



Provincia  
di Milano

Atti del Convegno

Milano, 3 Dicembre 2004

# Nuovi indirizzi nella bonifica dei siti contaminati

La prassi, la normativa, le nuove tecnologie

*BIORISANAMENTO IN SITU DI FALDE CONTAMINATE  
DA SOLVENTI CLORURATI:  
UN CASO DI STUDIO IN PROVINCIA DI MILANO*

*Andrea Zelioli - Provincia di Milano, Servizio Bonifiche Siti Contaminati  
Arcangelo Calloni, Paolo Sala, Francesco Vesci - Provincia di Milano, Servizio  
Controllo Centri di Pericolo e Industrie a Rischio  
Federico Aulenta, Mauro Majone, Marco Petrangeli Papini- Dipartimento di  
Chimica, Università degli Studi di Roma "La Sapienza"  
Michele Leccese, Paolo Viotti, - Dipartimento di Idraulica, Trasporti e Strade,  
Università degli Studi di Roma "La Sapienza"  
Simona Rossetti, Valter Tandoi- Istituto di Ricerca sulle Acque, CNR Roma*



# BIORISANAMENTO IN SITU DI FALDE CONTAMINATE DA SOLVENTI CLORURATI: UN CASO DI STUDIO IN PROVINCIA DI MILANO

## Parte I - Inquadramento del Sito Campione

Andrea Zelioli - Provincia di Milano, Servizio Bonifiche Siti Contaminati  
Arcangelo Calloni, Paolo Sala, Francesco Vesci - Provincia di Milano, Servizio  
Controllo Centri di Pericolo e Industrie a Rischio

### RIASSUNTO

Nell'ambito delle competenze espletate dalla Provincia di Milano per l'individuazione delle aree sorgente di contaminazione della falda e per la loro successiva bonifica, è stata attivata la collaborazione con l'Università di Roma "La Sapienza" - Dipartimenti di Chimica e Idraulica e con il CNR IRSA di Roma per la partecipazione al progetto di ricerca e sperimentazione di nuove tecnologie di biorisanamento in situ delle falde contaminate da solventi clorurati.

La Provincia si è quindi impegnata a scegliere un sito campione idoneo e a garantire il necessario supporto logistico e informativo circa l'area individuata.

Le caratteristiche peculiari di tale sito rispondono alla presenza di un'elevata contaminazione da solventi clorurati, alla buona conoscenza delle caratteristiche generali del sito sotto il profilo idrogeologico ed idrochimico, grazie ad una lunga attività ivi espletata dalla Provincia in collaborazione con ASL, ARPA, Amministrazioni Comunali e soggetti privati coinvolti, alla possibilità di eseguire in loco sondaggi e piezometri per l'integrazione puntuale delle informazioni, ed infine alla possibilità da parte degli Enti di ricerca di eseguire in tutta sicurezza ed autonomia un test di campo in situ.

Il sito individuato, posto in un Comune della fascia occidentale dell'hinterland milanese, viene di seguito descritto nelle sue caratteristiche peculiari sia sotto il profilo storico dell'attività industriale che del fenomeno di inquinamento da esso generato e del contesto idrogeologico in cui è inserito.

## IL SITO CAMPIONE

### La storia industriale del sito

Il sito ha una lunga storia di contaminazione, in conseguenza di diverse tipologie di produzioni industriali che si sono succedute nel corso degli anni.

Lo stabilimento chimico viene costruito nel 1907 e l'attività inizia con la produzione di inchiostri da stampa, destrine e colle derivate, ma ben presto, anche in virtù di una collaborazione industriale con la Società tedesca Leopold Cassella, la produzione si orienta verso la sintesi di coloranti "azoici" ed "allo zolfo", largamente richiesti dall'industria tessile e conciaria.

Va rimarcato che all'epoca, in Italia, questo tipo di produzione poteva essere considerata pressoché pionieristica, in quanto attuata solo da poche industrie quali l'Italica di Rho (MI), la SIPE di Cengio (SV), e la Bonelli di Cesano Maderno (MI), società tutte confluite nel 1929 nell'ACNA Aziende Chimiche Nazionali Associate, ma anche dalla Saronio di Melegnano (MI) fondata nel 1926 da Piero Saronio (ex socio fondatore dell'Italica), anch'essa confluita nell'ACNA nel 1962.

Dal 1931 sino al 1945, la Società chimica in oggetto entra a far parte del colosso tedesco IG Farben, costituito da industrie quali BAYER, BASF, AGFA, Hoechst, Cassella ed altre, un cartello proprietario di molti brevetti che detenne il monopolio europeo della chimica organica sino al dopoguerra.

Sempre nel 1931 il gruppo ACNA fallisce e viene rilevato dalla Montecatini la quale acquisisce anche una quota di minoranza della Società in oggetto (che rimane comunque di proprietà della tedesca Farben); la Società entra quindi a far parte del gruppo ACNA (il cui nome viene cambiato in Aziende Colori Nazionali e Affini), gruppo ormai da tempo specializzato nella produzione di coloranti.

Nel 1945, alla fine del conflitto, la Società chimica, a maggioranza azionaria tedesca, viene confiscata dal governo italiano come "bene nemico" e nel 1950, per assegnazione d'asta, la proprietà degli stabilimenti passa ad un grosso gruppo chimico italiano, che ne gestisce l'attività industriale sino alla definitiva chiusura degli impianti, avvenuta nel 1979.

Da tale ricostruzione storica emerge che l'attività industriale del sito, sviluppatasi nel corso di buona parte del '900, attraverso due guerre, varie proprietà e diverse tipologie di produzione industriale, ha raggiunto il suo massimo fulgore tra gli anni venti ed il primo dopoguerra, periodo che ha visto la sintesi di più di 300 individui chimici e la produzione di 1500 tonnellate annue di coloranti, oltre ad ausiliari tessili, tannini sintetici ed altre specialità.

## La Produzione

Iniziata, come già detto, con gli inchiostri da stampa, destrine e colle derivate, si estende rapidamente alla produzione dei coloranti, attività poi trasferita nel 1960 all'ACNA di Cesano Maderno.

Dal benzolo e dalla naftalina, mediante sintesi complessa ed utilizzo di composti organoalogenati, venivano ottenuti i prodotti intermedi pilastri della chimica dei coloranti azoici quali clorobenzolo, nitrobenzolo, nitrotoluene, anilina ed altre ammine aromatiche, benzidina, amminofenoli, dinitronaftalina, diamminonaftalina, diossinaftalina e acidi: H, Gamma, Isogamma, Tobias.

Tali composti, non solo venivano utilizzati per la produzione in loco del prodotto finito, ma anche spediti agli altri stabilimenti ACNA, ottimizzando e sinergizzando i cicli produttivi. Parallelamente ed in tempi diversi vennero inoltre affiancate altre lavorazioni, anche molto diversificate, quali la produzione di ausiliari tessili polivalenti come l'Igepon (sale sodico di metiltauride dell'acido oleico) che aprirono la strada verso la produzione dei tensioattivi derivati dell'ossido di etilene.

Vennero inoltre prodotti detergenti domestici a base di alchilarilsolfonati, tra cui il famoso OMO della Lever. Occorre inoltre segnalare, durante la guerra, la produzione di Atebrina, un potente antimalarico basato su formula BAYER, e nel 1935-36, la produzione di Iprite (solfuro di etile biclorurato), potente gas vescicante utilizzato in guerra.

Và infine rimarcato che, seppur a fronte di un grande impegno nell'innovazione e nella ricerca in un campo dominato da gruppi stranieri, l'attività industriale in oggetto si è sostanzialmente sviluppata in un periodo di assenza di qualunque tipo di regolamentazione ambientale (la Legge Merli è del 1976): tale situazione ha purtroppo cagionato una grave passività ambientale, attualmente oggetto di intervento, ma non ancora completamente risolta.

## Inquadramento idrogeologico generale dell'area

Vengono qui sintetizzati alcuni elementi principali e caratteristici dell'ambito territoriale considerato per quanto concerne la struttura idrogeologica, con particolare riguardo alla suddivisione delle falde e all'andamento generale della piezometria.

Nella Figura 1 è rappresentata una sezione idrogeologica interessante l'area dell'ex polo chimico, tracciata lungo la direzione del flusso idrico (NO-SE).

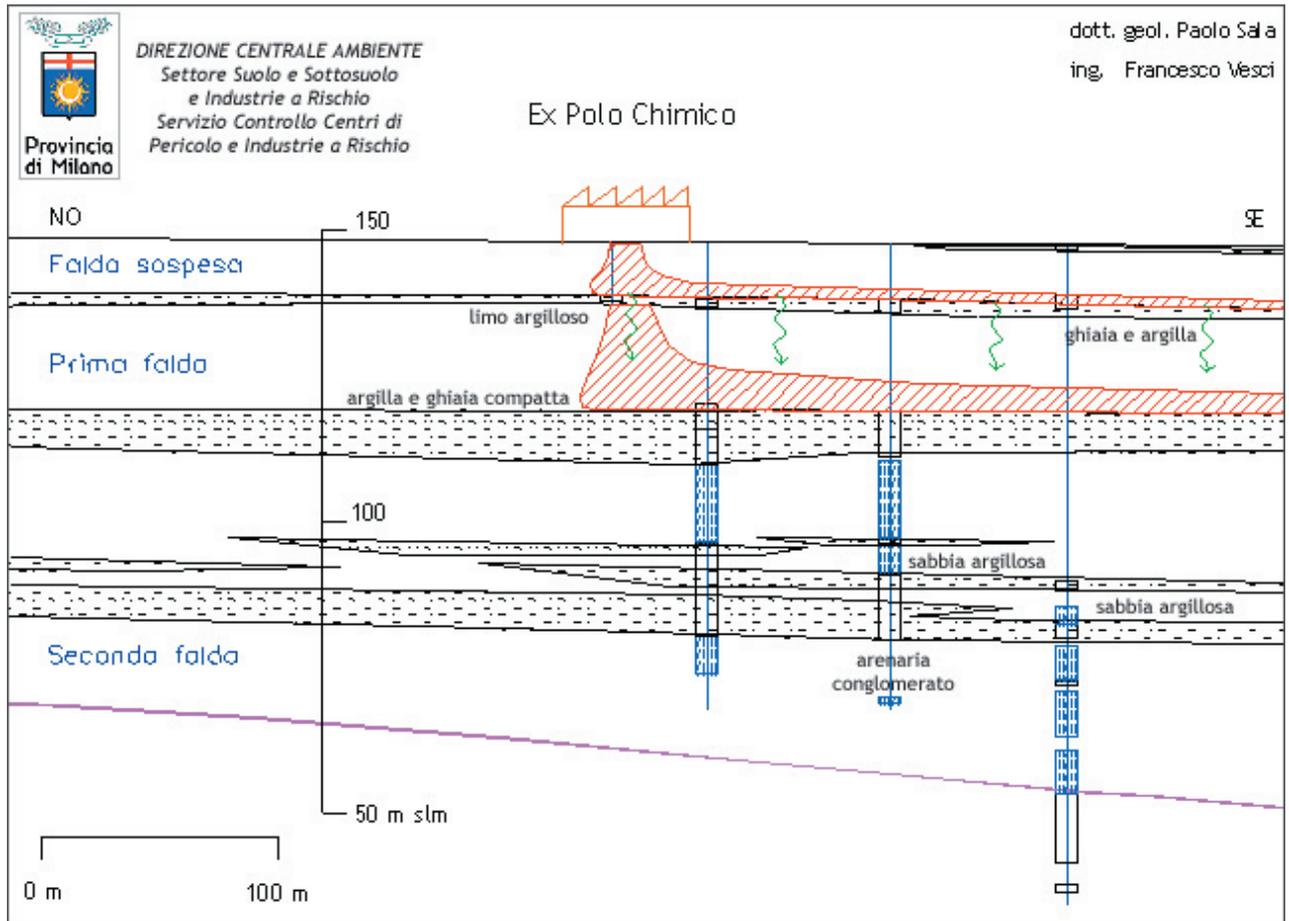


Figura 1 - Sezione idrogeologica a livello locale

Essa mostra la presenza di un livello di limo sabbioso più o meno argilloso posto a profondità variabile da N a S fra i 6.5 m ed i 9.5, dotato di modesto spessore (1÷1.5 m) e discreta estensione nell'area; la sua continuità nel senso del flusso idrico sembra solo parziale, rilevandosi invece una giustapposizione di lenti che danno luogo ad un confinamento che non è quindi totale.

Questo setto sostiene una modesta falda superficiale freatica, alimentata per lo più dalle precipitazioni e dalle perdite della rete irrigua, il cui livello piezometrico è posto fra 5 m e 8 m circa di profondità dal piano campagna in corrispondenza dell'area ex polo chimico.

Al di sotto si rinvengono livelli argillosi di spessore superiore a 3 m a profondità di circa 30 m e 55 m dal piano campagna.

Questi ultimi hanno una certa continuità in direzione NO-SE, mentre lateralmente sono piuttosto frammentati.

Si è quindi in presenza di una prima falda, localmente suddivisa dal setto argilloso posto intorno ai 30 m di profondità dal p.c., con base poco oltre i 50 m di profondità.

A tetto essa è limitata dal livello limoso-argilloso che la suddivide dalla falda superficiale anzidetta, a letto da un analogo setto sabbioso-argilloso talora discontinuo.

Si tratta quindi di una falda semiconfinata con possibilità di scambi a tetto e a letto, il cui livello piezometrico in corrispondenza dell'area in oggetto si pone intorno ai 9-10.5 m di profondità dal p.c.

Spostandosi alcuni chilometri lungo la direzione del flusso idrico, la struttura idrogeologica vede la scomparsa del setto limoso-argilloso che sostiene la falda superficiale, la quale viene quindi a coalescere con la prima falda (Figura 2).

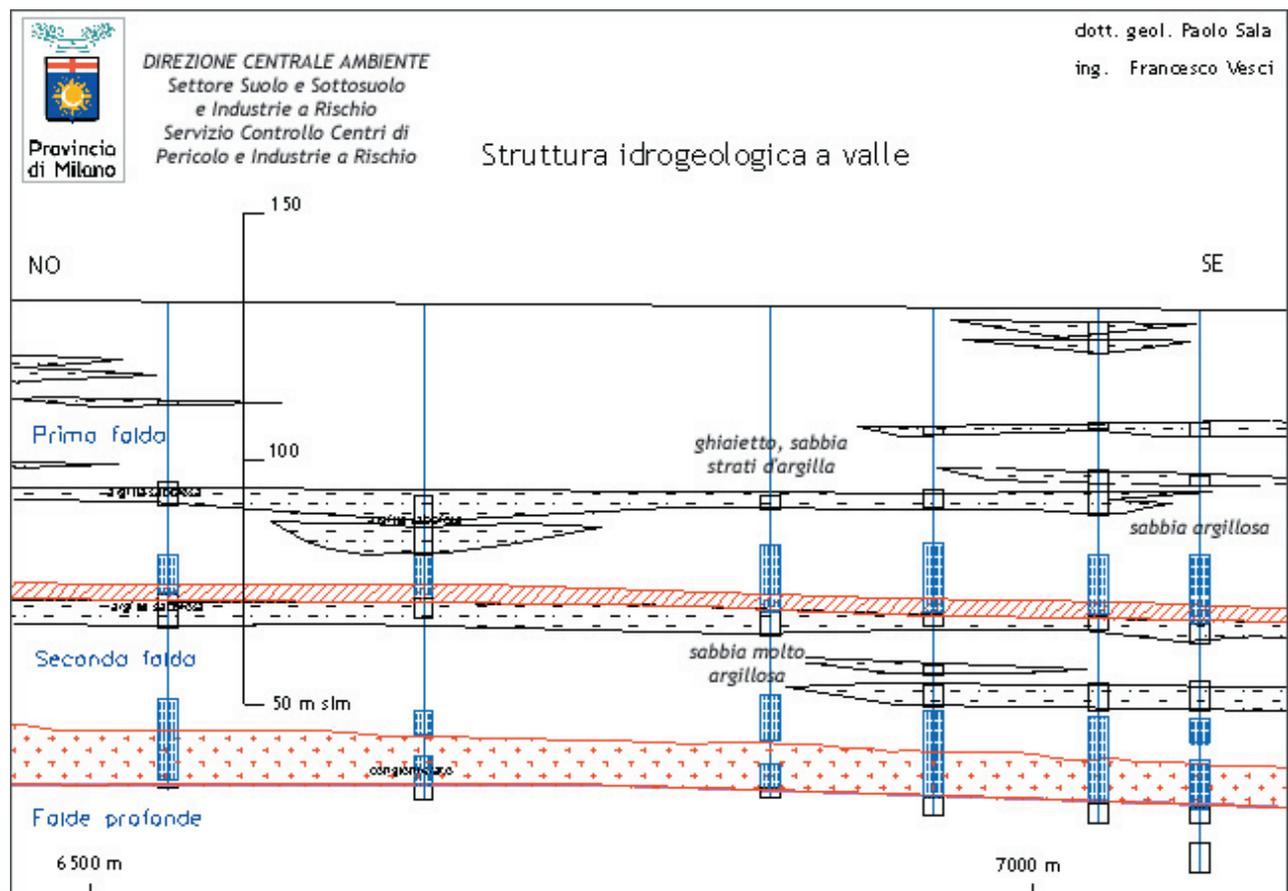


Figura 2 - Sezione idrogeologica a valle dell'ex polo chimico

D'altro lato, la presenza di numerose lenti costituite da sedimenti fini suddivise in modo vario sia la prima falda che la sottostante, ed anche il setto principale di separazione fra di esse presenta numerose discontinuità, favorendo gli scambi fra di esse.

Per quanto concerne l'andamento piezometrico occorre evidenziare che la falda principale semiconfinata negli anni scorsi, venendo già fortemente condizionata dal richiamo operato dalla depressione milanese, ha visto la variazione della direzione del flusso idrico da circa NNO-SSE a circa ONO-ESE quanto più ci si avvicina da ovest verso il limite del Comune di Milano (Figura 3).

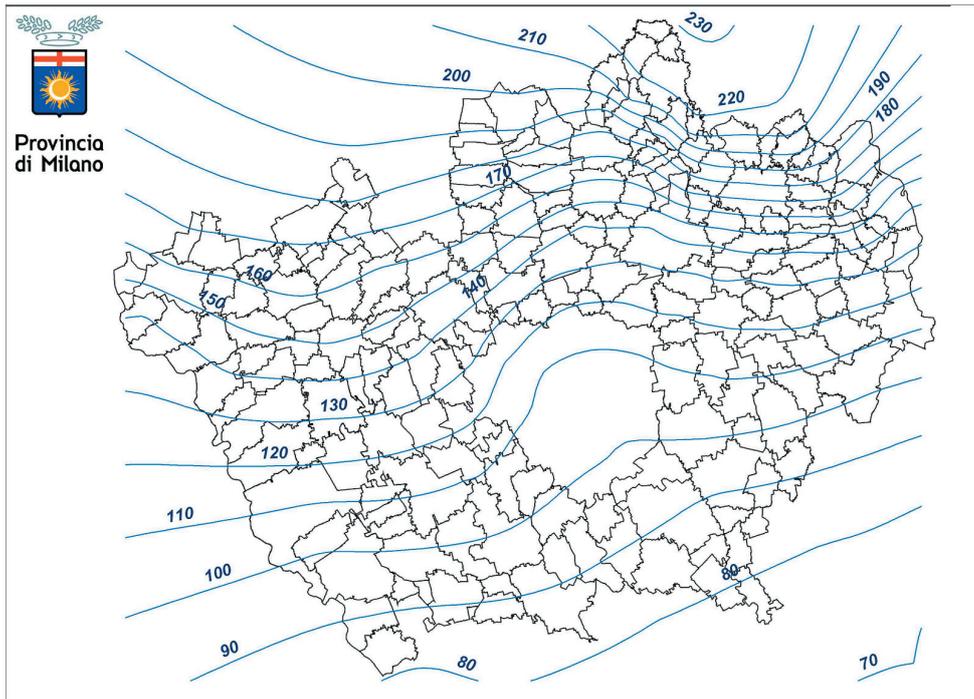


Figura 3 - Superficie piezometrica della prima falda - settembre 2001

La direzione della falda è comunque variata nel corso degli anni di attività dell'ex polo chimico. Il dato più antico a disposizione risale al 1897, in cui esiste una traccia della piezometria passante per il centro di Milano (Figura 4). Confrontando queste isolinee con quelle più recenti si deduce che il flusso idrico era disposto più vicino alla direzione N-S rispetto alle attuali.



Figura 4 - Isopiezometriche nel centro di Milano - anno 1897

Poiché lo stabilimento chimico ha incominciato la sua produzione all'inizio del '900, si può assumere che non ci siano state variazioni notevoli del prelievo fino al secondo dopoguerra e che quindi questa piezometria sia indicativa per la direzione del flusso idrico all'incirca fino agli anni '60 quando l'elevato prelievo idrico determinato dallo sviluppo industriale ha cominciato a creare la forte depressione piezometrica di Milano.

Il cono della depressione milanese ha comportato quindi nel settore immediatamente ad ovest di Milano lo spostamento della direzione di flusso all'incirca da N-S a NNO-SSE (Figura 5).

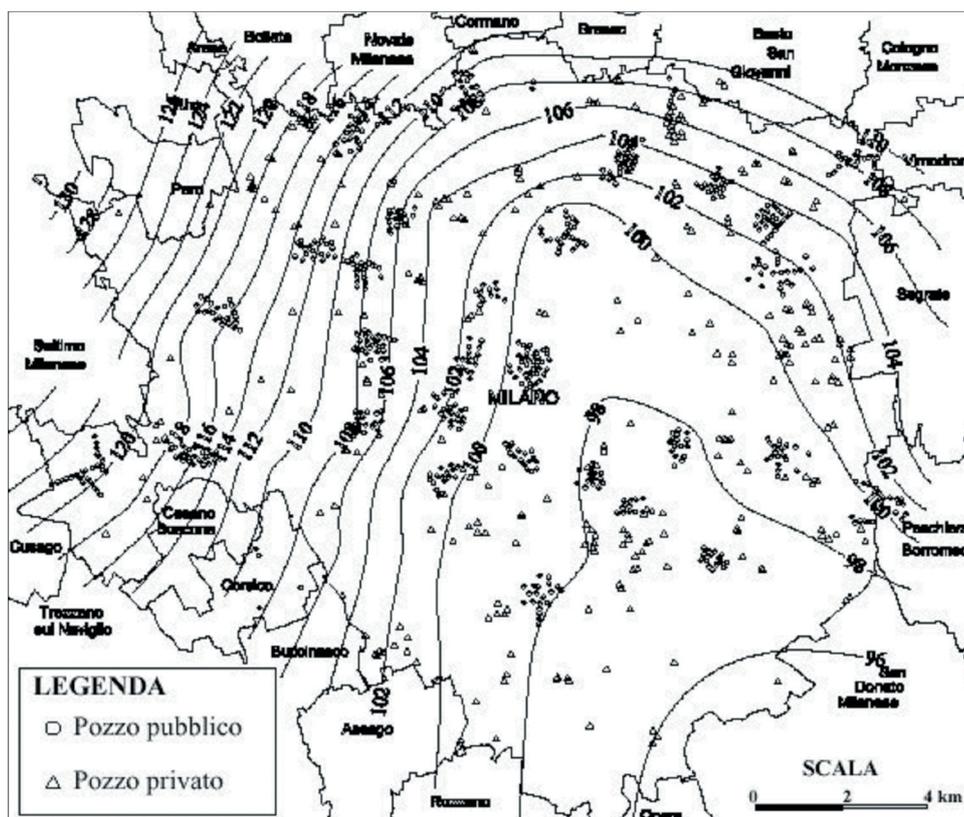


Figura 5 - Superficie piezometrica della prima falda - marzo 1990

Tale situazione, pur con fluttuazioni di tutto rilievo, è perdurata fino alla fine degli anni '90, da quando la riduzione dei prelievi ha comportato l'inversione del fenomeno.

I dati disponibili attualmente sembrano evidenziare distorsioni della piezometria nell'area milanese condizionate maggiormente dall'andamento visibile nel settore orientale della provincia piuttosto che dai residui della depressione precedentemente esistente in Milano (Figura 6).

Si deve quindi rilevare che dai primi del '900, anno di costruzione del polo chimico, fino ai nostri giorni la direzione del flusso idrico della falda tradizionalmente captata in un intorno abbastanza significativo del bordo occidentale del Comune di Milano (e della relativa depressione piezometrica) è variata all'interno di un angolo di circa 30° di ampiezza, come mostrato a titolo esemplificativo in Figura 7.

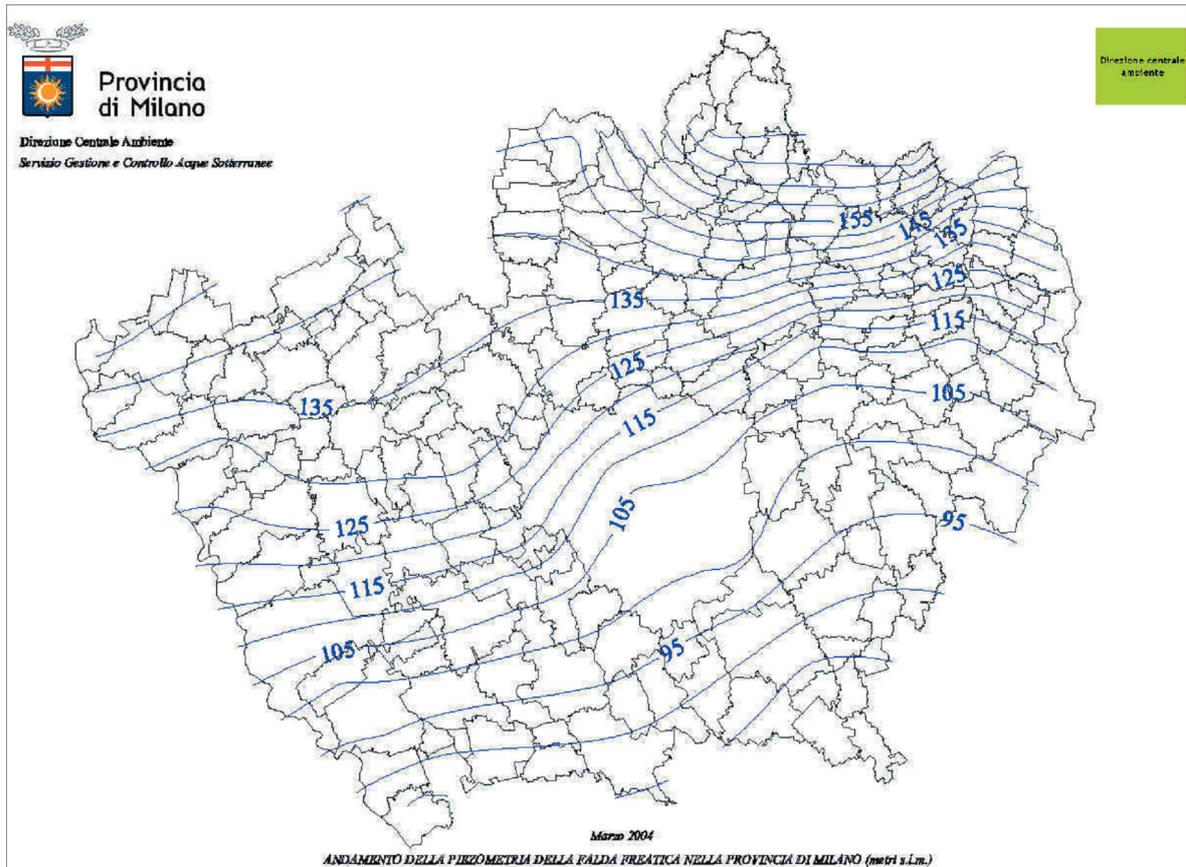


Figura 6 - Superficie piezometrica della prima falda - marzo 2004

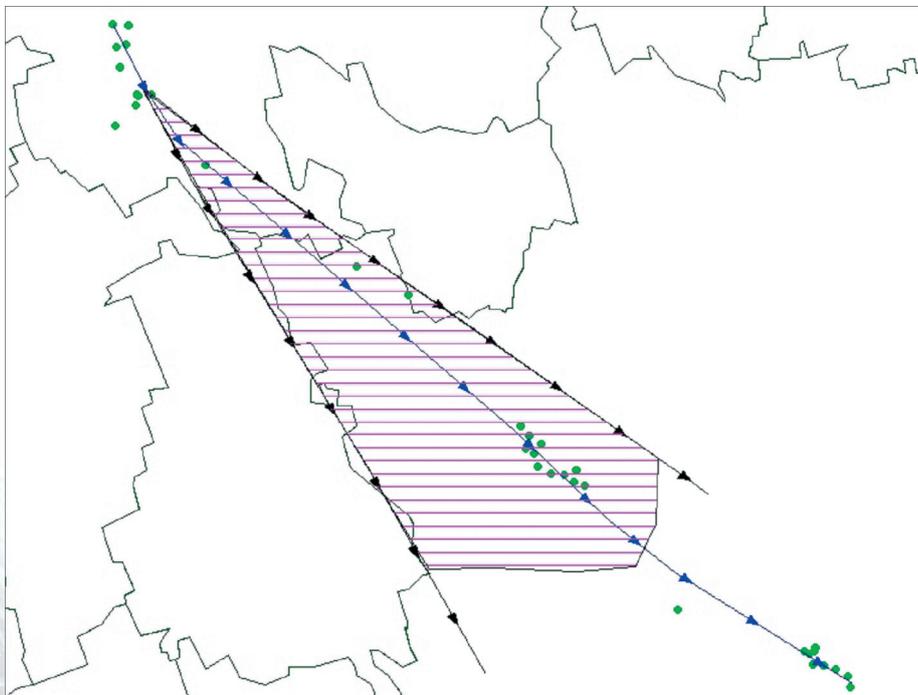


Figura 7 - Variazione della direzione di flusso dalla costruzione del polo chimico fino ad oggi.

Per quanto concerne invece la falda superficiale, esistente a livello locale nel territorio in cui è ubicato l'ex polo chimico, la caratterizzazione si presenta più difficile sia per la carenza di misurazioni in essa effettuate, sia in quanto la maggiore labilità di

alimentazione comporta già di per sé una più ampia possibilità di variazione di direzione del flusso idrico.

Essa è inoltre fortemente condizionata dal regime irriguo, oltreché da quello delle precipitazioni, e in tal senso può essere stagionalmente "spinta" in direzioni molto discoste da quella principale prossima a N-S; per contro, essa è molto meno influenzata dalla depressione milanese che interessa per lo più le falde sottostanti.

Nel territorio in esame, per quanto attiene la sola prima falda e con riferimento all'anno 2001, sono stati stimati alcuni parametri idraulici per la caratterizzazione delle condizioni del flusso idrico.

Si tratta di dati medi, poiché riguardano un'area che si sviluppa per oltre 5 km in direzione del flusso idrico:

Gradiente idraulico medio	3 ‰
Permeabilità media	$1 \cdot 10^{-4}$ m/s
Velocità effettiva media	372 m/anno

## Inquinamento delle falde generato dall'ex polo chimico

I dati finora acquisiti tramite successive campagne di monitoraggio condotte da ASL, ARPA e Provincia di Milano individuano una situazione complessa sia in ordine alla molteplicità di sostanze indesiderate presenti nelle acque sotterranee che alla necessità di distinguere le falde coinvolte, in particolare quelle utilizzate per il consumo umano dai pozzi pubblici.

Le sezioni idrogeologiche riportate nel precedente paragrafo, che evidenziano pozzi e piezometri utilizzati sia per la ricostruzione stratigrafica che per il monitoraggio idrochimico delle falde, indicano che nell'area dell'ex polo chimico l'inquinamento interessa esclusivamente la falda superficiale e la prima falda fino al setto argilloso-limoso posto a 30 m di profondità dal p.c. (Figura 1).

Si noti altresì, come specificato più oltre, che la maggior concentrazione di inquinante è attualmente posta nella prima falda, avendo ormai oltrepassato il setto limoso-sabbioso posto alla base della falda superficiale.

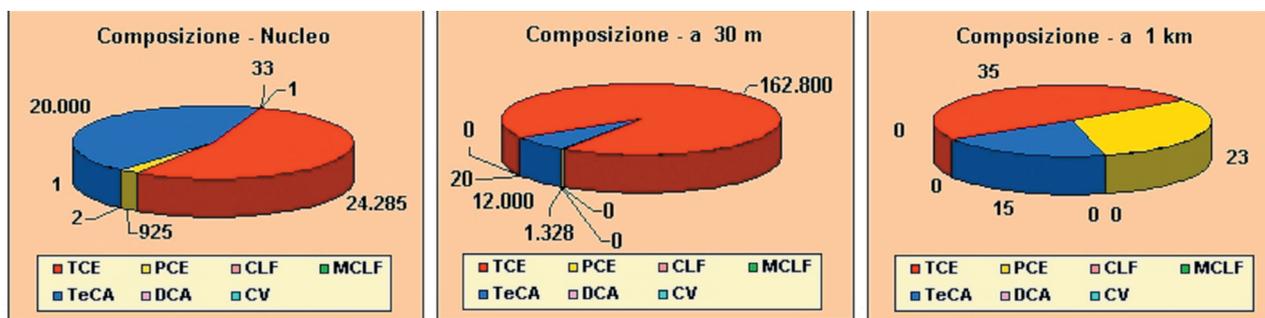
Alcuni chilometri più a valle, nella direzione principale del flusso idrico, la contaminazione fluisce alla base della prima falda, ma è anche transitata in modo più diffuso all'interno della seconda falda a causa dell'intercomunicazione variamente esistente fra le due lungo il percorso (Figura 2).

Quanto ai parametri di inquinamento, la maggior quota della contaminazione generata

dall'ex polo chimico è rappresentata dai composti organo-alogenati con una prevalenza di tricloroetilene, 1,1,2,2 tetracloroetano, tetracloroetilene, seguita dai tensioattivi anionici.

E' stata anche rilevata la presenza di ammine aromatiche, policlorobutadieni, alchilbenzeni, clorobenzeni, cloronitrobenzeni ed alcuni metalli.

In Figura 8 sono riportati i grafici che illustrano la composizione della miscela di organo-alogenati determinata nelle acque di falda superficiale emunte dal piezometro esistente al nucleo (focolaio principale di contaminazione), nelle acque estratte dalla prima falda in un piezometro posto 30 m a valle del nucleo stesso, nelle acque parimenti prelevate in prima falda da un pozzo posto ad 1 km a valle.



Blu = 1,1,2,2 tetracloroetano , Rosso = tricloroetilene , Giallo = tetracloroetano

Figura 8 - Miscela di composti organo-alogenati presenti nelle acque di pozzi e piezometri

Appaiono immediatamente evidenti le differenze di composizione ai punti di monitoraggio prescelti, legate presumibilmente anche a fenomeni di degradazione dei composti in oggetto.

E' altresì visibile che la maggior parte della contaminazione è fuoriuscita dal nucleo originario ed è situata poco a valle ed è costituita per lo più dal tricloroetilene.

Il grafico di Figura 9 illustra invece l'andamento nel tempo del totale dei composti organo-alogenati determinato ai tre punti di monitoraggio suddetti.

Posto che le analisi al nucleo e a 30 m di distanza vengono eseguite con regolarità solo da alcuni anni, sembra potersi rilevare la sostanziale stabilità del fenomeno di inquinamento nel tempo in corrispondenza dell'ex polo chimico, mentre a valle (pozzo distante 1 km) si ha una decisa decrescita dei valori.

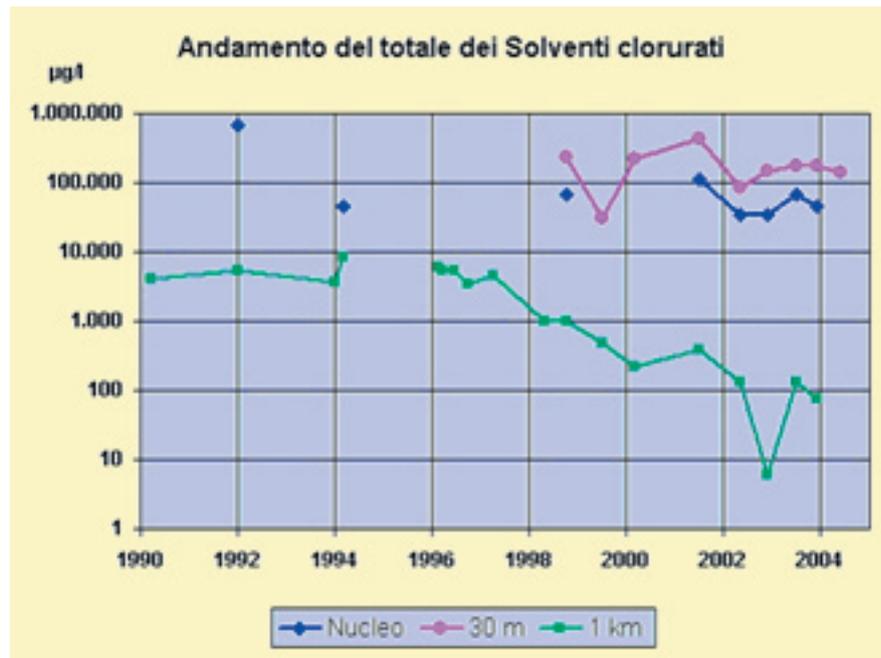


Figura 9 - Evoluzione della contaminazione in falda nel tempo in tre punti di monitoraggio

Per comprendere il diverso andamento del pozzo posto a maggiore distanza si deve probabilmente considerare l'evoluzione della superficie piezometrica precedentemente illustrata.

Infatti tale pozzo è stato prescelto lungo la direttrice di flusso passante per il nucleo all'inizio degli anni '90, quando l'orientamento era decisamente in senso NNO-SSE.

L'attenuazione della depressione milanese ed il raddrizzamento delle linee di flusso verso la direzione N-S degli ultimi anni ha fatto sì che il suddetto pozzo venga quindi a trovarsi in posizione marginale rispetto all'attuale direttrice di flusso passante per il nucleo.

Infine, gli elementi raccolti sia in ordine alla configurazione idrogeologica sia relativamente alla presenza dei contaminanti ricercati in pozzi e piezometri dell'intero settore, hanno consentito di trarre considerazioni sulla diffusione del fenomeno di inquinamento generato dall'ex polo chimico.

Come anche mostrato dalle sezioni idrogeologiche delle figure 1 e 2, la contaminazione principale (solventi clorurati) transita dalla falda superficiale alla prima falda e successivamente alla seconda, estendendosi lungo la direzione del flusso idrico per circa 7 km.

L'area coinvolta - intesa come quella in cui i pozzi attingono acqua inquinata dall'ex polo chimico - si estende su svariati chilometri quadrati.

Il pennacchio di contaminazione così definito ha una larghezza massima (ortogonale al flusso idrico) pari a circa 800 m, in dipendenza della fluttuazione sopra discussa della direzione del flusso idrico entro un angolo di circa 30°.

Tale diffusione, decisamente ampia rispetto a quanto si verifica normalmente, comporta però una maggiore diluizione della contaminazione ad eccezione dell'area prossima al focolaio e di una ristretta fascia longitudinale al centro del pennacchio stesso.

## BIBLIOGRAFIA

- C.A.P., 1995. Indagine preliminare sull'uso sostenibile delle falde profonde nella provincia di Milano. Milano.
- C.N.R.-I.R.S.A., 1979. Lineamenti idrogeologici della Pianura Padana. Quaderni I.R.S.A., 28 (II), Roma.
- CAVALLIN A., FRANCANI V., MAZZARELLA S., 1983. Studio idrogeologico della pianura compresa fra Adda e Ticino. Costruzioni, n° 326-327, La fiaccola, Milano.
- COLOMBO F., RAFFAELLI L., RAIMONDI P., ROSTI G., 1994. Le problematiche idrogeologiche delle aree altamente industrializzate: l'esempio di Milano. Provincia di Milano, Milano.
- GRUPPO DI INTERVENTO PER L'INNALZAMENTO DELLA FALDA NEL MILANESE, 1997. Progettazione di massima degli interventi. Milano.
- PETERLONGO G., ROSTI G., ARDUINI C., DI PALMA F., 1998. Monitoraggio delle falde: reti di controllo piezometrico. Milano.
- PROVINCIA DI MILANO - POLITECNICO DI MILANO, 1995. Le risorse idriche sotterranee della Provincia di Milano, vol.1 :Lineamenti idrogeologici. Milano.
- PROVINCIA DI MILANO, 1992. Indagini sulla presenza di composti organo-alogenati nelle acque di falda della Provincia di Milano. Milano.
- PROVINCIA DI MILANO, 1997. Rete di rilevamento 1992-1995. A cura dell'Assessorato Ambiente, Milano.
- RAFFAELLI L., RAIMONDI P., ROSTI G., 1996. Valutazioni sull'innalzamento della falda nella città di Milano nei primi anni '90. Provincia di Milano, Milano.
- SALA P., CALLONI A., PIRROTTA S., TAVECCHIA S., 2002. Fenomeni di contaminazione delle acque sotterranee nella Provincia di Milano. Provincia di Milano. Milano.

# BIORISANAMENTO IN SITU DI FALDE CONTAMINATE DA SOLVENTI CLORURATI: UN CASO DI STUDIO IN PROVINCIA DI MILANO

## Parte II - Attività di Ricerca e Sperimentazione

Federico Aulenta, Mauro Majone, Marco Petrangeli Papini- Dipartimento di Chimica,  
Università degli Studi di Roma "La Sapienza"

Michele Leccese, Paolo Viotti, Dipartimento di Idraulica, Trasporti e Strade,  
Università degli Studi di Roma "La Sapienza"

Simona Rossetti, Valter Tandoi, Istituto di Ricerca sulle Acque, CNR Roma

### SOMMARIO

La contaminazione di suoli e acque di falda da solventi clorurati è recentemente divenuta di primaria rilevanza sia a livello nazionale che internazionale e un gran numero di ricerche sono state condotte allo scopo di sviluppare tecnologie di bonifica appropriate in alternativa al consolidato approccio del "Pump & Treat". In questo contesto sono assai promettenti le tecnologie di biorisanamento in-situ basate sulla stimolazione della degradazione biologica in situ, nel contesto dei meccanismi di attenuazione naturale. Il presente lavoro descrive l'attività di ricerca attualmente in corso presso un sito campione in Provincia di Milano per lo sviluppo di un protocollo per la valutazione della applicabilità della bonifica per via biologica di falde contaminate da solventi clorurati alifatici. La ricerca prevede la caratterizzazione del sito, l'esecuzione di studi di trattabilità in scala di laboratorio (studi di microcosmo) e la verifica in situ in impianto pilota su campo

## INTRODUZIONE

I solventi clorurati sono stati per anni utilizzati come sgrassanti in vari settori industriali, impiegati nelle operazioni di pulitura a secco e anche come intermedi per la produzione di prodotti chimici. A seguito di pratiche di impiego e metodi di smaltimento non appropriati i solventi clorurati costituiscono una categoria di contaminanti praticamente ubiquitari. Solo negli Stati Uniti alla fine del 1996 sono stati individuati circa 400.000 siti contaminati da solventi clorurati comprendendo sia suoli che falde acquifere. Generalmente i solventi clorurati che si trovano nell'ambiente sono nella forma di metani, etani ed eteni clorurati. La maggior parte di essi presentano alcune peculiari caratteristiche chimico-fisiche che ne caratterizzano il loro comportamento nei suoli e nelle acque di falda: presentano una scarsa solubilità in acqua, una pressione di vapore variabile e sono più densi dell'acqua. Come conseguenza la maggior parte dei solventi clorurati, quando presenti in quantità sufficienti, sono classificati come fasi liquide non-acquose dense che tendono ad accumularsi sugli strati impermeabili sul fondo di acquiferi confinati. I più comuni solventi clorurati sono l' 1,2-dicloroetano (1,2-DCA), 1,1,1-tricloroetano (TCA), tetracloruro di carbonio, cloruro di metilene, cloroformio, tetracloroetilene (PCE) e tricloroetilene (TCE). Nei siti contaminati da solventi clorurati il TCE viene generalmente individuato come il componente a maggiore concentrazione.

Le diverse tecnologie attualmente disponibili per la bonifica di falde acquifere contaminate da solventi clorurati sono basate essenzialmente su sistemi di Pump & Treat. In questo caso il pennacchio contaminato viene intercettato da un opportuno sbarramento idraulico e l'acqua emunta inviata ad un impianto di trattamento. I processi di trattamento raramente consentono di raggiungere i bassi limiti richiesti per la reiniezione dell'acqua emunta in falda ed il destino finale è spesso quello di uno scarico in corpo idrico superficiale. Nei casi peggiori, si può avere mobilitazione di contaminanti persistenti e bioaccumulabili. Inoltre, il trattamento si basa spesso su trasferimento di fase senza effettiva degradazione (es. adsorbimento, desorbimento). Infine, il "Pump & Treat" presenta in generale una elevata richiesta energetica e costi elevati di trattamento (pompaggio, adsorbenti, rigenerazione). Ciò è particolarmente problematico nelle situazioni in cui è presente una fase separata (ad es. la fase densa non acquosa, DNAPL, tipica dei solventi clorurati): in questo caso la velocità di rimozione è spesso controllata dalla lenta dissoluzione del DNAPL, ovvero il sistema "Pump & Treat" deve essere mantenuto attivo per tempi lunghi.

In alternativa a tale approccio, grande interesse rivestono i sistemi di risanamento *in-situ* quali le Barriere Permeabili Reattive (basate su ferro zero-valente, carboni attivi, zeoliti sintetiche e naturali e processi biologici), il biorisanamento (enhanced natural attenuation, ENA, con aggiunta di nutrienti e ammendanti e/o bioaugmentation) e l'attenuazione naturale monitorata (MNA). Tali sistemi presentano in generale potenziali vantaggi per quanto riguarda i minori costi di gestione, legati essenzialmente alle minori richieste energetiche, l'assenza di scarichi esterni da trattare e smaltire nonché un minor

disturbo degli usi del suolo. Inoltre, nella maggior parte dei casi, tali sistemi consentono una effettiva degradazione dei contaminanti, piuttosto che un semplice trasferimento di fase.

D'altra parte, alcuni potenziali svantaggi ne hanno limitato finora l'uso, quali la possibile difficoltà a raggiungere i valori limite richiesti per la completa bonifica delle acque sotterranee (con la conseguente necessità di attivare procedure di analisi di rischio) e la possibile presenza di fenomeni di contaminazione secondaria (es. accumulo di intermedi anche più tossici dei prodotti di partenza). Più in generale, tali interventi richiedono una più approfondita conoscenza delle condizioni locali anche in quanto non sono a tutt'oggi disponibili protocolli e metodologie standardizzati di progettazione e monitoraggio.

Su tali tematiche e' in corso una attività di ricerca dal titolo "Bonifica per via biologica di falde contaminate da solventi clorurati" che si avvale del supporto finanziario del Ministero dell'Ambiente (Bando pubblico, G.U. Serie generale n. 281 del 30-11-99) e del CNR - Gruppo nazionale per la Difesa dai Rischi Chimici Industriali ed Ecologici presso il Dipartimento per la Protezione Civile. La ricerca e' svolta congiuntamente dai Dipartimento di Chimica e Dipartimento di Ingegneria Idraulica, Trasporti e Strade dell'Università "La Sapienza" di Roma e dall'Istituto di Ricerca sulle Acque del CNR di Roma (ciascuno dei quali opera con una propria unità operativa nell'ambito del succitato progetto), in collaborazione con la Provincia di Milano.

La ricerca ha lo scopo di sviluppare e fornire strumenti scientifici, tecnologici e metodologici per la decontaminazione per via biologica di falde contaminate da solventi clorurati. Essa si articola in due sottotemi fortemente interconnessi:

- studio e sviluppo di processi avanzati di bioremediation sia in situ che ex situ
- messa a punto e convalida attraverso un'applicazione di campo di un protocollo per la definizione della miglior strategia di bioremediation

Il presente lavoro tratta esclusivamente del secondo obiettivo: esso si basa sullo sviluppo di una procedura sequenziale di indagine per la valutazione dell'applicabilità del biorisanamento in situ, anche utilizzando ed ampliando protocolli preesistenti a livello internazionale, nonché sulla sua applicazione e verifica su un acquifero "campione" opportunamente scelto. La figura 1 riporta lo schema concettuale della procedura di valutazione in corso di applicazione.

## **DEGRADAZIONE BIOLOGICA DEI COMPOSTI ORGANO-ALOGENATI**

I composti organo-alogenati possono essere degradati sia mediante processi di tipo metabolico che cometabolico. Il primo caso si verifica quando il microrganismo consuma il composto per soddisfare i propri bisogni catabolici ed anabolici, rispettivamente energetici e di carbonio organico. Nel caso di processo cometabolico la biotrasformazione avviene in maniera fortuita, senza cioè che l'organismo ne ricavi energia o materiale

per la biosintesi, grazie all'azione di enzimi e/ o cofattori biologici adibiti alla trasformazione di un substrato o metabolita primario. A causa della profonda differenza fra le finalità della biotrasformazione metabolica di un substrato, rispetto a quella di tipo cometabolico, esiste una sostanziale diversità delle cinetiche relative ai due tipi di processo, accompagnata anche da quella delle percentuali delle risorse energetiche batteriche utilizzate.

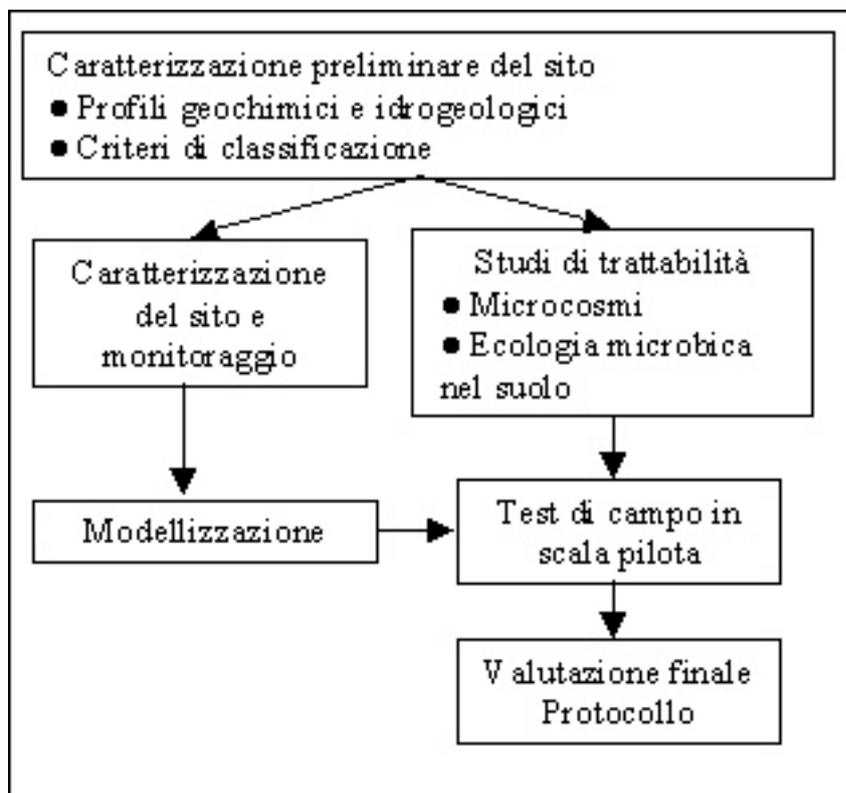


Figura 1 Schema concettuale della procedura di valutazione del biorisanamento in situ

Nel caso dei processi metabolici si registrano le maggiori velocità e rese di biotrasformazione dei substrati.

Inoltre i processi di degradazione metabolica o cometabolica possono avvenire sia in condizioni aerobiche che in condizioni anaerobiche, in funzione delle condizioni redox esistenti nel mezzo di coltura, dalla composizione microbica e dal grado di alogenazione del composto in esame. I composti altamente alogenati (ad esempio PCE e TCE) difficilmente sottostanno a reazioni di ossidazione, mentre è favorita la loro riduzione. La resistenza alla degradazione aerobica è imputabile all'elevato stato di ossidazione dei composti saturi di sostituenti alogeni, la cui ossidazione con ossigeno molecolare comporta una modesta variazione di energia libera, la sostituzione nucleofila è inibita dall'elevata elettronegatività del composto stesso, mentre la idrossilazione è impedita dalla mancanza di atomi di carbonio legati ad atomi di idrogeno. I composti, quali il PCE o l'esaclorobenzene, che posseggono tutti i carboni legati ad atomi di alogeno, sono invece risultati biodegradabili in condizioni di anaerobiosi (Vogel et al. 1987), attraverso la loro dealogenazione riduttiva (RD), ovvero la sostituzione nucleofila dell'alogeno con uno

ione idruro (Vogel, 1994). Una rappresentazione schematica dei successivi possibili step nella dechlorazione riduttiva del PCE fino ad etilene è riportato in Figura 2.

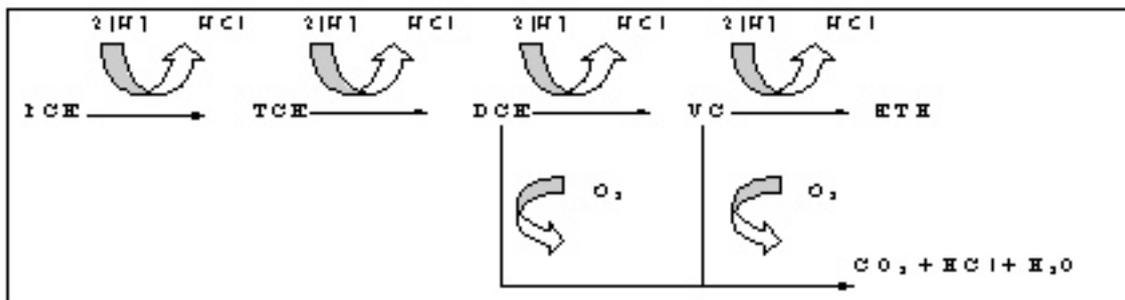


Figure 2 Schema della sequenza di biodegradazione anaerobica e/o aerobica del PCE

La prima evidenza di dechlorazione riduttiva del PCE oltre TCE fu prodotta da Parson et al., (1984) che osservò la produzione di TCE, cis-DCE, trans-DCE e VC da parte di sedimento incubato in presenza di PCE e metanolo. Per la prima volta, nel 1989 fu riportata la completa dechlorazione riduttiva del PCE fino ad etilene da parte di un consorzio metanigeno, in presenza di metanolo (Freedman e Gosset, 1989). Nel corso degli anni successivi la dechlorazione riduttiva del PCE è stata ampiamente documentata in letteratura.

La dechlorazione riduttiva richiede la disponibilità di un donatore esterno di elettroni. Sebbene vari substrati carboniosi siano in grado di sostenere la dechlorazione riduttiva del PCE, è ormai accertato come nella maggior parte dei casi l'effettivo donatore di elettroni utilizzato per la dechlorazione del PCE sia l'idrogeno molecolare (DiStefano et al., 1991; DiStefano et al., 1992, Maymo-Gatell et al., 1995; Aulenta et al., 2001; Aulenta et al. 2002), o direttamente disponibile o prodotto dalla fermentazione di substrati carboniosi primari. Solo recentemente si è anche riportato un esempio in cui la RD è sostenuta direttamente da un substrato carbonioso non fermentabile ad idrogeno quale l'acetato (He 2002).

Dove l'idrogeno è l'effettivo donatore di elettroni per la RD, differenti microrganismi possono competere per l'utilizzo di tale substrato (dechloranti, metanigeni idrogenofili, omoacetogeni, solfato riduttori). Alcuni ricercatori hanno osservato che i microrganismi dechloranti hanno maggiore affinità per l'idrogeno dei metanogeni (Ballapragada et al., 1997; Fennel et al., 1997). Questo indica che potenzialmente i microrganismi dechloranti sono in grado di sopravvivere a concentrazioni di idrogeno più basse rispetto ai metanigeni e acquistano un vantaggio selettivo rispetto a questi quando l'idrogeno è presente a concentrazioni molto basse (<10 nM). Questi studi suggeriscono che una efficace dechlorazione può essere ottenuta utilizzando donatori di elettroni (i.e. substrati carboniosi) quali ad esempio il propionato o il butirato che vengono fermentati lentamente rilasciando dunque idrogeno a basse concentrazioni.

D'altra parte, nei consorzi microbici dechloranti, altri microrganismi possono competere per il substrato carboniosi primario, ad esempio metanigeni e acidogeni. La competizione per il donatore di elettroni primario determina la porzione di elettroni effettivamente utilizzati per la formazione di idrogeno e così potenzialmente disponibili per la RD. Ad esempio, in un consorzio microbico dechlorante alimentato con metanolo, gli elettroni effettivamente trasferiti per la formazione di etilene da PCE sono risultati solo il 4% mentre la restante parte era utilizzata per la formazione diretta di metano da metanolo (15%), la formazione di acetato sia per acetogenesi che per omoacetogenesi (72%, omoacetogenesi <19%) e la crescita cellulare (9%). Nonostante, la minima percentuale di utilizzo degli elettroni disponibili, la popolazione dechlorante può comunque mantenersi stabile per lunghi periodi.

La RD del PCE può essere sia un processo cometabolico che metabolico. La RD cometabolica del PCE è stata riscontrata in vari consorzi microbici e colture pure, soprattutto in condizioni di metanogenesi (Fathepure e Boyd, 1988) ma anche in presenza di attività acetogenica o omoacetogenica. Viceversa, la prima evidenza sperimentale dell'esistenza di batteri in grado di accoppiare la RD del PCE alla crescita (processo metabolico, noto anche come dehalorespiration) in strette condizioni anaerobiche, è stata presentata da Holliger et al. (1993). Il consorzio descritto da Holliger era un arricchimento altamente purificato in grado di ridurre il PCE a cis-DCE in presenza di idrogeno quale donatore di elettroni. Il microrganismo successivamente denominato *Dehalobacter restrictus* è in grado di utilizzare solo idrogeno come donatore di elettroni e può crescere solo riducendo il TCE o il PCE a cis-DCE. Successivamente sono stati descritti altri microrganismi in grado di accoppiare la riduzione del PCE fino a intermedi meno clorurati (Scholz-Muramatsu, 1995, Gerritse et al., 1996, Krumholtz et al., 1996, Middlerdorp, 1999). Il primo microrganismo risultato in grado di dechlorare il PCE fino ad etilene è stato *Dehalococcoides ethenogenes* Strain 195 (Tandoi et al. 1994; Maymò-Gatell et al., 1997). Tuttavia, tale isolato tuttavia è in grado di ridurre metabolicamente il PCE solo fino a VC mentre lo stadio finale da VC a etilene è cometabolico (ciò comporta che l'ultimostadio è più lento con l'accumulo intermedio di VC fino a che tutti i suoi precursori non sono stati convertiti). Sebbene l'idrogeno sia l'effettivo donatore di elettroni utilizzato da Strain 195 per la riduzione del PCE, tale batterio richiede la presenza di acetato, vitamina B<sub>12</sub>, e di presumibilmente di ulteriori fattori di crescita non ancora individuati. Studi basati su tecniche molecolari (ovvero senza necessità di isolamento), indicano che altri batteri possano giocare un ruolo analogo a quello del *D.Ethenogenes* (Rossetti et al. 2003). Inoltre, ancora più recentemente, sono stati descritti altri microrganismi che sono in grado di ridurre metabolicamente il DCE e/o VC ad etilene ma non il PCE o il TCE (He, 2003; Cupples, 2003). Sebbene dunque la RD del PCE o del TCE fino ad etilene sia stata frequentemente osservata in colture miste, nessun microrganismo è stato ancora isolato in grado di effettuare tale trasformazione in coltura pura e con processo metabolico. Poiché il VC è a volte un prodotto di accumulo intermedio della dechlorazione riduttiva del PCE e del TCE in ambienti anaerobici, particolarmente rilevanti sono gli studi sulla sua biodegradabilità in condizioni aerobiche, nell'ottica di un possibile processo combinato anaerobico-aerobico per la completa biodegradazione di un'acqua di falda contenente

PCE o TCE (figura 2). La degradazione cometabolica del VC da parte di microrganismi che crescono su metano, propano, propene, isoprene, toluene, fenolo o ammoniaca è ampiamente descritta in letteratura (Freedman & Herz 1996, Verce et al 2001a;). Inoltre, il VC è anche l'unico tra gli eteni clorurati ad essere utilizzato attraverso un processo metabolico, anche se finora è stato riportato un numero limitato di isolati (appartenenti ai generi *Mycobacterium* e *Pseudomonas*) e colture miste in grado di utilizzare VC come unica fonte di carbonio ed energia (Hartmans & de Bont 1992; Verce et al 2000; Verce et al 2001b, Coleman et al 2002; Aulenta et al., 2003). In tal caso, il potere riducente necessario alla degradazione del VC è rigenerato con la successiva degradazione del VC stesso. In tale contesto non risulta necessaria la presenza di un substrato di crescita, e si prevengono fenomeni di inibizione da substrato.

Per quanto riguarda gli etani clorurati, le conoscenze disponibili indicano un comportamento più complesso con la possibile coesistenza di diverse vie degradative anche in condizioni strettamente anaerobiche. L'1,1,2,2

- TeCA può essere anaerobicamente degradato in etani ed eteni non clorurati o a più basso grado di clorurazione attraverso tre meccanismi differenti (Figura 3). I primi due meccanismi, denominati idrogenolisi e dicloroeliminazione, sono due differenti processi di dechlorazione riduttiva, in quanto entrambi richiedono il trasferimento di due elettroni con il conseguente rilascio, rispettivamente, di uno o di due atomi di cloro. Il terzo meccanismo, noto come deidroclorazione, è un processo non-ossidoriduttivo attraverso cui si ha il rilascio di una molecola di HCl con la conseguente formazione di un doppio legame tra i due atomi di carbonio vicinali. D'altronde, PCE e TCE sono generalmente degradati mediante idrogenolisi; ciò comporta che gli etani ed eteni clorurati possono avere degli intermedi comuni di reazione (i.e. TCE, DCE, VC), a seconda dei percorsi degradativi seguiti dagli etani clorurati.

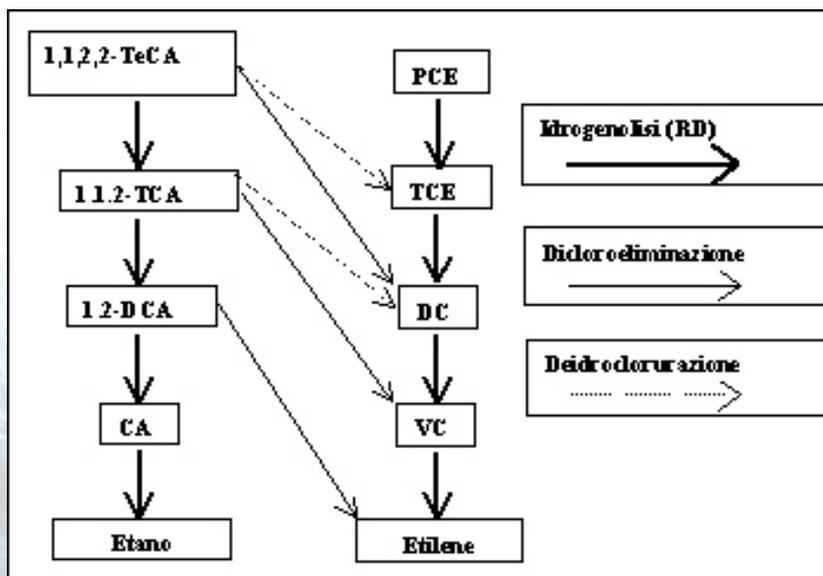


Figura 3. Possibili percorsi degradativi anaerobici degli etani ed eteni clorurati

## PROTOCOLLI DI CARATTERIZZAZIONE E VALUTAZIONE

Un protocollo di caratterizzazione e valutazione è sostanzialmente una procedura che procede alla verifica di ipotesi di intervento attraverso specifiche misure e test, tenendo conto della tipologia di contaminanti considerata, della o delle tecnologie di bonifica che si intendono valutare e delle caratteristiche del sito in oggetto. Per sua natura intrinseca, un protocollo di questo tipo è perciò molto più specifico di una caratterizzazione generale volta a determinare semplicemente estensione e tipologia della contaminazione, quale è prevista ad esempio come prima fase di un intervento di bonifica nel D.M. 471/99. Un protocollo di valutazione richiede anzi tipicamente che una tale fase di caratterizzazione sia stata condotta e va a collocarsi nell'ambito delle attività necessarie alla progettazione preliminare dell'intervento (seconda fase nel D.M. 471/99).

Con riferimento specifico al caso dei solventi clorurati alifatici esistono ad esempio due protocolli, finalizzati rispettivamente alla valutazione della possibilità di attenuazione naturale o accelerata (enhanced). Il primo protocollo è pubblicato dall'EPA con il titolo "Technical protocol for evaluating natural attenuation of chlorinated solvents in groundwater" (Weidemeier et al., 1998). Il protocollo è mirato alla verifica della possibilità che nel particolare acquifero considerato i processi di attenuazione naturale (intesi come la somma dei processi di immobilizzazione, adsorbimento, diluizione e degradazione biologica) possano essere da soli in grado di raggiungere la decontaminazione del sito entro tempi accettabili e condizioni ambientali compatibili con la sicurezza. Il secondo è il cosiddetto protocollo tecnico RABBIT "A treatability test for evaluating the potential applicability of the reductive anaerobic biological in situ treatment technology to remediate chloroethenes" frutto del lavoro di cooperazione tra il Battelle Memorial Institute (Columbus, Ohio), la Cornell University (Ithaca, New York), l'EPA (Ada, Oklahoma) e l'US Air Force Armstrong Laboratory (Tyndall AFB, Florida). Tale protocollo descrive un approccio più completo che oltre alla valutazione della attenuazione naturale include una fase di test di trattabilità con lo scopo di determinare il potenziale per l'accelerazione della dechlorazione riduttiva in situ attraverso azioni specifiche come l'aggiunta di substrati riducenti.

Entrambi i protocolli si basano (almeno nella fase iniziale) su un sistema di punteggi (score) assegnati alle diverse caratteristiche del sito oggetto di studio, in base alla sommatoria delle quali il sito va a collocarsi in una certa posizione in una graduatoria (ranking) che ne individua la maggior o minor aderenza all'ipotesi di modalità di decontaminazione assunta dal protocollo. Sulla base di tale ranking, il protocollo può prevedere che la modalità di decontaminazione sia accettata, scartata o sottoposta a verifica con un approfondimento della caratterizzazione. Pertanto il protocollo guida l'utilizzatore attraverso un processo decisionale nel quale le informazioni sono organizzate e utilizzate per determinare se la tecnologia in esame merita ulteriore considerazione. Il protocollo viene interrotto quando esso indica che le caratteristiche del sito o altre considerazioni

quali considerazioni normative o particolarità logistiche impediscono l'applicazione delle tecnologie o la rendono non competitiva rispetto ad altre.

A titolo di esempio si la procedura prevista nel protocollo RABBIT, che consta di quattro fasi distinte.

- caratterizzazione preliminare e sistema di valutazione speditivi
- caratterizzazione dettagliata e modellazione
- studio di trattabilità in scala di laboratorio (microcosmi)
- verifica di campo in scala pilota

La prima fase è una ricognizione delle caratteristiche del sito per una sua prima classificazione rispetto alla potenzialità della RD naturale o stimolata. Si utilizzano informazioni di tipo chimico, geochimico, idrogeologico, a volte direttamente disponibili da una caratterizzazione preliminare, che vengono organizzate in tre categorie indipendenti, ovvero sotto il profilo della contaminazione chimica, sotto il profilo idrogeologico e sotto il profilo geochimico. Il profilo della contaminazione comprende tutti i parametri che concorrono a definire il tipo e l'estensione della contaminazione. Tra le caratteristiche di particolare interesse per la dechlorazione riduttiva devono citarsi la presenza, concentrazione e distribuzione di prodotti a basso grado di clorurazione (come DCE e VC) che indicano la possibilità di dechlorazione riduttiva in atto. Allo stesso modo la presenza di possibili co-contaminanti (idrocarburi, solventi aromatici, metalli) può influenzare la RD in modo sia positivo che negativo. Ad esempio, concentrazioni elevate di metalli pesanti possono inibire la attività microbica mentre alcuni contaminanti organici possono fungere da donatori di elettroni e facilitare la RD, anche attraverso il consumo di accettori di elettroni potenziali competitori della RD. In questo profilo sono anche comprese le informazioni sulla distribuzione spaziale della contaminazione ed in particolare se essa comprenda anche zone insature e/o fasi non acquose che possono fortemente condizionare l'efficacia di una strategia basata sull'aggiunta di substrati dall'esterno.

Il profilo idrogeologico è definito da una unica grandezza, ovvero la conduttività idraulica ( $K$ , cm/sec) considerata sufficientemente indicativa per valutare la possibilità di accelerare la RD mediante la aggiunta di substrati. Una conduttività idraulica eccessivamente bassa ( $<10^{-5}$  cm/sec) comporta da sola un punteggio così negativo da impedire di fatto la prosecuzione del protocollo. Il profilo geochimico descrive sostanzialmente la esistenza o possibilità di ottenere condizioni ambientali adatte alla attività dechlorante. Oltre a caratteristiche generali quali pH, alcalinità e temperatura, esso si basa soprattutto sulla valutazione dei parametri che influenzano le condizioni redox del sistema. ciò in considerazione del fatto che la RD richiede condizioni fortemente riducenti. Vengono perciò considerate le condizioni redox attuali (potenziale redox), la presenza di accettori di elettroni (ossigeno, nitrato, solfato), di donatori di elettroni (carbonio organico disciolto) ed infine di prodotti di metabolismi tipicamente anaerobi (metano, acido solfidrico).

La seconda fase consiste in una più dettagliata caratterizzazione del sito. La

caratterizzazione viene eseguita in una determinata collocazione e con una scala ridotta, sulla base dei risultati della prima fase. Essa prevede attività di campo con misure ad hoc della distribuzione dei contaminanti e delle caratteristiche idrogeologiche e geochimiche, già prese in esame nella prima fase, al fine di confermare l'applicabilità del protocollo e progettare le fasi successive, ovvero gli studi di microcosmo e il test di campo rispettivamente.

La terza fase consiste negli studi di microcosmo, ovvero in prove di laboratorio condotte incubando il materiale acquifero e/o l'acqua di falda in condizioni ambientali differenti, sia naturali (equivalenti a quelle in situ) che modificate (ad esempio attraverso l'aggiunta di substrati carboniosi). Per ciascun test viene seguito nel tempo (in genere 6 mesi) l'andamento dei composti clorurati e di una serie di altri parametri (substrati, accettori di elettroni), così da determinare la condizione ottimale di lavoro per la dechlorazione riduttiva. L'esecuzione di una serie appropriata di microcosmi è un punto chiave per la comprensione dell'efficacia di un intervento di accelerazione della decontaminazione biologica. Attualmente, infatti le conoscenze disponibili sui microrganismi dechloranti e sulle comunità microbiche anaerobiche all'interno delle quali essi riescono ad operare non sono tali da consentire una previsione affidabile del loro comportamento sulla base dei soli parametri ambientali (chimici, geochimici ed idrogeologici). Ad esempio, la scelta del substrato carbonioso è critica nel determinare la velocità di produzione dell'idrogeno molecolare (ad opera dei batteri fermentativi) nonché la sua pressione parziale, fattori che poi regolano la competizione tra microrganismi dechloranti e potenziali competitori per il suo utilizzo. Il destino del substrato carbonioso dipende a sua volta dalla presenza nell'acqua di falda di sostanze ossigenate (ossigeno disciolto, nitrati e solfati) che determinano la ripartizione del substrato tra metabolismi di respirazione e fermentativi.

Discorso analogo vale anche per la presenza/aggiunta di fattori nutrienti che possono regolare uno o più metabolismi nel consorzio microbico (tra cui in particolare la vitamina B12 che è risultata fondamentale per la crescita del *Dehalococcoides ethenogenes*, l'unico batterio finora isolato che dechlora il PCE fino ad etilene).

A questi fattori ambientali che influenzano la fisiologia dei consorzi microbici si aggiunge l'aspetto più propriamente microbiologico, ovvero il fatto che nel sistema siano presenti microrganismi dechloranti e tra questi di specie in grado di condurre la dechlorazione fino ad etilene.

La quarta ed ultima fase prevede un test di campo al fine di confermare in situ le indicazioni ricevute dagli studi di microcosmo. In particolare, il protocollo prevede che sia verificata in situ l'effetto della formulazione ammendante (substrato e/o nutrienti) che si è rivelata nei microcosmi più efficace nell'accelerare la dechlorazione riduttiva e portarla fino ad etilene

## IL SITO CAMPIONE

La ricerca è attualmente sviluppata e applicata ad un sito contaminato da solventi clorurati situato nel comune di Rho (Milano), le cui caratteristiche peculiari sono descritte in maniera più approfondita nella parte I di questo lavoro. Riassumendo brevemente per comodità di lettura, il sottosuolo è caratterizzato dalla presenza di due strati argillosi a diversa profondità che definiscono due acquiferi (uno superficiale e l'altro semiconfinato) interessati dalla contaminazione. La falda freatica sospesa non sempre continua è sostenuta da un livello di argilla limosa di modesto spessore, che va via via assottigliandosi fino a scomparire verso valle alimentata per lo più dalle precipitazioni e dalle perdite della rete irrigua. Al di sotto di tale strato argilloso si ha una falda semiconfinata comunicante con quelle sottostanti e sostenuta a letto da un setto argilloso posto ad una profondità di circa 50 m dal piano campagna. L'area contaminata è inoltre attraversata da un fiume che la divide in un settore settentrionale e uno meridionale.

Da varie campagne di monitoraggio condotte da Provincia di Milano (Calloni et al, 2001), ARPA ed ASL sono state riscontrate elevate concentrazioni di solventi clorurati (SC), in particolare PCE, TCE e 1,1,2,2 tetracloroetano derivanti dallo stoccaggio di contenitori nel terreno e dallo sversamento incontrollato. Inoltre dai dati di concentrazione risulta che la maggior parte della massa dei contaminanti è presente nel primo acquifero probabilmente a seguito del piccolo spessore argilloso, spesso non continuo, e che ha consentito il percolamento dei solventi sversati (probabilmente sottoforma di DNAPL).

### **Valutazione preliminare del sito campione ai fini dell'applicabilità del biorisanamento in situ**

Preliminarmente è stata condotta una revisione dei dati disponibili (informazioni idrogeologiche e risultati del monitoraggio sulla rete di piezometri già esistenti) che ha consentito una modellizzazione concettuale del sito. La presenza di prodotti di degradazione dei composti a più alto grado di clorurazione insieme ad una conducibilità idraulica misurata  $> 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$ , indicavano come nel sito fosse potenzialmente applicabile un processo di attenuazione naturale o stimolata.

Su tale base si è poi proceduto ad una ulteriore caratterizzazione dello stato chimico delle acque contaminate, per l'applicazione degli indici di valutazione predittiva dei protocolli di attenuazione naturale dell'EPA (Weidemeier et al., 1998) o di attenuazione stimolata RABITT (Morse et al., 1998). Secondo il primo (punteggio 9), l'evidenza di biodegradazione anaerobica è risultata piuttosto limitata mentre il secondo ha fornito un risultato più incoraggiante (punteggi 38-49), secondo cui le condizioni idrogeologiche e geochemiche sono favorevoli ed è probabile che la dechlorazione stia avvenendo in diverse località all'interno del sito. Ciò ha portato ad intraprendere studi di microcosmo con il

suolo saturo sia presente nel focolaio di contaminazione che prelevato in corrispondenza della falda primaria. Parallelamente si è definito un programma di monitoraggio, con installazione di nuovi piezometri, che prevede campionamenti di acque con cadenza circa quadrimestrale per la verifica della evoluzione dinamica del pennacchio di contaminazione. (si vedano i paragrafi successivi).

## INSTALLAZIONE DELLA RETE DI MONITORAGGIO

Sul sito è stata avviata una campagna di monitoraggio attraverso la realizzazione di una serie di piezometri a maglia più stretta nell'area del focolaio di contaminazione, da affiancarsi alla esistente rete di pozzi e piezometri preesistenti che coprono però un'area molto più vasta. La realizzazione dei piezometri è stata anche utilizzata per il prelievo di campioni di suolo nello strato saturo per l'esecuzione degli studi di microcosmo.

Il posizionamento dei piezometri è stato definito in base ad una ipotetica griglia costituita sostanzialmente da un triangolo con vertice nel focolaio e con una base che si andava via via allargando allontanandosi dal vertice. L'allargamento serviva per tenere in conto l'eventuale allargamento del pennacchio dovuto agli effetti dispersivi. La dislocazione dei pozzi deriva dall'analisi effettuata durante la fase di caratterizzazione del sito, la dimensione dell'area investigata riassume le caratteristiche litologiche della zona e presenta concentrazioni di inquinanti tali da consentire facilmente il confronto tra valori rilevati e simulati. L'asse di questa griglia è allineato con la direzione principale della falda.

Complessivamente sono stati realizzati 11 piezometri in prossimità del focolaio, di cui 10 fino ad una profondità di 18 m dal piano campagna e finestrati da 12 a 18 m, intestandosi quindi nella prima falda semiconfinata (sulla quale si sono concentrate le indagini in quanto è quella attualmente oggetto di contaminazione). Un unico piezometro localizzato in corrispondenza del focolaio di contaminazione è stato realizzato fino ad una profondità di soli 9 m e finestrato da 3 a 9 m in corrispondenza della soggiacenza originaria della falda superficiale.

La minor profondità è stata dovuta alla necessità di evitare qualsiasi rischio di rimettere in comunicazione il focolaio teoricamente isolato con la falda sottostante. In figura 4 è riportata l'ubicazione dei piezometri e pozzi preesistenti nonché di quelli realizzati ex novo.



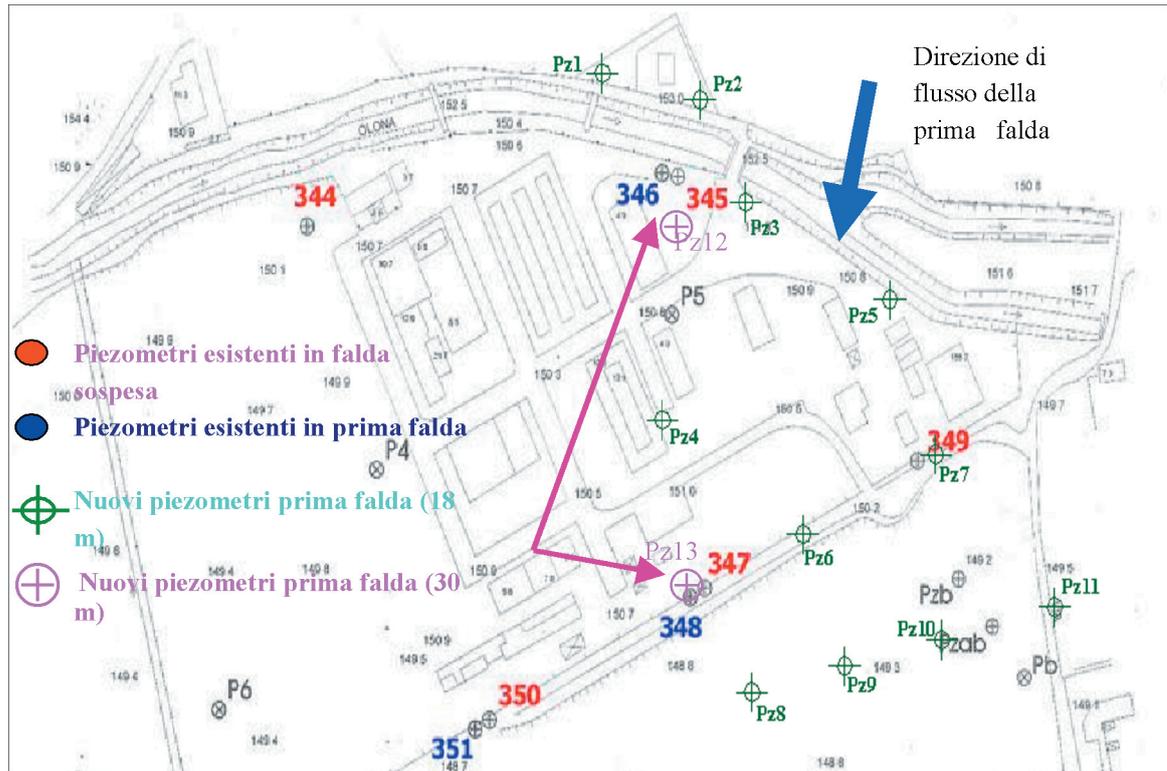


Figura 4 Rete di monitoraggio

Nel periodo 2003-2004 state effettuate 4 campagne di monitoraggio. Riassumendo per punti, risulta:

- All'interno del focolaio di contaminazione (teoricamente isolato negli interventi pregressi di messa in sicurezza di emergenza), la falda superficiale rimane altamente contaminata (piezometri 366 e 0). Si conferma la prevalenza del TeCA, seguito da TCE e PCE. Le concentrazioni sono fluttuanti, ma si deve considerare come la falda sia in questa porzione areale almeno parzialmente isolata e soggetta ad ampie fluttuazioni di livello in relazione alle condizioni climatiche. Non si riscontra infatti un accumulo significativo di composti di degradazione parziale, pur rilevandocene tracce, indice che esiste comunque una qualche attività biologica riduttiva.
- Procedendo verso valle, si riscontra una elevata contaminazione nella prima falda, il che indica il transito della contaminazione dalla falda superficiale a quella sottostante, probabilmente dovuto a discontinuità, naturale o indotta dello strato di argilla intermedio.
- In particolare, si conferma la presenza di un massimo di contaminazione nella prima falda in corrispondenza del piezometro 346 (immediatamente a valle del fiume Olona); rispetto al focolaio in falda superficiale, l'inversione delle proporzioni relative tra TeCA e TCE sembra indicare che nella migrazione dei contaminanti si abbia anche una degradazione del TeCA in TCE. Gli studi di microcosmo (Attività 2i) hanno indicato chiaramente

l'esistenza di tale degradazione (deidroclorazione, meccanismo tipicamente abiotico). Anche in questo caso si osserva una diminuzione della concentrazione complessiva di composti clorurati che non sembra collegata a fenomeni di degradazione biologica.

- Le concentrazioni di composti clorurati decrescenti all'aumentare della distanza dei singoli punti di campionamento dal focolaio di contaminazione. Tuttavia non è possibile individuare chiaramente un pennacchio di contaminazione regolare. Ad esempio, alte concentrazioni residue di composti clorurati sono osservate nei piezometri situati ad ovest della griglia di campionamento (348, 7), circa 200 m a valle del piezometro 346 e poco più dal focolaio. Tuttavia il piezometro pz 6 posto all'interasse in posizione intermedia (circa 100 m a valle del 346) ne risulta completamente esente. Ciò suggerisce la possibile presenza di più sorgenti di contaminazione, la presenza di DNAPL e/o la possibile presenza di percorsi preferenziali dovuti alle disomogeneità nel sottosuolo.

- Gli slug tests hanno viceversa mostrato una discreta uniformità delle caratteristiche idrodinamiche dell'acquifero testato, come è indicato dai valori sufficientemente regolari della conducibilità idraulica (compresi nell'intervallo tra  $1.4$  e  $9.4 \times 10^{-5}$  m/sec ). Tale evidenza è peraltro suffragata dall'analisi delle stratigrafie dei piezometri realizzati. Pertanto, si è rafforzata l'ipotesi di una presenza di zone di DNAPL e/o di altre sorgenti attive nell'area.

- E' in corso la realizzazione di ulteriori due piezometri, in zone rispettivamente ad alta concentrazione (prossimità del piezometro 346) e bassa concentrazione (prossimità piezometro 348). Tali piezometri sono progettati per profondità superiori dei precedenti (finestratura in prima falda fino a -30 metri) e saranno attrezzati con un particolare sistema di campionamento del tipo "multipacker" messo a punto dell'Università di Tubingen (Germania). L'uso di tal e "multipacker system" permetterà il campionamento simultaneo a differenti profondità (metro per metro) consentendo di ricostruire la eventuale stratificazione verticale dell'area

## TEST DI MICROCOSMO

### *Preparazione ed impostazione dei test*

I microcosmi sono stati allestiti utilizzando campioni di suolo saturo e acqua di falda contaminata, prelevati nel sito campione. Il suolo utilizzato proveniva dal sondaggio effettuato all'interno del focolaio originale di contaminazione. L'acqua di falda proveniva da un piezometro già disponibile, nelle immediate vicinanze del punto dove è stato campionato il suolo (la sua composizione è riportata in Tabella 1). Sono attualmente in corso altri microcosmi con il suolo saturo dell'acquifero in prossimità del piezometro 346.

Una volta campionati sia l'acqua di falda che il suolo, sono stati conservati in recipienti di vetro scuro e mantenuti a  $4^{\circ}\text{C}$  fino al momento dell'uso. I microcosmi sono stati poi

preparati sotto atmosfera di N<sub>2</sub> mediante l'ausilio di una cappa anaerobica. Sono stati realizzati 13 trattamenti differenti ciascuno dei quali condotto in triplicato per verificarne la riproducibilità. Le condizioni sperimentali testate negli studi di microcosmo sono riportate in Tabella 2 (Aulenta et al., in press). I primi 10 trattamenti sono stati realizzati riempiendo ogni bottiglia (da 250 mL) con 80 g di suolo umido (16 % di umidità) e 160 mL di acqua di falda.

Tabella 1. Caratterizzazione chimico-fisico dell'acqua di falda utilizzata negli studi di microcosmo.

Parametro		Parametro	
TeCA (mg/l)	8.30	CH <sub>4</sub> (mg/l)	< d.l.
PCE(mg/l)	0.58	COD (mg/l)	30.1
TCE(mg/l)	5.38	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mg/l)	419.0
cis-DCE (mg/l)	0.36	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/l)	26.8
trans-DCE (mg/l)	0.05	O <sub>2</sub> (mg/l)	0.7
VC (mg/l)	< d.l.	pH	6.6
ETH (mg/l)	3.6	Potenziale redox	160

Una volta preparate, le bottiglie sono state chiuse ermeticamente (con tappi di gomma butile e ghiere di alluminio) e ammendate con il donatore di elettroni scelto (i.e: estratto di lievito, lattato, butirrato, idrogeno o niente). I fattori di crescita (estratto di lievito 20 mg/L e vitamina B<sub>12</sub> 0,05 mg/L), nei microcosmi in cui ne era prevista la presenza, sono stati aggiunti contestualmente al donatore di elettroni. Il trattamento 11 è stato realizzato riempiendo le bottiglie con 35 mL di un consorzio dechlorante misto arricchito su PCE ed alimentato con H<sub>2</sub> (contenente *Dehalococcoides ethenogenes*, si veda Aulenta et al., 2002 e 2004) e 160 mL di acqua (in assenza del suolo). Dopo averle chiuse ermeticamente, le bottiglie sono state ammendate con H<sub>2</sub> e fattori di crescita. Per realizzare i trattamenti 12 e 13, gli 80 g di suolo umido aggiunti nelle bottiglie da siero sono stati diluiti con 160 mL di un mezzo anaerobico riducente (RAMM). Dopo averle chiuse ermeticamente, le bottiglie sono state ammendate con TCE e H<sub>2</sub> (trattamento 12) o TCE e butirrato (trattamento 13).

Tutti i microcosmi, una volta preparati sono stati incubati al buio a temperatura ambiente (20-25° C) e mantenuti in quiete. Ogni 14 giorni, la determinazione dei solventi clorurati, ETH, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>, lattato e acidi grassi volatili era effettuata mediante gascromatografia, in spazio di testa o in fase liquida, con rivelatore ECD, FID e TCD a seconda del composto e della concentrazione. Gli anioni inorganici erano determinati mediante cromatografia ionica.

Tabella 2. Condizioni sperimentali testate negli studi di microcosmo

Trattamento	Suolo e acqua di falda ammendati con:
1	- (controllo abiotico)
2	- (controllo biotico)
3	- (controllo biotico)+ g.f. <sup>1</sup>
4	YE <sup>2</sup> (180 mg/l) + g.f.
5	Lattato (3 mmol/l)
6	Lattato (3 mmol/l) + g.f.
7	Butirrato (3 mmol/l)
8	Butirrato (3 mmol/l)+ g.f.
9	H <sub>2</sub> (3 mmol/l) <sup>3</sup>
10	H <sub>2</sub> (3 mmol/l) + g.f.
	<b>Acqua di falda ammendata con:</b>
11	H <sub>2</sub> (3 mmol/l) +Inoculo dcelorante <sup>4</sup> + g.f.
	<b>Suolo ammendato con:</b>
12	RAMM <sup>5</sup> + TCE + H <sup>2</sup> (3mmol/l) + g.f.
13	RAMM + TCE + Butirrato (3mmol/l) + g.f.

<sup>1</sup> g.f. (fattori di crescita): estratto di lievito (20 mg/l) e Vitamina B<sub>12</sub> (0.05 mg/l);

<sup>2</sup> YE: estratto di lievito ;

<sup>3</sup> concentrazioni nominali;

i.e. moli totali/ volume di liquido;

<sup>4</sup> l'inoculo è un consorzio microbico dechlorante contenente Dehalococcoides spp.;

<sup>5</sup> RAMM: rmezzo minerale anaerobico

### Risultati dei microcosmi

Lo studio di microcosmo ha consentito di verificare la capacità dei microrganismi nativi del suolo contaminato di degradare i contaminanti presenti nell'acqua di falda, di verificare i principali prodotti della degradazione dei contaminanti, nonché di identificare le condizioni ambientali più favorevoli alla biodegradazione. Ciò è stato possibile attraverso il periodico monitoraggio dei principali costituenti l'acqua di falda durante tutto il periodo di incubazione delle bottiglie (microcosmi) che è durato oltre un anno (384 giorni). A titolo di esempio, in Figura 5 è riportato l'andamento temporale della degradazione dei solventi clorurati (i.e. TeCA, TCE) presenti nell'acqua di falda da parte dei microrganismi del suolo, in un tipico microcosmo ammendato con lattato ed elementi in tracce (Petrangeli Papini et al., 2004).

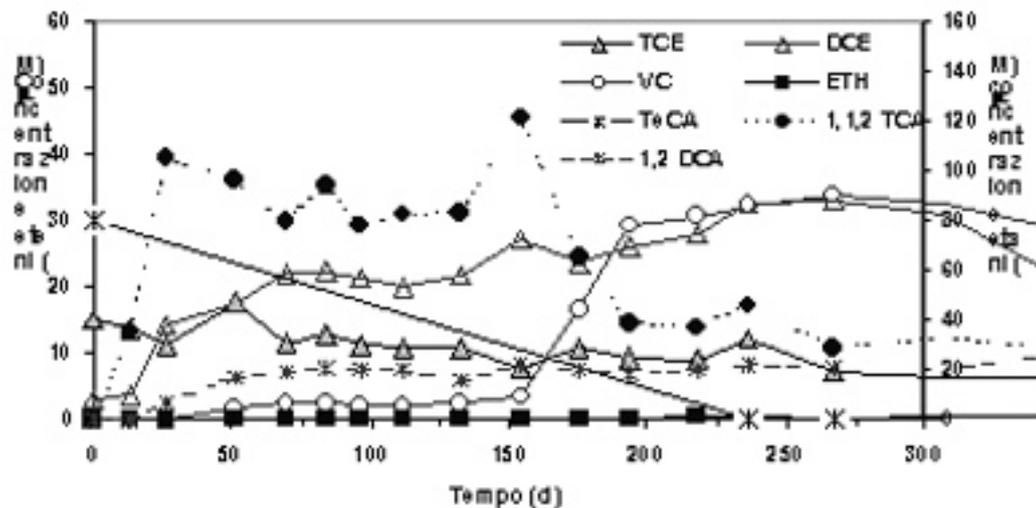


Figura 5. Andamento temporale della degradazione dei solventi clorurati osservati in un tipico microcosmo ammendato con lattato ed elementi in tracce.

In sommario, si è rilevato che:

- Nel suolo del sito contaminato "campione" sono presenti popolazioni dechloranti native in quanto tutti i microcosmi, con la sola eccezione del controllo abiotico, hanno mostrato attività dechlorante;
- l'attenuazione naturale risulta di difficile applicazione per il risanamento del sito "campione" data la lenta dechlorazione osservata nel trattamento che riproduceva le condizioni naturali presenti in falda (trattamento 2);
- l'attività dechlorante a carico dei microrganismi autoctoni è favorita dalla presenza di fattori di crescita e la loro assenza ne costituisce una condizione limitante;
- tutti i donatori di elettroni testati (estratto di lievito, lattato, butirrato e idrogeno) stimolano l'attività dechlorante rispetto al controllo biotico;
- tra tutti i donatori di elettroni ammendati, quello che stimola maggiormente l'attività dechlorante è l'estratto di lievito. Tale ammendante, infatti, porta ad una maggiore conversione dei contaminanti clorurati (sia etanici che etenici) in etilene. Ciò dimostra che i microrganismi autoctoni del suolo sono in grado di effettuare tutti gli stadi della RD degli etani ed eteni clorurati fino ad etilene.
- l'aggiunta in falda di un inoculo dechlorante esogeno contenente *Dehalococcoides* spp può incrementare sensibilmente la velocità di degradazione dei contaminanti clorurati. Nel trattamento 11 in cui si è riprodotta tale condizione, i composti clorurati sono stati degradati più velocemente e convertiti principalmente in etilene (58,6%) e VC (20,6%) rispetto al controllo con microrganismi del suolo (a parità di donatore di elettroni, H<sub>2</sub>, trattamento 10).
- In conclusione i risultati ottenuti dai microcosmi indicano che è possibile favorire la completa degradazione dei contaminanti clorurati attraverso l'aggiunta di un appropriato donatore di elettroni (estratto di lievito) e/o l'aggiunta di una coltura dechlorante contenente *Dehalococcoides* spp.

**E' inoltre interessante notare che:**

- la dechlorazione degli eteni clorurati avviene anche in presenza di solfato, nonostante questo competa nel consumo del donatore di elettroni;
- i microrganismi nativi del suolo hanno bisogno non solo di un donatore di elettroni ma anche di acetato (probabilmente come fonte di carbonio per la crescita);
- l'attività metanigena è molto scarsa nella maggior parte dei microcosmi e comporta una limitazione della idrogenolisi degli eteni clorurati
- la limitazione della RD di eteni clorurati a etilene, osservata in alcuni microcosmi, è probabilmente da ascrivere ad effetti di inibizione di co-contaminanti nell'acqua di falda (diretta e/o sui metanogeni) o più probabilmente all'assenza di qualche fattore nutritivo ancora da individuare. Tale inconveniente può essere superato usando una fonte di carbonio complessa come l'estratto di lievito e/o aggiungendo gli elementi tipici di un mezzo minerale sintetico.
- Su quest'ultimo aspetto è necessario un approfondimento di ricerca per individuare il o gli elementi nutritivi responsabili della limitazione della RD degli eteni clorurati.

**REALIZZAZIONE DEL TEST DI CAMPO**

Al fine di verificare sul campo i risultati incoraggianti ottenuti nei test di microcosmo per quanto riguarda la degradazione biologica è stato realizzato un sistema pilota che consentisse l'aggiunta di ammendanti e la verifica degli effetti di stimolazione dell'attività biologica direttamente in situ. Il test in situ ha anche la funzione di verificare gli aspetti della idrodinamica dell'acquifero su scala locale in quanto la possibilità di implementare poi a piena scala il processo di decontaminazione è legata alla realizzazione di un opportuno sistema di distribuzione degli ammendanti.

Il sistema pilota è stato realizzato in una zona delimitata del sito contaminato in questione e consiste in un sistema di circolazione artificiale che estrae l'acqua dalla falda a valle, la miscela con gli ammendanti e la reimmette in falda. Tale sistema permette di poter variare a piacere le condizioni idrodinamiche locali, consentendo di ottenere:

- un confinamento idraulico del volume della zona reattiva con limitazione degli scambi con il normale flusso di falda.
- il controllo del tempo di residenza dell'acqua ammendata ad un valore adeguato limitando al contempo il volume coinvolto nella fase reattiva;
- un adeguato miscelamento dell'acqua di falda con gli ammendanti prescelti;

Ad ulteriore sicurezza, il sistema è stato realizzato all'interno del focolaio originale con captazione nella falda sospesa. In quanto confinata, tale localizzazione offriva allo stesso tempo la maggiori garanzie di salvaguardia per l'acquifero vero e proprio (prima falda) ed un'assenza di gradiente idraulico significativo a limitare ulteriormente gli scambi con l'esterno.

Per la progettazione dell'impianto pilota, sono state effettuate simulazioni mediante VISUALMODFLOW per verificare le condizioni idrodinamiche del sistema di circolazione artificiale e valutare l'entità della zona interessata dalla dispersione delle sostanze ammendanti. Le simulazioni sono state condotte utilizzando in input i parametri idrogeologici e dispersivi derivanti dalla precedente attività di caratterizzazione del sito (ricostruzione del modello concettuale e modellizzazione a scala locale dell'acquifero) nonché valutando diversi scenari operativi (numero, collocazione e profondità dei piezometri, portate emunte e reiniettate). Inoltre, è stato simulato il destino nel campo di moto generato dalla circolazione forzata di singoli elementi fluidi immessi attraverso i piezometri di immissione (particle tracking mediante FLOWPATH), sempre al fine di valutare la dispersione di traccianti o ammendanti. La figura 6 riporta un esempio di tale simulazione nello scenario che è stato poi effettivamente prescelto per la realizzazione del sistema pilota.

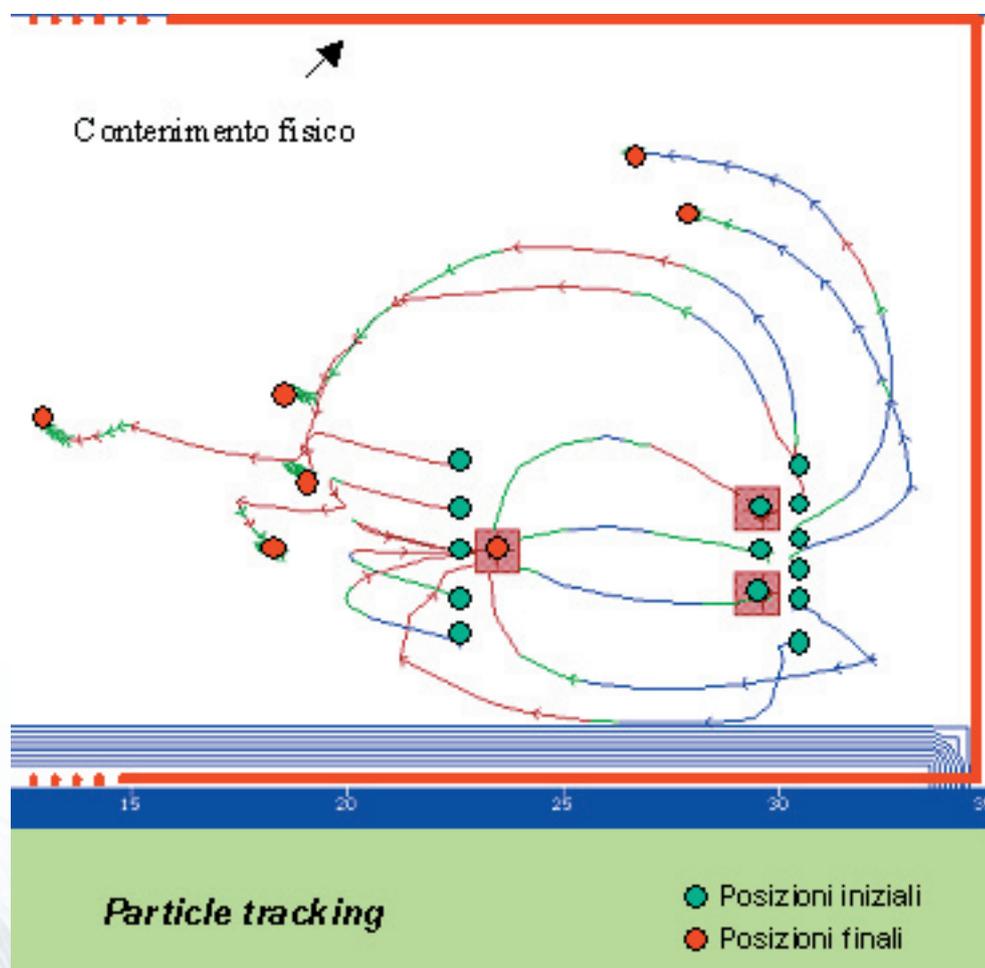


Figura 6 Esempio di simulazione di Particle tracking (FLOWPATH)

Sulla base delle risultanze modellistiche, il sistema è stato quindi realizzato come riportato in Tabella 3 e Figura 7. Come si vede, la circolazione delle acque di falda sospesa è ottenuta per mezzo di due pozzi di iniezione della miscela acqua-ammendante ed un pozzo di estrazione, collegati attraverso un circuito di miscelazione con punti

di prelievo acqua a monte e a valle della miscelazione stessa. Inoltre è stato previsto un sistema di monitoraggio (7 piezometri) per il prelievo di campioni di acqua e per la verifica dei livelli piezometrici. Il sistema è stato anche dotato di un sistema indipendente di alimentazione d'acqua all'interno dell'area soggetta al test di campo, attraverso un impianto di sollevamento emungente la prima falda. Ciò è stato realizzato al fine di poter eventualmente intervenire a mantenere costante il livello dell'acqua nel sistema poroso in quanto la caratteristica di acquifero freatico isolato dalla circolazione idrica sotterranea locale potrebbe provocare una eccessiva dipendenza del livello dai cicli stagionali di ricarica superficiale.

NOME POZZO	TIPOLOGIA	Ø INTERNO	PROFONDITA' (m dal p.c.)	FINESTRATURA		PORTATA (m <sup>3</sup> /d)
				da	A	
PI1	Iniezione	80 mm	-9	-7.5	-8.5	1.3
PI2	Iniezione	80 mm	-9	-7.5	-8.5	1.3
PE3	Estrazione	80 mm	-9	-6	-9	-2.6
PIA	Alimentazione	80 mm	-9	-7.5	-8.5	-2.6

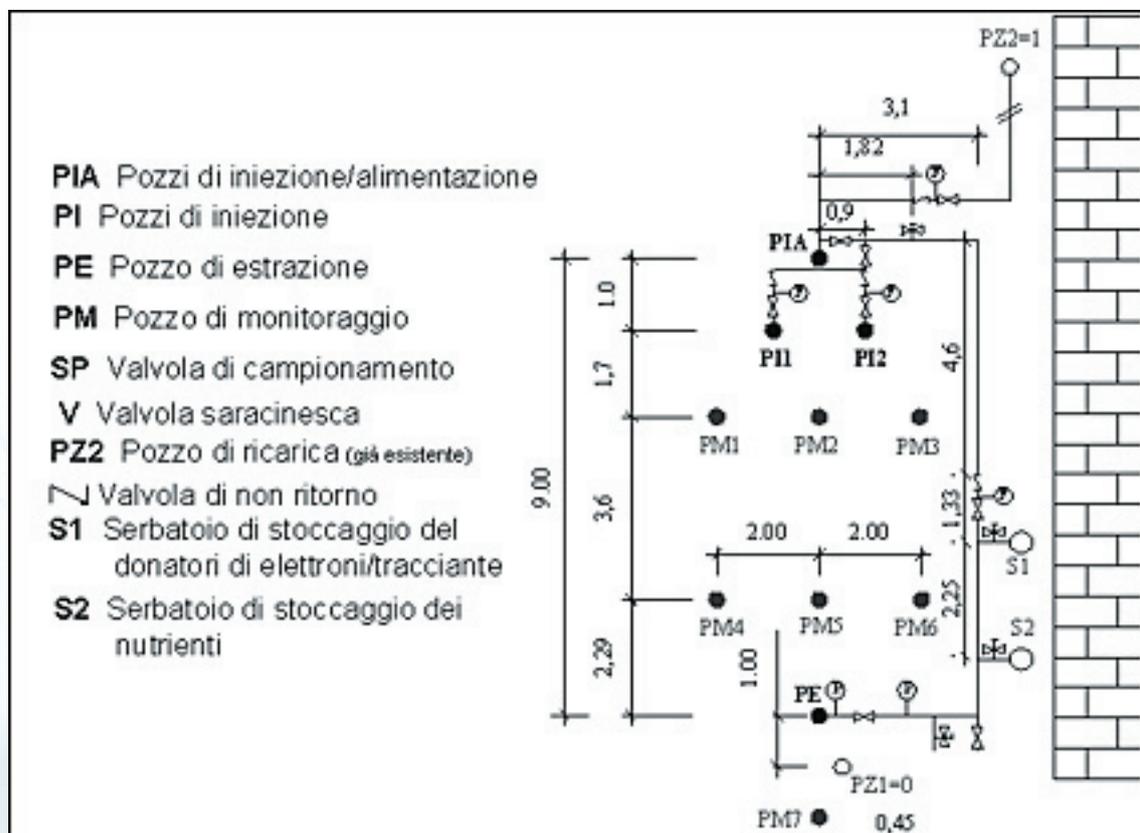


Figura 7 - Schema impianto test di campo

L'impianto pilota è stato realizzato nella prima metà di luglio del 2004 (Figura 8) ed è attualmente utilizzato per la realizzazione di opportuni test con tracciante. Dall'analisi dei risultati dei test con tracciante sarà possibile ottenere informazioni circa le proprietà idrodinamiche del mezzo, nonché verificare la corretta funzionalità del sistema di circolazione indotta delle acque. Tali informazioni consentiranno una stima più accurata dei tempi di residenza, consentendo una ottimizzazione della distribuzione degli ammendanti necessari al sostentamento dell'attività biodegradativa. Il test con tracciante sarà seguito dalla fase di sperimentazione del sistema di bonifica biologica accelerata con una durata non inferiore ai 6 mesi.



Figura 8 – Fotografia dell'impianto pilota (Luglio 2004)

## BIBLIOGRAFIA

- Aulenta, F., Majone, M., Di Pinto, A.C., Tomei, M.C., Tandoi, V. Reductive dechlorination of perchloroethene to ethene by microbial consortia in sediments. *Proceedings of 9th World Congress on Anaerobic Digestion*. Antwerpen, 2: 239-244, 2001.
- Aulenta, F., Majone, M., Verbo, P., Tandoi, V. Complete dechlorination of tetrachloroethene to ethene in presence of methanogenesis and acetogenesis by an anaerobic sediment microcosm. *Biodegradation* 13: 411-424, 2002.
- Aulenta F., Majone M., Beccari M., Perna L. Tandoi V. Enrichment from activated sludges of aerobic mixed cultures capable to degrade vinyl chloride (VC) as the sole carbon source, *Annali di Chimica*, 93, 337-346, 2003.
- Aulenta, F., Rossetti, S., Majone, M., Tandoi V. Detection and quantitative estimation of *Dehalococcoides* spp. in dechlorinating bioreactor by a combination of fluorescent in situ hybridization (FISH) and kinetic analysis. *App Microbiol Biotechnol* 64: 206-212, 2004.
- Aulenta, F., Bianchi, A., Majone, M., Petrangeli Papini, M., Potalivo, M., Tandoi, V. Assessment of natural or enhanced in situ bioremediation at a chlorinated solvent-contaminated aquifer in Italy: a microcosm study. *Environmental international*, in press
- Ballapragada, B.S., Stensel, D.H., Puhakka, J.A. , Ferguson, J.F. Effect of hydrogen on reductive dechlorination of chlorinated ethenes. *Environ Sci Technol* 31, 1728-1734, 1997.
- Calloni A., Pirrotta S., Sala P., Tavecchia S., Virgilio R. Individuazione del pennacchio di inquinamento originato nell'area dominata "Ex-Bianchi" di Rho e perimetrazione dell'area ad esso adiacente. *Relazione tecnica. Direzione centrale ambiente. Provincia di Milano*, 2001.
- Coleman NV, Mattes TE, Gossett JM, Spain JC Phylogenetic and kinetic diversity of aerobic vinyl chloride-assimilating bacteria from contaminated sites. *Appl Environ Microbiol* , 68, 6162-6171, 2002.
- Cupples, A. M.; Spormann, A. M.; McCarty, P. L. Growth of a *Dehalococcoides*-like microorganism on vinyl chloride and *cis*-dichloroethene as electron acceptors as determined by competitive PCR. *Appl. Environ. Microbiol*, 69, 953-959, 2003.
- DiStefano, T.D., Gossett, J.M., Zinder, S.H. Reductive dechlorination of high concentration of tetrachloroethene to ethene by an anaerobic enrichment culture in absence of methanogenesis. *Appl Environ Microbiol* 57, 2287-2292, 1991.

- DiStefano, T.D., Gossett, J.M. , Zinder, S.H. Hydrogen as an electron donor for dechlorination of tetrachloroethene by an anaerobic mixed culture. *Appl Environ Microbiol* 58: 3622-3629, 1992.
- Fathepure B. Z., Boyd S. A. Reductive dechlorination of perchloroethylene and the role of methanogens. *FEMS Microbiol.Letter* 49 149-156, 1988.
- Fennell, D.E., Gossett, J.M., Zinder, S.H. Comparison of butyric acid, ethanol, lactic acid, and propionic acid as hydrogen donors for the reductive dechlorination of tetrachloroethene. *Environ Sci Technol* 31, 918-926, 1997.
- Freedman D, Gossett JM Biological reductive dechlorination of tetrachloroethylene and trichloroethylene to ethylene under methanogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2144-2151, 1989.
- Freedman D.L., Herz S.D. *Wat. Env. Res.* 68, 3, 320-328, 1996.
- Gerritse J., Renard V., Pedro Gomes T. M., Lawson P.A., Collins M. D., Gottschal J. C. *Arch. Microbiol.* 165 132-137, 1996.
- Hartmans S.J., De Bont J. A. M., *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1220-1226, 1992.
- He, J.; Ritalahti, K. M.; Yang, K.-L.; Koenigsberg, S. S.; Löffler, F. E. Detoxification of vinyl chloride to ethene coupled to growth of an anaerobic bacterium. *Nature*, 424, 62-65, 2003.
- He,J., Sung, Y., Dollhopf, M.E., Fathepure, B.Z., Tiedje, J.M. , Löffler, F.E. Acetate versus hydrogen as direct electron donors to stimulate the microbial reductive dechlorination process at chloroethene-contaminated sites. *Environ Sci Technol* 36, 3945-3952, 2002..
- Holliger C., Schraa G., Stams A. J. M.,e Zehnder A. J. B. A highly purified enrichment culture couples the reductive dechlorination of tetrachloroethene to growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2991-2997, 1993.
- Krumholtz L. R., Sharp R., Fishbain S. S. A freshwater anaerobe coupling acetate oxidation to tetrachloroethylene dehalogenation. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 4108-4113, 1996.
- Maymò-Gatell X, Tandoi V, Gosset JM, Zinder SH. Characterisation of an H<sub>2</sub>-utilizing anaerobic enrichment culture that reductively dechlorinates tetrachloroethene to vinyl chloride and ethene in complete absence of methanogenesis and acetogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3928-3933, 1995.

- Maymò-Gatell, X., Chien, Y.T., Gossett, J.M., Zinder, S.H. Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene. *Science* 276, 1568-1571, 1997.
- Middeldorp, P.J.M.; Luijten, M.L.G.C.; van de Pas, B.A.; van Eekert, M.H.A.; Kengen, S.W.M.; Schraa, G.; Stams, A.J.M. Anaerobic microbial reductive dechlorination of chlorinated ethenes. *Bioremediation Journal*. 3: 151-169, 1999.
- Morse, J.J., Alleman, B.C., Gossett, J.M., Zinder, S.H., Fennell, D.E., Sewell, G.W. & Vogel, C.M. A treatability test for evaluating the potential applicability of the reductive anaerobic biological in situ treatment technology (RABITT) to remediate chloroethenes. *A Draft technical protocol developed for the Environmental Security Technology Certification Program, Department of Defense; US Government printing Office, Washington D.C.* 1997.
- Parsons F., Wood P. R., De Marco A. Transformations of tetrachloroethene and trichloroethene in microcosms and groundwater. *J. Am. Water Works Assoc.* 56-59, 1984.
- Petrangeli Papini M., Majone M., Aulenta F., Viotti P., Leccese M., Tandoi V., Rossetti S., Calloni A., Sala P. *Sviluppo di un protocollo per la valutazione di fattibilità della bonifica per via biologica di falde contaminate da solventi clorurati*, Ecomondo Acqua, Rimini 3-6 novembre 2004.
- Rossetti S., Blackall L.L., Majone M., Hugenholtz P., Plumb J.J., Tandoi V. Kinetic and molecular characterization of an anaerobic dechlorinating microbial community, *Microbiology* 149, 459-469, 2003.
- Ryoo D, Shim H, Arengi FL, Barbieri P, Wood TK. Tetrachloroethylene, trichloroethylene, and chlorinated phenols induce toluene-o-xylene monooxygenase activity in *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Appl Microbiol Biotechnol*; 56(3-4), 545-9, 2001.
- Scholz-Muramatsu H., Neumann A., Mebmer M., Moore E., Diekert G. *Arch. Microbiol.* 163, 48-54, 1995.
- Tandoi, V., DiStefano, T.D., Bowser, P.A., Gosset, J.M., Zinder, S.H. Reductive dehalogenation of chlorinated ethenes and halogenated ethanes by a high rate anaerobic enrichment culture. *Environ Sci Technol* 28, 973-979, 1994.
- Verce MF, Ulrich RL, Freedman DL Characterization of an Isolate that uses vinyl chloride as a growth substrate under aerobic conditions. *Appl Environ Microbiol* 66: 3535-3542, 2000.

- Verce MF and Freedman DL Modeling the kinetics of vinyl chloride cometabolism by an ethane-grown *Pseudomonas* sp. *Biotechnol Bioeng* 71, 274-285, 2001a.
- Verce MF, Ulrich RL, and Freedman DL Transition from cometabolic to growth-linked biodegradation of vinyl chloride by a *Pseudomonas* sp. isolated on ethene. *Environ Sci Technol* 35, 4242-4251, 2001b
- Vogel T. M.»Handbook of Bioremediation Ed. Kerr R. S. - CRC Press, 10, 201-225, 1994.
- Vogel T. M., Criddle C. S., McCarty P. L. Transformations of halogenated aliphatic compounds. *Environ. Sci. Technol.* 21(8) 722-736, 1987.
- Wiedemeier T.H. et al. Technical protocol for evaluating natural attenuation of chlorinated solvents in ground water *EPA/600/R-98/128*, 1998.

