina (isomero)	29.84	141
07	1,2,4,5-tetraclorobenzene	31.03	214
08	2,6-diclorobenzenammina	31.23	161
09	2,6-diclorobenzenammina (isomero)	32.05	161
10	1,2,3,4-tetraclorobenzene	33.11	214
11	bifenile	33.22	154
12	difeniletere	34.23	170
13	2,6,-dicloro-3-metilnilina	34.86	175
14	2,6-dicloro-benzenammina	35.48	161
15	3,4,5-triclorobenzenammina	35.71	195
16	1-cloro-4-(clorometilsulfonil)benzene	36.70	224
17	4,6-di (1,1-dimetil)etil-2-metilfenolo	38.84	220
18	pentaclorobenzene	38.93	248
19	4,cloro,1-naftalenolo	39.32	178
20	3,4,5-triclorobenzenammina	39.84	195
21	difenilsulfide	41.61	186
22	esaclorobenzene	46.06	284
23	difeniletere	46.32	170
24	fenantrene	48.71	178
25	2,3,4,5,6-pentacloroanilina	50.94	263
26	difenilsulfone	53.41	218
27	9,10 antracenedione	54.79	208
28	1-fenilmetil-naftalene	56.15	218
29	1-cloro-9,10-antracenedione	59.82	242
30	1metil-fluorantene	61.91	216
31	6-crisenolo	62.24	244
32	benzilbifenile	63.18	244
33	1-ammino-9,10 antracenedione	65.41	223
34	1H-indene, 1,1'-(1,2-etanedilene)	66.07	254
35	binaftalene	66.54	258
36	1-fenil nafto B tiofene	67.18	260
37	Crisene	68.33	228
38	1H-indene, 1,1'-(1,2-etanedilene)	69.41	254
39	7-H-Benzo[DE]-Antracen-7-one	69.61	230
40	1-(2-naftalenilmetil)-naftalene	70.96	268
41	1,1-metilenebis-naftalene	72.24	268
42	2,2-dinaftiletere	72.44	270
43	1,2-(naftalenilmetil)naftalene	72.67	268
44	9-fenil-antracene	73.04	254
45	1,2-(ossinaftalenil)naftalene	73.17	270
46	2-fenil-nafto[2,1B]tiofene	73.64	260
47	1.2 [BD]dinaftofurano	76.61	268
48	1.2 [BD]dinaftofurano(isomero)	78.17	268
49	binaftilsulfone	89.51	318

### 5.1.2 Effetto della tessitura sull'estrattibilità dei contaminanti organici

I risultati delle analisi quali-quantitative dei suoli A e B, hanno evidenziato che soxhlet e sonicazione fornivano una simile efficienza estrattiva dei contaminanti nel caso del suolo A, mentre, nel suolo B, la sonicazione ha consentito un maggior recupero di contaminanti rispetto alla soxhlet.

La diversa resa di estrazione ottenuta dai due metodi di estrazione tra i suoli A e B, oltre alle motivazioni già analizzate, può essere considerata principalmente una conseguenza della diversa tessitura dei suoli (Jastrow, 1996; Pefferkorn, 1997).

E' ampiamente accettato che la tessitura fine è il principale fattore responsabile dell'adsorbimento della sostanza organica alle sottili particelle di suolo colloidali, che favoriscono, in tal modo, l'associazione di micro in macroaggregati.

Tali aggregazioni, e in special modo i microaggregati, possono essere stabilizzate dall'associazione di composti organici idrofobici derivandone, pertanto un miglioramento della struttura del suolo (Jastrow, 1996; Pefferkorn, 1997; Piccolo & Mbagwu, 1999). La sostanza organica, mentre funge da collante naturale per gli aggregati del suolo, accrescendone la stabilità nei confronti dell'erosione, è, al tempo stesso, fisicamente protetta all'interno degli aggregati, con conseguente limitazione della disponibilità alla biodegradazione e all'azione solubilizzante di soluzioni di desorbenti chimici, quali i surfattanti.

L'energia prodotta dalle vibrazioni ultrasoniche, è in grado di frammentare gli aggregati del suolo aumentando la superficie, e dunque la materia organica adsorbita sulle componenti inorganiche del suolo, disponibile ad una successiva reattività chimica. In questo modo, la sostanza organica inglobata negli aggregati viene esposta al potere solubilizzante dei solventi utilizzati per

le estrazioni, consentendo la migliore resa di estrazione della sonicazione rispetto alla soxhlet (Tabella 5.1).

I risultati evidenziano, inoltre, la stessa efficienza di estrazione per i tiofeni per ambedue le tecniche, suggerendo che tali composti erano adsorbiti principalmente sulla superficie esterna degli aggregati. Quindi, limitatamente a questi composti non vi è il vantaggio di estrazione ottenibile con la disaggregazione del suolo per via ultrasonica.

## **5.2 Lavaggio chimico con tensioattivi**

### **5.2.1 Capacità solubilizzante dei surfattanti**

I risultati delle diverse prove effettuate per valutare l'efficienza estrattiva dei contaminanti organici attraverso l'uso di soluzioni dei tensioattivi sintetici (SDS e TX-100), e di tensioattivi naturali, quali le sostanze umiche (HA), e acqua Milli-Q, per i due suoli A e B, estratti mediante soxhlet e sonicazione, sono mostrati in figura 5.3 e in figura 5.4.

In generale, si evidenzia che, dopo i vari trattamenti di lavaggio con acqua Milli-Q, SDS, Triton X-100, il suolo A viene estratto più efficacemente per sonicazione che per soxhlet.

In particolare, per le prove condotte utilizzando solo acqua Milli-Q i risultati mostrano una bassa capacità di rimozione dei contaminanti dal suolo A sia per Soxhlet che per sonicazione. Il lavaggio con sola acqua risulta più efficiente nel recupero di contaminanti dal suolo B, soprattutto per la tecnica di sonicazione.

Le soluzioni di lavaggio con surfattanti sintetici (SDS e TX-100) o naturali (HA) hanno consentito un recupero significativamente maggiore dei

contaminanti (Figura 5.3 e 5.4). In generale, i risultati indicano che le soluzioni di tensioattivi sintetici qui usate sono in grado di rimuovere più dell'80% di contaminanti, confermando precedenti rapporti di letteratura (Chefetz *et al.*, 2000; Holman *et al.*, 2002; Kim and Lee, 2002).

Questo lavoro indica, inoltre, che sistemi micellari di surfattanti ionici naturali, quali le sostanze umiche (HA), consentono un recupero di contaminanti dai suoli inquinati comparabile a quello ottenuto mediante i surfattanti sintetici (Figura 5.3 e 5.4). In particolare, per il suolo B, l'uso della soluzione umica consente la massima rimozione dei contaminanti organici (73%).

La differenza di capacità estrattiva tra i due suoli, per quanto poco significativa nel caso del lavaggio con la soluzione umica, può essere attribuita alla diversa idrofobicità dei composti organici presenti nel suolo B.

Infatti, mentre l'eterogeneità delle sostanze umiche consente loro di solubilizzare con la stessa efficienza, nei suoli A e B, contaminanti a diverso grado di idrofobicità, nel caso del suolo B, la presenza di contaminanti organici più polari, giustifica il maggior recupero di contaminanti ottenuto anche mediante lavaggio con sola acqua Milli-Q (65%).

Un'altra possibile spiegazione può essere ricercata in un processo di aggregazione delle particelle di suolo in acqua nel suolo più finemente tessiturato (Oades and Waters, 1991; Christensen, 1992; Puget *et al.*, 2000), determinando una diminuzione della resa di estrazione dei contaminanti ottenuta con l'estrazione soxhlet.

Figura 5.3. Valori totali ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) dei contaminanti estratti nel suolo A tal quale, dopo lavaggio (SW) con  $\text{H}_2\text{O}$ , SDS, TX100 e soluzione di acido umico (HA).

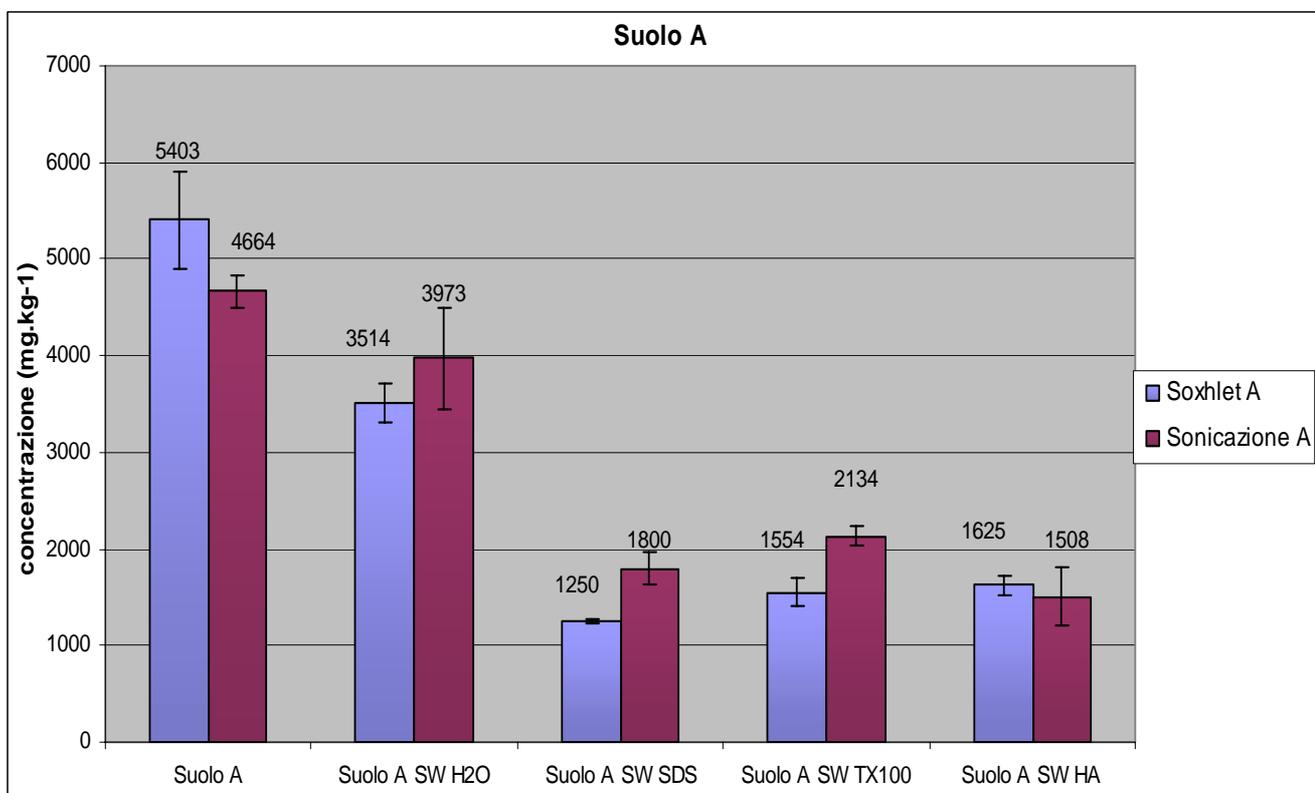
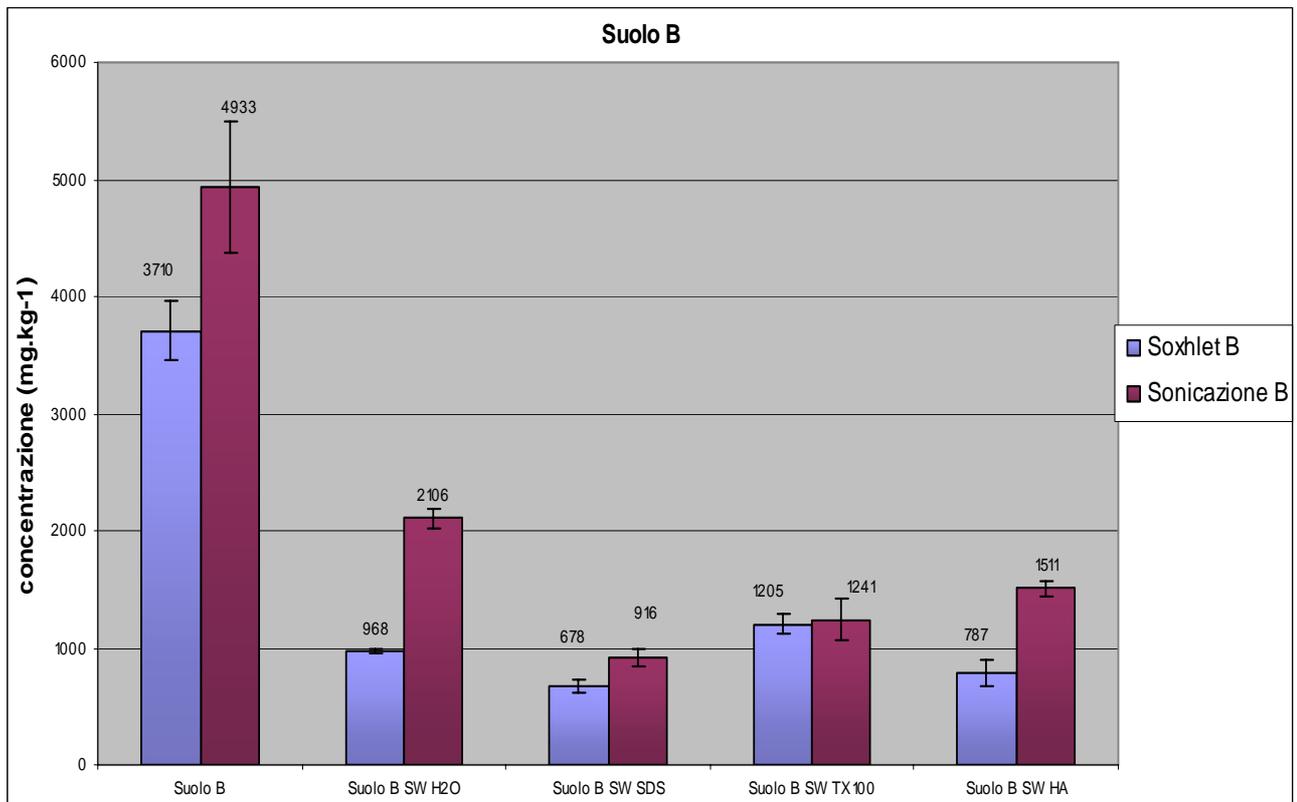


Figura 5.4. Valori totali ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) dei contaminanti estratti nel suolo B tal quale, dopo lavaggio (SW) con  $\text{H}_2\text{O}$ , SDS, TX100 e soluzione di acido umico (HA).



### 5.2.2 Effetto della tessitura sull'efficienza estrattiva dei surfattanti

La tabella 5.3 mostra i valori totali di concentrazione per le diverse classi di contaminanti estratte dal suolo A mediante soxhlet e sonicazione dopo i vari trattamenti di lavaggio.

La migliore efficienza di estrazione ottenuta con la sonicazione, nel suolo A, si può spiegare considerando che durante i lavaggi si formano degli aggregati di suolo che intrappolano i contaminanti e non ne consentono, pertanto, un'efficiente estrazione mediante soxhlet.

In realtà, il lavaggio del suolo (SW) può influenzare la gerarchia strutturale del suolo determinando una ridistribuzione delle dimensioni degli aggregati (Kemper & Rosenau, 1986). Tale effetto non è influente sull'estrazione condotta mediante sonicazione, poiché l'intensa energia delle onde ultrasoniche, consente una alterazione accentuata degli aggregati neoformati. Tuttavia, non si evidenzia nessuna significativa differenza nei valori totali di concentrazione dei PAH, bifenili, dei composti aromatici alogenati e nitrogenati, tiofeni e sulfoni sia quando estratti mediante sonicazione sia mediante soxhlet dopo lavaggio del suolo A con H<sub>2</sub>O Milli-Q (tabella 5.3 ). L'acqua, infatti, al contrario dei surfattanti, per la predominante tessitura sabbiosa del suolo A, non ha prodotto ulteriore aggregazione tale da influenzare l'estrazione dei contaminanti.

Inoltre, i dati riportati in tabella 5.3 mostrano anche che l'efficienza estrattiva delle due tipologie di estrazione è la stessa dopo che il suolo A è stato sottoposto a lavaggio con acido umico esogeno (HA). Tale surfattante naturale, infatti, rispetto ai surfattanti sintetici, l'SDS e il TX-100, consente una migliore dispersione del suolo, e, quindi, una più vantaggiosa solubilizzazione dei contaminanti mediante la soluzione di lavaggio. Il residuo di suolo dopo lavaggio con HA consente, nel suolo A, un recupero simile di contaminanti sia per soxhlet che per sonicazione.

L'effetto ottenuto prima e dopo il trattamento di lavaggio con acido umico su suolo A e successiva estrazione soxhlet, si può osservare nei cromatogrammi di figura 5.12. Nel caso del suolo B, il contenuto di frazione tessiturale fine determina una maggiore tendenza a formare aggregati e, perciò, influenza la resa di estrazione dei contaminanti, che, in generale, risulta più elevata quando ottenuta mediante sonicazione (Tabella 5.4).

La stessa tessitura consente di spiegare il diverso comportamento del suolo B quando si considera il contenuto totale di contaminanti dopo i vari trattamenti di lavaggio. Relativamente a ciò, dal confronto tra il suolo A e il suolo B si ricava che il suolo A contiene in media più contaminanti rispetto al suolo B dopo i vari lavaggi. Infatti, dopo lavaggio sia con HA sia con le altre soluzioni, l'estrazione per sonicazione consente un recupero maggiore di contaminanti nel suolo B, poiché gli aggregati già presenti nel suolo consentono una migliore solubilizzazione e rimozione dei contaminanti presenti.

I surfattanti di natura idrofobica siano essi naturali o sintetici possono aumentare la stabilità strutturale del suolo per l'azione aggregante che essi stessi possono esercitare sulle particelle di suolo (Piccolo & Mbagwu, 1999), influenzando, pertanto, i fenomeni solubilizzazione in relazione alla specifica struttura chimica dei contaminanti.

Ad esempio, alcuni surfattanti si sono mostrati più efficienti nella rimozione di alcuni tipi di contaminanti. La rimozione degli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) nel suolo A da parte dell' SDS è più efficiente per ultrasonificazione che per soxhlet (Tabella 5.3). Viceversa, nel suolo A, la soxhlet consente un maggior recupero di contaminanti polari non acidi (tiofeni, bifenili, composti monoaromatici alogenati e nitrogenati).

Per Despande *et al.*, (1999), i surfattanti non ionici con bassi valori di HLB hanno mostrato una più alta capacità di solubilizzazione verso gli IPA. Nel caso del suolo A, solo l'estrazione mediante sonicazione, dopo lavaggio con

un surfattante non ionico, come il TX-100, fornisce un maggior recupero di contaminanti idrofobici (IPA e sulfoni), mentre la soxhlet permette di estrarre tiofeni e bifenili con maggiore efficienza (Tabella 5.3).

Una possibile spiegazione di questo fenomeno può essere riferita a fenomeni di riaggregazione delle particelle di suolo dopo il lavaggio con surfattanti e a una diversa distribuzione dei contaminanti sulla superficie interna o esterna dei nuovi aggregati.

Il trattamento di lavaggio con HA consente, per le proprietà surfattanti dell'acido umico, una migliore dispersione del suolo, determinando così la solubilizzazione di contaminanti di diversa natura e consentendo buone rese di estrazione per soxhlet, in particolare nel suolo B.

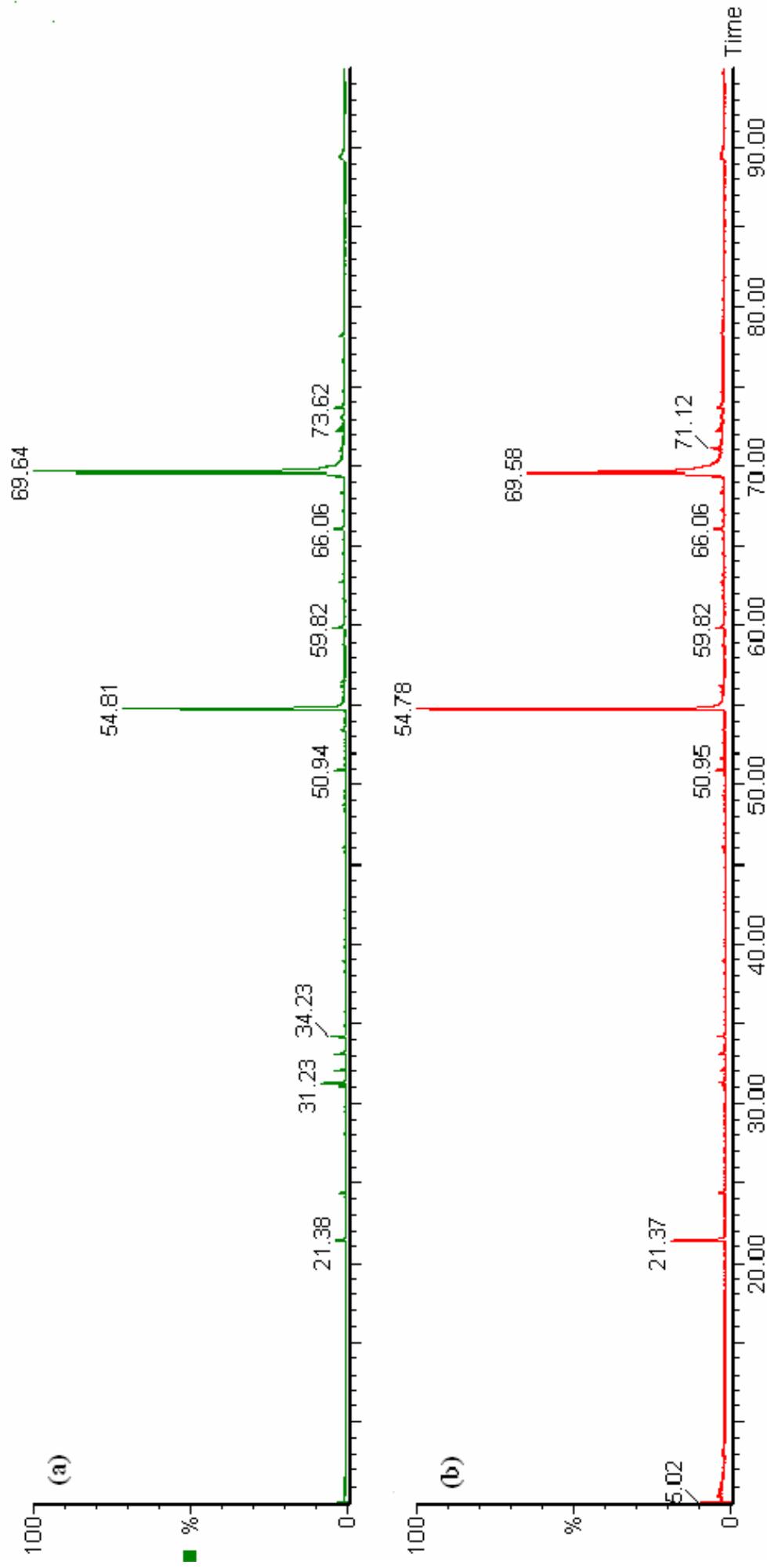
Infatti, al contrario di quanto ottenuto dal lavaggio con SDS e TX-100, nel suolo A, il trattamento con acido umico (HA), consente un recupero simile degli IPA sia con la soxhlet che con la sonicazione (Tabella 5.3), benché inferiore rispetto al suolo B. Questo comportamento può essere attribuito alla maggiore eterogeneità delle sostanze umiche rispetto ai surfattanti sintetici e quindi alla loro capacità di solubilizzare, per ripartizione nei domini idrofobici, con la stessa efficienza idrocarburi policiclici aromatici di diversa struttura molecolare (Fava & Piccolo, 2002).

Ciò nonostante, la sonicazione, ha permesso di estrarre dal suolo A una maggiore quantità di composti monoaromatici alogenati e nitrogenati e di bifenili rispetto alla soxhlet, mentre quest'ultima ha consentito un più elevata rimozione di tiofeni (Tabella 5.3).

La tendenza generale osservata per il suolo B di una maggiore efficienza estrattiva della sonicazione rispetto alla soxhlet, dopo tutte le varie procedure di lavaggio, può essere attribuita alla tessitura più fine del suolo B (Tabella 5.4). Con l'eccezione del lavaggio con TX-100, ciò ha permesso di estrarre per sonicazione dal suolo B, lavato con i surfattanti, una maggiore quantità di idrocarburi policiclici aromatici (Tabella 5.4). Nel suolo B, i risultati

evidenziano un'efficiente rimozione dei trattamenti di lavaggio anche dei sulfoni, sia per Soxhlet che per sonicazione (Tabella 5.4).

In generale, anche gli altri contaminanti del suolo B sottoposto ai trattamenti di lavaggio sono stati estratti con maggiore efficienza mediante sonicazione. Ciò può essere attribuito nuovamente alla maggiore stabilità strutturale di questo suolo, che quando sottoposto all'energia prodotta dalle vibrazioni ultrasoniche, ha permesso l'accesso delle soluzioni estraenti ai contaminanti adsorbiti all'interno degli aggregati e consentendone, quindi, una migliore solubilizzazione. L'apparente minore efficienza di rimozione mostrata dai surfattanti nel caso del suolo B, quando estratto per ultrasonificazione, rivela, in realtà, soltanto la migliore efficienza di estrazione ottenuta con questa tecnica, in particolare nel suolo a tessitura fine.



**Figura 5.12** Cromatogrammi GC-MS degli estratti organici ottenuti prima(a) e dopo (b) trattamento di lavaggio con la soluzione unica e successiva estrazione soxhlet del suolo A



**Figura 5.3.** Valori totali ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) delle principali classi di contaminanti estratte dal suolo A con soxhlet e sonicazione dopo lavaggio di suolo(SW) con  $\text{H}_2\text{O}$ , SDS, TX100 e HA.

Contaminanti	Soxhlet SW- $\text{H}_2\text{O}$	Sonicazione SW- $\text{H}_2\text{O}$	Soxhlet SW-SDS	Sonicazione SW-SDS	Soxhlet SW- TX100	Sonicazione SW-TX100	Soxhlet SW-HA	Sonicazione SW-HA
IPA	3071±185	3607±482	1033±16	1639±158	1366±92	1944±73	1411±83	1318±286
Composti monoaromatici alogenati e nitrogenati	167±10	172±18	95±4	75±9	93±7	87±11	60±4	83±7
Tiofeni	6±1	23±4	11±1	0	15±1	9±2	11±1	2±1
Solfoni	175±4	103±5	51±1	53±4	40±3	65±3	56±2	45±7
Bifenili	43±2	27±6	33±1	10±1	17±1	6±1	16±1	31±2
Altro	52±2	41±6	27±1	23±3	23±34	23±4	71±3	29±4

**Tabella 5.4.** Valori totali ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) delle principali classi di contaminanti estratte dal suolo B con soxhlet e sonicazione dopo lavaggio di suolo (SW) con  $\text{H}_2\text{O}$ , SDS, TX100 e HA.

Contaminanti	Soxhlet SW- $\text{H}_2\text{O}$	Sonicazione SW- $\text{H}_2\text{O}$	Soxhlet SW-SDS	Sonicazione SW-SDS	Soxhlet SW- TX100	Sonicazione SW-TX100	Soxhlet SW-HA	Sonicazione SW-HA
IPA	419±5	1340±20	338±29	496±43	600±41	583±109	340±25	666±33
Composti monoaromatici alogenati e idrogenati	67±3	102±4	54±4	44±6	62±4	30±2	18±6	66±3
Tiofeni	421±9	563±50	233±22	282±20	485±29	591±60	396±68	691±18
Solfoni	35±1	71±2	27±1	71±7	32±3	28±2	17±7	50±8
Bifenili	11±1	16±1	9±1	8±1	11±1	6±1	0	10±2
Altri	15±1	14±1	17±1	15±3	15±1	3±1	16±2	28±1

### 5.2.3 Lavaggio del suolo A con acido umico

La tabella 5.5 riporta i valori totali di concentrazione determinati sul residuo di suolo A dopo trattamento con tre cicli successivi di lavaggio con la soluzione umica ed ulteriore estrazione soxhlet dopo un'unica fase di essiccamento in stufa. In particolare, sono riportate le rese medie di estrazione e le relative deviazioni standard ottenute dopo tale prova rispetto a quella conseguita mediante un solo ciclo di lavaggio con acido umico.

I risultati indicano una capacità di rimozione dei composti inquinanti simile per entrambi i cicli di lavaggio effettuati, con una percentuale di rimozione pari a circa il 70% .

Nel processo a più cicli di lavaggio, la concentrazione residua  $C$  di contaminanti dopo  $n$  cicli risulta esprimibile mediante una funzione esponenziale del tipo:

$$C_n (\text{mg.kg}^{-1}) = a \exp (-b_n)$$

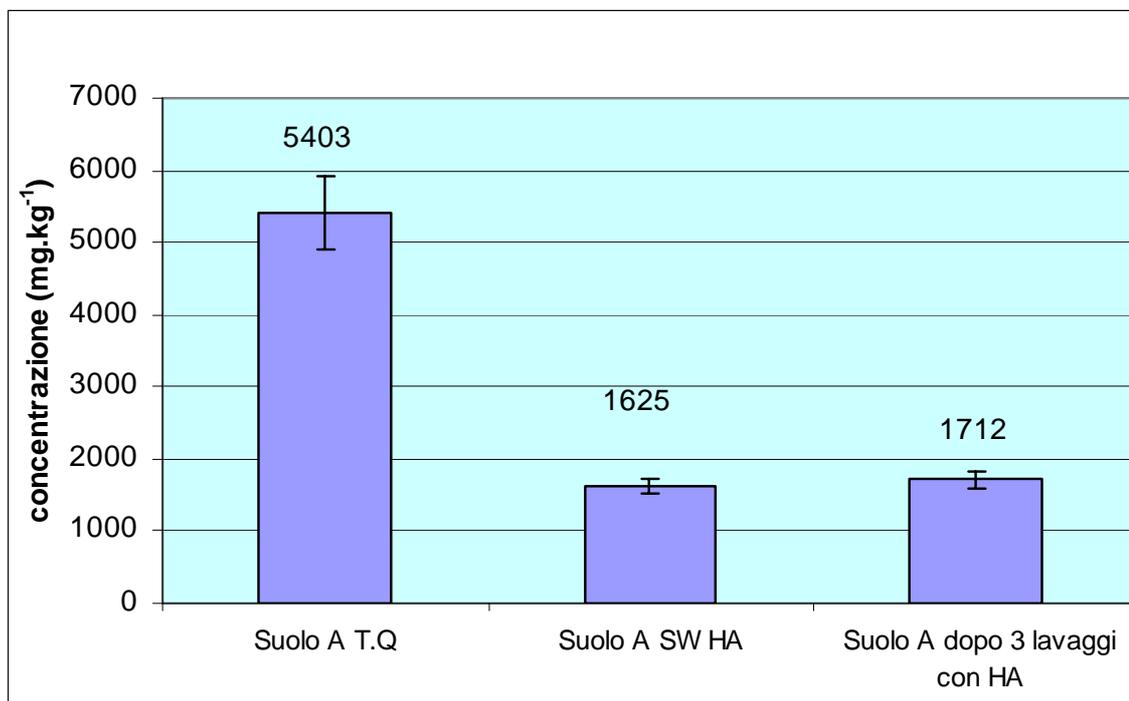
dove  $a$  è la concentrazione all'avvio del trattamento e  $b$  è una costante caratteristica del composto, fissata per una determinata matrice trattata nelle specifiche condizioni di processo (Saponaro *et al.*, 2002).

Risultando l'efficienza di rimozione chimica di ciascun inquinante nel ciclo  $n$  indipendente da  $n$  e dalla concentrazione in ingresso al ciclo di estrazione stesso, l'efficienza complessiva  $E_n$  (%) di rimozione chimica ottenuta dopo  $n$  cicli di trattamento è risultata anch'essa indipendente dalla concentrazione iniziale e, quindi, per tale studio, corrispondente a quella ottenuta con un solo ciclo di lavaggio (figura 5.5).

Nel caso del campione di suolo ACNA altamente inquinato, tale risultato conferma l'efficienza di estrazione ottenibile impiegando la soluzione umica in un solo trattamento di lavaggio.

**Tabella 5.5:** Rese medie di estrazione ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) ed errore standard dopo uno e tre cicli di lavaggio del suolo A con acido umico (HA) e successiva estrazione soxhlet.

Suolo A non trattato	5403 $\pm$ 509
Suolo A dopo 1 lavaggio con HA	1625 $\pm$ 95
Suolo A dopo 3 lavaggi con HA	1712 $\pm$ 120



**Figura 5.13.** Contenuto ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) di contaminanti totali nel suolo A dopo uno e tre cicli di lavaggio con acido umico(HA).

### 5.3. Sistema catalitico biomimetico

#### 5.3.1. Copolimerizzazione ossidativa dei contaminanti in acido umico catalizzata da ferro-porfirina.

Numerosi studi hanno evidenziato la possibilità di polimerizzare inquinanti come i clorofenoli e l'anilina in oligomeri (Bollag, 1992; Kim *et al.*, 1997; Itoh *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 1999; Fukushima *et al.*, 2003) che risulterebbero meno tossici per l'ambiente. Queste prove sono state condotte utilizzando enzimi di natura ossidativa come le laccasi o le perossidasi, enzimi presenti nel suolo. I risultati mostrano che i catalizzatori enzimatici sono coinvolti in un meccanismo di accoppiamento ossidativo attraverso formazione di radicali liberi.

La letteratura (Morimoto & Tatsumi, 1997; Fukushima & Tatsumi, 2001) suggerisce che, nelle reazioni ossidative basate su intermedi radicalici (ad es. enzimatiche, Fenton e ossidazioni  $MnO_2$ ), la rimozione dei contaminanti può essere aumentata o inibita in presenza di sostanze umiche. Il comportamento inibente può essere attribuito alle proprietà riducenti delle sostanze umiche capaci di disattivare le specie ossigeno-attive che agiscono da forti ossidanti nei confronti dei contaminanti organici (Klausen *et al.*, 1997). Al contrario, l'aumento della reattività può essere attribuito all'accoppiamento dei radicali liberi formati sui contaminanti organici con quelle presenti sulle sostanze umiche (Morimoto & Tatsumi, 1997; Fukushima & Tatsumi, 2001). Fukushima *et al.* (2003) riportano, inoltre, che le sostanze umiche possono e influenzare la rimozione dei contaminanti organici anche in reazioni di accoppiamento ossidativo catalizzate da metallo-porfirine.

Tuttavia, nessuna prova è stata finora effettuata circa l'effetto di metalloporfirine sul una reazione di copolimerizzazione ossidativa che

coinvolga inquinanti di diversa natura chimica presenti contemporaneamente in un suolo ed in presenza di un acido umico esogeno.

Le figure 5.13 e 5.14 mostrano, a titolo esemplificativo, i cromatogrammi relativi al suolo A prima e dopo trattamento con: 1. sistema catalizzatore (FePha) più ossidante ( $H_2O_2$ ), e, 2: con la stessa miscela di reazione ma aggiunta successivamente ad un trattamento con acido umico esogeno.

Per la prova 1 (Figura 5.13), si nota che il profilo del cromatogramma (TIC) risulta notevolmente variato, sia nel numero che nell'intensità dei picchi cromatografici, rispetto al controllo del suolo non trattato.

In particolare, i picchi corrispondenti ai composti monoaromatici alogenati e nitrogenati (clorobenzeni e cloroaniline) presenti nel cromatogramma del suolo controllo scompaiono completamente in quello trattato, mentre persistono, in parte, i segnali presenti nella regione del cromatogramma compresa tra 50.94 e 89.40 min, anche se poco significativi da un punto di vista quantitativo, mentre, i picchi, rilevati a 53.69 e 69.45 min, ascrivibili ai prodotti di degradazione dell'antracene, sono sempre visibili, seppure con aree lievemente inferiori rispetto al controllo.

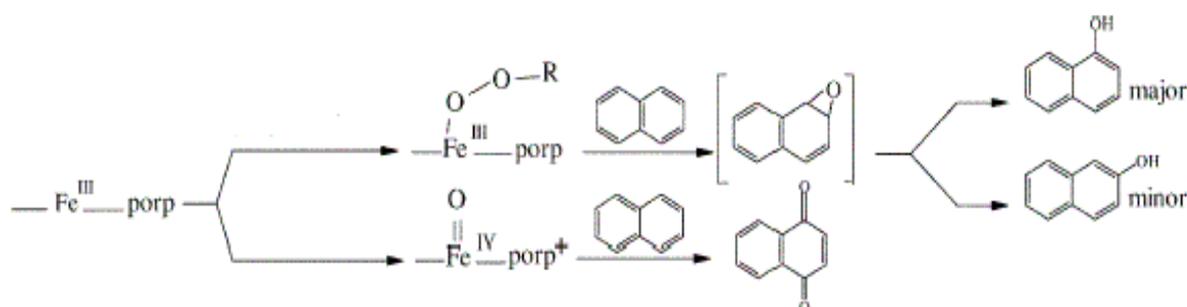
Risultati analoghi si osservano per il trattamento con FePha- $H_2O_2$ , preceduto da lavaggio con acido umico (Figura 5.14). Tuttavia, in quest'ultimo anche le aree dei picchi relativi al 9,10-antracenedione e del 7[H]-benzo[DE]antracen-7-one presentano una più significativa diminuzione rispetto al controllo, suggerendo che l'attività catalitica della ferroporfirina idrosolubile, usata in questo studio, è migliorata dalla presenza di sostanze umiche.

Si ritiene che il possibile meccanismo di azione della ferroporfirina richieda la presenza di un donatore d'ossigeno per produrre una specie oxo-ferro ad alta valenza che diventa un attivo ossidante dei contaminanti. Come avviene nel caso dei catalizzatori biotici, i composti ossidati possono essere sottoposti ad ulteriore accoppiamento mediante un meccanismo di tipo radicalico.

L'ossidazione di substrati organici mediante uso di complessi ferro(III)-porfirinici come catalizzatori è stata studiata con particolare riguardo all'ossidazione di composti organici clorurati (Labat *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1999). In particolare, nel ciclo catalitico (Schema 1(a))(Sheldon, 1994), la specie attiva ossidante per il substrato organico, prodotta in presenza di perossido d'idrogeno come attivatore, è un radicale cationico oxo-ferro(IV)-porfirinico ( $\text{Por}^{\bullet}\text{-Fe(IV)=O}$ ) e, di conseguenza, la riduzione di quest'ultimo, a spese del substrato AH, produce  $\text{Por-Fe(IV)=O}$  e una specie radicalica derivata dal substrato ( $\text{A}^{\bullet}$ ) in seguito alla rottura del legame non stabile perossi O-O del perossicomposto. Il trasferimento di un secondo elettrone dal substrato alla  $\text{Por-Fe(IV)=O}$  segna il ritorno della  $\text{Por-Fe(III)}$  allo stato iniziale, mentre le specie radicaliche  $\text{A}^{\bullet}$  possono essere sottoposte a reazioni di accoppiamento in molecole di maggiori dimensioni mediante la formazione di nuovi e più stabili legami covalenti del tipo C-O-C o C-C.

Lo schema 2 illustra la reazione di ossidazione del naftalene in presenza dell'agente ossidante catalizzata da ferroporfirina, che può portare alla formazione diretta di 1,4 naftochinone o di 1- naftolo e 2-naftolo.

Questi risultati sono in accordo con il precedente meccanismo proposto per l'ossidazione di poliaromatici mediante intermedi radicali.



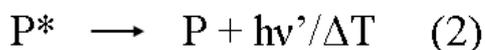
**Schema 2.** Rappresentazione schematica di ossidazione del naftalene in presenza di Fe(III)porfirina.

Studi recenti di fotocatalisi (Maldotti *et al.*, 1996; Suslik & Watson, 1992; Fukushima *et al.*, 2003) hanno dimostrato che i complessi Fe(III)porfirinici sono capaci di catalizzare l'ossidazione di substrati organici anche in presenza di luce.

L'assorbimento della luce causa un trasferimento elettronico intramolecolare che porta alla formazione di un intermedio reattivo(1) con la conseguente rottura omolitica del complesso Fe(III)L (Schema (b))



Come risultato, la fotoeccitazione ( $\lambda=300-400\text{nm}$ ) causa l'ossidazione e il distacco del ligando assiale come specie radicale e la riduzione del Fe(III) a Fe(II). Quest'ultimo può coordinare l'O<sub>2</sub>, proveniente probabilmente dall'acqua, che è ridotto ad anione superossido, rigenerando Fe(III)P. La rottura del legame perossi O-O degli instabili perossicomposti, porta alla formazione di composti radicali che, a loro volta, possono essere infine polimerizzati alla sostanza umica. La sequenza di reazioni avviene, anche in questo caso, secondo un processo ciclico, la cui efficienza dipende dalla possibilità che il fotocatalizzatore reagisca prima che sopraggiunga la sua disattivazione (2).



Visto sotto questo aspetto, la possibilità di inattivare contaminanti organici in presenza di luce, può permettere al catalizzatore ferroporfirinico, di continuare la sua azione nel tempo anche quando l'azione dell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sia terminata, giustificando maggiormente il suo utilizzo, mediante un contesto più realistico di sperimentazione, per un successivo processo di bonifica su larga scala.

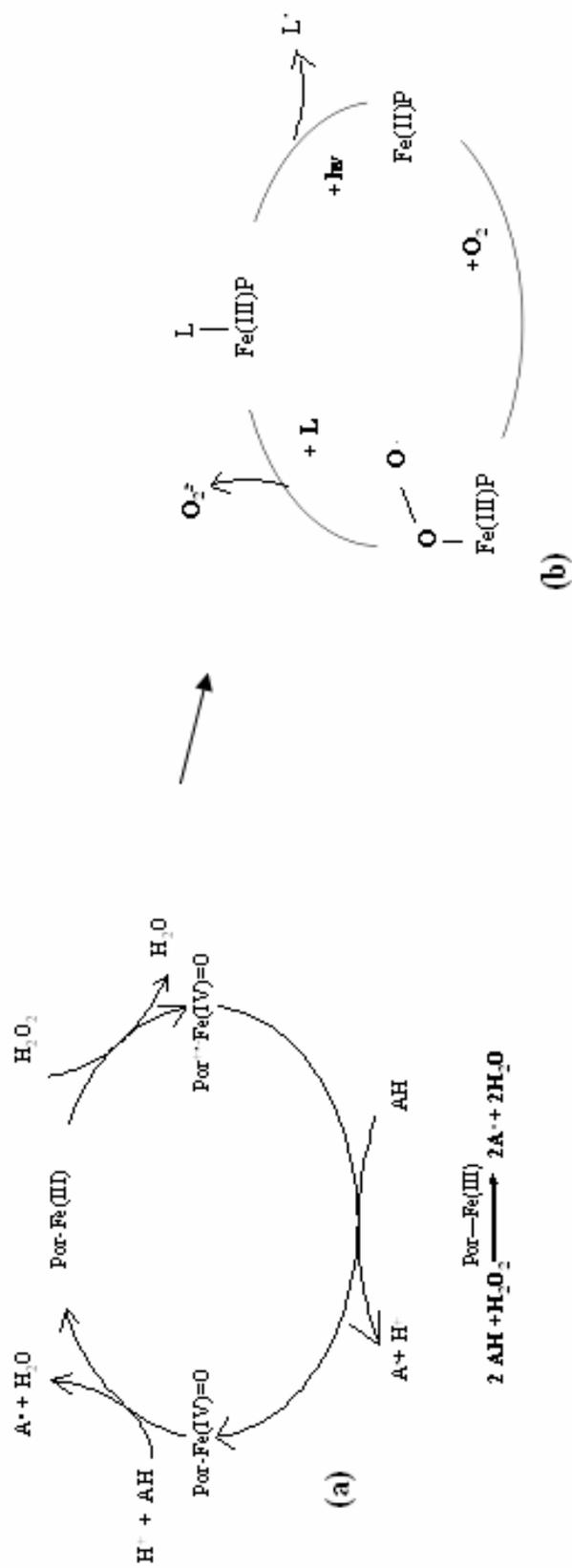
Lo schema 1(a) e (b) illustra il possibile meccanismo di azione della Fe(III)P in relazione alla disponibilità del tipo di attivatore.

I risultati qui presentati sono confermati da recenti studi di pirolisi-GC/MS e  $^{13}\text{C}$  NMR che hanno mostrato l'esistenza del legame covalente tra intermedi di composti clorurati, come i radicali clorofenossi, e le frazioni umiche (Fukushima et al., 2003). In particolare, l'aggiunta di sostanze umiche con un basso grado di umificazione al sistema catalitico Por-Fe(III), ha determinato la scomparsa di dimeri e di circa il 60% del cloro rilasciato dal pentaclorofenolo (PCP) trovato poi nelle frazioni umiche dopo la reazione, suggerendo che gli intermedi clorurati sono stati incorporati covalentemente alle sostanze umiche o ai loro precursori. La natura del legame covalente è stata studiata mediante l'esame dei picchi mostrati negli spettri  $^{13}\text{C}$  NMR delle frazioni umiche che cadono nelle regioni dei legami C-C e C-O a conferma dell'avvenuta polimerizzazione. In tale studio (Fukushima *et al.*, 2003), l'efficacia del sistema catalitico biomimetico in presenza di sostanze umiche è stata dimostrata da una significativa riduzione della tossicità degli intermedi clorurati mediante test di tossicità, quale risultato del loro legame covalente alle sostanze umiche, giustificandone il possibile utilizzo come sistema di detossificazione in-situ di suoli contaminati.

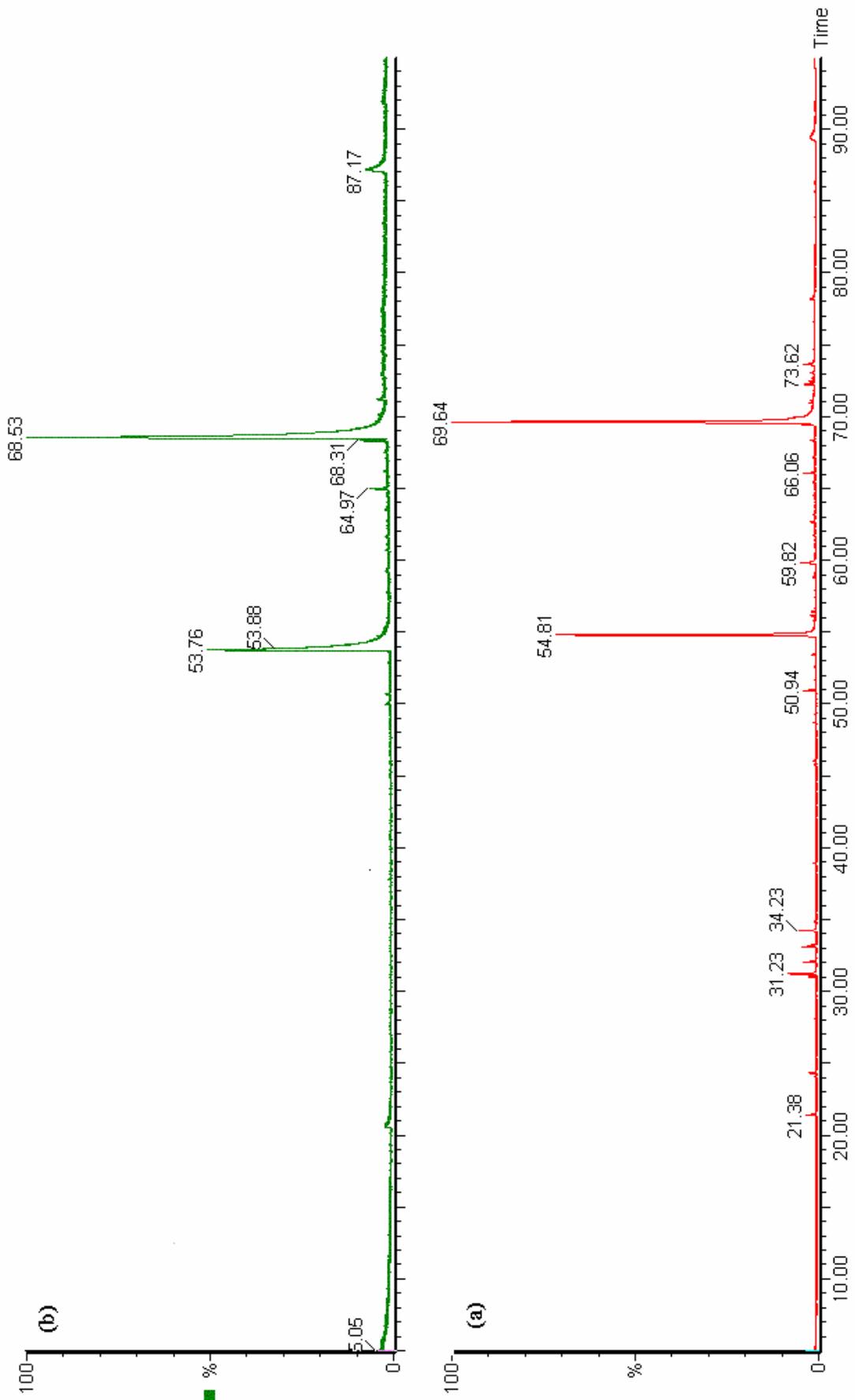
La differenza sostanziale evidenziata tra i cromatogrammi del suolo controllo e dei suoli trattati, pur necessitando ulteriori conferme, ha mostrato l'efficacia dell'azione sinergica di FePha e  $\text{H}_2\text{O}_2$  anche quando contaminanti di diversa natura chimica sono presenti contemporaneamente nel sistema. La consistente rimozione ottenuta in presenza della miscela di polimerizzazione potrebbe essere spiegata come un fenomeno d'inglobamento di intermedi chimici radicalici fortemente reattivi, prodotti per degradazione ossidativa, nelle molecole umiche, presumibilmente mediante la formazione di legami covalenti intermolecolari (Piccolo et al., 2004). La migliorata efficienza di rimozione con FePha e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , riscontrata in presenza di acido umico esogeno,

risulta effettiva poiché non influenzata dall'aggiunta di altri componenti al sistema. Tale aumento dell'attività catalitica può essere dovuto ad un fenomeno di adsorbimento della porfirina sui colloidi umici migliorando, in tal modo, l'azione catalitica di quest'ultima per un più stretto contatto tra il catalizzatore ed i due substrati di reazione (inquinanti e molecole umiche)

Tali risultati, pur essendo difficili da interpretare per i possibili effetti di inibizione che di attivazione sinergici e/o antagonisti, sono di grande interesse poiché forniscono informazioni aggiuntive al fine della trasformazione di composti organici inquinanti in matrici contaminate in presenza di sostanza organica naturale e tanto più plausibili perché riferiti ad un caso reale di contaminazione.



**Schema 1.** Comportamento catalitico della Fe(II)P in presenza di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (a) o di luce (b) con O<sub>2</sub>.



**Figura 5.13** Cromatogrammi GC-MS degli estratti organici ottenuti senza (a) e dopo trattamento con FePha-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> del suolo A senza precedente ammendaggio con acido umico (b) e successivamente estratto alla Soxhlet

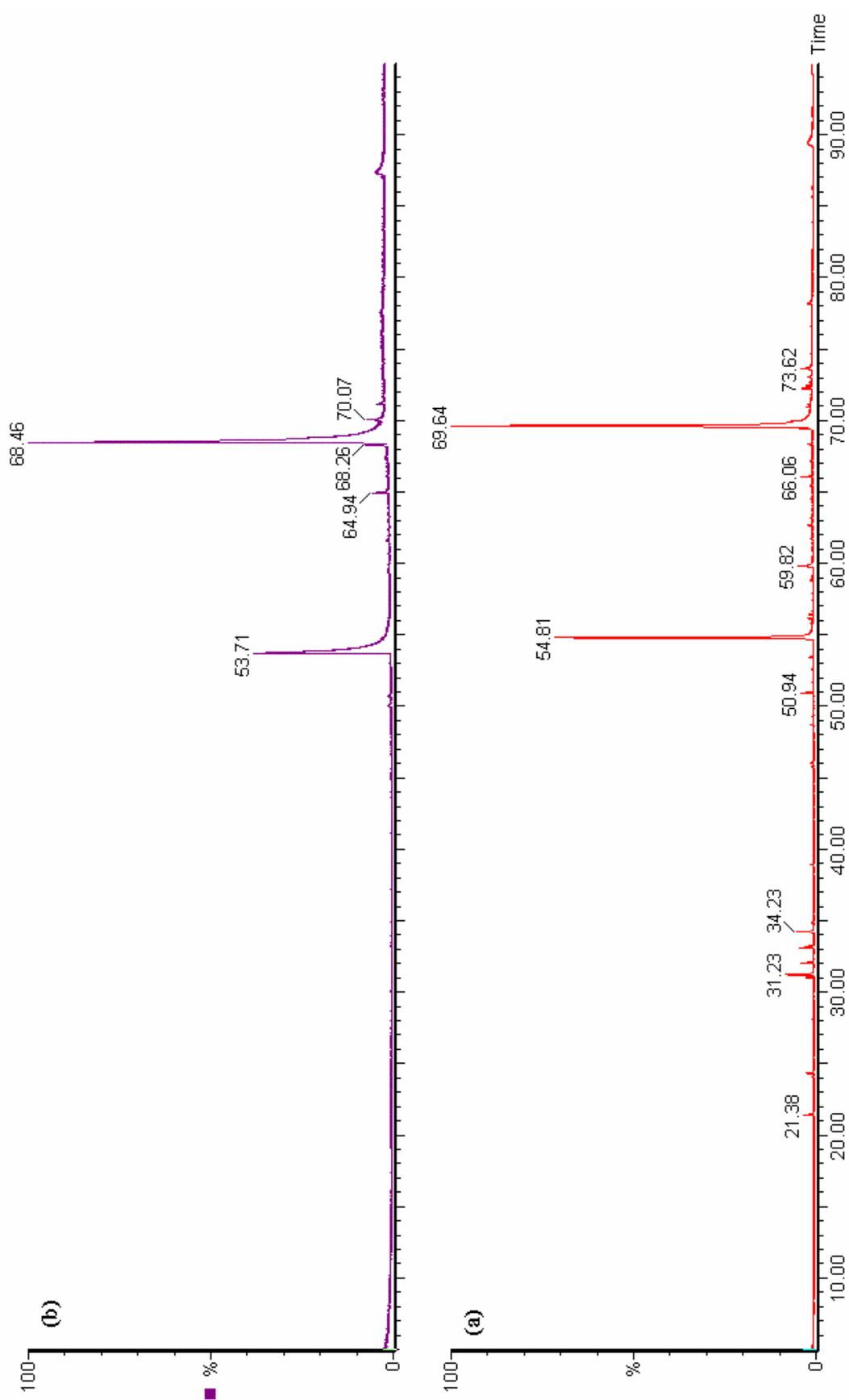


Figura 5.14 Cromatogrammi G-C-MS degli estratti organici ottenuti senza(a) e dopo trattamento con FePha-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> del suolo A prima ammendato con acido umico(b) e successivamente estratto alla soxhlet

### 5.3.2 Rese di estrazione dei contaminanti organici nel suolo controllo e nel suolo A sottoposto a vari trattamenti

#### 5.3.2.1 Effetti della ferroporfirina in presenza di $H_2O_2$ sull'estrattibilità dei contaminanti dal suolo A

La tabella 5.6 riporta i dati ottenuti dopo trattamento del suolo A con ferroporfirina con e senza perossido d'idrogeno e in sola presenza dell'agente attivante.

I risultati indicano che la sola presenza dell'agente attivante non ha avuto alcuna influenza sulla rimozione della contaminazione, mentre l'efficienza di degradazione dei contaminanti ottenuta in presenza di FePha e  $H_2O_2$  risulta notevolmente aumentata raggiungendo una percentuale di rimozione del 50% ca rispetto al controllo (Figura 5.15).

**Tabella 5.6.** Rese di estrazione ( $mg.kg^{-1}$ ) ed errore standard dopo trattamento del suolo A con FePha con e senza  $H_2O_2$  (estrazione soxhlet).

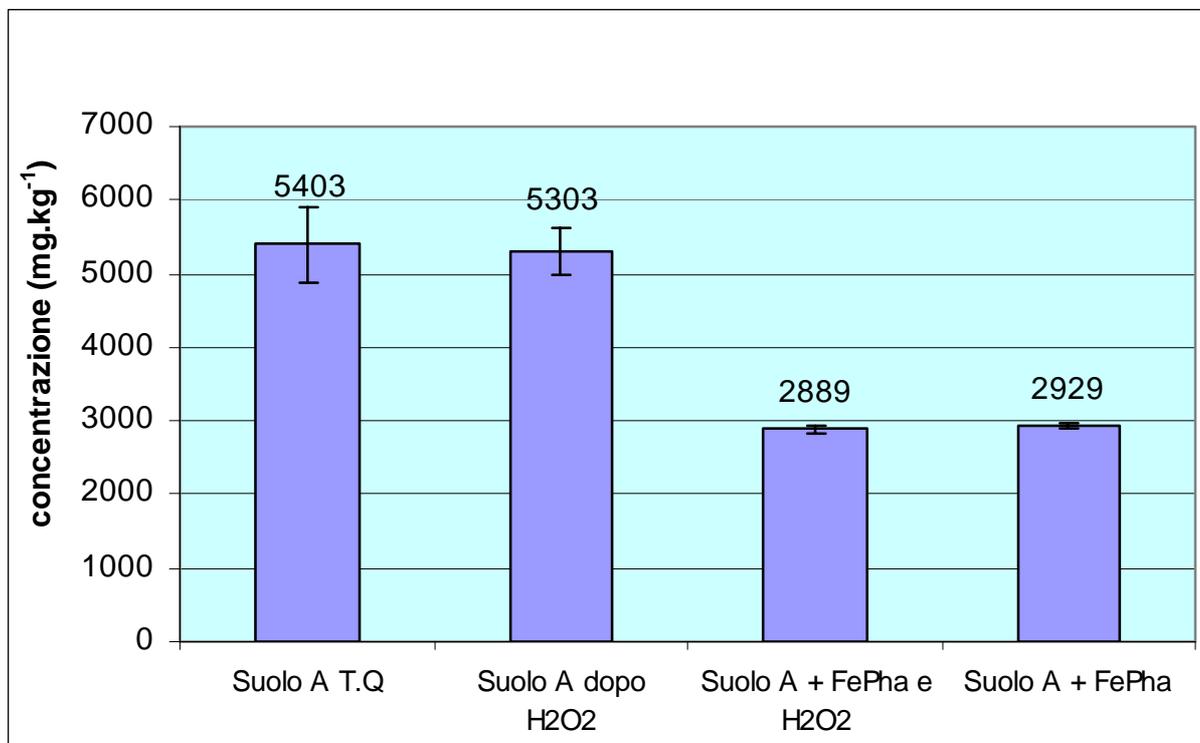
Suolo A T.Q	5403 ±509
Suolo A dopo $H_2O_2$	5303 ±321
Suolo A + FePha	2929 ±33
Suolo A +FePha e $H_2O_2$	2889±60

I dati ottenuti mostrano inoltre, che la sola presenza di ferroporfirina nel sistema, ha permesso di ottenere un'efficienza di rimozione paragonabile a quella ottenuta in presenza della miscela FePha-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Tale risultato, suggerisce che il sistema catalizzatore-ossidante rappresentato dalla ferro-porfirina e acqua ossigenata è in grado di alterare profondamente il contenuto e la struttura molecolare degli inquinati del suolo. Presumibilmente, il meccanismo radicalico interviene anche nel suolo e favorisce, con la catalisi della ferroporfirina, una ossidazione avanzata dei composti contaminanti. Le prove condotte dimostrano che anche la sola aggiunta di ferroporfirina senza la presenza di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ha consentito un'efficiente rimozione della contaminazione mediante reazioni di accoppiamento ossidativo..

Tale sistema, costituisce senz'altro una scelta valida per l'abbattimento della contaminazione rispetto agli altri trattamenti ossidativi essenzialmente per l'attività ciclica del catalizzatore stesso che, certamente, non si esaurisce nel tempo dell'esperimento.

**Figura 5.15.** Resa di estrazione ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) da suolo A dopo trattamento con FePha con e senza  $\text{H}_2\text{O}_2$  o della sola  $\text{H}_2\text{O}_2$  rispetto al suolo controllo non trattato (estrazione soxhlet).



### 5.3.2.2 Riduzione catalitica della contaminazione nel suolo A in presenza di acido umico esogeno

La tabella 5.7 riporta i valori totali di concentrazione ottenuti dal suolo A dopo trattamento con ferro-porfirina in presenza e in assenza di perossido d'idrogeno

e precedente aggiunta di acido umico.

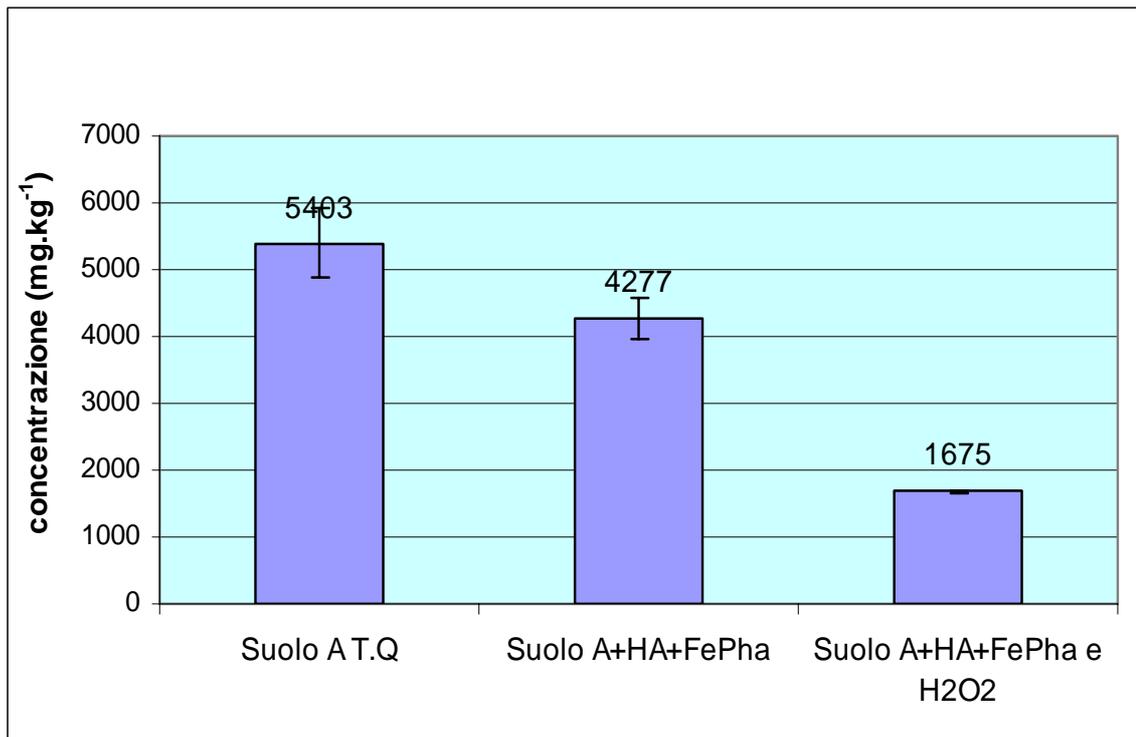
I risultati, mostrati in figura 5.16 , indicano che la presenza di acido umico e ferroporfirina in assenza dell'agente attivante ha avuto un effetto poco significativo sulla riduzione complessiva della contaminazione dal suolo A, consentendo una capacità di rimozione dei contaminanti pari solo a circa il 20 % rispetto al controllo.

**Tabella 5.7.** Rese di estrazione ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) ed errore standard per il suolo ammendato con acido umico (HA) dopo trattamento con FePha con e senza  $\text{H}_2\text{O}_2$  (estrazione soxhlet).

Suolo A T.Q	5403 $\pm$ 509
Suolo A+HA+FePha	4277 $\pm$ 298
Suolo A+HA+FePha e $\text{H}_2\text{O}_2$	1675 $\pm$ 34

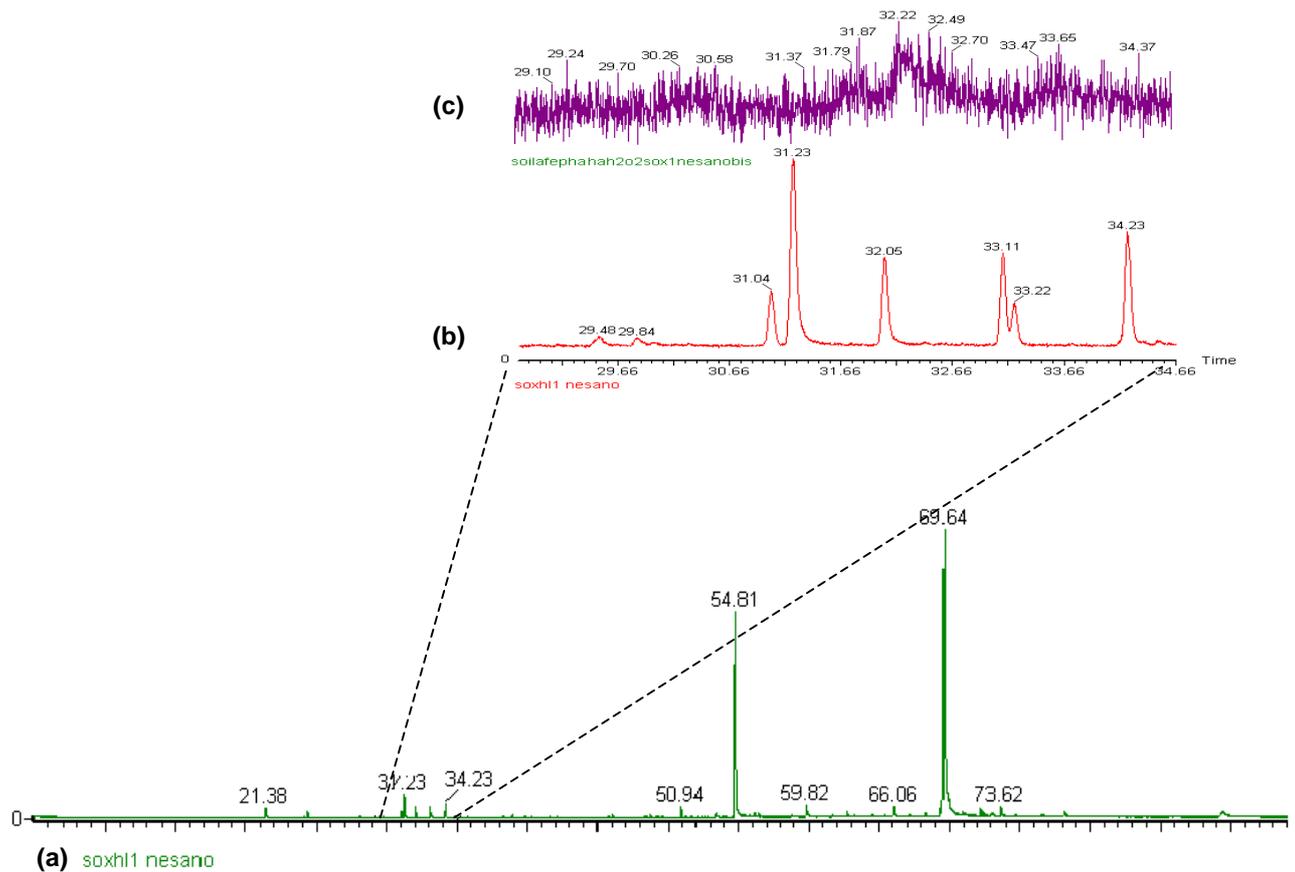
Al contrario, l'aumentata efficienza di rimozione della contaminazione rilevata in presenza di perossido d'idrogeno ( $H_2O_2$ ) aggiunto al catalizzatore dopo trattamento con acido umico, suggerisce l'avvenuta reazione di copolimerizzazione dei contaminanti nelle sostanze umiche. Infatti, i valori di concentrazione risultati considerevolmente più bassi quando confrontati al trattamento condotto solo in presenza del sistema FePha- $H_2O_2$ , indicando chiaramente che la presenza dell'acido umico è determinante sull'aumentata capacità di rimozione della contaminazione del sistema (Figura 5.16).

**Figura 5.16.** Effetto dell'aggiunta di HA esogeno sulla rimozione catalitica della contaminazione dal suolo A.



Dall'analisi dei cromatogrammi parziali degli estratti organici da suolo A, è stato possibile valutare, in particolare, i notevoli livelli di decontaminazione ottenuti nella regione degli aromatici alogenati insieme agli adiacenti sistemi molecolari semplici, dopo trattamento con HA/FePha-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig.5.17a).

0

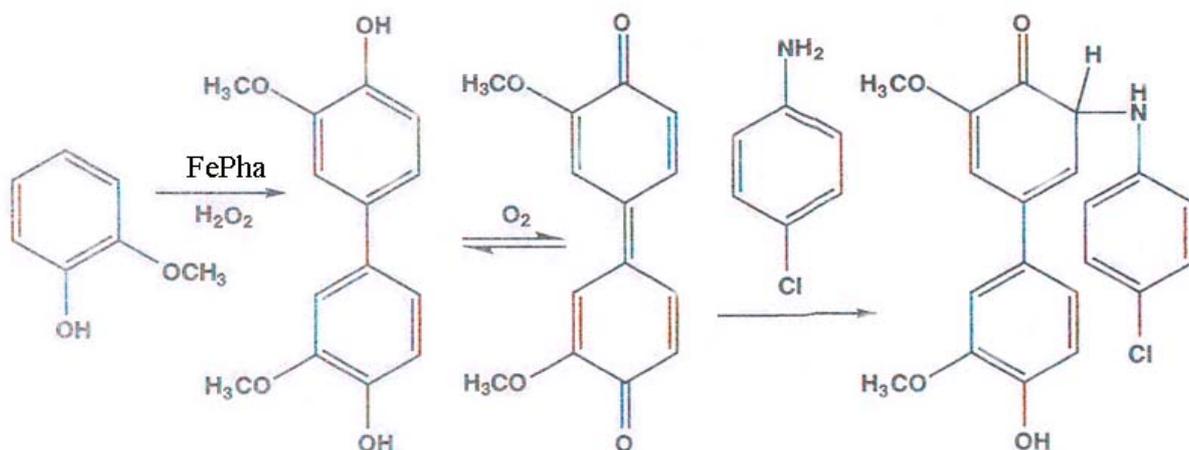


**Fig.5.17.**

Cromatogramma GC-MS dell'estratto organico ottenuto da suolo A dopo estrazione soxhlet(a). Il particolare illustra la regione ingrandita relativa allo stesso cromatogramma dopo trattamento con HA/FePha-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(c) rispetto al controllo prima del trattamento(b)

Cloro-metil-benzenammina (28.08 e 29.84 min.), tetracolorobenzene (31.04 e 33.11 min), bifenile(33.22 min.) e difenilettere(34.23 min.), rilevati nel controllo prima del trattamento (Fig.5.17b), non sono stati ritrovati nel controllo a fine trattamento, mentre la sostanziale diminuzione dell'abbondanza dello ione molecolare ( $M^+ = 116$ ) nello spettro relativo al picco presente a 32.22 min, spostato rispetto al controllo, non rende più riconoscibile la dicloroanilina, indicandone la possibile disattivazione in presenza del catalizzatore (Fig.5.17c).

E' probabile che i contaminanti abbiano reagito per via radicalica con le sostanze umiche aggiunte attraverso formazione di legami covalenti con le molecole umiche. La ferroporfirina, nel caso specifico, può influenzare sia reazioni dirette di accoppiamento ossidativo tra ammine aromatiche e gruppi chinoni o carbonili di sostanze umiche sia creare siti substrato aggiuntivi quali dimeri chinoidi che successivamente subiscono attacco nucleofilo da parte della cloroanilina (Thorn *et al.*, 1996) secondo lo schema di seguito illustrato



La capacità di catalizzare l'accoppiamento di prodotti di ossidazione di contaminanti, quali la dicloroanilina, e di altri intermedi di reazione, è stato da tempo confermato da Hatcher *et al.* mediante  $^{13}\text{C}$  NMR dove i picchi nella regione (161-171 ppm) assegnati ai carboni carbonilici, come i chinoni, indicano che gli intermedi di reazione sono incorporati covalentemente alle sostanze umiche (Fukushima & Tatsumi, 2001; Fukushima *et al.*, 2003).

Tale forte interazione con la matrice umica non solo impedisce la successiva estrazione per Soxhlet e la determinazione analitica dei contaminanti ma anche, presumibilmente, la loro inattivazione ambientale (biotica ed abiotica) perché entrati a far parte stabilmente della matrice umica.

### 5.3.2.3 Effetto di un precedente ciclo di lavaggio con acido umico esogeno sulla riduzione catalitica della contaminazione

In tabella 5.8 sono indicati i risultati delle prove effettuate per valutare l'effetto di un precedente ciclo di lavaggio sull'azione catalitica della ferroporfirina nella riduzione della contaminazione nel campione di suolo A.

**Tabella 5.8** Rese di estrazione ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) ed errore standard ottenute da suolo A dopo un ciclo di lavaggio con acido umico seguito da trattamento con FePha, o senza  $\text{H}_2\text{O}_2$  (estrazione soxhlet).

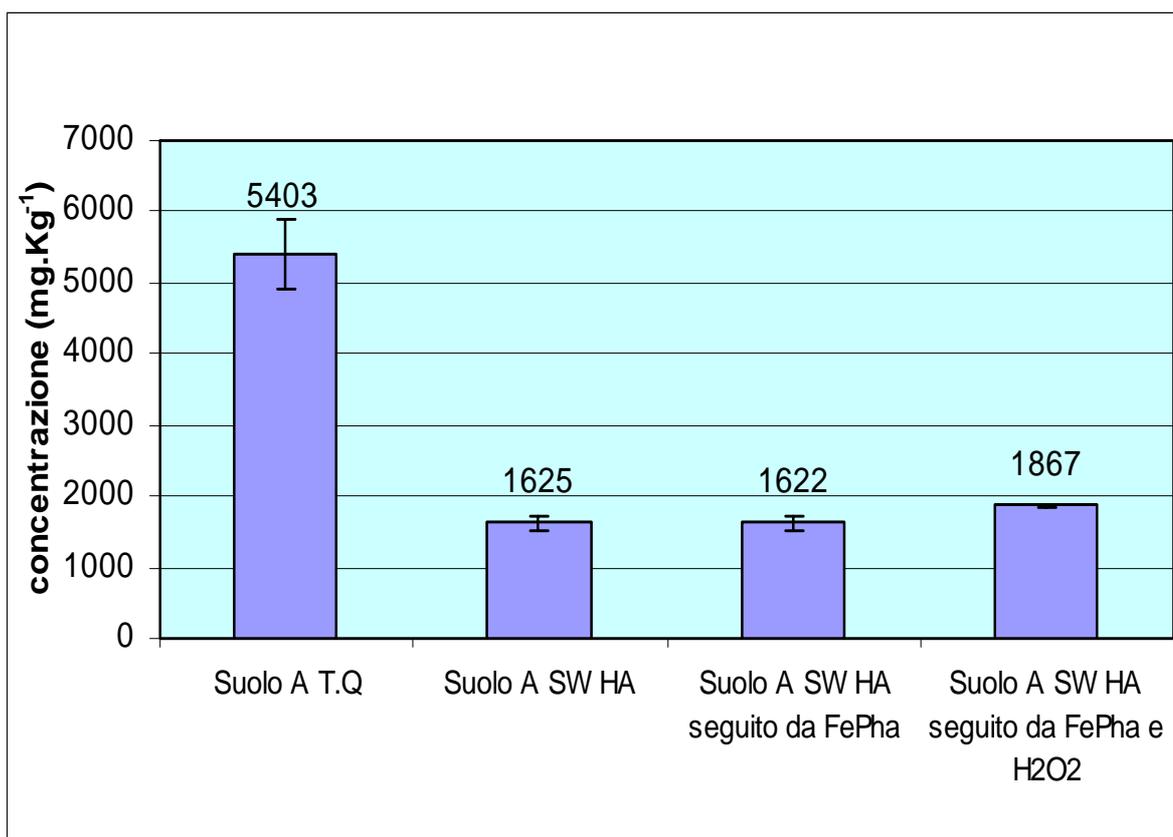
Suolo A T.Q	5403 $\pm$ 509
Suolo A SW HA	1625 $\pm$ 95
Suolo A SW HA seguito da FePha	1622 $\pm$ 96
Suolo A SW HA seguito da FePha e $\text{H}_2\text{O}_2$	1867 $\pm$ 30

Le rese di estrazione relative a tali prove indicano che un precedente trattamento di lavaggio con acido umico non ha influenza sulla rimozione catalitica della contaminazione dal momento che la percentuale di abbattimento (E%) ottenuta dall'aggiunta successiva di ferroporfirina o della miscela FePor- $\text{H}_2\text{O}_2$ , rispetto al controllo, non è significativamente diversa da quella ottenuta dal solo trattamento di lavaggio con acido umico esogeno (Figura 5.18).

Tali esperimenti, pur necessitando di ulteriori verifiche, indicano che un precedente ciclo di lavaggio con acido umico non ha consentito un ulteriore abbattimento di contaminanti nel suolo A.

I risultati ottenuti potrebbero essere attribuiti, a un meccanismo di interazione tra le sostanze umiche del suolo e i contaminanti stessi, che instauratosi sia prima che dopo il trattamento di lavaggio con acido umico, limiterebbe l'efficacia catalitica della ferroporfirina anche quando utilizzata in presenza dell'agente ossidante.

**Figura 5.18.** Estrazione di contaminanti dal suolo A dopo un ciclo di lavaggio con acido umico e successivo trattamento con FePha con e senza H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



#### 5.3.2.4 Comportamento fotocatalitico della ferroporfirina sulla riduzione della contaminazione

La tabella 5.9 riporta i risultati relativi alla rese di estrazione dal suolo A dei prodotti ottenuti per fotossidazione catalitica con FePha rispetto a quelli ottenuti utilizzando il sistema FePha-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Tabella 5.9 Rese medie di estrazione (mg.kg<sup>-1</sup>) ed errore standard dopo trattamento del suolo A con FePha seguito da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o esposizione alla luce solare (estr. Sox)

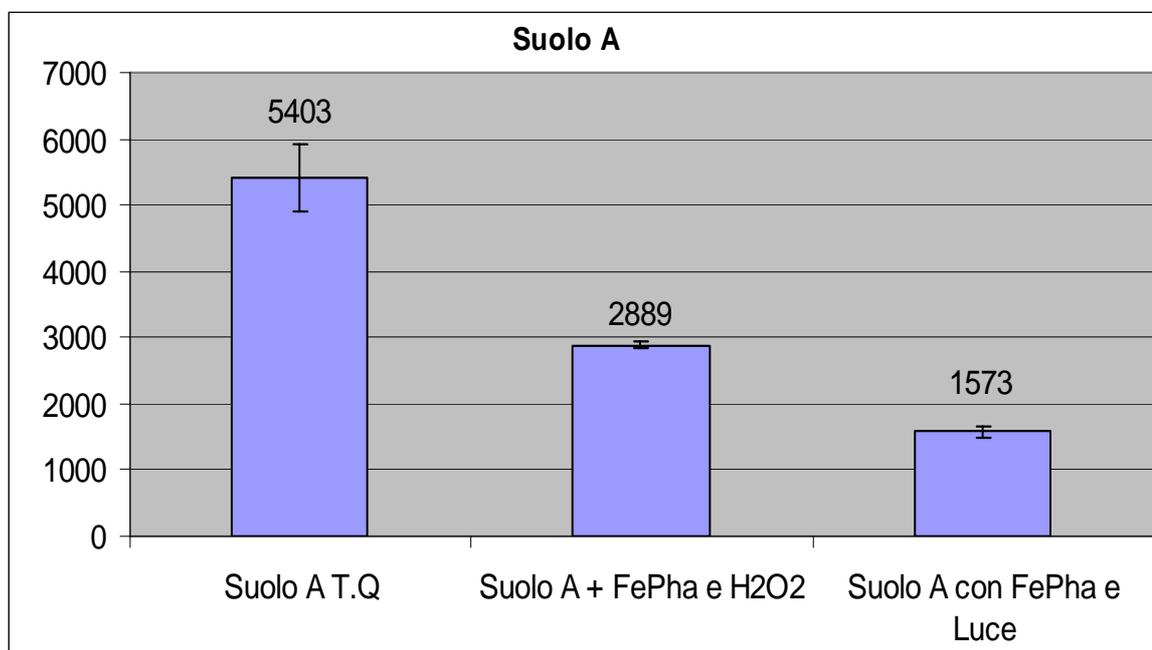
<b>Trattamenti con esposizione alla luce solare</b>	
Suolo A T.Q	5403 ±509
Suolo A + FePha e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2889 ±60
Suolo A con FePha e Luce	1573 ±77

Dall'analisi dei risultati, è emerso che la luce, è più efficace del perossido d'idrogeno nelle reazioni di rimozione della contaminazione organica, determinando una resa di estrazione al inferiore del 75% rispetto al controllo. I dati indicano la fattibilità della degradazione ottenibile mediante la radiazione visibile come agente attivante, considerando l'elevata percentuale di abbattimento (E%~75%)(figura 5.19) ottenuta rispetto al controllo. Ciò giustifica, pertanto, il recente interesse verso questo sistema alternativo di

abbattimento delle sostanze inquinanti, economicamente vantaggioso e ambientalmente compatibile.

Tali risultati, seppure riferiti a una sperimentazione ancora allo stadio iniziale, sembrano promettenti e richiedono ulteriore ricerca nel campo della fotocatalisi, soprattutto in presenza di catalizzatori metalloporfirinici, poiché i più recenti contributi in questo campo di ricerca si basano sull'uso di materiali semiconduttori, attivi solo in presenza di luce UV, che peraltro costituisce solo il 4% della radiazione solare.

**Figura 5.19** Contenuto( $\text{mg.kg}^{-1}$ ) di contaminanti totali nel suolo A dopo trattamento con FePha seguito da  $\text{H}_2\text{O}_2$  o dalla luce solare (estrazione soxhlet).



## **CAPITOLO 6**

### **CONCLUSIONI**

#### **6.1 Uso della sonicazione come tecnica estrattiva per una procedura di determinazione analitica dei contaminanti organici nei suoli inquinati**

Lo studio comparativo intrapreso per stabilire l'idoneità di una metodologia analitica come procedura standard per la determinazione di composti organici, voleva avere inizialmente la pretesa di un'applicabilità generale, perché utilizzato in un caso reale di contaminazione, ma in quanto tale, giustifica le difficoltà incontrate nella prosecuzione del lavoro sperimentale per la messa a punto di tale metodo, giungendo alla conclusione che la scelta va effettuata caso per caso e la cui efficienza dipende da una serie di fattori, che essenzialmente riguardano il tipo di inquinanti, la tecnica adottata per estrarli dai suoli e la composizione dei suoli stessi.

Infatti, i dati ottenuti in questa fase della ricerca hanno dimostrato che la tessitura del suolo è un importante parametro da considerare per la scelta della tecnica analitica più appropriata per estrarre i contaminanti dal suolo. Dai

risultati, è emerso che la sonicazione è più esaustiva della soxhlet nel suolo B caratterizzato da una tessitura sottile, mentre il suolo A, caratterizzato da una tessitura sabbiosa, fornisce risultati equivalenti sia quando estratto mediante soxhlet che sonicazione.

I risultati ottenuti dall'ottimizzazione della procedura estrattiva per le due tecniche estrattive selezionate, Soxhlet ed estrazione per ultrasonificazione, relativi alla quantità di solvente utilizzato, al numero di fasi di estrazione, ma soprattutto alla durata dell'estrazione (12 min contro le 48 ore richieste dalla soxhlet), suggeriscono la sonicazione come procedura estrattiva applicabile a tutti i tipi di suoli oltre che per la velocità di esecuzione, anche per l'affidabilità dei risultati poiché fornisce dati riproducibili e coerenti con quelli ottenuti mediante estrazione soxhlet, che, in genere, è il metodo di riferimento.

L'aspetto negativo che può influenzare sul rendimento ottenibile con tale tecnica, la riportata degradazione sonochimica di contaminanti organici aromatici e di composti organici alogenati (Drijvers *et al.*, 1999) è compensata dalla maggiore efficienza di estrazione quantitativa.

L'utilizzo successivo di colonne SPE C18 permette di ridurre i tempi di preparazione del campione con la possibilità di purificare contemporaneamente più campioni, fornendo risultati consistenti e riproducibili a costi bassi.

Infine l'uso della gascromatografia-spettrometria di massa, consentendo la separazione e la quantificazione anche di bassi livelli di contaminanti dai campioni studiati, può essere indicato quale metodo di identificazione degli analiti negli estratti di campioni ambientali complessi in considerazione sia dei brevi tempi di estrazione che per l'elevato numero di analiti identificati contemporaneamente.

In conclusione, le diversificate caratteristiche chimiche degli inquinanti presenti nei campioni di suolo analizzati, hanno consentito lo sviluppo di una

procedura analitica, basata sulla estrazione per sonicazione accoppiata alla gascromatografia-spettrometria di massa, semplice e relativamente veloce, ma soprattutto efficiente che può essere utilizzata per la determinazione diretta di inquinanti organici nei suoli, soprattutto in quelli con contaminazione pregressa.

## **6.2 Lavaggio del suolo con acido umico esogeno per la riduzione della contaminazione dei suoli**

I risultati ottenuti dalle prove di lavaggio condotte con diversi surfattanti di sintesi, hanno confermato dati già disponibili in letteratura circa l'efficienza di degradazione ottenibile con questa tecnica chimico-fisica, mentre l'utilizzo della sola acqua ha dimostrato di non essere efficiente per la rimozione della contaminazione organica dai suoli contaminati studiati.

L'uso di surfattanti sintetici, sebbene consentano un buon recupero di contaminanti, possono essere causa di ulteriori problemi ambientali, a causa della loro bassa degradabilità ed alta tossicità.

Al contrario, questo studio ha voluto dimostrare l'efficacia di surfattanti naturali, quali le sostanze umiche, come valida alternativa ai surfattanti di sintesi, normalmente utilizzati per il lavaggio di suoli contaminati.

I risultati mostrano che il lavaggio con la soluzione umica è efficiente quanto quello effettuato con i surfattanti sintetici ionici e non ionici, il sodiododecilsolfato e il Triton X-100, selezionati per questo studio sperimentale.

Il vantaggio nell'uso delle soluzioni umiche risiede principalmente nella loro limitata tossicità verso la microflora del suolo e, costituendo fonte di carbonio organico per la crescita di microrganismi, ne migliorano l'attività per

l'ulteriore degradazione dei contaminanti rimasti sul suolo dopo il lavaggio, una volta che il suolo è stato riposizionato *in situ* (Fava & Piccolo, 2002).

L'uso di sostanze umiche consente, quindi, di ottenere suoli recuperati per lavaggio con una più elevata percentuale finale di sostanza organica che svolge un successivo ruolo utile per il ripristino dell'attività biologica e per l'attenuazione naturale della contaminazione.

In conclusione, i risultati hanno evidenziato che la tecnologia di lavaggio con sostanze umiche è adeguata alla rimozione della contaminazione da inquinanti organici, nell'ipotesi di intervento *ex-situ* a scala maggiore ed al fine di consentire il completo recupero dei suoli trattati per un loro reinserimento nell'ambiente.

### **6.3. Catalisi biomimetica come tecnologia innovativa per la copolimerizzazione ossidativa dei contaminanti nelle strutture molecolari delle sostanze umiche**

Dai risultati ottenuti dallo studio dei catalizzatori abiotici sul suolo A altamente contaminato, è emersa la validità di questo approccio come metodologia per il recupero di suoli inquinati e la loro reimmissione nell'ambiente. Il confronto dei cromatogrammi prima e dopo il trattamento con il catalizzatore biomimetico in presenza dell'agente attivante, ma ancor più in presenza di acido umico esogeno, ha dimostrato una consistente diminuzione di gran parte degli analiti individuati nel campione di suolo prima del trattamento. Questi risultati suggeriscono che l'attività catalitica della ferroporfirina può essere aumentata dalla presenza di sostanze umiche esogene. L'efficienza di rimozione in queste condizioni è attribuibile ad una

reazione di copolimerizzazione ossidativa dei contaminanti presenti nella matrice umica.

In presenza di donatori di ossigeno, i catalizzatori metallo-porfirinici sono in grado di ossidare substrati organici con formazione di intermedi reattivi che possono essere accoppiati attraverso reazioni spontanee di polimerizzazione in molecole di dimensioni più grandi e restando, infine, inglobati nella sostanza umica. La presenza di materiale umico esogeno ha, di fatto, aumentato la rimozione della contaminazione dovuta all'immobilizzazione dei contaminanti nelle superstrutture umiche mediante legami stabili di natura covalente.

Il solo fatto di produrre l'immobilizzazione covalente dell'inquinante, ne limita i potenziali danni ambientali impedendone la percolazione attraverso il suolo che altrimenti potrebbe consentire all'inquinante di raggiungere la falda. I confortanti risultati ottenuti incoraggiano l'ulteriore approfondimento della linea di ricerca intrapresa, con la possibilità di utilizzare anche la radiazione solare come sorgente di energia per gli esperimenti di catalisi biomimetica, consentendo, in tal modo, di pensare all'applicazione di questa tecnologia di bonifica su larga scala e senza l'impiego di perossido d'idrogeno.

## BIBLIOGRAFIA

Ahmad, R., Kookana, R.S., Alston, A.M., and Skjemstad J.O. (2001) The nature of Soil Organic Matter Affects Sorption of Pesticides. 1. Relationships with Carbon Chemistry as Determined by  $^{13}\text{C}$  CPMAS NMR Spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* **35**: 878-884

Aiken, G.R.(1985) in: Aiken, G.R., McKnight, D. M., Wershaw, R.L. MacCarthy, P. (Eds.), *Humic Substances in Soil, Sediment and Water-Geochemistry, Isolation and Charaterization*, Wiley, New York, pp. 363

Alexander, M. (1997) How are toxic chemicals in soils? *Environ. Sci. Technol.* **29**: 2713-2323

Andreux, F. (1996) "Humus in World Soils". *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*. (ed. by A. Piccolo) pp. 45-100, Elsevier, Amsterdam

Babic, S., Petrovic, M., Kastelan-Macan, M. (1998) Ultrasonic solvent extraction of pesticides from soil. *J. Chromat. A*, **823**: 3–9

Ball, W.P., Roberts P.V. (1991) *Environ. Sc. Technol.* **25**: 1223-1237

Ballarin-Denti, A., Bertazzi, P.A., Facchetti, S., Fanelli, R., Mocarelli, P. (1999) *Chemistry, Man and Environment. The Severo accident 20 years on: monitoring, epidemiology and remediation*, Elsevier Oxford, UK.

Bennett, B.D., Kottler D., White J.C., Kelsey J.W. (2001) Influence of soil mixture on the sequestration of organic compounds in soil. *Chemosphere* **42**: 893-898

Bollag, J.M. (1992) Decontaminating soil with enzymes. *Environ. Sc. Technol.* **26**: 1876-1881

Bollag, J.M., Loll, M.J. (1983) Incorporation of xenobiotics into soil humus. *Experientia* **39**: 1221- 1231

Bollag, J.M., Myers, C.J., Minard, R.D. (1992) Biological and chemical interactions of pesticides with soil organic matter. *Sci. Total Environ.* **123/124**: 205-217

Boopathy, R. (2000) Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology* **74**: 63-67

Borgå, K., Gabrielsen, G.W., Skaare, J.U. (2001) Biomagnification of organochlorines along a Barents Sea food chain. *Environ. Poll.* **113**: 187-198

Cambardella C.A. & Elliot E.T. (1992) Particulate soil organic matter changes across a grassland cultivation sequence. *Soil Science Society of American Journal* **56**: 777-783

Catallo, W.J., Junk, T. (1994) Sonochemical treatment of hazardous chlorinated hydrocarbons in aqueous systems. Final report, Gulf Coast Hazardous Substance Research Center, Beaumont, TX

Catallo, W.J., Junk, T. (1995) Sonochemical dechlorination of hazardous organic wastes in aqueous systems. *Waste management* **15**: 303

Chefetz, B., Deshmukh, A.P., Hatcher, P.G. (2000) Pyrene sorption by natural organic matter. *Environ. Sc. Technol.* **34**: 2925-2930

Cheng, H.H. (1990) Pesticides in the soil environment: processes, impacts, and modelling. SSSA, Madison, WI.

Chen, S.T., Stevens, D.K., Kang, G. (1999) *Water Res.* **33**: 3657-3665

Chen, Z. and Pawluk, S. (1995) Structural variations of humic acids in two Alberta Mollisol. *Geoderma* **65**: 173-193

Chenu, C., Guèrif J. (1991) Mechanical strength of clay minerals as influenced by an adsorbed polysaccharide. *Soil Science Society of American Journal* **55**:1076-1080.

Chesire M.V. & Hayes M.H.B. (1990) "Compositions, Origins, Structures and Reactivities of Soil Polysaccharides". In: *Soil Colloids and Their Association in Aggregates*. M.F. De Boodt et al.(Eds.), pp.307-336, Plenum Press, NewYork: 307-336

Chesire M.V., Russell J.D., Fraser A.R., Bracewell J.M., Robertson G.W., Benzing-Purdie L.M. (1992). Ratcliffe C.I. Ripmeester J.A. & Goodman B.A. Nature of soil carbohydrate and its association with soil humic substances. *Journal of Soil Science* **43**: 359-373.

Chin, Y.-P., Weber, J.R., and Eadle, J.B (1990). Estimating the effects of dispersed organic polymers on the sorption of contaminants by natural solids: 2. Sorptions in the presence of humic and other natural macromolecules. *Environ. Sci. Technol.* **24**: 837-842.

Chin, Y.-P., Aiken, G.R., Danielsen, K.M. (1997) Binding of pyrene to aquatic and commercial humic substances: the role of molecular weight and aromaticity. *Environ. Sci. Technol.* **31**: 1630-1635

Chiou, C.T., Kile, D.E., Brinton, T.I., Malcolm, R.L. & Leenher, J.A. (1987) A comparison of water solubility enhancements of organic solutes by aquatic humic material and commercial humic acids. *Environ. Sci. Technol.* **21**: 1231-1234

Christensen, B.T. (1992) Physical fractionation of soil and organic matter in primary particle size and density separates. *Advances in Soil Science* **20**: 1-90

Chun, C.L., Lee, J.-J., Park, J.W. (2002) Solubilization of PAH mixtures by three different anionic surfactants. *Environ. Poll.* **118**: 307-313

Chu, W., Chan, K.H. (2003) The mechanism of the surfactant-aided soil washing system for hydrophobic and partial hydrophobic organics. *Sci. Total Environ.* **307**: 83-92

Chu, W., Hunt, J.R., Jafvert C.T. (2002) Modeling the sequential photodechlorination of hexachlorobenzene in surfactant micelles. *Water research* **36**: 843-850

Chu, W., So, W.S., (2001) Modeling the two stages of surfactant –aided soil washing. *Water Res.* **35**(3): 182-188

CLARINET (Contaminated Land Rehabilitation Network for Environmental Technology) 2000. *Remediation of Contaminated Land Technology Implementation in Europe: A state of the Art of CLARINET WG 7*. 8th Draft Document, December 2000  
CLARINET website: <http://www.clarinet.at>, 2000.

Conte, P., Piccolo, A., (1999) Conformational arrangement of dissolved humic substances. Influence of solution composition on association of humic molecules. *Environ. Sci. Technol.* **33**:1682-1690

Conte, P., Piccolo, A., van Lagen, B., Buurmann, P., and Hemminga, M.A.(2002) Elemental quantitation of natural organic matter by CPMAS<sup>13</sup>C NMR *Spectroscopy*. *Solid State Nucl. Mag. Res.* **21**: 158-170

Conte, P., Zena, A., Pilidis, G., Piccolo, A.(2001) Increased retention of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils induced by soil treatment with humic substances. *Environ. Poll.* **112**: 27-31

Cozzolino, A., and Piccolo, A. (2002) “Polymerization of dissolved humic substances catalyzed by peroxidase. Effects of pH and humic composition”. *Organic Geochemistry* **33**: 281-294

Cuypers, C., Pancras, T., Grotenhuis, T., Rulkens, W. (2002) The estimation of PAH bioavailability in contaminated sediments using hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and Triton X-100 extraction techniques. *Chemosphere* **46**: 1235-1245

Dean, J.R. (1999) *Extraction methods for environmental analysis*, Wiley and Sons, NY

Deshpande, S., Shiau, B.J., Wade, D., Sabatini, D.A., Harwell J.H. (1999) Surfactant selection for enhancing ex situ soil washing. *Wat. Res.* **33**: 351-360

Drijvers, D., Van Langenhove, H., Herrygerris V. (2000) Sonolysis of fluoro-, chloro-, bromo and iodobenzene: a comparative study. *Ultrasonic Sonochem.* **7**: 87-95

Engbreton, R.R., Wandruszka R. (1994) Microorganization in dissolved humic acids. *Environ. Sci. Technol.* **28**: 1934-1941

Edwards, D.A., Luthy, R.G., Liu, Z. (1991) Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar non-ionic surfactant solutions. *Environm.Sci. Technol.* **25**: 127-133

Fava, F., Piccolo, A. (2002) Effect of humic substances on the bioavailability aerobic biodegradation of polychlorinated biphenils in a model soil. *Biothechnol. Bioeng.* **77**: 204-211

Fent, K. (2003) Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicol. Lett.*, 140//141, 353-/365

Fukushima, M., Ichikawa, H., Kawasaki, M., Sawada, A., Morimoto, K., Tatsumi, K. (2003) Effects of humic substances on the pattern of oxidation products of pentachlorophenol Induced by a Biomimetic Catalytic System Using Tetra(*p*-sulfophenyl)porphineiron(III) and  $\text{KHSO}_5$  *Environm. Sci. Technol.* **37**: 386-394

Fukushima, M., Sawada, A., Hiroyasu, I., Morimoto, K. And Tatsumi, K. (2003) Influence of Humic substances on the removal of pentachlorophenol by a Biomimetic Catalytic System with a Water-Soluble Iron (III)-Porphirin Complex. *Environm. Sci. Technol.* **37**: 1031-1036

Fukushima, M., Tatsumi, K.(2001) Degradation Pathways of Pentachlorophenol by Photo-Fenton Systems in the presence of Iron (III) Humic Acid and Hydrogen Peroxide. *Environm. Sci. Technol.* **35**: 1771-1778

Gaboriau, H., Saada, A. (2001) Influence of heavy organic pollutants of anthropic origin on PAH retention by kaolinite, *Chemosphere* **44**:1633-1639

Gaffney, J.S., Marley, N.A., Clark, S.B. (1996) Humic and Fulvic Acids and Organic Materials in the Environment. In: Humic and Fulvic Acids. ACS Symposium Series, No.651.(Edited by Gaffney, J.S., Marley N.A. and Clark S.B.); American Chemical Society: Washington, D.C.; 1996: 2-14

Garon, D., Krivobok, S., Wouessidjewe, D., Seigle-Murandi, F. (2002) Influence of surfactants on solubilization and fungal degradation of fluorine, *Chemosphere* **47**: 303-309

Ghosh, K., Schnitzer, M. (1980). Macromolecular structures of humic substances. *Soil Sci.* **129**: 266-276.

Goskonda S. Catallo, W.J., Junk, T. (2002) Sonochemical degradation of aromatic organic pollutants. *Waste Manag.* **22**: 351-356

Grathwohl, P. (1990) Influence of organic matter from soils and sediments from various origins on the sorption of some chlorinated aliphatic hydrocarbons: implications on  $K_{oc}$  correlation. *Environm. Sci. Technol.* **24**: 1687-1693

Griffiths, R.A. (1995) Soil washing technology and practice, *J. Haz. Mat.* **40**: 175-189

Grimberg, S.J., Nagel, J. and Aiken, M. (1995) Kinetics of phenantrene dissolution into water in the presence of non-ionic surfactant. *Env. Sci. Tech.* **29**: 1480-1487

Guetzloff, T.F, Rice J.A.(1996) Micellar nature of humic colloids, in: Gaffney, J.S., Marley, N.A., Clark, S.B. Eds. Humic and Fulvic Acids. Isolation , Structure and Environmental Role, Amer. Chem. Soc. Washington DC, 18-25

GWRTAC (Ground-Water Remediation Technologies Analysis Center) (1999) *In situ chemical treatment*. Department of Applied Science, Upton and Department of Civil and Environmental Engineering, Newark. TE/99/01, July 1999

- Halim, M., Conte, P., Piccolo, A. (2003) Potential availability of heavy metals to phytoextraction from contaminated soils induced by exogenous humic substances, *Chemosphere* **52**: 265–275.
- Hassett, J.J., Banwart, W.L. (1989) The sorption of nonpolar organics by soils and sediments. In “ Reactions and movement of organic chemicals in soils. Sawhney B.L., Brown K (eds.) SSSA Spec Publ **22**: 31-44
- Hatcher, P.G., Bortiatynski, J.M., Minard, R.D., Dec, J., Bollag, J.M. (1993) Use of High Resolution  $^{13}\text{C}$  NMR to examine the Enzymatic Covalent Binding of  $^{13}\text{C}$ - Labeled 2,4-Dichlorophenol to Humic Substances *Environ. Sci. Technol.* **27**: 2098-2103
- Hatzinger, P.B. and Alexander, M. (1995) Effects of aging of chemicals in soil on their biodegradability and extractability. *Environ. Sci. Technol.* **29**: 537-545
- Hayes, M.H.B., MacCarthy P., Malcom, R.L., Swift, R.S. (eds) (1989) Humic substances II- In: Search of Structure. Wiley and Sons, Chichester, UK
- Holman, H.-Y.N., Nieman, K., Sorensen, D.L., Miller, C.D., Martin, M.C., Borch, T., McKinney, W.R., Sims, R.C. (2002) Catalysis of PAH biodegradation by humic acid shown in synchrotron infrared studies. *Environ. Sci. Technol.* **36**: 1276-1280
- Hu, W.-G.; Mao, J.-D.; Xing, B.; Schmidt-Rohr, K. (2000) *Environ. Sci. Technol.* **34**: 530-534
- Huang, W., Peng, P., Yu, Z., Fu, J. (2003) Effects of organic matter heterogeneity on sorption and desorption of organic contaminants by soils and sediments. *Applied Geochem.* **18**: 955-972
- Insam H., 1996. “Microorganisms and humus in soils”. Humic Substances in Terrestrial Ecosystems. (eds. A. Piccolo) pp. 265-296, Elsevier, Amsterdam
- Jastrow, J.D. (1996) Soil aggregate formation and the accrual of particulate and mineral-associated organic matter. *Soil Biol. Biochem.* **28**: 665-676

Johnson-Logan, L.R., Broshears, R.E. and Klaine, S.J. (1992) Partitioning behavior and the mobility of chlordane in groundwater. *Environ. Sci. Technol.* **26**: 2234-2239.

Kan, A.T., Fu, G., Thomson, M.B.(1994) Adsorption/Desorption hysteresis in organic pollutant and soil/sediment interaction. *Environ. Sci.Tecnol.* **28**: 859-867

Kästner, M. (2000) “ Humification “ Process or formation of refractory soil organic matter. In: Rehm, H.J., Reed, G., Pülher, A., Stadler, P. (eds) *Biotechnology*, vol.11 b, *Environmental Processes–Soil decontamination, Waste gas treatment, Potable water preparation*. Wiley-VCH, Weinheim: 90-125

Kästner, M. and Richnow, H.H. (2001) Formation of residues of Organic Pollutants within the Soil Matrix-Mechanisms and Stability. In: *Treatment of Contaminated Soil-Fundamentals, Analysis, Applications* (2001). Calmano, W., Matz, G. (Eds.) Springer-Verlag, Berlin: 221-226

Karickhoff S. W. (1984) Organic pollutant sorption in aquatic systems. *J. Hydraul. Eng.* **110**: 707-735. Zhou J. L., Rowland S., Mantoura R. F. C. and Braven J.

Kelsey, J.W., Alexander, M. (1997) Declining bioavailability and inappropriate estimation of risk of persistent compounds. *Environ. Toxicol. Chem.* **16**: 582-585

Kemper, W.D., Rosenau, R.C., 1986, Aggregate stability and size distribution, p. 425-442, in A. Klute (ed.) *Methods of soil analysis, Part I*, 2<sup>nd</sup> ed., Agron. Monogr. 9. ASA and SSSA, Madison, WI

Kile, D.E., Wershaw, R.L., Chiou, C.T.(1999) *Environ. Sci. Technol.* **33**: 2053-2056

Kim, Y., Lee, D. (2002) Solubility enhancement of PCDD/F in the presence of dissolved humic matter. *J. Haz. Mat.* **B91**: 113–127

Klausen, J.; Haderlein, S.B.; Scharzenbach, R.P. *Environ. Sci. Technol.* (1997) **31**: 2642-2649

Kuhlman, M.I., Greenfield, T.M., (1999) Simplified soil washing processes for a variety of soils. *Journal of Hazardous Materials* **66**: 31–45

Kiem, R., Knicker, H., Ligouis, B., Kögel-Knabner, I. (2003) Airborne contaminants in the refractory organic carbon fraction of arable soils in highly industrialized areas *Geoderma* **114**: 109– 137

Kopinke, F.-D., Georgi, A., Mackenzie, K. (2000) Sorption and chemical reactions of PAHs with dissolved humic substances and related model polymers, *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, **28**: 385-399

Kuhlman, M.I., Greenfield, T.M. (1999) Simplified soil washing processes for a variety of soils. *Journal of Hazardous Materials* **66**: 31–45

Labat, G., Meunier, B. (1989) *J. Org. Chem.* **54**: 5008

Labat, G.; Seris, -L.; Meunier, B. *Angew. Chem. (1990) Int. Ed. Engl.* **29**: 1471-1473

Laha, S., Liu, Z., Edwards, D., and Luthy, R.G. (1990) The potential for solubilizing agents to enhance the remediation of hydrophobic organic solutes in soil-water system. In “*Gas, oil, coal, and environmental biotechnology II*”. Smith, J. and Akin, C. (Eds.) Chicago, Institute of Gas Technology Press: 280-295

Lee, D.-H., Cody, R.D., Kim, D.-J., Choi, S. (2002) Effect of soil texture on surfactant-based Remediation of hydrophobic organic-contaminated soil. *Environment International* **27**: 681–688

Liu, C., Huang, P.M.(1999) In: *Understanding Humic Substances: Advanced Methods, Properties and Application*. Ghabbour, E.A., Davis, G. (Eds.). Royal Society of Chemistry, Cambridge: 87-100

Liu, Z., Laha, S., and Luthy, R., G. (1991) Surfactant solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbon compound in soil-water suspensions. *Water Sci. Technol.* **23**: 475-485

- Luthy, R.J., Aiken, G.R., Brusseau, M.L., Cunningham, S.D., Gschwend, P.M., Pignatello J.J., Reinard, M., Traina, S.J., Weber, Jr., W.J., Westall, J.C. (1997) Sequestration of hydrofobic organic contaminants by geosorbent. *Environ. Sci. Technol.* **31**: 3341-3347
- Mackay, D., Fraser, A., (2000) Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models. *Environmental Pollution* **110**: 375-391
- Maldotti, A., Molinari, A., Bergamini, P., Amadelli, Battioni, P., Mansuy, D.(1996) Photocatalitic oxidation of cyclohexane by (nBu<sub>4</sub>N)<sub>4</sub>W<sub>10</sub>O<sub>32</sub>/Fe(III) porphyrins integrated systems. *Journal of molecular catalysis* **113**:147-157
- Maldotti, A., Molinari, A., Amadelli, R. (2002) Photocatalysis with Organized Systems for the oxofunctionalization of hydrocarbons by O<sub>2</sub>. *Chem.Rev.* **102**: 3811-3836
- Mann, M.J. (1999) Full-scale and pilot-scale soil washing. *J. Haz. Mat.* **66**: 119–136
- Mao, J.-D., Xing, B. Schmidt-Rohr (2001) New structural information on a humic acid from two-dimensional <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C correlation solid state nuclear magnetic resonance. *Environ. Sci.Technol.* **35**: 1928-1934.
- Marschner, B., Kalbitz, K. (2003) Controls of bioavailability and biodegradability of dissolved organic matter in soils. *Geoderma* **113**: 211–235
- Martens, D., Gfrerer, M., Wenzl, T., Zhang, A., Gawlik, B.M., Schramm, K.W., Lankmayr, E., Kettrup, A. (2002) Comparison of different extraction techniques for the determination of polychlorinated organic compounds in sediments. *Anal. Bioanal. Chem.* **372**: 562-568
- Mata-Sandoval, J.C., Karns, J., Torrents, A. (2002) Influence of Rhamnolipids and Triton X-100 on the desorption of pesticides from soils. *Environ. Sci. Technol.* **36**: 4669-4675
- Meunier, G., Meunier, B.(1985) Evidence for an efficient of demethylation of methoxy ellipticine catalized by a peroxidase. *J. Am. Chem. Soc.* **107**: 2558-60

- Minemy, S.C.B., Brown, J.T., Martinez, G.A., Meyer-Ilse (1999) *W. Science*. **286**: 1335
- Morimoto, K., Tatsumi, K. (1997) Effect of Humic Substances on the Enzymatic Formation of OCDD from PCP. *Chemosphere* **34**: 1277-1283
- Mulder, H., Breure, A.M., Rulkens, W.H. (2001) Application of a mechanistic desorption-biodegradation model to describe the behavior of polycyclic aromatic hydrocarbons in peat soil aggregates. *Chemosphere* **42**: 285-299
- Nardi, S., Sessi, E., Pizzeghello, D., Sturaro, A., Rella, R., Pargoli, G. (2002) Biological activity of soil organic matter mobilized by root exudates. *Chemosphere* **46** 1075–108
- Noordman, W.H., Bruining, J.-W., Wietzes, P., Janssen, D.B. (2000) Facilitated transport of a PAH mixture by a rhamnolipid biosurfactant in porous silica matrices. *J. Contam. Hydr.* **44**: 119-140
- Oades, J.M., Waters, A.G. (1991) Aggregate hierarchy in soils. *Austr. J. Soil Sci.* **29**: 815-828
- Ockenden, W.A., Breivik, K., Meijer, S.N., Steinnes, E., Sweetman, A.J., Jones, K.C. (2003) The global re-cycling of persistent organic pollutants is strongly retarded by soils. *Environ.Poll.* **121**: 75–80
- Paustian K., Parton W.J. & Persson J. (1992) Modeling Soil Organic Matter in Organic-Amended and Nitrogen-Fertilized Long-Term Plots. *Soil Science Society of American Journal* **56**: 476-488.
- Pefferkorn, E. (1997) Structure and stability of natural organic matter/soil complexes and related synthetic and mixed analogues. *Adv. Coll. Int. Sci.* **73**: 127-200
- Pfeifer, T., Klaus U., Hoffmann, R., Spiteller, M. (2001) Characterisation of humic substances using atmospheric pressure chemical ionisation and electrospray ionisation mass spectrometry combined with size-exclusion chromatography. *Journal of chromatography* **926**: 151-159

Piatt, J.J., Backhus, D.A., Capel, P.D., Eisenreich, S. (1996) *Environ. Sci. Technol.* **30**: 751-760

Piccolo, A. (1996) "Humus and soil conservation". *Humic Substances in Terrestrial Ecosystem.* (eds . A. Piccolo) pp. 225-264, Elsevier, Amsterdam.

Piccolo, A. (2002) The Supramolecular Structure of Humic Substances: a Novel Understanding of Humus Chemistry and Implications in Soil Science. *Adv. Agron.* **75**: 57-134

Piccolo, A., Celano, G., Conte, P. (1996) Adsorption of glyphosate by humic substances. *J. Agric. Food Chem.* **44**: 2442-2446.

Piccolo, A., Conte, P. (2000) Molecular size of humic substances. Supramolecular associations versus macromolecular polymers. *Adv. Environm. Res.* **3**: 508-521

Piccolo, A., Conte, P., Cozzolino, A., (1999a) Effects of mineral and monocarboxylic acids on the molecular association of dissolved humic substances. *Eur. J. Soil Sci.* **50**: 687-694

Piccolo, A., Conte, P., Cozzolino, A., and Spaccini, R., 2001. Molecular Sizes and association Forces of Humic Substances in solution. *In* " Humic Substances and chemical Contaminants" (C.E. Clapp, M. H. B. Hayes, N. Senesi, P. Bloom, and P.M. Jardine, Eds.); Soil Science Society of America Inc., Madison, WI: 89-118

Piccolo, A., Conte, P., Scheunert, I., and Paci, M. (1998). Atrazine interaction with soil humic substances of different molecular structure. *Journal of Environ. Q.* **27**: 1324-1333.

Piccolo, A., Conte, P., Spaccini, R., Chiarella, M. (2003) Effects of some dicarboxylic acids on the association of dissolved humic substances. *Biol. Fertil. Soils* **37**: 255-259

Piccolo, A., Conte, P., Tagliatesta P. (2004) Increased conformational rigidity of humic substances by oxidative biomimetic catalysis. *Biomacromolecules* (in press)

- Piccolo, A., Conte, P., Trivellone E., Van Lagen B., P. Buurman P. (2002) "Reduce heterogeneity of a lignite humic acid by preparative HPSEC following interaction with an organic acid. Characterization of size-separates by PYR-GC-MS and <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. *Environmental Science and Technology* **36**: 76-84
- Piccolo, A., Cozzolino, A., Conte P. (2001). Chromatographic and spectrophotometric properties of dissolved humic substances as compared to macromolecular polymers. *Soil Sci.* **166**: 174-185
- Piccolo, A., Cozzolino, A., Conte P., and Spaccini, R. (2000) Polymerization of humic substances by an enzyme catalized oxidative coupling. *Naturwissenschaften* **87**: 391-394
- Piccolo, A., Mbagwu, J.S.C. (1999) Role of hydrophobic components of soil organic matter in soil aggregate stability. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **63**: 1801-1810
- Piccolo, A., Nardi, S., and Concheri, G. (1996b). Micelle-like conformation of humic substances as revealed by size-exclusion chromatography. *Chemosphere* **33**: 595-60
- Piccolo, A., Nardi, S., and Concheri, G. (1996c) Macromolecular changes of soil humic substances induced by interaction with organic acids. *Eur. J. Soil Sci.* **47**: 319-328
- Piccolo, A., Spaccini, R., Haberhauer, G., and Gerzabek, M.H.(1999). Increased sequestration of organic carbon in soil by hydrofobic protection. *Naturwissenschaften* **86**: 496-499.
- Piccolo, A. and M. Spiteller (2003) Electrospray ionization mass spectrometry of terrestrial humic substances and their size-fractions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **377**: 1047-1059
- Plante, A.F., McGill, W.B. (2002) Soil aggregate dynamics and the retention of organic matter in laboratory-incubated soil with differing simulated tillage frequencies. *Soil Till. Res.* **66**: 79-92
- Poole, S.K., Dean, T.A., Oudsema, J.W., Poole, C.F. (1990) *Anali. Chim. Acta* **236**: 3-42

Preston, C. M. (1996) Application of NMR to soil organic matter analysis: History and prospects. *Soil Sci.* **161**: 144-166

Puget, P., Chenu, C., Balesdent, J. (2000) Dynamics of soil organic matter associated with particle-size fractions of water-stable aggregates. *Eur. J. Soil Sci.* **51**: 595-605

Rebhun, M., De Smedt, F. and Rwetabula J. (1996) Dissolved humic substances for remediation of sites contaminated by organic pollutants. Binding-desorption model predictions. *Wat. Res.* **30** (9): 2027-2038

Richnow, H.H., Seifert, R., Hefter, J., Kästner, M., Mahro B., Michaelis, W. (1994) Metabolites of xenobiotica and mineral oil constituents linked to macromolecular organic matter in polluted environments. *Adv. Org. Geochem.* **36**: 671-681

Rouse, J.D., Sabatini, D.A., Suflita, J.M. and Harwell, J.H. (1994) Influence of surfactants on microbial degradation of organic compounds, CRC Crit. Rev. *Environm. Sci. Technol.* **24**: 325-370

Rullkotter, J. and Michaelis, W. (1989) The structure of kerogen and related materials. A review of recent progress and future trends. *Org. Geochem.* **16**: 829-842

Sandbacka, M., Christianson, I., Isomaa, B. (2000) The Acute Toxicity of Surfactants on Fish Cells, *Daphnia magna* and Fish – A Comparative Study, *Toxicology in Vitro* **14**: 61-68

Saponaro, S., Bonomo, L., Barbaferi, M., Petruzzelli, G. (2002) Soil Washing Feasibility at a Manufacturing Gas Plant Site. *Soil and Sediment Contamination* **11**(5): 751-767

Schlesinger W.H., 1997. Biogeochemistry: An Analysis of Global Change. pp126-165 2<sup>nd</sup> ed., Academic Press San Diego

Schnitzer, M. (1978) Humic Substances: Chemistry and Reactions. In: Schnitzer, M., Khan, S.U., (Eds), *Soil Organic Matter*, Elsevier, Amsterdam 3

Schwarzenbach R. P., Gschwend P. M. and Imboden D. M. (1993) Environmental Organic Chemistry. John Wiley & Sons, Inc., New York.

Schwarzenbach, A.R., Gschwend, P.M., Imboden, D.M. (2003) Environmental organic chemistry, 2nd ed., J. Wiley and Sons, NY

Sheldon, R. (1994) Oxidation Catalysis by metalloporphyrins. In: metalloporphyrins in catalytic oxidations (Roger and Sheldon Eds) Macel Dekker Inc. New York.

Simcik, M.F., Eisenreich, S.J., Liou, P.J. (1999) Source apportionment and source/sink relationships of PAHs in the coastal atmosphere of Chicago and Lake Michigan. *Atmospheric Environment* **33**: 5071-5079

Smith T.M., Shugart H.H. (1993) The transient response of terrestrial carbon storage to a perturbed climate. *Nature* **36**: 523-526.

Song, R; Sorokin, A.; Bernardou, J.; Meunier, B. (1997) Metalloporphyrin-catalyzed oxidation of 2-methylnaphtalene to vitamin K<sub>3</sub> and 6-methyl-4-naphtoquinone by potassium monopersulfate in aqueous

Steelink, C. (2002) Investigating Humic Acids in Soils. *Analytical Chemistry* **74**: 326-333

Stevenson F.J. (1991) "Organic Matter-Micronutrient Reaction in Soil. Micronutrient in Agriculture". 2<sup>nd</sup> Edition. Soil Sci.Soc. Am., Madison, WI. pp.145-186.

Stevenson F.J. (1994). Humus chemistry: Genesis, composition and reactions. 2<sup>nd</sup> ed. Wiley-Intersci., New York.

Suslick, K.S., Watson, R.A. (1992) The Photochemistry of Chromium, Manganese, and Iron Porphyrin Complexes. *New J. Chemistry* **16**: 633-642

Swift, R.S. (1999) Macromolecular properties of soil humic substances: fact, fiction, and opinion. *Soil Sci.* **164**: 790-802

Tiehm A., Stieber M., Werner, P., Frimmel, F.H. (1997) Surfactants-enhanced mobilization and biodegradation of polycyclic hydrocarbons in manufactured gas plant soil. *Environm. Sci. Technol.* **31**: 2570-2576

Thorn, K.A., Goldenberg, W.S., Younger, S.J., Weber, E.J. (1996) Covalent Binding of Aniline to Humic Substances. In: Humic and Fulvic Acids. ACS Symposium Series, No.651.(Edited by Gaffney, J.S., Marley N.A. and Clark S.B.); American Chemical Society: Washington, D.C.; 1996: 299-306

Tombacz, E.; Rice, J.A. (1999) In “Understanding Humic Substances: Advanced Methods, Properties and Application” ; Ghabbour, E. A., Davies, G., Eds.; Royal Society of Chemistry, Cambridge, U.K.: 69-77

USEPA (U.S. Environmental Protection Agency) 1991 *Guide to conducting treatability studies under CERCLA: soil washing*. Risk reduction Engineering Laboratory, Cincinnati, OH 45268 and Office of Solid Waste and Emergency Response, Washington, DC 20460. EPA/540/2-91/020A. September 1991

USEPA (U.S. Environmental Protection Agency) 1993. *Innovative Site Technology*. Volume 3. *Soil Washing/ Soil flushing*. Office of Solid Waste and Emergency Response, Washington, DC 20460. EPA/542/B-93/012. November 1993

Venkataraman, C., Negi, G., Sardar, S.B., Rastogi, R. (2002) Size distributions of polycyclic aromatic hydrocarbons in aerosol emissions from biofuel combustion. *Aerosol Science* **33**: 503–518

Watts, C.W., Eich, S., Dexter A.R. (2000) Effects of mechanical energy inputs on soil respiration at the aggregate and field scales. *Soil Till. Res.* **53**: 231-243

Weng, L., Temminghoff, E.J.M., Lofts, S., Tipping, E., Van Riemsdijk, W.H. (2002) Complexation with dissolved organic matter and solubility control of heavy metals in a sandy soil. *Environ. Sci. Technol.* **36**: 4804-4810

Wershaw, R. L. (1986) A new model for humic materials and their interactions with hydrophobic chemicals in soil water and sediment-water systems. *J. Contam. Hydrol.* **1**: 29-45

Wershaw, R. L. (1993) Model for humus in soils and sediments. *Environ. Sci. Technol.* **27**: 814-816

White, J.C., Pignatello J.J. (1999) Influence of Bisolute Competition on the Desorption Kinetics of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in soil. *Environ. Sci. Technol.* **33**: 4292-4298

Xing, B. (1997) The effect of the quality of soil organic matter on sorption of naphthalene. *Chemosphere* **35**: 633-642

Xing, B. (2001) Sorption of anthropogenic organic compounds by soil organic matter: a mechanistic consideration. *Soil Sci.* **81**: 317-323

Xing, B., McGill, W.B. and Dudas, M.J. (1994) Cross-correlation of polarity curves to predict partition coefficient of nonionic organic contaminants. *Environm. Sci. Technol.* **28**: 1929-1933

Xing, B., Pignatello, J.J. (1997) Dual-mode sorption of low polarity compounds in glassi poly (vinyl chloride) and soil organic matter. *Environ. Sci. Technol.* **31**: 792-799

Yeom, I.T., Ghosh, M.M., and Cox, C.D. (1996) Kinetic aspects of surfactant solubilization of soil-bound polycyclic aromatic hydrocarbons. *Env. Sci. Technol.* **30**: 1589-1595

Zhou, J.L., Rowland, S.J. (1997) Evaluation of the interactions between hydrophobic organic pollutants and suspended particles in estuarine waters. *Wat. Res.* **31**: 1708-1718

Nome Commerciale	Triton X-100	SDS
Composto	Polietossietene <sub>(10)</sub> isooctil Feniletere	Sodio Dodecilsolfato
Peso molecolare	625	288
HLB	13,5	40
CMC(nM)	0.24	8
Formula molecolare	(C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> )C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> OH	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> SO <sub>4</sub> Na
Tipo	Non ionico	anionico

SINTESI DELLA TESI DI DOTTORATO DI RICERCA IN  
“ **VALORIZZAZIONE E GESTIONE DELLE RISORSE  
AGROFORESTALI**”

INDIRIZZO “BONIFICA E DIFESA DEL SUOLO”- XVII CICLO -

Attività di ricerca svolta dalla dott.sa Anna Agretto (2001-2004)

Docente guida: prof. Alessandro Piccolo

**Titolo della tesi:**

***“Uso di sostanze chimiche esogene per il risanamento di suoli contaminati”***

La riutilizzazione delle aree industriali dismesse o degradate riveste un carattere strategico per uno sviluppo economico ambientalmente compatibile. Il problema è già di notevole consistenza e destinato ad ampliarsi a breve termine; infatti, nonostante la produzione e l'impiego industriale di molti composti organici clorurati siano stati sospesi molti anni fa o avvengano sotto stretto controllo in processi chiusi, numerosi sono i siti contaminati da detti composti xenobiotici da bonificare sia in Italia che all'estero.

Per tale motivo, numerosi sono i contributi e le competenze scientifiche che vedono impegnate numerose UdR sul tema dei siti contaminati che riguardano sia lo studio dei processi di degradazione delle sostanze chimiche tossiche sia lo sviluppo di tecnologie di bonifica chimica e biologica (*chemiremediation* e *bioremediation*) *in situ* ed *ex situ*.

Nell'ambito delle ricerche sui trattamenti chimici di bonifica, per lo studio di tesi, l'attività di ricerca ha focalizzato l'attenzione sull'applicabilità e l'ottimizzazione di opportune tecniche di estrazione chimica finalizzate all'abbattimento del carico inquinante organico di un suolo proveniente dal sito industriale ex ACNA, una delle più storiche aziende chimiche, con sede a Savona.

In particolare, le attività sperimentali sono state condotte, durante il primo anno, esclusivamente su un campione di suolo corrispondente al sondaggio A5 136B (denominato suolo A).

Il suolo in oggetto, dopo essere stato essiccato all'aria e vagliato con setaccio a 2 mm, è stato analizzato circa la tessitura -costituita dal 21.2 % di sabbia grossolana, dal 35.6% di sabbia fine, dal 39.6% in silt e da 3.6% in argilla- e per il contenuto di carbonio organico(C)- pari al 2.83 %.

Sulla base delle informazioni già disponibili circa la contaminazione del sito fornite dall'ARPAP (Environmental Agency of Piemonte), il suolo è caratterizzato da una presenza rilevante di clorobenzeni, cloroaniline e naftalene, oltre a una significativa presenza di arsenico, rame e mercurio presenti molto al di sopra dei limiti di accettabilità.

Lo scopo della tesi è stato la definizione di una appropriata procedura analitica di determinazione degli inquinanti organici nel suolo studiato e, in generale, nei suoli caratterizzati da contaminazione organica, finalizzata all'individuazione di una tecnologia innovativa per l'abbattimento del carico inquinante organico presenti nel suolo del sito industriale ex ACNA. Si è voluta, in particolare, confrontare l'efficacia di sostanze naturali esogene, quali le sostanze umiche(HA) nel processo di lavaggio del suolo rispetto alle sostanze che normalmente vengono impiegate nel *soil washing*, come l'SDS (sodiododecilsolfato) e il TRITON X-100(isoetil-fenossi-polietossietanolo). E' stata inoltre, valutata la possibilità di usare un catalizzatore biomimetico, quale una ferro-porfirina di sintesi (Fe-Pha) per la detossificazione di sostanze xenobiotiche mediante un meccanismo di ossidazione radicalica. L'effetto sinergico di HA e Fe-Pha, mediante una reazione ossidativa impiegando catalizzatori biomimetici, sulla stabilizzazione della sostanza organica è stato considerato quale possibile strategia di risanamento di suoli contaminati da sostanze organiche.

### Procedura estrattive

Sono stati confrontati due diversi metodi di estrazione e quindi di analisi chimica dei contaminanti organici presenti nel suolo indagato. In particolare è stata paragonata l'efficienza di estrazione dei metodi Soxhlet e ultrasonificazione applicati sia direttamente sul suolo tal quale sia dopo lavaggio dello stesso( *soil washing*):

1. Estrazione Soxhlet: sono stati utilizzati 10 g di suolo in 100 ml di una miscela di acetone/n.esano (1:1, v/v) fatta riciclare nel sistema per circa 72 ore a una temperatura di circa 60° C. Dopo estrazione alla fase organica è stata aggiunta una soluzione di NaOH (pH=11) per effettuare la rimozione dei contaminanti organici attraverso una semplice estrazione liquido-liquido. L'estratto è stato infine filtrato, portato a secco al rotavapor e portato a un volume finale di 2 ml con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.
2. Ultrasonificazione: lo stesso contenuto di suolo, sospeso in 100 ml di acetone/n.esano(1:1,v/v), è stato sottoposto a un'energia totale di 39.6 kJ (55 watt) per 12 minuti. La sospensione è stata poi filtrata attraverso filtri Whatman 40 e la fase organica è stata concentrata a un volume finale di 2 ml con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

Soil washing: la tecnica di lavaggio del terreno (soil washing), che può essere effettuata in situ o ex situ, prevede l'estrazione degli inquinanti dalla matrice solida per trasferimento in fase liquida; il fluido di lavaggio è in genere acqua o una soluzione acquosa contenente un reagente chimico opportunamente scelto. Nel caso ACNA sono stati utilizzati HA, SDS, TRITON X-100 e H<sub>2</sub>O a diverse concentrazioni; successivamente le fasi organiche sono state rimosse dalle acque di lavaggio sia mediante estrazione *Soxhlet* che *Ultrasonificazione* al fine di un confronto analitico degli estratti preceduti da stadi di concentrazione degli stessi.

#### Analisi GC-MS

Sia i contaminanti estratti dal suolo tal quale che quelli ottenuti dal suolo lavato con HA, SDS, TRITON X-100 e H<sub>2</sub>O sono stati poi purificati su cartucce SPE e gli eluati in n.esano portati a secco al rotavapor. I prodotti secchi sciolti in 1 ml di CH<sub>2</sub>CL<sub>2</sub> sono stati analizzati per gascromatografia-spettrometria di massa (GC-MS) permettendo la caratterizzazione qualitativa dei contaminanti organici presenti nel campione di suolo A.

L'attività sperimentale condotta durante il secondo anno di dottorato ha permesso anche la caratterizzazione quantitativa dei singoli contaminanti organici individuati nel suolo oggetto di studio mediante uso di Octafluoronaftalene che serve come standard interno per le analisi quantitative GC-MS.

I risultati sperimentali hanno dimostrato una netta prevalenza di idrocarburi policiclici aromatici (86%) rispetto agli altri contaminanti presenti (14%) ascrivibili a sistemi monoaromatici quali clorobenzeni e cloroaniline o a molecole semplici quali tiofeni, sulfoni, difenileteri e bifenili.

La sperimentazione ha permesso inoltre, una valutazione delle prestazioni delle due tecniche estrattive utilizzate per la rimozione di xenobiotici organici - *soxhlet e sonicazione* - scelte per questo lavoro, perché tra quelle maggiormente utilizzate a tale scopo. Le rese di estrazione relative al suolo A5 136B dimostrano che entrambe le procedure sono del tutto equivalenti per quanto riguarda il contenuto totale di contaminanti estratti preferendo la sonicazione alla soxhlet per la maggiore velocità di esecuzione.

Sono state condotte inoltre, analisi finalizzate a una stima dell'efficienza estrattiva mediante trattamenti di lavaggio chimico con soluzioni di tensioattivi ionici naturali, quali le sostanze umiche (HA), paragonandole a quelle di tensioattivi sintetici ionici e non ionici e alla sola acqua deionizzata per la rimozione dei contaminanti organici polari. Le indagini quantitative mediante CG-MS hanno evidenziato che il lavaggio del campione di suolo proveniente dal sito contaminato ACNA mediante uso della soluzione umica è risultato efficiente quanto quello effettuato mediante surfattanti sintetici (SDS e TX-100) ampiamente utilizzati in campo ambientale per la decontaminazione da residui idrofobici. In particolare si è potuto verificare che la sola acqua deionizzata abbatta solo per il 20% il carico totale di inquinanti del suolo dell' ex stabilimento ACNA di Cengio. Al contrario sia i tensioattivi sintetici che quelli naturali abbattano il contenuto totale di contaminanti del 60-72%. Tuttavia, malgrado il TX-100 e l'SDS mostrino spiccate capacità solubilizzanti sui composti idrofobici, si ritiene che possano avere poche prospettive di impiego nella soil remediation a causa della loro recalcitranza e tossicità.

Infatti, oltre alla loro limitata biotossicità ed efficienza di estrazione, valutazioni di tipo anche economico suggeriscono l'utilizzo di soluzioni umiche per il loro basso costo e per la loro compatibilità con l' ambiente, essendo molecole di origine naturale.

L' attività di ricerca intrapresa durante il secondo anno di dottorato ha riguardato essenzialmente la sperimentazione condotta su un altro campione di suolo (denominato B) prelevato in una fase successiva della stessa zona contaminata del sito oggetto di studio al fine della riproducibilità delle metodiche estrattive applicate al suolo già studiato. A tale scopo sono state ottimizzate le tecniche di estrazione con particolare riguardo all'ammontare di solvente, al numero e alla durata delle fasi di estrazione.

L'elaborazione dei dati ottenuti, effettuata durante l'ultimo anno di dottorato, ha permesso la caratterizzazione sia chimico-fisica che quali-quantitativa anche del secondo suolo sottoposto ad indagine. I due suoli ACNA hanno mostrato una significativa differenza da un punto di vista granulometrico, risultando il suolo B più ricco in componenti sottili (sabbia fine, limo e argilla) rispetto al suolo A. La diversa efficienza estrattiva di entrambi i metodi selezionati per questo studio nei suoli A e B può essere attribuita alla loro diversa tessitura, laddove tale differenza risulta più evidente quando si confrontano i risultati relativi alla sonicazione. In particolare, nel suolo B, la sonicazione, permette di solubilizzare, i contaminanti adsorbiti sulla superficie esterna delle particelle sottili che si formano per disaggregazione dei macroaggregati più stabili, grazie all'energia prodotta dalle vibrazioni ultrasoniche. Nel suolo A, invece, per la presenza di aggregati meno stabili, le due tecniche hanno permesso di estrarre con la stessa efficienza i contaminanti adsorbiti alla superficie esterna delle particelle di taglia superiore. Le conseguenti implicazioni analitiche portano a sostenere l'uso della sonicazione come tecnica di estrazione adatta a tutti i tipi di suoli, raccomandata soprattutto per la maggiore velocità di esecuzione.

Relativamente ai trattamenti di lavaggio, i risultati hanno mostrato che l'acqua non rimuove efficacemente i contaminanti dal suolo A, mentre è risultata più efficiente nel suolo B, soprattutto quando è stata usata la sonicazione come procedura di estrazione, attribuendone il motivo, anche in questo caso, alla sottile tessitura del suolo B, dove un processo di aggregazione delle particelle di suolo in acqua limita l'estrazione dei contaminanti con la soxhlet.

I trattamenti di lavaggio condotti sia con surfattanti sintetici (SDS e TX-100) che con surfattanti naturali (HA), condotti sul suolo B, hanno confermato la loro maggiore efficienza rispetto all'acqua nel rimuovere i contaminanti organici dai due suoli contaminati, in particolare, l'impiego *acido umico*,

come surfattante naturale, ha reso possibile la rimozione di un ammontare di contaminanti simile a quello ottenuto mediante i surfattanti sintetici.

In generale, tutti i trattamenti di lavaggio hanno determinato la rimozione di un più ampio ammontare di Ipa (idrocarburi policiclici aromatici), ciò dovuto essenzialmente a una redistribuzione dei contaminanti sulla superficie interna o esterna dei nuovi aggregati formati dopo i trattamenti con i surfattanti.

L'interesse dell'attività di ricerca svolta per il Consorzio INCA nell'ambito del programma ACNA-Bonifica di Siti Inquinati si è focalizzato, durante l'ultimo anno, anche sull'impiego di metodi catalitici che possono costituire sistemi alternativi validi per il controllo dell'inquinamento e per lo sviluppo di una chimica sostenibile.

La grande efficienza e selettività che caratterizza i sistemi catalitici ha importanti implicazioni ambientali: consentono di ottimizzare la resa e la selettività dei processi anche in condizioni blande di temperatura e pressione.

Studi recenti, in particolare, hanno dimostrato la possibilità di ottenere reazioni di polimerizzazione ossidativa di sostanza unica terrestre impiegando catalizzatori biologici (perossidasi) o biomimetici (metalloporfirine).

Il nostro interesse, come gruppo di ricerca, è rivolto, in particolare, ai catalizzatori biomimetici, scelti poiché, oltre ad essere attivi come quelli naturali e molto più resistenti nell'ambiente, possono essere specificamente attivati dalla luce solare e dall'ossigeno, rendendo economicamente vantaggioso e ambientalmente compatibile il processo d'interesse.

La possibilità di copolimerizzare covalentemente contaminanti organici nelle matrici umiche mediante reazioni di accoppiamento ossidativo utilizzando una ferro-porfirina di sintesi, è stata parte di oggetto di studio durante il terzo anno di dottorato.

A tale scopo è stato messo a punto un set di esperimenti effettuati solo sul suolo A per valutarne la possibilità di applicazione sia in termini tecnici che

economici rispetto al solo trattamento di lavaggio chimico con acido umico esogeno.

Dal primo suolo caratterizzato, denominato (A5 136), sono stati prelevati campioni di circa 40 g e sottoposti ad ammendamento con acido umico isolato da una Leonardite del Nord Dakota preventivamente sciolto in 20 ml di H<sub>2</sub>O. I suoli così trattati sono stati lasciati essiccare all'aria e sottoposti a due successivi trattamenti: 1. trattamento con 20 ml di una soluzione di Ferroporfirina (2mg FePha/20ml H<sub>2</sub>O), 2. Trattamento con FePha a cui sono stati aggiunti 3 ml di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 8.6 M.

I risultati mostrano che l'aggiunta di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> come agente ossidante dopo trattamento con HA e FeP

ha prodotto una reazione di copolimerizzazione ossidativa, riducendo del 70% i contaminanti estratti, mentre la presenza di HA e FeP da soli non è efficace nel diminuire significativamente l'estrazione del contenuto totale dei contaminanti.

In un altro esperimento i campioni di suolo sono stati sottoposti all'azione della miscela di reazione **1.** FeP-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e alla sola azione di **2.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> senza la precedente aggiunta di acido umico.

Questi esperimenti mostrano che mentre la sola presenza di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> non ha alcun effetto sul suolo contaminato, laddove l'azione concertata di Fe-P e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> riduce l'estrattibilità dei contaminanti di circa il 50%.

Questo lavoro, che necessita di essere ulteriormente approfondito, indica che la catalisi biomimetica in presenza di un ambiente ossidante può essere un valido metodo di decontaminazione dei suoli, la cui efficacia è aumentata in presenza di acido umico.

Il vantaggio nell'uso di HA in presenza del catalizzatore biomimetico risiede nell'inattivazione dei contaminanti che vengono copolimerizzati alla sostanza organica naturale senza alcun effetto negativo sull'ambiente.

Questa tecnologia innovativa a base di catalizzatori biomimetici, rivelatasi già promettente per la stabilizzazione chimica e fisica dei suoli, può risultare altamente efficace per il risanamento di suoli contaminati, poiché l'immobilizzazione covalente dei contaminanti ne limita i potenziali danni che deriverebbero dalla loro percolazione attraverso il suolo e, infine, dalla loro immissione in falda.