

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

Dottorato di Ricerca in

Ingegneria Civile, Ambientale e dei Materiali

Ciclo XXVIII

Settore Concorsuale di afferenza: 03/D1

Settore Scientifico disciplinare: CHIM/11

Applicazioni del processo di washing alla decontaminazione ex-situ di sabbie inquinate da idrocarburi del petrolio: selezione di agenti biogeni e/o surfattanti microbici non tossici/biodegradabili e ottimizzazione dei parametri di processo

Presentata da:

Dr Alessia Arelli

Coordinatore Dottorato

Chiar.mo

Prof. Alberto Lamberti

Relatore

Chiar.mo

Prof. Fabio Fava

Correlatore

Giulio Zanaroli, Ph.D

Esame finale anno 2016

Indice

Parte introduttiva.....	6
1. Contesto	6
1.1 Prodotti biogenici nella bioremediation: disponibilità commerciale ed applicabilità.....	9
1.2 Soil washing: applicazioni innovative ambientalmente ed economicamente più sostenibili ..	15
2. Inquinamento matrici ambientali.....	20
2.1 Frequenza e natura di oil spills	22
2.2 I processi chimico-fisici conseguenti gli sversamenti petroliferi.....	25
2.3 L'impatto ambientale conseguente gli sversamenti petroliferi	27
2.3.1 L'impatto sulle coste	28
2.3.2 Gli interventi di ripristino costiero	29
3. Gli idrocarburi petroliferi.....	32
3.1 Proprietà	33
3.2 Olio combustibile pesante ad uso navale (IFO180).....	34
4. Tecnologie di bonifica	36
4.1 Tecnologie di bonifica dei suoli	36
4.2 Cenni su tecnologie biologiche di risanamento	42
4.3 La biodisponibilità.....	44
4.4 Soil washing.....	45
5. Agenti mobilizzanti/surfattanti biogeni e microbici	54
5.1 Agenti mobilizzanti biogeni	54
5.2 I surfattanti.....	56
5.2.1 Classificazione dei surfattanti	59
5.2.2 Surfattanti sintetici	60
5.2.3 Surfattanti biogeni.....	62
5.2.4 I surfattanti di origine microbica (biosurfattanti)	64

6. Response Surface Methodology (RSM)	70
6.1 Disegno e dominio sperimentale	71
6.2 Valutazione del disegno sperimentale	75
6.3 Procedura	80
6.3.1 Trasformazione	80
6.3.2 <i>Fit summary</i>	81
6.3.3 Scelta del modello	84
6.3.4 ANOVA	84
6.3.5 Diagnostica dei risultati	88
6.3.6 Grafici del modello	95
6.4 Ottimizzazione dei parametri del processo	96
6.4.1 Funzione desiderabilità	97
6.5 Post analisi	99
Obiettivi della sperimentazione	100
Parte di materiali e metodi	102
7. Materiali	103
7.1 Sabbie utilizzate	103
7.2 IFO180	103
7.3 Agenti testati	104
7.4 Prodotti e reagenti impiegati	105
8. Protocolli sperimentali	106
8.1 Contaminazione delle sabbie con IFO180	106
8.2 Estrazione degli idrocarburi dalle sabbie	107
8.3 Estrazione degli idrocarburi dal refluo acquoso	110
8.4 Analisi gas-cromatografica (GC–FID) degli idrocarburi totali del petrolio (HC) e dei n-alcani	110
8.5 Calcolo della rimozione di idrocarburi totali dalle sabbie dopo lavaggio	112
8.6 Analisi gas-cromatografica (GC–FID) degli IPA	113

8.7 Calcolo della rimozione di IPA dalle sabbie dopo il soil washing	114
8.8 Soil washing: piano sperimentale	114
8.8.1 Screening degli agenti.....	116
8.8.2 Ottimizzazione del processo	117
Parte dei risultati della sperimentazione	120
9. Fase di screening degli agenti testati	121
9.1 Soil washing: fase di screening per selezione degli agenti mobilizzanti/surfattanti biogeni e microbici	121
9.2 Bilancio di massa (HC).....	124
10. Modelli predittivi e ottimizzazione del processo.....	126
10.1 Design of Experiment (DoE) e dominio sperimentale	126
10.2 Validazione ed ottimizzazione del processo.....	127
10.3 Blank	128
10.3.1 RSM applicato alle 24 ore: analisi statistica della risposta	128
10.3.2 RSM applicato alle 24 ore: influenza dei parametri sulla risposta	132
10.3.3 Validazione sperimentale del modello selezionato e ottimizzazione dei parametri del processo alle 24 ore	134
10.4 TX.....	135
10.4.1 RSM applicato alle 24 ore: analisi statistica della risposta	135
10.4.2 RSM applicato alle 24 ore: influenza dei parametri sulla risposta	139
10.4.4 Validazione sperimentale del modello selezionato e ottimizzazione dei parametri del processo alle 24 ore	141
10.5 SL	143
10.5.1 RSM applicato alle 24 ore: analisi statistica della risposta	143
10.5.2 RSM applicato alle 24 ore: influenza dei parametri sulla risposta	147
10.5.3 RSM applicato alle 48 ore	150
10.5.4 Validazione sperimentale del modello selezionato e ottimizzazione dei parametri del processo alle 24 ore	153
10.6 HPB-CD.....	155
10.6.1 RSM applicato alle 24 ore: analisi statistica della risposta	155

10.6.2 RSM applicato alle 24 ore: influenza dei parametri sulla risposta	159
10.6.3 RSM applicato alle 48 ore	161
10.6.4 Validazione sperimentale del modello selezionato e ottimizzazione dei parametri del processo alle 24 ore	164
10.7 SR.....	165
10.7.1 RSM applicato alle 24 ore: analisi statistica della risposta	165
10.7.2 RSM applicato alle 24 ore: influenza dei parametri sulla risposta	170
10.7.3 RSM applicato alle 48 ore	173
10.7.4 Validazione sperimentale del modello selezionato e ottimizzazione dei parametri del processo alle 24 ore	176
11. Determinazione della frazione <i>n-alcane</i>/IPA in IFO180 e nei casi di validazione/ottimizzazione	179
11.1 Frazione <i>n-alcane</i> /IPA presente in IFO180.....	180
11.2 Frazione <i>n-alcane</i> /IPA nei campioni di validazione / ottimizzazione.....	182
12. Caso studio SL – 2 factors : introduzione del parametro tempo	187
12.1 Design of Experiment (DoE) e dominio sperimentale	187
12.2 RSM applicato a SL – 2 factors: analisi statistica della risposta	188
12.3 RSM applicato a SL – 2 factors: influenza dei parametri sulla risposta e validazione/ottimizzazione del processo	192
13. Conclusioni	194
Bibliografia	207

Parte introduttiva

~

1. Contesto

La presente sperimentazione rientra nel progetto di ricerca internazionale “Integrated Biotechnological Solutions for Combatting Marine Oil Spill” (Kill Spill, FP7 Grant agreement No. 312139) finanziato nell’ambito del 7° Programma Quadro della Comunità Europea. Il progetto mira a ricercare soluzioni (bio)tecnologiche innovative, che possano rivelarsi economicamente ed ambientalmente sostenibili per la gestione degli sversamenti di petrolio e la bonifica delle matrici contaminate, a seguito di sversamenti da trasporto di petroli o incidenti in piattaforme *offshore*. In ambienti marini il petrolio tende a diffondersi con il moto ondoso e con l’azione dei venti, gli idrocarburi del petrolio possono arrivare fino alle spiagge; la persistenza del petrolio sui sedimenti della costa può essere un fenomeno prolungato nel tempo (l’entità della problematica ambientale causata da *oil spills* viene meglio descritta nel *cap. 2*).

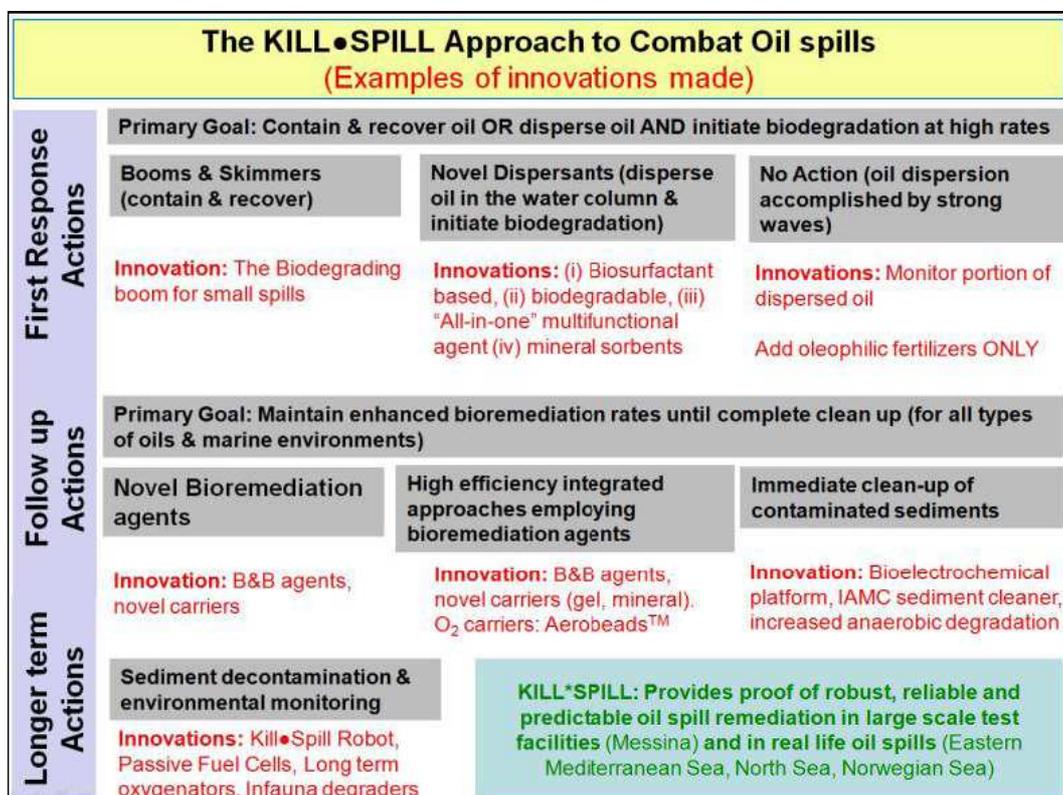


Fig. 1.1 Azioni implementate nel progetto Kill Spill per contrastare *oil spills*

<http://www.killspill.eu/node/248>

Il progetto Kill Spill intende sviluppare azioni integrate e multidisciplinari che rappresentino soluzioni e strategie, ed utilizzino biotecnologie ad alta efficienza, applicabili sia a valle delle azioni di risposta immediate (*skimmer*, agenti disperdenti ecc.), sia nel lungo periodo, per trattare mari, sedimenti, suoli e spiagge contaminate (*fig.1.1*). Se consideriamo le prime azioni che di norma si applicano a fronte di uno sversamento di prodotti petroliferi, possiamo affermare che attualmente in più ambienti marini, quali Mar Baltico o Mediterraneo, l'uso di bracci e *skimmer* per contenere e recuperare quanto più olio possibile sversato, è il metodo maggiormente in uso negli Stati europei, rappresentando il primo intervento di emergenza, in quanto evita il trasferimento del contaminante dalla superficie del mare alla colonna d'acqua. L'olio presenta la naturale tendenza a disperdersi, evaporare, diffondersi ed emulsionare sin dalle prime ore dopo l'evento di contaminazione (*fig.1.2*). Con tali tecniche ad oggi si è in grado di raccogliere dal mare circa il 15% del petrolio sversato, mentre il restante si deposita sul fondo o raggiunge le coste (Owens, 2011). I risultati migliorano qualora si tratti di aree in zone di mari confinati. Kill Spill mette in atto una serie di risposte alle azioni da attuare in questa prima fase, proponendo soluzioni meccaniche in grado per esempio di diminuire la dispersione degli oli o concentrarli in strati superficiali più spessi. Vengono anche studiate nuove caratteristiche tecniche dei bracci (forme e materiali assorbenti), unitamente a tessuti-non tessuti aventi maggiore robustezza e maneggiabilità. Rispetto ai trattamenti da adottare in mare aperto, quali le azioni di decontaminazione da attuare nella seconda fase temporale *post* sversamento, è di uso comune l'utilizzo di agenti disperdenti (favorito dalla introduzione sul mercato di una nuova generazione di prodotti non tossici) per rimuovere l'olio dalle superfici prima che questo si depositi sui fondali. Si tenga conto che l'attenuazione naturale è possibile solo in mare aperto ed in condizioni di moti ondosi ad elevata energia, inoltre a causa dei processi di *weathering* e dei tempi di attivazione dei meccanismi di degradazione, si stima che tale processo si attivi dopo almeno una settimana dall'evento (*fig.1.2*). Kill Spill propone azioni per diminuire tali tempistiche, introducendo, per esempio, nutrienti insieme a consorzi di batteri in grado di degradare gli oli, e/o biosurfattanti al fine di accelerare i tempi di degradazione. Per favorire la degradazione in ambienti anaerobici (lungo la colonna d'acqua) Kill Spill promuove tecnologie innovative (per esempio Oxygel™ e Aerobeads™) a lento rilascio di ossigeno che perduri nel tempo e possa agire anche nei sedimenti; ossigeno necessario per favorire una efficiente degradazione. Queste tecniche possono essere usate infatti per la decontaminazione di sedimenti in ogni tipologia di ambiente dall'est mediterraneo alla

Groenlandia. Altre tecnologie innovative proposte dal progetto riguardano il monitoraggio, viene infatti proposto lo sviluppo di biosensori e *tools* per il monitoraggio chimico. Questo è solo un cenno alle azioni innovative promosse dal progetto Kill Spill, che di fatto coinvolge 33 partners internazionali, con esperienze comprovate e trasversali.

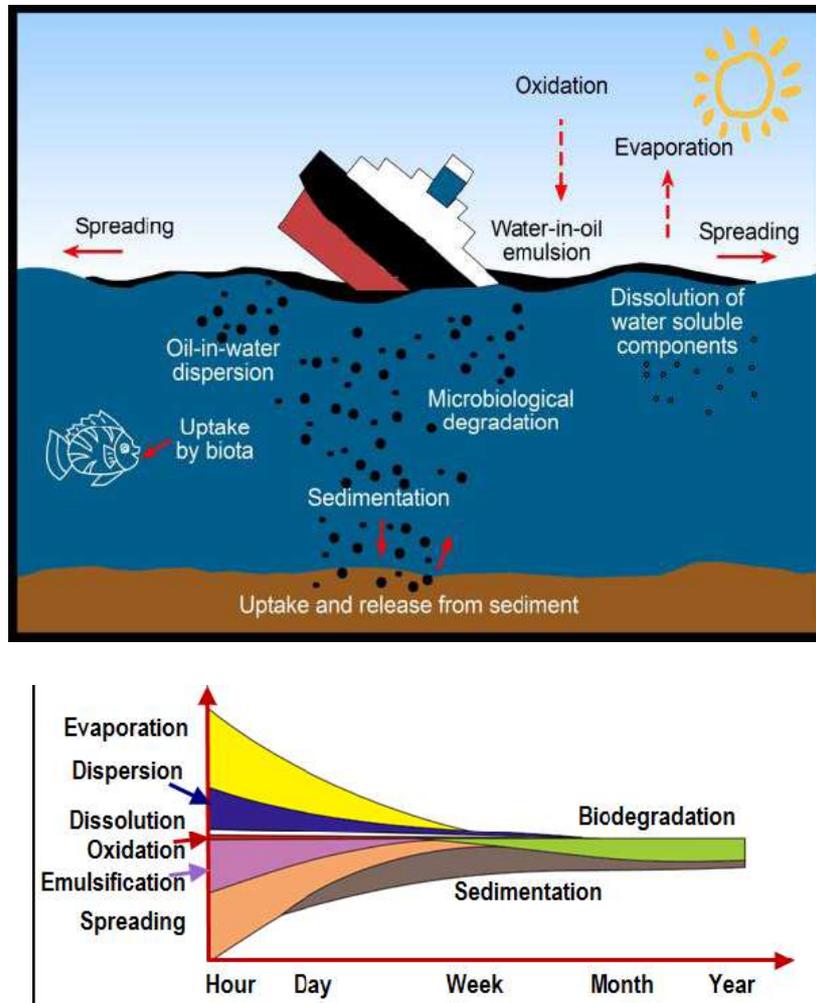


Fig. 1.2 Processi di *weathering* degli *oil spills* e periodo di attivazione <http://www.killspill.eu/>

In sintesi il progetto kill Spill persegue come fini ultimi :

- sviluppare soluzioni economicamente ed ambientalmente sostenibili per contrastare gli *oil spills*
- validare nuovi processi biotecnologici con prove in campo per il disinquinamento di acque marine e sedimenti, nonché ambienti costieri e terrestri
- testare i processi proposti in campo validandone la robustezza e una serie di criteri di sostenibilità

- sostenere la diffusione e l'impiego dei risultati ottenuti
- promuovere l'attuazione di nuove politiche ambientali europee

Il presente studio si inserisce in una parte del progetto, in particolare riguardo lo sviluppo e sperimentazione di nuovi materiali mobilizzanti e (bio)surfattanti, utilizzabili per accelerare processi di emulsione e la biodisponibilità degli idrocarburi del petrolio alla degradazione microbica. Una delle applicazioni operative di tali materiali (alcuni già in via di sperimentazione altri del tutto innovativi secondo la letteratura corrente) è dedicata al *soil washing* di sabbie contaminate da carburante marino

1.1 Prodotti biogenici nella bioremediation: disponibilità commerciale ed applicabilità

L'uso di prodotti biosurfattanti, bioemulsionanti e disperdenti di origine naturale possono rappresentare un passo significativo nel trattamento di bonifica degli *oil spills*. Poter sfruttare la capacità dei microrganismi di produrre biosurfattante sia in grande quantità sia a costi contenuti in condizioni naturali, come l'ambiente marino, è certo vantaggioso, soddisfacendo requisiti ecologici, ma soprattutto limitando i rischi per l'uomo derivanti dall'esposizione agli idrocarburi. I microrganismi sintetizzano una vasta gamma di composti tensioattivi (SACs), generalmente chiamati biosurfattanti. Questi composti sono principalmente classificati secondo le loro proprietà chimico-fisiche e il peso molecolare. SACs a basso peso molecolare o biosurfattanti riducono la tensione superficiale nell'interfaccia aria/acqua e olio/acqua, mentre SACs ad alto peso molecolare, detti bioemulsionanti, sono più efficace nello stabilizzare emulsioni olio in acqua. I biosurfattanti stanno attirando molto interesse per i potenziali vantaggi rispetto ai loro omologhi sintetici, in diversi campi quali quello ambientale, alimentare, biomedicale, ed altre applicazioni industriali. La loro applicazione su larga scala, tuttavia, in Europa è attualmente limitata dai costi elevati di produzione e dalla non completa comprensione delle loro interazioni con le cellule e con l'ambiente abiotico (Banat *et al.*, 2010). La produzione di questi composti in natura è già di per sé un adattamento dei sistemi biologici per metabolizzare gli idrocarburi o mitigare gli impatti che ne derivano (Perfumo *et al.* 2010). Nonostante le informazioni riguardanti l'isolamento e l'identificazione di questi composti siano incomplete, alcuni metodi per la produzione effettiva e relativi costi sono disponibili (Makkar *et al.*, 2011). La disponibilità di idonei biosurfattanti a costi sostenibili, con conseguente aumento del loro utilizzo per la mobilitazione di petrolio e successiva biodegradazione, è la chiave per applicazioni commerciali future (Makkar *et al.*, 2002). E' noto che i surfattanti agiscono

sulle superfici di interfacce (Raza *et al.*, 2002); fra quelli di origine microbica i più studiati, e quindi testati nel presente studio, sono i ramnolipidi, i soforolipidi e le surfattine, ma la loro produzione e disponibilità sono piuttosto limitate e causa dei prezzi proibitivi. Malgrado risultino promettenti per il loro utilizzo, la produzione dei biosurfattanti su scala industriale è attualmente difficile a causa dei costi elevati delle materie prime, oltre a quelli di produzione e trattamento del prodotto finito (Henkel *et al.*, 2012). Ne consegue che una delle sfide attuali della ricerca sia l'aumento del rendimento nella produzione e la riduzione dei costi delle materie prime (Mukherjee *et al.*, 2006). I biosurfattanti possono potenzialmente sostituire qualsiasi tensioattivo sintetico. Attualmente l'applicazione principale è orientata al recupero degli idrocarburi del petrolio che, in virtù della bassa concentrazione micellare dei SACs, può avvenire anche con bassi consumi di biosurfattanti, l'uso è inoltre favorito dalle proprietà di biodegradabilità (Banat *et al.*, 2010). SACs trovano impiego anche come emulsionanti da utilizzare in diverse fasi dell'esplorazione del petrolio, recupero e trasporto degli oli, che rappresentano punti cardine nelle diverse fasi produttive dell'industria petrolifera (Manning *et al.*, 1995). Tradizionalmente, il de-emulsione è ottenuto per centrifugazione, trattamento termico, elettrico chimico o chimico (Manning *et al.*, 1995). I biosurfattanti possono sostituire i prodotti chimici di sintesi ed essere applicati come de-emulsionanti *in situ*, fornendo soluzioni più rispettose per l'ambiente. Tra le specie di batteri, *Acinetobacter* e *Pseudomonas* sono i principali de-emulsionanti nelle colture miste (Nadarajah *et al.*, 2002). I microrganismi sfruttano la doppia natura idrofoba/idrofila dei biosurfattanti per distruggere le emulsioni. Glicolipidi, glicoproteine, fosfolipidi e polisaccaridi sono tra i prodotti microbici in grado di mobilizzare l'emulsione dall'interfaccia acqua/olio (Mukherjee *et al.*, 2006), Wei *et al.*, 2005). Molte applicazioni di disoleazione vengono realizzate utilizzando ramnolipidi commerciali (JBR 215, *Jeneil biosurfactant Company*, USA). Anche in altri settori i biosurfattanti microbici possono sostituire i tensioattivi di sintesi: prodotti per la lubrificazione, come emolliente, fissanti di coloranti, antischiumogeni, analogamente nel campo alimentare, nell'industria biomedicale e del biorisanamento i glicolipidi e i lipopeptidi trovano applicazioni migliorative rispetto ai tensioattivi tradizionali (*fig.1.3*). Shete *et al.* (2006) hanno elencato i brevetti in cui è previsto l'uso dei biosurfattanti e bioemulsionanti (255 brevetti a rilascio mondiale) oltre numerosi brevetti nel settore petrolifero (33%), cosmetico (15%), come agenti medicali (12%) e nella *bioremediation* (11%).

Biosurfactant class	Microorganism	Application
Glycolipids	Rhamnolipids <i>P. aeruginosa</i> and <i>P. putida</i>	Bioremediation
	<i>P. chlororaphis</i>	Biocontrol agent
	<i>Bacillus subtilis</i>	Antifungal agent
	<i>Renibacterium salmoninarum</i>	Bioremediation
Sophorolipids	<i>Candida bombicola</i> and <i>C. apicola</i>	Emulsifier, MEOR, alkane dissimilation
Trehalose lipids	<i>Rhodococcus spp.</i>	Bioremediation
	<i>Tsakamurella sp.</i> and <i>Arthrobacter sp.</i>	Antimicrobial agent
Mannosylerythritol lipids	<i>Candida antarctica</i>	Neuroreceptor antagonist, antimicrobial agent
	<i>Kurtzmanomyces sp.</i>	Biomedical application
Lipopeptides	Surfactin <i>Bacillus subtilis</i>	Antimicrobial agent, biomedical application
	Lichenysin <i>B. licheniformis</i>	Hemolytic and chelating agent

Fig. 1.3 Applicazioni dei principali biosurfattanti microbici (Reis *et al.*, 2013)

Soforolipidi (24%), surfattine (13%) e ramnolipidi (12%) compaiono in una gran parte dei brevetti, tuttavia, in molti casi non viene specificato l'organismo che produce il biosurfattante microbico, limitandone quindi l'applicazione. Il numero di pubblicazioni e brevetti che riguardano i surfattanti microbici è comunque in considerevole aumento (Muller *et al.* 2012). Malgrado diversi processi di produzione di biosurfattanti siano stati brevettati, solo alcuni di essi esistono in commercio. EC-601 (*Ecochem Organics Company*), un agente di dispersione di idrocarburi insolubili in acqua contenente ramnolipidi e PD5 (*Pendragon Holdings Ltd*), un additivo per carburanti a base di miscela di biosurfattanti ramnolipidi ed enzimi, sono esempi di prodotti biosurfattante disponibili commercialmente (Kronemberger *et al.*, 2008). Altre applicazioni hanno lo scopo di ottimizzare il processo produttivo dei SACs agendo sui fattori che influenzano il tipo e la quantità di biosurfattante prodotto da un microrganismo: carbonio e fonti di azoto, potenziali limitazioni di nutrienti e altri parametri chimico-fisici quali ossigeno (Kronemberger *et al.*, 2008), temperatura e pH (Mukherjee *et al.*, 2006). Tra i surfattanti microbici, i ramnolipidi hanno buone probabilità di essere adottati dall'industria quale nuova classe di SACs (Muller *et al.*, 2012). L'ingegneria genetica può essere una strategia promettente per migliorare la resa di produzione, e la produzione da ceppi ricombinanti e non patogeni (Muller *et al.*, 2011). In tal senso i ramnolipidi sono stati al centro di molti studi, oltre ad essere utilizzati in alcune applicazioni, sono i biosurfattanti microbici meglio

caratterizzati in termini di produzione, vie metaboliche e regolazione genica. In presenza di ramnolipidi, in un sistema diesel/acqua si è osservata decontaminazione e crescita della biomassa, (Whang *et al.*, 2008). I ramnolipidi risultano efficaci anche nella rimozione di idrocarburi policiclici aromatici (IPA) e pentaclorofenolo dal suolo con efficienza di rimozione del 60-80%, che varia con il tempo di contatto e concentrazione biosurfattante (Garcia *et al.*, 2003; Mulligan *et al.*, 2003). Altri studi hanno evidenziato la capacità dei biosurfattanti microbici di rimuovere naftaline da suoli contaminati (Cumaraswamy *et al.*, 2000) I surfattanti microbici sono stati testati anche per valutare applicazioni di *bioremediation* a *n-alcani*, in fanghi petroliferi, che sono stati arricchiti con consorzi ammendanti di ramnolipidi e nutrienti. L'incubazione è perdurata per diversi giorni, ma si sono osservate degradazioni di nC12-nC21; nC22-nC31 oltre l'80% (Rahaman *et al.*, 2003). Diverse specie batteriche sono state segnalate per la produzione di biosurfattanti glicolipidici (ramnolipidi e soforolipidi) (Abdel-mawgoud *et al.*, 2010) (Fig. 1.3).

Biosurfactant	Origin	Supplier	Application
BioFuture	Bacterial rhamnolipid	BioFuture Ltd, Ireland	Bioremediation of contaminated soil with hydrocarbon
EC-601	Bacterial rhamnolipid	Ecochem Ltd, Canada	Dispersive agent of water-insoluble hydrocarbons
EC-1800	Bacterial consortium	Ecochem Ltd, Canada	Cleans up oil spills in soil, sand and gravel
EC-2100W	Bacterial consortium	Ecochem Ltd, Canada	Degrades hydrocarbon based compounds in waste water treatment plants, lagoons, storage tanks, sumps and other aqueous environments
JBR products	Microbial rhamnolipid	Jeneil Biosurfactant Co., LTC, USA	Used in different industries, such food and agro-industrial markets
Petosolv	Bacterial unknown	Enzyme Technologies Inc, USA	Oil removal; oil recovery and processing
Surfactin	<i>Bacillus subtilis</i>	Sigma-Aldrich Co. LLC, USA	Antifungal, antibacterial and antitumor activities

Fig. 1.4 Es. di prodotti commerciali a base di biosurfattanti microbici e applicazioni (Reis *et al.*, 2013)

Il *washing* di suoli/sedimenti contaminati, nelle correnti applicazioni, prevede principalmente l'utilizzo di surfattanti di sintesi, anionici e non ionici. Fra questi citiamo il Triton X-100 nonché SDS (sodio dodecil solfato); i meccanismi e le condizioni di lavaggio sono stati approfonditi da più autori, fra questi ricordiamo il lavoro di Deshpande *et al.*

(1998) che ha messo a confronto otto surfattanti applicati al *washing* di tre differenti suoli contaminati con idrocarburi del petrolio. Gli autori hanno osservato sempre crescenti rimozione del contaminante all'aumentare della concentrazione del surfattante, ma in parallelo anche l' aumento della torbidità, della formazione di schiume e tossicità delle soluzioni di estrazione. Per tali ragione nel tempo è cresciuto l'interesse verso surfattanti meno invasivi quali i surfattanti di origine vegetale ed animale rispetto alle proprietà di rimozione degli inquinanti in suoli/sedimenti contaminati, i cui studi sono relativamente recenti. Importanti sono le caratteristiche di non tossicità ed economicità, peculiari di questi materiali che, malgrado non siano ancora pienamente studiati, presentano interessanti caratteristiche di solubilità, mobilizzazione dei contaminanti nonché biodegradabilità. Le capacità di rimozione di inquinanti sino ad ora osservate riguardano principalmente i policlorobifenili (*PCBs*) e alcuni gruppi di idrocarburi policiclici aromatici (*IPA*). La decontaminazione di suoli storicamente contaminati da *PCBs* è stata per esempio sperimentata utilizzando lecitina di soia (Occulti F *et al.*, 2007) con tecniche di *washing*, posta a confronto con Triton X-100; Occulti F *et al.* hanno utilizzato concentrazioni sensibilmente superiori alle *CMC*, rapporto acqua/ suolo 1:7 e velocità di *mixing* pari a 120 rpm. A fronte delle soddisfacenti rimozioni di contaminante osservate, si è deciso di utilizzare la soia lecitina nella presente sperimentazione; prendendo spunto da queste condizioni di *washing* come riferimento. Sulla stessa tipologia di suoli contaminati sono state testate le metil- β -ciclodestrine (RAMEB) (Fava *et al.*, 2002), interessanti per le caratteristiche di biodegradabilità; le RAMEB infatti vengono lentamente metabolizzate dai microrganismi aerobi presenti nei suoli. Interessanti studi sono stati nel tempo dedicati alle ciclodestrine quali decontaminanti di *IPA* in suoli inquinati e posti a confronto con Triton X-100. Gli *IPA* sono contaminanti di grande interesse ambientale a causa della tossicità, cancerogenicità e mutagenicità già note da tempo, che li contraddistingue, anche a basse concentrazioni (Pothuluri *et al.*, 1998; Van Agteren *et al.*, 1998). Cuypers *et al.* (2002) hanno stimato la biodisponibilità degli *IPA* in suoli contaminati trattati con Idrossi- β -ciclodestrine (HPB-CD) confrontando i risultati ottenuti con il Triton X-100. I risultati sono confortanti ed in linea a quanto osservato da altri precedenti autori (Reid *et al.*, 1998; 1999; 2000). E' noto che HPB-CD, oligosaccaride ciclico, contiene una cavità a tronco di cono apolare che favorisce la formazione di chelati stabili. Le ciclodestrine sono infatti in grado di coplessare gli *IPA* all'interno delle cavità, perché la forma e il peso molecolare dell'inquinante siano stericamente compatibili: si stima infatti maggiore affinità con naftalene, fenantrene rispetto ad antracene fluorante e pirene; malgrado Wang *et al.*,

(1998) abbiano osservato che laddove la molecola di *IPA* risulti troppo ingombrante per formare complessi 1:1, si possono formare inclusioni più complesse con rapporti molecolari pari a 1:2 (ciclodestrina : *IPA*). Anche il Triton X-100 è in grado di includere *IPA* nelle proprie micelle, aumentando considerevolmente la solubilità apparente degli inquinanti, qualora utilizzato a concentrazioni superiori alle *CMC*. Altri autori si sono interessati alle proprietà di rimozione di *IPA* da suoli contaminati, applicando il *washing* : Berselli *et al.* (2004) hanno valutato le rese di rimozione di β -CD, HPB-CD e ramnolipidi, riscontrando rimozioni rispettivamente del 60%, 39%, 36% rispetto a quelle osservate per il Triton X-100. Ulteriori lavori più recenti hanno trattato le proprietà delle ciclodestrine nel rimuovere *IPA* da suoli contaminati con trattamenti di *washing* (Ye M *et al.*, 2014; Sun MM *et al.*, 2013). Altre sperimentazioni di *soil washing* hanno interessato gli acidi colici e derivati, agenti mobilizzanti dei contaminanti (Berselli *et al.*, 2005). In questo caso i suoli erano storicamente contaminati da aniline clorate, benzene, tiofene e diversi *IPA*. Sono stati saggiati l'acido deossicolico, la bile bovina e suoi estratti, posti a confronto con Triton X-100; rispetto al quale hanno presentato capacità di rimozione superiori al 56%. Le condizioni di *washing* hanno previsto concentrazioni degli agenti pari all'1% (w/v) rapporto acqua/suoli 1:7 e velocità di *mixing* pari a 120 rpm. Viene quindi mantenuta la regola generale di utilizzare i surfattanti a concentrazioni poco superiori alle loro *CMC*, al fine di permettere la formazione di micelle emulsionanti evitando eventuali effetti di tossicità (Chang *et al.*, 2009; Cheah *et al.*, 1998; Deshpande *et al.*, 1999; Urum *et al.*, 2004). Miscele di (bio)surfattanti spesso presentano proprietà migliori rispetto ai singoli agenti, a causa di effetto sinergico. Una migliore strategia per il risanamento è infatti quello di applicare la miscela di tensioattivi a ridotta concentrazione di singoli tensioattivi, in tal modo si riducono i costi mantenendo una buona efficienza di rimozione (Cameotra *et al.*, 2010) la solubilità dei contaminanti idrofobi viene infatti migliorata utilizzando miscele di tensioattivi anionici e non ionici, suggerendo che nelle combinazioni appropriate (bio)surfattanti hanno il potenziale per migliorare l'efficienza di lavaggio del suolo e facilitare la biodisponibilità degli inquinanti (Zhou *et al.*, 2007, 2008) Si è osservato per esempio che la combinazione di Tween 80, Triton X 100 e biosurfattanti prodotti da ceppi di *P. aeruginosa* aumenta la solubilità del fenantrene a 50°C, se paragonata con l'aggiunta dei singoli tensioattivi (Wong *et al.*, 2004). Altri prodotti biogenici commerciali e di origine vegetale che agiscono come mobilizzanti dell'inquinante dalla matrice solida, e che sono stati testati in questa sperimentazione sono i prodotti della *BioBased*, che ha sviluppato detergenti a base di alcoli e altri frazioni, di origine vegetale e vengono testati in questo

studio. Questi prodotti commerciali si comportano come un tensioattivi mobilizzanti non-emulsionanti - che si presume abbiano buona affinità per il substrato carbonioso e siano in grado di trasportarlo dalla superficie del suolo senza reagire chimicamente con esso. Test grezzi hanno mostrato la capacità di questi prodotti di pulire le superfici senza creare una emulsione o danni sulla superficie pulita. Queste miscele di detergenti vegetali provenienti da fonti rinnovabili sono stati quindi testati nel presente studio, nelle prove di *washing* meglio descritte in seguito (cap.7- 9)

1.2 Soil washing: applicazioni innovative ambientalmente ed economicamente più sostenibili

Applicare la *bioremediation* a terreni contaminati da oli è complesso, in quanto l'eccesso di olio forma goccioline o film su particelle di terreno, che rappresenta una potente barriera contro la degradazione microbica (Urum *et al.*, 2004) La tecnica *ex situ* del *soil washing* è per certo fra le maggiormente diffuse per il trattamento di suoli/sabbie contaminati (cap.4). L'applicazione dei surfattanti nel trattamento *ex-situ* di *soil washing* è stata studiata da vari autori (Desphande *et al.*,1999; Mulligan *et al.*, 2005; Franzetti *et al.*, 2009; Mao *et al.*, 2015). Essi hanno dimostrato che il meccanismo di rimozione degli idrocarburi del petrolio dalla matrice solida avviene principalmente in tre passaggi: mobilizzazione, solubilizzazione ed emulsificazione. La prospettiva di utilizzare biosurfattanti nel *soil washing* da idrocarburi, dipende dalla capacità di questi composti di migliorare il desorbimento e dissoluzione dell'inquinante organico e aumentare il grado di trasporto del contaminante dal suolo. I meccanismi coinvolti nella rimozione degli idrocarburi dai terreni sono legati alla crescente biodisponibilità dell'inquinante e quindi al biorisanamento. Le capacità di stabilizzare emulsioni olio/acqua e aumentare la solubilità degli idrocarburi può infatti migliorare entrambi gli aspetti. Gli effetti della mobilizzazione e della maggiore solubilità si osservano sia a concentrazione inferiore che oltre le *CMC*. Tra i metodi di Biowise (2000), *soil washing* è stata proposto come una tecnologia di bonifica innovativa, promettente e ampiamente studiata negli ultimi anni (Abdul *et al.*, 1990; Deshpande *et al.*, 1999; Bhandari *et al.* 2000). Deshpande *et al.* (1999) hanno valutato otto soluzioni di (bio)surfattanti nel *soil washing* di terreni contaminati da idrocarburi, quindi, hanno proposto una linee guida per la scelta di tensioattivi per il lavaggio del suolo. *Soil washing* decontamina il terreno non solo dal petrolio, ma anche dai metalli pesanti (Mulligan *et al.*, 1999, 2001;. Anderson *et al.*, 1999). E' una tecnica più rapida rispetto alla attenuazione

naturale e la fitodepurazione, che sono dipendenti da fattori climatici. Il *soil washing* spesso comporta l'aggiunta di soluzioni acquose di surfattanti per il rilascio di sostanze contaminanti nella fase acquosa senza che queste vengano distrutte chimicamente (Mann 1999). I (bio)surfattanti sono sostanze costituite da una parte idrosolubile (idrofila) ed un'altra parte olio solubile (idrofobi), hanno quindi la tendenza ad accumularsi nell'interfaccia olio-suolo e olio-acqua dove agiscono come emulsionanti. L'aggiunta del surfattante alla soluzione di lavaggio riduce la tensione interfacciale aria/acqua e olio/acqua, riducendo così la forza capillare che trattiene l'olio al suolo, che viene quindi più facilmente mobilizzato e solubilizzato (Kosaric *et al.*, 1987; Bai *et al.*, 1997; Cheah *et al.*, 1998; Deshpande *et al.*, 1999). Numerosi studi di laboratorio hanno dimostrato che le soluzioni acquose di (bio)surfattanti sono efficaci in terreni contaminati da idrocarburi del petrolio (Bhandari *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2000; McCray *et al.*, 2001; Mulligan *et al.*, 2001). Abdul *et al.* (1990) ha studiato i processi di mobilizzazione da un terreno sabbioso, utilizzando una selezione di soluzioni di (bio)surfattanti basandosi sulla loro proprietà biologiche, fisiche e chimiche. Questi autori hanno osservato che la rimozione di olio dal suolo contaminato attraverso il processo *soil washing* dipende dalla natura fisico-chimica dei (bio)surfattanti e dei suoli contaminati. Generalmente, l'uso di (bio)surfattanti per decontaminare dal petrolio suoli/sabbie contaminate con tecniche di lavaggio, non è ancora completamente sfruttata. I biosurfattanti microbici quali ramnolipidi e surfattine sono stati valutati con successo nel *washing* dei suoli inquinati dai *crude oil*, IPA e idrocarburi clorurati (Zhou *et al.*, 2007). In molti casi, l'efficienza di rimozione risulta elevata (fino al 80%) e dipende sia dal tempo di contatto che dalla concentrazione del biosurfattante (Zouboulis *et al.*, 2003). I ramnolipidi sono stati studiati per la decontaminazione delle spiagge in Alaska, dopo lo sversamento della petroliera Exxon Valdez spill (Nitschke *et al.*, 2009) evidenziando una capacità di rimozione del petrolio per tre volte superiore rispetto all'acqua. Van Dyke *et al.* (1993) hanno riferito che i ramnolipidi, ad una concentrazione di 5 g/l, sono in grado di rimuovere circa il 10% in più idrocarburi da un terreno argilloso/sabbioso rispetto a SDS. I ramnolipidi, presenti a concentrazioni contenute (80 mg/l), per esempio sono risultati efficaci nel ridurre la concentrazione di olio in suoli sabbiosi contaminati (Santa Anna *et al.*, 2007). In questo caso gli autori hanno applicato la metodologia RSM per rimuovere paraffine e aromatici dal terreno sabbioso, osservando rimozioni superiori al 78%: ramnolipidi, qualora utilizzati a concentrazioni superiori alle CMC, migliorano la solubilità apparente di esadecano, ottadecano e n-paraffine, favorendo la biodegradazione di fanghi petroliferi (Maier *et al.*, 2000; Rahman *et*

al., 2003) I biosurfattanti sembrano aumentare la solubilità apparente degli IPA fino a cinque volte rispetto a surfattanti commerciali (Nitschke *et al.*, 2009, Heyd *et al.*, 2008). L'interesse crescente verso queste applicazioni è origine di questa sperimentazione che utilizza materiali mobilizzanti e biosurfattanti che, disciolti nelle acque di lavaggio di sabbie contaminate da IFO180, favoriscano la biodisponibilità dell'inquinante (in termini di idrocarburi totali HC e le sue due frazioni *n-alcani* e IPA), e che risultino non tossici per l'ambiente e biodegradabili.

Costi e produzione dei biosurfattanti microbici

Secondo recenti dati, il mercato dei biosurfattanti si aggirava nel 2011 a circa 1,7 bi di USD e si prevede raggiungerà nel 2018 circa 2,2 bi di USD, sulla base di un tasso di crescita del 3,5% annuo. Il mercato globale di biosurfattanti si prevede possa superare 470.000 tonnellate entro il 2018, a causa della crescente domanda da parte dell'Asia, Africa e America Latina, che dovrebbe rappresentare il 21% di esso (www.transparencymarketresearch.com). Il numero di pubblicazioni relative all'identificazione, ottimizzazione del processo di produzione e migliore comprensione delle vie metaboliche è aumentata negli ultimi anni (Muller *et al.*, 2012). Oltre ai notevoli sforzi dedicati alla ricerca, si stima che il costo per la produzione di biosurfattante sia di circa 9,57 volte più elevato rispetto alla produzione di un tensioattivo di sintesi. I biosurfattanti microbici sono tipicamente prodotti da microrganismi che crescono in idrocarburi come fonte di carbonio, processo che aumenta il costo di produzione (Kronemberger *et al.*, 2008). Inoltre, la bassa produttività e intensa formazione di schiuma durante la produzione biosurfattante è attualmente una barriera per una produzione economicamente praticabile del biosurfattante (Kronemberger *et al.*, 2008; Henkel *et al.*, 2012). Pertanto, la maggior parte delle ricerche vengono incentrate sull'aumento della resa di produzione, riducendo i costi delle materie prime e lo sviluppo di strategie di ossigenazione per ridurre la formazione di schiuma (Heyd *et al.*, 2008). Recenti studi hanno anche focalizzato l'attenzione sulla produzione *in situ* da substrati rinnovabili, lanciando una nuova generazione di produzione di biosurfattanti (Muller *et al.*, 2012), così come nuove strategie di ingegneria del metabolismo al fine di indirizzare i flussi metabolici verso il prodotto finale (Mukherjee *et al.*, 2006). Diversi approcci sono stati applicati al fine di migliorare la produttività biosurfattante come l'ottimizzazione delle condizioni di crescita (ad esempio, terreno di coltura, temperatura, pH, ossigenazione, fasi di fermentazione), modificazioni genetiche (mutazioni del gene, *knockout* o amplificazione), combinate con analisi genomiche e modellazione computazionale (Lee *et al.*, 2005)

Approccio sperimentale per l'ottimizzazione del *soil washing*

Come già evidenziato ogni evento di contaminazione è a sé stante in termini di matrice solida, proprietà chimico-fisiche del contaminante e condizioni ambientali, non prevedibile e difficilmente riproducibile (*fig.1.2*). Si pensi ai processi a cui è soggetto un inquinante sversato prima di arrivare alle coste ed inquinare le spiagge. Si consideri che l'inquinante può variare notevolmente per proprietà chimico-fisiche (viscosità, solubilità, pH ecc.), come la matrice contaminata (contenuto organico, porosità, umidità, granulometria ecc..) e di conseguenza le interazioni matrice/contaminante, nonché i processi ambientali in funzione dei tempi di contatto e delle condizioni climatiche che matrice solida/contaminante subiscono, non sono sempre descrivibili. Per tali ragioni nella sperimentazione si è scelta una matrice rappresentativa delle caratteristiche medie delle sabbie mediterranee e un contaminante marino di caratteristiche rappresentative, focalizzando l'attenzione sulla metodologia di studio (*cap. 6*). Le condizioni medie iniziali adottate per selezionare i surfattanti maggiormente performanti, sono state valutate sulla base della letteratura e di esperienze precedenti (Berselli *et al.* , 2005; Kalali *et al.* 2011; Urum *et al.*, 2013, 2015); mentre per entrare nel merito della individuazione delle migliori condizioni operative con cui eseguire il *washing*, ci si è avvalsi di un approccio statistico, al fine di impostare la ricerca tenendo conto di più variabili in un ampio *range* di valori (dominio sperimentale). Questa generalizzazione iniziale rappresenta un tipo di approccio utile per processi non completamente noti. L'approccio statistico (*RSM*) permette di descrivere il fenomeno con modelli predittivi, in grado quindi di valutare le interazioni esistenti fra i parametri del processo, e di ottimizzare le condizioni operative, secondo criteri scelti nel processo stesso; nell'ottica di ottenere le massime rese di rimozione dell'inquinante e minori consumi, sia in termini di materiali che di energia. A conferma dell'interesse crescente verso l'ottimizzazione delle condizioni operative di *washing* applicato a suoli contaminati, al fine di migliorarne le efficienze, citiamo dei lavori similari di alcuni autori che hanno utilizzato la tecnica del *soil washing* con soluzioni di surfattanti sia di sintesi che (bio)surfattanti. Kalali *et al.* (2011) hanno applicato la metodologia *RSM* per l'ottimizzazione dei parametri di processo del *soil washing* di un suolo contaminato artificialmente con 5 g/kg di petrolio greggio, utilizzando surfattante non-ionico (Brij35). I parametri investigati, oltre alla concentrazione del surfattante sono stati il volume di acqua utilizzato, il tempo, la frequenza di lavaggio e la velocità di *mixing*. Il valore ottimale di rimozione ottenuto, è pari al 94%, e corrisponde alle condizioni di 0.8% di concentrazione di surfattante (*CMC* = 74 mg/l), 150 rpm come velocità di *mixing*, rapporto acqua/soilo pari

a 10, frequenza del *washing* pari a 3 e tempo di reazione di 75 minuti. Le condizioni ottimali per il *soil washing* contaminato da *crude-oil*, utilizzando biosurfattanti sono state investigate da Urum *et al.* (Urum *et al.*, 2013, 2015) Questo studio riporta misure sperimentali sulla capacità delle soluzioni acquose di diversi surfattanti (escina, lecitina - semi di lecitina-, ramnolipidi, saponina, e tannino) di rimuovere Ekofisk, *crude oil*, da un terreno contaminato in laboratorio (circa 50 mg/g) al variare delle condizioni di lavaggio. Le prestazioni dei biosurfattanti nella rimozione dell'olio sono state valutate rispetto ad un tensioattivo anionico sintetico (SDS). E' stato utilizzato come approccio statistico il metodo sperimentale di progettazione Taguchi, con un disegno fattoriale. I parametri del *washing* che sono stati testati sono la temperatura (5-50 °C), il tempo di trattamento (5-20 min), velocità di agitazione (80-200 rpm), rapporto suolo/acqua (1-4), e le concentrazioni di tensioattivi (0.004 – 0.5 %). I risultati hanno indicato che la temperatura di lavaggio è stato il parametro più influente sulla rimozione dell'olio, mentre il tempo di trattamento era quello meno rilevante. Si sono osservate decontaminazioni maggiori dell' 80% a 50°C per tutte le soluzioni di tensioattivi, tranne che per la lecitina (semi di lecitina), che ha presentato le rimozioni più basse (42% in soluzioni 0.004 %). A 20°C, saponina, lecitina, escina, e tannino rimuovono meno del 50% greggio. Harvey *et al.* (1990) ha esaminato l'efficienza di un biosurfattante prodotto da *Pseudomonas aeruginosa* per migliorare la rimozione di Exxon Valdez (*oil spill* nella ghiaia dell'Alaska) sotto varie condizioni di lavaggio quali temperatura, concentrazione di tensioattivo e tempo di lavaggio. I risultati dello studio hanno dimostrato risultati soddisfacenti. Sembra comunque che il tempo di contatto prolungato non aumenti significativamente la rimozione di olio utilizzando biosurfattante o acqua. Questi studi evidenziano quindi la crescente attenzione nel voler individuare per ogni caso di contaminazione i parametri operativi influenti sulle rimozioni dell'inquinante e le relazioni fra essi esistenti. Questa analisi è alla base dell'ottimizzazione del processo, con l'obiettivo di raggiungere un compromesso fra rese massime e consumi minimi in termini di materiali (acqua e reattivi) ed energia. In questa ottica, nella presente sperimentazione si sono analizzati in modo sistematico, e avvalendosi di metodi statistici, i parametri ritenuti influenti sulla resa di rimozione dell'inquinante (quantità di acqua e surfattante, oltre alla velocità di *mixing* e il livello di contaminazione delle sabbie). Questo approccio, sviluppato per ogni agente biogeno ritenuto performante, dopo un primo step di *screening* fra 12 mobilizzanti biogeni e/o surfattanti microbici (vedi *cap. 9*), e quindi particolarmente articolato, non trova uguali esempi in letteratura.

2. Inquinamento matrici ambientali

L'inquinamento ambientale è imputabile ad alterazioni degli equilibri delle componenti ecosistemiche e delle loro relazioni, a causa di variazioni nella composizione chimico-fisica di sostanze in una o più matrici (suolo/sabbie, sottosuolo, sedimenti, acque superficiali, acque sotterranee, costiere e marine, aria e biodiversità).

La diffusa presenza di sostanze inquinanti nelle matrici ambientali acqua e suolo derivante da attività industriali, quali stoccaggio legale ed illegale di rifiuti; perdite di idrocarburi da serbatoi, condotte, piattaforme industriali e derivante da trasporto via terra e via mare, attività minerarie e militari ecc.. pone in modo sempre crescente l'evidente necessità di interventi finalizzati alla rimozione e/o riduzione degli inevitabili impatti sulla salute umana e sugli ecosistemi. In riferimento alla pubblicazione della *European Environmental Agency* (EEA) del 1999, in cui si affronta per la prima volta la problematica legata alla quantificazione del numero dei siti contaminati in tutto il territorio degli Stati membri; fu possibile, per i 18 paesi membri coinvolti, identificare una stretta correlazione fra sito contaminato e sorgente, solo per l'Italia ne furono indicati 1.251 con una stima di oneri di bonifica di circa 510 milioni di Euro. Fu per la prima volta evidenziato il riconoscimento dei principali contaminanti presenti nelle matrici ambientali, in relazione alle fonti di contaminazione puntuali presenti in Europa. (fig 2.1-2)

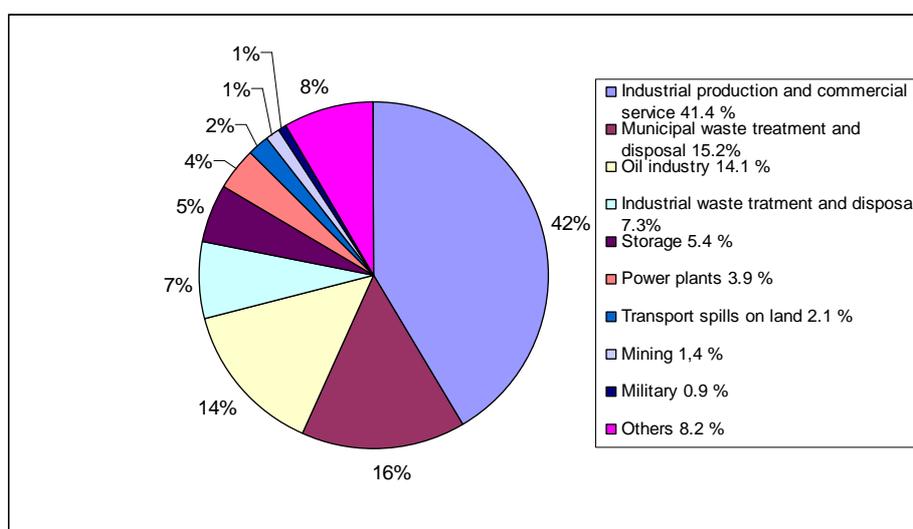


Fig. 2.1 Principali cause di contaminazione di suoli e acque in Europa (Brugnoli E et al., 2014)

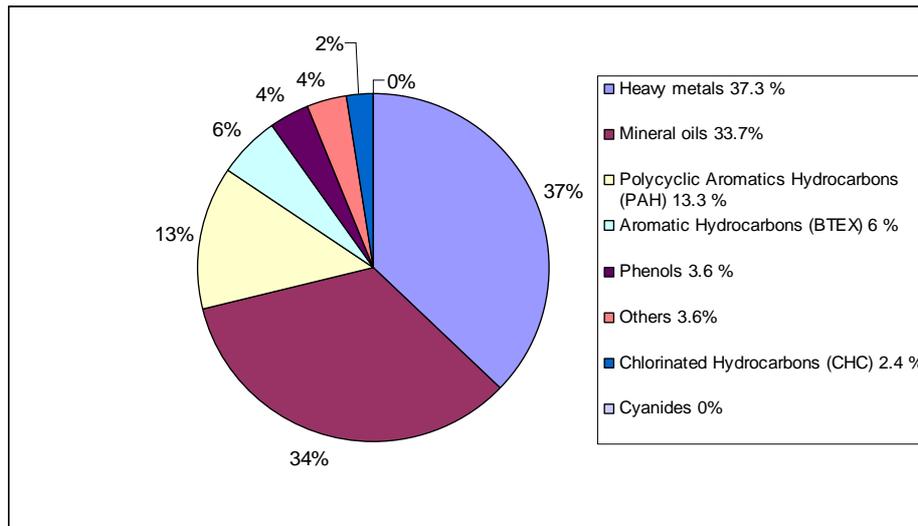


Fig. 2.2 Principali contaminanti di suoli e acque in Europa (Brugnoli E *et al.*, 2014)

Tali minacce coinvolgono differenti livelli di scala e di complessità ambientale, sino alla compromissione della naturalità e sensibile alterazione della biodiversità, a sua volta causa di cambiamenti nella stabilità degli ecosistemi. Le forme di vita colpite e le matrici ambientali coinvolte da inquinamento puntuale e diffuso, sono definite bersagli o recettori sensibili, e possono chiaramente subire danni più o meno gravi e permanenti in relazione al tempo di esposizione, alla tossicità, alla assunzione cronica giornaliera e alla loro biologia. Ne consegue una riduzione della funzionalità (distrofia) e resilienza degli stessi sistemi ambientali. Si pensi solo alle funzioni della matrice suolo, rispetto alla produzione di cibo, di materie prime, di risorse genetiche, oltre allo svolgimento delle attività antropiche e sociali. Il servizio ecosistemico della matrice suolo è altresì fondamentale rispetto alla riduzione del rischio di dispersione di inquinanti, per l'intrinseca capacità di trattenere disponibilità di acqua essenziale al controllo biologico dei parassiti o per l'intrappolamento di CO₂, di naturale contrasto ai cambiamenti climatici. Come noto il processo di formazione e rigenerazione del suolo è molto lento, per tale ragione il suolo è considerato una risorsa non rinnovabile che occorre preservare e tutelare, evitando possibili asportazioni. Risulta necessario intervenire su vari fronti, affinché il degrado ambientale e il conseguente impoverimento della qualità ecosistemica, oltre a creare tutta una serie di squilibri, non debba più contribuire in maniera significativa all'incremento del manifestarsi di patologie per l'uomo quali allergie, asma e malattie respiratorie croniche, diabete e malattie cardiovascolari (Eugloreh, 2009; GA2LEN, 2010). L'aumento delle pressioni antropiche sull'ambiente e la conseguente modificazione di naturali equilibri hanno provocato forti modificazioni sulle forme viventi e sulle matrici ambientali

variandone l'omeostasi (Kleidon *et al.*, 2011) con conseguenze a cascata, che implicano rischi sulla salute dell'uomo e sulla perdita di capitale naturale. In tal senso il mondo scientifico è chiamato a sviluppare tecnologie e processi di messa in sicurezza e bonifica ambientale in grado di raggiungere i giusti equilibri tra la necessità di rimozione o disattivazione degli inquinanti, e l'opportunità di utilizzare approcci meno invasivi, evitando di danneggiare o distruggere le funzioni delle matrici ambientali. E' infatti noto come la perdita di tali funzionalità comporti la diminuzione della biodiversità nel suolo e nelle acque, causando possibili impatti negativi sulla catena alimentare e sulla salute umana.

2.1 Frequenza e natura di oil spills

L'inquinamento delle acque del mare è di primario interesse ambientale, tema ampiamente affrontato nel progetto EU FP-7 project Kill Spill - *Integrated Biotechnological Solutions for Combating Marine Oil Spills*, nel cui contesto si inserisce questa ricerca. La contaminazione delle acque oceaniche è dovuta a varie cause, tra cui gli scarichi fluviali, gli scarichi dovuti ad esplorazioni e sfruttamenti delle risorse naturali del sottosuolo marino; lo sversamento di idrocarburi trasportati dalle navi, in particolare dalle petroliere (Fingas, 2014). In generale, il rilascio incontrollato degli idrocarburi del petrolio ha un grosso impatto negativo sui suoli e sulle risorse idriche. La contaminazione può derivare dalla fuoriuscita di contaminante da serbatoi sotterranei di stoccaggio, dalle perdite da raffinerie petrolifere, da fuoriuscite da impianti chimici, dalla rottura di oleodotti, e dal trasporto malgestito degli idrocarburi. Se si aggiungono gli incidenti ed il rischio di esplosione e d'incendio si individua una ulteriore minaccia per l'ambiente. Si stima che annualmente quasi 4 milioni di tonnellate di petrolio vengano globalmente sversati nelle acque del mare (Cohen, 2013). Di questi più della metà provengono da rilasci naturali dei fondali oceanici, mentre circa il 35% dei rilasci di petrolio in mare deriva da attività umane (attività ricreative e commerciali sulle navi, rilasci di combustibili navali, ecc..) e un 12% dal trasporto di greggio tramite navi e *pipelines*. Gli idrocarburi petroliferi, rilasciati a causa di eventi geologici, attraverso una lenta infiltrazione, possono rientrare nella biosfera, dove vengono degradati dai microrganismi autoctoni, che li utilizzano come fonte di carbonio ed energia. Tuttavia le enormi quantità di idrocarburi introdotte nell'ecosistema per opera dell'uomo superano la capacità autodepurativa dell'ambiente, ne risulta che la contaminazione da idrocarburi è sempre più spesso causa di disastri ambientali (Coehn, 2013).

La principale fonte d'inquinamento degli idrocarburi in mare è rappresentata dalle navi cisterna. Oltre ad eventi accidentali, causati per esempio dalla rottura di *pipelines* o da malfunzionamenti delle piattaforme di estrazione del greggio, l'inquinamento dovuto a rilascio di petrolio in mare risulta essere anche di tipo operativo, cioè causato da scarichi illegali di idrocarburi volontariamente rilasciati dalle navi in mare, lungo le rotte navali. Queste navi sono responsabili degli scarichi "intenzionali" in mare di acque di lavaggio delle cisterne e delle acque di zavorra, che risultano inevitabilmente inquinanti, essendo contenute in serbatoi adibite al carico di idrocarburi. Si parla invece di inquinamento accidentale di contaminanti petroliferi, qualora avvenga in seguito una errata manovra o a un incidente durante la produzione e il trasporto di idrocarburi. Questa tipologia di contaminazione risulta essere molto più dannosa per l'entità dello sversamento e delle dimensioni dei danni che ne conseguono. Gli sversamenti di petrolio e dei prodotti petroliferi in mare sono eventi frequenti, che si verificano in tutto il mondo. Se si osservano i dati riportati dall'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA) e *Regional Marine Pollution Emergency Response Center for the Mediterranean Sea* (REMPEC) riguardanti l'inquinamento in mare da prodotti petroliferi, tralasciando le perdite naturali di petrolio dai fondali oceanici, è stato stimato che annualmente circa il 45% dell'inquinamento mondiale di petrolio deriva da operazioni di scarico della navi; mentre gli sversamenti accidentali provenienti da serbatoi e piattaforme *off-shore* contribuiscono solamente per il 5% ed il 2%, rispettivamente. Questi sversamenti intenzionali avvengono con una frequenza maggiore rispetto agli incidenti navali e stanno diventando una pratica molto comune, rappresentando così la principale sorgente di inquinamento marino da parte delle navi. In particolare il bacino Mediterraneo, a causa della sua posizione strategica, rappresenta da sempre la rotta principale per i trasporti navali. La REMPEC, ha stimato che circa il 25% del traffico mondiale di navi che trasportano greggio, transita nel Mediterraneo, per cui il trasporto di petrolio greggio e dei prodotti della raffinazione rappresenta la voce principale del trasporto marittimo nel Mediterraneo. Si stima che circa 600.000 tonnellate di greggio siano state versate nel mar Mediterraneo ogni anno a causa di inquinamento da scarichi "operazionali" (REMPEC, 2011). Mentre l'inquinamento in mare dovuto ad eventi accidentali può essere ridotto ma non eliminato, gli scarichi illegali da parte delle navi dovrebbero essere evitati attraverso un sistema di regolamentazione, controllo e monitoraggio più rigido.

L'approvvigionamento del greggio avviene esclusivamente via mare. Tale forma di trasporto dà luogo a delle criticità, rendendo non trascurabili i rischi di sversamento di

greggio a seguito di incidenti durante la navigazione o durante le operazioni di carico/scarico del greggio. Il più grave disastro ambientale nel Mar Mediterraneo è avvenuto nel 1991, quando la petroliera cipriota *Haven* esplose nel golfo di Genova, durante le operazioni di bilanciamento del carico, sversando in mare parte del suo carico, all'incirca 144.000 tonnellate di petrolio. In generale, dall'analisi dei dati (ISPRA, 2011), si evince una certa tendenza nel tempo, ad un minore rilascio di petrolio in mare e ad una diminuzione degli eventi accidentali. Particolare attenzione deve essere comunque posta al crescente sviluppo dei traffici di merci in *container*: a causa del gigantismo navale è in aumento la costruzione di navi portacontainer, la cui trazione avviene solitamente tramite olio combustibile pesante stivato in grandi quantità (qualche migliaio di tonnellate). Gli incidenti avvenuti a portacontainer hanno causato rilevanti danni agli ecosistemi, come ad esempio quello avvenuto in Nuova Zelanda nel 2011 e nel Canale della Manica nel 2007.

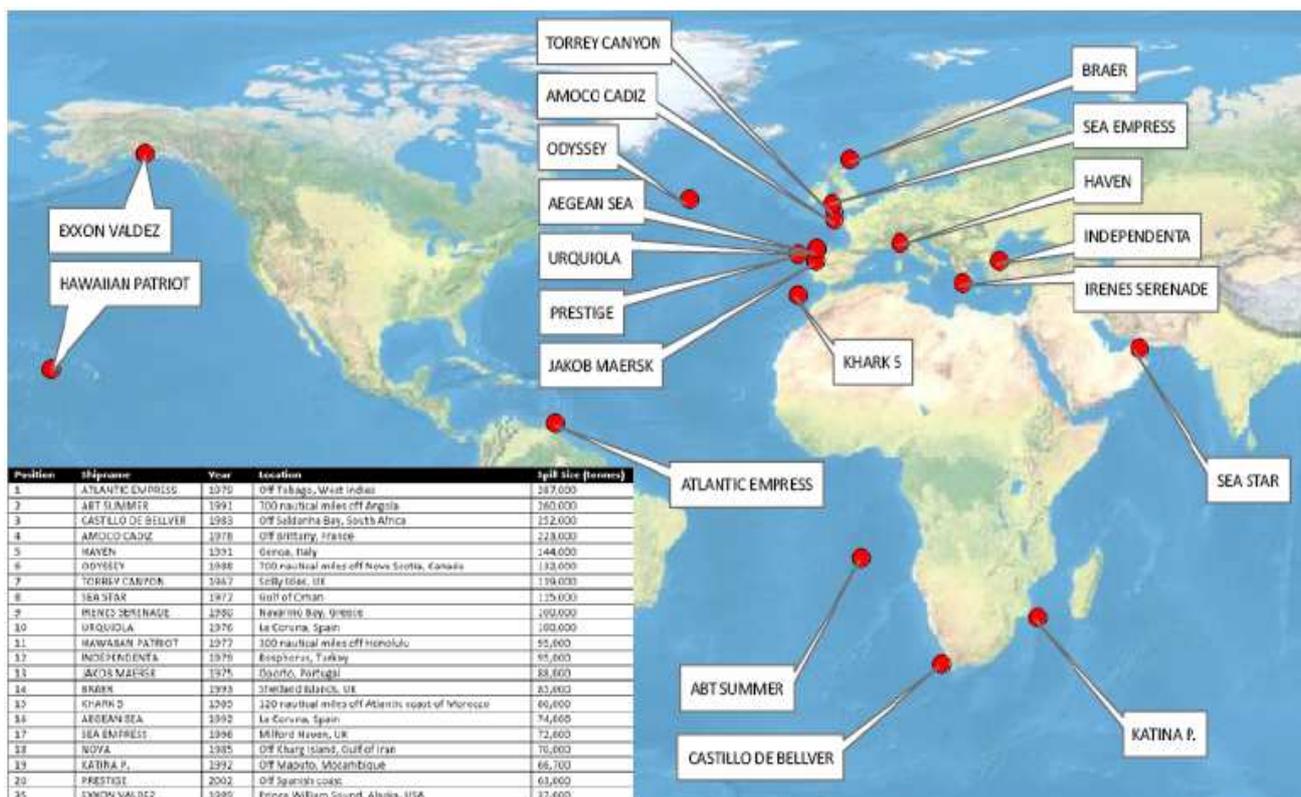


Fig. 2.3 Localizzazione geografica dei 20 incidenti più catastrofici - Fonte ITOPF

La banca dati *International Tanker Owners Pollution Federation* (ITOPF) (<http://www.itopf.com/knowledge-resources/documents-guides/document/oil-tanker-spill-statistics-213>;) fornisce annualmente informazioni su sversamenti di petrolio provenienti da navi mercantili, cisterne e chiatte; ed annovera a partire dal 1970, circa 10.000 sversamenti, includendo nella quantità di greggio anche il petrolio bruciato e quello rimasto nelle cisterne delle navi affondate. Inoltre, vengono fornite indicazioni riguardanti il tipo di

sversamento, la quantità di carico rilasciata in mare, il tipo di nave coinvolta, il luogo e le cause del rilascio. In *fig.2.3* è riportata una mappa in cui sono localizzati i 20 incidenti più catastrofici dal 1967 e una tabella relativa alle quantità totali di petrolio rilasciato in mare. Gli incidenti più gravi sono stati quelli che hanno coinvolto le piattaforme di estrazione del greggio: ad esempio nel 1979 l'esplosione della piattaforma *Ixtoc I* nella Baia di *Campeche* nel Golfo del Messico portò ad una fuoriuscita di petrolio di circa 480.000 tonnellate, durata 9 mesi. Più recentemente, il disastro della piattaforma petrolifera *Deepwater Horizon* ha causato la fuoriuscita di enormi quantità di petrolio (circa 600.000 t), sempre nel golfo del Messico. In generale, nel corso degli ultimi 40 anni sono avvenuti 1.336 incidenti con sversamenti tra le 7 - 700 t e 461 incidenti oltre le 700 t. In particolare, dal 2000 in poi è diminuita la frequenza degli sversamenti più consistenti (si sono verificati al massimo 5 sversamenti maggiori di 700 t all'anno), con una riduzione del quantitativo di petrolio rilasciato in mare nonostante sia aumentato il trasporto di idrocarburi via mare. Ad ogni modo continuano a verificarsi perdite importanti di petrolio, anche se di minore entità, che danneggiano l'ambiente costiero. Complessivamente, nel periodo tra il 1970 - 2009 sono state sversate in mare all'incirca 5.7 milioni di tonnellate di petrolio a causa di 1.789 incidenti, evidenziando così come solo pochi incidenti gravi siano stati responsabili di elevati quantitativi di greggio rilasciati in mare (<http://www.itopf.com>). Per quanto riguarda il Mar Mediterraneo, nel periodo tra il 1977 - 2010, a seguito di 545 incidenti sono stati rilasciati in mare all'incirca 312.000 tonnellate di petrolio, di cui 9 incidenti hanno portato allo sversamento di almeno 5.000 tonnellate di petrolio, 4 di questi avvenuti in acque italiane (REMPEC, 2011).

2.2 I processi chimico-fisici conseguenti gli sversamenti petroliferi

Quando il petrolio, o suoi derivati, viene rilasciato in mare, le sue proprietà chimico-fisiche cambiano per effetto di vari fattori, come l'azione dell'acqua, della radiazione solare e dei microrganismi presenti in ambienti acquatici. I cambiamenti sono molto veloci nelle fasi iniziali dell'esposizione, per poi stabilizzarsi. I processi di alterazione (*weathering*) a cui va incontro il petrolio rilasciato in mare sono i seguenti: diffusione (*spreading*), evaporazione, emulsificazione, dispersione, dissoluzione, sedimentazione, ossidazione e biodegradazione (<http://www.itopf.com/marine-spills/fate/weathering-process>; Farrington, 2014). La velocità e l'entità di ciascun processo dipende da vari fattori come, la quantità di olio sversato, le caratteristiche fisico-chimiche (viscosità, densità, *flash point*, *pour point*, tensione interfacciale) del greggio e le condizioni meteo-climatiche (Fingas, 2014).

Generalmente i processi di dispersione, evaporazione, emulsificazione e dissoluzione avvengono al momento dello sversamento mentre i processi di fotoreazione, sedimentazione e biodegradazione avvengono in un secondo tempo, influenzando il destino ambientale del petrolio. La distribuzione del petrolio sulla superficie del mare avviene sotto l' influenza delle forze di gravitazione, della viscosità del petrolio e della tensione superficiale dell'acqua. Dopo i primi giorni una parte considerevole del petrolio evapora. Oltre alle componenti volatili, una parte del petrolio perde anche gli idrocarburi solubili in acqua. La parte restante (frazione più viscosa) ritarda la dispersione del petrolio. La maggior parte dei componenti (in particolare quelli alifatici a basso peso molecolare e gli aromatici) sono solubili in acqua. Rispetto all'evaporazione, che agisce entro le prime 24-48 ore, la dissoluzione è un processo più lungo. Oli pesanti evaporano poco, formando frazioni di greggio residue molto dense. Si stima che dopo 5-6 ore dallo sversamento, la concentrazione di idrocarburi aromatici volatili diminuisca sensibilmente (ITOPF). La macchia di petrolio può frammentarsi in piccole gocce nella parte alta della colonna d'acqua per effetto della dispersione. Questo processo è più veloce se l'olio versato è del tipo leggero, a bassa viscosità e il mare è molto mosso. Spesso, in presenza di greggio viscoso, si ricorre all'utilizzo di agenti disperdenti per aumentare il rapporto superficie/volume delle gocce di petrolio e per favorirne il processo di dispersione (EPA, 1999). Alcuni oli viscosi, in condizioni di turbolenza marina, possono portare alla formazione di emulsioni stabili in acqua e più persistenti del petrolio originale (Liu *et al.*, 2013). Le emulsioni più stabili, del tipo acqua in olio, contengono dal 30% al 80% di acqua. La formazione di un'emulsione stabile provoca un aumento di volume della massa inquinante che si forma e rallenta gli altri processi chimico-fisici che permetterebbero la degradazione dell'inquinante. Tali formazioni possono essere presenti per oltre 100 giorni, note come *chocolate mousses*. Prodotti petroliferi con densità maggiore dell'acqua, possono sedimentarsi sul fondale marino; generalmente la sedimentazione, che si verifica mediante l'adsorbimento sul materiale sospeso e depositato sul fondo, avviene in prossimità della costa, dove la turbolenza è elevata. Per effetto della radiazione solare si verificano reazioni chimiche di ossidazione, decomposizione e polimerizzazione sulla superficie dello strato di petrolio emulsionato con l'acqua. Questo processo di ossidazione può portare alla formazione di ammassi catramosi che, per effetto dei raggi ultravioletti, sono frantumati e successivamente sedimentano sul fondale marino o si ritrovano spiaggiati lungo la fascia costiera. Molti componenti del petrolio possono essere biodegradati dai microrganismi presenti nell'ambiente marino, sia che si tratti di petrolio

emulsionato in superficie sia di petrolio depositato sul fondo (Farrington, 2014). Per stimolare il processo di autodepurazione, vengono aggiunte sostanze a base di azoto e fosforo, che sono in grado di favorire la crescita dei microrganismi (EPA, 1998). In generale l'evaporazione è il maggior processo di *weathering*. Ha un grande impatto sul quantitativo di petrolio rimanente nell'acqua e nelle spiagge dopo uno sversamento; molte componenti di petroli pesanti non evaporano, anche dopo lunghi periodi di tempo o ad alte temperature (Fingas, 2011).

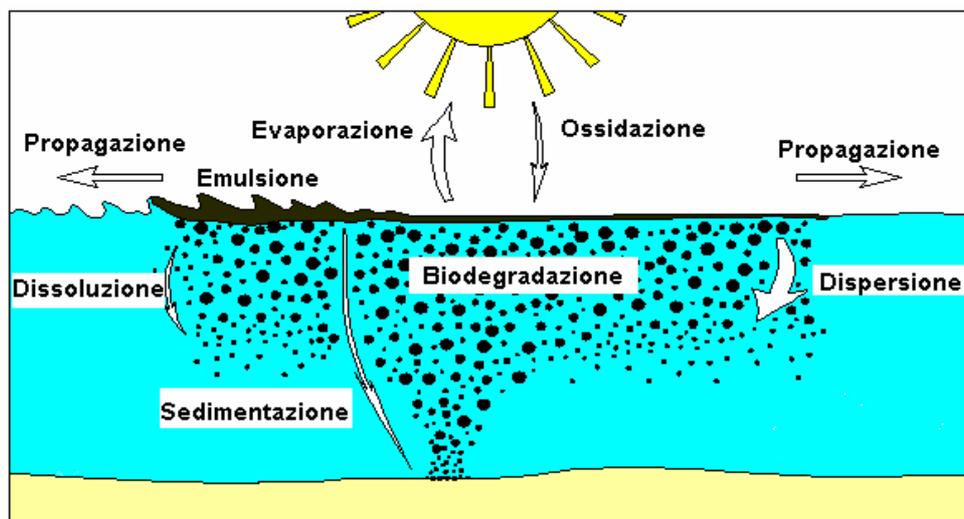


Fig. 2.4 Processi di alterazione (*weathering*) Fonte ITOPF

2.3 L'impatto ambientale conseguente gli sversamenti petroliferi

Lo sversamento di prodotti petroliferi in mare determina un forte impatto negativo sull'intero ecosistema. I fattori che maggiormente influenzano la pericolosità dello sversamento sono il tipo di petrolio rilasciato, gli organismi animali e vegetali esposti e la vicinanza dello stesso alle attività umane. Gli organismi biotici (pesci, invertebrati, uccelli e piante) una volta entrati in contatto con il petrolio rilasciato, possono andare incontro a morte o diventare essi stessi fonte di contaminazione, poiché si verifica un aumento della concentrazione di contaminante lungo la catena alimentare. Per questa ragione possono andare a costituire un potenziale pericolo per la salute umana (Cohen, 2013). Un ulteriore impatto dello sversamento di petrolio si verifica a seguito di utilizzo in terreni agricoli di sostanze contaminanti, provenienti dalle acque oceaniche, dalle paludi o dalle spiagge. Interventi rapidi e mirati di bonifica delle coste risultano perciò di fondamentale importanza. Questi interventi devono essere effettuati sulla base di considerazioni quali le caratteristiche dei litorali contaminati, del loro uso, delle correnti, dell'ecosistema coinvolto e delle comunità biologiche potenzialmente colpite da tale contaminazione (EPA, 1998).

2.3.1 L'impatto sulle coste

La distribuzione del petrolio sui litorali e l'efficacia della sua rimozione dipende principalmente dal luogo in cui avviene la contaminazione. La maggioranza delle perdite di petrolio si verifica al largo delle coste o nelle vicinanze di queste, piuttosto che direttamente sulle spiagge. Tuttavia, a causa del moto ondoso e dell'azione dei venti, il petrolio può essere trasportato fino ai litorali. Queste zone, quando vengono esposte all'inquinamento da idrocarburi del petrolio, tendono ad essere estremamente sensibili a tale contaminazione (Bravo-Linares *et al.*, 2012). I processi di *weathering* che subisce il petrolio sono gli stessi che avvengono per rilasci in mare aperto; il petrolio si degrada perdendo principalmente componenti a basso peso molecolare, quali alcani a corta catena (USEPA, 2007). Più questi processi sono duraturi nel tempo, maggiore è la formazione di residui di petrolio densi e pesanti, che si possono adsorbire sulle rocce e sugli organismi, o formare emulsioni che difficilmente vengono rimosse tramite processi chimico-fisici (Pereira *et al.*, 2004). Chiazze di petrolio e *mousse* possono arrivare fino alle spiagge, sui litorali rocciosi ed in aree e zone umide, come paludi e mangrovie. La persistenza del petrolio sui sedimenti della costa dipende da vari fattori, come la tipologia del sedimento (sabbioso, roccioso), il tipo di petrolio e l'azione delle correnti marine (Castanedo *et al.*, 2009). A seconda del tipo di substrato e del tasso di esposizione alle correnti marine, la tipologia e i tempi di bonifica delle coste contaminate da petrolio risultano essere diversi. Se il petrolio si riversa su coste rocciose, poiché aderisce poco a questo substrato, sono necessari minori interventi di ripristino, al contrario, maggiori interventi di bonifica possono essere necessari quando il petrolio è poco esposto alle correnti, aumentando così la sua persistenza (ISPRA, 2011). Grazie all'azione del moto ondoso, il petrolio che si riversa sulle rocce, è continuamente rimosso, in particolare le sue componenti più solubili in acqua. Contemporaneamente il riscaldamento solare causa l'evaporazione delle componenti volatili mentre la radiazione solare provoca reazioni fotochimiche di degradazione. In sintesi, le coste sabbiose contaminate da idrocarburi sono maggiormente esposte agli effetti dello sversamento, poiché hanno una maggiore tendenza ad accumulare gli idrocarburi nella matrice solida. Il petrolio può persistere a lungo in questo tipo di sedimenti poiché queste coste, essendo costituite da sabbia, ghiaia e pietrisco, hanno una elevata porosità e quindi, garantiscono un'elevata permeabilità al petrolio, che si accumula negli strati più profondi dei sedimenti, risultando più difficile da trattare (Farrington, 2014). Ne consegue un dilatamento dei tempi di ripristino. Il petrolio che si trova negli strati inferiori della sabbia, a causa dell'azione del moto ondoso, può essere

riportato sulla superficie del sedimento oppure frammentarsi in piccoli pezzi. Come è già stato scritto in precedenza la persistenza del petrolio sui sedimenti della costa può essere un fenomeno molto duraturo. Ad esempio, in seguito allo sversamento della petroliera *Exxon Valdez* avvenuta nel 1989, una parte del petrolio giunse a riva in aree in cui erano presenti sedimenti grossolani. Per molto tempo, il petrolio sversato rimase adeso ai ciottoli del sottosuolo e alle ghiaie, poiché gli oli pesanti legandosi ai sedimenti grossolani, proteggevano i sedimenti sottostanti anch'essi contaminati, andando così ad ostacolare la rimozione del petrolio dai litorali (Cohen, 2013). In zone umide paludose, la presenza di petrolio sui litorali, risulta particolarmente preoccupante poiché può persistere per diversi anni, nel caso di oli pesanti anche per decenni. Per quanto riguarda la fuoriuscita di petrolio dalla petroliera *Amoco Cadiz* sulla costa della Bretagna (Francia) nel 1978, la presenza di residui di greggio è stata ritrovata dopo 23 anni nei sedimenti paludosi. La biodegradazione totale del petrolio originale, dopo 23 anni, è stata stimata del 60%, con una percentuale del 6.8% di residui di alcani e cicloalcani, 34.7% di molecole aromatiche ad alto peso molecolare e 49% di asfalteni (Cohen, 2013).

2.3.2 Gli interventi di ripristino costiero

In mare il petrolio tende a diffondersi. Le modalità operative di intervento, condizionate dal tempo trascorso in mare dall'idrocarburo e dalle condizioni meteo-marine, mirano prima di tutto all'eliminazione della fonte inquinante e alla rimozione meccanica di quanto sversato in mare e del prodotto giunto in costa. Il petrolio che raggiunge la costa presenta un rischio di danno ambientale maggiore che in mare aperto, per cui si richiedono interventi rapidi per evitare che gli oli raggiungano i litorali. Ad oggi, si è in grado di raccoglierne circa il 15% mentre il restante 85% si deposita sul fondo o raggiunge la costa (Owens, 2011). I metodi per la pulizia delle macchie di petrolio in mare sono: la raccolta, tramite contenimento grazie a barriere galleggianti o tramite materiali assorbenti, oppure l'utilizzo di disperdenti. Questi ultimi sono in grado di abbassare la tensione interfacciale tra olio-acqua, rompendo la macchia di petrolio in piccole goccioline, che accelerano la loro dispersione in acqua, promuovendone la dissoluzione delle componenti idrofobiche del greggio e favorendo il processo di degradazione del petrolio da parte dei batteri presenti nel mare (Gong *et al.*, 2014). Una volta che il petrolio si riversa sulla costa, occorre raccogliere il materiale spiaggiato. In base alle tipologie di costa (spiagge sabbiose, ghiaiose, scogliere, zone umide costiere), al loro utilizzo (località balneari, porti industriali, ecc.), ai livelli di contaminazione, al tipo e alle caratteristiche chimico-fisiche del petrolio e

alla profondità di penetrazione del petrolio nei sedimenti; vengono attuate diverse tecniche di pulizia. Lo scopo dell'attività di pulizia è quello di ottenere che il tratto di costa interessato soddisfi requisiti ecologici ma soprattutto vengano eliminati rischi derivanti dall'esposizione agli idrocarburi. Il petrolio che si riversa sulle spiagge può non essere sottoposto ad alcun trattamento, aspettando che avvenga il processo di autodepurazione, tramite i meccanismi di decomposizione naturali, in quanto in alcuni casi la rimozione meccanica del sedimento può causare danni all'ambiente (Owens, 2011). Tuttavia, nel caso in cui siano colpite località balneari o aree di interesse ecologico, e comunque se sulle spiagge si rileva la presenza di oli pesanti con componenti altamente idrofobiche, che si legano fortemente ai sedimenti, o si verifica la formazione di depositi di composti viscosi, noti anche come *tar balls* e *asphalt balls*, che limitano i processi biodegradativi da parte dei microrganismi, si preferisce intervenire con diversi trattamenti. Le spiagge contaminate possono essere bonificate tramite lavaggio con flussi d'acqua calda o a temperatura ambiente, ad alta o bassa pressione, soprattutto nel caso di petroli ad alta viscosità (*soil washing in-situ*). In alcuni casi questa tecnica può portare ad un'ulteriore penetrazione del petrolio nei sedimenti o ad un aumento dell'erosione delle coste (Owens, 2011), per cui ne va attentamente valutato l'utilizzo. Quando il petrolio raggiunge spiagge sabbiose e facilmente accessibili, spesso si ricorre alla rimozione degli strati superficiali della sabbia tramite mezzi meccanici (ruspe, scavatori) per la raccolta o alla rimozione manuale con rastrelli. Per evitare l'erosione delle rive, risulta necessario rimuovere solo i sedimenti contaminati. Possono essere raccolte notevoli quantità di petrolio, che possono essere recuperate, e sabbie oleose che vanno opportunamente trattate con interventi *ex situ*, come impianti di *soil washing*. La matrice sabbiosa bonificata viene ricollocata nel sito di provenienza o destinata ad altri usi industriali (Owens, 2011). Questo processo di rimozione diventa molto più difficile da attuare quando il petrolio contamina sedimenti a granulometria grossolana. Possibili interventi *in situ* consistono in combustione, *bioremediation* e trattamenti chimici con agenti disperdenti, quali solventi organici con o senza tensioattivi. Questi agenti di pulizia agiscono come degli emulsionanti, disperdendo l'olio nelle acque del mare e vengono utilizzati per rimuovere il petrolio dalla matrice sabbiosa (Bravo-Linares *et al.*, 2012). Per contro, possono far in modo che la dispersione del petrolio raggiunga zone incontaminate, aumentando l'area di contaminazione o permettendo il trasporto del petrolio all'interno dei sedimenti. Solitamente l'unico modo praticabile per rimuovere il petrolio risulta la raccolta meccanica: in una spiaggia che sia stata fortemente inquinata, lo strato contaminato viene generalmente rimosso e trasferito

presso una stazione di decontaminazione. Gli svantaggi di trattamenti *off site* sono molteplici, rispetto agli altri tipi di interventi, legati al rischio di ulteriori inquinamenti legati al trasporto, alla maggiore formazione di rifiuti e ai costi di gestione che ciò comporta (Owens, 2011).

3. Gli idrocarburi petroliferi

I processi di evaporazione, diffusione, solubilizzazione o trasformazione chimica che interessano gli idrocarburi petroliferi dispersi nell'ambiente, in matrici quali il suolo e sottosuolo dipendono, oltre che dalle caratteristiche del terreno, anche dalle proprietà chimico-fisiche delle singole componenti del petrolio. Il petrolio greggio e i prodotti petroliferi sono una miscela complessa di idrocarburi presenti in percentuale variabile, ciascuno con diverse caratteristiche chimico-fisiche e tossicologiche (solubilità, polarità, viscosità, densità, *flash point*, *pour point*, tensione interfacciale ecc..) e conseguente impatto ambientale (Fingas, 2011). Il petrolio, oltre idrocarburi lineari ramificati e aromatici, può contenere altri elementi come zolfo, azoto, ossigeno, tracce di metalli (nickel, vanadio e cromo). Gli idrocarburi del petrolio sono compresi tra il C6 ed il C40 (Potter *et al.*, 1998) e possono essere classificati in tre categorie in base al loro peso: componenti leggeri, medi (allo stato gassoso o liquido) e pesanti (sotto forma di solidi amorfi o cristallini); oppure sono classificati in base alla loro struttura in saturi, aromatici, resine e asfalteni (SARA) (Fingas, 2011). Gli idrocarburi saturi includono lunghe catene di alcani lineari e ramificate e cicloalcani.

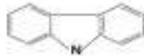
Groupings	Example Classes, Names, and Compounds			Example compound
	Chemical class	Alternate name	Description	
Saturates	alkanes	paraffins		dodecane  $C_{12}H_{26}$
	cycloalkanes waxes	naphthanates	n-alkanes C18-C80	decalin 
Aromatics	Benzenes			benzene 
	BTEX		Benzene, Toluene, Ethylbenzene, Xylenes	
	PAHs			anthracene 
	Naphthenoaromatics		combinations of aromatics and cycloalkanes	tetralin 
Resins	class of mostly anomalous polar compounds sometimes containing oxygen, nitrogen, sulphur, or metals			carbazole 
Asphaltenes	class of large anomalous compounds sometimes containing oxygen, nitrogen, metals, or sulphur			structures not known

Fig. 3.1 Classificazione idrocarburi del petrolio (SARA) (Fingas, 2011)

Gli idrocarburi policiclici aromatici (*IPA*) costituiscono una famiglia di numerosi composti chimici, formati da uno o più anelli benzenici, generalmente apolari (López-Vizcaino *et al.*, 2012). Per queste ragioni vengono classificati come composti organici idrofobi. Essi sono molto persistenti nei suoli e nei sedimenti a causa della loro bassa volatilità, bassa solubilità in acqua e bassa biodegradabilità. Per questo sono molto difficili da rimuovere dal suolo. I più abbondanti composti aromatici nel petrolio sono i *BTEXS* (Benzene, Toluene, Etilbenzene, Xilene e Stirene), maggiormente volatili. Le resine sono i più piccoli composti polari del petrolio, contengono eteroatomi quali zolfo, azoto o ossigeno e presentano quindi maggiore polarità e solubilità in acqua. Composti polari a più alto peso molecolare vengono denominati asfalteni.

3.1 Proprietà

I prodotti petroliferi hanno proprietà chimiche e fisiche di base simili. Le principali proprietà di questi composti sono: polarità, solubilità, volatilità, tossicità e biodegradabilità. I componenti leggeri sono costituiti da idrocarburi alifatici contenenti fino a 10 atomi di carbonio (alcani e ciclo alcani) e da idrocarburi monoaromatici. Rappresentano circa il 90% della frazione solubile del petrolio, caratterizzati da completa e rapida evaporazione (solitamente entro 24 ore dopo l'evento di dispersione nell'ambiente).

I componenti medi sono costituiti da idrocarburi alifatici compresi tra il C11 e C22 (frazione di alcani facilmente biodegradabili), diaromatici (naftalene) e poliaromatici (fenantrene, antracene, ecc.). Sono caratterizzati da bassa velocità di evaporazione, necessitano infatti di alcuni giorni, in funzione delle condizioni climatiche ambientali. I componenti pesanti comprendono idrocarburi contenenti 23 o più atomi di carbonio e cere, asfalteni, e composti polari. A temperatura ambiente presentano scarsa evaporazione e persistono a lungo termine nei sedimenti sotto forma di grumi di catrame o pavimenti di asfalto, con bassi tassi di degradazione. In generale con il crescere del numero degli atomi di carbonio si osserva un aumento della densità, delle temperature di fusione e di ebollizione, del *flash point*, dell'adesione alle matrici solide, del carattere idrofobico, mentre si ha una diminuzione della tensione di vapore, della mobilità, del coefficiente di diffusione in aria, della solubilità in acqua. Petroli greggi costituiti da idrocarburi a basso peso molecolare sono considerati non persistenti nell'ambiente, contrariamente ai greggi con idrocarburi a medio e alto peso molecolare (API, 2001). Oltre alle caratteristiche chimico-fisiche di un composto disperso in una o più matrici ambientali, è necessario valutare il grado di pericolosità che questo rappresenta per l'uomo e per l'ambiente, sulla base delle

caratteristiche sanitarie (tossicità e cancerogenicità). L'impatto degli idrocarburi del petrolio sull'uomo e sull'ambiente è dovuto principalmente alle sue caratteristiche idrofobe permettendo di accumularsi lungo la catena alimentare. (Huguenot *et al.*, 2015). Gli oli pesanti, possono ricoprire un litorale e uccidere gli organismi attraverso il semplice impatto fisico (*smothering*), in generale sono molto persistenti anche se sono relativamente meno tossici degli oli leggeri (Biliardo *et al.*, 2000). Il processo di *weathering* riduce in parte la pericolosità dei prodotti petroliferi; in generale uno sversamento di petrolio che raggiunge la costa rapidamente è da considerarsi un evento più pericoloso per la vita costiera rispetto ad un analogo sversamento in mare aperto, quindi sottoposto più a lungo al processo *weathering*. Nella valutazione dello sversamento di prodotti petroliferi nell'ambiente, dal punto di vista operativo, risulta impraticabile determinare lo stato di ogni singolo componente, per cui solitamente, nelle indagini riguardanti i siti inquinanti si ricercano informazioni sugli idrocarburi totali (HC) o TPH (*Total Petroleum Hydrocarbons*) e su un certo numero di contaminanti "indicatori", rappresentativi delle proprietà chimico-fisico e tossicologiche delle varie classi idrocarburiche, in funzione del loro potenziale di rischio per la salute umana e per l'ambiente. A seconda delle componenti del petrolio (pesanti, intermedie e leggere) vengono utilizzati come indicatori gli IPA (idrocarburi policiclici aromatici) o i BTEXS (Benzene, Toluene, Etilbenzene, Xilene, Stirene). Esistono in letteratura, molti studi di tossicità per gli idrocarburi totali del petrolio. Gli IPA, sono una classe di composti con diverse proprietà mutagene (Liu *et al.*, 2013). Contaminazioni di IPA a causa di sversamenti di petrolio, sono molto importanti e pongono seri problemi nel trattamento delle zone costiere, per cui l'indagine della loro presenza dopo uno sversamento risulta necessaria per stimare l'impatto sull'ambiente (Liu *et al.*, 2013; Huguenot *et al.*, 2015). Alcuni IPA sono cancerogeni e sono quindi di particolare interesse come contaminanti ambientali (Sims *et al.*, 1983). Tali sostanze inducono sia effetti acuti che cronici sulle zone colpite e, per il benzo[a]pirene, uno degli IPA più cancerogeni che, come tale, è il composto più studiato (Holstein *et al.*, 1979), si ha la certezza di una loro azione mutagena, cancerogena e teratogena.

3.2 Olio combustibile pesante ad uso navale (IFO180)

Dopo l'estrazione, il petrolio viene avviato ad una serie di lavorazioni basate sulla distillazione frazionata. In linea generale, a temperature oltre 400° C, ciò che resta del greggio di partenza inizia a decomporsi prima di arrivare ad ebollizione. Il residuo della distillazione (circa il 15% del greggio originario) è la frazione più pesante del petrolio, che

mescolata con le frazioni dei distillati più pesanti, rappresenta l'olio combustibile per motori tipo diesel ad alta compressione, come quelli delle grandi navi (EPA, 1998). Esistono tre tipi di combustibili marini: i distillati, gli oli residui e una miscela dei primi due, denominata IFO (*Intermediate Fuel Oil*). Questi tipi di combustibili hanno alta viscosità, sono insolubili in acqua e relativamente stabili al di sotto della superficie (CONCAWE, 1998). La composizione chimica degli oli combustibili varia molto: l'ecotossicità dipende sia dal tipo di grezzo di provenienza sia dal distillato impiegato per ogni specifico olio combustibile. Nel corso dell'invecchiamento la composizione dell'olio cambia: entro il primo anno dallo sversamento vengono perse le componenti più leggere (per evaporazione, biodegradazione e dissoluzione), con una rimozione quasi totale degli alcani fino al C17. I composti biodegradati a minore velocità risultano pristano e fitano, persistendo per diversi anni. I residui dell'olio combustibile contengono idrocarburi con atomi di carbonio superiore a 25 e con alto rapporto C/H, idrocarburi aromatici ad alto numero di anelli condensati, paraffine e nafteni.

A causa del loro preponderante uso come carburanti per navi, l'olio combustibile residuo, stivato nei serbatoi delle navi, è spesso oggetto di indagine nello sversamento di petrolio in mare, durante gli incidenti che coinvolgono le imbarcazioni. Gli oli combustibili residui, spesso riferiti a combustibili petroliferi pesanti o HFO, risultano i più utilizzati per la propulsione delle navi e il loro trasporto aumenta di anno in anno. I più comuni, tra gli HFO, sono l' IFO180 e l' IFO380.

4. Tecnologie di bonifica

Gli inquinanti che maggiormente risultano impattanti nell'inquinamento dei suoli/sabbie risultano i metalli pesanti, i composti organici tossici e cancerogeni (prodotti del petrolio, fitofarmaci, prodotti di combustione ecc.), amianto e i radionuclidi. I prodotti petroliferi, a causa dei numerosi eventi di contaminazione, risultano diffusi nelle matrici ambientali. Essi costituiscono una classe di contaminanti fortemente persistente e a causa della elevata mobilità risultano tossici e a volte cancerogeni per gli organismi viventi, bersagli di prioritaria importanza nella analisi del rischio conseguente eventi di contaminazione. In particolare gli idrocarburi, in quanto composti organici idrofobici, si legano alle componenti del suolo e sono più difficili da rimuovere e degradare una volta che vengono a contatto con i sedimenti piuttosto che in mare, rappresentando un pericolo per l'uomo e per l'ambiente. E' evidente la primaria importanza che assume il risanamento dei siti inquinati dai contaminanti petroliferi, fortemente diffusi nell'ambiente e dannosi per gli organismi viventi. Il suolo contaminato è difficile da bonificare, a causa della formazione sulle particelle di suolo di piccole gocce o film di olio, che costituiscono una barriera per la degradazione microbica (Reis *et al.*, 2013). I microrganismi presenti nei pori dei suoli o nella matrice dei sedimenti non possono trovarsi in pori che sono più piccoli della loro taglia, ciò limita la biodisponibilità dei contaminanti adsorbiti alla matrice solida. Numerose tecnologie di risanamento sono state sviluppate per ridurre la contaminazione da idrocarburi nei suoli e nei sedimenti.

Prima di trattare nello specifico la tecnologia del *soil washing* applicata alla decontaminazione delle sabbie da prodotti petroliferi, si introducono alcuni concetti di carattere generale relativi alle modalità di intervento di bonifica applicate ai suoli/sabbie e sedimenti; evidenziando, a seguire, i principi base e le condizioni ambientali necessarie per l'applicazione delle tecnologie biologiche di risanamento. Fra tali principi, è necessario soffermarsi sul concetto della biodisponibilità dell'inquinante nella matrice acquosa, condizione necessaria per permettere la degradazione biologica.

4.1 Tecnologie di bonifica dei suoli

Premesso che non si può individuare fra le metodologie e tecniche di risanamento, quella universalmente migliore, ogni tipologia di intervento richiede l'analisi di più fattori, in relazione ai risultati della caratterizzazione durante l'elaborazione del modello concettuale

del sito, ed in merito al rischio per l'uomo e per l'ecosistema che la contaminazione in essere determina. Le tipologie di intervento, ai fini della bonifica dei suoli, dal punto di vista dei processi indotti sui contaminanti si distinguono in:

- di distruzione
- di mobilizzazione (tra cui il *soil washing*)
- di immobilizzazione e contenimento

Le tecniche di distruzione sono le uniche che agiscono direttamente sui contaminanti riducendo l'azione tossica e nociva delle matrici ambientali. Tali tecniche trasformano i contaminanti in sostanze meno pericolose, attraverso processi chimici biologici e biochimici (degradazioni chimica, trattamenti termici - Nikolopoulou *et al.*, 2013). Fra queste si annoverano quelle di risanamento biologico e di incenerimento. Le prime si basano sulle attività metaboliche dei microrganismi e più in generale di organismi viventi (*phytoremediation*), mentre le seconde sulle trasformazioni ossidative indotte dalle alte temperature. Altre tecniche efficaci si basano su principi di elettrochimica grazie alla capacità del suolo, in virtù del suo contenuto idrico, di funzionare come una pila, in cui i contaminanti ionici si spostano da un elettrodo all'altro all'interno dell'acqua; altre tecniche distruttive fanno ricorso all'ossidazione chimica *in situ*, grazie all'utilizzo di agenti fortemente ossidanti.

Le tecniche di mobilizzazione inducono la mobilizzazione del contaminante dalla matrice in cui è principalmente presente in altre. Tali tecniche provocano un trasferimento dell'adsorbato o del soluto verso la matrice aria (iniezione diretta di varie miscele di gas ovvero con somministrazione di calore) o acqua (lavaggio dei suoli, particolarmente utile per liscivare metalli o contaminanti organici). Si fa ricorso a tali tecniche quando risulta più vantaggioso ed agevole trattare una matrice differente da quella principale, oggetto della contaminazione.

Le tecniche di immobilizzazione, al contrario delle precedenti, mirano a ridurre fortemente la mobilità dei contaminanti tra le matrici ambientali. Si tratta principalmente di tecniche di solidificazione/stabilizzazione, vetrificazione e termodistruzione. Tali tecniche isolano la fonte di contaminazione, impedendo possibili vie di trasporto (barriere impermeabili, *capping* ecc.). Si tenga presente che alcune tecniche quali l'incapsulamento di un volume di suolo contaminato sono difficilmente realizzabili se il sottosuolo non possiede un substrato impermeabile ad una profondità non eccessivamente elevata dal piano campagna. Rientrano in queste tecniche tutte le messe in sicurezza. Il criterio per la scelta dell'intervento ottimale deve considerare fattori sito-specifici, nell'ottica della sostenibilità

ambientale. Essa dipende da diversi fattori, quali le caratteristiche geologiche e idrologiche del sito da bonificare, l'estensione dell'area inquinata, i volumi di suolo contaminato, il grado di inquinamento delle diverse matrici ambientali, e la distribuzione delle sostanze inquinanti nel sito. Ogni progetto di risanamento ambientale dovrebbe prevedere analisi comparative in merito alle possibilità di intervento utilizzabili nel sito in relazione alle caratteristiche intrinseche dello stesso, agli obiettivi di bonifica, ai tempi di raggiungimento e alla sostenibilità degli interventi anche in virtù delle risorse disponibili.

Ulteriore distinzione dei trattamenti di bonifica, oltre i principi chimico-fisico-biologici su cui esse si basano, avviene sulla base del sito in cui il contaminante viene trattato. Si distinguono due grandi classi di trattamento: *in situ* ed *ex-situ*:

- *in-situ*: prevedono l'impiego di tecnologie di bonifica che non comportano rimozione di terreno. In questo caso l'implementazione delle tecniche richiede una accurata conoscenza sito specifica del sito, sulle peculiarità geologiche e geotecniche, sulla qualità e quantità della flora batterica che popola il suolo sino ad una certa profondità, sulle caratteristiche della contaminazione e soprattutto necessitano di una corretta fase di applicazione in fase pilota. In *tab.4.1* si riporta l'elenco delle principali tecnologie di bonifica *in situ*; dettagliate per tipologia di intervento (biologica, chimica, termica, di stabilizzazione/solidificazione). Le tecniche *in situ* sono generalmente da preferirsi, qualora applicabili, in quanto ecosostenibili ed economicamente vantaggiose rispetto a tecniche *on site* e *off site* che comportano inevitabili modifiche morfologiche, pedologiche e biologiche dei suoli, oltre a costi ambientali legati al trasporto e trattamento dei suoli.
- *ex-situ*: il materiale inquinato viene rimosso per essere decontaminato con un appropriato intervento. Tale approccio può avvenire *on-site* (all'interno dell'area da bonificare) o *off-site*. Tali trattamenti vengono usualmente adottati per rimuovere sostanze presenti in elevate concentrazioni, consentono di raggiungere con maggiore certezza gli obiettivi di bonifica rispetto ad applicazioni *in situ*; in virtù del maggior controllo di processo attuabile durante le fasi di bonifica. La differenza sostanziale tra trattamenti *on site* e *off site* consiste nella riduzione dei costi legati al trasporto di materiale contaminato prelevato dal sito, la riduzione di incidenti dovuti al trasporto e la prevenzione di illeciti ambientali. L'allestimento *on site* degli impianti di trattamento è subordinato alla disponibilità delle superfici necessarie per l'impianto/i e di stoccaggio dei materiali. Deve inoltre essere evitato il contatto fra il materiale sottoposto a bonifica e la matrice ambientale. In generale si può supporre che può essere sottoposto a trattamento *on site/off site* un suolo sino ad una profondità massima di 5 m rispetto al piano campagna. Tutte le difficoltà tecniche cui

si può incorrere durante l'escavazione limitano fortemente l'applicabilità di tali tecnologie (presenza di strutture, ostacoli, *pipeline*, possibili frane o slavine per scalzamento del piede, presenza di materiale compatto, possibile migrazione del contaminante in altre zone del sito o matrici ambientali). In *tab.4.2* si riporta l'elenco delle principali tecnologie di bonifica *on site/off site*; dettagliate per tipologia di intervento (biologica, chimica, termica, di stabilizzazione/solidificazione).

Tecnologia	Descrizione	Tipo
<i>Bioremediation</i>	Bonifica ottenuta alterando le condizioni del suolo per favorire l'efficienza di biodegradazione del contaminante	B
<i>Bioslurping</i>	Estrazione della fase libera dal suolo insaturo e dalla falda. Consente di estrarre contemporaneamente anche il contaminante presente nella fase vapore e di fornire ossigeno per favorire la biodegradazione	B,F
<i>Bioventing</i>	Insufflazione di aria nel sottosuolo per favorire l'attività microbica aerobica e la mobilità della fase vapore della contaminazione	B,F
<i>In situ Chemical Oxidation/Reduction</i>	Trasformazione chimica del contaminante in sostanze compatibili con l'ambiente e non tossiche	C
<i>Electroremediation</i>	Applicazione di un campo elettrico al suolo per favorire la mobilità della contaminazione o per contenerla	B,F
<i>Soil flushing</i>	Ricircolazione dell'acqua di falda trattata per il lavaggio dei suoli	F,C
<i>Thermal heating</i>	Utilizzo di vapore acqueo o microonde per favorire il desorbimento termico del contaminante dal suolo	T
<i>Landfarming</i>	Coltivazione superficiale del suolo per favorire la biodegradazione del contaminante. Include l'utilizzo di ammendanti e nutrienti	B
<i>Natural attenuation</i>	Utilizzo monitorato dei processi di attenuazione della contaminazione che avvengono naturalmente nel suolo	B,F,C
<i>Phytoremediation</i>	Utilizzo di essenze vegetali per la rimozione della contaminazione dal suolo o per la stimolazione dei processi biodegradativi	B
<i>Soil vapor extraction (SVE)</i>	Estrazione di aria e degli altri gas dal sottosuolo contaminato. Favorisce l'ossigenazione e lo stripping della fase vapore	F
<i>Stabilization/Solidification</i>	Iniezione di agenti solidificanti che riducono la mobilità della contaminazione	S/S
<i>Vitrification</i>	Miscelazione del suolo con materiali silicei e riscaldamento a temperature che favoriscono la formazione di una fase vetrosa. Le sostanze organiche vaporizzano e quelle inorganiche rimangono immobilizzate nella matrice	S/S,F

Tab. 4.1 – Principali tecnologie di bonifica *in situ*, distinte per tipologia di intervento. B biologica, F fisica, C chimica, T termica, S/S Stabilizzazione/Solidificazione (Brugnoli E *et al.*, 2014)

Tecnologia	Descrizione	Tipo
<i>Biopiles</i>	Compostaggio di suolo contaminato	B
<i>Bioreactors</i>	Trattamento di fango o suolo secco in reattori chiusi, in presenza di nutrienti, aria ed eventuali ceppi batterici adatti alla biodegradazione del contaminante	B
<i>Biological treatment beds</i>	Coltivazioni superficiali di suolo per favorire l'azione biodegradativa. Detta anche <i>landfarming on site</i>	B
<i>Chemical enhanced soil washing</i>	Lavaggio del suolo con l'utilizzo di solventi per favorire la lisciviazione o l'estrazione del contaminante	C,F
<i>Chemical leaching</i>	Trasferimento del contaminante dal suolo ad una soluzione acquosa	C
<i>Chemical extraction</i>	Estrazione del contaminante dal suolo per mezzo di un solvente	C
<i>Incineration</i>	Distruzione ad alta temperatura del contaminante	T
<i>Soil washing</i>	Lavaggio della frazione fine del suolo con acqua. Si utilizzano opportuni solventi o surfattanti	F
<i>Stabilization/Solidification</i>	Utilizzo di cementi e sostanze solidificanti per immobilizzare la contaminazione presente nel suolo	S/S
<i>Thermal desorption</i>	Utilizzo di forni a bassa temperatura per favorire il desorbimento dei contaminanti organici presenti nella matrice. I vapori estratti devono essere trattati.	T
<i>Vitrification</i>	Utilizzo di materia contenente silicio mescolata al terreno contaminato per la formazione di una matrice vetrosa ad alte temperature che immobilizza la contaminazione	S/S

Tab. 4.2 – Principali tecnologie di bonifica *on site/off site*, distinte per tipologia di intervento. B biologica, F fisica, C chimica, T termica, S/S Stabilizzazione/Solidificazione (Brugnoli E *et al.*, 2014)

La tecnica di bonifica *off site* di uso più comune: smaltimento in discarica

In generale l'opzione di scavo e conferimento in discarica, malgrado preveda la bonifica completa dell'area interessata raggiunta attraverso la rimozione e il trasferimento della origine del rischio, crea una forte perdita della risorsa ambientale, ed è applicabile solo alla parte corticale del suolo, oltre ad essere sconsigliata per gli elevati costi ed impatti ambientali. Ciò malgrado resta fra le tecniche maggiormente diffuse per la decontaminazione dei suoli, in quanto viene rimossa la parte del suolo con inquinante in fase libera, evitando problematiche con la Comunità che ancora mostra riluttanza verso

l'applicazione di tecniche di trattamento *in situ*. Le tecniche *in situ* sono al contrario convenienti quando si voglia recuperare un'area non eccessivamente estesa o quando i fenomeni di contaminazione sono così gravi da non rendere possibile con le tecnologie disponibili a costi accettabili conseguire i risultati prescritti dalla norma vigente.

La scelta della tecnica – strumenti di supporto alle decisioni

Nonostante la complessità nella scelta della tecnologia, un primo assunto può comunque essere fatto : ogni tecnologia resta specifica ed adatta ad una classe di contaminanti e per il raggiungimento di specifici livelli di decontaminazione. La scelta è condotta in relazione alla alle condizioni locali, quali aspetti legati alla matrice (distribuzione granulometrica che influisce su trasporto, contenuti di argilla sui fenomeni di adsorbimento e scambio cationico, l'umidità del terreno e i nutrienti sull'attività microbica); al sito (spessore da risanare, caratteristiche idrogeologiche, presenza di costruzioni) e alla contaminazione (tipo di inquinante, concentrazione, tossicità e biodegradabilità) (Bonomo *et al.*, 2005). E' inoltre fondamentale ridurre i rischi igienico - sanitari per la popolazione, evitando tecniche pericolose che potrebbero essere fonti secondarie di contaminazione; ma anche possibili impatti acustici ed olfattivi. In questa direzione vengono spesso forniti *tools* che fungono da strumenti di supporto alle decisioni (*Decision Support System*). Alcuni di questi esempi sono il *software* ELGIRA (sistema di aiuto alla conoscenza e alla valutazione nella riqualificazione dei siti inquinati) (www.elgira.corila.it) oppure GoldSET (www.golden.com).

4.2 Cenni su tecnologie biologiche di risanamento

Quando si parla di tecnologie biologiche ci si riferisce all'insieme di processi di decontaminazione che prevedono l'utilizzo di organismi viventi (batteri, funghi e piante) in grado di mineralizzare un contaminante o di rimuoverlo fisicamente in virtù di processi metabolici intrinseci. I processi degradativi biologici generalmente avvengono nel suolo e nel sottosuolo a qualsiasi profondità e spontaneamente grazie alla presenza di popolazione di microrganismi nell'ambiente naturale, ovvero essi possono essere accelerati con tecniche tese ad incrementare la presenza o il metabolismo degli stessi. Se non si apportano variazioni chimico-fisici nei suoli si parla di *intrinsic bioremediation*; altrimenti, se modificati alcuni parametri funzionali alle bonifiche, di *engineered bioremediation*. In generale si può affermare che l'attenuazione naturale sia una vera e propria tecnica di bonifica *in situ*, competitiva per i costi, i bassi consumi energetici e la restituzione di un terreno biologicamente attivo. Resta sempre indispensabile condurre esperienze preliminari di laboratorio e successivamente su scala pilota, volte a valutarne

la fattibilità. I microrganismi presenti nel suolo e più in generale nelle varie matrici ambientali, hanno la capacità di degradare composti organici in maniera più o meno selettiva, ed in generale ciascun ceppo batterico è capace di degradare solo una specifica famiglia di composti. Si riportano alcuni esempi (tab. 4.3).

Specie	Inquinante
<i>Pseudomonas spp.</i>	Benzene, Antracene, idrocarburi, PCB
<i>Alcaligenes spp.</i>	Idrocarburi alogenati, solfati, IPA, PCB
<i>Flavobacterium spp.</i>	Naftaline, bifenili aromatici
<i>Azotobacter spp.</i>	Benzene, cicloparaffine
<i>Rhodococcus spp.</i>	Idrocarburi aromatici
<i>Nocardia spp.</i>	Diazinon
<i>Methosinus spp.</i>	PCB e formaldeide
<i>Methanogens spp.</i>	PCB, IPA

Tab. 4.3 – Microrganismi con potenziale biodegradativo inquinante-specifico (Brugnoli E *et al.*, 2014)

La biodegradazione dei composti organici può avvenire in ambiente aerobico e anaerobico e segue due vie a seconda del tipo di substrato utilizzato dai microrganismi: se consumano il substrato carbonioso direttamente come fonte di energia, si parla di trasformazione degradativa in ambiente metabolico, mentre se l'attività avviene tramite la trasformazione di un substrato non utilizzato, tramite altro composto che funge da substrato di crescita, si parla di trasformazione cometabolica. Fatte queste premesse, a seconda del tipo di processo, possiamo suddividere i microrganismi in gruppi in funzione dell'ambiente in cui agiscono:

- aerobici, per esempio come *Pseudomonas*, *Alcaligenes* e *Rhodococcus* in grado di ridurre pesticidi ed idrocarburi utilizzando il solo contaminante come fonte di carbonio e di energia
- anaerobici, come *Dehalococcoides spp.* o *Sulfurospirillum spp.* in grado di degradare PCB e TCE

Le fasi preliminari consistono nello studio di biodegradabilità dei composti e sulla caratterizzazione microbica del suolo per valutare la presenza di ceppi batterici adeguati alla rimozione del contaminante. La fattibilità del processo biodegradativo dipende principalmente da :

- composizione chimica della sostanza da degradare;
- valutazione della biodisponibilità dell'inquinante;

- concentrazione del contaminante non troppo elevata da risultare tossica per i microrganismi e né troppo bassa da rendere trascurabile la velocità di rimozione;
- presenza di sostanze che favoriscano l'azione dei batteri;
- (nutriente / elettroni accettori-donatori)
- Formazione di prodotti intermedi controllabili, tale da non risultare eventualmente tossici per l'uomo e l'ambiente.

Le tecniche di biorisanamento sono generalmente molto lente e presentano efficienze di rimozione più basse rispetto ai trattamenti chimico-fisici. La *bioremediation*, applicata con successo per la prima volta in seguito allo sversamento di petrolio dalla petroliera *Exxon Valdez*, ha incentivato molte ricerche per indagare fattori chimici, fisici, biologici che possono produrre condizioni favorevoli per la bonifica ecocompatibile ed economica *in situ* ed *ex situ* dei contaminanti (Nikolopoulou *et al.*, 2013). Tra queste tecnologie il *soil washing/flushing* con acqua e tensioattivi di origine biologica risulta essere un metodo innovativo, eco-compatibile, versatile e relativamente rapido (Mao *et al.*, 2015). Tali tensioattivi permettono di abbassare il tempo di rilascio del contaminante dalla matrice solida (Mulligan *et al.*, 2001). Tra le diverse tecniche utilizzate per la bonifica dei suoli le tecnologie basate sull'impiego dei surfattanti sono classificate come tecnologie innovative, e circa il 2-3% dei siti contaminanti prevede l'utilizzo di surfattanti con tali applicazioni (Paria, 2008). In particolare tecniche di risanamento che prevedono l'utilizzo di surfattanti sono molto promettenti soprattutto per la rimozione dei contaminanti organici.

4.3 La biodisponibilità

La definizione più frequente per indicare la biodisponibilità è la seguente: "Un inquinante ha una biodisponibilità limitata quando il suo tasso di assorbimento da parte di un organismo è limitato da barriere fisico-chimiche tra l'inquinante e l'organismo" (Volkering *et al.*, 1998). Se l'inquinante non è biodisponibile tali processi non avvengono. L'interazione petrolio/suolo è un processo estremamente complesso che coinvolge molti fattori fisici, chimici e biologici (Lai *et al.*, 2009). Lo studio delle complesse interazioni tra la matrice suolo, inquinante e microrganismi fornisce un valido metodo per cercare di comprendere al meglio il processo che regola la biodisponibilità. Queste interazioni dipendono dalla tipologia e dallo stato chimico-fisico del suolo, dell'inquinante e dal tipo di microrganismo e da fattori ambientali come la temperatura e le precipitazioni. Gli idrocarburi del petrolio possono presentarsi in diverse forme fisiche nel suolo: possono essere sciolti in acqua interstiziale, adsorbiti dalle particelle del terreno o essere presenti come fase separata

(liquida o solida). La persistenza degli inquinanti organici nel terreno è dovuta alla idrofobicità, determinata dalla solubilità e dal coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua (K_{ow}), caratteristico di ciascuna sostanza: gli idrocarburi del petrolio a medio e alto peso molecolare, sono altamente idrofobici, poco solubili e vengono adsorbiti nella matrice solida, riducendo così la mobilità e quindi la biodisponibilità alle comunità microbiche. Per quanto riguarda le interazioni tra suolo e contaminanti, una matrice che presenta un'elevata quantità di materiale organico (principalmente sostanze umiche), ha come caratteristica un'alta capacità adsorbente, soprattutto per i composti idrofobici, i quali vengono rilasciati con più difficoltà (per esempio idrocarburi policiclici aromatici e altri contaminanti non polari vengono adsorbiti prevalentemente dalla sostanza organica piuttosto che dai minerali argillosi). In conclusione, la biodisponibilità di un inquinante dipende principalmente dal tasso di diffusione, ovvero dal trasporto dell'inquinante dalla matrice solida alla fase acquosa, costituendo la chiave che regola il processo della biodisponibilità del contaminante. Se la molecola tossica è saldamente adesa al suolo possono essere utilizzati degli emulsionanti, generalmente di sintesi, per favorirne il distacco. Tali emulsionanti possono di contro avere anche una forte azione antibatterica. Per tali motivazioni, si prediligono emulsionanti di origine naturale come i biosurfattanti, che in presenza di idrocarburi petroliferi aderiscono alle goccioline lipidiche favorendone la persistenza in emulsione. In tale contesto si inserisce questo studio di ricerca, finalizzato alla selezione di emulsionanti naturali, utilizzabili nel *soil washing* di sabbie contaminate da prodotti petroliferi. Tali sostanze naturali favoriscono la biodisponibilità del contaminante in fase acquosa, finalizzata alla successiva degradazione biologica, senza impattare sulla riuscita del processo di decontaminazione o sull'ambiente, trattandosi di sostanze biodegradabili non tossiche.

4.4 Soil washing

Il lavaggio del suolo (*soil flushing* o *soil washing*), è un trattamento per la bonifica di terreni contaminati, allo scopo di recuperare parte pregiata del mezzo. Tale processo di separazione chimico-fisico, utilizza liquidi, solitamente soluzioni acquose, per rimuovere gli inquinanti dal suolo (Mao *et al.*, 2015). Spesso viene impiegato come processo di pre-trattamento per la riduzione del volume di suolo contaminato da destinare ad altri processi di bonifica (USEPA, 2007). In linea generale il suolo contaminato viene scavato, stoccato e pretrattato per selezionare la frazione più fine (più inquinata) da quella grossolana come ghiaia e sabbia (solitamente non contaminata). La frazione fine viene lavata con soluzioni

soluzioni acquose, che costituiscono il refluo in sono trasferiti gli inquinanti originariamente presenti nel suolo. Il refluo viene trattato con diversi processi (coagulazione, flocculazione, sedimentazione, filtrazione), con formazione di un chiarificato, spesso ricircolato, e di un fango da smaltire. La tecnica di *soil washing* si può applicare in combinazione ad altre tecnologie oppure in singolo, nel caso di matrici sabbiose o limo-sabbiose, con basso contenuto di particelle fini (fino a circa 50%), e bassi valori di porosità che conferiscono bassa capacità adsorbente. Nei casi di suoli con un'elevata percentuale di argilla (> 25% p/p) o di frazioni con particelle di dimensioni superiori ai 63 µm significativamente contaminate, difficilmente vengono risanati senza la combinazione con altre tecnologie (USEPA, 2007). Il trattamento risulta idoneo per un largo spettro di contaminanti: idrocarburi del petrolio e residui di combustibili, metalli pesanti, cianuri e contaminanti organici inclusi quelli più fortemente adsorbiti (*IPA*, *PCB*, pesticidi), senza limiti di concentrazione. Poichè i contaminanti aderiscono alla superficie delle particelle del suolo e spesso hanno bassa solubilità in acqua, solitamente si utilizzano soluzioni acquose additivate con acidi, tensioattivi, surfattanti o agenti chelanti per desorbire dalla matrice del suolo una parte del contaminante, al fine di trasferirlo in soluzione o in sospensione. Il processo si basa su due meccanismi principali (Riganti *et al*, 2007) :

- dissoluzione dei contaminanti nell'agente estraente
- concentrazione e dispersione dei contaminanti nel liquido di estrazione sotto forma di particelle sospese, per ulteriori trattamenti.

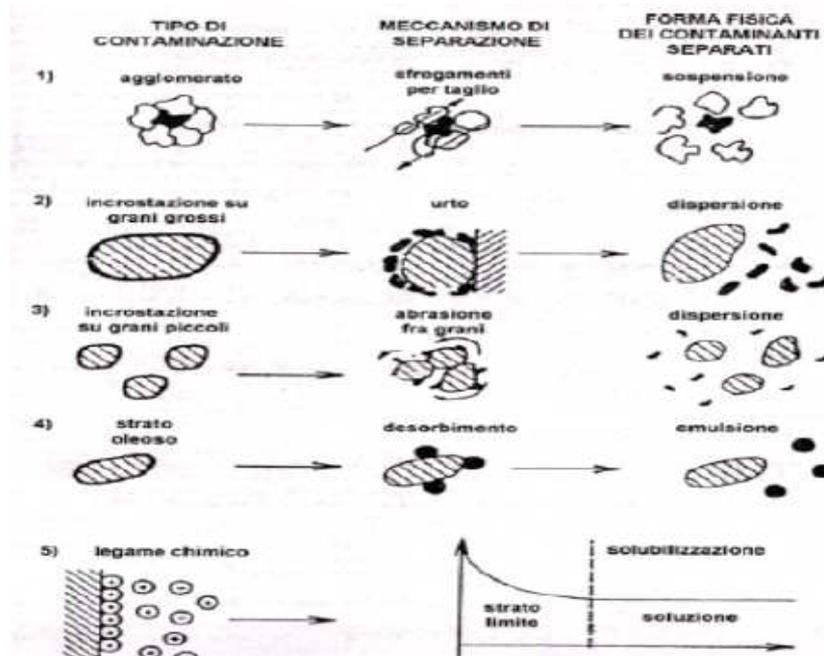


Fig 4.1 Meccanismi di separazione e forme di contaminazione (Riganti et al, 2007)

A seconda della forma di contaminazione diversi sono i meccanismi di rimozione dell'inquinante: azione meccanica (urti, miscelazione e attrito fra le particelle) quando il contaminante è in forma agglomerata o adesa sulla superficie delle particelle grossolane; azione chimica, tramite fluido estraente, quando il contaminante è adeso come strato oleoso sulla superficie dei granuli o adsorbito nei granuli.

Descrizione della tecnologia

Viene illustrato schematicamente il processo generale di un soil washing *ex-situ* con utilizzo di soluzioni acquose contenenti surfattanti.

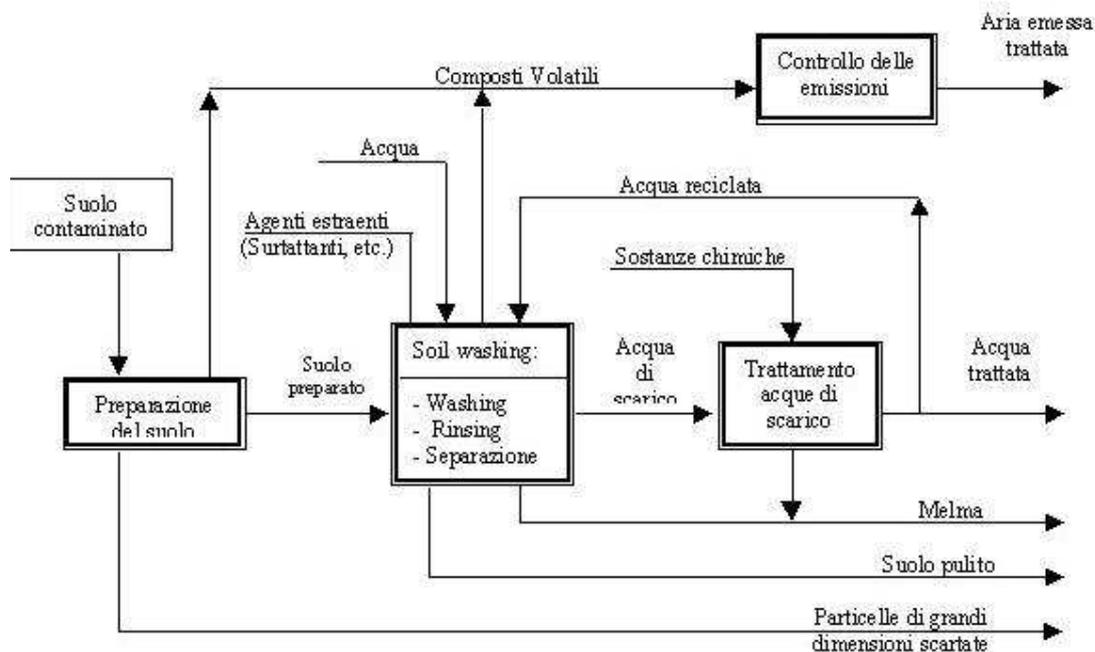


Fig. 4.2 Schematizzazione di un processo di *soil washing* con agenti surfattanti

Il *soil washing* consiste principalmente in cinque distinte unità di processo:

- 1) pretrattamento del terreno contaminato
- 2) lavaggio ed estrazione dei contaminanti: il terreno pretrattato viene miscelato con l'agente estraente in modo da favorire il trasferimento degli inquinanti dalla fase solida a quella liquida
- 3) separazione delle due fasi soluzione estraente - terreno
- 4) post - trattamento del suolo separato
- 5) trattamento delle acque di processo e recupero dell'agente estraente con sua reimmissione nel ciclo di estrazione.

1) Il pre - trattamento consiste nello scavo e trasporto dei suoli contaminati o sedimenti; separazione fisica delle differenti frazioni granulometriche con griglie o vagli vibranti o

rotanti a secco (con passo compreso tra 0.25-250 mm), idrocycloni, celle di attrizione, spirali gravimetriche e separatori magnetici (per la separazione dei materiali ferromagnetici) al fine di rimuovere i materiali grossolani di dimensioni molto elevate (>150 mm). Il materiale grossolano derivante da questa prima vagliatura risulta solitamente non contaminato e può essere ricollocato nel sito (USEPA, 2007).

2) Il lavaggio e l'estrazione dei contaminanti avviene tramite la miscelazione, in condizioni di turbolenza spinte, del suolo con la soluzione estraente, allo scopo di separare o concentrare i contaminanti, senza distruggerli. Affinché i metodi di lavaggio siano applicabili risulta necessario che la contaminazione sia associata a particelle di terreno le cui dimensioni si trovino in un intervallo sufficientemente ristretto, in quanto nella maggior parte dei casi, le sostanze contaminanti si legano a materiali a granulometria più fine (in cui sono solitamente concentrate il 90% delle sostanze inquinanti) e ricche di sostanza organica. La capacità di separare i contaminanti dipende da diversi fattori come le proprietà delle sostanze inquinanti (solubilità in acqua, polarità, volatilità), le caratteristiche del terreno contaminato (pH, sostanza organica, capacità di scambio cationica, dimensioni delle particelle), le caratteristiche del mezzo di lavaggio e il tempo di contatto. I maggiori risultati si raggiungono nel caso di suoli con contaminazione recenti, poiché l'adesione e il compattamento, che legano le particelle inquinanti agli altri costituenti del terreno, aumentano nel corso del tempo.

L'estrazione degli inquinanti avviene attraverso meccanismi di tipo meccanico e/o sistemi ad acqua calda in pressione che consentono la disgregazione degli aggregati di suolo e la liberazione in soluzione del particolato fino di inquinante adeso alle superfici più grossolane. I meccanismi di tipo fisico-chimico (desorbimento, dissoluzione), causano il distacco del contaminante dalle particelle di suolo tramite l'alterazione delle forze locali di adsorbimento (cambiamento delle forze superficiali mediante tensioattivi, variazione del pH del sistema acqua-terreno). Per il lavaggio del terreno sono solitamente impiegate macchine a tamburo rotante, in cui l'energia viene fornita per trasporto e caduta libera del materiale a seguito della rotazione del tamburo (USEPA, 2007).

Il lavaggio viene effettuato con diversi fluidi estraenti, in funzione della tipologia di inquinante (USEPA, 1998):

- acqua, fredda o calda, per contaminanti facilmente solubili;
- acqua con tensioattivi, per contaminazioni da idrocarburi (quali Triton X-100);
- soluzioni acide (es. HCl, H₂SO₄ ed HNO₃), per contaminazioni da metalli pesanti;

- soluzioni alcaline (es. NaOH, Na₂CO₃), per terreni contaminati da cianuri;
- solventi organici (esano, acetone, etilacetato, etanolo, alcool isopropilico), per la rimozione di composti poco solubili in acqua (ad esempio idrocarburi, IPA);
- agenti complessanti (acido citrico, acetato di ammonio, NTA ed EDTA-acido etilendiamminotetracetico), per contaminazioni da metalli pesanti.

3) La separazione delle fasi liquido estraente - terreno consiste nel separare le particelle di terreno con diametro superiore a 0.03-0.06 mm, dall'agente estraente. La frazione di materiale grossolano (solitamente un 90% in peso del terreno trattato), generalmente risulta pulita, mentre i contaminanti disciolti e dispersi nell'acqua, vengono inviati alla fase di trattamento del refluo. La separazione delle fasi avviene tramite classificazione a umido del terreno. Tra i sistemi più utilizzati vi sono: vagli a tamburo rotante, per separare le frazioni ghiaiose; coclee classificatrici per separare le sabbie medio-grosse; idrocycloni, per separare sabbia fine da limi e argille; flottatori, per separare materiale molto fine e leggero (USEPA, 1998).

4) Il post-trattamento del suolo comprende le correnti in uscita dallo stadio di separazione solido-liquido ovvero la frazione lavata e pulita (costituita per la maggior parte da ghiaia e sabbia), ed il fango contaminato con fase solida formata prevalentemente da frazione fine del terreno a cui si sono adsorbiti gli inquinanti e da particelle disperse separate meccanicamente dal suolo durante il lavaggio, e con fase liquida costituita dalla soluzione estraente insieme a parte dei contaminanti in emulsione e/o disciolti. Il trattamento delle acque risulta indispensabile per contenere i consumi e per evitare lo scarico di acqua contaminata. Il liquido di lavaggio viene depurato, recuperato e/o ricircolato (Riganti *et al.*, 2007). Il terreno depurato può essere sottoposto ad un ulteriore lavaggio con sola acqua o con agente estraente pulito. Generalmente il terreno viene disidratato per poi poter essere riutilizzato. La frazione fine presente nel fango viene avviata all'impianto di depurazione del liquido estraente.

5) Trattamento delle acque di processo: la depurazione del refluo può avvenire tramite vari processi. I più comuni sono: sedimentazione (in cui la separazione tra le particelle e il chiarificato viene accelerata con l'aggiunta di agenti flocculanti e il fango viene ispessito sul fondo), flottazione, per separare la frazione fine leggera contenente prevalentemente contaminanti idrofobici; filtropresse (in cui la torbida viene fatta passare su un filtro che trattiene la fase solida); estrazione con reagenti in reattori controcorrente o a miscelazione completa; trattamento biologico in reattore a fase *slurry*; inertizzazione dei fanghi;

trattamento termico. L'agente estraente così depurato viene riciclato nell'impianto per la decontaminazione di altro suolo (USEPA, 1998). Il recupero dell'additivo e la separazione/abbattimento dei contaminanti può essere effettuata con sistemi quali la basificazione, ultrafiltrazione, estrazione con solventi, strippaggio, adsorbimento su carboni attivi, trattamento fotochimico o biologico ecc., a seconda delle caratteristiche del contaminante (Mulligan *et al.*, 2001).

Potenzialità e applicabilità della tecnologia

I carburanti commercialmente utilizzati sono sostanze complesse (dal *crude-oil* ai più raffinati) la cui composizione può variare significativamente a seconda della provenienza geografica e al trattamento. Se mal gestiti, possono comportare rischi significativi per la salute e l'ecologia della terra durante produzione, trasformazione e consumo. La causa principale del danno ambientale è dovuto a sversamenti accidentali e intenzionali scarico di idrocarburi o rifiuti oleosi in acqua o sulla terraferma (CONCAWE, 1984). Le fuoriuscite o gli scarichi in sistemi di acqua spesso alla fine finiscono a terra. La soluzione ideale è prevenire fuoriuscite o scarichi ma questo non è sempre possibile. Così molte tecnologie di trattamento sono state sviluppate e testate per la bonifica di idrocarburi di petrolio relative al danno ambientale (Biowise 2000). Tra i metodi di Biowise (2000), *soil washing* è stata proposta come una tecnologia di bonifica innovativa, promettente e ampiamente studiata negli ultimi anni (Abdul *et al.* 1990; Deshpande *et al.* 1999; Bhandari *et al.* 2000). Soil washing decontamina il terreno non solo dal petrolio, ma anche dai metalli pesanti (Mulligan *et al.* 1999, 2001; Anderson *et al.* 1999). È più rapido rispetto al biorisanamento e la fitodepurazione, che sono dipendenti da fattori climatici. Il soil washing spesso comporta l'aggiunta di soluzioni acquose di surfattanti per il rilascio di sostanze contaminanti nella fase acquosa senza che queste vengano distrutte chimicamente (Mann 1999). I (bio)surfattanti sono sostanze costituite da una parte idrosolubile (idrofila) ed un'altra parte olio solubile (idrofobi). Essi hanno la tendenza di accumulare nell'interfaccia olio-suolo e olio-acqua dove agiscono come emulsionanti. Circa il 15% dei tensioattivi prodotti vengono utilizzati in applicazioni relative petrolio; facilitano il recupero del petrolio, e di de-emulsione (Kosaric *et al.* 1987). L'aggiunta del tensioattivo alla soluzione di lavaggio riduce la tensione interfacciale l'aria-acqua e interfaccia olio-acqua, riducendo così la forza capillare che trattiene l'olio al suolo, che viene quindi più facilmente mobilizzato e solubilizzato (Kosaric *et al.* 1987; Bai *et al.*, 1997; Cheah *et al.* 1998; Deshpande *et al.* 1999). Numerosi studi di laboratorio hanno dimostrato che le soluzioni acquose di (bio)surfattanti sono efficaci in terreni contaminati da idrocarburi del petrolio

(Bhandari *et al.* 2000;. Zhou *et al.* 2000; McCray *et al.* 2001; Mulligan *et al.* 2001). Deshpande *et al.* (1999) hanno valutato otto soluzioni di (bio)surfattanti nel lavaggio di terreni contaminati da idrocarburi, quindi, hanno proposto una Linee guida per la scelta di tensioattivi per il lavaggio del suolo. Abdul *et al.* (1990) ha studiato i processi di mobilitazione da un terreno sabbioso, utilizzando una selezione di soluzioni di (bio)surfattanti basandosi sulla loro proprietà biologiche fisiche, chimiche. Questi autori hanno osservato che la rimozione di olio dal suolo contaminato attraverso il processo soil washing dipende dalla natura fisico-chimica dei (bio)surfattanti e dei suoli contaminati. Generalmente, l'uso di (bio)surfattanti per decontaminare dal petrolio suoli/sabbie contaminate con tecniche di lavaggio, non è ancora completamente sfruttata. Harvey *et al.* (1990) ha esaminato l'efficienza di un biosurfattante prodotto da *Pseudomonas aeruginosa* per migliorare la rimozione di Exxon Valdez (oil spill nella ghiaia dell'Alaska) sotto varie condizioni di lavaggio quali temperatura, concentrazione di tensioattivo e tempo di lavaggio. I risultati dello studio hanno dimostrato risultati soddisfacenti. Sembra comunque che il tempo di contatto prolungato non aumenti significativamente la rimozione di olio utilizzando biosurfattante o acqua. Gatchett *et al.* (1995) hanno esaminato un metodo di lavaggio del suolo su scala commerciale (*BioGenesis*) trasferendo contaminanti del greggio ad una fase liquida utilizzando una soluzione tensioattivo. Le soluzioni hanno comportato miglioramenti nella biodegradazione degli olio. I tensioattivi naturali classificati come biosurfattanti mostrano eccellenti proprietà in merito, nonostante la loro ingombrante struttura molecolare in confronto ai tensioattivi sintetici. Biosurfattanti microbici hanno vantaggiose caratteristiche di biodegradabilità, in natura facilmente prodotti da risorse rinnovabili, con alta specificità e minore tossicità (Francy *et al.*, 1991;. Jain *et al.*, 1992; Van Dyke *et al.*, 1993). Essi mostrano migliore compatibilità ambientale e anche ad alta attività, a temperature estreme, pH, e condizioni di salinità. Così, ci si aspetta siano più efficace di quelli sintetici o che possano essere miscelati con altri tensioattivi per offrire le prestazionali desiderate. Grazie alla loro proprietà chimico-fisiche, i biosurfattanti sono più adatti per l'ambiente rispetto a quelli sintetici (Muller *et al.* 1993.; Lang *et al.* 1999; Pekdemir *et al.*, 1999). L'impiego di biosurfattanti potrà in futuro soppiantare l'uso dei tensioattivi, la cui presenza nelle acque danneggia l'ambiente a causa della loro elevata tossicità. La produzione dei biosurfattanti, le applicazioni commerciali nella rimozione di metallo dal suolo, e il potenziale di biodegradazione di idrocarburi sono state indagate (Kosaric *et al.* 1987; Banat, 1995; Bagnolo, 1999; Maier *et al.*, 2000). In generale, il *soil washing* risulta molto efficace per terreni sabbiosi, a causa del basso contenuto di

sostanze umiche e della dimensione delle particelle (Ceschia *et al.*, 2014), con contaminazioni recenti in quanto le fasi di adesione e compattazione che legano le frazioni più inquinate con le particelle del terreno, aumentano col tempo. Tra gli svantaggi vi sono la necessità di rimozione del terreno, l'impiego di ingenti volumi d'acqua per l'estrazione e il reintegro dell' acqua perduta col fango disidratato (5-10%) e il consumo d'acqua per spurgo delle acque di lavaggio. Per quanto riguarda i quantitativi d'acqua solitamente vengono impiegati rapporti da 2:1 a 10:1 rispetto al suolo. Studi passati in letteratura hanno dimostrato che suoli contaminanti con idrocarburi del petrolio possono essere effettivamente trattati mediante il *soil washing*: si sono ottenute efficienze di rimozione dal 90 al 98% per gli idrocarburi utilizzando il calore e aggiungendo surfattanti all'acqua di lavaggio (USEPA,1998). Soluzioni calde acquose di surfattanti, a causa della loro alta temperatura, aiutano a ridurre la viscosità del petrolio e aumentano la capacità di solubilizzazione dei surfattanti, sebbene alte temperature richiedano un aumento dei costi energetici (Ceschia *et al.*, 2014). Il *soil washing* con estraenti chimici presenta un costo di circa 50-100 €/t (in dipendenza del contenuto di materiali fini, del tipo e grado di contaminazione e dalla complessità del processo e di alcune miscele di lavaggio) (Riganti *et al.*, 2007).

Parametri di influenza del processo

Nel caso di inquinanti organici, soprattutto quelli idrofobi come gli idrocarburi del petrolio (alcani ad alto peso molecolare e IPA), la frazione fine può essere sottoposta a estrazione con soluzioni acquose contenenti tensioattivi, surfattanti, agenti mobilizzanti o co-solventi organici miscibili con acqua, che agiscono riducendo l'intensità delle interazioni tra contaminanti e fase solida, aumentando la solubilità apparente. Per l'applicazione di tale estrazione risulta necessario condurre test di laboratorio al fine di valutare le cinetiche di trasferimento degli inquinanti solidi alla soluzione di lavaggio, utilizzando differenti agenti estraenti; ciò consente di ottenere informazioni su quali tensioattivi siano più indicati e sui tempi caratteristici del processo di desorbimento. Le caratteristiche ideali dei reagenti utilizzati sono: elevata selettività nei confronti dei contaminanti da rimuovere; elevata capacità di saturazione, in quanto il solvente deve essere separato dal terreno, per poter essere recuperato; atossicità ed economicità. I fattori principali da considerare in questi tipi di processo (*soil washing*) per la selezione dei biosurfattanti sono i costi, la biodegradabilità, la bassa tossicità, basso adsorbimento al suolo, efficienze di rimozione a concentrazione minori del 3%, bassa dispersione nel suolo e bassa tensione superficiale

(Paria, 2008). I surfattanti devono essere recuperati e riutilizzati affinché il processo sia economicamente sostenibile.

Un altro parametro su cui è necessario indagare è il rapporto solido/liquido per poter individuare il rapporto ottimale. L'aumento del parametro acqua promuove quasi per certo la diffusione dei contaminanti desorbiti nella fase acquosa, accrescendo la rimozione del petrolio (Han *et al.*, 2009). Anche la *mixing rate* è un parametro di interesse nel *soil washing*: oltre a migliorare l'attrito tra le particelle del suolo e la forza di lavaggio della soluzione, comporta un aumento della diffusione dei contaminanti desorbiti e la loro interazione con le micelle del tensioattivo in soluzione, accelerando la solubilizzazione (Han *et al.*, 2009).

5. Agenti mobilizzanti/surfattanti biogeni e microbici

5.1 Agenti mobilizzanti biogeni

Gli agenti mobilizzanti biogeni sono prodotti naturali di origine animale o vegetale. Essi svolgono una buona azione solubilizzante o mobilizzante e hanno come vantaggio principale, il non persistere nell'ambiente, data la loro biodegradabilità. Oltre a non causare effetti tossici sulla biomassa, favoriscono la crescita dei microrganismi indigeni, fungendo da fonti di carbonio ed energia. Grazie al loro basso costo il loro utilizzo risulta essere molto promettente.

Nella presente sperimentazione sono state utilizzate le ciclodestrine, una classe di agenti biogeni costituita da molecole a base di glucosio, oligosaccaridi ciclici con superficie esterna idrofila ed una cavità centrale idrofoba, che conferisce loro una buona solubilità in acqua (145 - 450 g/l a seconda del tipo di ciclodestrina). Sono prodotte dalla degradazione enzimatica dell'amilosio, contenuto nell'amido, da parte dei batteri. Sono caratterizzate da una struttura molecolare a forma di anello tronco-conico, costituite da 6 (α -ciclodestrine), 7 (β -ciclodestrine), 8 (γ -ciclodestrine) unità di glucopiranosio, unite tra loro con legami α -(1,4). Grazie alla cavità a bassa polarità, possono accogliere dentro i propri anelli inquinanti non polari, legati in modo non covalente, formando complessi di inclusione, che sono più solubili rispetto alle singole molecole (Saenger, 1980). Questa proprietà conferisce alle ciclodestrine la capacità di aumentare la solubilità di una vasta gamma di inquinanti idrofobici organici, come gli idrocarburi policiclici aromatici (Von Lau *et al.*, 2014), agendo con un meccanismo di mobilizzazione dell'inquinante dalla fase solida a quella acquosa, esse infatti non formano micelle. Poiché favoriscono la solubilità dei contaminanti, le ciclodestrine risultano molto promettenti nei trattamenti di bonifica di suoli contaminati da idrocarburi (Leitgib *et al.*, 2008). Grazie alle loro dimensioni, relativamente piccole, le ciclodestrine (CD) sono in grado di circondare e rimuovere i contaminanti presenti all'interno di matrici porose, quali i suoli (Petitgirard *et al.*, 2009). Per questi motivi sono adoperate per aumentare la biodisponibilità di contaminanti idrofobici, promuovendone il desorbimento dalla matrice solida e mobilizzando i contaminanti in biofilm, dove viene aumentato il contatto tra questi e i microrganismi degradativi presenti in fase acquosa (Leitgib *et al.*, 2008). In base alle dimensioni, le α -ciclodestrine possono complessare molecole a basso peso molecolare o composti con catene alifatiche, le β -

ciclodestrine possono formare complessi con composti aromatici ed eterociclici e le γ -ciclodestrine possono formare complessi con diverse molecole, quali macrocicliche e steroidi. Le più diffuse, meno costose e solitamente le più utilizzate, sono le β -ciclodestrine e l'idrossipropil- β -ciclodestrina (HPB-CD), formata da 7 unità con 4-6 gruppi idrossipropilici, di solito in corrispondenza del C₆ delle molecole di glucosio.

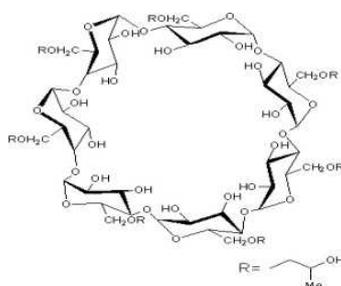


Fig. 5.1 Struttura chimica della idrossipropil- β -ciclodestrina (HPB-CD)

I costi delle ciclodestrine sono relativamente bassi, in quanto prodotte da substrati economici, con valori all'incirca di 3-5 €/kg per le β -ciclodestrine e di 10-12 €/kg per le HPB-CD. Le β -ciclodestrine sono atossiche nei confronti dei microrganismi, in quanto sono completamente metabolizzate e sono meno inclini a formare emulsioni, rispetto ai surfattanti, con un potere solubilizzante inferiore rispetto a questi (Von Lau *et al.*, 2014). Una miscela di CD metilate, denominata RAMEB (*randomly methylated- β -cyclodextrin*), prodotta industrialmente, ha mostrato notevoli proprietà “mobilizzanti” nei confronti di un’ampia gamma di molecole (Fava *et al.*, 2002; Leitgib *et al.*, 2007). In letteratura sono riportati diversi studi in merito alla capacità delle BCD e HPB-CD di desorbire dal suolo composti idrofobici, come gli *IPA* (idrocarburi policiclici aromatici) e i *PCB* (policlorobifenili), e nel biorisanamento di suoli contaminati da idrocarburi, quali oli minerali e *IPA*. Gómez *et al.* (2010) hanno dimostrato che una soluzione acquosa contenente l'1% di HPB-CD è capace di rimuovere il 70% di fenantrene nel *washing* di un suolo contaminato artificialmente con 5 g/kg di *IPA*, dopo sei giorni. Recentemente, Sánchez-Trujillo *et al.* (2013) hanno evidenziato come CD modificate chimicamente, comprendenti HPB-CD, RAMEB e HP- γ -CD, siano più efficienti nella rimozione degli *IPA* rispetto alle β -ciclodestrine naturali. La più alta percentuale di rimozione è stata ottenuta utilizzando le HPB-CD e le RAMEB, con percentuali superiori al 41% e 43% rispettivamente, in tre *washing* sequenziali. Inoltre, lo studio ha evidenziato come le rimozioni maggiori si siano verificate per molecole lipofile piccole, che grazie alla loro forma e dimensione riescono ad entrare agevolmente nelle cavità delle CD; mentre molecole troppo grandi (ad esempio composte da 6 anelli come in alcuni *IPA*) possono comunque portare alla formazione di

complessi, ma solo una parte di esse entra nella cavità idrofobica. Altri agenti mobilizzanti testati in questa sperimentazione sono stati i prodotti commerciali della BioBased; si tratta di prodotti detergenti commerciali, già testati per la pulizia di superfici, di origine vegetale, biodegradabili. Si riportano schematicamente le principali caratteristiche fisiche di ogni prodotto testato.

- SuperSolv Safety Solvent – color ambra, punto di ebollizione 136.6 °C, flash point 82.2 °C, liquido viscoso, solubilità in acqua 100%, pH 10.2-10;
- Aircraft Cleaner – color ambra molto chiaro, punto di ebollizione 100 °C, liquido con bassa viscoso, solubilità in acqua 99.9%, pH 8.2-8.8;
- SC1000 – color ambra molto chiaro, punto di ebollizione 100 °C, liquido lievemente viscoso, solubilità in acqua 99.9%, pH 10.2-10.5;
- OmniBrite Acid Cleaner – trasparente, punto di ebollizione 100 °C, liquido poco viscoso, solubilità in acqua 99.9%, pH 1.8-2;

5.2 I surfattanti

Altra modalità efficace e molto promettente per aumentare la biodisponibilità (o solubilità) degli idrocarburi del petrolio presenti nei suoli, consiste nell'utilizzo di tensioattivi o surfattanti, che agiscono per mezzo di due meccanismi principali:

- aumento della solubilità apparente dell'inquinante grazie alla presenza di micelle;
- trasporto facilitato dell'inquinante in soluzione tramite interazioni chimico-fisiche tra surfattante e inquinante.

Una delle prime ricerche nel campo dell'industria petrolifera riguardanti l'applicazione di surfattanti sintetici per bonificare suoli inquinati, sono state effettuate *dall'American Petroleum Institute* (1979). L'obiettivo delle sperimentazioni è stato di aumentare il recupero di petrolio dai pozzi petroliferi tramite un lavaggio con soluzioni di surfattanti, utilizzando l'azione dispersiva di tali tensioattivi.

I surfattanti (*SURFace ACTIVE AgeNTS*) agiscono diminuendo la tensione superficiale nell'interfaccia solido-liquido, svolgendo un'azione di trasporto delle molecole adsorbite, con conseguente aumento della biodisponibilità. Queste sostanze sono molecole o strutture sovramolecolari anfifiliche a lunga catena, composte da una testa polare idrofila e una coda apolare idrofoba, che permette loro di ridurre la tensione interfacciale tra una

fase idrofila e una idrofoba (ad esempio oleosa). In ambienti acquosi, quando la concentrazione della soluzione contenente il surfattante supera un determinato valore, i monomeri dei surfattanti creano una colonia regolare di molecole, denominate micelle. Questo valore di concentrazione prende il nome di "concentrazione micellare critica" (CMC) (Paria, 2008). Ciò si verifica grazie alla capacità di queste molecole di formare in fase acquosa degli aggregati sferici, detti micelle, nei quali la coda idrofoba delle molecole è rivolta verso l'interno della micella, legandosi al composto idrofobico, mentre la testa polare idrofila si orienta verso l'esterno a contatto con la fase acquosa, andando a formare la superficie della micella. Le molecole di solubilizzante circondano ed emulsionano i composti apolari, prelevandoli dalla matrice solida e stabilizzandoli in soluzione acquosa. La CMC corrisponde al punto in cui l'additivo mostra il più basso valore di tensione superficiale della soluzione (Mulligan *et al.*, 2001). Molte proprietà fisiche che caratterizzano i surfattanti dipendono dalla loro CMC, quali la formazione di emulsioni, la solubilizzazione dell'olio, le proprietà di produrre schiuma e di detergere, la tensione interfacciale e superficiale (Urum *et al.*, 2004). La CMC dei surfattanti dipende altamente da vari fattori quali temperatura, pressione, lunghezza della catena idrocarburica e presenza di altri elettroliti (Marchant *et al.*, 2012). Queste proprietà possono essere utilizzate per verificare l'idoneità dei surfattanti nel risanamento ambientale se, per esempio, utilizzate come additivi nella tecnica del *soil washing*. Soluzioni acquose di surfattanti possono essere impiegate per rilasciare composti, caratterizzati da bassa solubilità, dal suolo o da altre matrici.

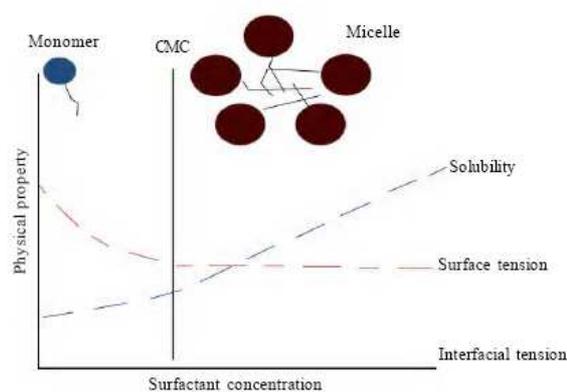


Fig. 5.2 Variazione schematica di alcune proprietà fisiche della soluzione di surfattante con la concentrazione del surfattante (Mulligan *et al.*, 2001).

L'applicazione dei surfattanti nel trattamento *ex-situ* di *soil washing* è stata studiata da vari autori (Desphande *et al.*, 1999; Mulligan *et al.*, 2005; Franzetti *et al.*, 2009; Mao *et al.*, 2015). Essi hanno dimostrato che il meccanismo di rimozione degli idrocarburi del petrolio dalla matrice solida avviene principalmente in tre passaggi: mobilizzazione,

solubilizzazione ed emulsificazione. Il meccanismo di mobilizzazione avviene al di sotto della *CMC* tramite una riduzione della tensione superficiale e interfacciale tra i sistemi suolo/acqua e aria/acqua, che causa un'ulteriore riduzione della forza capillare e dell'angolo di contatto che tiene uniti suolo e petrolio, favorendo la mobilizzazione di quest'ultimo (Urum *et al.*, 2004). Quando i surfattanti sono aggiunti al sistema acqua-suolo, una determinata quantità è inevitabilmente adsorbita dalle particelle solide. Più i surfattanti sono adsorbiti, minore risulta essere il loro contributo alla solubilizzazione dell'inquinante, rendendo meno efficace il trattamento di *washing*. Inoltre, all'aumentare dell'adsorbimento del surfattante nella matrice solida si verifica un aumento dell'idrofobicità del suolo. Ne consegue un riadsorbimento nella matrice solida del composto organico precedentemente solubilizzato dal surfattante (Paria, 2008). La capacità di adsorbimento del surfattante nel suolo dipende da diversi fattori, principalmente dalla struttura molecolare del surfattante, ma anche da alcune proprietà del suolo quali la frazione di carbonio organico. Ciò suggerisce che maggiore è il contenuto di carbonio organico nel suolo, maggiore è la dose di surfattante richiesta per la solubilizzazione del contaminante, in quanto una parte di questo è adsorbito nel suolo e non è disponibile in soluzione per la formazione di micelle. Ne consegue che nel sistema acqua-suolo-surfattante si osserva una *CMC* effettiva > *CMC* del sistema acqua-surfattante (Laha *et al.*, 2009).

Al di sopra della *CMC*, la solubilità del petrolio aumenta a causa della formazione di micelle; il processo di incorporazione di molecole idrofobe all'interno di micelle è noto come solubilizzazione "micellare". Il tasso di solubilizzazione dipende da vari fattori, come la struttura dei surfattanti, la geometria delle micelle, il bilancio idrofilico-lipofilico (*HLB*), la temperatura (Paria, 2008). Idealmente un surfattante deve possedere una bassa *CMC* ed essere efficace a basse concentrazioni, al fine di ridurre i costi per la rimozione del contaminante e, conseguentemente, di tutto il processo di bonifica (Mao *et al.*, 2015).

Il meccanismo di emulsificazione, ottenuto con biosurfattanti ad alto peso molecolare, porta alla formazione di un'emulsione contenente piccole goccioline di petrolio sospese in un fluido, generalmente acqua. Ciò permette la stabilizzazione della fase oleosa, aumentandone la superficie di contatto e favorendone la biodegradazione microbica (Pacwa-Plociniczak *et al.*, 2011). Inoltre i surfattanti che formano microemulsioni solubilizzano gli idrocarburi quando usati ad elevate concentrazioni e in presenza di cosolventi, mentre i surfattanti solubili in oli lavorano a basse concentrazioni e facilitano il recupero dell'acqua di lavaggio nel processo di *soil washing* (Mulligan *et al.*, 2001). In conclusione le micelle presenti nei surfattanti possono significativamente aumentare la

solubilità dei composti organici idrofobici ed incrementare il risanamento del suolo dai contaminanti, specialmente per quanto riguarda i surfattanti anionici e non-ionici (Kalali *et al.*, 2011).

5.2.1 Classificazione dei surfattanti

Gli agenti solubilizzanti possono essere classificati, a seconda della natura del loro gruppo idrofilo, in (Paria *et al.*, 2008; Volkering *et al.*, 1998) in:

- cationici: impiegati principalmente come battericidi, il cui gruppo idrofilo è composto principalmente da ammonio quaternario;
- anionici: impiegati soprattutto come detergenti, ad esempio i sali degli acidi grassi, la cui porzione idrofila è costituita soprattutto da gruppi carbossilati o solfati;
- non ionici: la loro caratteristica principale è di essere stabili sia in ambiente acido che alcalino, con i gruppi idrofili costituiti da zuccheri, polipeptidi o poliossietilene;
- zwitterionici: contengono sia gruppi cationici che anionici; fra questi vi sono vari prodotti di origine naturale, quali lecitine e caseina.

Affinché un tensioattivo svolga la sua funzione, deve esserci un appropriato equilibrio tra le sue parti idrofiliche e lipofiliche: un importante parametro che descrive l'attività di un tensioattivo verso la fase acquosa, è il bilancio idrofilico-lipofilico (*HLB - Hydrophilic Lipophilic Balance*), determinato dal rapporto tra le porzioni idrofile e quelle lipofile:

$$\frac{1 \text{ PM parte idrofila}}{5 \text{ PM totale}} * 100$$

Il valore di *HLB* aumenta con la sua idrofilità; un surfattante con *HLB* tra 1 e 8 promuove la formazione di emulsioni d'acqua in olio, mentre con *HLB* tra 12 e 20 si favorisce la formazione di emulsioni di olio in acqua. Valori di *HLB* compresi tra 8 e 12 possono dare luogo ad entrambe le emulsioni, ma generalmente sono favorite emulsioni di olio in acqua. (Fingas, 2011). Un'altra classificazione prevede la suddivisione dei surfattanti in due gruppi principali, in base alla loro origine:

- surfattanti sintetici: prodotti di sintesi, a partire da sottoprodotti delle raffinerie del petrolio, e dal gas naturale. I gruppi idrofobi più comuni sono paraffine, olefine, alchilbenzeni, alchilfenoli e alcoli mentre i gruppi idrofili sono generalmente gruppi solfato, solforato o carbossilato (surfattanti anionici), poliossietilene o polipeptide (surfattanti non-ionici), ammonio quaternario (surfattanti cationici). Sebbene abbiano il vantaggio di svolgere un'elevata azione solubilizzante, consentendo elevate rimozioni nel *washing* dei contaminanti, la maggior parte di questi prodotti risultano essere degli inquinanti tossici e

recalcitranti alla biodegradazione da parte della biomassa in grado di degradare gli idrocarburi (Whang *et al.*, 2008).

- biosurfattanti: prodotti naturali di origine vegetale o animale, quali prodotti extracellulari di microrganismi (batteri, funghi e lieviti).

Paragonati ai surfattanti sintetici, i biosurfattanti presentano numerosi vantaggi quali una bassa tossicità per la biomassa e un'alta biodegradabilità, favorendo la crescita dei microrganismi indigeni che li utilizzano come fonte di carbonio ed energia; migliore compatibilità ambientale; bassa irritazione; bassa CMC ed elevata attività superficiale ed infine, elevata attività a temperature, pH e condizioni saline estreme (Marchant *et al.*, 2012; Cameotra *et al.*, 2004). Per questi motivi i biosurfattanti sembrano essere i migliori candidati per la bioremediation dei contaminanti del suolo e per il trattamento del *washing*, poichè il loro utilizzo eliminerebbe la necessità di rimuovere i surfattanti dai reflui, essendo essi stessi biodegradabili (Lai *et al.*, 2009). La prospettiva di utilizzare i biosurfattanti nel *soil washing* di idrocarburi dipende dalla capacità di questi composti di aumentare il desorbimento e la dissoluzione dei contaminanti organici ed aumentare il tasso di trasporto dei contaminanti nel suolo (Franzetti *et al.*, 2010). Le proprietà di stabilizzare le emulsioni di olio in acqua e di aumentare la solubilità degli idrocarburi può favorire sia il tasso di biodegradazione che la percentuale di rimozione degli idrocarburi dal suolo. L'impiego di biosurfattanti per la rimozione dei contaminanti dai suoli è una tecnologia caratterizzata da un minore grado di incertezza rispetto alla *bioremediation* con biosurfattanti, in quanto l'efficienza di rimozione dipende solamente dalle proprietà chimico-fisiche dei biosurfattanti e non dai loro effetti sulle proprietà delle superficie delle cellule e sul metabolismo microbico (Pacwa-Plociniczak *et al.*, 2011).

5.2.2 Surfattanti sintetici

E' noto da numerosi autori che l'impiego di tensioattivi chimici risulta efficace nella rimozione di idrocarburi dalla terreni. Lee *at al.* (2005) hanno testato tensioattivi non ionici in grado di rimuovere più del 80% degli idrocarburi totali dal suolo. Billingsley *et al.* (1999) hanno osservato interessanti differenze tra gli effetti dovuti a tensioattivi non-ionici/anionici sulla rimozione e la biodisponibilità di PCB: i primi decontaminano il suolo dai PCB. Altri studi hanno comunque dimostrato che i contaminanti organici intrappolati nelle micelle di tensioattivi di sintesi, divengono meno disponibili ai microrganismi con conseguente inibizione della loro degradazione. Witconol SN70, un composto attivo non ionico, inibisce per esempio la mineralizzazione di esadecano e phenanthrene (Manning *et al.*, 1995) Dosi di quattro tensioattivi (Tween 20, sodio dodecil solfato, tetradecil trimetil bromuro di

ammonio, Citrikleen) a concentrazioni prossime alle *CMC*, inibiscono la mineralizzazione del fenantrene in un sistema di *soil washing*. In mezzi acquosi, la biodegradazione dei quattro *PCB* congeneri viene inibita da Igepal CO.630, un tensioattivo non ionico, a concentrazioni superiori alla *CMC* (Urum *et al.*, 2004) Sono stati osservati anche altri casi di inibizione della biodegradazione causata dall'aggiunta di tensioattivi; questo fatto si ritiene dovuto al fatto che i tensioattivi forniscono fonti di carbonio più facilmente degradabile rispetto al contaminante (Rosen *et al.*, 2002; Maier *et al.*, 2000))

Nella sperimentazione è stato utilizzato un solo surfattante di sintesi, come confronto. Il Triton X-100 (Numero CAS 9002-93-1) è un tensioattivo commerciale sintetico non ionico, riconducibile alla famiglia degli alchil-fenoli etossilati (isocetil-fenossi-polietossietanolo), la cui formula chimica è riportata in *fig. 5.3*.

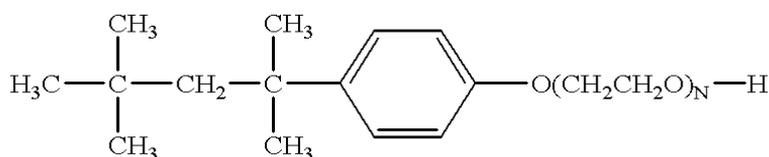


Fig.5.3: isocetil-fenossi-polietossietanolo (Triton X-100)

Questa categoria di surfattanti sintetici ha generalmente mostrato un'ottima capacità "solubilizzante" verso i contaminanti organici, soprattutto quando impiegati a concentrazioni superiori alla loro *CMC* (Rouse *et al.*, 1994; Von Lau *et al.*, 2014). La formazione di micelle è il processo favorito per questi surfattanti non ionici rispetto a quelli ionici: essi presentano basse *CMC* in generale, implicando una più alta concentrazione di micelle di surfattante e quindi un'aumentata capacità di solubilizzazione dei contaminanti organici dai suoli (Mao *et al.*, 2015). I tensioattivi non-ionici si adsorbono meno al terreno rispetto ai cationici e pertanto sono favoriti nei processi di *washing*, poiché richiedono dosaggi inferiori per l'estrazione degli inquinanti stessi (Paria, 2008). Inoltre, i tensioattivi non-ionici formano generalmente meno schiume, agevolando la gestione della soluzione estraente. Il Triton X-100 è stato testato con successo, nella bonifica di suoli contaminati da idrocarburi, ma spesso è risultato tossico sia nel terreno dopo il trattamento di lavaggio, sia nei reflui derivanti da tale processo; recalcitrante (in grado di produrre metaboliti tossici nella matrice ammendata), e quindi di inibire la crescita dei microrganismi, impedendo di conseguenza, la rimozione finale dei contaminanti da parte delle comunità microbiche presenti in fase acquosa (Berselli *et al.*, 2004, 2006; Mao *et al.*, 2015). Il Triton X-100 è caratterizzato da un numero medio di unità di ossido di etilene pari a 9 (gruppo

idrofilo), CMC tra 106-130 mg/L, HLB pari a 13.4 (Peng *et al.*, 2011). Ha un costo approssimativo di circa 70 €/L.

5.2.3 Surfattanti biogeni

Nella nostra sperimentazione sono stati utilizzati cinque surfattanti biogeni di origine vegetale ed animale. In particolare le lecitine di soia (SL) sono fosfolipidi costituiti da acido fosforico, colina, due acidi grassi (solitamente uno saturo e uno insaturo) e glicerolo. I fosfolipidi sono caratterizzati da una testa polare idrosolubile, in grado di sciogliersi facilmente in acqua, mentre i due acidi grassi saturi rappresentano le due code apolari. Esistono in natura diverse lecitine a seconda del tipo e della posizione degli acidi grassi e della posizione relativa del gruppo fosforico, le più diffuse risultano essere le α e β -fosfatidilcolina.

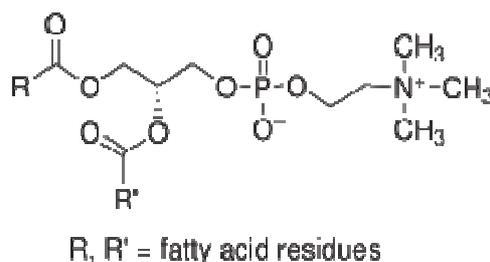


Fig 5.4 Struttura chimica delle lecitine di soia

Le lecitine sono molecole organiche presenti come componenti delle cellule animali e vegetali, prevalentemente concentrate nel tessuto nervoso e nei globuli rossi; inoltre sono presenti anche nei semi delle piante e nella maggior parte dei microrganismi. Sono igroscopiche e solubili in alcol, nei grassi, e nella maggior parte degli idrocarburi e per questa ragione sono impiegate come agenti emulsionanti. Industrialmente la lecitina viene estratta dagli oli vegetali, dal tuorlo d'uovo, dal grasso di pesce; la più semplice da reperire, per uso commerciale, è quella di soia, che si ottiene come sottoprodotto dell'estrazione dell'olio di semi di soia tramite estrazione con solventi (esano, acetone). Risulta vantaggioso ricavarle dalla soia, per la sua costante disponibilità, ottenendo lecitine di soia a costi mediamente bassi: 5-6 €/kg, impiegabili nel biotattamento di suoli, dove non sono richieste operazioni di purificazione del prodotto. Le molecole di lecitina di soia (SL) hanno una porzione idrofoba (rappresentata dalle due catene alchiliche) e una porzione idrofila (la colina e il gruppo fosforico), e si organizzano in strutture micellari, una volta solubilizzate in acqua. Formano emulsioni di olio in acqua o di acqua in olio a

seconda della lunghezza della catena idrocarburica, ad esempio catene lunghe portano a emulsioni di olio in acqua. La *CMC* delle SL è tipicamente di 400 mg/L (Urum *et al.*, 2004). Le SL utilizzate in questo studio, sono miscele di fosfolipidi che disperse in fase acquosa formano una sospensione colloidale stabile; sono caratterizzate da un HLB di 7 per il preparato disoleato di soia (*Solec F*) e di 4 per la lecitina di soia (*Textrol F-10*). Per quanto riguarda la loro applicazione nel risanamento di suoli contaminati da idrocarburi del petrolio, poche sono le applicazioni riscontrabili in letteratura. Le lecitine di soia sono state testate da Urum *et al.* (2004), nel *soil washing* di un suolo contaminato artificialmente da petrolio a 54.4 mg/kg; nello studio in esame le SL, impiegate alla concentrazione di 0.004%, hanno consentito rimozioni del 43% degli idrocarburi totali.

Altro surfattante testato è costituito dagli acidi biliari bovini (BB) come classe di agenti mobilizzanti biogeni di origine animale. La bile bovina è composta principalmente da acido colico (45-50%), acido deossicolico (20%) e chenodesossicolico (10-15%), con residui di taurina o glicina. Gli acidi biliari sono sintetizzati a partire dal colesterolo e si trovano nella bile in forma di sali idrosolubili di potassio e sodio, i sali biliari, coniugati agli amminoacidi glicina e taurina. I sali biliari coniugati, mediante idrolisi alcalina, portano alla formazione di acidi biliari liberi, che si comportano come composti tensioattivi, in grado di scindere le sostanze lipidiche nel tratto intestinale. Sono tensioattivi anionici, anfipatici, che possono formare soluzioni micellari e stabilizzare le emulsioni. Il valore della *CMC* dipende dalla porzione idrofila, dalla presenza di ioni Na^+ e K^+ e dalla coniugazione con glicina e taurina. In particolare, l'acido colico libero ha una *CMC* di 13 mM in acqua (in assenza di Na^+). In studi passati, è stato dimostrato che la bile bovina è in grado di aumentare la solubilità e quindi la biodisponibilità di vari composti idrofobici. Gli acidi biliari presentano inoltre il vantaggio di essere biodegradabili e non tossici.

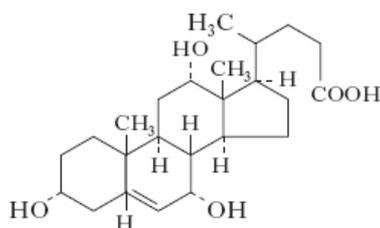


Fig. 5.5 Struttura chimica dell'acido Colico

5.2.4 I surfattanti di origine microbica (biosurfattanti)

I biosurfattanti di origine microbica possono essere classificati in quattro gruppi principali, sulla base della specie di microrganismo produttore e sulla base della loro struttura chimica (Bognolo *et al.*, 1999):

- lipopeptidi e lipoproteine
- glicolipidi
- fosfolipidi
- surfattanti polimerici

La parte idrofila più comune dei biosurfattanti è costituita da carboidrati, peptidi ciclici, amminoacidi, fosfati, acidi carbossilici o alcoli, mentre i gruppi idrofobici sono costituiti da lunghe catene di acidi grassi. La maggior parte dei biosurfattanti sono non-ionici o anionici, e non vi è in letteratura presenza di biosurfattanti con strutture cationiche ad eccezione di quelli contenenti gruppi amminici (Urum *et al.*, 2004).

Un'ulteriore classificazione distingue i biosurfattanti in base al loro peso molecolare (Liu *et al.*, 2010): quelli a basso peso molecolare (biosurfattanti) e polimeri ad alto peso molecolare (bioemulsionanti). Questi ultimi risultano meno efficaci nella riduzione della tensione interfacciale, ma sono in grado di stabilizzare l'emulsione di olio in acqua, rivestendo le goccioline di petrolio (Marchant *et al.*, 2012). Invece, i biosurfattanti a basso peso molecolare, dotati di bassa *CMC*, diminuiscono la tensione interfacciale tra olio ed acqua, aumentando la solubilità degli idrocarburi, tramite la loro aggregazione nelle cavità delle micelle. Essi sono prodotti extracellularmente o derivano da porzioni di membrana cellulare di batteri, lieviti e funghi. Essi possono derivare da vari tipi di substrato come zuccheri, oli, alcani (Mulligan *et al.*, 2009) o materie prime di scarto, attraverso fermentazione microbica (garantendo un ulteriore vantaggio rispetto all'utilizzo di surfattanti sintetici). Tra questi biosurfattanti, quelli che sono stati maggiormente isolati e studiati, sono i lipopeptidi prodotti da *Bacillus subtilis* e i glicolipidi, di cui i ramnolipidi prodotti da *Pseudomonas aeruginosa*, e i soforolipidi isolati da diverse specie di *Candida*. La *CMC* di questi biosurfattanti è compresa nell'intervallo 5-200 mg/l, a seconda dei componenti nella miscela (Pornsunthorntawee *et al.*, 2008). A seconda del grado di purezza del biosurfattante i campi di applicazione possono essere: la bonifica ambientale o i processi di recupero del petrolio per i biosurfattanti impuri, accessibili a minori costi, oppure il settore cosmetico o farmaceutico per quelli ad alto grado di purificazione. Risultati promettenti si sono ottenuti in seguito all'applicazione di tensioattivi microbici nel trattamento di suoli contaminati da petrolio. In dettaglio, uno dei fattori chiave risulta

essere la formazione di emulsioni, ovvero l'abbinamento di due liquidi immiscibili, quali olio e acqua. Quando uno dei due liquidi è disperso nell'altro, le piccole goccioline aumentano l'area della superficie interfacciale e di conseguenza una maggiore energia libera interfacciale del sistema. Grazie all'impiego di biosurfattanti, le emulsioni formatesi possono stabilizzarsi, riducendo così la tensione interfacciale. Le emulsioni dipendono dall'equilibrio tra le fasi del sistema olio/acqua/surfattanti (Urum *et al.*, 2004). Urum (2004) afferma che l'efficacia dei surfattanti nel lavaggio dei suoli è funzione della capacità di formare schiume stabili. Questo è stato studiato anche da Deshpande nel 1999: un'elevata capacità di formare schiuma è indice di una buona deterzione, ciò contribuisce a confermare l'efficacia dei surfattanti nel separare i composti oleosi dal suolo. Tuttavia, la formazione di grandi quantitativi di schiuma rende difficoltoso il trattamento della soluzione contenente surfattanti e potrebbe comportare difficoltà operative nel trattamento di *soil washing*.

I soforolipidi (SR), prodotti da alcune specie di lieviti non patogeni appartenenti alla *Candida sp*, sono biosurfattanti non-ionici glicolipidici, costituiti da molecole a basso peso molecolare contenenti un mono o disaccaride legato ad un acido grasso insaturo (Hirata *et al.*, 2009). Furono scoperti per la prima volta nel 1961 da Gorin e collaboratori. In figura 3.5 è riportata la configurazione dei soforolipidi come miscele di SL-latttonici e acidi di 17-L-idrossidecanoico.

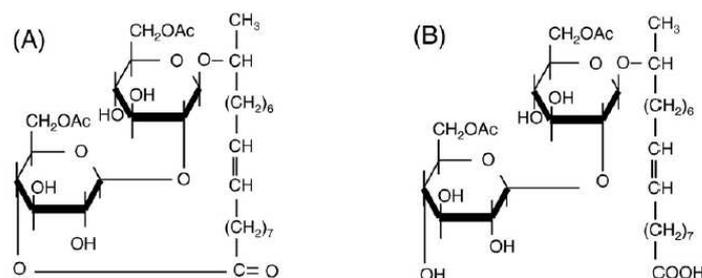


Fig. 5.6 A) SL-lattone: surfattante non-ionico; B) SL-acido: surfattante anionico (Hirata *et al.*, 2009)

Per le loro caratteristiche chimiche, essi generano micelle quando vengono utilizzati ad una concentrazione maggiore di 40-100 mg/L, che rappresenta la loro CMC, sono in grado di abbassare la tensione della superficie acquosa fino a 30 mN/m, e hanno un *HLB* compreso tra 10 e 13, che li rende efficaci come stabilizzanti di emulsioni di olio in acqua (Van Bogaert *et al.*, 2007). I soforolipidi sono classificati come surfattanti ad alto potere detergente, ed esibiscono una bassa citotossicità e alta biodegradabilità (Hirata *et al.*, 2009). Sebbene siano stati testati come agenti solubilizzanti nella bonifica di sabbie contaminate da bitumi (Cooper and Paddock, 1984), pochi studi sono riportati in letteratura che hanno testato la loro potenzialità in merito al risanamento di suoli contaminati da

idrocarburi. Gli alti rendimenti di produzione dei soforolipidi (tra 300 - 400 g/L) da parte dei lieviti *Candida bombicola*, fanno sì che siano dei biosurfattanti potenzialmente utili ed economici (Mulligan, 2004). Il prezzo di produzione è mediamente di 2-5 €/kg, a seconda del costo del substrato e della produzione di scala. Polman et al. (1994) hanno osservato che un preparato grezzo di biosurfattanti prodotti da *Candida bombicola* è in grado di solubilizzare parzialmente lignite proveniente dal North Dakota. Altri studi riportano che soforolipidi impuri sono stati testati per la rimozione di metalli pesanti da sedimenti e suoli contaminati (Mulligan *et al.*, 2001). Oberbremer *et al.* (1990) hanno aggiunto soforolipidi ad una sospensione di suolo al 10% e 1.35% di idrocarburi, osservando che il 90% degli idrocarburi veniva rimosso in 79 h rispetto all'81% in 114 h senza l'aggiunta di biosurfattante. L'efficacia dei soforolipidi nel lavaggio e nella biodegradazione degli idrocarburi presenti nel suolo è stata testata recentemente da Kang *et al.* (2010), dimostrando che il 30% di 2-metilnaftalene è stato effettivamente solubilizzato grazie all'aggiunta di 10 g/L di soforolipidi, con rimozioni migliori rispetto ai surfattanti sintetici non ionici eccetto per il surfattante sintetico Tween 80, il quale ha un elevato HLB che causa una migliore solubilità del 2-metilnaftalene. L'aggiunta di soforolipidi nel suolo ha aumentato la biodegradazione di 2-metilnaftalene (95% in 2 giorni), pristano (85%, 6 giorni) ed esadecano (97%, 6 giorni).

I ramnolipidi (RL), prodotti da alcune specie patogene di *Pseudomonas aeruginosa*, sono anch'essi glicolipidici. Diverse molecole vengono prodotte da questi batteri, dando origine principalmente a ramnolipidi contenenti catene alchiliche con un numero di atomi di carbonio compreso tra 8 e 12. Due sono le molecole maggiormente prodotte: i mono-ramnolipidi con due catene alchiliche C10 e i di-ramnolipidi con due catene alchiliche C10; la cui struttura viene rappresentata in figura 4.5 (Marchant *et al.*, 2012).

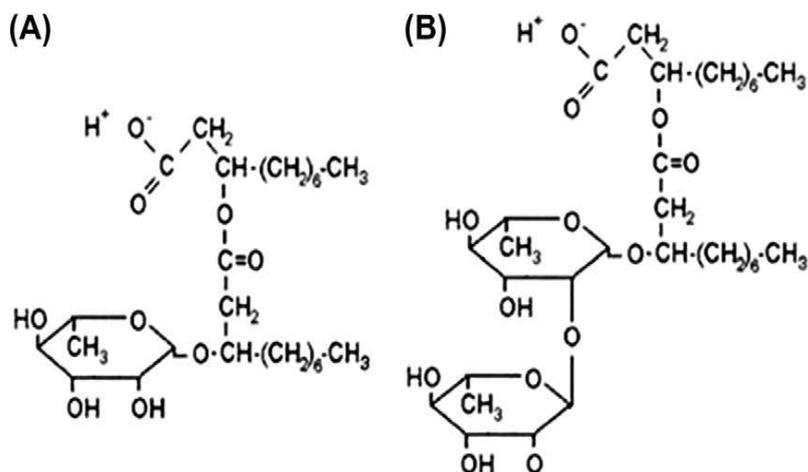


Fig. 5.7 Mono(A) e di-ramnolipidi (B) prodotti da *Pseudomonas aeruginosa* (Nguyen *et al.*, 2010)

Per le loro caratteristiche chimiche, essi generano micelle quando sono utilizzati ad una concentrazione maggiore di 10-230 mg/L, che rappresenta la loro CMC. Hanno *HLB* pari a 22-24, abbassano la tensione superficiale dell'acqua fino a 29 mN/m e hanno una massa molecolare compresa tra 504-660 Da (Nguyen *et al.*, 2010; Mulligan, 2009). In commercio esistono vari prodotti a base di ramnolipidi, che sono impiegati in diversi settori (petrolifero, industria alimentare, cosmesi) o per bonifiche di siti contaminati da sversamenti di composti petroliferi. L'alta biodegradabilità dei ramnolipidi li rende vantaggiosi rispetto ai corrispettivi tensioattivi sintetici, presentando inoltre un valore molto inferiore di CMC. Possono essere impiegati come emulsionanti e detergenti, poiché non alterano la natura degli idrocarburi recuperati, migliorando il trattamento di depurazione di tali composti. I ramnolipidi sono stati testati per la prima volta (1989) nella bonifica delle coste dell'Alaska a seguito dello sversamento della petroliera *Exxon Valdez*, consentendo rimozioni degli idrocarburi in quantità tre volte maggiori di quelle ottenute dall'acqua (Mulligan, 2004). Diversi studi hanno rivelato come i ramnolipidi siano efficaci nella rimozione di composti idrofobici dal terreno: ad esempio Scheibenbogen *et al.* (1994) hanno osservato una rimozione dal 23 al 59% di una miscela di idrocarburi da un suolo sabbioso, con diverso grado di rimozione dipendente dal tipo di idrocarburo e dalla concentrazione di biosurfattante; Urum *et al.* (2004) hanno testato l'abilità di vari biosurfattanti, tra cui ramnolipidi, di lavare un suolo contaminato da petrolio greggio, notando che in particolari condizioni ottimali, essi sono stati in grado di rimuovere il 79% del petrolio presente nel terreno. Lai *et al.* (2009) hanno testato i ramnolipidi per rimuovere gli idrocarburi totali del petrolio da un suolo realmente contaminato, proveniente da un sito in cui era collocata una raffineria del greggio. A confronto con i surfattanti sintetici Triton X-100 e Tween 80, questi biosurfattanti, impiegati allo 0.2% (w/v), hanno mostrato una percentuale di rimozione degli idrocarburi del 63% rispetto al 35% e 40% dei sintetici, su un suolo contaminato a 9 g/kg. Inoltre Lai *et al.* (2009) ha evidenziato come la solubilità del petrolio aumenti all'aumentare della concentrazione di soluzione contenente il biosurfattante. Un altro esempio più recente è dato da Reis *et al.* (2013), che hanno impiegato ramnolipidi purificati nella rimozione di idrocarburi del petrolio da una sabbia. Sono state ottimizzate le concentrazioni di petrolio e di biosurfattante, utilizzando un disegno degli esperimenti statistico che genera una superficie di risposta. La sabbia oleosa, contenente principalmente idrocarburi aromatici e paraffine (5-10% p/p), è stata miscelata con una soluzione di ramnolipidi a concentrazione tra 6.3-7.9 g/L, ottenendo una rimozione di petrolio fino al 91% per gli idrocarburi aromatici e del 78% per le paraffine. Inoltre, i

ramnolipidi, aggiunti sopra alla loro CMC, hanno permesso la biodegradazione dell'esadecano, delle n-paraffine e dell'ottadecano nel suolo, grazie a un miglioramento della solubilità in acqua.

Surfattine (SF) – La surfattina è un lipopeptide ciclico di origine microbica con potenti proprietà surfattanti. La crescente resistenza dei batteri contro i convenzionali antibiotici ha portato alla ricerca di nuovi tipi di antibiotici come quelli peptidici. Tra questi, surfattina è un surfattante lipopeptidico prodotto da *Bacillus subtilis* (Arima *et al.*, 1968) e si è osservato che è in grado di ridurre la tensione superficiale dell'acqua da 72 mN/m a 30 mN/m. Il peptide ha struttura circolare detta a "sella di cavallo" con due siti carichi positivamente che agiscono da *carrier*, in quanto potenziale sito di legame per cationi bivalenti (i due residui acidi, aspartato e glutammato, formano un "artiglio" che stabilizzano facilmente cationi bivalenti Bonmatin *et al.*, 1992).

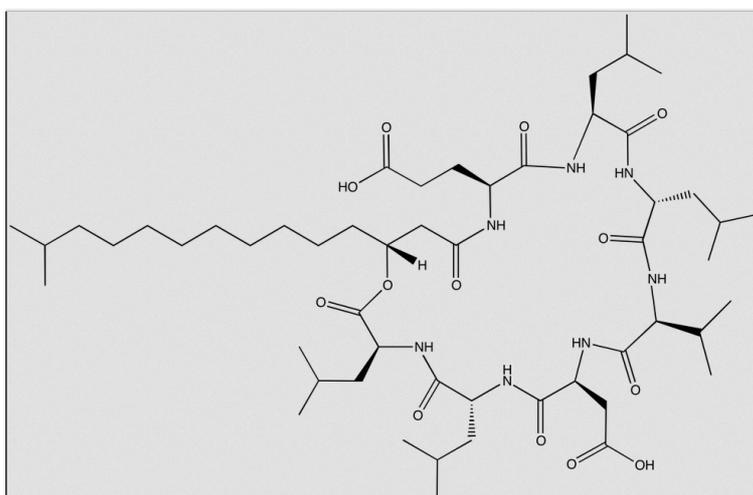


Fig. 5.8 Surfattina - surfattante lipopeptidico prodotto da *Bacillus subtilis* (Arima *et al.*, 1968)

Dal lato opposto dell'anello, la catena grassa può estendersi in una struttura micellare o in un doppio strato lipidico, interagendo con membrane cellulari. Surfattina forma micelle a bastoncino con un elevato numero di aggregazione. Una varietà di applicazioni importanti e attività fisiologiche sono state proposte per surfattina, che potrebbe svolgere un ruolo fisiologico aumentando la biodisponibilità di substrati insolubili in acqua e regolando il fissaggio/distacco di microrganismi da superfici (Rosenberg *et al.*, 1999). Surfattina ha proprietà antivirali (Vollenbroich *et al.*, 1997a.; Kracht *et al.*, 1999), antibatteriche (Vollenbroich *et al.*, 1997b), e antitumorale (Kameda *et al.*, 1974) e può essere utilizzato come antimicotico. Queste caratteristiche hanno attirato notevole interesse perché possono essere correlate all'affinità della parte lipidica della surfattina con le membrane

cellulari. L'applicazione di surfattina è anche come potente detergente, potenzialmente utilizzabile per finalità ambientali, ma richiederebbe lo sviluppo di metodi di produzione molto più conveniente (Rosenberg *et al.*, 1999).

6. Response Surface Methodology (RSM)

La *Response Surface Methodology* (RSM) consiste in tecniche matematiche e statistiche utilizzate per la realizzazione di modelli empirici. RSM consente di determinare l'effetto dei parametri sperimentali e di identificare le condizioni operative ottimali, applicabili a processi biotecnologici (Montgomery DC, 2005; khuri *et al.*, 2010; Mayers *et al.*, 2002; Robinson *et al.*, 2006).

Questo metodo, descritto per la prima volta da Box e Wilson nel 1951, permette di individuare, sulla base degli effetti generati da due o più parametri, il responso ottimale di un processo. In generale, RSM esplora le relazioni tra alcune variabili sperimentali (variabili indipendenti, *input*) ed una o più variabile di risposta (variabili dipendenti, *output*), attraverso una determinata relazione matematica (polinomi lineari: quadratici, cubici ecc..). Box e Wilson suggerirono di usare un modello polinomiale di secondo grado, qualora possibile. Pur riconoscendo che questo metodo è una approssimazione, esso è molto utilizzato, in quanto un processo biotecnologico così descritto, è facile da stimare ed applicare, anche quando la natura del processo stesso risulti non del tutto nota e/o complessa.

Un modo per stimare l'andamento complessivo di un processo consiste nell'utilizzo di un disegno sperimentale fattoriale o, in alternativa, di un disegno fattoriale parziale. Ciò è sufficiente per determinare quali variabili, e con quale significatività, risultino avere impatto sulla variabile di risposta di interesse.

In statistica, un esperimento fattoriale completo è un esperimento il cui *design* è costituito da due o più fattori (variabili di interesse), ciascuno dei quali assume valori discreti o "livelli"; i fattori sono fra loro combinati in tutti i possibili modi. Un *design* fattoriale completo può anche essere chiamato *fully crossed design*. Tale esperimento permette di valutare l'effetto di ciascuna variabile di interesse e delle interazioni fra queste, diversamente combinate, sulla risposta/e del processo.

Se il numero di combinazioni in *fully crossed design* risulta troppo alto per essere praticamente sperimentabile, viene applicato un *design* fattoriale parziale, in cui alcune delle possibili combinazioni fra i fattori vengono trascurate, riducendo così il numero di prove necessarie per ottenere il modello. RSM suggerisce diversi disegni sperimentali, con caratteristiche specifiche, che possano meglio rispondere alle esigenze sperimentali.

Condizione alla base per poter applicare *RSM* è possedere a monte un buon livello conoscitivo del processo, al fine di individuare le variabili sperimentali descrittive del fenomeno studiato, quindi misurabili e con effetto correlato alla risposta/e del processo.

L'ottimizzazione del processo produttivo implica, oltre alla corretta scelta dei fattori sperimentali, l'individuazione dei livelli che tali fattori devono assumere nella sperimentazione (dominio sperimentale prescelto). Il dominio sperimentale corrisponde al *range* operativo entro cui si ritiene utile studiare ed ottimizzare il fenomeno stesso, per migliorarne le future applicazioni.

Nel caso in studio, *soil washing* applicato alla rimozione di idrocarburi totali da sabbie contaminate, è stato possibile delineare il dominio sperimentale, sulla base di sperimentazioni precedenti e di applicazioni note in letteratura. Le variabili ritenute correlabili alla risposta del *washing* (percentuale di rimozione dell'inquinante dalle sabbie), valutate nel nostro disegno sperimentale sono: le concentrazioni iniziali di IFO180 presente nelle sabbie e di agente mobilizzante/surfattante disciolto in acqua deionizzata; la velocità di *mixing* del reattore e il quantitativo di acqua utilizzato per il *washing* in rapporto alla quantità di sabbia utilizzata in ogni sperimentazione. La risposta misurabile del processo è la percentuale di rimozione del contaminante dalle sabbie, rispetto al valore inizialmente misurato del parametro idrocarburi totali nelle sabbie prima del *soil washing*. Le altre variabili, sono state considerate costanti durante l'esperimento (temperatura, pH della soluzione acquosa, forza ionica della soluzione ecc..), quindi non determinanti sulla variazione di risposta del processo di *soil washing*.

L'applicazione di *RSM* al presente caso studio, è stata supportata dal *software* statistico Design-Expert (versione DX9) di Stat-Ease®, impiegato per realizzare il disegno sperimentale, analizzare i dati sperimentali ed ottimizzare il processo.

In dettaglio si descrivono a seguire i singoli passaggi del metodo: individuazione del disegno e del dominio sperimentale; validazione del disegno sperimentale; procedura di elaborazione: trasformazione dei dati, *fitting*, scelta del modello, *ANOVA*, diagnostica dei risultati, sezione grafica; ottimizzazione del processo e post analisi.

6.1 Disegno e dominio sperimentale

Un processo che si intende analizzare utilizzando come supporto l'approccio *RSM*, richiede la definizione del dominio sperimentale, ovvero lo spazio entro il quale si ritiene

utile studiare ed ottimizzare il processo stesso, per migliorarne le future applicazioni. Tale dominio è definito dai fattori che per esperienza e conoscenza pregressa, descrivono al meglio il processo (controllabili e misurabili); dai livelli di interesse che tali fattori possono assumere e dal tipo di risposta/e sperimentale (misurabile) (Anderson *et al.*).

Con il termine piano fattoriale ci si riferisce ad esperimenti completi o replicazioni degli stessi, in cui sono provate tutte le possibili combinazioni di fattori e livelli. Per esempio, se ci sono a livelli del fattore A e b livelli del fattore B, ogni replicazione contiene tutte le $a \times b$ combinazioni dei trattamenti, dove con il termine replicazione si intende la ripetizione dell'esperimento di base, cioè in questo caso del piano.

Eeguire gli esperimenti in modo completo, è spesso una strategia non praticabile, per cui si sceglie un *DoE* (*design of experiment*) che permetta di razionalizzare la descrizione del processo, minimizzando il numero di prove necessarie alla comprensione dello stesso, permettendo al contempo di individuare le eventuali interazioni esistenti tra fattori analizzati e la risposta sperimentale.

I *DoE* possono essere di tipo *factorial*, completi o frazionati, in cui ogni fattore è regolato su due livelli, oppure di tipo *response surface*, in cui ogni fattore può assumere più livelli. Fra questi ultimi, sono generalmente utilizzati i seguenti disegni sperimentali:

Box-Behnken (BBD) – i punti del disegno sperimentale assumono specifiche posizioni, si tratta di un modello quadratico. Ogni fattore assume 3 livelli ($0; \pm 1$) e lo spazio del modello coincide con l'intervallo operativo. Genera una buona previsione del fenomeno in prossimità del punto centrale del disegno sperimentale, mentre la previsione risulta debole ai vertici del cubo, dove non ci sono punti del disegno sperimentali. Il modello risulta infine critico e di bassa accuratezza se vi sono *run* mancanti o soggette ad errore in modo significativo.

D-optimal – i punti del modello non hanno specifiche posizioni, ma vengono definiti in funzione del numero di fattori scelti, al fine di minimizzazione il numero delle prove e dell'errore dei coefficienti del modello. Viene utilizzato per creare disegni adatti a modelli lineari, quadratici, cubici o di grado più elevato. C'è la possibilità di definire dei vincoli nel dominio sperimentale (per esempio escludere un area del modello dove non si può ottenere la risposta sperimentale). Rispetto al modello *BBD*, vengono previste più prove, ne segue che il modello risulta meno sensibile a *run* mancanti o soggette ad errore sperimentale in modo significativo.

Central Composite Design (CCD) - Il CCD è un disegno molto efficiente per descrivere modelli del secondo ordine e consiste in tre tipologie di punti sperimentali:

- fattoriali, ai vertici del disegno
- assiali (detti *star points*)
- centrali

Occorre specificare due parametri del disegno sperimentale: la distanza α delle prove assiali, e il numero di repliche nei punti centrali. La scelta di α nel CCD è dettata principalmente dalla regione d'interesse. Se α è uguale a 1, i punti assiali vengono disposti in posizione intermedia tra i valori fattoriali al vertice del disegno (praticamente corrispondono al punto centrale delle facce di un cubo; al centro si hanno i punti centrali e ai vertici i punti fattoriali). Per i punti centrali si hanno solitamente n repliche in modo da avere una buona stima dell'errore sperimentale e rendere il modello più robusto nella zona centrale (considerata quella di maggiore interesse operativo).

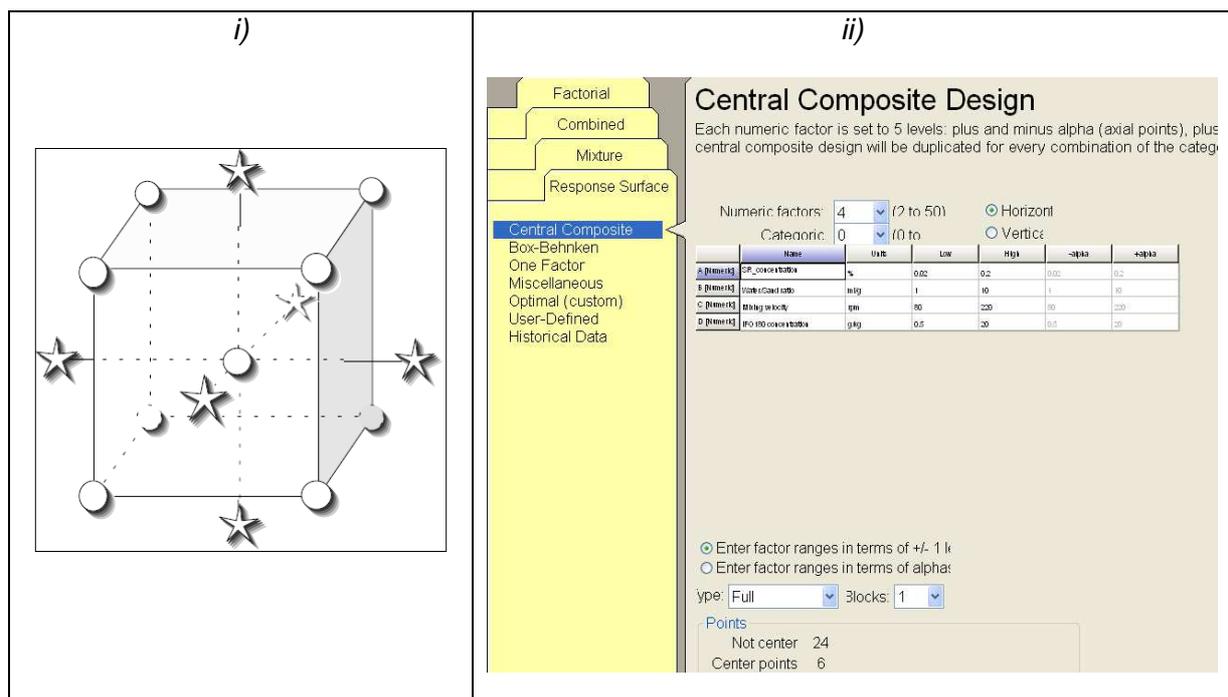


Fig. 6.1 i) Central Composite Design per 3 fattori ii) inserimento CCD con 4 fattori, α pari a 1

E' inoltre possibile aggiungere ulteriori repliche delle *run* sperimentali. Rispetto al modello *BBD* e *D-optimal*, vengono previste più prove, ne segue che il modello risulta meno sensibile a *run* mancanti o soggette ad errore in modo significativo. Per α uguale a 1 si ottiene un disegno che richiede 3 livelli per ciascun fattore ($0; \pm 1$ - CCD a facce centrate). Questo è il disegno sperimentale utilizzato nel nostro caso di studio, relativo a 4 fattori, con α uguale a 1 (fig. 6.1).

A seguire elenco delle *run* proposte dal disegno, quattro fattori - A, B, C, D - ed un fattore di risposta - Yield 24 (%) – (fig.6.2).

Std	Run	Factor 1 A:SR conc. g/100ml	Factor 2 B:Water/S... ml/g	Factor 3 C:Mixing rate rpm	Factor 4 D:FO180 c... g/g	Response 1 Yield 24 %
19	1	0.11	1	150	10.54	39.8
30	2	0.11	5.5	150	10.54	55.5
16	3	0.2	10	220	15.71	62.4
12	4	0.2	10	80	15.71	18.7
26	5	0.11	5.5	150	10.54	64.9
27	6	0.11	5.5	150	10.54	62.9
8	7	0.2	10	220	0.61	65.4
11	8	0.02	10	80	15.71	6.2
13	9	0.02	1	220	15.71	26.6
2	10	0.2	1	80	0.61	42.3
28	11	0.11	5.5	150	10.54	64.2
18	12	0.2	5.5	150	10.54	41.6
15	13	0.02	10	220	15.71	28.4
1	14	0.02	1	80	0.61	45.7
17	15	0.02	5.5	150	10.54	36.9
5	16	0.02	1	220	0.61	55.5
25	17	0.11	5.5	150	10.54	65.1
10	18	0.2	1	80	15.71	22.9
22	19	0.11	5.5	220	10.54	74.6
14	20	0.2	1	220	15.71	19
21	21	0.11	5.5	80	10.54	38.9
24	22	0.11	5.5	150	15.71	42.6
6	23	0.2	1	220	0.61	62.8
7	24	0.02	10	220	0.61	60.5
23	25	0.11	5.5	150	0.61	57.3
29	26	0.11	5.5	150	10.54	54.6
3	27	0.02	10	80	0.61	49.2
20	28	0.11	10	150	10.54	73.2

Fig. 6.2 Esempio di elenco delle *run*

Nella sessione *graph columns* del software è inoltre possibile visualizzare la distribuzione delle *run*, sia in termini di fattore/risposta (fig. 6.3a), sia fattore/fattore (fig. 6.3b). In questo modo si ottiene una prima valutazione grafica della distribuzione dei punti sperimentali nel dominio.

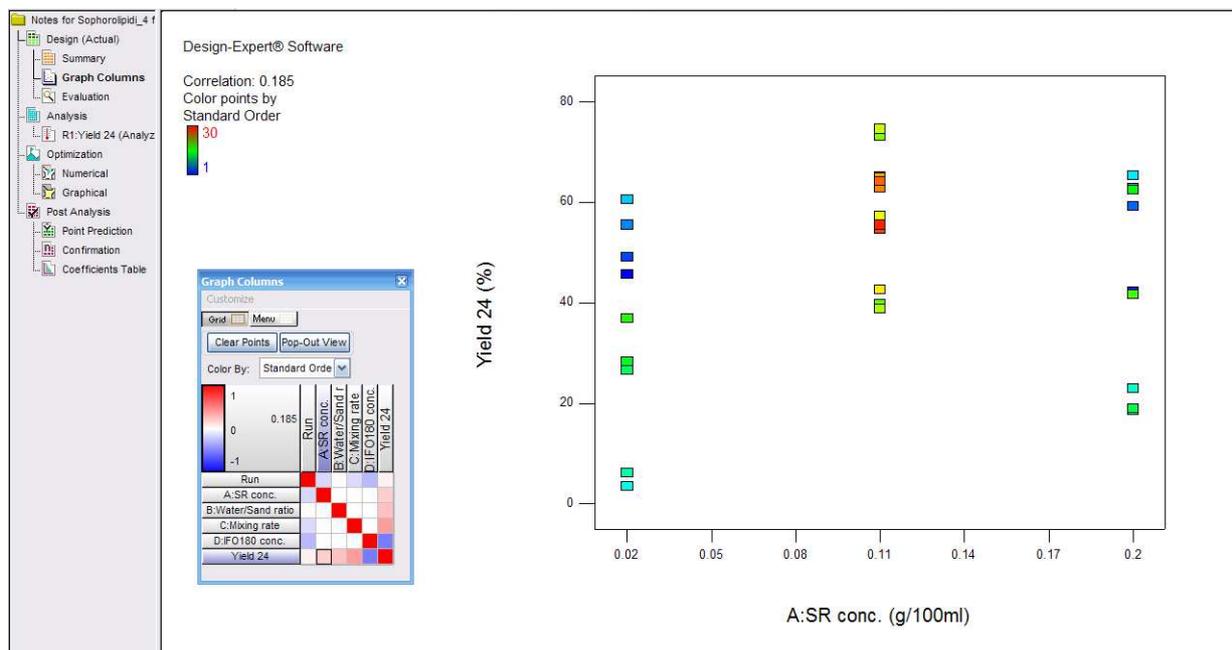


Fig. 6.3a Esempio di distribuzione delle *run*, in funzione di A/Yield 24 (%)

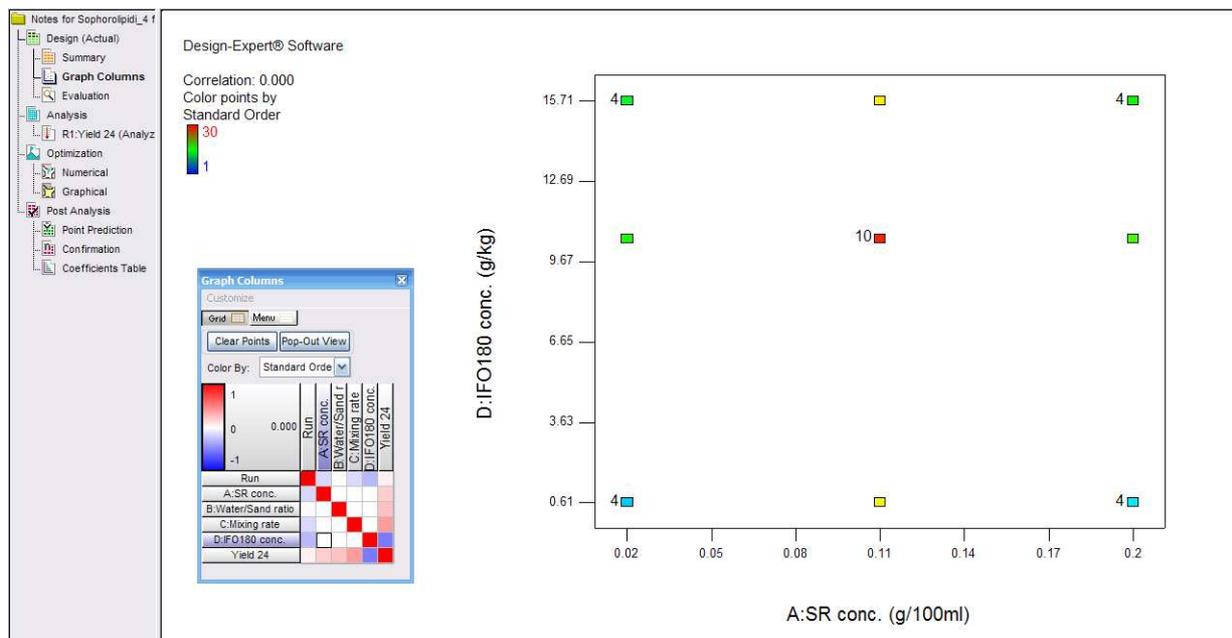


Fig. 6.3b Esempio di distribuzione delle run, in funzione di A/D

6.2 Valutazione del disegno sperimentale

Prima di procedere con l'analisi ANOVA (*ANalysis Of VAriance*), è necessario valutare il disegno sperimentale, cioè l'adeguatezza fra il modello polinomiale selezionato (es. quadratico) e la distribuzione dei dati sperimentali del disegno.

A tal fine nella sessione *Results* del software in uso vengono valutati i seguenti parametri:

DF (degree freedom) – esaminando la tabella dei gradi di libertà (*DF*), è necessario verificare che vi siano minimo 3 gradi di libertà per il parametro *Lack of Fit (LoF)* e minimo 4 gradi di libertà per il parametro *Pure error*. In generale al crescere dei *DF*, aumenta l'adeguatezza del modello.

Degrees of Freedom for Evaluation	
Model	9
Residuals	20
<i>Lack of Fit</i>	15
<i>Pure Error</i>	5
Corr Total	29

Tab 6.1 – DF per il modello quadratico

Power – rappresenta la capacità del disegno sperimentale di individuare quanto i termini specifici siano statisticamente significativi. Per piani fattoriali la *power* del disegno è definita come la probabilità di risolvere due termini (quindi di distinguerli), all'interno di uno stesso effetto principale¹, se la differenza fra questi cade entro ½, 1 o 2 deviazioni standard.

Term	StdErr	VIF	Ri-Squared	Power at 5 % alpha level to detect signal/noise ratios of		
				0.5 Std. Dev.	1 Std. Dev.	2 Std. Dev.
A	0.24	1.07	0.0611	16.5 %	49.9 %	97.4 %
B	0.24	1.00	0.0000	17.3 %	52.4 %	98.1 %
C	0.24	1.00	0.0000	17.3 %	52.4 %	98.1 %
D	0.56	3.54	0.7171	7.1 %	13.6 %	39.6 %
AB	0.25	1.00	0.0000	15.9 %	47.8 %	96.7 %
AD	0.32	1.07	0.0611	11.5 %	31.7 %	84.2 %
BC	0.25	1.00	0.0000	15.9 %	47.8 %	96.7 %
A^2	0.54	2.09	0.5216	14.3 %	42.3 %	94.2 %
D^2	1.01	5.05	0.8019	7.6 %	15.7 %	47.2 %

Tab 6.2 – Errore standard dei coefficienti, *VIF*, *Ri-squared*, *power*

VIF (variance inflation factor) – Misura quanto cresce la varianza dei coefficienti del modello selezionato a causa della mancanza di ortogonalità nella matrice di dispersione. Più specificatamente l'errore standard di un coefficiente del modello cresce proporzionalmente alla radice quadrata di *VIF*. Se un coefficiente è ortogonale ai rimanenti termini del modello, il suo *VIF* è unitario. *VIF* che eccedono il valore 10 indicano che i coefficienti di regressione associati sono valutati in modo non efficace a causa della multicollinearità. *VIF* è legati ad *R_i squared* :

$$VIF = 1 / (1 - R_i \text{ squared})$$

R_i squared – E' il coefficiente di correlazione multipla che indica quanto il coefficiente *i*-esimo è correlato agli altri. Tale termine dovrebbe essere prossimo a 0, per indicare una correlazione minima.

Leverage (h) – Il *leverage* è una misura standardizzata della distanza dell' *i*-esimo punto situato sulla superficie sperimentale, dal centro dello spazio occupato dal modello: un

¹ L'effetto principale di un fattore è definito come la variazione della risposta a seguito di un cambiamento del livello del fattore

valore elevato indica che l' *i-esima* osservazione è distante dal centro del modello. Un metodo per scegliere eventuali punti da replicare è quello di considerare i punti con il più elevato valore di *leverage*, dal momento che tale parametro corrisponde al peso che ogni punto sperimentale ha sulla risposta predetta. La superficie di risposta costruita dal modello, passerà quindi in prossimità dei punti aventi i maggiori valori di *leverage*.

Run	Leverage	Space Type
1	0.1470	Axial
2	0.0914	Axial
3	0.4639	Factorial
4	0.4639	Factorial
5	0.0914	Axial
6	0.0914	Axial
7	0.4726	Factorial
8	0.4639	Factorial
9	0.4639	Factorial
10	0.4726	Factorial
11	0.0914	Axial
12	0.3454	Axial
13	0.4639	Factorial
14	0.4726	Factorial
15	0.3454	Axial
16	0.4726	Factorial
17	0.0914	Axial
18	0.4639	Factorial
19	0.1470	Axial
20	0.4639	Factorial
21	0.1470	Axial
22	0.3405	Axial
23	0.4726	Factorial
24	0.4726	Factorial
25	0.3405	Axial
26	0.0914	Axial
27	0.4726	Factorial
28	0.1470	Axial
29	0.4726	Factorial
30	0.4639	Factorial
Average =	0.3333	

Tab 6.3 – Leverage delle run

Quando $h_i = 1$, il valore predetto sarà uguale al valore osservato, e la superficie di risposta passerà esattamente per quel punto sperimentale. Definito il *leverage* medio come il rapporto p (numero di termini di modello, compresa l'intercetta) ed N il numero di esperimenti; viene suggerito di ripetere i punti sperimentali aventi un *leverage* maggiore del doppio del *leverage* medio e/o prossimo ad 1. Nell'esempio riportato in *tab. 6.3*, non vengono segnalate *run* critiche. Nella sessione *Graph*, viene rappresentato l'errore standard del dominio sperimentale. Uno degli obiettivi del *fitting* di dati sperimentali, consiste nel rappresentare la superficie di risposta del modello più precisamente possibile. La superficie di risposta può essere rappresentata come la distribuzione dei valori medi predetti lungo il dominio sperimentale. La precisione con cui viene disegnata tale superficie dipende dall'errore standard associato al valore medio predetto, che a sua volta dipende da tre fattori: errore sperimentale (espresso come deviazione standard), disegno sperimentale (numero di *run*) e posizionamento dei punti sperimentali nel disegno. Di seguito si descrivono tre modalità per rappresentare l'errore standard: in funzione delle variabili sperimentali (3D), dello spazio/volume del dominio (FDS) e infine rispetto ad ogni variabile espressa in *coded units* (*Perturbation*).

Errore standard del disegno - superficie 3D. L'applicativo genera una risposta casuale normalmente distribuita con varianza unitaria, relativa al modello polinomiale utilizzato. Tale superficie viene confrontata con i punti sperimentali del modello e quindi calcolato l'errore standard del disegno (*fig. 6.4*). La forma dipende quindi solo dai punti del disegno sperimentale e dal tipo di polinomio cui sono stati adeguati. La forma ideale è una superficie simmetrica, con errore relativamente basso in prossimità del centro. La forma reale è funzione della deviazione standard che dipende dalle risposte osservate.

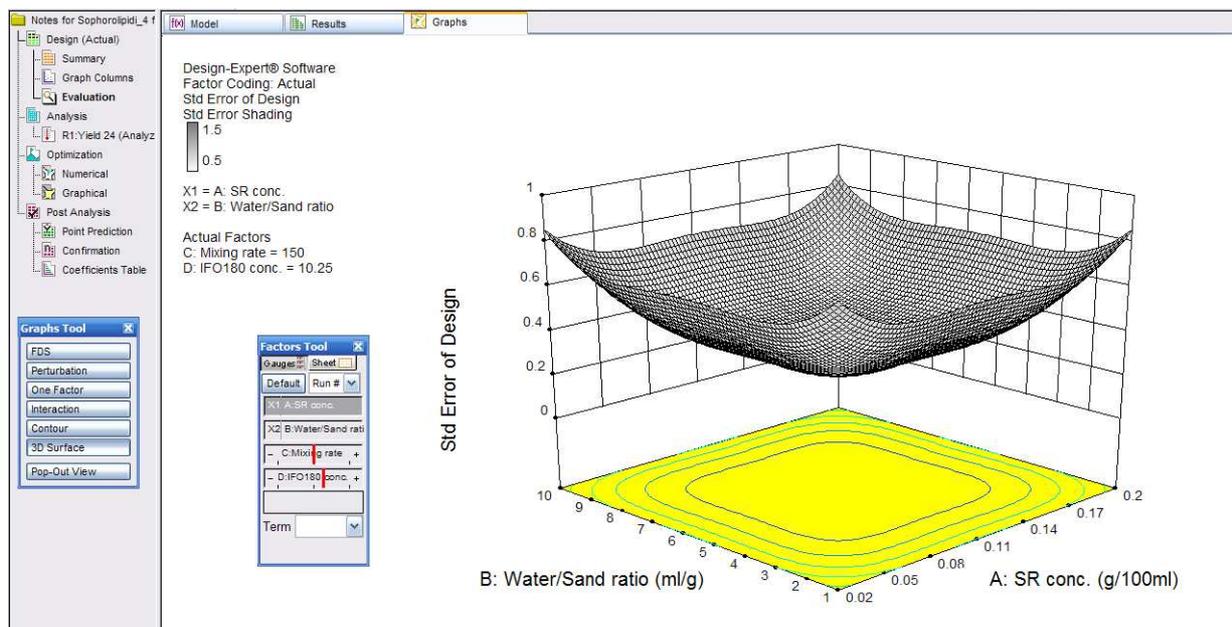


Fig 6.4 Esempio di errore standard nel dominio sperimentale in 3D. A/B variabili, C/D fissi

FDS (fraction design space) – Tale grafico mostra il profilo dell'errore standard associato al disegno sperimentale, in una singola curva. Il grafico rappresenta l'errore standard espresso come distribuzione cumulativa del dominio sperimentale (fig. 6.5).

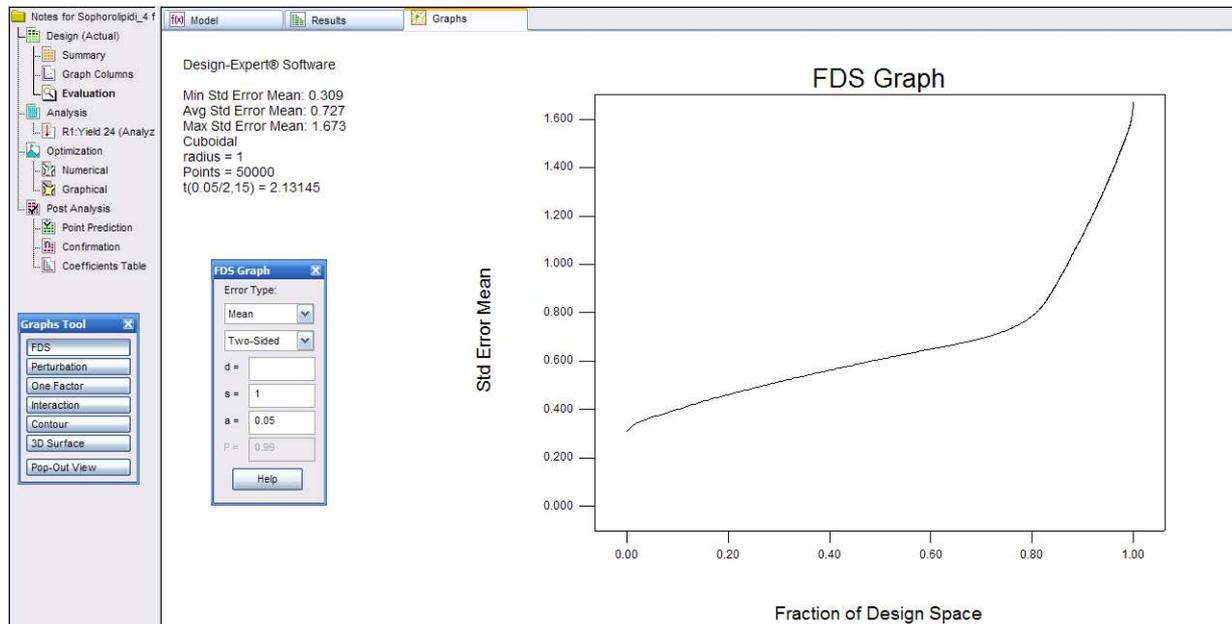


Fig 6.5 Esempio di FDS

Perturbation – Tale grafico esprime l'errore standard di disegno, in funzione di ogni variabile di modello espressa in *coded units* (viene valutata una variabile singola, mantenendo le altre costanti fissate al valore medio del dominio) (fig. 6.6).

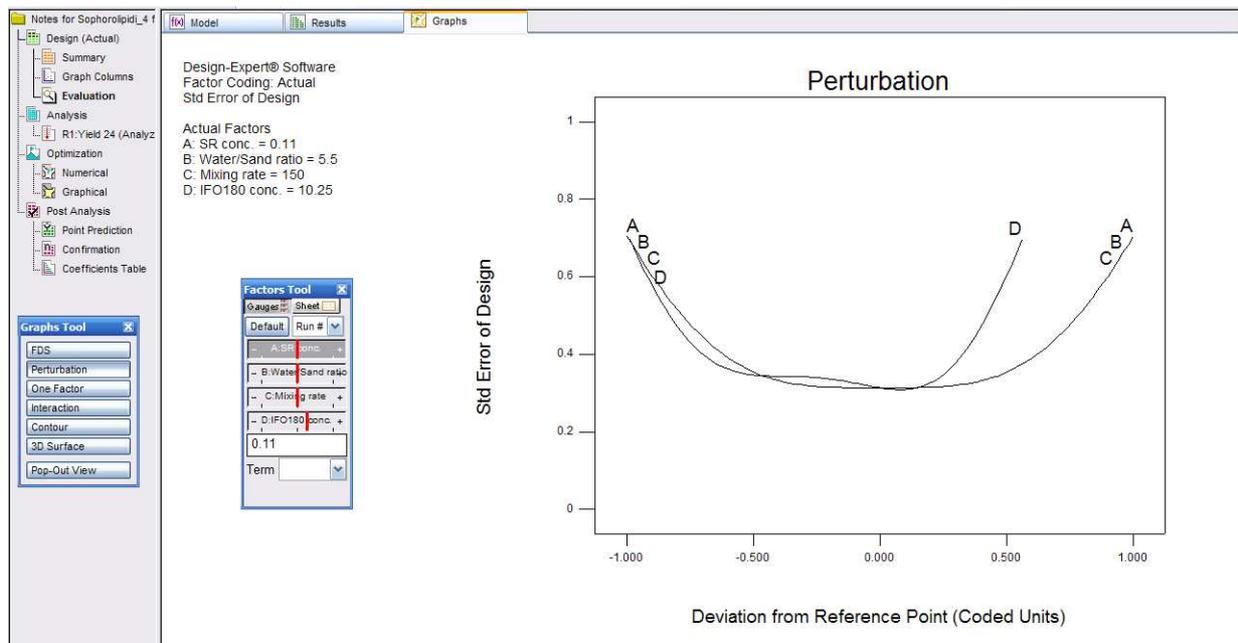


Fig 6.6 Esempio di Perturbation plot

6.3 Procedura

Inserite le risposte sperimentali osservate per ogni *run* previste dal disegno sperimentale, si procede alla definizione del modello e della superficie di risposta. Si considerino i seguenti passaggi:

1. applicazione di una eventuale trasformazione dei dati;
2. analisi del *fit summary* per la valutazione del modello;
3. scelta del modello: ordine e inclusione/esclusione dei suoi termini;
4. analisi della varianza (ANOVA);
5. diagnostica: valutazione della qualità del *fitting* per il modello;
6. grafici del modello: visualizzazione grafica della superficie di risposta, per valutare il modello selezionato.

6.3.1 Trasformazione

Nella sezione *trasform* il *software* Design-Expert permette di applicare una trasformazione matematica della risposta. La trasformazione potrebbe essere necessaria per convalidare le assunzioni di seguito descritte riguardo la valutazione dei residui e l'analisi dell'ANOVA.

Sono possibili varie trasformazioni (inversa, logaritmica, *power*); la scelta del tipo di trasformazione dipende dalla distribuzione dei residui, assunta ideale se normalmente distribuiti con varianza costante. Queste informazioni sono presenti nei grafici visualizzati nella sezione *Diagnostica*: si rimanda alla loro analisi per valutare se applicare o meno una trasformazione.

6.3.2 Fit summary

Nella sezione *Fit Summary*, il software Design-Expert mostra diverse tabelle statistiche da utilizzare per identificare quale modello selezionare. Sulla base dei dati raccolti, vedi esempio (tab. 6.4 a,b,c,d), viene suggerito il modello più adeguato, in questo caso il quadratico.

Sequential Model Sum of Squares						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Mean vs Total	65370.67	1	65370.67			
Linear vs Mean	5447.51	4	1361.88	6.26	0.0012	
2FI vs Linear	436.04	6	72.67	0.28	0.9414	
Quadratic vs 2FI	3649.68	4	912.42	10.10	0.0004	Suggested
Cubic vs Quadratic	892.33	8	111.54	1.69	0.2520	Aliased
Residual	462.35	7	66.05			
Total	76258.58	30	2541.95			

Tab. 6.4a Esempio di valutazioni sul modello da adottare : analisi somma dei quadrati

Lack of Fit Tests						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Linear	5323.55	20	266.18	11.39	0.0067	
2FI	4887.52	14	349.11	14.94	0.0038	
Quadratic	1237.84	10	123.78	5.30	0.0398	Suggested
Cubic	345.51	2	172.75	7.39	0.0321	Aliased
Pure Error	116.84	5	23.37			

Tab. 6.4b Esempio di valutazioni sul modello da adottare : test *Lack of Fit*

Model Summary Statistics						
Source	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	PRESS	
Linear	14.75	0.5003	0.4204	0.2912	7717.56	
2FI	16.23	0.5404	0.2985	-0.5984	17402.88	
Quadratic	9.50	0.8756	0.7595	0.2975	7648.86	Suggested
Cubic	8.13	0.9575	0.8241	-5.9162	75303.33	Aliased

Tab. 6.4c Esempio di valutazioni sul modello da adottare : parametri statistici

Si evidenzia quanto segue: il modello cubico per tutti i test e parametri riportati in tabella 6.4 risulta *aliased*, in quanto il disegno sperimentale prescelto non è sufficiente per descrivere il fenomeno sino ai termini polinomiali cubici.

Summary					
Source	Sequential p-value	Lack of Fit p-value	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	
Linear	0.0012	0.0067	0.4204	0.2912	
2FI	0.9414	0.0038	0.2985	-0.5984	
Quadratic	0.0004	0.0398	0.7595	0.2975	Suggested
Cubic	0.2520	0.0321	0.8241	-5.9162	Aliased

Tab. 6.4d Esempio di valutazioni sul modello da adottare : sommario test e parametri

Le sezione Sequential Model Sum of Squares (tab. 6.4a) valuta la bontà del modello selezionato, sulla base del test F. In questo caso H_0 (ipotesi nulla) del test F, applicata per esempio al modello cubico, consiste nell'ipotizzare che l'aggiunta di un termine (per esempio il cubico rispetto al modello quadratico) generi una variazione della risposta non casuale, quindi che esista una reale dipendenza risposta/termine cubico.

Tale test quindi valuta l'ipotesi che l'aggiunta di termini di grado superiore, migliori in modo significativo il modello stesso:

L'ipotesi H_0 è accettata, qualora $p\text{-value} < 0.05$; in tal caso l'aggiunta di un ulteriore termine passando dal modello 2FI al *quadratic* varia la risposta in modo non casuale,

indicando che esiste una dipendenza significativa, non casuale, fra i termini quadratici aggiunti e la risposta. Il modello quadratico risulta quindi migliorativo rispetto al 2FI.

L'ipotesi H_0 è rigettata, qualora $p\text{-value} > 0.1$, in tal caso l'aggiunta di un ulteriore termine passando dal modello lineare a 2FI, oppure dal *quadratic* al *cubic* varia la risposta in modo casuale, indicando che non esiste una dipendenza significativa, bensì casuale, fra i termini quadratici e la risposta.

La sezione *Lack of Fit tests* valuta la bontà del *fitting* corrispondente al modello selezionato, sulla base del test F (*tab. 6.4b Lack of Fit tests*). In questo caso H_0 (ipotesi nulla) del test F, applicata per esempio al modello cubico, consiste nell'ipotizzare che l'aggiunta di un termine (per esempio il cubico rispetto al modello quadratico) generi una variazione della risposta non casuale rispetto all'errore residuo del modello, quindi che esista una reale dipendenza risposta/errore residuo del modello.

Tale test quindi valuta l'ipotesi che l'aggiunta di termini di grado superiore, peggiori in modo significativo il modello stesso:

L'ipotesi H_0 è accettata, qualora $p\text{-value} < 0.05$; in tal caso l'aggiunta di un ulteriore termine passando dal modello 2FI al *quadratic* varia la risposta in modo non casuale, indicando che esiste una dipendenza significativa, non casuale, fra la risposta e l'errore residuo del modello.

L'ipotesi H_0 è rigettata, qualora $p\text{-value} > 0.1$; in tal caso l'aggiunta di un ulteriore termine passando dal modello lineare a 2FI al *quadratic* al *cubic* varia la risposta in modo casuale, indicando che non esiste una dipendenza significativa, bensì casuale, fra la risposta e l'errore residuo del modello. In tal caso modello quadratico risulta quindi migliorativo rispetto al 2FI.

Qualora *LoF* risultasse significativo, *Design Expert* consiglia di valutare una trasformazione della risposta, oppure la ricerca di *outliers* o la riduzione dei termini del modello per avere un *LoF* non significativo. In questi casi dalla diagnostica dei residui si ricercano gli *outliers* e dal diagramma Box-Cox viene valutata l'applicazione della trasformazione dei dati. Nei casi del presente studio si è proceduto con la rimozione manuale dei termini del modello non significativi (quelli che avevano un *p-value* superiore a 0.05) rispettando la gerarchia. In questo modo il *LoF* ha presentato sempre *p-value* non

significativo, provando l'adeguatezza del modello nel prevedere la superficie di risposta rispetto ai dati sperimentali.

Nella sezione *Model Summary Statistics* (tab. 6.4c) il software Design-Expert indirizza la scelta del modello verso quello che massimizza gli indici statistici di *fitting* e predizione, considerando come maggiormente predittivi i modelli che forniscono un alto R^2_{adj} e R^2_{pred} (vedi sezione 6.3.4). In tab. 6.4d vengono riassunti i test ed i parametri statistici già descritti, evidenziando che il modello quadratico è sempre quello suggerito.

6.3.3 Scelta del modello

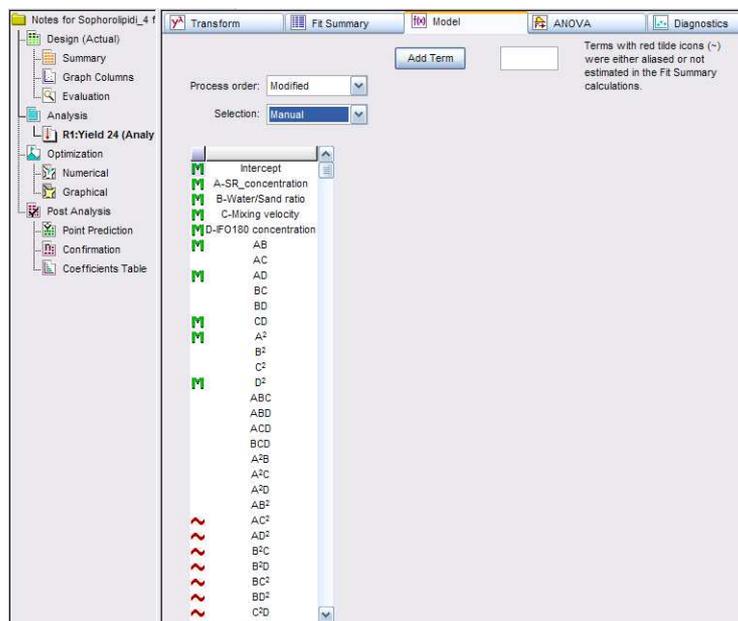


Fig 6.6 Esempio di sezione *Model* del Design-Expert

Nella sezione *Model* del software Design-Expert vengono elencati i termini del polinomio prescelto. In questa sezione è possibile inserire od eliminare ulteriori termini del polinomio.

6.3.4 ANOVA

In questa sezione (*ANOVA* del software Design-Expert) vengono presentati i parametri statistici dell'analisi della varianza applicata al modello prescelto. La grandezza utilizzata abitualmente per valutare la qualità di un modello di regressione è il coefficiente di correlazione multipla R^2 , ovvero la percentuale della variazione della risposta prevedibile dal modello. Per definizione R^2 è dato dalla formula:

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1, n} (\hat{y}_i - y_i)^2}{\sum_{i=1, n} (y_i - \bar{y})^2} = 1 - \frac{SS_E}{SS_T} = \frac{SS_R}{SS_T}$$

che si può leggere come il rapporto tra la varianza spiegata dal modello e la varianza contenuta nei risultati sperimentali, rapporto che, moltiplicato per 100, rappresenta la percentuale di varianza spiegata dal modello. ANOVA minimizza gli scarti quadratici medi fra i valori osservati e quelli calcolati, che si traduce in $R^2 = 1$, nel caso ottimale. Questa grandezza in realtà cresce all'aumentare del numero di variabili utilizzate nel modello di regressione, anche se le variabili introdotte migliorano la risposta. Ciò è dovuto al fatto che tale indice statistico non tiene conto del numero di gradi di libertà del modello, in rapporto al numero di gradi di libertà forniti dagli esperimenti effettuati.

Una prima modifica a questo indice è stata apportata con l'introduzione del coefficiente di correlazione multipla aggiustato (*adjusted*) che introduce un indice di peso a numeratore e denominatore, coincidente col numero di gradi di libertà con cui ciascuna grandezza viene determinata:

$$R_{adj}^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2 / (n-p)}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 / (n-1)}$$

dove n è il numero delle prove e p il numero di parametri presenti nel modello. Quando le variabili aggiunte non portano nuova informazione, la somma dei quadrati dei residui a numeratore non diminuisce di molto, per cui l'effetto del rapporto $(n-1)/(n-p)$ fa diminuire questo indice. Il parametro presenta un massimo nel punto di complessità ottimale del modello (numero massimo di variabili significative) e cala nuovamente quando l'aggiunta di una ulteriore variabile al modello non è adeguatamente compensata da un significativo aumento di R. Entrambi gli indici sono ottenuti in condizioni cosiddette di *fitting*, cioè quando si ha la massima convergenza fra i risultati previsti e quelli sperimentali. Per ottenere dei parametri che misurino la capacità predittiva del modello ottenuto è necessario utilizzare le tecniche di validazione, in questo modo si ottiene un modello in grado di predire efficacemente la risposta corrispondente a nuove condizioni sperimentali. Una validazione delle capacità predittive di un modello di regressione può essere calcolata mediante gli algoritmi di *cross-validazione*. Il metodo più usato è quello *definito leave-one-out*: si supponga di avere n esperimenti; al primo passo si lascia fuori il primo esperimento e si calcola il modello di regressione in sua assenza; quindi si utilizza il modello appena calcolato per predire la risposta per il primo esperimento, che era stato lasciato fuori nella fase di calcolo del modello. Si ottiene così un valore stimato per la risposta che può essere

interpretato come valore predetto. Da questo valore si può calcolare l'errore come differenza tra il valore stimato e quello vero. A questo punto si reintroduce il primo esperimento e si opera allo stesso modo sul secondo esperimento, e così via. Le differenze calcolate tra le risposte predette e quelle sperimentali sono utilizzate nell'espressione:

$$PRESS = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_{i(i)})^2,$$

dove PRESS sta per *PR*edictive *E*rrore *S*um of *S*quares mentre $\hat{y}_{i(i)}$ indica il valore predetto dal modello per l'*i*-esimo campione che non è stato considerato per calcolare il modello. Utilizzando PRESS al posto di SS_E nell'espressione di R^2 si ottiene la percentuale di varianza spiegata dal modello di predizione:

$$R_{pred}^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_{i(i)})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} = 1 - \frac{PRESS}{SS_T}$$

Questo nuovo coefficiente non cresce necessariamente all'aumentare del numero di variabili del modello, anzi, è molto sensibile all'introduzione di variabili che portano soltanto rumore e non nuova informazione. Infatti può assumere valori negativi quando il set di variabili utilizzato non presenta alcuna relazione con la risposta studiata.

La grandezza C.V.% è il coefficiente di variazione definito come:

$$C.V.\% = \frac{\sqrt{MS_E}}{\bar{y}} \cdot 100$$

Con esso si esprime la variabilità non spiegata o residua dei dati come percentuale della risposta media.

Infine il parametro statistico *Adeq Precision*, calcolato dividendo la differenza tra la massima e la minima risposta prevista per la deviazione standard di tutte le risposte previste, misura sostanzialmente un rapporto segnale/rumore. Solitamente viene assunto 4 come valore di controllo: valori superiori indicano che il modello ha buone capacità previsionali. In sintesi nella sezione ANOVA viene esaminata la significatività dei parametri del modello prescelto nella sezione *Model*, utilizzando le seguenti tabelle (*tab. 6.5 a,b*).

ANOVA for Response Surface Reduced Quadratic model						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	9420.07	9	1046.67	14.26	< 0.0001	significant
<i>A-SR_concentration</i>	442.03	1	442.03	6.02	0.0234	
<i>B-Water/Sand ratio</i>	613.67	1	613.67	8.36	0.0090	
<i>C-Mixing velocity</i>	1691.45	1	1691.45	23.05	0.0001	
<i>D-IFO180 concentration</i>	2234.39	1	2234.39	30.44	< 0.0001	
<i>AB</i>	130.53	1	130.53	1.78	0.1973	
<i>AD</i>	89.81	1	89.81	1.22	0.2818	
<i>CD</i>	112.44	1	112.44	1.53	0.2301	
<i>A^2</i>	800.88	1	800.88	10.91	0.0035	
<i>D^2</i>	288.27	1	288.27	3.93	0.0614	
Residual	1467.84	20	73.39			
Lack of Fit	1351.00	15	90.07	3.85	0.0717	not significant
<i>Pure Error</i>	116.84	5	23.37			

Tab. 6.5a Esempio di ANOVA per il modello quadratico – F test applicato

Std. Dev.	8.57	R-Squared	0.8652
Mean	46.68	Adj R-Squared	0.8045
C.V. %	18.35	Pred R-Squared	0.6579
PRESS	3724.59	Adeq Precision	13.927

Tab. 6.5b Esempio di parametri statistici

Dai risultati dell'ANOVA si valuta quanto segue:

- F-test applicato al parametro *Model*. Il test deve risultare significativo (p-value < 0.05). Il modello quadratico risulta significativo.
- F-test applicato ai parametri di regressione. Il test deve risultare significativo (p-value < 0.05)
- F-test applicato al parametro *LoF*. Il test deve risultare non significativo (p-value > 0.1)
- controllo dell' *Adeq Precision* > 4
- controllo del R^2_{adj} e R^2_{pred} . ($R^2_{adj} - R^2_{pred} < 0.2$)

Qualora *LoF* risultasse non significativo (<0.1), DesignExpert consiglia di valutare una trasformazione della risposta, oppure la ricerca di *outliers* o, in alternativa, la riduzione dei termini del modello per avere un *LoF* maggiore. Dalla diagnostica dei residui si ricercano gli *outliers*, ed eventualmente si può valutare se eliminare o rifare le relative prove; dal diagramma *Box-Cox* viene suggerita l'eventuale trasformazione dei dati da applicare per poi rieseguire ANOVA; mentre nella sezione *Model* è possibile rimuovere manualmente dei termini non significativi del modello (quelli aventi *p-value* superiore a 0.10), rispettando la gerarchia degli stessi. In questo modo il *LoF* potrà presentare un *p-value* non significativo (> 0.10), che dimostra l'adeguatezza del modello nel descrivere la superficie di risposta, rispetto ai dati sperimentali. Si riporta a livello di esempio l'equazione finale in termini di *coded factor*.

Final Equation in Terms of Coded Factors:	
Yield 24	=
+59.36	
+5.11	* A
+5.84	* B
+10.00	* C
-26.53	* D
+2.86	* AB
+3.04	* AD
+3.40	* CD
-15.25	* A^2
-17.10	* D^2

Tab. 6.6 Esempio di coefficienti polinomiali

Per descrivere la superficie di risposta, i dati sperimentali vengono preferibilmente elaborati con l'ausilio di un'equazione polinomiale di secondo grado, che descrive la natura non lineare della risposta, i cui coefficienti (caso SR) sono descritti in *tab. 6.6*

(Eq.1)

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_4 + b_5X_1X_2 + b_6X_1X_3 + b_7X_1X_4 + b_8X_2X_3 + b_9X_2X_4 + b_{10}X_3X_4 + b_{11}X_1^2 + b_{12}X_2^2 + b_{13}X_3^2 + b_{14}X_4^2$$

6.3.5 Diagnostica dei risultati

L'analisi dei residui risulta necessaria per confermare che i presupposti di ANOVA siano effettivamente rispettati. Essa mira a verificare se gli errori si distribuiscono in modo

normale, con valore atteso di media nulla e deviazione standard costante e se i residui presentano qualche tipo di tendenza, o se semplicemente sono distribuiti in modo casuale. Il verificarsi del primo caso potrebbe essere un indice del fatto che la forma matematica del modello adottata non è la più corretta. Vengono quindi consultati i diagrammi diagnostici presenti nella sezione *Diagnostica*, raggruppati in due tipologie:

Diagrammi diagnostici - Il controllo diagnostico sul modello si basa sulla verifica delle assunzioni di normalità e indipendenza degli errori e sull'omogeneità della varianza.

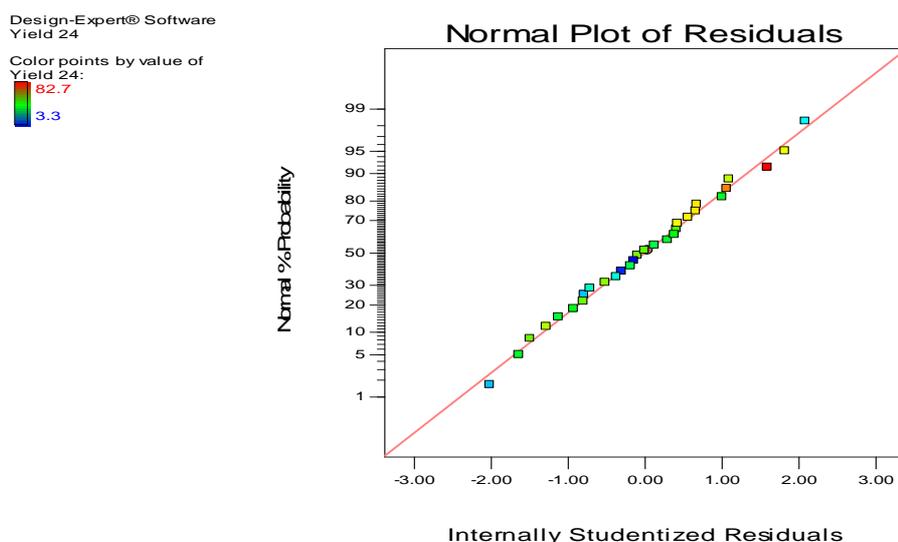


Fig 6.7 Esempio di plot dei residui normalizzati

Attraverso la diagnostica si sono presi in esame i residui analizzando il loro comportamento. L'assunzione di normalità² può essere verificata valutando il grafico di probabilità normale in *fig 6.7*.

² *Assunzione di normalità*: questo controllo avviene tramite il tracciamento di un *grafico di probabilità normale* dei residui, in cui i residui sono riportati in ordine crescente rispetto alla loro frequenza cumulata osservata; se la distribuzione dell'errore è normale, il tracciato somiglierà ad un segmento di linea retta. Nel rappresentarlo conviene dare maggior enfasi ai valori centrali del grafico, piuttosto che agli estremi. In generale, modesti scostamenti dalla normalità sono di scarsa rilevanza nell'analisi della varianza ad effetti fissi. Poiché il test *F* ne è solo leggermente influenzato, se ne deduce che l'analisi della varianza è robusta per l'assunzione di normalità. Un'anomalia molto comune, spesso riscontrata sui grafici di probabilità normale, è la presenza di un residuo in valore assoluto molto più grande degli altri; tale residuo eccessivo è indicato come valore anomalo (*outlier*). La presenza di uno o più *outlier* può portare a distorsioni sui risultati dell'analisi della varianza e soprattutto nella formulazione del modello, evidenziando l'esistenza di una regione nello spazio dei regressori in cui il modello accostato in realtà approssima in modo non adeguato la superficie di risposta vera. A volte la presenza di *outlier* è dovuta ad errori di calcolo nella codifica dei dati. Se non è questo il caso, si devono analizzare attentamente le condizioni sperimentali corrispondenti alla prova; se la risposta abnorme è un valore particolarmente desiderabile, l'*outlier* può essere più informativo del resto dei dati. Si

L'idealità è data dalla retta segnata in rosso, indicativa della distribuzione normale. Dal grafico si nota che non c'è motivo per dubitare dell'assenza di normalità, in quanto i residui "studentizzati" si distribuiscono linearmente. Inoltre non si nota la presenza di *outlier*, elementi che si discosterebbero dall'andamento rettilineo che sarebbero riscontrabili agli estremi della distribuzione. La ragione per cui in ascissa sono riportati i residui internamente studentizzati risiede nel fatto che in questo modo si tiene conto anche della posizione del punto nel dominio sperimentale, cosa che non avviene per i residui ordinari³.

Vengono riportati nel grafico successivo i residui studentizzati rispetto ai valori predetti, allo scopo di evidenziare una eventuale disomogeneità della varianza. Andamenti regolari sono indice di una varianza non costante. Nel caso in esame si nota una disposizione casuale che conferma che i presupposti di ANOVA sono rispettati (*fig.6.8*); la maggioranza dei punti sta all'interno di più o meno una deviazione standard.

In *fig.6.9* viene analizzato il grafico dei residui studentizzati in funzione della sequenza sperimentale: se sono presenti dei *trend*, segno di correlazione tra i residui, vengono

deve avere molta cura a non rifiutare o scartare un'osservazione soltanto perché sproporzionata, a meno di non avere sostanziali motivi di natura non statistica per farlo.

³ Residui ridotti. Vengono riassunte alcune procedure diagnostiche (Montgomery e Peck, 1992). La diagnostica si basa sostanzialmente sullo studio dei residui, perché sono i residui (e_i), che sono misurabili e che assumono il ruolo di surrogati degli errori concettuali (ϵ_i). I residui sono definiti come: $e_i = y_i - \hat{y}_i$, dove y_i è il valore individuale reale e \hat{y}_i è il valore predetto dal modello. Si preferisce operare sui residui ridotti, in quanto forniscono più informazioni di quelli ordinari. Un tipo di residui ridotti è dato dai *residui studentizzati* (o internamente studentizzati), definiti come:

$t_i = \frac{e_i}{\sqrt{\hat{\sigma}^2 \cdot (1-h_{ii})}}$, con $\hat{\sigma} = \sqrt{MS_E}$. Il residuo viene diviso per la deviazione standard stimata per quel residuo (dipendente dal leverage), che misura il numero di deviazioni standard che separano il valore reale da quello previsto. Poiché h_{ii} è una misura della posizione dell' i -esimo punto nello spazio delle x , la varianza di e_i dipende da dove si trova il punto x_i . Le violazioni delle assunzioni del modello sono più probabili nei punti più distanti, per cui si raccomanda l'esame dei residui studentizzati. Poiché nei residui studentizzati è consueto usare MS_E (quadrato medio dell'errore) come stima di σ^2 , ci si riferisce a ciò come ad una trasformazione interna della scala del residuo (da qui *internally studentized*), poiché MS_E è una stima generata internamente, ottenuta dall'accostamento del modello a tutte le n osservazioni. Un altro approccio potrebbe essere usare una stima di σ^2 basata su un insieme di dati rimuovendo l' i -esima osservazione e stimando la risposta rispetto alle prove rimanenti, per ottenere un residuo studentizzato esterno (*externally studentized*), di solito chiamato R-Student, definito come: $t_i = \frac{e_i}{\sqrt{S_{(i)}^2(1-h_{ii})}}$

Questo "valore erratico t " rappresenta il numero di deviazioni standard tra questo valore previsto e la risposta reale. Prove che presentano ampi valori di t (regola pratica: $|t| > 3.5$) vengono segnalate e devono essere indagate.

meno i presupposti di ANOVA. Si nota, nel caso in figura, che non sono presenti andamenti particolari o sistematici, piuttosto, un andamento altalenante.

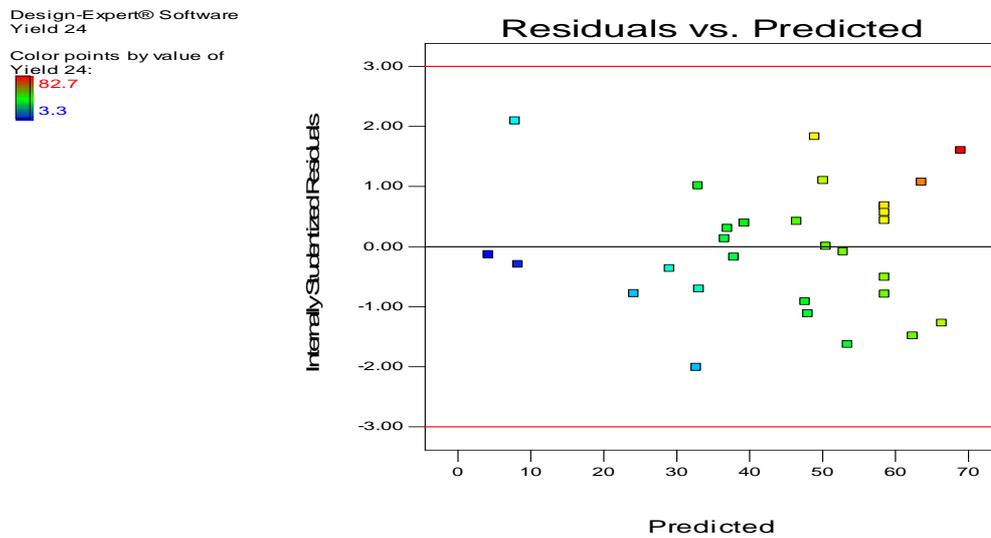


Fig 6.8 Esempio di distribuzione dei residui rispetto ai valori predetti

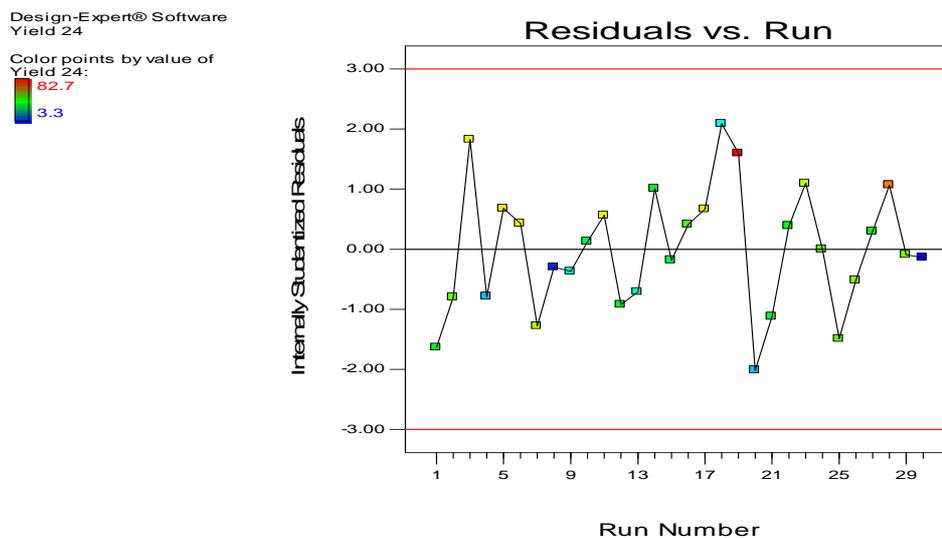


Fig 6.9 esempio di distribuzione dei residui nelle run

Si osservi ora il grafico dei valori predetti contro i valori reali: in esso viene mostrata la presenza o meno di valori non facilmente predetti dal modello. L'andamento rettilineo costituisce l'idealità (fig. 6.10). I punti dovrebbero essere casualmente distribuiti lungo la retta a 45 gradi.

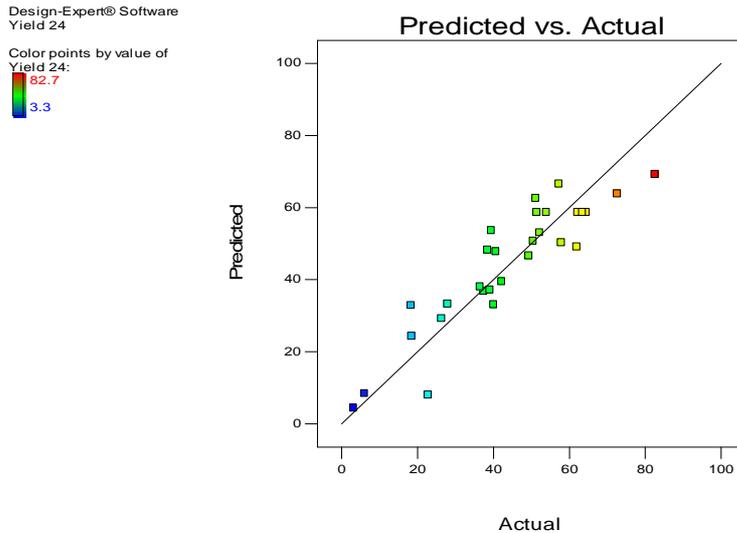


Fig. 6.10 Esempio di valori predetti rispetto ai valori sperimentali

Gruppi di punti sopra o sotto la linea indicano zone di elevata o scarsa predicibilità.

Diagramma Box Cox: viene utilizzato per determinare se una trasformazione può essere appropriata per i dati in esame (fig. 6.11).

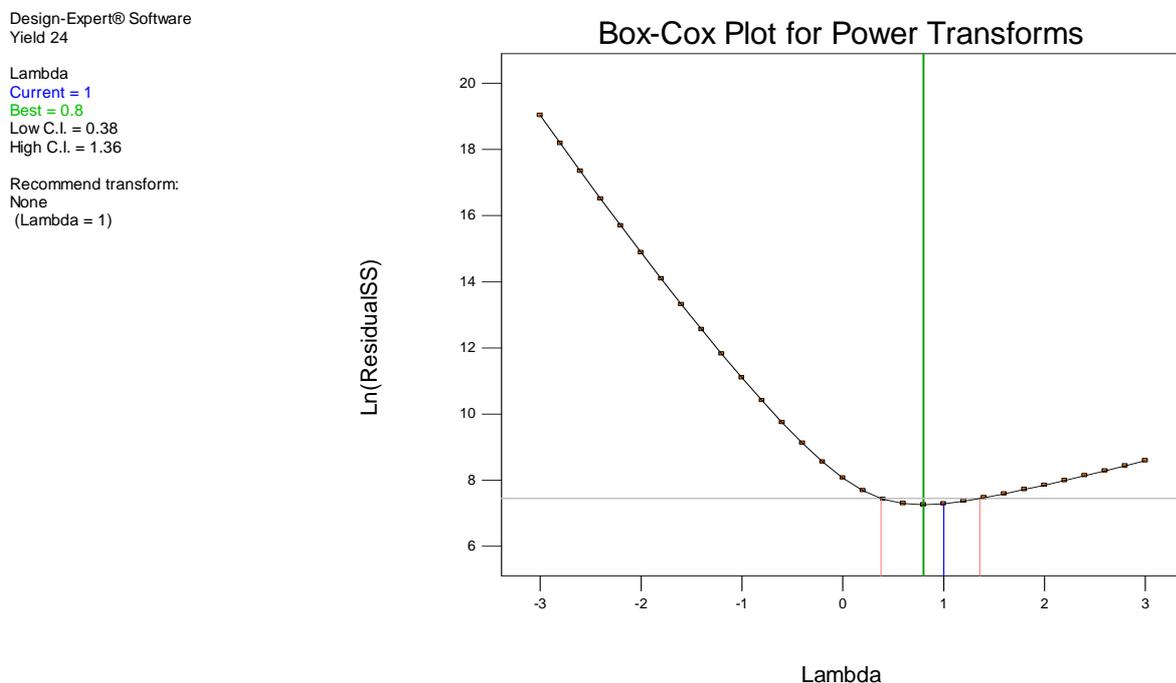


fig. 6.11 Esempio di diagramma Cox Box – diagnosi ANOVA

La linea blu indica la trasformazione attuale ($\lambda = 1$ per non trasformazione) e la linea verde indica il miglior valore di λ . Le linee rosse indicano un intervallo di confidenza del 95% associato al miglior valore di λ . *Design Expert* identifica la trasformazione standard

consigliata a meno che l'intervallo di confidenza non includa il valore 1, come nel nostro caso, per cui la raccomandazione è *Nessuna*.

Diagrammi di influenza - Vengono analizzati i grafici relativi alle misure di influenza: i parametri statistici vengono calcolati prendendo in considerazione ogni *run* out (toglie ogni prova), uno dopo l'altro, e vedendo come ciò influenza l'adattamento del modello.

I residui esternamente studentizzati costituiscono una misura di quanto il valore predetto differisce dal valore osservato quando il punto non è considerato nell'analisi. Nel grafico (*fig. 6.12*), eventuali residui esternamente studentizzati, cioè fuori dai limiti di confidenza del 95 % (circa ± 3.5) indicano che le prove non sono state adattate come le altre. Nel caso in esame non vi è la presenza di anomalie.

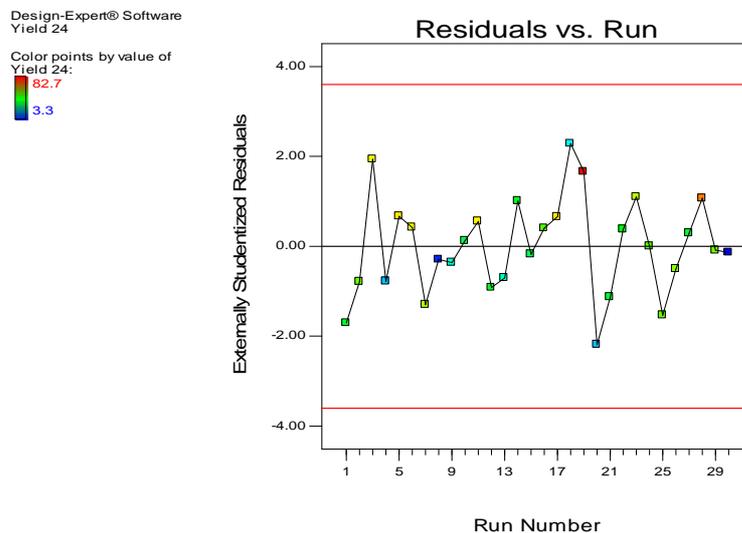


Fig. 6.12 esempio di distribuzione dei residui nelle *run*

In *fig. 6.13* è riportato il grafico dei *leverage*: non ci sono punti con *leverage* elevato, ovvero punti il cui valore superi il doppio della media dei valori di *leverage* considerati.

In *fig. 6.14* si riporta il DFFITS rispetto alla sequenza sperimentale; altro supporto statistico per rilevare prove influenti. Si raccomanda di focalizzarsi su valori fuori da ± 2 . Design Expert avverte che questa regola pratica potrebbe rivelarsi eccessivamente sensibile per *design* ridotti come nel nostro caso per cui se si rilevano un certo numero di punti al di fuori dei limiti questo non risulta allarmante. Dal momento che il DFFITS risulta dipendere sia dal *leverage* (valori che risultavano essere tutti contenuti) che dal valore predetto nel punto considerato, si può concludere che tali anomalie derivano da un limite nella predizione del punto, ovvero da residui elevati. Nel grafico dei residui esternamente

studentizzati si nota come queste anomalie si avvicinano molto più degli altri punti ai limiti. I punti considerati hanno quindi un'influenza superiore agli altri nei confronti del modello del secondo ordine.

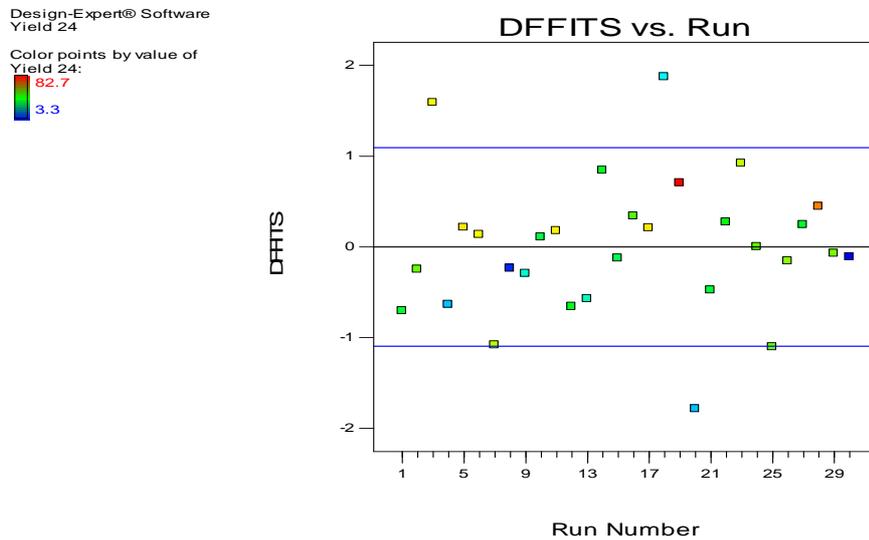


Fig 6.13 esempio di distribuzione del *leverage* nelle *run*

L'ultimo grafico preso in esame (fig. 6.15) è quello associato alla distanza di Cook, la quale misura la distanza al quadrato tra due stime: quella dei minimi quadrati per i coefficienti di regressione, basata su tutte le nostre osservazioni e quella che si è ottenuta eliminando l'*iesimo* punto. Questo grafico è d'aiuto quando si riscontrano più di un valore anomalo in altri diagrammi diagnostici. Dal precedente diagramma dei DFFITS si erano riscontrate irregolarità che vengono confermate in questo diagramma: la run #18 presenta la maggiore distanza di Cook. Non si ravvisano tuttavia, condizioni tali per cui ripetere la prova.

Dalla diagnostica è quindi possibile valutare se il modello può essere utilizzato per descrivere la risposta in funzione dei fattori considerati.

Design-Expert® Software
Yield 24

Color points by value of
Yield 24:
82.7
3.3

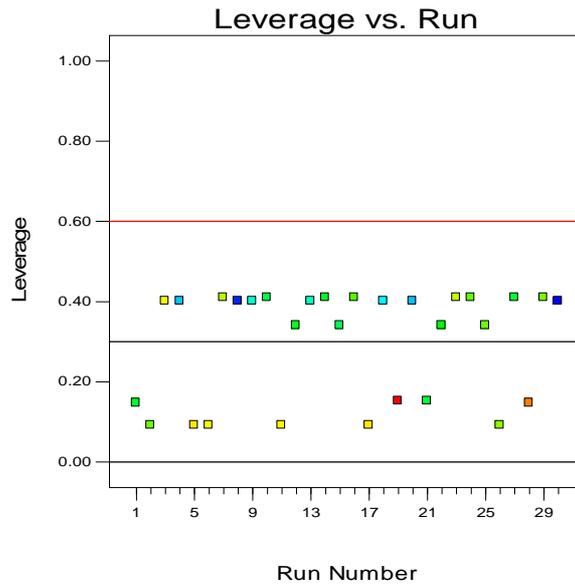


Fig 6.14 Esempio di distribuzione del DFFITS nelle run

Design-Expert® Software
Yield 24

Color points by value of
Yield 24:
82.7
3.3

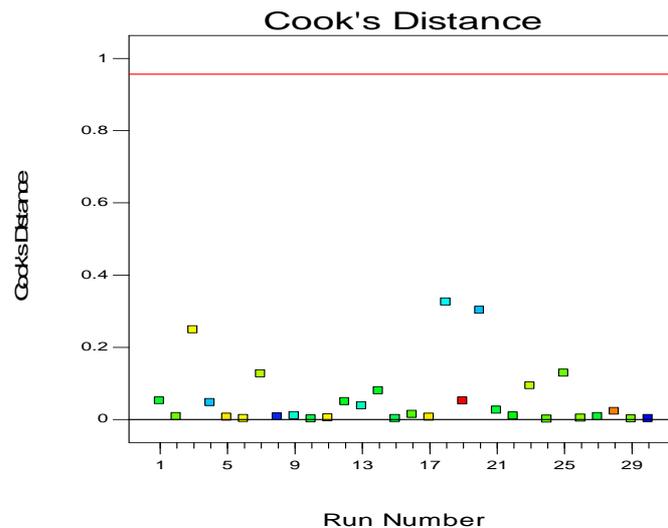


Fig 6.15 Esempio di distanza di Cook nelle run

6.3.6 Grafici del modello

Dopo aver verificato l'adeguatezza del modello, si passa alla costruzione della superficie di risposta, per valutare graficamente sia le interazioni esistenti fra i diversi fattori sperimentali, sia le condizioni operative ottimali. Questa sessione verrà illustrata nel dettaglio nella parte dedicata alla presentazione dei dati sperimentali, poiché di supporto per la lettura e l'analisi dei risultati ottenuti.

6.4 Ottimizzazione dei parametri del processo

Nella sezione *Criteria* del software *Design-Expert* è possibile regolare i criteri per ottenere l'ottimizzazione del processo desiderata, sulla base del modello polinomiale costruito dall'applicativo. Viene prodotto un *report* dettagliato contenente una serie di soluzioni, ognuna delle quali riporta i valori predetti per tutti i fattori, per la risposta e il valore di desiderabilità associato alla singola soluzione. Nei criteri è possibile richiedere che ogni fattore/risposta venga massimizzato, minimizzato, raggiunga un *target*, rientri in un *range* di valori o assuma un determinato valore. Può inoltre essere assegnata una importanza *t* ad ogni fattore/risposta (+; ++ .. +++++); di *default* a tutti i parametri viene assegnata una *t* intermedia (+++). L'importanza assegnata nei criteri ad ogni fattore/risposta corregge la pendenza della funzione desiderabilità, in corrispondenza del fattore/risposta considerato.

E' inoltre possibile designare un peso *r* per entrambi i limiti dell'intervallo scelto, nel caso in cui il criterio selezionato sia *minimize*, *maximize* o *target*. Il calcolo delle soluzioni che l'ottimizzazione propone, parte da una serie di *starting point* casuali e/o del disegno sperimentale, e prosegue in modo iterativo verso le soluzioni corrispondenti a pendenze via via crescenti sino ad un massimo di desiderabilità. Ci possono essere due o più massimi a causa della curvatura della superficie di risposta e di conseguenza più di una soluzione della funzione desiderabilità. Partendo da punti diversi del disegno sperimentale si ottengono differenti *step* migliorativi e quindi il numero di soluzioni per arrivare al massimo locale cambia. Dal menu opzioni si possono modificare le seguenti impostazioni: numero di *starting point*, sia casuali che facenti parte del disegno sperimentale, griglia per selezionare più o meno soluzioni multiple – *step* intermedi migliorativi - e visualizzazione dell'errore standard associato alle risposte.

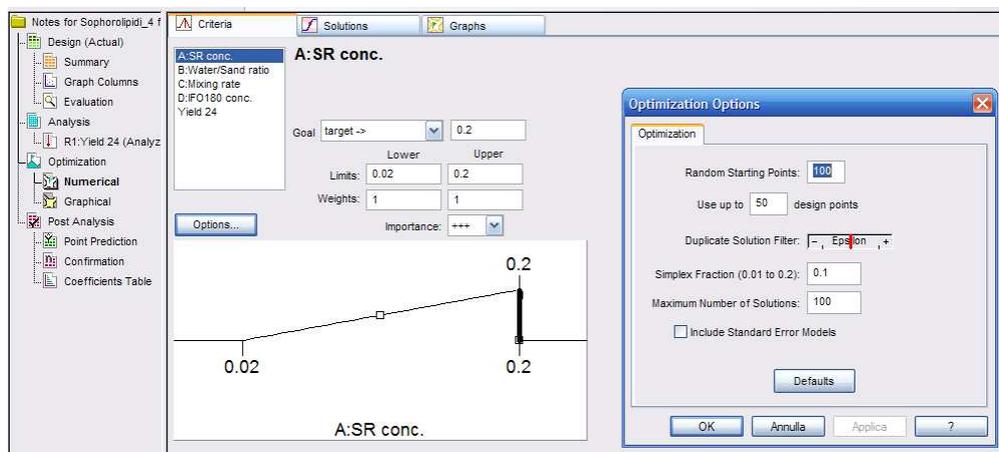


Fig.6.16 Esempio di impostazione dei criteri per l'ottimizzazione

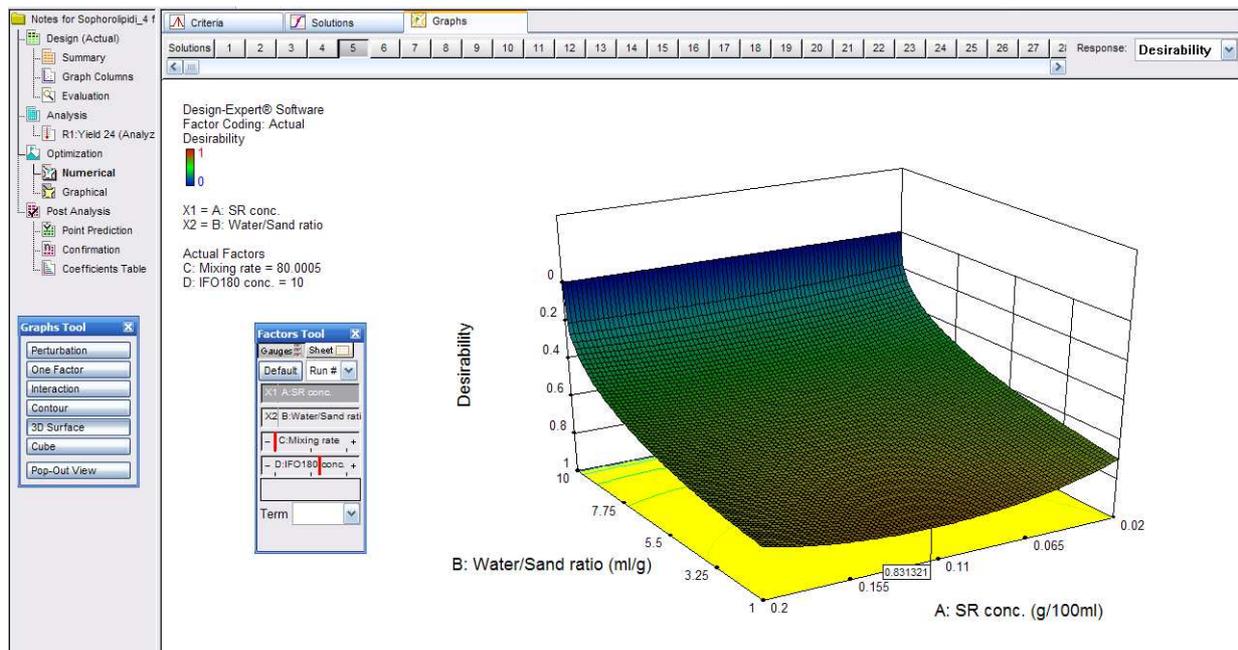


Fig. 6.17 Funzione desiderabilità in 3D in funzione di A/B, mantenendo fissi C/D per la soluzione 3

La funzione desiderabilità può essere visualizzata con grafici a contorni o 3D, nel dominio sperimentale. Inoltre ogni singola soluzione ottenuta nella ottimizzazione può essere rappresentata graficamente (fig. 6.17).

6.4.1 Funzione desiderabilità

Funzione descritta da Myers and Montgomery, al fine di fornire per ogni soluzione ottenuta nell'ottimizzazione, il livello di corrispondenza rispetto ai criteri selezionati. Tale funzione $D(d_i)$ assume valori compresi fra 0 e +1. Si tratta di una media geometrica fra tutte le risposte dei fattori "convertite" :

$$D = (d_1 \times d_2 \times \dots \times d_n)^{\frac{1}{n}} = \left(\prod_{i=1}^n d_i \right)^{\frac{1}{n}}$$

L'approccio generale consiste nel convertire dapprima ciascuna risposta y_i in una funzione individuale di desiderabilità d_i che assume valori nell'intervallo $0 \leq d_i \leq 1$, dove d_i è quindi la singola risposta dei fattori, ed n il numero delle risposte. Se nessuna delle risposte dei fattori corrisponde al criterio prescelto, la funzione $D(d_i)$ assume valore nullo. Se il criterio è *none*, la risposta del fattore non verrà utilizzata per l'ottimizzazione. Ogni risposta d_i può assumere i seguenti valori, in relazione al corrispondente criterio prescelto:

maximize:

$d_i = 0$ se la risposta $<$ valore inferiore

$0 < d_i < 1$ se la risposta cade fra il livello inferiore e quello superiore

$d_i = 1$ se la risposta $>$ del livello superiore

minimale:

$d_i = 1$ se la risposta $<$ valore inferiore

$0 < d_i < 1$ se la risposta cade fra il livello inferiore e quello superiore

$d_i = 0$ se la risposta $>$ del livello superiore

target

$d_i = 0$ se la risposta è $<$ valore inferiore

$0 < d_i \leq 1$ se la risposta varia fra il livello inferiore ed il *target*

$1 \geq d_i > 0$ se la risposta varia fra il *target* ed il livello superiore

$d_i = 0$ se la risposta è $>$ del livello superiore

range

$d_i = 0$ se la risposta $<$ valore inferiore

$d_i = 1$ se la risposta cade fra il livello inferiore e quello superiore

$d_i = 0$ se la risposta è $>$ del livello superiore

quando il peso r è pari a 1, la funzione di desiderabilità è lineare. Scegliendo $r > 1$ si pone più importanza quando la soluzione si trova più vicina al valore obiettivo, dal momento che si ottiene una famiglia di curve concave verso l'alto. Scegliendo $0 < r < 1$ si pone meno importanza all'obiettivo ma si dà importanza all'intervallo attorno all'obiettivo, ottenendo una famiglia di curve concave verso il basso. La scelta di r così come quella dei limiti superiore e inferiore è soggettiva. L'ulteriore possibilità offerta da Design Expert è data dal porre l'intervallo come obiettivo. Un'ulteriore possibilità che da Design Expert è quella di poter dare a ciascuna risposta una determinata importanza t . L'equazione per il calcolo della desiderabilità generale viene così modificata:

$$D = (d_1^{t_1} \cdot d_2^{t_2} \cdot \dots \cdot d_m^{t_m})^{1/(t_1+t_2+\dots+t_m)}$$

dove t1 è l'importanza relativa della risposta 1, t2 è l'importanza relativa della risposta 2, e così via. I valori di ti possono essere scelti su Design Expert in un intervallo che va da 1 a 5 (+; ++ .. +++++).

6.5 Post analisi

Point-prediction – in questa sezione è possibile predire la risposta al variare dei valori dei parametri sperimentali. Viene fornito un valore predetto con relativo errore standard e intervallo di confidenza (fig.6.18).

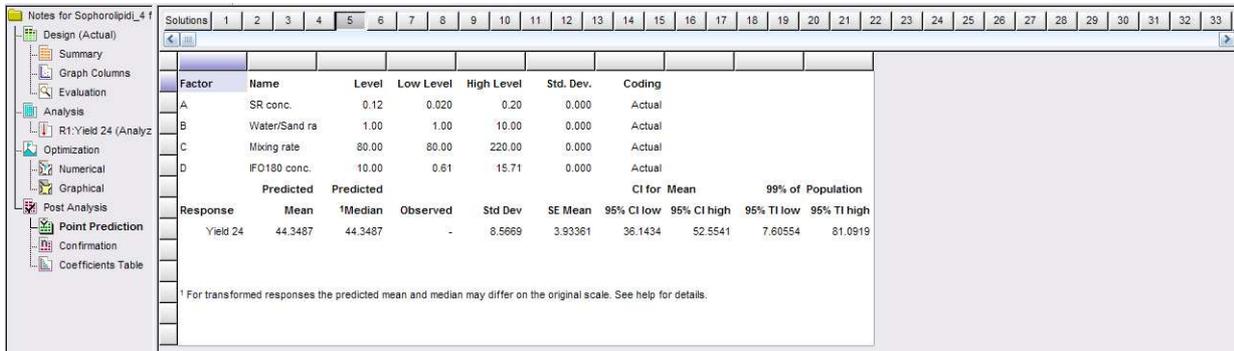


Fig. 6.18 Esempio di *post prediction* in un punto della superficie di risposta

Confirmation – dopo aver eseguito l'ottimizzazione del modello è possibile richiedere la conferma di una condizione sperimentale definita. Ripetendo la prova sperimentale nelle condizioni definite n volte ed inserendo i relativi dati, l'applicativo calcola la media/mediana dei valori inseriti e relativo intervallo di confidenza di predizione, la cui ampiezza dipende da n.

Coefficient table – riassunto dei coefficienti del modello e dei relative *p-values* (fig.6.19)

Response	Intercept	A	B	C	D	AB	AD	CD	A^2	D^2
Yield 24	59.3623	5.11418	5.83889	10.0041	-26.5298	2.85625	3.04286	3.40465	-15.2484	-17.1001
p values		0.0234	0.0090	0.0001	< 0.0001	0.1973	0.2818	0.2301	0.0035	0.0614
Legend		p < .01	.01 <= p < .05	.05 <= p < .10	p >= .10					

Fig. 6.19 Esempio di coefficienti e *p-values*

Obiettivi della sperimentazione

Questo studio pone come obiettivo la sperimentazione di una tecnica di bonifica ecocompatibile, finalizzata all'abbattimento degli idrocarburi del petrolio dalle sabbie, che sono state contaminate in laboratorio con un combustibile navale (IFO180). A tal fine la tecnica *ex situ* di lavaggio dei suoli (*soil washing*) prevede l'estrazione degli idrocarburi dalla matrice solida in refluo acquoso. Il fluido di lavaggio è in genere una soluzione acquosa additivata di agenti di sintesi. In questo studio si è inteso sperimentare agenti surfattanti/mobilizzanti biogenici e surfattanti microbici, a ridotto impatto ambientale e biodegradabili. L'obiettivo iniziale è stato di selezionare fra gli agenti testati (cinque di origine animale e vegetale, quattro detergenti commerciali di origine vegetale e tre surfattanti microbici) quelli più performanti in termini di rimozione percentuale degli idrocarburi totali presenti in IFO180 dalle sabbie contaminate. Il successivo obiettivo è consistito nella ottimizzazione del processo di *soil washing*, utilizzando i tre agenti selezionati (Lecitina disoleta (SL) – prodotto commerciale SOLECT™; hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPB-CD) – prodotto commerciale con elevato carattere idrofilico e soforolipidi (SR) – surfattante microbico) che presentano percentuali di rimozione confrontabili o pari al 70% di quelle mostrate dal surfattante sintetico (Triton X-100). Sono state studiate le condizioni di *washing*, variando i parametri operativi ritenuti influenti sulla rimozione degli idrocarburi totali, nel dominio operativo di interesse: A - concentrazione del surfattante; B - rapporto acqua/suolo utilizzato nel reattore; C - velocità di miscelazione del reattore; D - concentrazione dell'inquinante nelle sabbie (IFO180). Tramite approccio *RSM* (Response Surface Methodology) con il supporto del software statistico *Design-Expert* (ver.9), è stata applicata ANOVA alle prove sperimentali relative al *washing* dopo 24 ore di processo, per ogni agente di interesse. L'obiettivo raggiunto è stato la determinazione di modelli predittivi in grado di evidenziare le relazioni esistenti fra i parametri di processo, caso per caso, e di valutare le condizioni operative ottimali. Tali condizioni hanno mirato alla massimizzazione delle rese di rimozione in termini di idrocarburi totali dell'IFO180 dalle sabbie contaminate, mantenendo tutti gli altri parametri di processo (A, B, C) nel range operativo. Questa ottimizzazione è stata prevista per diversi livelli di contaminazione delle sabbie. Un ulteriore criterio di ottimizzazione ha previsto le stesse regole, ma minimizzando il parametro B, cioè i consumi di acqua (riduzione dei costi operativi e di gestione dei volumi del refluato da trattare a seguito del *soil washing*) In corrispondenza delle condizioni operative ottimali, si è inoltre valutata la % di rimozione dell'inquinante in termini di *IPA*

(idrocarburi policiclici aromatici) che rappresenta la frazione maggiormente tossica/cancerogena di IFO180.

Infine si è applicata una ulteriore sperimentazione alla lecitina di soia disoleata (SL) – prodotto commerciale SOLEC™- agente maggiormente performante nella rimozione degli idrocarburi totali dalle sabbie. In questo caso si sono mantenute fisse le condizioni ritenute ottimali, sulla base delle risultanze pregresse, per i parametri A (concentrazione di SL), C (consumi di energia) e D (massimi livelli di contaminazione delle sabbie), inserendo nel processo solo due variabili : A - rapporto acqua/suolo; B – tempo. In tal modo è stato possibile disegnare la superficie di risposta in grado di massimizzare le rese, mantenendo un buon compromesso fra i consumi A e B, cioè consumi di acqua e durata del processo.

Parte di materiali e metodi

~

Per riprodurre il processo di *washing*, in scala di laboratorio, si è scelto di utilizzare sabbie contaminate da IFO180 in laboratorio, a concentrazioni definite, a cui è stato applicato il *washing* utilizzando agenti mobilizzanti/surfattanti di origine biogenica o surfattanti microbici, complessivamente non tossici e biodegradabili. Per preparare soluzioni di IFO180, gli estratti organici dalle sabbie, soluzioni di standard interni, si è fatto uso di solventi e standard interni. Di seguito, oltre alla provenienza dei materiali utilizzati (*cap.7*), vengono descritti i protocolli sperimentali messi a punto per il trattamento dell'inquinante IFO180, la contaminazione delle sabbie, il processo di *washing*, le procedure di estrazione dalle sabbie e dal refluo acquoso degli idrocarburi totali, e di analisi chimica degli idrocarburi totali, n-alcane ed IPA (*cap.8*).

7. Materiali

7.1 Sabbie utilizzate

I campioni di sabbie, utilizzati in laboratorio, provengono dall'area costiera di Ravenna (Italia). Dalla vagliatura delle sabbie (< 2mm) la matrice è stata classificata come sabbia, sulla base della classificazione USDA (fig. 7.1). Il contenuto del carbonio organico è stato stimato <1% (determinazione del carbonio organico con metodo Sprinter-Klee), dato in accordo con la matrice sabbiosa; ed il pH ≈7.2 (metodo potenziometrico).

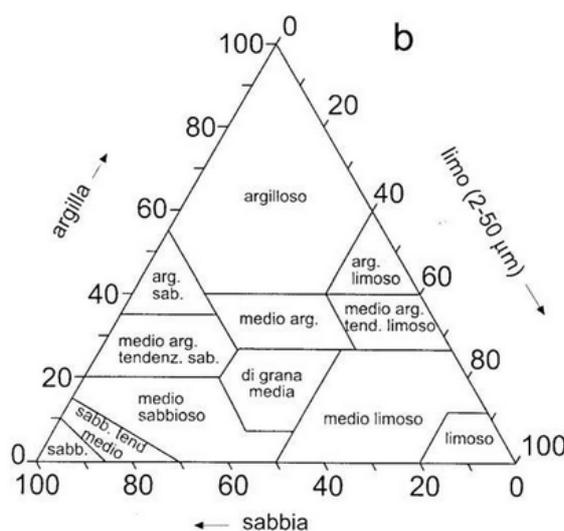


Fig. 7.1 triangolo della tessitura del suolo riferito alla classificazione USDA

7.2 IFO180

L'IFO180, carburante per navi, è stato fornito dalla Shell. La qualità dell'olio combustibile per uso navale è regolamentata a livello mondiale dalla norma ISO8217. Nella tabella 7.1 vengono riassunte le caratteristiche principali dell'IFO180, in particolare, quello prodotto dalla Shell, utilizzato nel nostro studio.

L'IFO180 è composto per l'80-92% da residui ad alta viscosità e per il 5-20% da distillati (IMO, <http://www.imo.org/>). La composizione chimica del residuo è abbastanza variabile, solitamente l'IFO180 è caratterizzato da lunghe catene di idrocarburi alifatici dal C10 fino al C40, cicloalcani e aromatici. Queste frazioni costituiscono la parte apolare. Inoltre il residuo di raffinazione contiene asfalteni, presenti allo stato solido e tendenzialmente idrofobici. Le resine e asfalteni sono costituiti anche da composti eterociclici con zolfo,

azoto e ossigeno che rappresentano la frazione polare e più pesante di IFO180. Sono inoltre presenti tracce di metalli (vanadio). Nell' IFO180 sono presenti idrocarburi policiclici aromatici (IPA), tipicamente l'1.5%, e tracce di benzo[a]pirene allo 0.2% (Material Safety Data Sheet Fuel Oil, Tesoro 2012). A causa della elevata viscosità di IFO180, questo prodotto viene opportunamente pretrattato, il t.q. viene disciolto in una soluzione esano:dicloromentano (1:20) *overnight*, sotto cappa; in tal modo il prodotto è trattabile e perde la frazione più volatile di idrocarburi, simulando il naturale processo di *weathering* che subisce una macchia di petrolio quando viene rilasciata in mare e raggiunge le coste.

Densità	0.94 - 0.97	kg/l
Viscosità cinematica (50°C)	180	cSt
Tensione di vapore (25 °C)	210	Pa
Solubilità (in acqua) (25 °C)	10-30	ppm
Zolfo totale % (p/p)	4	
Vanadio	200	mg/kg
Sodio	50	mg/kg
Ceneri (%)	0.10	
Alluminio+silicio	80	mg/kg
Pour Point	30	°C
Flash point, minimo	60	°C

Tab. 7.1 Caratteristiche principali dell' IFO180 (ISO8217, 2005)

Ai fini della nostra sperimentazione è stata posta l'attenzione sulla analisi della componente idocaburi totali (*HC*), frazione n-alcani e IPA presenti in IFO180.

L'interesse per tali famiglie di composti nasce dalle caratteristiche ambientali: tossicità, cancerogenicità e biodegradabilità. Si dettagliano gli aspetti di interesse per ogni famiglia di composti, sia normativi che scientifici.

7.3 Agenti testati

Per i test iniziali di *washing* sono stati impiegati diversi agenti surfattanti e mobilizzanti biogeni e surfattanti microbici, le cui caratteristiche sono state precedentemente descritte (*cap. 5*). I due preparati a base di soforolipidi, isolato da *Candida sp.*, e di ramnolipidi, isolati da *Pseudomonas aeruginosa*, sono stati gentilmente forniti dal gruppo di ricerca del

Prof. Banat dell'Università di Ulster (Irlanda); i due prodotti commerciali a base di lecitina di soia, denominati SOLEC™ F (Solec F), preparato disoleato di lecitina di soia (ditta Solae) con $HLB = 7$ e Textrol F-10, lecitina di soia grezza con $HLB = 4$. Le miscele di β -ciclodestrine sono, una più idrofila, le idrossipropil- β -ciclodestrine (HPB-CD) fornite dalla Amaizo e una più idrofoba, commercializzata col nome RAMEB (*randomly methylated β -cyclodextrins*). In aggiunta sono stati testati quattro prodotti di pulizia commerciali di origine vegetale (SuperSolvSafetySolvent, SC1000, Aircraft Cleaner, OmniBrite Acid Cleaner) forniti dalla ditta BioBased Europe e un agente solubilizzante di origine animale, gli acidi biliari bovini (BB), a maggior contenuto di acido colico. Infine Triton X-100 (ditta Dow), surfattante sintetico, utilizzato come riferimento per la sua notevole capacità detergente, ma ad elevato impatto ambientale.

7.4 Prodotti e reagenti impiegati

Per preparare le soluzioni di IFO180, estrarre il contaminante dalle sabbie e analizzare i campioni in GC, sono stati utilizzati principalmente esano (Carlo Erba, Italia), acetone (Sigma-Aldrich - Francia), DCM – diclorometano (J.T.Backer - Olanda), diversamente miscelati. Gli standard interni utilizzati per valutare il recupero nelle fase di estrazione dalle sabbie delle diverse frazioni del petrolio (*HC*, n-alcani e *IPA*) sono L'o-terfenile (otf) e il C10, forniti dalla ditta Ultra Scientific (North Kingstown, RI, USA). Le due miscele di standard per la caratterizzazione degli n-alcani e *IPA*, rispettivamente *c10c40 hydrocarbon Standard* e *Aromatic hydrocarbon Standard*, sono state anch'esse fornite dalla ditta Ultra Scientific. Sono inoltre state utilizzate due precolonne, la prima per purificare il campione di estratto organico, qualora necessario (cartuccia Florisil - Sigma-Aldrich - Francia), la seconda per separare la frazione *IPA* dagli idocarburi totali (cartuccia Upti - Clean SI/CN, in silica/cyanopropyl - SiO_2/C_3-CN , 1.0/0.5 g - Stepbio srl).

8. Protocolli sperimentali

8.1 Contaminazione delle sabbie con IFO180

Per eseguire i test di *screening* la sabbia è stata contaminata con IFO180 alla concentrazione di 5 g/kg, mentre nel secondo step (ottimizzazione dei parametri del *washing*) sono state utilizzate sabbie contaminate con IFO180 a diverse concentrazioni, nell'intervallo tra 0.5 – 20 g/kg. La sabbia, dopo essere stata essiccata sotto cappa per alcuni giorni, è stata vagliata con un setaccio con maglie di 0.2 cm e conservata a temperatura ambiente. La vagliatura è stata condotta al fine di rimuovere pietre, resti di piante e altro materiale grossolano, che solitamente risulta non contaminato e rende inefficace il processo di *soil washing* (USEPA, 2007). In seguito, le sabbie, vagliate ed essiccate, sono state contaminate con IFO180.

A causa della elevata viscosità di IFO180, questo prodotto è stato opportunamente pretrattato, disciolto in una soluzione esano:diclorometano (1:20) *overnight*, sotto cappa; in tal modo il prodotto è risultato trattabile perdendo la frazione più volatile di idrocarburi, simulando il naturale processo di *weathering* che subisce una macchia di petrolio quando viene rilasciata in mare e raggiunge le coste.

Per eseguire i *washing* relativi alle prove di *screening* è stato preparato 1.6 kg di sabbie contaminate con IFO180 alla concentrazione di 5 g/kg, miscelando 400 g di sabbia pulita (25%) con 200 ml di soluzione di L'IFO180 (40 g/l) in esano:diclorometano (1:20). La miscela trattata *overnight* sotto cappa, al fine di distribuire omogeneamente IFO180 nella matrice sabbiosa, ha raggiunto la completa vaporizzazione del solvente (*weathering*). A seguire è stato aggiunto il restante quantitativo di sabbie pulite (75%).

Successivamente, per il secondo set di esperimenti (ottimizzazione del processo di *washing*), è stato preparato 1kg di sabbie contaminate con IFO180 alla concentrazione di 20 g/kg, miscelando 250 g di sabbia con 250 ml di soluzione di L'IFO180 (80 g/l) in esano:diclorometano (1:20), con lo stesso procedimento sopradescritto, quindi è stato aggiunto il restante quantitativo di sabbie pulite. La sabbia così ottenuta, con una contaminazione di 20 g/kg, è stata omogeneamente miscelata, successivamente sono state aggiunte differenti quote di sabbia pulita per ottenere sabbie contaminate a differente concentrazione di IFO180 (nell'intervallo 0.5-20 g/kg). I campioni di sabbie diversamente contaminati, sono stati conservati in bottiglie sigillate di vetro *Pirex* per prevenire

l'evaporazione delle componenti più leggere e posti in camera fredda. L'utilizzo delle sabbie contaminate nelle prove di *washing* è avvenuto in tempi brevi, il tipo di sperimentazione svolta si può quindi considerare applicabile a contaminazioni non datate.

8.2 Estrazione degli idrocarburi dalle sabbie

La fase solida (sabbia) campionata durante il processo di *washing*, è stata trattata ed analizzata, per valutare la quantità percentuale di idrocarburi totali (*HC removal %*) rimossa dalle sabbie durante il trattamento, ovvero biodisponibile nel refluo acquoso. È stata inoltre valutata la quantità percentuale di n-alcani rimossa (*n-alcane removal %*) e di *IPA* (*IPA removal %*).

Le sabbie sono state analizzate prima di essere trattate con il *washing*, al fine di conoscere l'effettiva contaminazione presente in termini di idrocarburi totali e poter quindi calcolare la percentuale di rimozione dopo il lavaggio. Tale contenuto di *HC* costituisce il punto al tempo zero della procedura di *washing*. Sulle sabbie contaminate è stata effettuata l'estrazione solido-liquida (*SPE - solid phase extraction*) con una miscela di solventi organici. Gli idrocarburi totali di IFO180 presenti negli estratti organici, sono stati quindi determinati con analisi al gascromatografo.



Fig. 8.1 Campioni essiccati su filtro sotto cappa *overnight*

Ciascun campione di sabbia prelevato durante il *washing*, è stato pesato ed essiccato su filtro sotto cappa *overnight*. Ogni campione di sabbia è stato opportunamente siglato e conservato in camera fredda. Per l'analisi degli *HC* è stata prelevata da ogni campione una aliquota di 5 g, posta in bottigliette *Pirex* (100 ml) e sospesa in una soluzione (5 ml) di acetone:esano (1:1), a cui sono stati aggiunti due standard interni, necessari per valutare il

recupero nella procedura di estrazione, prassi richiesta per la corretta analisi quantitativa degli idrocarburi. Questo espediente permette di compensare gli errori derivanti da perdita di analita durante le fasi di trattamento del campione e di analisi, assumendo che lo standard interno subisca una perdita analoga. Per questa ragione lo standard interno è un composto che deve comportarsi in maniera simile alla specie chimica di interesse nei campioni (ma assente nell'analita), dato che gli effetti dovuti alla preparazione del campione (perdite o concentrazioni casuali) sullo standard interno e sull'analita, devono essere comparabili. Il rapporto fra i due segnali (analita/standard interno) viene poi usato per ottenere la concentrazione dell'analita al netto del recupero. Gli standard interni utilizzati sono stati C10 (idrocarburo alifatico lineare, facente parte della frazione n-alcani ma assente nell'analita), alla concentrazione di 10 ppm e *o*-*ter*-*fenile*, idrocarburo policiclico aromatico, facente parte della frazione *IPA*, ma assente nell'analita) pari 8 ppm. Per la preparazione di ogni estrazione sono stati aggiunti ai 5 g di sabbia contaminata posti in bottiglietta Pirex, 0.25 ml della soluzione madre di c10 (200 ppm, diluizione 1:20 in 5ml, 10 ppm C10) e 0.10 ml dalla soluzione madre di *o**t**f* (400 ppm, diluizione 1:50 in 5ml, 8 ppm *o**t**f*); oltre a 4.65 ml di soluzione esano:acetone (1:1). Per conoscere la concentrazione precisa dei due standard interni aggiunti ai campioni di sabbia, sono state eseguite, a parte, le stesse diluizioni in solvente organico (bianco), partendo dalle soluzioni madre, poi analizzate al GC. Le bottigliette *Pirex* sono state accuratamente sigillate e poste in un bagno agli ultrasuoni per 15 minuti (a caldo), è seguita agitazione *overnight* a 150 rpm e successivamente le bottigliette sono state riposte nel bagno ultrasonico per 15 minuti (a freddo). L'estratto organico contenente petrolio-solvente è stato completamente prelevato dalla bottiglietta *Pirex* con pipetta *Pasteur*, e opportunamente posto in *vials*, siglato e conservato in camera fredda; una aliquota analizzata al GC-FID.

La scelta di utilizzare esano:acetone (1:1) come solvente per l'estrazione degli idrocarburi del petrolio dalle sabbie, è stata principalmente basata sul fatto che l'esano è un solvente altamente apolare (affine agli idrocarburi del petrolio), a bassa tossicità e più reperibile rispetto ad altri solventi. Diversi autori hanno infatti utilizzato in passato l'esano nell'estrazione dei prodotti petroliferi dai suoli (Urum *et al.*, 2003). L'acetone, nel contempo, riesce a portare in soluzione la frazione di IFO180 costituita da resine e asfalteni, maggiormente polari. In fase di definizione del protocollo di estrazione del contaminato dalle sabbie sono stati eseguiti diversi *tests*, utilizzando miscele di solventi diversamente costituite: esano; esano:acetone (1:1); esano:acetone (9:1); diclorometano;

esano:diclorometano (1:1) ed esano:diclorometano (9:1); allo scopo di scegliere la miscela più efficace per l'estrazione degli idrocarburi totali dalle sabbie contaminate. A parità di efficacia si è scelta la miscela composta dai solventi meno tossici.

Separazione degli IPA dall'estratto organico

Alcuni estratti organici sono stati ulteriormente trattati (cap.11), allo scopo di separare la frazione alifatica, da quella aromatica; avendo come principale obiettivo quello di stimare la percentuale di *IPA* che il *washing* è in grado di rimuovere da IFO180. Tale frazione è stata stimata quali-quantitativamente con il supporto di colonnine separative, che permettono la separazione fisica delle due frazioni. Sono state utilizzate cartucce Upti - Clean Si/CN, in silica/cyanopropyl ($\text{SiO}_2/\text{C}_3\text{-CN}$, 1.0/0.5 g) per frazionare gli alifatici lineari dagli aromatici (fig. 8.4). La cartuccia è stata preconditionata con 2x4 ml di esano prima dell'uso. Il carico ottimale per ottenere un buon frazionamento è di 5/10 mg di *HC* totale presente in IFO180. Il campione caricato nella cartuccia, dopo il preconditionamento, è stato fatto eluire lungo la colonnina in pressione, con flusso di $1,5 \text{ ml min}^{-1}$ seguita da caricamento di 4 ml di esano (in questa fase eluisce dalla colonnina la frazione alifatica) e a seguire di 4 ml diclorometano/esano (3:1) (in questa fase eluisce dalla colonnina la frazione aromatica) (Alzaga *et al.*, 2004, Zeyu *et al.*, 2011).



Fig.8.4 cartucce Upti - Clean Si/CN, per frazionare gli alifatici lineari dagli aromatici

Le due aliquote sono state raccolte separatamente, poste in vials, siglate e conservate in camera fredda; una aliquota analizzata al GC-FID. Il metodo cromatografico comprendeva la retta di calibrazione *IPA*, per il riconoscimento e la quantificazione degli stessi (par.8.6).

8.3 Estrazione degli idrocarburi dal refluo acquoso

La fase liquida (refluo acquoso) campionata durante il processo di *washing*, è stata trattata con solvente organico ed analizzata al GC, per valutare la quantità percentuale di idrocarburi totali (*HC removal%*) biodisponibile nel refluo acquoso. Tale percentuale, calcolata per ogni campione di refluo acquoso prelevato durante il *washing*, è stata confrontata con quella calcolata sulla base degli idrocarburi totali analizzati sui rispettivi campioni di sabbia, al fine di verificare il bilancio di massa. Il controllo del bilancio di massa è stato eseguito gli agenti di origine vegetale ed animale utilizzati nel primo *screening*, per ogni campione effettuato durante la sperimentazione. Il refluo acquoso campionato è stato estratto con un ugual volume di solvente organico (esano), in grado di rompere l'emulsione acqua-surfattante-idrocarburi formatasi durante il processo di *washing*. L'estrazione liquido-liquido si assume essere completa; il solvente organico è stato infine analizzato al GC, utilizzando il metodo per gli idrocarburi totali.

8.4 Analisi gas-cromatografica (GC-FID) degli idrocarburi totali del petrolio (HC) e dei n-alcani

L'estratto organico, ottenuto dalla fase solida, è stato sottoposto ad analisi gas-cromatografica per la caratterizzazione e quantificazione degli idrocarburi idrofobi presenti nell'IFO180. Preventivamente all'analisi al GC-FID, alcuni campioni sono stati purificati con l'ausilio delle colonnine di *Fluorisil*; in dettaglio si tratta dei campioni relativi alle prove con le lecitine di soia (Solec F e Textrol F10), operazione necessaria causa interferenze cromatografiche generate dallo stesso surfattante. In questo caso, il refluo organico è stato purificato su precolonnina di *Fluorisil* e quantitativamente raccolto in vials. L'analisi degli idrocarburi totali è stata effettuata impiegando un gas-cromatografo (6890N serie, Agilent Technologies), equipaggiato con una colonna capillare HP-5 (lunghezza 30m x0.25 mm ID, 0.25 μ m df), e con iniettore di tipo *Split-Splitless* (operante in splitless), tenuto mediante controllo programmato, a una temperatura costante di 270 °C. Un rivelatore a ionizzazione di fiamma FID - *Flame Ionization Detector* (Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA, USA) è stato utilizzato per la determinazione qualitativa e quantitativa degli idrocarburi estratti dalle sabbie prima e dopo il trattamento di lavaggio. Come gas di trasporto è stato utilizzato azoto e il volume di iniezione è stato pari a 1 μ l. Le condizioni operative adottate per tutti i campioni sono state le seguenti (ISPRA, 2011; Eija *et al.*, 2010; Zhendi *et al.*, 2009):

- iniettore di tipo *splitless* alla pressione di 19 psi e flusso di 51.7 ml min⁻¹
- pressione in entrata del gas alla colonna: 19 psi
- portata del gas in uscita: 1.9 ml min⁻¹
- rampa di temperatura rappresentata in tabella 8.1:

	Temperatura iniziale del forno	Tempo	ΔT	Temperatura finale
Inizio		1 minuto		40 °C
Rampa 1	40 °C	17 minuti	10 °C/min	200 °C
Rampa 2	200 °C	53 minuti	20 °C/min	320 °C

Tab. 8.1 : Rampa di temperatura nel metodo HC totali.

La durata di ogni singola analisi è stata di 53 minuti.

Le analisi gas-cromatografiche hanno dato origine ad un tracciato della risposta del rivelatore FID in funzione del tempo di ritenzione delle sostanze interessate. La cromatografia permette di identificare la composizione del campione, conoscendo a priori il tempo di ritenzione delle sostanze interessate.

Procedura: la colonna cromatografica viene pulita mediante iniezione di acetone e di esano. La rampa di temperatura viene impostata secondo i valori riportati nella tabella precedente (tab. 8.1). Si attende la stabilizzazione dello strumento e si inietta un campione di esano per la pulizia della colonna e una corsa senza campioni per ottenere il rumore dello strumento. Vengono poi iniettati i vari estratti organici, precedentemente posti in vials da 2 ml, e al termine dell'analisi si inietta nuovamente esano per la pulizia finale della colonna.

Per la determinazione degli HC totali presenti nell'IFO180 è stata usata l'area totale del cromatogramma. Tale area totale è stata assunta come riferimento per costruire la retta di calibrazione (concentrazione HC totale in funzione dell'area cromatografica totale). La retta di calibrazione è stata periodicamente ricalcolata; nell'intervallo di concentrazione 0.1-20 g/l, con $R^2 \geq 0.99$. Per il calcolo dell'area dei singoli picchi cromatografici si è utilizzata la modalità *baseline* con ottima correlazione lineare ($R^2 \geq 0.99$).

Per la determinazione della frazione alifatica n-c10c40, presente nell'IFO180 viene utilizzato come standard esterno la miscela *c10c40 Standard (Ultra Scientific)*. E' stata

periodicamente eseguite l'opportuna calibrazione utilizzando la miscela c10c40; nell'intervallo di concentrazione 0.01-50 ppm, con $R^2 \geq 0.99$.

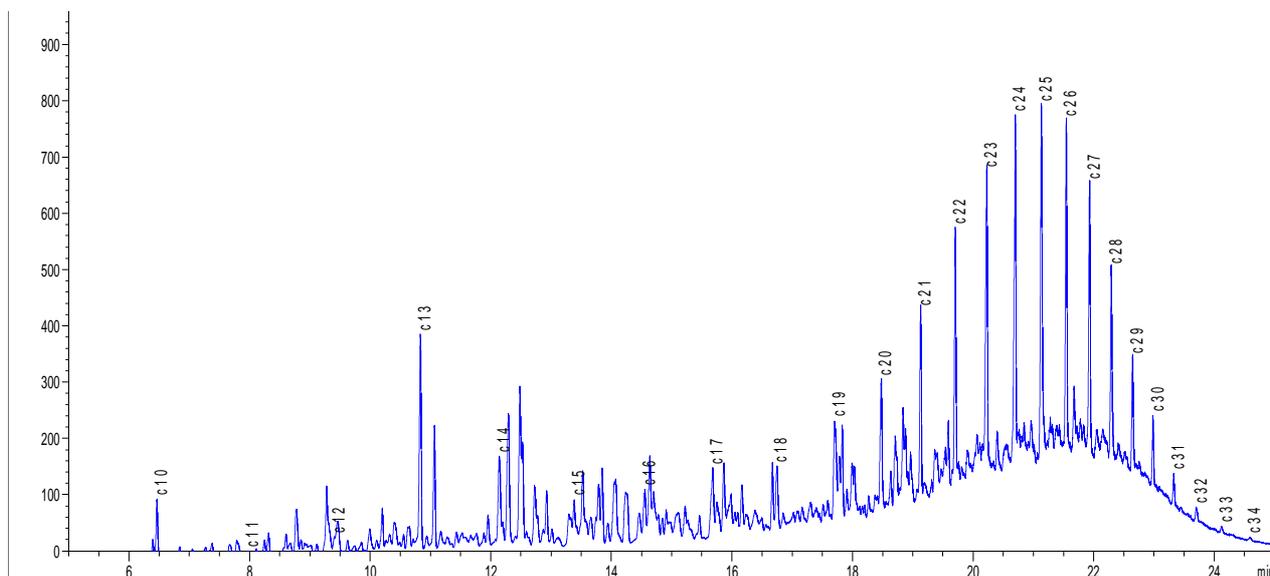


Fig.8.2 Cromatogramma degli HC totali di IFO180 (13g/l) – riconoscimento n-alcani

In fig. 8.2 viene riportato un esempio di cromatogramma di IFO180 (13 g/l), in cui sono indicati i picchi degli n-alcani, quantificabili nell'intervallo c11-c32. Si evidenzia che il picco c10 corrisponde allo standard interno aggiunto alla miscela.

8.5 Calcolo della rimozione di idrocarburi totali dalle sabbie dopo lavaggio

Nella prima fase di *screening* i *washing* sono stati condotti in doppio per ciascun agente testato, mentre nella fase di ottimizzazione del processo si è effettuato un singolo *washing* per ognuna delle 30 prove previste dal piano sperimentale. Nel secondo caso le estrazioni con solvente da ogni campione di sabbia prelevato (che rappresenta la fase della procedura maggiormente soggetta ad errore casuale, dovuta alla intrinseca disomogeneità del campione solido e alla astrazione solido-liquido difficilmente completa) sono state condotte in doppio, nella quasi totalità dei casi, analogamente alla estrazione con solvente sulle sabbie inizialmente contaminate con IFO180 (tempo zero). La riproducibilità è stata stimata dalla deviazione standard delle medie di rimozione degli idrocarburi totali. La resa % di idrocarburi totali presenti in IFO180 (HC), rimossi dopo il lavaggio è stata quindi determinata tramite la seguente equazione:

$$HC \text{ removal } (\%) = [(C_i - C_f) / C_i] * 100$$

dove C_i è la concentrazione iniziale di *HC* contenuto nelle sabbie contaminate (g/kg); C_f è la concentrazione residua di *HC* presente nelle sabbie dopo il *washing* (g/kg).

Le singole concentrazioni (C_i e C_f), sono state preventivamente corrette per il recupero, rapporto fra $C(std_i)/C(std_f)$ – rapporto fra la concentrazione dello standard interno iniziale e finale. Lo standard interno utilizzato è *c10*. Le percentuali di recupero durante la procedura di estrazione sono state valutate nell'intervallo 80-120 %.

8.6 Analisi gas-cromatografica (GC–FID) degli IPA

I due estratti organici relativi alla frazione alifatica ed aromatica, ottenuti dalla separazione con le colonnine Upti - Clean SI/CN, sono stati sottoposti ad analisi gas-cromatografica per la caratterizzazione e quantificazione degli n-alcani e degli *IPA*. Tale procedura è stata applicata solo ai campioni relativi ai *washing* eseguiti per la validazione ed ottimizzazione del modello (cap 11). L'analisi è stata effettuata con stesso GC-FID utilizzato per l'analisi degli idrocarburi totali (*par.8.5*), analogamente si è utilizzata la stessa procedura e manutenzione. Il metodo utilizzato per analizzare la frazione *IPA* è stata modificato unicamente per la rampa come di seguito riportato (*tab. 8.2*) (ISS, 2001):

	Temperatura iniziale del forno	Tempo	ÄT	Temperatura finale
Inizio		3 minuto		40 °C
Rampa 1	40 °C	10.5 minuti	20 °C/min	190 °C
Rampa 2	325 °C	33 minuti	20 °C/min	6 °C

Tab. 8.2 : Rampa di temperatura impostata sul gas-cromatografo nel metodo IPA

La durata di ogni singola analisi è di 33 minuti.

Per la determinazione quali-quantitativa degli *IPA* sono stati utilizzati come standard esterni la miscela *Aromatic hydrocarbon Standard (Ultra Scientific)* e come riferimento interno *o-ter-fenile (o-ter phenyl solution – Utra Scientific)*. Per il calcolo dell'area dei singoli picchi cromatografici è stata impostata la modalità *baseline*. Per l'analisi quali-quantitativa sono state periodicamente costruite le opportune rette di calibrazione delle due miscele di standard esterni; nell'intervallo di concentrazione 0.1-10 ppm ($R^2 \geq 0.99$).

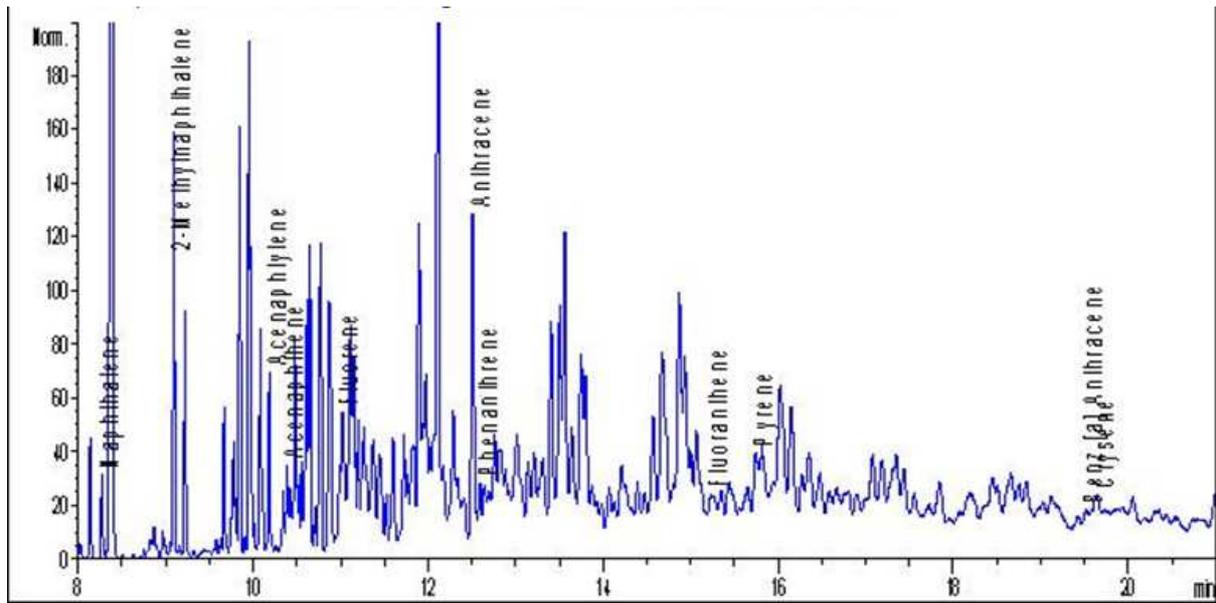


Fig.8.3 Cromatogramma della frazione IPA di IFO180 (13g/l)

8.7 Calcolo della rimozione di IPA dalle sabbie dopo il soil washing

Le percentuali di rimozione degli IPA dalle sabbie contaminate sono state valutate solo in alcuni casi nella fase di ottimizzazione del processo (cap.11), effettuando per questi casi studio dei *washing* in doppio. La riproducibilità è stata stimata dalla deviazione standard delle medie di rimozione degli IPA. La resa % di IPA presenti in IFO180, rimossi dopo il lavaggio è stata quindi determinata tramite la seguente equazione:

$$IPA \text{ removal } (\%) = [(C_i - C_f) / C_i] * 100$$

dove C_i è la concentrazione iniziale di IPA contenuto nelle sabbie contaminate (ppm); C_f è la concentrazione residua di IPA presente nelle sabbie dopo il *washing* (ppm).

Le singole concentrazioni (C_i e C_f), sono state preventivamente corrette per il recupero, rapporto fra $C(std_i)/C(std_f)$ – rapporto fra la concentrazione dello standard interno iniziale e finale. Lo standard interno utilizzato è *off*. Le percentuali di recupero durante la procedura di estrazione sono state valutate nell'intervallo 80-120 %.

8.8 Soil washing: piano sperimentale

La prima fase del piano sperimentale è stata dedicata allo *screening* degli agenti mobilizzanti, surfattanti biogenici e microbici, scelti per essere testati nelle prove preliminari di *washing*. Come già esposto (cap. 7), gli agenti testati sono stati numerosi e

scelti fra una vasta gamma di sostanze di interesse sulla base di alcuni criteri: atossicità, biodegradabilità e disponibilità a basso costo. I *washing* per lo *screening*, svolti in doppio per ogni agente, in condizioni operative medie (concentrazione dell'agente, rapporto suolo/acqua, velocità di *mixing*, concentrazione di IFO180 nelle sabbie contaminate, 48 ore di osservazione) hanno coinvolto schematicamente tre raggruppamenti di composti:

- agenti mobilizzanti e surfattanti di origine vegetale e animale - SOLEC™ F (Solec F), Textrol F-10, idrossipropil- β -ciclodestrine (HPB-CD), RAMEB (*randomly methylated β -cyclodextrins*) e acidi biliari bovini (BB)
- quattro prodotti di pulizia commerciali di origine vegetale (SuperSolvSafetySolvent, SC1000, Aircraft Cleaner, OmniBrite Acid Cleaner) forniti dalla ditta BioBased Europe
- tre surfattanti microbici - soforolipidi (SR) e ramnolipidi (RL) e la surfattina SF
- Triton X-100 (TX), surfattante di sintesi



Fig.8.5 Esempio di *washing* di Solec F nelle diverse condizioni operative

L'obiettivo di questa fase sperimentale è stato di selezionare gli agenti maggiormente performanti in termini di rimozione percentuale di idrocarburi totali (*HC removal %*). Successivamente si è focalizzata l'attenzione sulla ottimizzazione del processo, utilizzando gli agenti selezionati risultati maggiormente efficienti in condizioni operative medie. E' stato individuato il dominio operativo per ogni parametro di processo ritenuto di interesse (concentrazione del surfattante, rapporto suolo/acqua, velocità di *mixing* e concentrazione di IFO180 nelle sabbie), variando, nelle sperimentazioni di *washing*, la combinazione degli stessi (*fig. 8.5*). Per impostare quali e quante prove di *washing* svolgere, data la numerosità dei fattori in gioco, ci si è avvalsi della metodologia RSM (cap. 8), scegliendo il *DoE* più appropriato al caso studio, al fine di costruire un modello

polinomiale descrittivo del processo predittivo della rimozione percentuale di idrocarburi totali (*HC removal %*). I *washing* relativi alla seconda fase di sperimentazione, come indicato nel *DoE*, sono quindi stati svolti in condizioni operative variabili. Infine, sempre ai fini della ottimizzazione del processo, sono state svolte prove di *washing* in doppio, per ogni agente selezionato, in determinate condizioni operative. Tali prove sono state utili sia per validare il modello matematico, confrontando *HC removal %* sperimentale/calcolato; sia per valutare condizioni di processo ritenute ottimali per il processo (massime rimozioni di contaminante o minimo consumo di acqua).

8.8.1 Screening degli agenti

Per effettuare i test preliminari sulla selezione degli agenti mobilizzanti, surfattanti biogeni e microbici le prove di *washing* sono state eseguite in doppio. Per ogni prova sono stati prelevati 50 g dalla sabbia contaminata alla concentrazione di 5 g/kg e posti in beuta frangiflutti da 1L (Erlenmeyer flasks), portando in sospensione la sabbia con la soluzione acquosa contenente gli agenti già presente in beuta.

Preparazione della soluzione acquosa: sono state preparate beute frangiflutti da 1L, ciascuna contenente 350 ml di acqua deionizzata (rapporto acqua/suolo = 7) in soluzioni al 1% w/v per i seguenti agenti solubilizzanti:

- agenti mobilizzanti di origine vegetale e animale (disoleato di lecitina di soia Solec F, lecitina di soia Textrol F-10, β -ciclodestrine HPB-CD e RAMEB-CD, acidi biliari bovini) agenti di pulizia commerciali a base vegetale (SuperSolvSafetySolvent, SC1000, Aircraft Cleaner, OmniBrite Acid Cleaner) (*cap. 5.2.3*)
- Triton X-100 (concentrazioni tipiche per questo surfattante sintetico, Singh *et al.*, 2007) (*cap. 5.2.2*);

oppure in soluzioni al 0.1 % w/v per:

- biosurfattanti microbici (ramnolipidi e soforolipidi) e surfattine (SF), a causa della loro bassa CMC (5-200 mg/l). (*cap. 5.2.4*)

Le beute sono state sigillate con tappi a vite in Teflon e poste su un agitatore alla velocità di 150 rpm per circa 2h, al fine di garantire la dissoluzione completa degli agenti emulsionanti in acqua. Poiché questa operazione causa la formazione di schiuma sulla

superficie dell'acqua, la miscela è stata tenuta a riposo per qualche minuto ed in seguito è stata aggiunta la sabbia contaminata.

Successivamente, le beute contenenti la miscela di sabbia contaminata e la soluzione di biosurfattante, sono state poste in agitazione alla velocità di 150 rpm, alla temperatura di $20 \pm 2^\circ\text{C}$, per un tempo totale di 48h. I campionamenti sono stati eseguiti a 4, 8, 24 e 48 ore. Per ogni campionamento, sono stati prelevati 10 g di sabbia e 70 ml di refluo, al fine di mantenere costante il rapporto suolo/acqua = 7 fino alla fine del processo.

Complessivamente le condizioni dei *washing* nella fase di screening sono così riassumibili:

- A. conc. agente = 1% w/v; eccetto per soforolipidi, ramnolipidi e surfattine per i quali la conc. agente = 0.1% w/v
- B. rapporto suolo/acqua = 7
- C. velocità di *mixing* = 150 rpm
- D. conc. IFO180 = 5 g/kg

Le sabbie campionate, sono state poste su carta assorbente o in crogiuoli, e fatte asciugare sotto cappa per una notte. Il refluo è stato separato dal residuo solido tramite centrifugazione (4000 rpm, per 15 minuti). I campioni (sabbie e refluo) sono stati conservati in camera fredda.

8.8.2 Ottimizzazione del processo

Sulla base dei risultati ottenuti nei test preliminari sono stati selezionati i migliori biosurfattanti da testare nell'esperimento di ottimizzazione del *washing*. Nelle prove successive, finalizzate alla ottimizzazione del processo, sono state svolte 30 prove di *washing* in singolo, per ogni surfattante selezionato. Il dettaglio sono stati sperimentati i *washing* con lecitina di soia Solec F , β -ciclodestrine HPB-CD e soforolipidi oltre al Triton X-100 e al caso senza l'utilizzo di surfattante. I *washing* con lecitina di soia Solec F e β -ciclodestrine HPB-CD sono stati monitorati alle 4, 8, 24 e 48 ore di processo; nel caso dei soforolipidi e Triton X-100 il monitoraggio è avvenuto alle 24 e 48 ore di processo; infine per il caso senza uso del surfattante alle 24 ore di *washing*.

In dettaglio, sono stati pesati 50 g o 25 g (nel caso delle lecitine di soia Solec F / β -ciclodestrine HPB-CD o soforolipidi / Triton X-100 / bianco, rispettivamente) prelevati da

sabbia contaminata a diversa concentrazione di IFO (nell'intervallo 0.5-20 g/kg, vedi cap. 12). Il sedimento è stato posto in beute frangiflutti da 1L (Erlenmeyer flasks), portandolo in sospensione con la soluzione acquosa contenente gli agenti solubilizzanti.

Preparazione della soluzione acquosa: sono state preparate beute frangiflutto da 1L con volumi variabili di soluzione acquosa a seconda del rapporto acqua/suolo richiesto dalla prova sperimentale (1-10) e diverse concentrazioni di biosurfattante nei seguenti range operativi (per dettaglio singole prove vedi cap.12):

- lecitina di soia Solec F , β -ciclodestrine HPB-CD e Triton X-100 – conc. = (0.5-5% w/v)
- Soforolipidi – conc. = (0.02-0.2% w/v)

Le beute sono state sigillate con tappi a vite in Teflon e poste su un agitatore alla velocità di 150 rpm per circa 2h, al fine di garantire la dissoluzione completa degli agenti emulsionanti in acqua. Poiché questa operazione causa la formazione di schiuma sulla superficie dell'acqua, la miscela è stata tenuta a riposo per qualche minuto ed in seguito è stata aggiunta la sabbia contaminata.

Successivamente, le beute contenenti la miscela di sabbia contaminata e la soluzione di biosurfattante, sono state poste in agitazione a diverse velocità a seconda dell' esperimento da effettuare (nell'intervallo 80-220 rpm per l'esperimento di ottimizzazione del *soil washing*); alla temperatura di $20 \pm 2^\circ\text{C}$, per un tempo totale 48 ore (eccetto per il caso del bianco per il quale il monitoraggio si è fermato alle 24 ore di processo).

I campionamenti sono stati complessivamente eseguiti con le seguenti tempistiche:

- lecitina di soia Solec F , β -ciclodestrine HPB-CD = 24 e 48 ore
- Soforolipidi , Triton X-100 = 24, 48 ore
- Bianco = 24 ore

Per ogni campionamento, sono stati prelevati 10g di sabbia (le estrazioni del contaminante dalle sabbie in questo caso sono avvenute in doppio) e volumi di refluo prelevati variabili, in funzione della prova, al fine di mantenere il rapporto sabbia/acqua costante durante l'intero processo.

Le sabbie campionate, sono state poste su carta assorbente o in crogiuoli, e fatte asciugare sotto cappa per una notte. Il refluo è stato separato dal residuo solido tramite centrifugazione (4000 rpm, per 15 minuti). I campioni di sabbia sono stati conservati in camera fredda.

Infine, per gli esperimenti di validazione/ottimizzazione del processo, sono state eseguite prove in doppio per ogni condizione scelta/calcolata per ogni agente (per il dettaglio vedi *cap.10*). Sono stati pesati 25 g di sabbia contaminata ad una specifica concentrazione di IFO (nell'intervallo 0.5-20 g/kg, vedi *cap.10*). Il sedimento è stato posto in beute frangiflutti da 1L (Erlenmeyer flasks), portandolo in sospensione con la soluzione acquosa contenente gli agenti solubilizzanti.

Preparazione della soluzione acquosa: sono state preparate beute frangiflutto da 1L con volumi variabili di soluzione acquosa a seconda del rapporto acqua/suolo richiesto dalla prova sperimentale (1-10) e della concentrazione di surfattante richiesto dalla singola prova. A seguire le beute sono state sigillate con tappi a vite in Teflon e poste su un agitatore alla velocità di 150 rpm per circa 2h, al fine di garantire la dissoluzione completa degli agenti emulsionanti in acqua. Poiché questa operazione causa la formazione di schiuma sulla superficie dell'acqua, la miscela è stata tenuta a riposo per qualche minuto ed in seguito è stata aggiunta la sabbia contaminata. Successivamente, le beute contenenti la miscela di sabbia contaminata e la soluzione di surfattante, sono state poste in agitazione a diverse velocità a seconda dell' esperimento effettuato (nell'intervallo 80-220 rpm); alla temperatura di $20 \pm 2^\circ\text{C}$, per un tempo totale 24 ore. Per il campione alle 24 ore sono stati prelevati oltre 10 g di sabbia. Le sabbie campionate, sono state poste su carta assorbente o in crogiuoli, e fatte asciugare sotto cappa per una notte. Il refluo è stato separato dal residuo solido tramite centrifugazione (4000 rpm, per 15 minuti). I campioni di sabbia sono stati conservati in camera fredda.

Parte dei risultati della sperimentazione

~

In questa sezione vengono illustrati i dati sperimentali ottenuti. il primo *screening*, effettuato su tutti i gli agenti (*cap.9*) è relativo alle rese di rimozione in termini di idrocarburi totali (*HC*), della frazione alifatica (*n-alcani*) e al bilancio di massa sabbia/refluo; a seguire la parte sperimentale dedicata alla ottimizzazione del processo (*cap.10*), in cui sono illustrati i disegni sperimentali adottati (*DoE*), i modelli matematici predittivi del processo di *washing* e l'ottimizzazione del processo applicata ad ogni caso selezionato. I disegni sperimentali adottati (CCD) sono in funzione di quattro variabili sperimentali prescelte - concentrazione di surfattante (% w/v); rapporto acqua/suolo (v/w); velocità di mixing (rpm) e concentrazione di IFO (w/w) - e una risposta (resa di rimozione percentuale di *HC* dopo 24, 48 ore di trattamento). In dettaglio per i cinque casi studio (*Blank*, TX, Solec F, HPB-CD e SR) vengono descritti : RSM applicato alle 24 ore (analisi statistica della risposta e influenza dei parametri sulla risposta); RSM applicato ad ulteriori tempi (48 ore) qualora analizzati; la validazione sperimentale dei modelli predittivi e l'ottimizzazione dei parametri di processo alle 24 ore secondo criteri selezionati (massima rimozione dell'inquinante minimo consumo di acqua). L'intera procedura (dalla fase di pianificazione all'ottimizzazione) è stata supportata dall'utilizzo del software Design-Expert (versione DX9) di Stat-Ease®, le cui caratteristiche sono state precedentemente illustrate (*cap.6*). Il Cap. 11 è dedicato alla determinazione della frazione *n-alcani/IPA* in IFO180 e alla quantificazione della rimozione percentuale in termini di *IPA* tramite *washing* applicato ai casi sperimentali sviluppati per la validazione/ottimizzazione del modello predittivo; tale determinazione analitica è stata effettuata per i cinque casi studio (*Blank*, TX, Solec F, HPB-CD e SR). Il Capitolo 12 illustra infine i risultati di un ulteriore set di prove di *washing* applicato utilizzando il surfattante Solec F; in questo caso il disegno sperimentale adottato (CCD) è in funzione di tre variabili sperimentali prescelte (rapporto acqua/suolo (v/w); velocità di mixing (rpm) e tempo di trattamento (ore)).

9. Fase di screening degli agenti testati

9.1 Soil washing: fase di screening per selezione degli agenti mobilizzanti/surfattanti biogeni e microbici

Nella prima fase di sperimentazione del *washing* sono stati testati cinque mobilizzanti/surfattanti biogeni di origine animale e vegetale; quattro prodotti mobilizzanti di origine vegetale commerciali e tre surfattanti microbici, in grado di portare in fase acquosa inquinanti organici idrofobi, come gli idrocarburi del petrolio, da sabbie contaminate artificialmente in laboratorio con IFO180. L'efficacia di tali agenti viene paragonata a quella del Triton X-100, tensioattivo sintetico, tossico e recalcitrante, spesso impiegato nel trattamento industriale di *soil washing* (Berselli *et al.*, 2005; Mao *et al.*, 2014; Von Lau *et al.*, 2014).

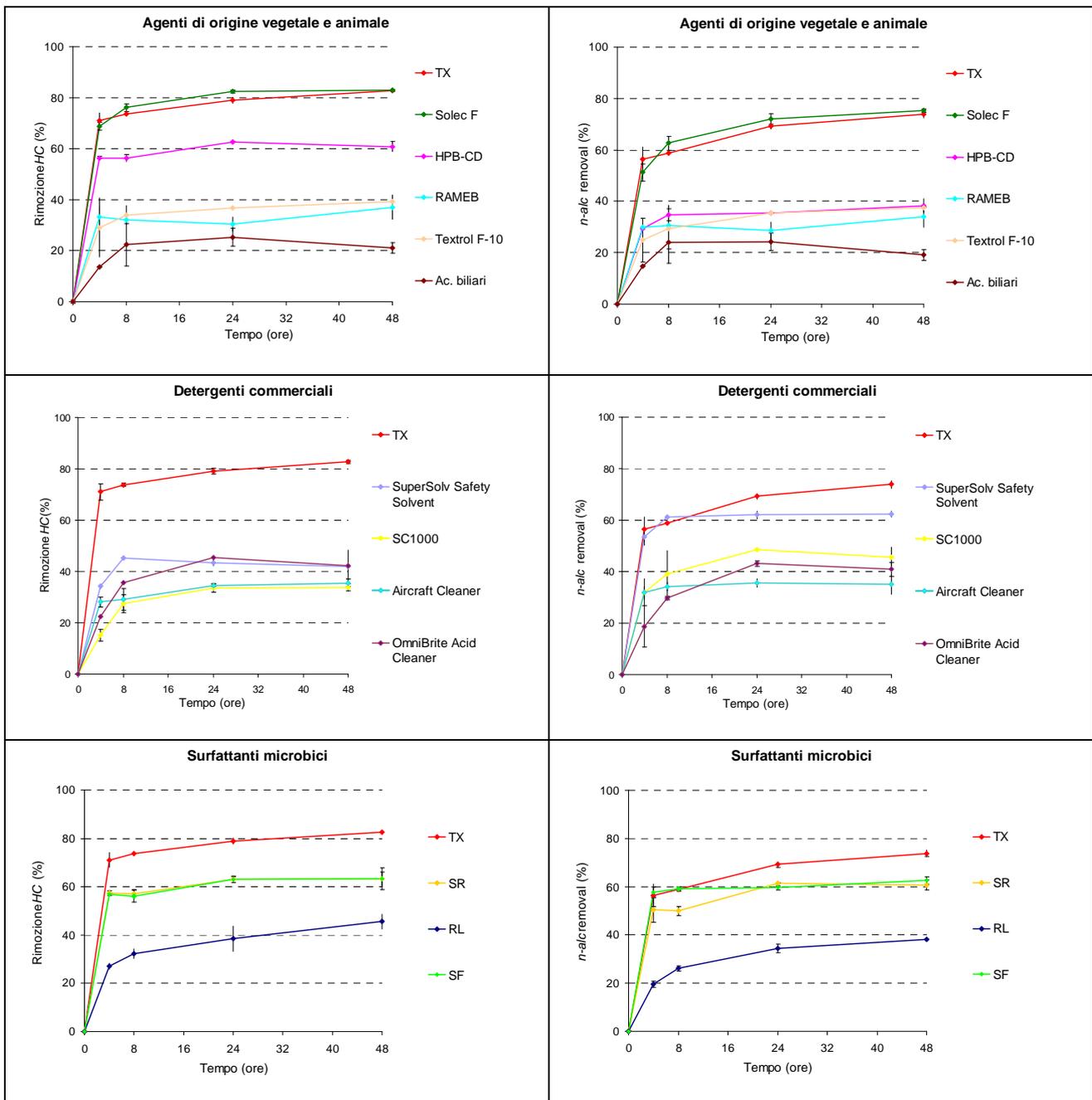


Fig. 9.1 Rimozione degli idrocarburi totali (%) ottenuta con agenti di origine vegetale e animale (a), prodotti di pulizia commerciali (b), biosurfattanti di origine microbica (c) paragonati al Triton X-100

Fig. 9.2 Rimozione degli n-alcani (%) con agenti di origine vegetale e animale (a), prodotti di pulizia commerciali (b) e biosurfattanti di origine microbica (c) paragonati al Triton X-100

Il *washing* realizzato con il surfattante Triton X-100 (TX) ha permesso di rimuovere il 71.0 ± 3.1 % e 82.7 ± 0.5 % degli idrocarburi totali dalla sabbia, dopo 4 e 48 ore, rispettivamente (Fig 9.1). Il TX, impiegato alla concentrazione pari a 1% (w/v), si è dimostrato il più efficiente nella rimozione dei contaminanti, con rimozioni paragonabili a quelle osservate in precedenti studi (Peng *et al.*, 2011; Shing *et al.*, 2007). Altri valori di rimozioni degli idrocarburi totali, paragonabili a quelli del TX, sono stati ottenuti con la lecitina di soia più idrofila (SL; HLB= 7): 68.8 ± 1.6 % e 82.9 ± 0.4 % a 4 e 48 ore rispettivamente (Fig 9.1 a). L'effetto esercitato da SL è probabilmente dovuto alla capacità di creare microemulsioni micellari, aumentando la solubilità apparente e quindi la biodisponibilità degli inquinanti idrofobi. Le rimozioni ottenute con la lecitina di soia più idrofoba (Tetrol F-10) sono molto più basse rispetto al TX, dell'ordine di circa 39 % dopo 48h dall'inizio del processo (Fig 9.1 a). Tali valori di rimozione sono paragonabili a quelli riscontrati da Urum e Pekdemir (2004) nel *soil washing* con lecitine da suoli contaminati con petrolio greggio. Soddisfacenti percentuali di rimozione degli idrocarburi totali si osservano per la ciclodestrina più polare (HPB-CD) rispetto a quella più idrofoba (RAMEB-CD), anche se inferiori al TX (56.2 ± 0.7 % e 60.9 ± 2.0 % dopo 4 e 48 ore) (Fig 9.1a). I detergenti commerciali estratti da piante e gli acidi biliari hanno esibito efficienze di rimozione degli idrocarburi totali molto inferiori al TX (mediamente intorno al 40 % per gli agenti di pulizia commerciali e circa 20 % per gli acidi biliari, a 48 ore dal trattamento) (fig 9.1 b). I biosurfattanti di origine microbica hanno mostrato significative rimozioni di idrocarburi totali, in particolare nel caso dei soforolipidi (SR) e delle surfattine (SF) le rimozioni superano il 50 % di quelle riscontrate con l'utilizzo del TX. SR ha infatti mostrato efficienze di rimozione del 57.3 ± 1.0 % e 63.2 ± 2.9 % dopo 4 e 48 ore rispettivamente e SF del 56.7 ± 0.5 % e 63.3 ± 4.4 % dopo 4 e 48 ore. I soforolipidi e le surfattine presentano quindi una efficienza di rimozione praticamente uguale. I ramnolipidi (RL) hanno rese di rimozione del 27.1 ± 1.2 % e 45.6 ± 3.1 % dopo 4 e 48 ore rispettivamente (fig 9.1 c). I valori di rimozione da parte dei ramnolipidi sono più bassi di quelli riscontrati in letteratura (Reis *et al.*, 2013; Lai *et al.*, 2009), e simili ai valori riportati da Urum *et al.* (2006), nonostante siano stati adoperati ad una concentrazione superiore alla loro CMC come nei casi di studio citati.

In generale si osserva che le rimozioni più alte sono state ottenute per gli agenti solubilizzanti più idrofilo (con un HLB maggiore); tale risultato è imputabile al fatto che agenti con una maggiore porzione idrofila risultano essere più affini alla frazione polare di IFO180, riducendo l'adsorbimento del tensioattivo alle particelle del suolo e alla fase

oleosa, e favorendo quindi il trasferimento degli idrocarburi alla fase acquosa. La Solec F (SL), le idrossipropil- β -ciclodestrine (HPB-CD) e i soforolipidi (SR) e le surfattine (SF) hanno mostrato rimozioni degli idrocarburi totali paragonabili, o comunque superiori al 70%, a quelle ottenute col tensioattivo sintetico (TX). Questi agenti meritano attenzione sia per il fatto che facilitano il processo di mobilizzazione degli inquinanti dalla fase solida a quella acquosa sia perchè, a paragone con i surfattanti chimici di sintesi, risultano biodegradabili e non-tossici, rappresentando una alternativa promettente e ambientalmente sostenibile all'utilizzo tradizionale di tensioattivi sintetici nel lavaggio di sabbie contaminate da idrocarburi del petrolio. Nella fase di ottimizzazione delle condizioni di lavaggio, sono stati quindi saggiati tre di questi agenti piogeni (Solec F, le idrossipropil- β -ciclodestrine e i soforolipidi).

Per quanto riguarda la rimozione degli *n*-alcani (C11-C32), Solec F (SL) e Triton X-100 (TX) hanno mostrato rimozioni fra loro paragonabili, (*Fig 9.2 a*); sono state infatti ottenute rimozioni del $75.2 \pm 0.7 \%$, $73.9 \pm 1.4 \%$, a 48 ore, rispettivamente; tali agenti presentano rese di rimozione della frazione *n*-alcani sensibilmente inferiore rispetto a quella osservata per gli *HC* totali. Percentuali soddisfacenti di rimozione degli *n*-alcani sono stati ottenuti anche con soforolipidi (SR) surfattine (SF): $60.8 \pm 2.0 \%$, $62.7 \pm 1.5 \%$, a 48 ore, rispettivamente; in tal caso le rese di rimozione risultano paragonabili a quelle degli *HC* totali (*Fig 9.2 a, c*). Meno soddisfacenti i risultati osservati per HPB-CD, la cui resa di rimozione è di $38.3 \pm 2.6 \%$ a 48 ore. (*Fig 9.2 a*), inferiore a quella osservata per *HC* totali.

9.2 Bilancio di massa (HC)

A sostegno dei risultati ottenuti ottenute nella prima fase sperimentale, relativi alle percentuali di rimozione in termini di idrocarburi totali, è stata svolta la verifica del bilancio di massa. Per ogni agente testato, durante il *washing* è stato campionato il refluo acquoso, in quantità proporzionale alle sabbie estratte. Le modalità di campionamento ed analisi sono state descritte (*par.7.3*). A seguire vengono riportati i risultati del bilancio di massa percentuale osservato fra *HC* presente nelle sabbie e nel refluo acquoso, nei campionamenti prelevati dopo 4, 8, 24, 48 ore di *washing* per gli agenti di origine animale e vegetale confrontati con TX (*fig.9.3*). I risultati appaiono soddisfacenti, i bilanci di massa perlopiù rientrano nel range 100 – 120 %.

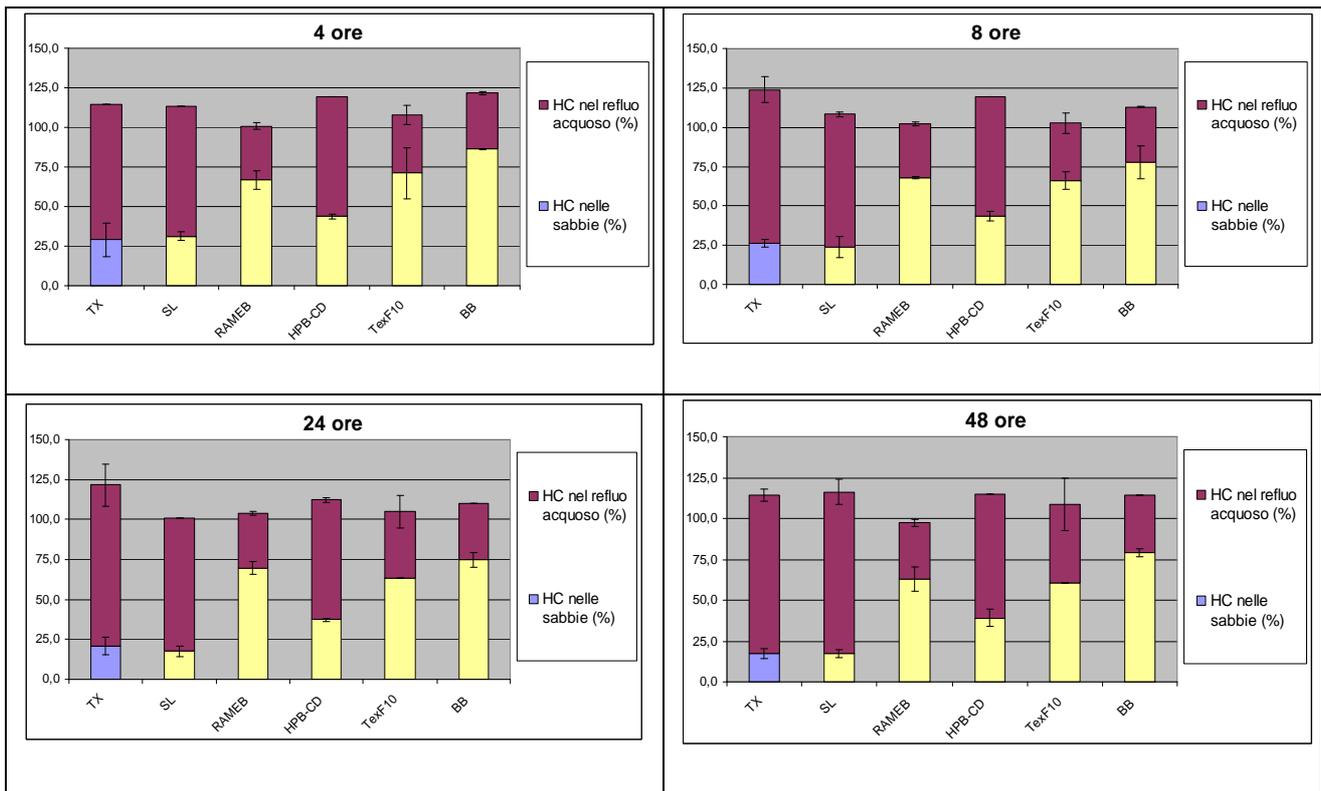


Fig. 9.3 Bilancio di massa (%) dopo 48 ore di *washing*: in blu, giallo, arancio e verde % HC nelle sabbie sabbie in TX, agenti di origine vegetale e animale; surfattanti microbici e detergenti commerciali rispettivamente. In viola % CH nel refluo acquoso.

10. Modelli predittivi e ottimizzazione del processo

La metodologia RSM applicata ai dati sperimentali e la successiva ottimizzazione dei parametri di processo sono stati sviluppati per 5 casi studio: *blank* (*washing* senza agente), TX (surfattante sintetico di confronto), SL, HPB-CD e SR (i tre agenti selezionati durante il primo *screening*).

10.1 Design of Experiment (DoE) e dominio sperimentale

Il *DoE* utilizzato per le nostre sperimentazioni è il CCD a facce centrate ($\alpha = 1$). Sono stati considerati 4 fattori ed una risposta :

A – Sur. conc. (g/100 ml)

B – water/sand ratio (ml/g)

C – mixing rate (rpm)

D – IFO180 conc. (g/kg)

Risposta – resa 24, 48 ore (%).

Le prove sono state eseguite su tre livelli per ogni fattore (0; ± 1):

Si esplicitano a seguire, per ogni parametro (A, B, C, D), i valori sperimentali assunti nei tre livelli, per ogni caso studio (*Tab 10.1*)

Factor	Name	Units	-1	0	+1
A	SR conc.	g/100 ml	0.02	0.11	0.2
	TX, SL, HPB-CD conc.		0.1	2.55	5
B (A – <i>blank</i>)	Water/Sand ratio	ml/g	1	5.5	10
C (B – <i>blank</i>)	Mixing rate	rpm	80	150	220
D (C – <i>blank</i>)	IFO180 conc.	g/kg	0.5	10.25	20

Tab 10.1 – Dominio del disegno sperimentale per i 5 casi studio

Il disegno ha richiesto 30 prove di *washing* per TX, SL, HPC-CD e SR e 20 prove nel caso del *blank*. Le prove di *washing* sono state eseguite sino alle 48 ore, i campioni, le analisi e l'applicazione del modello a 24 e 48 ore (solo a 24 ore nel caso del *blank* e del TX). Le prove di *washing*, i campionamenti e le analisi delle sabbie sono stati eseguiti in singolo, (per i soli TX e SR campionamenti e analisi delle sabbie alle 24 ore sono stati eseguiti in doppio).

La validazione ed ottimizzazione del modello è stata eseguita sui campioni delle 24 ore per tutti i casi studio. In questo caso le prove sperimentali di *washing* sono state eseguite sempre in doppio. Nei successivi paragrafi vengono descritti i risultati della implementazione del metodo RSM alle 24 e 48 ore (eccetto *blank* e TX), oltre alla validazione ed ottimizzazione (24 ore)

10.2 Validazione ed ottimizzazione del processo

Per la validazione del modello sono state condotte due ulteriori prove sperimentali di *washing*, oltre a quelle previste dal disegno sperimentale, per ogni agente e in doppio,. Il modello è stato infatti validato applicando il *washing* a sabbie contaminate con IFO180 a concentrazioni intermedie, comprese nel dominio sperimentale (sabbie contaminate con circa 2.5 e 6.5 g/kg di IFO180). Gli altri parametri operativi (A, B, C) hanno assunto valori casuali interni al dominio, diversi da quelli utilizzati per il disegno sperimentale.

La Response Surface Methodology applicata ai dati di resa percentuale della rimozione di idrocarburi totali dalle sabbie, fornisce indicazioni chiave per valutare l'andamento complessivo del processo di *washing*, necessarie per poter ottimizzare il processo, nel dominio operativo prescelto, secondo criteri prestabiliti. Il calcolo delle condizioni operative ottimali utilizza la funzione di desiderabilità che, sulla base dei singoli obiettivi impostati nei criteri, fornisce una serie di soluzioni a cui viene attribuito un valore di desiderabilità (mostrate dal *software* in ordine decrescente); tale serie viene proposta per valori di desiderabilità decrescenti.

Al fine di massimizzare la rimozione degli idrocarburi dalla fase solida, valutando anche l'aspetto dei consumi, l'ottimizzazione del processo è stata sviluppata secondo due criteri:

- ❖ **Maximum HC removal predicted (%)**: per ogni IFO180 conc. di interesse (0.5; 10.25; 20 g/kg) si sono ricercate le condizioni operative (A, B, C – A, B per *blank*) tali da rendere massima la resa di rimozione (Yield 24). Tali condizioni sono state predette dal modello. Si riassumono in *tab.10.2*:

A:Surfactant conc.	is in range
B:Water/Sand ratio (A per <i>blank</i>)	is in range
C:Mixing rate (B per <i>blank</i>)	is in range
D:IFO180 conc. (C per <i>blank</i>)	is equal to 0.5; 10.25; 20
Yield 24	maximum

Tab 10.2 – Criterio *Maximum* HC removal predicted (%)

- ❖ **Optimum HC removal (%)**: per ogni IFO180 conc. di interesse (0.5; 10.25; 20 g/kg) si sono ricercate le condizioni operative (A, C – B per *blank*) tali da rendere massima la resa di rimozione (Yield 24) e minimo il consumo di acqua. Tale scelta è finalizzata alla riduzione dei costi derivanti dal consumo di surfattante e di acqua. Le condizioni sono state predette dal modello e quindi validate sperimentalmente. Si riassumono in *tab. 10.3*:

A:Surfactant conc.	is in range
B:Water/Sand ratio (A per <i>blank</i>)	minimum
C:Mixing rate (B per <i>blank</i>)	is in range
D:IFO180 conc. (C per <i>blank</i>)	is equal to 0.5; 10.25; 20
Yield 24	maximum

Tab 10.3 – Criterio *Optimum* HC removal predicted and observed (%)

10.3 Blank

10.3.1 RSM applicato alle 24 ore: analisi statistica della risposta

Applicata ANOVA, viene esaminata la significatività dei parametri del modello predittivo. In *tab 10.4* sono elencate le 20 *run* sperimentali: valori assunti per ogni parametro di processo (A, B, C) e risposta delle singole prove (Yield %). Per il parametro C (IFO180 conc.) vengono riportate le reali concentrazioni dell'inquinante nelle sabbie utilizzate nella sperimentazione. Esse si discostano da quanto previsto dal *DoE*, ma nel complesso non si osserva una distorsione significativa dei punti del disegno sperimentale (vedi Plot dei *Leverage vs. Run. fig. 10.2*).

Le rese di rimozione sono comprese nell'intervallo 3.6 - 43.6 (%); le prove di *washing* sono state eseguite in singolo mentre i campionamenti e analisi delle sabbie, in doppio.

Run	A:Water/Sand ratio ml/g	B:Mixing rate rpm	C:IFO180 conc. g/kg	Yield 24 %
1	1	80	0.61	37.3
2	10	80	0.61	32.8
3	1	220	0.61	37.1
4	10	220	0.61	32.2
5	1	80	16.84	4.3
6	10	80	16.84	25.7
7	1	220	16.84	3.6
8	10	220	16.84	30.0
9	1	150	11.84	36.8
10	10	150	11.84	44.0
11	5.5	80	11.84	20.5
12	5.5	220	11.84	42.4
13	5.5	150	0.61	33.9
14	5.5	150	16.84	15.9
15	5.5	150	11.84	40.5
16	5.5	150	11.84	36.6
17	5.5	150	11.84	42.8
18	5.5	150	11.84	43.6
19	5.5	150	11.84	40.9
20	5.5	150	11.84	31.8

Tab.10.4 Matrice degli esperimenti svolti per *blank* dopo 24 ore di *washing*

A seguire le *tab 10.5* e *tab. 10.6* riassumono l'analisi della varianza ed illustrano i termini del modello significativi. Dal polinomio selezionato per descrivere il processo sono stati eliminati i termini poco significativi per il modello o comunque non migliorativi del *LoF*. Le seguenti tabelle mostrano che i valori calcolati dal test di Fischer per 'F-value' e '*p-value*' del parametro *Model*, sono rispettivamente 15.62 e <0.0001, questi valori indicano che il modello selezionato è altamente significativo ed esiste solo lo 0.01% di probabilità che la risposta sia casuale. Il valore associato di *p-value* minore di 0.05 per il modello (ovvero $\alpha = 0.05$ o 95% del livello di confidenza) indica che il modello è statisticamente significativo. Il valore R^2 (0.85), superiore a 0.75, suggerisce una buona adeguatezza del modello ed indica che l' 84.8% della variabilità della risposta può essere spiegata dal modello. Il *LoF*, risulta non significativo, come è desiderabile.

La tab. 10.5 mostra che water/sand ratio (A, p -value = 0.0087), IFO180 conc. (C e C², p -value < 0.001), AC (p -value = 0.0029) sono i termini significativi del modello.

La *mixing rate* risulta statisticamente meno significativa, a causa del p -value elevato. Il modello statistico, così sviluppato, risulta accurato e può essere utilizzato per la predizione e ottimizzazione della resa di rimozione (*Model significant*), anche oltre il dominio operativo selezionato (*LoF not significant*).

ANOVA for Response Surface Reduced Quadratic model						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	2343.61	5	468.72	15.62	< 0.0001	significant
<i>A-Water/sand ratio</i>	279.06	1	279.06	9.30	0.0087	
<i>B-Mixing rate</i>	61.01	1	61.01	2.03	0.1759	
<i>C-IFO180 conc.</i>	1563.84	1	1563.84	52.11	< 0.0001	
<i>AC</i>	387.10	1	387.10	12.90	0.0029	
<i>C^2</i>	1238.90	1	1238.90	41.28	< 0.0001	
Residual	420.17	14	30.01			
<i>Lack of Fit</i>	321.92	9	35.77	1.82	0.2639	<i>not significant</i>
<i>Pure Error</i>	98.25	5	19.65			

Tab. 10.5 ANOVA per il modello quadratico applicato a *blank* (24 ore) – F test

Std. Dev.	5.48	R-Squared	0.8480
Mean	31.63	Adj R-Squared	0.7937
C.V. %	17.32	Pred R-Squared	0.7223
PRESS	767.45	Adeq Precision	14.035

Tab. 10.6 ANOVA per il modello quadratico applicato a *blank* (24 ore) – parametri statistici

Final Equation in Terms of Coded Factors:	
Yield 24	=
+41.97	
+5.32	* A
+2.47	* B
-19.91	* C
+8.24	* AC
-27.61	* C^2

Tab. 10.7 Coefficienti polinomiali nel caso studio *blank* (24 ore)

Per descrivere la superficie di risposta, i dati sperimentali sono stati ottimizzati utilizzando un'equazione polinomiale di secondo grado. Si riportano i coefficienti finali in termini di fattori codificati x_i (tab.10.7)

Diagnostica dei residui. L'analisi dei residui è necessaria per confermare che i presupposti dell'ANOVA siano rispettati. L'assunzione di normalità può essere verificata valutando per esempio il grafico *predicted vs actual* mostrato in fig.10.1.

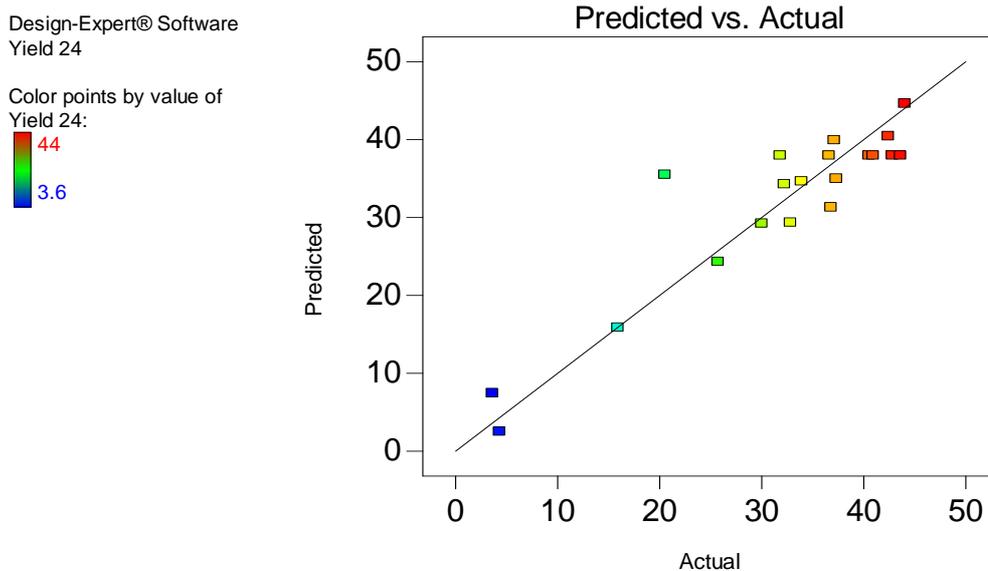


Fig 10.1 Plot dei *Predicted vs. Actual* – blank (24 ore)

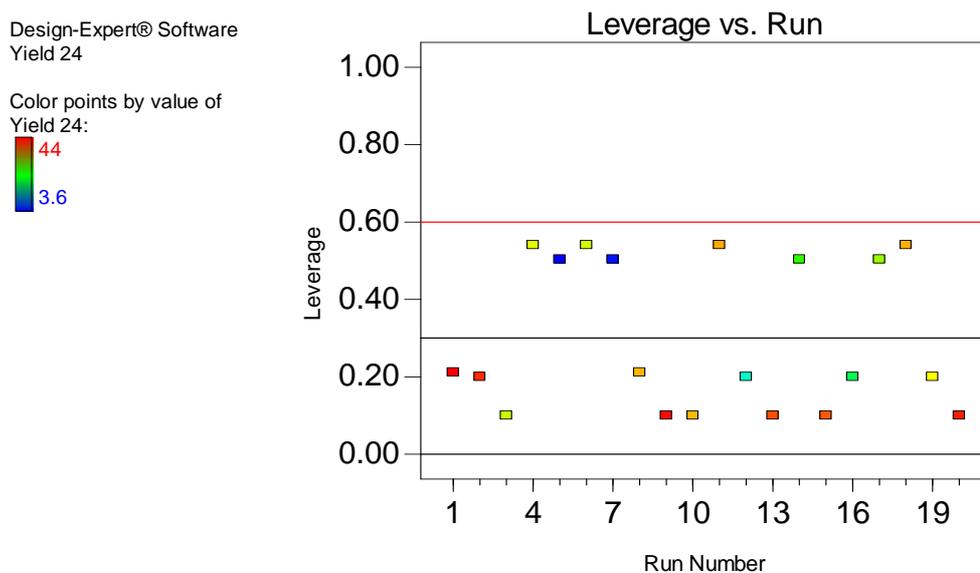


Fig 10.2 Plot dei *Leverage vs. Run* – blank (24 ore)

Nel caso in esame si nota una disposizione randomica che conferma che i presupposti dell'ANOVA sono rispettati. Fra i diagrammi di influenza si riporta il grafico dei leverage: non sono presenti punti con *leverage* elevato, cioè punti che presentino grande influenza sulla scelta del modello (fig 10.2 nessuna prova supera le linee di controllo). Dalla diagnostica è risultato che il modello predittivo della risposta è accettabile. E' possibile descrivere l'andamento della risposta in funzione dei fattori considerati (superficie di risposta).

10.3.2 RSM applicato alle 24 ore: influenza dei parametri sulla risposta

La fig.10.3 mostra l'effetto dei tre fattori sulla percentuale di rimozione degli idrocarburi totali, mantenendo gli altri parametri al valore centrale del dominio.

A - effetto del water/sand ratio (ml/g) sulla resa di rimozione: all'aumentare del parametro A si riscontra un aumento della resa di rimozione degli idrocarburi totali con un andamento lineare. Si presume che in assenza di surfattante, la decontaminazione sia guidata dalla solubilizzazione di IFO180 in acqua. L'aumento del parametro A permette un maggiore trasferimento in massa del contaminante nel refluo, oltre a promuoverne la diffusione della frazione desorbita dalle sabbie nella fase acquosa, accrescendo la rimozione del petrolio

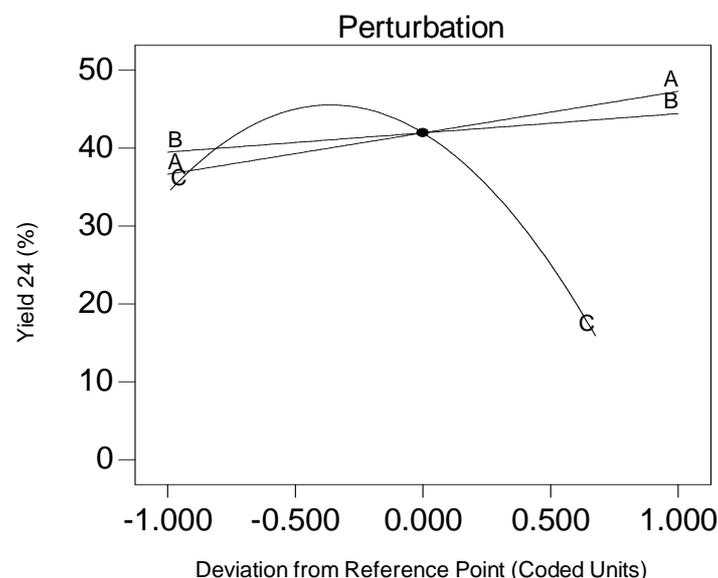


Fig. 10.3 Perturbation plot. Influenza dei singoli parametri sulla resa di rimozione degli idrocarburi *blank* (24 ore)

B - effetto della *mixing rate* (rpm) sulla resa di rimozione: l'aumento del parametro B comporta un lieve aumento delle rese di rimozione, con andamento lineare. La maggiore energia di contatto fra acqua e le goccioline di contaminante adese alle sabbie ne facilita il trasporto in soluzione e quindi la diffusione e solubilizzazione. Fenomeno comunque non determinante sulle rese di rimozione

C - effetto della concentrazione di IFO180 conc. (g/kg) sulla resa di rimozione: il parametro C è quello determinante sulle rese di rimozione. Al crescere della contaminazione delle sabbie si osserva un effetto negativo sulla rimozione degli idrocarburi. Fatto spiegabile dal limite di solubilità dell'IFO180 in acqua.

In *fig.10.4* sono rappresentate le superficie di risposta in 3D, evidenziando l'influenza dell'interazione di coppie di parametri sulle rese di rimozione (*contour plot*). In tal modo si valutano le interazioni fra i diversi fattori.

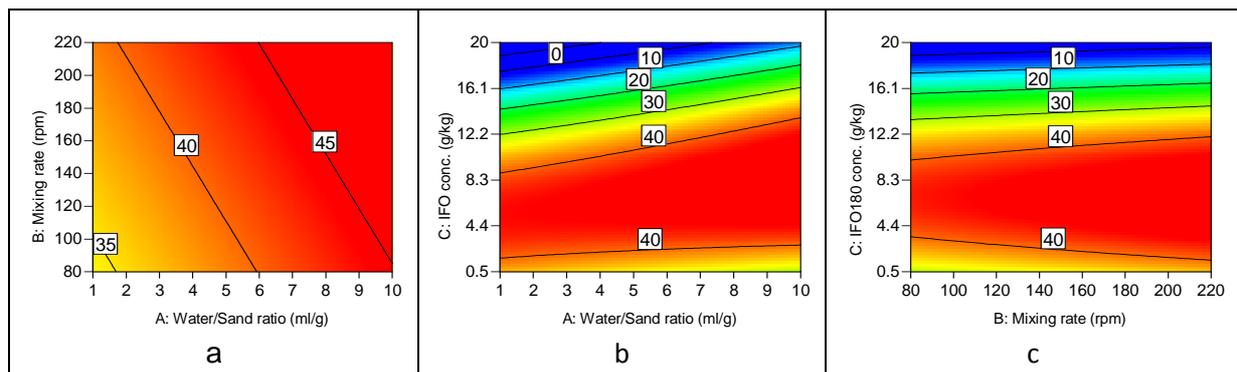


Fig. 10.4 Contour plot. Influenza della interazione di coppie di parametri sulla resa di rimozione degli idrocarburi – *blank* (24 ore)

Grafico a) interazione A/B. Non si osserva una forte influenza di questa interazione sulle rese di rimozione; le superficie di isovalori di risposta sono parallele con pendenza negativa. Ciò significa che per raggiungere un certo grado di solubilizzazione di IFO180 in 24 ore (quindi rimozione dalle sabbie, seppure in un range ristretto) è sufficiente aumentare o il quantitativo di acqua o la velocità di miscelazione;

i grafici b) e c) interazione A/C e B/C. L'interazione è significativa in entrambi i casi, ma dipende essenzialmente dal livello di contaminazione delle sabbie (superfici di isovalori della risposta pressochè parallele all'asse delle ascisse). Per sabbie con IFO180 conc. > 8 g/kg circa, le rese diminuiscono con pendenza elevata; si osserva infine una rimozione < 40% per sabbie poco contaminate (IFO180 conc. < 0.5 g/kg) : questa apparente contraddizione è probabilmente da attribuirsi a fattori cinetici.

10.3.3 Validazione sperimentale del modello selezionato e ottimizzazione dei parametri del processo alle 24 ore

Gli esperimenti di validazione del modello sono stati condotti in doppio: i risultati, media e deviazione standard sono riportati in *tab. 10.8*. Dall'analisi degli esperimenti di validazione, si osserva la sovrapposizione degli intervalli di confidenza fra i valori predetti e quelli osservati. Questi risultati suggeriscono che il modello sviluppato può accuratamente predire i risultati.

Blank : Model validation				
A	B	C	HC removal predicted (%)	HC removal observed (%)
7	100	2.5	36.1 ± 5.4 ⁱ	33.3 ± 1.9 ⁱⁱ
3	190	6.5	45.9 ± 5.4 ⁱ	43.9 ± 0.4 ⁱⁱ

Tab.10.8 blank (24 ore) – Model validation i) model SD at level confidence of 95% ii) experimental error

A	B	C	Blank: Maximum HC removal predicted (%) A,B : <i>in range</i> HC removal : <i>maximum</i>	
1	220	2.5	43.2 ± 5.4 ⁱ	
9.3	190	6.5	48.8 ± 5.4 ⁱ	
10	220	20	29.5 ± 5.4 ⁱ	
A	B	C	Blank: Optimum HC removal (%) A : <i>in range</i> HC removal (%): <i>maximum</i> B : <i>minimum</i>	
			HC removal predicted (%)	HC removal observed (%)
1	220	2.5	43.2 ± 5.4 ⁱ	42.4 ± 5.5 ⁱⁱ
1	220	6.5	46.5 ± 5.4 ⁱ	44.4 ± 0.5 ⁱⁱ
4.5	220	20	16.5 ± 5.4 ⁱ	21.5 ± 0.0 ⁱⁱ

Tab.10.9 blank (24 ore) – Optimization criteria: **Maximum and Optimum HC removal (%)** i) model SD at level confidence of 95% ii) experimental error

In *tab.10.9* vengono riportate le soluzioni secondo i criteri di ottimizzazione prescelti (*par.10.2*). Le rimozioni calcolate sono massime per concentrazioni di sabbie intermedie (48.0 ± 5.4). In tabella viene riportata, per ogni livello di contaminazione, una delle soluzioni avente desiderabilità pari ad 1, proposta dall'applicativo.

Minimizzando il consumo di acqua l'applicativo calcola rimozioni significativamente inferiori rispetto al criterio *Maximun* solo per sabbie fortemente contaminate, e il sistema di lavaggio richiede un valore del parametro A pari a 4.5. Si osserva congruenza fra dati calcolato e osservato.

10.4 TX

10.4.1 RSM applicato alle 24 ore: analisi statistica della risposta

Applicata ANOVA, viene esaminata la significatività dei parametri del modello predittivo. In *tab 10.10* sono elencate le 30 *run* sperimentali: valori assunti per ogni parametro di processo (A, B, C, D) e risposta delle singole prove (Yield %).

Per il parametro D (IFO180 conc.) vengono riportate le reali concentrazioni dell'inquinante nelle sabbie utilizzate nella sperimentazione. Esse si discostano da quanto previsto dal *DoE*, ma nel complesso non si osserva distorsione significativa dei punti del disegno sperimentale (vedi Plot dei *Leverage vs. Run. fig. 10.6*).

Le rese di rimozione sono comprese nell'intervallo 30.5 – 86.0 (%); le prove di *washing* sono state eseguite in singolo mentre i campionamenti e analisi delle sabbie in doppio.

A seguire le *tab 10.11* e *tab. 10.12* riassumono l'analisi della varianza ed illustrano i termini del modello significativi. Dal polinomio selezionato per descrivere il processo sono stati eliminati i termini poco significativi per il modello o comunque non migliorativi del *LoF*. Le seguenti tabelle mostrano che i valori calcolati per il parametro *Model*, dal test di Fischer per 'F-value' e '*p-value*' sono rispettivamente 32.72 e <0.0001, questi valori indicano che il modello selezionato è altamente significativo ed esiste solo lo 0.01% di probabilità che la risposta sia casuale. Il valore associato di *p-value* minore di 0.05 per il modello (ovvero $\alpha = 0.05$ o 95% del livello di confidenza) indica che il modello è statisticamente significativo. Il valore R^2 (0.926), superiore a 0.75, suggerisce una buona adeguatezza del modello ed indica che l'92.6% della variabilità della risposta può essere spiegata dal modello. Nel caso del TX è stato necessario applicare una trasformazione dei dati (*power* = 3) al fine di

migliorare per quanto possibile la convergenza del modello. Ciomalgrado II LoF, risulta significativo, ciò indica che in questo caso il modello non può essere utilizzato per la predizione e ottimizzazione della resa di rimozione oltre il dominio operativo selezionato (*LoF significant*).

Run	A:TX conc. g/100ml	B:Water/sand ratio ml/g	C:Mixing rate rpm	D:IFO180 conc. g/kg	Yield 24 %
1	0.1	1	80	0.61	51.0
2	5	1	80	0.61	47.4
3	0.1	10	80	0.61	51.6
4	5	10	80	0.61	56.8
5	0.1	1	220	0.61	35.9
6	5	1	220	0.61	45.4
7	0.1	10	220	0.61	45.9
8	5	10	220	0.61	30.9
9	0.1	1	80	16.84	57.9
10	5	1	80	16.84	77.4
11	0.1	10	80	16.84	68.0
12	5	10	80	16.84	76.7
13	0.1	1	220	16.84	71.8
14	5	1	220	16.84	73.9
15	0.1	10	220	16.84	79.7
16	5	10	220	16.84	85.3
17	0.1	5.5	150	11.84	68.2
18	5	5.5	150	11.84	86.0
19	2.55	1	150	11.84	69.2
20	2.55	10	150	11.84	83.2
21	2.55	5.5	80	11.84	79.7
22	2.55	5.5	220	11.84	84.2
23	2.55	5.5	150	0.61	30.5
24	2.55	5.5	150	16.84	76.7
25	2.55	5.5	150	11.84	82.1
26	2.55	5.5	150	11.84	83.6
27	2.55	5.5	150	11.84	82.9
28	2.55	5.5	150	11.84	79.9
29	2.55	5.5	150	11.84	81.7
30	2.55	5.5	150	11.84	82.4

Tab.10.10 Matrice degli esperimenti svolti per TX dopo 24 ore di washing

La *tab.10.11* mostra che la concentrazione di TX (A, p -value = 0.0024), il rapporto acqua/suolo (B, p -value = 0.0070), IFO180 conc. nelle sabbie (D, D2 con p -value rispettivamente di 0.0027, <0.0001), e i termini contenenti la conc. IFO180 (AD, CD con p -values rispettivamente di 0.0257, 0.0071) sono i termini significativi del modello. Gli altri termini, in particolar modo quelli di interazione non sono statisticamente significativi, a causa del loro p -value elevato.

ANOVA for Response Surface Reduced Quadratic model						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	1.142E+012	8	1.428E+011	32.72	< 0.0001	significant
A-TX conc.	5.168E+010	1	5.168E+010	11.84	0.0024	
B-Water/Sand ratio	3.890E+010	1	3.890E+010	8.91	0.0070	
C-Mixing rate	8.766E+009	1	8.766E+009	2.01	0.1711	
D-IFO180 conc.	5.065E+010	1	5.065E+010	11.61	0.0027	
AD	2.515E+010	1	2.515E+010	5.76	0.0257	
BD	1.268E+010	1	1.268E+010	2.91	0.1030	
CD	3.877E+010	1	3.877E+010	8.89	0.0071	
D^2	2.839E+011	1	2.839E+011	65.07	< 0.0001	
Residual	9.164E+010	21	4.364E+009			
Lack of Fit	8.844E+010	16	5.528E+009	8.64	0.0129	<i>significant</i>
Pure Error	3.198E+009	5	6.395E+008			

Tab. 10.11 ANOVA per il modello quadratico applicato ad TX (24 ore) – F test

Std. Dev.	66058.34	R-Squared	0.9257
Mean	3.639E+005	Adj R-Squared	0.8974
C.V. %	18.16	Pred R-Squared	0.8473
PRESS	1.884E+011	Adeq Precision	16.567

Tab. 10.12 ANOVA per il modello quadratico applicato ad TX (24 ore) – parametri statistici

Per descrivere la superficie di risposta, i dati sperimentali sono stati ottimizzati utilizzando un'equazione polinomiale di secondo grado. Si riportano i coefficienti finali in termini di fattori codificati x_i (*tab.10.13*).

I coefficienti calcolati hanno altro ordine di grandezza, rispetto agli altri casi studio, in quanto nel caso di TX è stato necessario applicare una trasformazione dei dati.

Final Equation in Terms of Coded Factors:	
Yield 24	=
+5.189E+005	
+54204.87	* A
+47025.93	* B
+22324.31	* C
+86753.36	* D
+47250.77	* AD
+33548.47	* BD
+58667.03	* CD
-3.460E+005	* D^2

Tab. 10.13 Coefficienti polinomiali nel caso studio TX (24 ore)

Diagnostica dei residui. L'analisi dei residui è necessaria per confermare che i presupposti dell'ANOVA siano rispettati. L'assunzione di normalità può essere verificata valutando per esempio il grafico *predicted vs actual* mostrato in fig. 10.5.

Design-Expert® Software
(Yield 24)^3

Color points by value of
(Yield 24)^3:

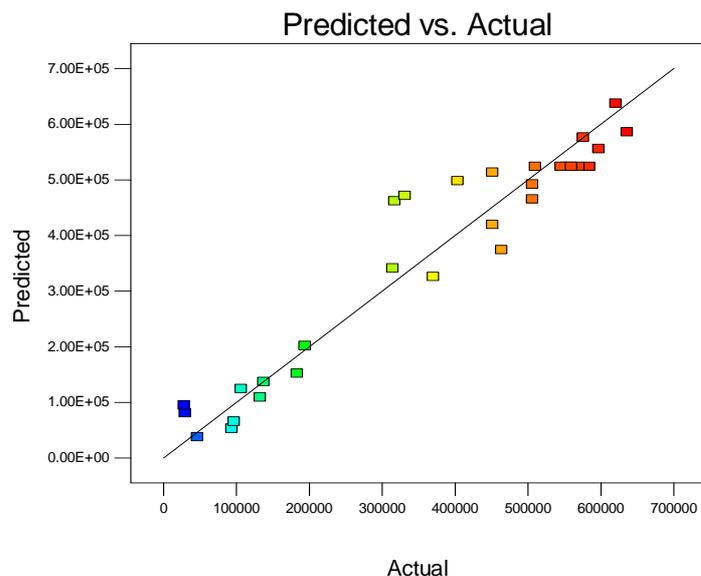


Fig 10.5 TX - Plot dei *Predicted vs. Actual*

Nel caso in esame si nota una disposizione randomica che conferma che i presupposti dell'ANOVA sono rispettati. Fra i diagrammi di influenza si riporta il grafico dei *leverage*: non sono presenti punti con *leverage* elevato, cioè punti che presentino grande influenza sulla scelta del modello (Fig 10.6 nessun punto supera le rette di controllo). Dalla diagnostica è risultato che il modello predittivo della risposta è accettabile. E' possibile

descrivere l'andamento della risposta in funzione dei fattori considerati (superficie di risposta).

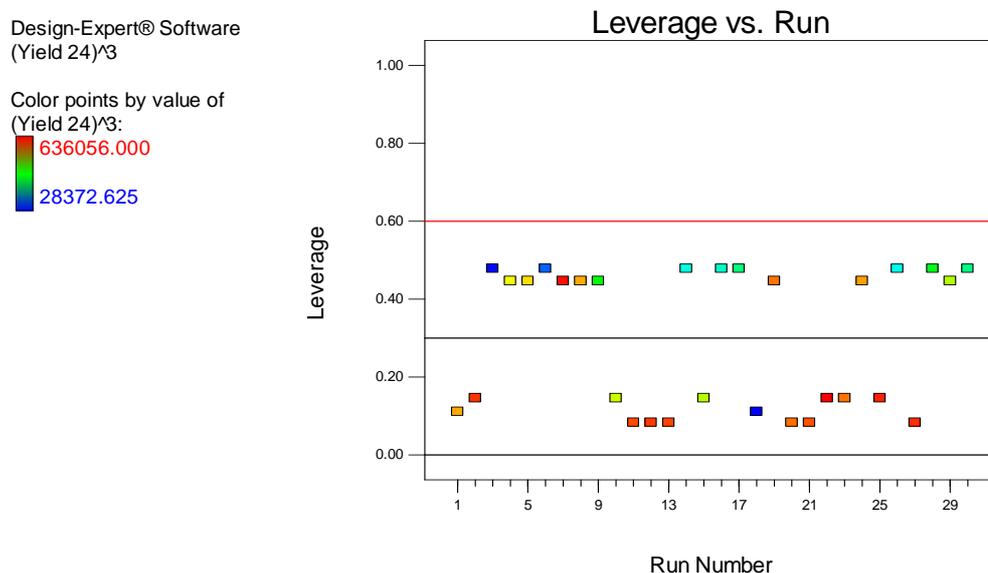


Fig 10.6 TX - Plot dei Leverage vs. Run

10.4.2 RSM applicato alle 24 ore: influenza dei parametri sulla risposta

La *fig. 10.7* mostra l'effetto dei quattro fattori sulla percentuale di rimozione degli idrocarburi totali, mantenendo gli altri parametri al valore centrale del dominio.

A - effetto di TX conc. (g/100 ml): i risultati indicano che la percentuale di rimozione aumenta sensibilmente in modo lineare con l'aumento della concentrazione del surfattante. Non sono state individuate delle concentrazioni di TX ottimali.

B - effetto del water/sand ratio (ml/g): i risultati indicano che la percentuale di rimozione aumenta sensibilmente in modo lineare con l'aumento del consumo di acqua, che corrisponde a maggior consumo di tensioattivo.

C - effetto della *mixing rate* (rpm): i risultati indicano che la percentuale di rimozione aumenta sensibilmente in modo lineare con l'aumento della velocità di miscelazione.

D - effetto della concentrazione di IFO180 conc. (g/kg) sulla resa di rimozione: al crescere delle concentrazioni di idrocarburi totali, si evidenzia un effetto positivo sulla rimozione degli idrocarburi. Si osserva un calo delle rese in corrispondenza delle sabbie con conc.

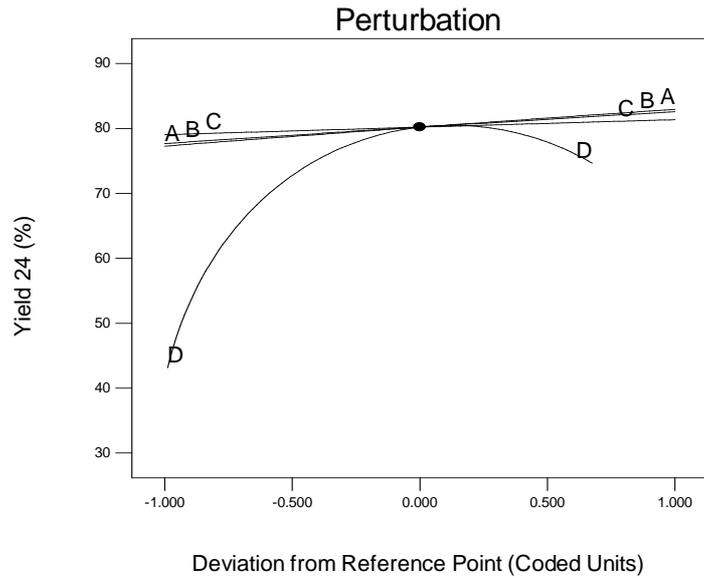


Fig. 10.7 Perturbation plot. Influenza dei singoli parametri sulla resa di rimozione degli idrocarburi TX (24 ore)

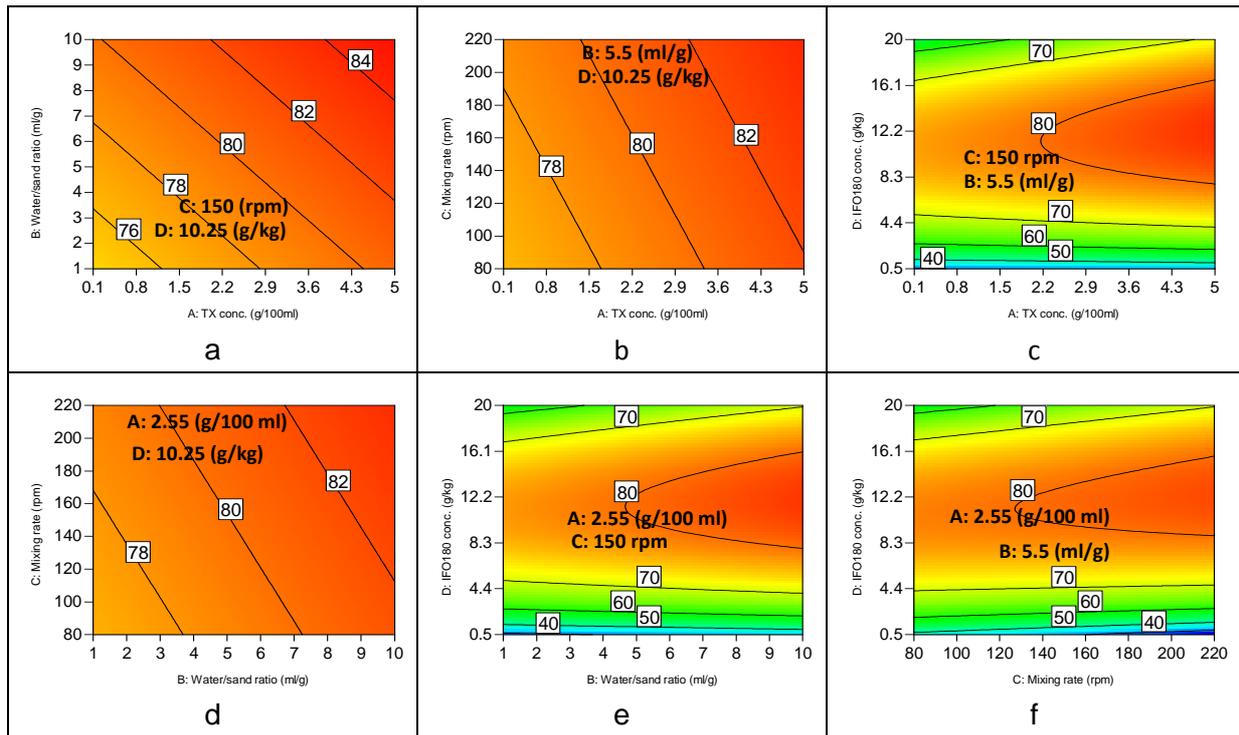


Fig. 10.8 Contour plot. Influenza della interazione di coppie di parametri sulla resa di rimozione degli idrocarburi – TX (24 ore)

IFO180 in prossimità di 20 g/kg, probabilmente a causa di un effetto cinetico, non avendo raggiunto alle 24 ore ancora il completo equilibrio di rimozione

In fig.10.8 sono rappresentate le superficie di risposta in 3D, evidenziando l'influenza dell'interazione di coppie di parametri sulle rese di rimozione (*contour plot*). In tal modo si valutano le interazioni fra i diversi fattori.

I grafici a) b) d) mostrano rispettivamente le correlazioni A/B, A/C e B/C e presentano andamenti analoghi. La correlazione più significativa appare quella fra i termini A/B in accordo con la significatività dei singoli termini. Si osserva che le superficie di isovalori di risposta, sono parallele con pendenza negativa, ad indicare che per ottenere le medesime rimozioni è sufficiente agire su uno dei due parametri; fatto che sottolinea la rilevanza del parametro TX conc. (un aumento di acqua corrisponde ad un aumento di TX;).

I grafici c) e) f) mostrano rispettivamente le correlazioni A/D, B/D e C/D. L'interazione di questi parametri operativi determina una forte influenza sulle rese di rimozioni, dettate dalla conc. di IFO180. Al crescere delle concentrazioni di idrocarburi totali, si evidenzia un effetto positivo sulla rimozione degli idrocarburi che raggiunge un massimo per valori intermedi di contaminazione (circa 12 g/kg).

10.4.4 Validazione sperimentale del modello selezionato e ottimizzazione dei parametri del processo alle 24 ore

Gli esperimenti di validazione del modello sono stati condotti in doppio: i risultati, media e deviazione standard sono riportati in *tab.10.14*. Dall'analisi degli esperimenti di validazione, si osserva la sovrapposizione degli intervalli di confidenza fra i valori predetti e quelli osservati. Questi risultati suggeriscono che il modello sviluppato può accuratamente predire i risultati.

In *tab.10.15*, vengono riportate le soluzioni secondo i criteri di ottimizzazione prescelti (*par.10.2*). Viene riportata, per ogni livello di contaminazione, una delle soluzione avente desiderabilità pari ad 1, proposta dall'applicativo.

TX: Model validation					
A	B	C	D	HC removal predicted (%)	HC removal observed (%)
1.8	7	100	2.5	59.7 ± 6.4 ⁱ	63.0 ± 0.3 ⁱⁱ
0.5	3	190	6.5	72.4 ± 4.4 ⁱ	72.7 ± 0.1 ⁱⁱ

Tab.10.14 TX (24 ore) – Model validation

Dalla *tab. 10.15*, si conferma che al crescere delle concentrazioni di idrocarburi totali, si evidenzia un effetto positivo sulla rimozione degli idrocarburi; mantenendo sempre elevato il consumo di surfattante TX. Minimizzando i consumi di acqua si osserva un calo delle

rese (significativa interazione A/B sulle rese di rimozione). Nel caso del TX viene sempre richiesto l'utilizzo del TX alle massime concentrazioni. La decontaminazione di sabbie contaminate con IFO180 20 g/kg super l'80% solo massimizzando tutti i parametri. La validazione del modello nel caso del criterio *Optimum* è soddisfacente. Questi risultati sono confermate dalla letteratura: Lee al. (2005) hanno testato tensioattivi non ionici in grado di rimuovere più del 80% degli idrocarburi totali dal suolo; inoltre i meccanismi e le condizioni di lavaggio dei tensioattivi di sintesi sono stati approfonditi da più autori, fra questi ricordiamo il lavoro di Deshpande *et al.* (1998) che ha messo a confronto otto surfattanti applicati al *washing* di tre differenti suoli contaminati con idrocarburi del petrolio. Gli autori hanno osservato sempre crescente rimozione del contaminante all'aumentare della concentrazione del surfattante, ma in parallelo anche l'aumento della torbidità, della formazione di schiume e tossicità delle soluzioni di estrazione.

				TX: Maximum HC removal predicted (%)	
A	B	C	D	A,B,C : <i>in range</i> HC removal : <i>maximum</i>	
5	10	80	2.5	66.3 ± 5.0 ⁱ	
5	10	220	6.5	79.7 ± 3.5 ⁱ	
5	10	220	20	86.0 ± 3.4	
				TX: Optimum HC removal (%)	
A	B	C	D	A, C: <i>in range</i> HC removal (%): <i>maximum</i> B : <i>minimum</i>	
				HC removal predicted (%)	HC removal observed (%)
5	1	220	2.5	58.5 ± 6.4 ⁱ	68.9 ± 5.3 ⁱⁱ
5	1	220	6.5	76.9 ± 3.8 ⁱ	82.1 ± 1.0 ⁱⁱ
5	1	220	20	80.5 ± 3.5 ⁱ	76.7 ± 1.6 ⁱⁱ

Tab. 10.15 TX (24 ore) – Optimization criteria: *Maximum* and *Optimum* HC removal (%) i) model SD at level confidence of 95% ii) experimental error

10.5 SL

10.5.1 RSM applicato alle 24 ore: analisi statistica della risposta

Applicata ANOVA, viene esaminata la significatività dei parametri del modello predittivo.

Run	A:SL conc. g/100ml	B:Water/Sand ratio ml/g	C:Mixing rate rpm	D:IFO180 conc. g/kg	Yield 24 %
1	0.1	1	80	0.6	45.3
2	5	1	80	0.6	56.5
3	0.1	10	80	0.6	65.1
4	5	10	80	0.6	72.4
5	0.1	1	220	0.6	58.7
6	5	1	220	0.6	64.6
7	0.1	10	220	0.6	76.3
8	5	10	220	0.6	70.5
9	0.1	1	80	22.9	55.1
10	5	1	80	22.9	63.3
11	0.1	10	80	22.9	69.0
12	5	10	80	22.9	63.9
13	0.1	1	220	22.9	67.2
14	5	1	220	22.9	55.8
15	0.1	10	220	22.9	85.6
16	5	10	220	22.9	84.4
17	0.1	5.5	150	11.2	54.9
18	5	5.5	150	11.2	88.0
19	2.55	1	150	11.2	76.5
20	2.55	10	150	11.2	87.5
21	2.55	5.5	80	11.2	80.7
22	2.55	5.5	220	11.2	97.9
23	2.55	5.5	150	0.6	73.7
24	2.55	5.5	150	22.9	85.9
25	2.55	5.5	150	11.2	90.3
26	2.55	5.5	150	11.2	83.0
27	2.55	5.5	150	11.2	84.4
28	2.55	5.5	150	11.2	96.4
29	2.55	5.5	150	11.2	92.6
30	2.55	5.5	150	11.2	89.9

Tab. 10.16 Matrice degli esperimenti svolti per SL (24 ore) di washing

In *tab 10.16* sono elencate le 30 *run* sperimentali: valori assunti per ogni parametro di processo (A, B, C, D) e risposta delle singole prove (Yield %). Esse si discostano da quanto previsto dal *DoE*, ma nel complesso non si osserva distorsione dei punti del disegno sperimentale significativa (vedi *Plot dei Leverage vs. Run. fig. 10.10*). Le rese di rimozione sono comprese nell'intervallo 55.1 – 97.9 (%); le prove di *washing* e le analisi delle sabbie sono state eseguite in singolo. A seguire le *tab 10.17* e *tab. 10.18* riassumono l'analisi della varianza ed illustrano i termini del modello significativi. Dal polinomio selezionato per descrivere il processo sono stati eliminati i termini poco significativi per il modello o comunque non migliorativi del *LoF*. Le seguenti tabelle mostrano che i valori calcolati dal test di Fischer per 'F-value' e 'p-value' per il parametro *Model* sono rispettivamente 12.56 e <0.0001, questi valori indicano che il modello selezionato è altamente significativo ed esiste solo lo 0.01% di probabilità che la risposta sia casuale. Il valore associato di *p-value* minore di 0.05 per il modello (ovvero $\alpha = 0.05$ o 95% del livello di confidenza) indica che il modello è statisticamente significativo. Il modello statistico, così sviluppato, risulta accurato e può essere utilizzato per la predizione e ottimizzazione della resa di rimozione (*Model significant*), anche oltre il dominio operativo selezionato (*LoF not significant*).

ANOVA for Response Surface Reduced Quadratic model						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	4659.52	7	665.65	12.56	< 0.0001	significant
<i>A-SL conc.</i>	117.82	1	117.82	2.22	0.1501	
<i>B-Water/Sand ratio</i>	963.60	1	963.60	18.19	0.0003	
<i>C-Mixing rate</i>	447.00	1	447.00	8.44	0.0082	
<i>D-IFO180 conc.</i>	117.56	1	117.56	2.22	0.1505	
AC	72.68	1	72.68	1.37	0.2541	
AD	54.07	1	54.07	1.02	0.3234	
A²	2929.15	1	2929.15	55.28	< 0.0001	
Residual	1165.68	22	52.99			
<i>Lack of Fit</i>	1039.42	17	61.14	2.42	0.1668	not significant
<i>Pure Error</i>	126.25	5	25.25			

Tab. 10.17 ANOVA per il modello quadratico applicato ad SL (24 ore) – F test

Std. Dev.	7.28	R-Squared	0.7999
Mean	74.51	Adj R-Squared	0.7362
C.V. %	9.77	Pred R-Squared	0.6589
PRESS	1987.20	Adeq Precision	12.911

Tab. 10.18 ANOVA per il modello quadratico applicato ad SL (24 ore) – parametri statistici

Il valore R^2 (0.799), superiore a 0.75, suggerisce una buona adeguatezza del modello ed indica che l'79.9% della variabilità della risposta può essere spiegata dal modello. La tab.10.17 mostra che il termine quadratico di concentrazione di biosurfattante (A^2 , p -value < 0.0001) il rapporto acqua/soilo (B p -value = 0.0003), la velocità di mixing (C, p -value = 0.0082) sono i termini significativi del modello. Gli altri termini, in particolar modo IFO180 conc. e quelli di interazione non sono statisticamente significativi, a causa del loro p -value elevato. Per descrivere la superficie di risposta, i dati sperimentali sono stati ottimizzati utilizzando un'equazione polinomiale di secondo grado: Si riportano i coefficienti finali in termini di fattori codificati x_i :

Final Equation in Terms of Coded Factors:	
Yield 24	=
+86.32	
+2.58	* A
+7.32	* B
+4.98	* C
+2.24	* D
-2.13	* AC
-1.61	* AD
-20.17	* A ²

Tab. 10.19 Coefficienti polinomiali nel caso studio SL (24 ore)

Diagnostica dei residui. L'analisi dei residui è necessaria per confermare che i presupposti dell'ANOVA siano rispettati.

Dalla diagnostica è risultato che il modello predittivo della risposta è accettabile. E' possibile descrivere l'andamento della risposta in funzione dei fattori considerati (superficie di risposta).

Design-Expert® Software
Yield 24

Color points by value of
Yield 24:
97.9
45.3

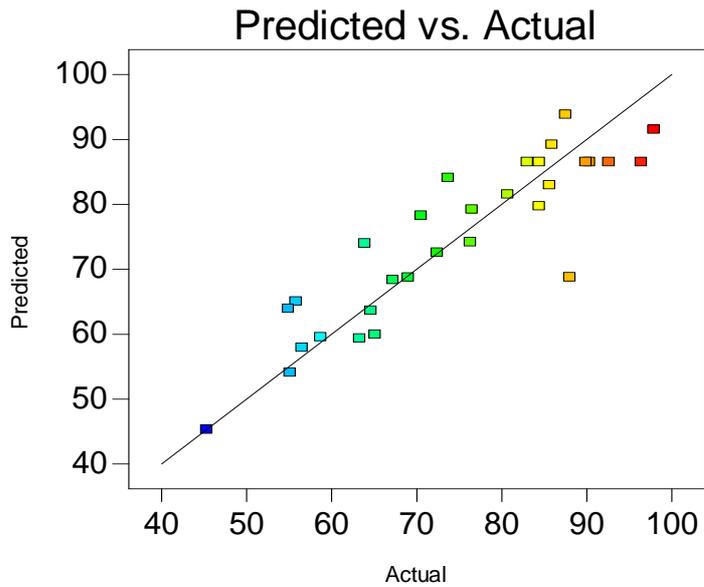


Fig 10.9 Plot dei *Predicted vs. Actual*- SL (24 ore)

L'assunzione di normalità può essere verificata valutando per esempio il grafico *predicted vs actual* mostrato in *fig. 10.9*.

Nel caso in esame si nota una disposizione randomica che conferma che i presupposti dell'ANOVA sono rispettati. Fra i diagrammi di influenza si riporta il grafico dei *leverage*: non sono presenti punti con *leverage* elevato, cioè punti che presentino grande influenza sulla scelta del modello (*fig 10.10*).

Design-Expert® Software
Yield 24

Color points by value of
Yield 24:
97.9
45.3

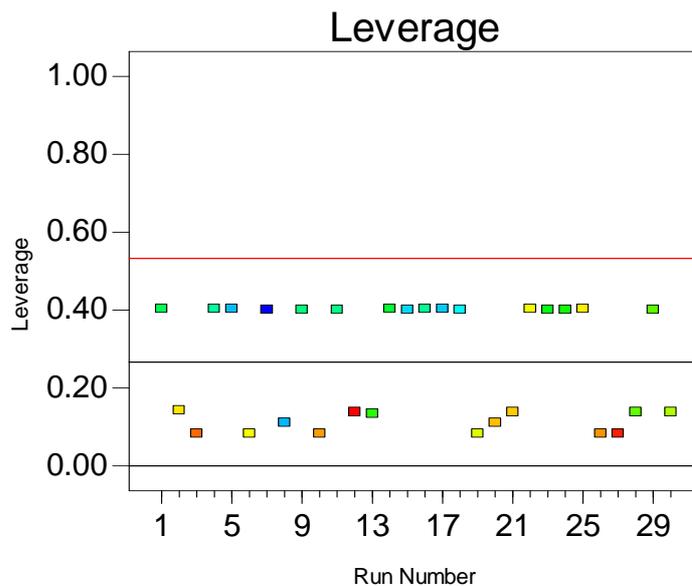


Fig 10.10 Plot dei *Leverage vs. Run* SL (24 ore)

10.5.2 RSM applicato alle 24 ore: influenza dei parametri sulla risposta

La *fig.10.11* mostra l'effetto dei quattro fattori sulla percentuale di rimozione degli idrocarburi totali, mantenendo gli altri parametri al valore centrale del dominio.

A - effetto di SL conc. (g/100 ml) : i risultati indicano che la percentuale di rimozione aumenta con l'aumento della concentrazione di Solec F; si osserva il massimo delle rese quando A assume valore ~ 2.6 (g/100 ml); l'ulteriore aumento della concentrazione di surfattante determina una diminuzione delle rese di rimozione. In generale l'aumento della capacità di mobilizzare l'inquinante dalla matrice solida in relazione all'aumento della concentrazione di emulsionante è trattata in letteratura (Urum *et al.*, 2003, 2004, 2015; Lai *et al.*, 2009; Peng *et al.*, 2010). In particolare Urum *et al.* Hanno sperimentato la capacità delle soluzioni acquose di diversi surfattanti (escina, lecitina -semi di lecitina-, ramnolipidi, saponina, e tannino) di rimuovere Ekofisk, *crude oil*, da un terreno contaminato in laboratorio (circa 50 mg/g) al variare delle condizioni di lavaggio. Le prestazioni dei biosurfattanti nella rimozione dell'olio sono state valutate rispetto ad un tensioattivo anionico sintetico (solfato di sodio dodecil, SDS). E' stato utilizzato come approccio statistico il metodo sperimentale di progettazione Taguchi, con un disegno fattoriale. I parametri del *washing* che sono stati testati sono la temperatura (5-50 °C), il tempo di trattamento (5-20 min), velocità di agitazione (80-200 rpm), rapporto suolo:acqua (1:4), e le concentrazioni di tensioattivi (0.004 – 0.5%). I risultati hanno indicato che la temperatura di lavaggio è stato il parametro più influente sulla rimozione dell'olio, mentre il tempo era quello meno rilevante. Si sono osservate decontaminazioni maggiori dell' 80% a 50°C per tutte le soluzioni di tensioattivi, tranne che per la lecitina (semi di lecitina), che ha presentato le rimozioni più basse (42% in soluzioni 0.004 %). A 20°C, saponina, lecitina, escina, e tannino rimuovono meno del 50% greggio. Malgrado i risultati di tale studio non siano confrontabili con la nostra sperimentazione (viene utilizzato *crude oil*, i semi di lecitina sono solubili solo in cloroformio, hanno quindi caratteristiche molto diverse rispetto alla Solec F da noi testata, inoltre si è puntato ad utilizzare alte temperature e tempi brevi al fine di aumentare la cinetica del processo) si possono evidenziare alcuni aspetti comuni. Il *range* delle concentrazioni dei surfattanti è stato scelto affinché venisse superato il valore di *CMC*; la concentrazione di surfattante, la velocità di *mixing* e il rapporto suolo/acqua sono stati considerati parametri di processo. Infine dagli elaborati di tale lavoro appare chiaramente che non sempre ad un aumento della concentrazione del surfattante corrisponde un aumento di resa di rimozione. Al contrario all'aumentare del

consumo dell'acqua, della temperatura e del tempo di lavaggio si osservano sempre rimozioni crescenti.

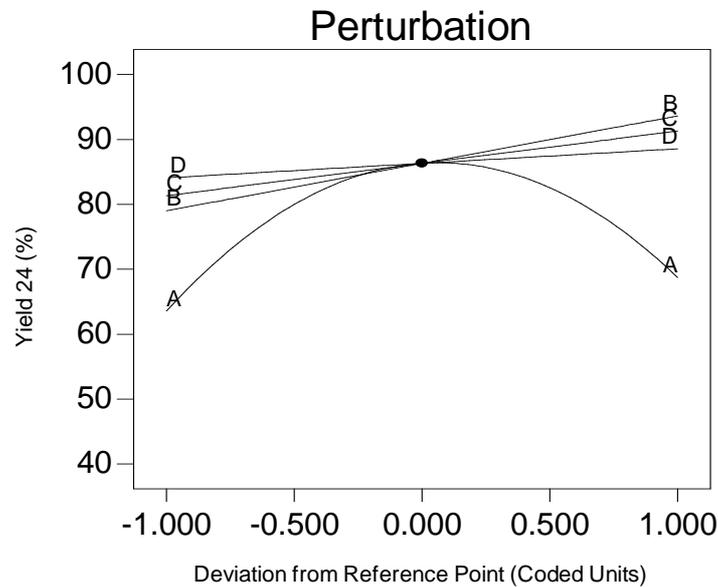


Fig. 10.11 Perturbation plot. Influenza dei singoli parametri sulla resa di rimozione degli idrocarburi SL (24 ore)

E' noto che la rimozione del petrolio dalla matrice solida dipende fortemente sia dalle proprietà del surfattante che dalle caratteristiche del sistema surfattante/acqua/soilo. Quando i surfattanti sono aggiunti al sistema acqua-suolo, una determinata quantità è inevitabilmente adsorbita dalle particelle solide. Più i surfattanti sono adsorbiti, minore risulta essere il loro contributo alla solubilizzazione dell'inquinante, rendendo meno efficace il trattamento di *washing*. Inoltre, all'aumentare dell'adsorbimento del surfattante nella matrice solida si verifica un aumento dell'idrofobicità del suolo. Ne consegue un riassorbimento nella matrice solida del composto organico precedentemente solubilizzato dal surfattante (Paria, 2008). La capacità di adsorbimento del surfattante nel suolo dipende da diversi fattori, principalmente dalla struttura molecolare del surfattante. E' infatti noto che le *CMC* di letteratura si riferiscono al "puro", cioè ad una soluzione acqua/surfattante in assenza della matrice contaminata. Quest'ultima, a causa di effetti di assorbimento e altre interazioni di diversa natura, può modificare in modo rilevante la *CMC* effettiva, rendendo poco prevedibile la capacità di rimozione del surfattante in funzione della sua concentrazione iniziale in soluzione acquosa.

B - effetto del water/sand ratio (ml/g) sulla resa di rimozione:

Un aumento della resa di rimozione degli idrocarburi totali si riscontra all'aumentare del parametro B - water/sand (ml/g), con un andamento lineare. Il parametro B, come detto precedentemente, risulta essere tra i più significativi. I risultati sono in accordo con quanto pubblicato da Urum *et al.* (2004), Han *et al.* (2009), Peng *et al.* (2011), Kalali *et al.* (2011). L'aumento del parametro B promuove quasi per certo la diffusione dei contaminanti desorbiti nella fase acquosa, accrescendo la rimozione del petrolio (Han *et al.*, 2009).

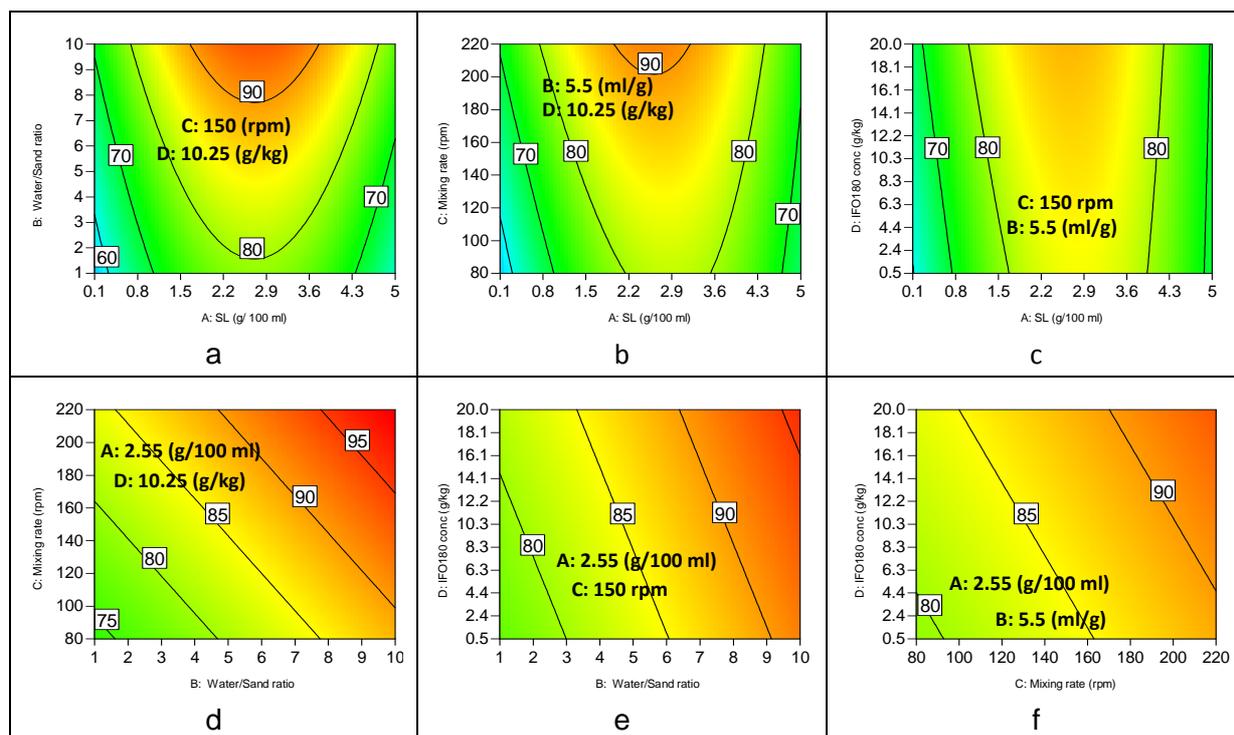


Fig. 10.12 Contour plot. Influenza della interazione di coppie di parametri sulla resa di rimozione degli idrocarburi – SL (24 ore)

C - effetto della *mixing rate* (rpm) sulla resa di rimozione: l'aumento del parametro C ha un effetto positivo sulla resa di rimozione. I risultati sono in accordo con quanto riportato da Urum *et al.* (2003), Lai *et al.* (2009), Han *et al.* (2009), Mnif *et al.* (2013), in cui un aumento del livello di agitazione aumenta fortemente la capacità di rimozione da parte dei biosurfattanti studiati nei relativi casi sperimentali. I risultati indicano che probabilmente l'aumento della *mixing rate* oltre a migliorare l'attrito tra le particelle del suolo e la forza di lavaggio della soluzione, comporta un aumento della diffusione dei contaminanti desorbiti e la loro interazione con le micelle del tensioattivo in soluzione, accelerando la solubilizzazione (Han *et al.*, 2009).

D - effetto della concentrazione di IFO180 conc. (g/kg) sulla resa di rimozione:

La concentrazione di idrocarburi totali, sembra essere quasi ininfluyente sulle le rese di rimozione; risultato questo di notevole importanza che rende Solec F di particolare interesse applicativo.

In *fig.10.12* sono rappresentate le superficie di risposta in 3D, evidenziando l'influenza dell'interazione di coppie di parametri sulle rese di rimozione (*contour plot*). In tal modo si valutano le interazioni fra i diversi fattori.

I grafici a, b, c) correlano i fattori A/B, A/C, A/D e presentano andamenti analoghi. Queste interazioni mostrano il massimo delle rimozioni quando $A \sim 2.6$ g/100 ml. La correlazione più significativa appare quella fra A/B, in accordo con la significatività dei singoli termini;

i grafici d, e, f) correlano i fattori B/C, B/D, CD e presentano andamenti analoghi, ma la correlazione B/D e C/D sembra avere poco effetto sulle rese di rimozione, in accordo con la bassa influenza del grado di contaminazione già osservata; al contrario B/C risultano più significativi rispetto alla risposta, e le superficie di isovalore hanno pendenza negativa, a conferma del fatto che per ottenere le medesime rimozioni è possibile adottare un compromesso fra il consumo di acqua e la velocità di *mixing*.

10.5.3 RSM applicato alle 48 ore

Applicata ANOVA ai dati sperimentali delle 48 ore, viene esaminata la significatività dei parametri del modello predittivo. In *tab 10.20* sono elencate le 30 *run* sperimentali: valori assunti per ogni parametro di processo (A, B, C, D) e risposta delle sperimentazioni (Yield %).

A conferma della bontà dei dati, si osserva un aumento delle rimozioni nella quasi totalità dei casi alle 48 ore rispetto a quanto osservato alle 24 ore.

Si riporta una breve descrizione del modello matematico proposto, al fine di evidenziarne la similarità con quanto ottenuto sui dati relativi alle 24 ore. La qualità del fitting è accettabile, sia in termini di significatività (p-value del parametro Model e del LoF), sia come dipendenza dai parametri : B, C, D, A^2 (*Fig. 10.21*).

Il parametro R^2 risulta accettabile (*tab.10.22*) e soprattutto i coefficienti polinomiali appaiono dello stesso ordine di grandezza, in modulo e segno, rispetto alle 24 ore (*tab.10.17* e *tab.10.23*)

Run	A:SL conc. g/100ml	B:Water/Sand ratio ml/g	C:Mixing rate rpm	D:IFO180 conc. g/kg	Yield 24 %	Yield 48 %
1	0.1	10	80	0.6	45.3	69.0
2	5	10	80	0.6	56.5	76.1
3	0.1	1	220	0.6	65.1	61.4
4	5	1	220	0.6	72.4	68.2
5	0.1	10	220	0.6	58.7	80.5
6	5	10	220	0.6	64.6	74.4
7	0.1	1	80	22.9	76.3	62.2
8	5	1	80	22.9	70.5	64.8
9	0.1	10	80	22.9	55.1	69.9
10	5	10	80	22.9	63.3	66.0
11	0.1	1	220	22.9	69.0	76.9
12	5	1	220	22.9	63.9	73.3
13	0.1	10	220	22.9	67.2	85.0
14	5	10	220	22.9	55.8	89.1
15	0.1	5.5	150	11.2	85.6	58.9
16	5	5.5	150	11.2	84.4	87.3
17	2.55	1	150	11.2	54.9	75.1
18	2.55	10	150	11.2	88.0	93.3
19	2.55	5.5	80	11.2	76.5	81.3
20	2.55	5.5	220	11.2	87.5	95.8
21	2.55	5.5	150	0.6	80.7	74.7
22	2.55	5.5	150	22.9	97.9	87.5
23	2.55	5.5	150	11.2	73.7	95.0
24	2.55	5.5	150	11.2	85.9	90.1
25	2.55	5.5	150	11.2	90.3	86.3
26	2.55	5.5	150	11.2	83.0	96.0
27	2.55	5.5	150	11.2	84.4	96.5
28	2.55	5.5	150	11.2	96.4	93.2
29	0.1	10	80	0.6	92.6	69.0
30	5	10	80	0.6	89.9	76.1

Tab. 10.20 Matrice degli esperimenti svolti per SL (48 ore) di washing

Analogamente alle 24 ore i parametri di processo che risultano avere la maggiore influenza sulle rese risultano il termine quadratico di concentrazione di biosurfattante (A^2 , p -value < 0.0001) il rapporto acqua/suolo (B p -value = 0.0006), la velocità di mixing (C, p -

value = 0.0010) e in questo caso anche la concentrazione di IFO180 (D, p -values = 0.0427), seppur debolmente.

ANOVA for Response Surface Reduced Quadratic model						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	3969.34	7	567.05	13.01	< 0.0001	significant
A-SL conc.	88.35	1	88.35	2.03	0.1685	
B-Water/Sand ratio	699.38	1	699.38	16.05	0.0006	
C-Mixing rate	625.40	1	625.40	14.35	0.0010	
D-IFO180 conc.	201.70	1	201.70	4.63	0.0427	
AC	3.61	1	3.61	0.083	0.7762	
AD	10.11	1	10.11	0.23	0.6348	
A ²	2375.39	1	2375.39	54.51	< 0.0001	
Residual	958.66	22	43.58			
Lack of Fit	880.20	17	51.78	3.30	0.0957	not significant
Pure Error	78.46	5	15.69			

Tab. 10.21 ANOVA per il modello quadratico applicato ad SL (48 ore) – F test

Std. Dev.	6.60	R-Squared	0.8055
Mean	77.90	Adj R-Squared	0.7436
C.V. %	8.47	Pred R-Squared	0.6677
PRESS	1637.34	Adeq Precision	12.649

Tab. 10.22 ANOVA per il modello quadratico applicato ad SL (48 ore) – parametri statistici

Final Equation in Terms of Coded Factors:	
Yield 48	=
+88.41	
+2.24	* A
+6.23	* B
+5.89	* C
+2.94	* D
-0.47	* AC
-0.70	* AD
-18.17	* A ²

Tab. 10.23 Coefficienti polinomiali nel caso studio SL (48 ore)

La Fig. 10.13 riporta gli effetti dei singoli termini lineari del modello sulla resa di rimozione, mantenendo gli altri parametri costanti al centro del dominio sperimentale. Anche in

questo caso si riscontra una forte similarità degli andamenti rispetto alle 24 ore (tab.10.13). Le evidenti somiglianze fra i *fitting* relativi a dati sperimentali distinti, relativi ai campioni delle 24 e 48 ore, confermano la validità dei modelli.

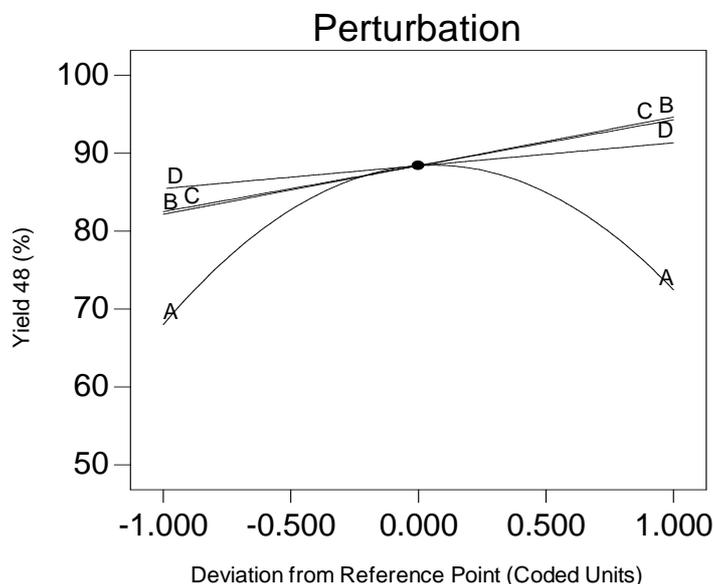


Fig. 10.13 Perturbation plot. Influenza dei singoli parametri sulla resa di rimozione degli idrocarburi SL (48 ore)

10.5.4 Validazione sperimentale del modello selezionato e ottimizzazione dei parametri del processo alle 24 ore

Gli esperimenti di validazione del modello sono stati condotti in doppio: i risultati, media e deviazione standard sono riportati in tab.10.24. Dall'analisi degli esperimenti di validazione, si osserva la sovrapposizione degli intervalli di confidenza fra i valori predetti e quelli osservati. Questi risultati suggeriscono che il modello sviluppato può accuratamente predire i risultati.

SL: Model validation					
A	B	C	D	HC removal predicted (%)	HC removal observed (%)
1.8	7	100	2.5	79.9 ± 7.3^i	73.3 ± 2.0^{ii}
0.5	3	190	6.5	67.8 ± 7.3^i	68.3 ± 5.3^{ii}

Tab.10.24 SL (24 ore) – Model validation

Vengono riportate le soluzioni secondo i criteri di ottimizzazione prescelti (par.10.2).

In tabella viene riportata, per ogni livello di contaminazione, una delle soluzioni avente desiderabilità pari ad 1, proposta dall'applicativo.

A	B	C	D	SL: Maximum HC removal predicted (%)	
				A,B,C : in range	
				HC removal : maximum	
2.7	10	220	2.5	96.9 ± 7.3 ⁱ	
2.6	10	220	6.5	97.8 ± 7.3 ⁱ	
2.5	10	150	20	96.5 ± 7.3 ⁱ	
A	B	C	D	SL: Optimum HC removal (%)	
				A, C: in range HC removal (%): maximum	
				B : minimum	
				HC removal predicted (%)	HC removal observed (%)
2.7	1	220	2.5	82.3 ± 7.3 ⁱ	75.3 ± 2.3 ⁱⁱ
2.6	1	220	6.5	83.2 ± 7.3 ⁱ	75.1 ± 1.9 ⁱⁱ
2.6	1	150	20	81.9 ± 7.3 ⁱ	75.9 ± 2.4 ⁱⁱ

Tab. 10.25 SL (24 ore) – Optimization criteria: *Maximum and Optimum HC removal (%)* i) model SD at level confidence of 95% ii) experimental error

Dalla *tab.10.25* risulta evidente che tutte le condizioni di ottimizzazione richiedono l'assunzione della concentrazione della Solec F a valori intermedi (2.5 – 2.7 g/100ml). inoltre l'aumentare della concentrazione di contaminazione risulta ininfluente sulle rese di rimozione.

L'andamento delle superfici di risposta è così riassumibile: alti valori di rimozione degli idrocarburi del petrolio si ottengono per concentrazioni intermedie di Solec F comprese tra 2.5 – 2.7 (g/100ml), il livello di contaminazione è poco influente sulle rese e il modello calcola rese massime sino al 97.8 ± 7.3%. Fissata la concentrazione di Solec F e la velocità di *mixing* (150-220), la diminuzione nell'utilizzo dell'acqua incide in modo significativo, nelle condizioni di *Optimum* HC removal tali rimozioni calano sino a 81.9 ± 7.3%. Si evidenzia che pur essendoci congruità fra osservato e calcolato nel caso della ottimizzazione, in quando gli intervalli di confidenza si sovrappongono, il modello tende a sovrastimare sensibilmente le rese di rimozioni. I risultati mostrano che Solec F è molto

performante, oltre ad essere molto interessante anche per le condizioni di ottimizzazione riscontrate.

La decontaminazione di suoli, utilizzando *washing* con soia lecitina, è stata poco studiata in letteratura. Oltre ai lavori di Urum sopraccitati ricordiamo lo studio relativo a suoli storicamente contaminati da *PCBs* (Occulti F et al., 2007) con tecniche di *washing*. Occulti *et al.* hanno utilizzato concentrazioni sensibilmente superiori alle *CMC*, rapporto acqua/ suolo 1:7 e velocità di *mixing* pari a 120 rpm.

10.6 HPB-CD

10.6.1 RSM applicato alle 24 ore: analisi statistica della risposta

Applicata ANOVA, viene esaminata la significatività dei parametri del modello predittivo. In *tab 10.26* sono elencate le 30 *run* sperimentali: valori assunti per ogni parametro di processo (A, B, C, D) e risposta delle singole prove (*Yield 24 %*). Per il parametro D (IFO180 conc.) vengono riportate le reali concentrazioni dell'inquinante nelle sabbie utilizzate nella sperimentazione. Esse si discostano da quanto previsto dal *DoE*, ma nel complesso non si osserva distorsione dei punti del disegno sperimentale significativa (vedi Plot dei *Leverage vs. Run. fig. 10.15*).

Le rese di rimozione sono comprese nell'intervallo 39.4 – 80.6 (%); le prove di *washing* e le analisi delle sabbie sono state eseguite in singolo.

A seguire le *tab 10.27* e *tab. 10.28* riassumono l'analisi della varianza ed illustrano i termini del modello significativi. Dal polinomio selezionato per descrivere il processo sono stati eliminati i termini poco significativi per il modello o comunque non migliorativi del *LoF*. Le seguenti tabelle mostrano per il parametro *Model* che i valori calcolati dal test di Fischer per 'F-value' e '*p-value*' sono rispettivamente 6.63 e 0.0003, questi valori indicano che il modello selezionato è altamente significativo ed esiste solo lo 0.03% di probabilità che la risposta sia casuale. Il valore associato di *p-value* minore di 0.05 per il modello (ovvero $\alpha = 0.05$ o 95% del livello di confidenza) indica che il modello è statisticamente significativo. Il modello statistico, così sviluppato, risulta accurato e può essere utilizzato per la predizione e ottimizzazione della resa di rimozione (*Model significant*), anche oltre il dominio operativo selezionato (*LoF not significant*).

Run	A:HPB-CD conc. (g/100ml)	B:Water/Sand ratio ml/g	C:Mixing rate rpm	D:IFO180 conc. g/kg	Yield 24 %
1	0.1	1	80	0.6	74.6
2	5	1	80	0.6	75.4
3	0.1	10	80	0.6	79.1
4	5	10	80	0.6	77.4
5	0.1	1	220	0.6	39.4
6	5	1	220	0.6	45.0
7	0.1	10	220	0.6	47.9
8	5	10	220	0.6	63.0
9	0.1	1	80	22.9	61.8
10	5	1	80	22.9	64.5
11	0.1	10	80	22.9	48.3
12	5	10	80	22.9	70.2
13	0.1	1	220	22.9	55.4
14	5	1	220	22.9	66.3
15	0.1	10	220	22.9	53.5
16	5	10	220	22.9	75.8
17	0.1	5.5	150	11.2	47.0
18	5	5.5	150	11.2	59.7
19	2.55	1	150	11.2	73.0
20	2.55	10	150	11.2	59.8
21	2.55	5.5	80	11.2	55.8
22	2.55	5.5	220	11.2	70.6
23	2.55	5.5	150	0.6	80.6
24	2.55	5.5	150	22.9	71.3
25	2.55	5.5	150	11.2	59.9
26	2.55	5.5	150	11.2	60.3
27	2.55	5.5	150	11.2	64.0
28	2.55	5.5	150	11.2	70.2
29	2.55	5.5	150	11.2	61.8
30	2.55	5.5	150	11.2	60.7

Tab.10.26 Matrice degli esperimenti svolti per HPB-CD (24 ore di washing)

Il valore R^2 (0.678), inferiore a 0.75, suggerisce una adeguatezza del modello non pienamente soddisfacente ed indica che l'67.8% della variabilità della risposta può essere spiegata dal modello. A ciò corrisponde un valore di model SD a livello di confidenza del 95% non trascurabile (par. 10.6.4).

La *tab.10.27* mostra i termini significativi del modello : il termine quadratico di concentrazione di HPB-CD (A, *p-value* = 0.0063 e A², *p-value* 0.0046), la velocità di *mixing* (C, *p-value* = 0.0018), la velocità di *mixing* * IFO180 conc (CD, *p-value* = 0.0004) e IFO180 conc (D², *p-value* = 0.0103).

ANOVA for Response Surface Reduced Quadratic model						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	2306.12	7	329.45	6.63	0.0003	significant
A-HPB-CD conc.	453.01	1	453.01	9.11	0.0063	
B-Water/Sand ratio	21.34	1	21.34	0.43	0.5191	
C-Mixing rate	625.78	1	625.78	12.59	0.0018	
D-IFO180 conc.	177.70	1	177.70	3.57	0.0719	
CD	844.41	1	844.41	16.98	0.0004	
A²	494.67	1	494.67	9.95	0.0046	
D²	390.92	1	390.92	7.86	0.0103	
Residual	1093.77	22	49.72			
Lack of Fit	1017.50	17	59.85	3.92	0.0685	not significant
Pure Error	76.27	5	15.25			

Tab. 10.27 ANOVA per il modello quadratico applicato ad HPB-CD (24 ore) – F test

Std. Dev.	7.05	R-Squared	0.6783
Mean	63.08	Adj R-Squared	0.5759
C.V. %	11.18	Pred R-Squared	0.4072
PRESS	2015.44	Adeq Precision	10.075

Tab. 10.28 ANOVA per il modello quadratico applicato ad HPB-CD (24 ore) – parametri statistici

Final Equation in Terms of Coded Factors:	
Yield 24	=
+64.14	
+5.02	* A
+1.09	* B
-5.95	* C
-3.27	* D
+6.38	* CD
-11.98	* A ²
+8.23	* D ²

Tab. 10.29 Coefficienti polinomiali nel caso studio SR (24 ore)

Per descrivere la superficie di risposta, i dati sperimentali sono stati ottimizzati utilizzando un'equazione polinomiale di secondo grado. Si riportano i coefficienti finali in termini di fattori codificati x_i (tab10.29).

Diagnostica dei residui. L'analisi dei residui è necessaria per confermare che i presupposti dell'ANOVA siano rispettati. L'assunzione di normalità può essere verificata valutando per esempio il grafico *predicted vs actual* mostrato in fig. 10.14.

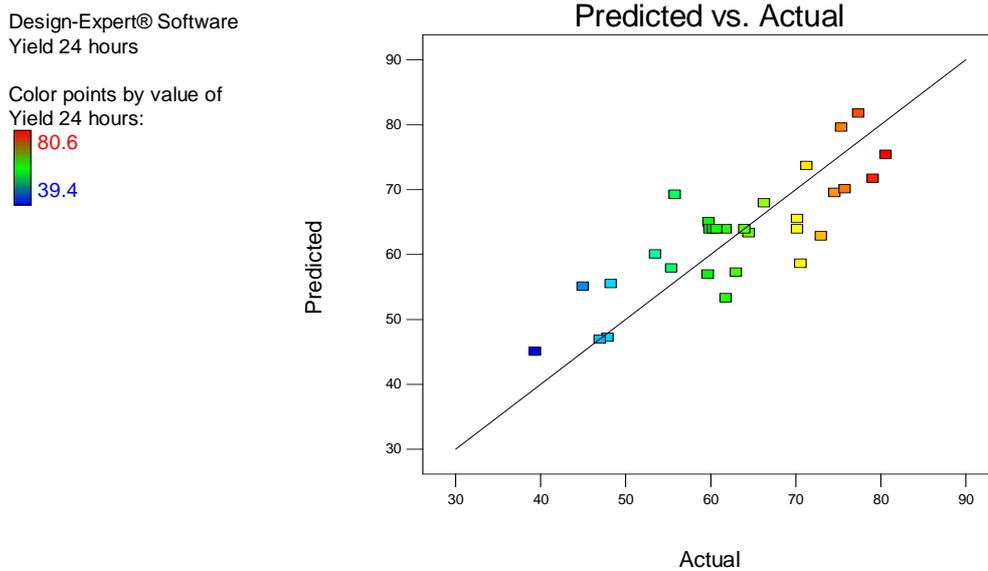


Fig 10.14 Plot dei *Predicted vs. Actual*- HPB-CD (24 ore)

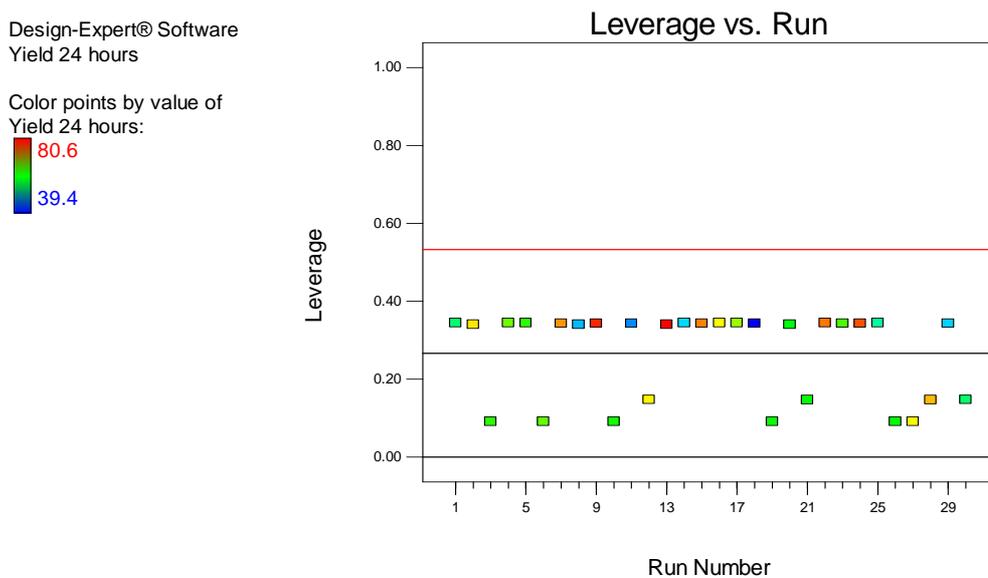


Fig 10.15 Plot dei *Leverage vs. Run*- HPB-CD (24 ore)

Nel caso in esame si nota una disposizione randomica che conferma che i presupposti dell'ANOVA sono rispettati.

Fra i diagrammi di influenza si il grafico dei *leverage*: non sono presenti punti con *leverage* elevato, cioè punti che presentino grande influenza sulla scelta del modello (*fig 10.15*).

Dalla diagnostica è risultato che il modello predittivo della risposta è accettabile. E' possibile descrivere l'andamento della risposta in funzione dei fattori considerati (superficie di risposta).

10.6.2 RSM applicato alle 24 ore: influenza dei parametri sulla risposta

La *Fig.10.16* mostra l'effetto dei quattro fattori sulla percentuale di rimozione degli idrocarburi totali, mantenendo gli altri parametri al valore centrale del dominio.

A - effetto di HPB-CD conc. (g/100 ml) : i risultati indicano che la percentuale di rimozione aumenta con l'aumento della concentrazione di HPB-CD; sino ad un massimo delle rese quando A assume valore ~ 3.3 (g/100 ml); l'ulteriore aumento della concentrazione di mobilizzante determina una diminuzione delle rese di rimozione.

B - effetto del water/sand ratio (ml/g) sulla resa di rimozione: Il quantitativo di acqua risulta praticamente ininfluenza sulle rese di rimozione

C - effetto della *mixing rate* (rpm) sulla resa di rimozione: si osserva un calo delle rimozioni all'aumentare della *mixing rate*. Questo andamento, apparentemente anomalo, si osserva solo nel caso di HPB-CD. In genere *mixing rate* oltre a migliorare l'attrito tra le particelle del suolo e la forza di lavaggio della soluzione, comporta un aumento della diffusione dei contaminanti desorbiti in soluzione, accelerando la solubilizzazione. Nel caso in esame non abbiamo la formazione di micelle, le ciclo destrine sono dei mobilizzanti che interagiscono con il contaminante legandone le molecole all'interno della propria cavità. Trattandosi di un processo sterico, probabilmente la velocità di miscelazione elevata sfavorisce la corretta interazione fra contaminante e molecola di HPB-CD (un ipotesi è che le molecole attivino movimenti rotatori che impediscono di fatto il contatto corretto). Per le stesse motivazioni può essere plausibile anche l'andamento del parametro A: esiste una concentrazione ottimale delle ciclo destrine che favorisce le interazioni ottimali con il contaminante.

D - effetto della concentrazione di IFO180 conc. (g/kg) sulla resa di rimozione: calo delle rese all'aumentare del livello di contaminazione

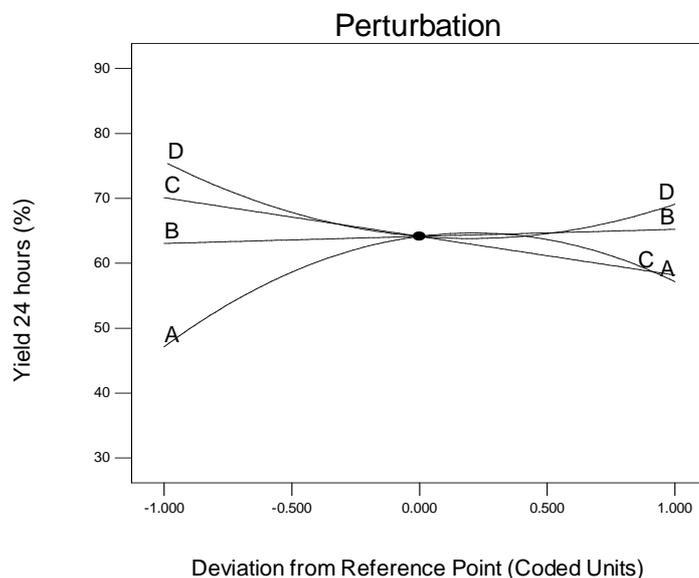


Fig. 10.16 Perturbation plot. Influenza dei singoli parametri sulla resa di rimozione degli idrocarburi HPB-CD (24 ore)

In Fig.10.17 sono rappresentate le superfici di risposta in 3D, evidenziando l'influenza dell'interazione di coppie di parametri sulle rese di rimozione (*contour plot*). In tal modo si valutano le interazioni fra i diversi fattori.

Il grafico a) correla i fattori A/B. Non si osserva una significativa interazione di questi due parametri operativi sulle rese di rimozione, si osserva un massimo di rese di rimozione per A ~ 3.3 g/100 ml;

i grafici b) e c) correlano rispettivamente i fattori A/C e A/D. L'influenza di queste interazioni sulla resa di rimozione, oltre ad essere forte (entrambi i fattori velocità di mixing e livello di contaminazione, sono significativi) evidenzia un massimo della risposta in corrispondenza della concentrazione di mobilizzante A ~ 3.3 g/100 ml;

i grafici d) ed e) correlano rispettivamente i fattori B/C e B/D. Il parametro B è quasi ininfluente sulle rese di rimozione, infatti dal grafico è evidente che le superfici di isovalore delle risposte sono pressochè parallele all'asse delle ascisse (parametro A). La maggiore percentuale di rimozione si osserva nel grafico e) in corrispondenza di basse concentrazioni di IFO180,

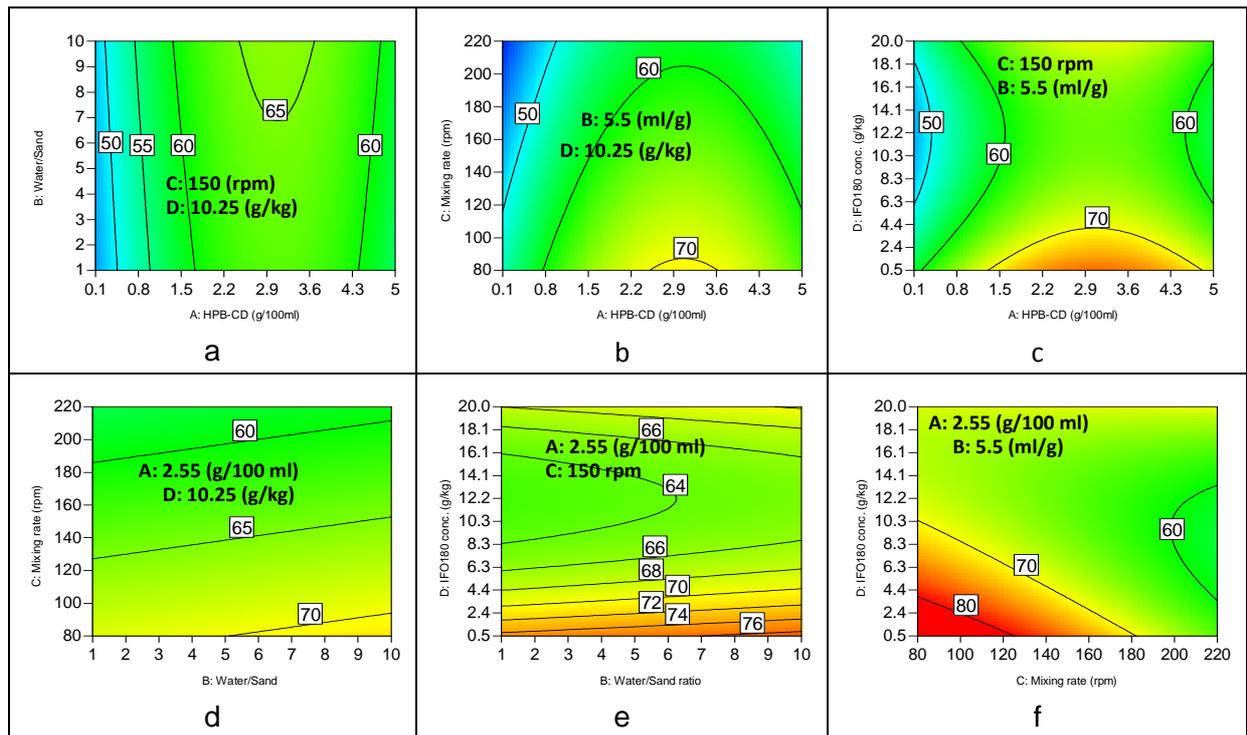


Fig. 10.17 Contour plot. Influenza della interazione di coppie di parametri sulla resa di rimozione degli idrocarburi – HPB-CD (24 ore)

il grafico f) correla i fattori C/D. Forte interazione sulle rese di rimozione e massimo nella zona di basse concentrazioni del contaminante e limitate velocità di mixing. Le superfici di risposta hanno pendenza lineare negativa, ciò indica che per ottenere le stesse rese di rimozione i due parametri agiscono in modo inversamente proporzionale (per raggiungere lo stesso livello di decontaminazione all'aumentare di IFO180 devono essere applicate velocità di miscelazione inferiori). Questo rende HPB-CD di interessante applicazione

10.6.3 RSM applicato alle 48 ore

Applicata ANOVA, viene esaminata la significatività dei parametri del modello predittivo. In tab 10.30 sono elencate le 30 run sperimentali: valori assunti per ogni parametro di processo (A, B, C, D) e risposta delle sperimentazioni (Yield 48 %).

A conferma della bontà dei dati, si osserva un aumento delle rimozioni nella quasi totalità dei casi alle 48 ore (le due eccezioni rientrano comunque nell'errore sperimentale).

Run	A:HPB-CD conc. (g/100ml)	B:Water/Sand ratio ml/g	C:Mixing rate rpm	D:IFO180 conc. g/kg	Yield 24 %	Yield 48 %
1	0.1	1	80	0.6	74.6	76.9
2	5	1	80	0.6	75.4	79.7
3	0.1	10	80	0.6	79.1	77.1
4	5	10	80	0.6	77.4	81.1
5	0.1	1	220	0.6	39.4	47.4
6	5	1	220	0.6	45.0	49.7
7	0.1	10	220	0.6	47.9	52.9
8	5	10	220	0.6	63.0	68.0
9	0.1	1	80	22.9	61.8	68.8
10	5	1	80	22.9	64.5	69.0
11	0.1	10	80	22.9	48.3	67.2
12	5	10	80	22.9	70.2	79.3
13	0.1	1	220	22.9	55.4	55.1
14	5	1	220	22.9	66.3	67.1
15	0.1	10	220	22.9	53.5	72.0
16	5	10	220	22.9	75.8	76.0
17	0.1	5.5	150	11.2	47.0	75.0
18	5	5.5	150	11.2	59.7	79.7
19	2.55	1	150	11.2	73.0	76.0
20	2.55	10	150	11.2	59.8	69.6
21	2.55	5.5	80	11.2	55.8	62.0
22	2.55	5.5	220	11.2	70.6	74.1
23	2.55	5.5	150	0.6	80.6	79.1
24	2.55	5.5	150	22.9	71.3	73.3
25	2.55	5.5	150	11.2	59.9	72.6
26	2.55	5.5	150	11.2	60.3	72.8
27	2.55	5.5	150	11.2	64.0	70.2
28	2.55	5.5	150	11.2	70.2	76.4
29	2.55	5.5	150	11.2	61.8	77.6
30	2.55	5.5	150	11.2	60.7	77.1

Tab.10.30 Matrice degli esperimenti svolti per HPB-CD dopo 48 ore di washing

Si riporta una breve descrizione del modello matematico proposto, al fine di confrontare il modello con quanto ottenuto sui dati relativi alle 24 ore. La qualità del *fitting* è accettabile, sia in termini di significatività (*p-value* del parametro *Model* e del *LoF*), sia come dipendenza dai parametri : A, B, C, CD, C² (Tab. 10.31).

ANOVA for Response Surface Reduced Quadratic model						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	1758.74	7	251.25	8.95	< 0.0001	significant
A-HPB-CD conc.	182.30	1	182.30	6.49	0.0183	
B-Water/Sand ratio	159.53	1	159.53	5.68	0.0262	
C-Mixing rate	666.44	1	666.44	23.73	< 0.0001	
D-IFO180 conc.	13.69	1	13.69	0.49	0.4924	
BC	96.95	1	96.95	3.45	0.0766	
CD	416.60	1	416.60	14.83	0.0009	
C^2	351.65	1	351.65	12.52	0.0018	
Residual	617.84	22	28.08			
Lack of Fit	572.46	17	33.67	3.71	0.0765	not significant
Pure Error	45.38	5	9.08			

Tab. 10.31 ANOVA per il modello quadratico applicato ad HPB-CD (48 ore) – F test

Std. Dev.	5.30	R-Squared	0.7400
Mean	70.77	Adj R-Squared	0.6573
C.V. %	7.49	Pred R-Squared	0.5617
PRESS	1041.62	Adeq Precision	12.217

Tab. 10.32 ANOVA per il modello quadratico applicato ad HPB-CD (48 ore) – parametri statistici

Final Equation in Terms of Coded Factors:	
Yield 48	=
+74.86	
+3.18	* A
+2.98	* B
-6.14	* C
+0.77	* D
+2.46	* BC
+4.48	* CD
-6.99	* C^2

Tab. 10.33 Coefficienti polinomiali nel caso studio HPB-CD (48 ore)

I parametri influenti sulle rese di rimozioni sono lievemente cambiati rispetto al modello delle 24 ore; pur confermandosi la forte significatività di A, C e CD che mantengono valori di p-value e coefficienti nel polinomio descrittivo del modello paragonabili (tab.10.27 e tab 10.29; tab.10.31 e tab.10.33 rispettivamente alle 24 e 48 ore)

10.6.4 Validazione sperimentale del modello selezionato e ottimizzazione dei parametri del processo alle 24 ore

Gli esperimenti di validazione del modello sono stati condotti in doppio: i risultati, media e deviazione standard sono riportati in *tab.10.34*. Dall'analisi degli esperimenti di validazione, si osserva la sovrapposizione degli intervalli di confidenza fra i valori predetti e quelli osservati. Questi risultati suggeriscono che il modello sviluppato può accuratamente predire i risultati.

HPB-CD: Model validation					
A	B	C	D	HC removal predicted (%)	HC removal observed (%)
1.8	7	100	2.5	77.4 ± 7.1 ⁱ	68.5 ± 1.5 ⁱⁱ
0.5	3	190	6.5	49.9 ± 7.1 ⁱ	52.3 ± 6.5 ⁱⁱ

Tab. 10.34 HPB-CD (24 ore) – Model validation

Vengono riportate le soluzioni secondo i criteri di ottimizzazione prescelti (*par.10.2*).

In tabella viene riportata, per ogni livello di contaminazione, una delle soluzioni avente desiderabilità pari ad 1, proposta dall'applicativo.

Dalla *tab.10.35* risulta evidente che il massimo della rimozione si verifica sempre in prossimità di concentrazioni intermedie di HPB-CD (nell'intervallo 2.6 - 3.3 g/100ml). Inoltre all'aumentare della concentrazione di contaminazione cala la resa di rimozione; mantenendo velocità di agitazione basse.

L'andamento delle superfici di risposta è così riassumibile: alti valori di rimozione degli idrocarburi del petrolio si ottengono per concentrazioni intermedie di HPB-CD, basse concentrazioni di contaminazione, basse velocità di *mixing*, a prescindere dal quantitativo di acqua utilizzato (rapporto suolo/acqua praticamente ininfluyente). In particolare, al fine di massimizzare la resa di rimozione degli idrocarburi totali trattando le sabbie con *washing* per 24 ore, i valori ottimali delle variabili, non ponendo limiti su questi, risultano essere così riassunti: concentrazione di HPB-CD 2.6 – 3.3 (g/100ml), rapporto acqua/soilo ininfluyente (ml/g), velocità di *mixing* tra 80-85 e sabbia contaminata sino a 2.5 g/kg. In tali condizioni la resa di rimozione, ottimizzata dal *software*, raggiunge valori circa dell' 85.3 % (dato non verificato sperimentalmente). I risultati mostrano che HPB-CD può essere impiegato nella *remediation* di suoli contaminati da idrocarburi del petrolio con buone

efficienze, il mobilizzante risulta ottimale nel trattare sabbie poco contaminate, riducendo consumi di acqua e di energia. In letteratura diversi autori si sono interessati alle ciclodestrine, focalizzando l'attenzione sulla capacità di queste molecole di rimuovere IPA da matrici contaminate (Wang et. al., 1998; Berselli *et al.* 2004; Ye M *et al.*, 2014; Sun MM *et al.*, 2013)

A	B	C	D	HPB-CD: Maximum HC removal predicted (%)	
				A,B,C : <i>in range</i> HC removal : <i>maximum</i>	
3.3	7.5	80	2.5	85.3 ± 7.1 ⁱ	
3.0	10	80	6.5	76.5 ± 7.1 ⁱ	
2.6	5.5	220	20	75.9 ± 7.1 ⁱ	
A	B	C	D	HPB-CD: Optimum HC removal (%)	
				A, C: <i>in range</i> HC removal (%): <i>maximum</i> B : <i>minimum</i>	
				HC removal predicted (%)	HC removal observed (%)
3.3	1	85	2.5	82.9 ± 7.1 ⁱ	81.4 ± 0.4 ⁱⁱ
3.0	1	80	6.5	74.3 ± 7.1 ⁱ	67.2 ± 0.6 ⁱⁱ
2.6	1	150	20	72.6 ± 7.1 ⁱ	66.5 ± 2.6 ⁱⁱ

Tab.10.35 HPB-CD (24 ore) – Optimization criteria: Maximum and Optimum HC removal (%) i) model SD at level confidence of 95% ii) experimental error

10.7 SR

10.7.1 RSM applicato alle 24 ore: analisi statistica della risposta

Applicata ANOVA, viene esaminata la significatività dei parametri del modello predittivo. In *tab 10.35* sono elencate le 30 *run* sperimentali: valori assunti per ogni parametro di processo (A, B, C, D) e risposta delle singole prove (Yield 24%) Esse si discostano da quanto previsto dal *DoE*, ma nel complesso non si osserva distorsione dei punti del disegno sperimentale significativa (vedi Plot dei *Leverage vs. Run. fig. 10.20*).

Run	A:SR conc. g/100ml	B:Water/Sand ratio ml/g	C:Mixing rate rpm	D:IFO180 conc. g/kg	Yield 24 %
1	0.02	1	80	0.61	45.7
2	0.2	1	80	0.61	42.3
3	0.02	10	80	0.61	49.2
4	0.2	10	80	0.61	59.2
5	0.02	1	220	0.61	55.5
6	0.2	1	220	0.61	62.8
7	0.02	10	220	0.61	60.5
8	0.2	10	220	0.61	65.4
9	0.02	1	80	15.71	3.5
10	0.2	1	80	15.71	22.9
11	0.02	10	80	15.71	6.2
12	0.2	10	80	15.71	18.7
13	0.02	1	220	15.71	26.6
14	0.2	1	220	15.71	19.0
15	0.02	10	220	15.71	28.4
16	0.2	10	220	15.71	62.4
17	0.02	5.5	150	10.54	36.9
18	0.2	5.5	150	10.54	41.6
19	0.11	1	150	10.54	39.8
20	0.11	10	150	10.54	73.2
21	0.11	5.5	80	10.54	38.9
22	0.11	5.5	220	10.54	74.6
23	0.11	5.5	150	0.61	57.3
24	0.11	5.5	150	15.71	42.6
25	0.11	5.5	150	10.54	65.1
26	0.11	5.5	150	10.54	64.9
27	0.11	5.5	150	10.54	62.9
28	0.11	5.5	150	10.54	64.2
29	0.11	5.5	150	10.54	54.6
30	0.11	5.5	150	10.54	55.5

Tab.10.36 Matrice degli esperimenti svolti per SR dopo 24 ore di *washing*

Le rese di rimozione sono comprese nell'intervallo 3.5 – 73.2 (%); le prove di *washing* sono state eseguite in singolo mentre i campionamenti e analisi delle sabbie in doppio. A seguire le *tab 10.37* e *tab. 10.38* riassumono l'analisi della varianza ed illustrano i termini del modello significativi. Dal polinomio selezionato per descrivere il processo sono stati

eliminati i termini poco significativi per il modello o comunque non migliorativi del *LoF*. Le seguenti tabelle mostrano che i valori calcolati dal test di Fischer per 'F-value' e '*p-value*' per il parametro *Model* sono rispettivamente 14.26 e <0.0001, questi valori indicano che il modello selezionato è altamente significativo ed esiste solo lo 0.01% di probabilità che la risposta sia casuale. Il valore associato di *p-value* minore di 0.05 per il modello (ovvero $\alpha = 0.05$ o 95% del livello di confidenza) indica che il modello è statisticamente significativo. Il modello statistico, così sviluppato, risulta accurato e può essere utilizzato per la predizione e ottimizzazione della resa di rimozione (*Model significant*), anche oltre il dominio operativo selezionato (*LoF not significant*). Il valore R^2 (0.865), superiore a 0.75, suggerisce una buona adeguatezza del modello ed indica che l'86.5% della variabilità della risposta può essere spiegata dal modello.

ANOVA for Response Surface Reduced Quadratic model						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	9420.07	9	1046.67	14.26	< 0.0001	significant
<i>A-SR conc.</i>	442.03	1	442.03	6.02	0.0234	
<i>B-Water/Sand ratio</i>	613.67	1	613.67	8.36	0.0090	
<i>C-Mixing rate</i>	1691.45	1	1691.45	23.05	0.0001	
<i>D-IFO180 conc.</i>	2234.39	1	2234.39	30.44	< 0.0001	
<i>AB</i>	130.53	1	130.53	1.78	0.1973	
<i>AD</i>	89.81	1	89.81	1.22	0.2818	
<i>CD</i>	112.44	1	112.44	1.53	0.2301	
<i>A^2</i>	800.88	1	800.88	10.91	0.0035	
<i>D^2</i>	288.27	1	288.27	3.93	0.0614	
Residual	1467.84	20	73.39			
<i>Lack of Fit</i>	1351.00	15	90.07	3.85	0.0717	not significant
<i>Pure Error</i>	116.84	5	23.37			

Tab. 10.37 ANOVA per il modello quadratico applicato ad SR (24 ore) – F test

Std. Dev.	8.57	R-Squared	0.8652
Mean	46.68	Adj R-Squared	0.8045
C.V. %	18.35	Pred R-Squared	0.6579
PRESS	3724.59	Adeq Precision	13.927

Tab. 10.38 ANOVA per il modello quadratico applicato ad SR (24 ore) – parametri statistici

La *tab.10.37* mostra che IFO180 conc. nelle sabbie (D, *p-value* < 0.0001), la velocità di *mixing* (C, *p-value* = 0.0001), e a seguire, il termine quadratico di concentrazione di biosurfattante (A², *p-value* = 0.0035) e il rapporto acqua/ suolo (B *p-value* = 0.0090) sono i termini significativi del modello. Gli altri termini, in particolar modo quelli di interazione non sono statisticamente significativi, a causa del loro *p-value* elevato. Il modello statistico, così sviluppato, risulta accurato e può essere utilizzato per la predizione e ottimizzazione della resa di rimozione, rimanendo all'interno del dominio sperimentale scelto. Per descrivere la superficie di risposta, i dati sperimentali sono stati ottimizzati utilizzando un'equazione polinomiale di secondo grado.

Si riportano i coefficienti finali in termini di fattori codificati x_i:

Final Equation in Terms of Coded Factors:	
Yield 24	=
+59.36	
+5.11	* A
+5.84	* B
+10.00	* C
-26.53	* D
+2.86	* AB
+3.04	* AD
+3.40	* CD
-15.25	* A ²
-17.10	* D ²

Tab. 10.39 Coefficienti polinomiali nel caso studio SR (24 ore)

Diagnostica dei residui. L'analisi dei residui è necessaria per confermare che i presupposti dell'ANOVA siano rispettati. L'assunzione di normalità può essere verificata valutando per esempio il grafico *predicted vs actual* mostrato in *Fig.10.19*.

Design-Expert® Software
Yield 24

Color points by value of
Yield 24:
74.6
3.5

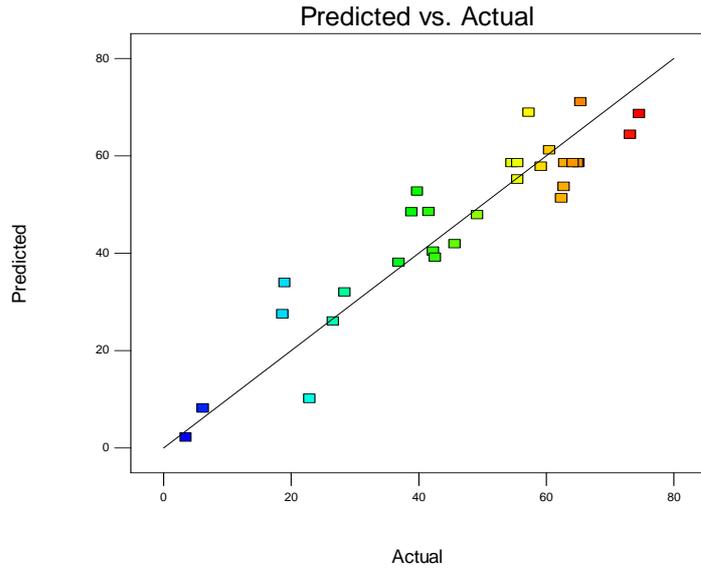


Fig 10.19 Plot dei Predicted vs. Actual

Nel caso in esame si nota una disposizione randomica che conferma che i presupposti dell'ANOVA sono rispettati. Fra i diagrammi di influenza si riporta il grafico dei *leverage*: non sono presenti punti con *leverage* elevato, cioè punti che presentino grande influenza sulla scelta del modello (Fig 10.20 nessun termina supera le rette di controllo).

Dalla diagnostica è risultato che il modello predittivo della risposta è accettabile. E' possibile descrivere l'andamento della risposta in funzione dei fattori considerati (superficie di risposta).

Design-Expert® Software
Yield 24

Color points by value of
Yield 24:
74.6
3.5

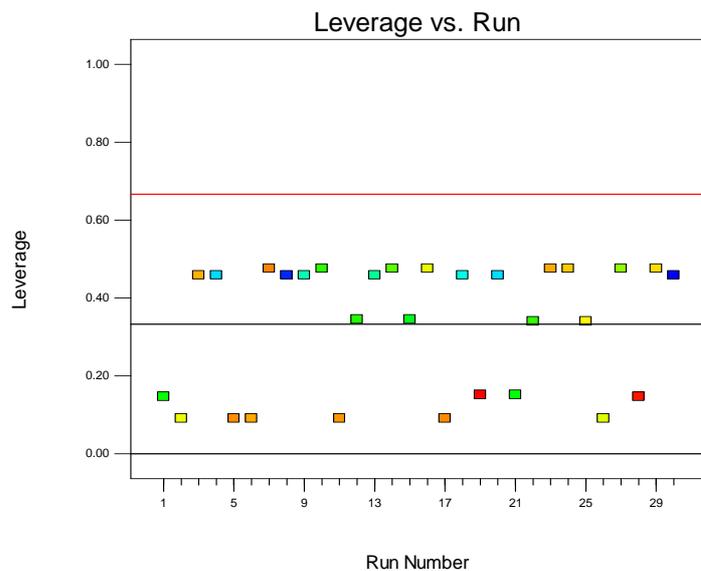


Fig 10.20 Plot dei Leverage vs. Run

10.7.2 RSM applicato alle 24 ore: influenza dei parametri sulla risposta

Per valutare l'influenza dei singoli fattori, e loro interazioni, sulla resa di rimozione è utile avvalersi del supporto grafico, in quanto risulta più immediato individuare le condizioni ottimali della risposta.

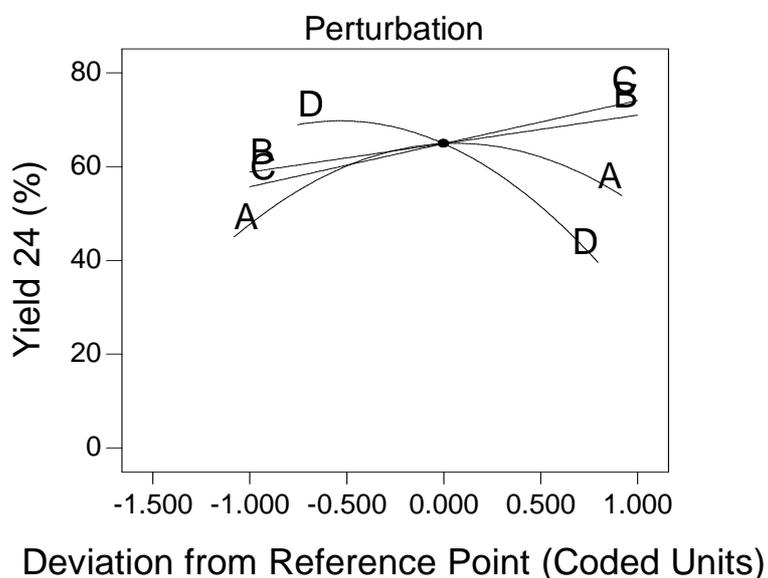


Fig. 10.21 Perturbation plot. Influenza dei singoli parametri sulla resa di rimozione degli idrocarburi SR (24 ore)

La Fig.10.21 mostra l'effetto dei quattro fattori sulla percentuale di rimozione degli idrocarburi totali, mantenendo gli altri parametri al valore centrale del dominio.

A - effetto di SR conc. (g/100 ml) : i risultati indicano che la percentuale di rimozione aumenta quasi linearmente con l'aumento della concentrazione di soforolipide sino ad un valore di circa 0.11 (g/100 ml) di concentrazione, per poi diminuire sino a concentrazioni di SR pari a circa 0.2 (g/100 ml). I risultati sono in apparente contraddizione con quanto riportato in letteratura: Mnif *et al.* (2013) hanno evidenziato un aumento tendenzialmente lineare della resa di rimozione all'aumentare della concentrazione di surfattante impiegato nella sperimentazione (*lipopeptide prodotto da Bacillus*). Solitamente la mobilizzazione o solubilizzazione da parte del surfattante dipende fortemente dalla sua concentrazione (Lai *et al.*, 2009). L'aumento della capacità di mobilizzare l'inquinante dalla matrice solida in relazione all'aumento della concentrazione di emulsionante è stata riportata in letteratura anche da Urum *et al.* (2003, 2004, 2015), Lai *et al.* (2009) e Peng *et al.* (2010). In particolare Urum *et al.* hanno indagato le condizioni ottimali per il *washing* di un suolo contaminato da petrolio greggio, testando diversi biosurfattanti. Tutti i surfattanti impiegati

hanno mostrato un aumento della capacità di rimozione dei contaminanti dal suolo all'aumentare della concentrazione della soluzione acquosa, ad eccezione del biosurfattante lecitina e tannino, per i quali non si osserva un aumento della solubilizzazione del petrolio nel suolo quando vengono impiegati a concentrazioni superiori alla loro CMC. Potrebbe rientrare in questa eccezione anche il soforolipide impiegato nella nostra sperimentazione ($CMC_{SR} = 0.02\%$), evidenziando che la rimozione del petrolio dalla matrice solida dipende fortemente sia dalle proprietà del surfattante che dalle caratteristiche del sistema surfattante/acqua/soilo. Quando i surfattanti sono aggiunti al sistema acqua-suolo, una determinata quantità è inevitabilmente adsorbita dalle particelle solide. Più i surfattanti sono adsorbiti, minore risulta essere il loro contributo alla solubilizzazione dell'inquinante, rendendo meno efficace il trattamento di *washing*. Inoltre, all'aumentare dell'adsorbimento del surfattante nella matrice solida si verifica un aumento dell'idrofobicità del suolo. Ne consegue un riadsorbimento nella matrice solida del composto organico precedentemente solubilizzato dal surfattante (Paria, 2008) La capacità di adsorbimento del surfattante nel suolo dipende da diversi fattori, principalmente dalla struttura molecolare del surfattante. E' infatti noto che le CMC di letteratura si riferiscono al "puro", cioè ad una soluzione acqua/surfattante in assenza della matrice contaminata. Quest'ultima, a causa di effetti di assorbimento e altre interazioni di diversa natura, può modificare in modo rilevante la CMC effettiva, rendendo poco prevedibile la capacità di rimozione del surfattante in funzione della sua concentrazione iniziale in soluzione acquosa.

B - effetto del water/sand ratio (ml/g) sulla resa di rimozione:

Un aumento della resa di rimozione degli idrocarburi totali si riscontra all'aumentare del parametro B - water/sand (ml/g), con un andamento lineare. Il parametro B, come detto precedentemente, risulta essere tra i più significativi. I risultati sono in accordo con quanto pubblicato da Urum *et al.* (2004), Han *et al.* (2009), Peng *et al.* (2011), Kalali *et al.* (2011). L'aumento del parametro B promuove quasi per certo la diffusione dei contaminanti desorbiti nella fase acquosa, accrescendo la rimozione del petrolio (Han *et al.*, 2009).

C - effetto della *mixing rate* (rpm) sulla resa di rimozione:

L'aumento del parametro C ha un effetto positivo sulla resa di rimozione. I risultati sono in accordo con quanto riportato da Urum *et al.* (2003), Lai *et al.* (2009), Han *et al.* (2009), Mnif *et al.* (2013), in cui un aumento del livello di agitazione aumenta fortemente la

capacità di rimozione da parte dei biosurfattanti studiati nei relativi casi sperimentali. I risultati indicano che probabilmente l'aumento della *mixing rate* oltre a migliorare l'attrito tra le particelle del suolo e la forza di lavaggio della soluzione, comporta un aumento della diffusione dei contaminanti desorbiti e la loro interazione con le micelle del tensioattivo in soluzione, accelerando la solubilizzazione (Han *et al.*, 2009).

D - effetto della concentrazione di IFO180 conc. (g/kg) sulla resa di rimozione:

La concentrazione di idrocarburi totali, mostra un effetto negativo sulla rimozione degli idrocarburi: le rese aumentano fino a concentrazioni di circa 5 g/kg per poi diminuire drasticamente all'aumentare della concentrazione di contaminazione. Questi risultati si possono considerare in accordo rispetto a quanto pubblicato da Mnif *et al.* (2013): la percentuale di mobilizzazione aumenta sino ad una contaminazione di diesel pari a 100 µl/g, in presenza di biosurfattante (SPB1 0.1% w/v). Mentre oltre i 100 µl/g di diesel, si osserva un significativa diminuzione della mobilizzazione

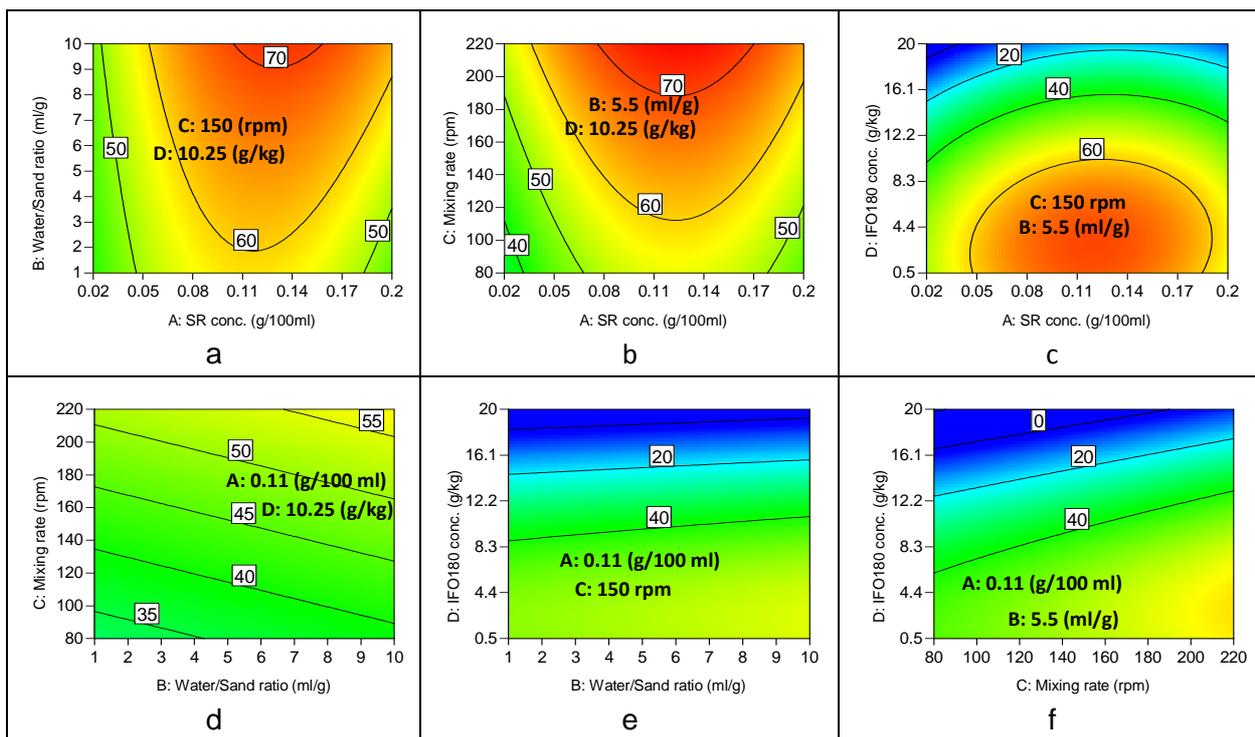


Fig. 10.22 Contour plot. Influenza della interazione di coppie di parametri sulla resa di rimozione degli idrocarburi – SR (24 ore)

In Fig.10.22 sono rappresentate le superficie di risposta in 3D, evidenziando l'influenza dell'interazione di coppie di parametri sulle rese di rimozione (*contour plot*). In tal modo si valutano le interazioni fra i diversi fattori.

Il grafico a) correla i fattori A/B. Si osserva una significativa interazione di questi due parametri operativi sulle rese di rimozione, in particolare si ha un massimo di rese di rimozione per A ~ 0.11 g/100 ml;

il grafico b) correla i fattori A/C. Si osserva una significativa interazione di questi due parametri operativi sulle rese di rimozione, in particolare si ha un massimo di rese di rimozione per A ~ 0.11 g/100 ml.

Il grafico c) correla A/D. Si osserva una significativa interazione di questi due parametri operativi sulle rese di rimozione, in particolare si ha un massimo di rese di rimozione per A ~ 0.11 g/100 ml.

Il grafico f) correla i fattori C/D. Si osserva unicamente una lieve interazione di questi due parametri operativi sulle rese di rimozione per IFO180 conc. >10 g/kg.

10.7.3 RSM applicato alle 48 ore

Tramite ANOVA viene esaminata la significatività dei parametri del modello predittivo. In *tab 10.6* sono elencate le 30 *run* sperimentali: valori assunti per ogni parametro di processo (A, B, C, D) e risposta delle sperimentazioni (Yield 48 %).

Le rese di rimozione sono comprese nell'intervallo 7.1 – 79.7 (%); le prove di *washing*, i campionamenti e analisi delle sabbie sono state eseguite in singolo.

A conferma della bontà dei dati, si osserva un aumento delle rimozioni nella quasi totalità dei casi alle 48 ore (le tre eccezioni rientrano comunque nell'errore sperimentale).

Si riporta una breve descrizione del modello matematico proposto, al fine di evidenziarne la similarità con quanto ottenuto sui dati relativi alle 24 ore. La qualità del fitting è accettabile, sia in termini di significatività (p-value del parametro *Model* e del *LoF*), sia come dipendenza dai parametri : A, B, C, D, A², D² (*Fig. 10.7-8*). Anche i coefficienti del polinomio sono dello stesso ordine di grandezza.

Tali parametri di processo sono stati inclusi nel modello descrittivo del processo (parametri utilizzati nel modello quadratico: A, B, C, D, BD, CD, A², D²), si riscontrano coefficienti simili a quanto calcolato per il modello SR alle 24 ore (*Fig. 10.9*).

Run	A:SR conc. g/100ml	B:Water/Sand ratio ml/g	C:Mixing rate rpm	D:IFO180 conc. g/kg	Yield 24 %	Yield 48 %
1	0.02	1	80	0.61	45.7	51.6
2	0.2	1	80	0.61	42.3	58.0
3	0.02	10	80	0.61	49.2	58.2
4	0.2	10	80	0.61	59.2	64.5
5	0.02	1	220	0.61	55.5	58.2
6	0.2	1	220	0.61	62.8	61.0
7	0.02	10	220	0.61	60.5	64.0
8	0.2	10	220	0.61	65.4	66.9
9	0.02	1	80	15.71	3.5	7.1
10	0.2	1	80	15.71	22.9	29.4
11	0.02	10	80	15.71	6.2	21.3
12	0.2	10	80	15.71	18.7	25.9
13	0.02	1	220	15.71	26.6	36.0
14	0.2	1	220	15.71	19.0	23.2
15	0.02	10	220	15.71	28.4	37.8
16	0.2	10	220	15.71	62.4	69
17	0.02	5.5	150	10.54	36.9	39.1
18	0.2	5.5	150	10.54	41.6	73.7
19	0.11	1	150	10.54	39.8	40.4
20	0.11	10	150	10.54	73.2	78.4
21	0.11	5.5	80	10.54	38.9	63.5
22	0.11	5.5	220	10.54	74.6	79.7
23	0.11	5.5	150	0.61	57.3	67.2
24	0.11	5.5	150	15.71	42.6	49.1
25	0.11	5.5	150	10.54	65.1	60.4
26	0.11	5.5	150	10.54	64.9	70.7
27	0.11	5.5	150	10.54	62.9	60.5
28	0.11	5.5	150	10.54	64.2	70.8
29	0.11	5.5	150	10.54	54.6	64.7
30	0.11	5.5	150	10.54	55.5	58.2

Tab.10.40 Matrice degli esperimenti svolti per SR dopo 48 ore di washing

Analogamente alle 24 ore i parametri di processo che risultano avere la maggiore influenza sulle rese risultano essere i termini lineari della concentrazione di IFO180 presente nelle sabbie, la velocità di agitazione, il rapporto acqua/suolo e il termine quadratico della concentrazione di biosurfattante nella soluzione di lavaggio.

ANOVA for Response Surface Reduced Quadratic model						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	8245.21	9	916.13	10.34	< 0.0001	significant
<i>A-SR conc.</i>	603.31	1	603.31	6.81	0.0168	
<i>B-Water/Sand ratio</i>	814.73	1	814.73	9.19	0.0066	
<i>C-Mixing rate</i>	935.67	1	935.67	10.56	0.0040	
<i>D-IFO180 conc.</i>	2554.89	1	2554.89	28.82	< 0.0001	
<i>AB</i>	43.23	1	43.23	0.49	0.4930	
<i>AD</i>	73.00	1	73.00	0.82	0.3749	
<i>CD</i>	265.48	1	265.48	3.00	0.0989	
<i>A^2</i>	374.52	1	374.52	4.23	0.0531	
<i>D^2</i>	577.39	1	577.39	6.51	0.0190	
Residual	1772.71	20	88.64			
<i>Lack of Fit</i>	1622.52	15	108.17	3.60	0.0818	<i>not significant</i>
<i>Pure Error</i>	150.19	5	30.04			

Tab. 10.41 ANOVA per il modello quadratico applicato ad SR (48 ore) – F test

Std. Dev.	9.41	R-Squared	0.8230
Mean	53.62	Adj R-Squared	0.7434
C.V. %	17.56	Pred R-Squared	0.5521
PRESS	4487.20	Adeq Precision	11.909

Tab. 10.42 ANOVA per il modello quadratico applicato ad SR (48 ore) – parametri statistici

Final Equation in Terms of Coded Factors:	
Yield 48	=
+65.94	
+5.97	* A
+6.73	* B
+7.44	* C
-28.37	* D
+1.64	* AB
+2.74	* AD
+5.23	* CD
-10.43	* A^2
-24.20	* D^2

Tab. 10.43 Coefficienti polinomiali nel caso studio SR (48 ore)

La Fig. 10.23 riporta gli effetti dei singoli termini lineari del modello sulla resa di rimozione, mantenendo gli altri parametri costanti al centro del dominio sperimentale.

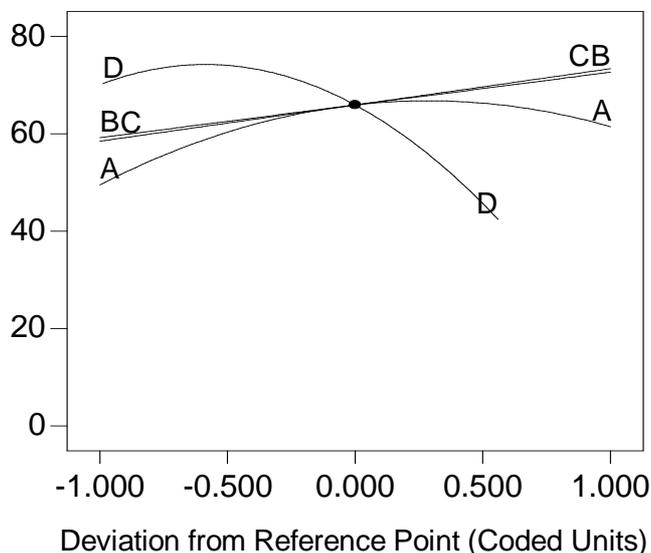


Fig. 10.23 Perturbation plot. Influenza dei singoli parametri sulla resa di rimozione degli idrocarburi SR (48 ore)

Si riscontrano rese crescenti al diminuire della concentrazione del contaminante e all'aumentare della velocità di mixing e del rapporto acqua/suolo; si osserva inoltre un punto di massimo di resa per il parametro concentrazione di surfattante, analogamente a quanto riscontrato nel caso delle 24 ore.

10.7.4 Validazione sperimentale del modello selezionato e ottimizzazione dei parametri del processo alle 24 ore

Gli esperimenti di validazione del modello sono stati condotti in doppio: i risultati, media e deviazione standard sono riportati in tab.10.44.

SR : Model validation					
A	B	C	D	HC removal predicted (%)	HC removal observed (%)
0.18	7	100	2.5	60.0 ± 8.6 ⁱ	62.8 ± 3.1 ⁱⁱ
0.05	3	190	6.5	60.3 ± 8.6 ⁱ	59.5 ± 0.2 ⁱⁱ

Tab.10.44 SR (24 ore) – Model validation

Dall'analisi degli esperimenti di validazione, si osserva la sovrapposizione degli intervalli di confidenza fra i valori predetti e quelli osservati. Questi risultati suggeriscono che il modello sviluppato può accuratamente predire i risultati. Nella *tab. 10.45* vengono riportate le soluzioni secondo i criteri di ottimizzazione prescelti (*par. 10.2*). In tabella viene riportata, per ogni livello di contaminazione, una delle soluzioni avente desiderabilità pari ad 1, proposta dall'applicativo.

Dalla *tab. 10.45* risulta evidente che il massimo della rimozione si verifica sempre in prossimità di concentrazioni intermedie di soforolipidi (circa 0.11 g/100ml). Inoltre all'aumentare della concentrazione di contaminazione cala la resa di rimozione pur mantenendo alte le velocità di agitazione.

A	B	C	D	SR: Maximum HC removal predicted (%)	
				A,B,C : in range	
				HC removal : maximum	
0.12	9.5	205	2.5	81.0 ± 8.6 ⁱ	
0.10	8.7	216	6.5	78.7 ± 8.6 ⁱ	
0.14	10	220	20	58.4 ± 8.6 ⁱ	
A	B	C	D	SR: Optimum HC removal (%)	
				A, C: in range HC removal (%): maximum	
				B : minimum	
				HC removal predicted (%)	HC removal observed (%)
0.11	1	220	2.5	71.1 ± 8.6 ⁱ	69.2 ± 1.3 ⁱⁱ
0.11	1	220	6.5	69.8 ± 8.6 ⁱ	58.9 ± 1.5 ⁱⁱ
0.11	1	220	20	45.5 ± 8.6 ⁱ	48.8 ± 7.5 ⁱⁱ

Tab. 10.45 SR (24 ore) – Optimization criteria: **Maximum and Optimum HC removal (%)** i) model SD at level confidence of 95% ii) experimental error

L'andamento delle superfici di risposta è così riassumibile: alti valori di rimozione degli idrocarburi del petrolio si ottengono per concentrazioni intermedie di soforolipidi, basse concentrazioni di contaminazione, elevate velocità di *mixing* ed elevati volumi di soluzione contenente il biosurfattante (alti rapporti acqua/suolo). In particolare, al fine di massimizzare la resa di rimozione degli idrocarburi totali trattando le sabbie con *washing*

per 24 ore, i valori ottimali delle variabili, non ponendo limiti su questi, risultano essere così riassunti: concentrazione di soforolipidi tra 0.11-0.13 (g/100ml), rapporto acqua/suolo 8.7-10 (ml/g), velocità di *mixing* tra 205-220 e sabbia contaminata sino a 6.5 g/kg. In tali condizioni la resa di rimozione, ottimizzata dal *software*, raggiunge valori circa dell' 80 % (dato non verificato sperimentalmente). I risultati mostrano che il biosurfattante soforolipide può essere impiegato nella *remediation* di suoli contaminati da idrocarburi del petrolio con buone efficienze.

Mnif *et al.* (2013) hanno dimostrato, tramite sperimentazioni in laboratorio, che il biosurfattante lipopeptide SPB1, prodotto da *Bacillus subtilis*, può raggiungere rimozioni dell'87% utilizzando un rapporto acqua/suolo di 12, una velocità di *mixing* di 200 rpm e concentrazione di lipopeptide a 0.1%, per 24 ore. Il valore ottenuto risulta più elevato di quello riportato nei risultati di molti studi presenti in letteratura (Urum *et al.*, 2003; Urum *et al.*, 2006; Franzetti *et al.*, 2009; Lai *et al.*, 2009).

I risultati ottenuti dalla nostra sperimentazione sono comparabili con le rimozioni riportate da Luna *et al.* (2009). L'articolo tratta la capacità di rimozione degli idrocarburi del petrolio nel lavaggio di sabbie contaminate artificialmente con 5 ml di olio per motori ad opera di un biosurfattante prodotto da *Candida glabrata* UCP1002. Le rimozioni sono state pari all'84% alle seguenti condizioni: concentrazione di surfattante pari a 2.5% (valore della sua CMC), rapporto acqua/suolo pari a 3 (v/w), velocità di agitazione 150 rpm, temperatura di 27°C, per 24 ore. Questi valori sono molto più alti di quelli riportati da Lai *et al.* (2009) per i ramnolipidi e la surfattina, riportati da Urum e Pekdemir (2004).

11. Determinazione della frazione *n-alcani*/IPA in IFO180 e nei casi di validazione/ottimizzazione

Idrocarburi alifatici lineari

I *n-alcani* rappresentano in genere la frazione di idrocarburi del petrolio maggiormente insolubile in acqua: nella fase di *screening* è infatti emerso che la percentuale di rimozione degli *n-alcani* dalle sabbie contaminate è generalmente inferiore a quella degli idrocarburi totali. Se, nell'evidenza, risulta che gli *n-alcani* sono una frazione meno biodisponibile rispetto agli idrocarburi totali, è anche vero che sono le specie chimiche più facilmente degradabili. In letteratura non vi sono molti lavori dedicati alla rimozione di *n-alcani* da prodotti del petrolio utilizzando agenti biogeni. I surfattanti microbici sono stati testati anche per valutare applicazioni di *bioremediation* a *n-alcani*, in fanghi petroliferi, arricchiti con consorzi ammendanti di ramnolipidi e nutrienti; in questo caso l'incubazione è perdurata per diversi giorni, ma si sono osservate degradazioni di *nC12-nC21*; *nC22-nC31* oltre l'80% (Rahaman *et al.*, 2003)

Idrocarburi policiclici aromatici

Gli idrocarburi policiclici aromatici sono idrocarburi costituiti da due o più anelli benzenici uniti fra loro, in un'unica struttura piana, attraverso coppie di atomi di carbonio condivisi fra anelli adiacenti.

Gli IPA sono solidi a temperatura ambiente ed hanno punti di ebollizione e di fusione elevati. La tensione di vapore di tali composti è generalmente bassa, ed inversamente proporzionale al numero di anelli di cui sono composti. Gli IPA sono poco solubili o del tutto insolubili in acqua. La solubilità diminuisce all'aumentare del peso molecolare. Antracene e 2-metil-naftalene hanno rispettivamente 3 e 2 anelli benzilici condensati, mentre le altre specie sono più complesse. Le maggiori solubilità in acqua si osservano per il 2-metil-naftalene (30,6 ppm), il naftalene (24,6ppm) e acenaftalene (4,4 ppm).

Contaminazioni di IPA a causa di sversamenti di petrolio, sono molto diffuse e pongono seri problemi nel trattamento delle zone costiere, per cui l'indagine della loro presenza dopo uno sversamento risulta necessaria per stimare l'impatto sull'ambiente (Liu *et al.*, 2013; Huguenot *et al.*, 2015). Gli IPA sono contaminanti di grande interesse ambientale a causa della tossicità, cancerogenicità e mutagenicità già note da tempo, che li

contraddistingue, anche a basse concentrazioni (Pothuluri *et al.*, 1998; VanAgteren *et al.*, 1998). Alcuni *IPA* sono cancerogeni e sono quindi di particolare interesse come contaminati ambientali (Sims *et. al.*, 1983). Tali sostanze inducono sia effetti acuti che cronici sulle zone colpite e, per il benzo[a]pirene, uno degli *IPA* più cancerogeni che in quanto tale è il composto più studiato (Holstein *et al.*, 1979), si ha la certezza di una loro azione mutagena, cancerogena e teratogena.

11.1 Frazione *n*-alcani/*IPA* presente in IFO180

Il protocollo per la separazione della frazione *n*-alcani/*IPA* tramite l'utilizzo della colonna Upti - Clean SI/CN, è stato applicato a due tipologie di campioni (*par.8.2*):

- 4 campioni usati per costruire la retta di calibrazione di IFO180 (post *weathering* con solvente *overnight*) nel range 2-11 g/l, al fine di analizzare quali-quantitativamente le due famiglie. Si è determinato il rapporto in massa fra le due frazioni rispetto agli idrocarburi totali (p/p %).
- campioni di validazione/ottimizzazione per i 5 casi studio (blank, TX, SL, HPB-CD e SR)

La frazione *n*-alcani è stata analizzata quali-quantitativamente utilizzando la miscela di idrocarburi totali secondo il metodo descritto nel *par 8.4*. Come si evidenzia in *fig.11.1* la colonna separativa trattiene la frazione pesante e viscosa di IFO180 (presumibilmente resine e asfalteni), separando in modo efficiente la frazione *n*-alcani da quella più polare che comprende i policiclici aromatici. Nel cromatogramma dopo l'utilizzo della colonna, i picchi relativi a *n*-alcani sono più distinguibili, Per confermare il corretto riconoscimento di questa famiglia di composti (c12-c32), sono stati posti a confronto i risultati ottenuti prima e dopo l'utilizzo della colonna Upti - Clean SI/CN, relativi ai 4 campioni di IFO180 nell'intervallo 2-11 g/l, *tab.11.1*. L'analisi quantitativa nei due casi risulta praticamente identica. Si conferma quindi la bontà dei dati ottenuti tramite l'analisi degli estratti organici contenenti HC totali, per la valutazione della frazione *n*-alcani.

antracene (31,0%), 2-metil-naftalene (25,1%), acenaftalene (11,9), fluorantene (8,8%), naftalene (5,4%), crisene (4,4%), acenaftene (3,8%), fenantrene e pirene (2,9%), fluorene (2,6%) e benz[a]antracene (1,3%). Il rapporto *IPA/HC* (%) è stato valutato mediamente pari a 0,62 %. Le percentuali di rimozione di *IPA* mostrate nel par.11.2 sono da riferirsi a tale raggruppamento totale.

11.2 Frazione *n*-alcani/*IPA* nei campioni di validazione / ottimizzazione

Si illustrano sinteticamente i risultati ottenuti dall'analisi quali-quantitativa degli estratti organici relativi alle due frazioni (alifatica/aromatica) ottenute per i campioni di validazione/ottimizzazione del modello.

Nelle singole tabelle a seguire vengono presentate, per ogni caso studio, oltre alle condizioni di *washing* per i campioni validazione/ottimizzazione alle 24 ore, le percentuali di rimozioni già presentate in termini di idrocarburi totali (*HC removal* %) e le percentuali di rimozioni calcolate in termini di frazioni di *n*-alcani e *IPA*.

Dalla tab.11.2, possiamo dedurre che la rimozione degli *IPA* a fronte del *washing* con la sola acqua (*blank*), segue in termini percentuali il seguente andamento: *n*-alcani < *HC* < *IPA*. Tale *trend* è in accordo con quanto previsto in termini di solubilità delle classi di composti. *IPA*. Le percentuali di rimozione variano da 42.5 ± 3.9 a 67.5 ± 1.2 .

B-Water/Sand (ml/g)	C – Mixing rate (rpm)	D – IFO180 conc. (g/kg)	<i>HC removal</i> (%)	<i>n</i> -alcani removal (%)	<i>IPA removal</i> (%)
7	100	2.5	33.3 ± 1.9	19.0 ± 0.2	49.6 ± 3.0
3	190	6.5	43.9 ± 0.4	23.0 ± 5.2	67.5 ± 1.2
1	220	2.5	42.4 ± 5.5	22.6 ± 8.2	43.1 ± 2.0
1	220	6.5	44.4 ± 0.5	29.0 ± 2.3	60.8 ± 7.8
4.5	220	20	21.5 ± 0.0	23.2 ± 0.7	42.5 ± 3.9

Tab. 11.2 *washing* alle 24 ore dei campioni di validazione/ottimizzazione per il caso *blank*.

Confronto % di rimozione *HC* / *n*-alcani / *IPA*

A – TX (g/100ml)	B-Water/Sand (ml/g)	C – Mixing rate (rpm)	D – IFO180 conc. (g/kg)	HC removal (%)	<i>n-alcani</i> removal (%)	IPA removal (%)
1.8	7	100	2.5	63.0 ± 0.3	66.6 ± 1.2	83.2 ± 5.6
0.5	3	190	6.5	72.7 ± 0.1	72.0 ± 4.0	86.2 ± 1.8
5	1	220	2.5	68.9 ± 5.3	69.7 ± 7.9	87.8 ± 0.8
5	1	220	6.5	82.1 ± 1.0	81.9 ± 2.7	86.1 ± 6.8
5	1	220	20	76.7 ± 1.6	78.5 ± 1.3	81.3 ± 1.7

Tab. 11.3 washing alle 24 ore dei campioni di validazione/ottimizzazione per il caso TX. Confronto % di rimozione HC / *n-alcani* / IPA

A – SL (g/100ml)	B-Water/Sand (ml/g)	C – Mixing rate (rpm)	D – IFO180 conc. (g/kg)	HC removal (%)	<i>n-alcani</i> removal (%)	IPA removal (%)
1.8	7	100	2.5	73.3 ± 2.0	67.1 ± 2.4	79.4 ± 1.2
0.5	3	190	6.5	68.3 ± 5.3	63.7 ± 0.4	77.5 ± 4.1
2.7	1	220	2.5	75.3 ± 2.3	67.3 ± 1.3	77.3 ± 9.6
2.6	1	220	6.5	75.1 ± 1.9	60.0 ± 1.4	74.8 ± 1.6
2.6	1	150	20	75.9 ± 2.4	76.1 ± 2.5	82.5 ± 1.4

Tab. 11.4 washing alle 24 ore dei campioni di validazione/ottimizzazione per il caso SL. Confronto % di rimozione HC / *n-alcani* / IPA

Dalle tab.11.3-4, possiamo dedurre che la rimozione degli IPA a fronte del washing con l'utilizzo rispettivamente di TX e SL, segue in termini percentuali il seguente andamento: *n-alcani* ~ HC < IPA. Il range di valori riscontrati è relativamente ristretto (per TX da 81.3 ± 1.7% a 87.8 ± 0.8%; per SL 74.8 ± 1.6% a 82.5 ± 1.4%), ad indicare la buona capacità del Solec F di decontaminare suoli inquinati da IPA, in modo poco dipendente dalle condizioni di lavaggio. Dalla letteratura è noto che il Triton X-100 è in grado di includere IPA nelle proprie micelle, aumentando considerevolmente la solubilità apparente degli inquinanti, qualora utilizzato a concentrazioni superiori alle CMC (Wang *et. al.*, 1998). Altri lavori hanno messo a confronto la capacità di rimozione degli IPA delle ciclodestrine rispetto al Triton X-100 (Berselli *et al.*, 2004) mentre nulla è noto sul comportamento delle lecitine di soia, circa le rese di rimozione degli IPA da matrici contaminate.

A – HPB-CD (g/100ml)	B-Water/Sand (ml/g)	C – Mixing rate (rpm)	D – IFO180 conc. (g/kg)	HC removal (%)	<i>n</i> -alcani removal (%)	IPA removal (%)
1.8	7	100	2.5	68.5 ± 1.5	61.6 ± 1.3	82.1 ± 2.3
0.5	3	190	6.5	52.3 ± 3.5	43.3 ± 3.4	67.0 ± 0.8
3.3	1	85	2.5	81.4 ± 0.4	67.8 ± 3.6	82.1 ± 3.3
3.0	1	80	6.5	67.2 ± 0.6	62.1 ± 0.2	67.1 ± 1.0
2.6	1	150	20	66.5 ± 2.6	62.3 ± 1.3	73.0 ± 4.0

Tab. 11.5 washing alle 24 ore dei campioni di validazione/ottimizzazione per il caso HPB-CD.

Confronto % di rimozione HC / *n*-alcani / IPA

Dalle tab.11.5, possiamo dedurre che la rimozione degli IPA a fronte del washing con l'utilizzo di HPB-CD, segue in termini percentuali il seguente andamento: *n*-alcani < HC < IPA. Il range di valori riscontrati di rimozione degli IPA da suoli contaminati da FO180 è da 67.1 ± 1.0,% a 82.1 ± 2.3%; si evidenzia che i migliori risultati si ottengono su sabbie poco contaminate. Per HPB-CD si conferma quindi una buona capacità di decontaminazione della frazione IPA. In letteratura sono riportati diversi studi in merito alla capacità delle β-CD e HPB-CD di desorbire dal suolo composti idrofobici, come gli IPA e i PCB, e nel biorisanamento di suoli contaminanti da idrocarburi, quali oli minerali e IPA. Gómez *et al.* (2010) hanno dimostrato che una soluzione acquosa contenente l'1% di HPB-CD è capace di rimuovere il 70% di fenantrene nel washing di un suolo contaminato artificialmente con 5 g/kg di IPA, dopo sei giorni. E' noto che HPB-CD, oligosaccaride ciclico, contiene una cavità a tronco di cono apolare che favorisce la formazione di chelati stabili. Le ciclodestrine sono infatti in grado di complessare gli IPA all'interno delle cavità, purché la forma e il peso molecolare dell'inquinante siano stericamente compatibili: si stima infatti maggiore affinità con naftalene, fenantrene rispetto ad antracene fluorante e pirene; malgrado Wang *et. al.*, (1998) abbiano osservato che laddove la molecola di IPA risulti troppo ingombrante per formare complessi 1:1, si possono formare inclusioni più complesse con rapporti molecolari pari a 1:2 (ciclodestrina : IPA). Altri autori si sono interessati alle proprietà di rimozione di IPA da suoli contaminati, applicando il washing : Berselli *et al.* (2004) hanno valutato le rese di rimozione di β-CD, HPB-CD e ramnolipidi; poste a confronto con Triton X-100; riscontrando rimozioni rispettivamente del 60%, 39%, 36% rispetto al TX. Altri studi sono stati nel tempo dedicati alle ciclodestrine quali decontaminanti di IPA in suoli inquinati e posti a confronto con TX. Cuypers *et al.* (2002) hanno stimato la biodisponibilità degli IPA in suoli contaminati trattati con Idrossi-β-

ciclodestrine (HPB-CD) confrontando i risultati ottenuti con il TX. I risultati sono confortanti ed in linea a quanto osservato da altri precedenti autori (Reid et al, 1998; 1999; 2000). Ulteriori lavori più recenti hanno trattato le proprietà delle ciclodestrine nel rimuovere IPA da suoli contaminati con trattamenti di *washing* (Ye M et al., 2014; Sun MM et al., 2013). Infine, recentemente, Sánchez-Trujillo et al. (2013) hanno evidenziato come CD modificate chimicamente, comprendenti HPB-CD, RAMEB e HP- γ -CD, siano più efficienti nella rimozione degli IPA rispetto alle β -ciclodestrine naturali. La più alta percentuale di rimozione è stata ottenuta utilizzando le HPB-CD e le RAMEB, con percentuali superiori al 41% e 43% rispettivamente, in tre *washing* sequenziali. Inoltre, lo studio ha evidenziato come le rimozioni maggiori si siano verificate per molecole lipofile piccole, che grazie alla loro forma e dimensione riescono ad entrare agevolmente nelle cavità delle CD; mentre molecole troppo grandi (ad esempio composte da 6 anelli come in alcuni IPA) possono comunque portare alla formazione di complessi, ma solo una parte di esse entra nella cavità idrofobica.

Dalla *tab.11.6*, possiamo dedurre che la rimozione degli IPA a fronte del *washing* con l'utilizzo di SR, segue in termini percentuali il seguente andamento: n -alcani < HC < IPA, nelle condizioni di ottimizzazione, (quando si minimizza il consumo di acqua - ultime tre righe della tabella) mentre n -alcani < HC = IPA per i restanti casi. Il range di valori riscontrati di rimozione degli IPA da suoli contaminati da FO180 è da $60.6 \pm 4.3\%$ a 91.9 ± 0.1 ; presenta quindi una forte variabilità.

A – SR (g/100ml)	B-Water/Sand (ml/g)	C – Mixing rate (rpm)	D – IFO180 conc. (g/kg)	HC removal (%)	<i>n</i> -alcani removal (%)	IPA removal (%)
0.18	7	100	2.5	62.8 ± 3.1	51.3 ± 4.6	67.4 ± 5.9
0.05	3	190	6.5	59.5 ± 0.2	49.2 ± 5.4	60.6 ± 4.3
0.11	1	220	2.5	69.2 ± 1.3	56.6 ± 6.1	83.5 ± 2.8
0.11	1	220	6.5	58.9 ± 1.5	38.0 ± 4.4	91.9 ± 0.1
0.11	1	220	20	48.8 ± 7.5	34.4 ± 2.2	62.9 ± 7.3

Tab. 11.6 washing alle 24 ore dei campioni di validazione/ottimizzazione per il caso SR. Confronto % di rimozione HC / *n*-alcani / IPA

Fra i surfattanti microbici, i ramnolipidi risultano efficaci anche nella rimozione di idrocarburi policiclici aromatici e pentaclorofenolo dal suolo con efficienza di rimozione del

60-80%, che varia con il tempo di contatto e concentrazione biosurfattante (Garcia *et al.*, 2003, Mulligan *et al.*, 2003). La rimozione del naftalene da suoli contaminati, trattati con biosurfattanti microbici, è stata studiata da Cumaraswamy *et al.* (2000) che ha osservato un aumento della solubilità del contaminante *IPA* di almeno 30 volte, rispetto all'acqua pura.

12. Caso studio SL – 2 factors : introduzione del parametro tempo

Con l'esperimento di seguito descritto si è inteso ottimizzare ulteriormente il caso studio applicato al surfattante Solec F, rivelatosi il più interessante sia in termini di rimozioni percentuali di idrocarburi totali da sabbie contaminate con IFO180, sia rispetto alle condizioni operative riscontrate quali ottimali nelle analisi già escritte. Solec F presenta infatti un comportamento quasi indipendente dal livello di contaminazione delle sabbie, oltre a non richiedere elevate concentrazioni di surfattante. Tali evidenze sono state già descritte nel *par. 10.5.4*; in cui è evidente che il parametro SL conc. (A), nei casi *Maximum* e *Optimum*, assume il valore di circa 2.6 (g/100ml). Per tali motivazioni si è scelto di ottimizzare ulteriormente le condizioni operative del *washing* di SL, fissando il parametro SL conc. al valore fisso/ottimale già riscontrato, 2.6 (g/100ml); il livello di contaminazione delle sabbie equivalente al caso peggiore (20 g/kg) e la velocità di mixing pari a 150, come suggerito in *tab.10.25* in corrispondenza dell'*Optimum* per il caso di sabbie più contaminate. Tali scelte hanno permesso di sviluppare un ulteriore esperimento in cui sono stati analizzati due soli parametri : water/sand ratio (A) e time (B), con l'obiettivo di cercare un eventuale condizione in grado di massimizzare la rimozione di contaminante in tempi inferiori alle 24 ore (minori consumi in termini di energia) e con consumi di acqua accettabili.

12.1 Design of Experiment (DoE) e dominio sperimentale

Il *DoE* utilizzato per le nostre sperimentazioni è il CCD a facce centrate.

Sono stati considerati 2 fattori ed una risposta :

A – water/sand ratio (ml/g)

B – time (rpm)

Risposta – HC removal (%)

Il disegno ha richiesto 7 prove di *washing* (2 prove con A =1, 10 rispettivamente e 5 con A = 5,5), durante le quali sono stati eseguiti i 13 campionamenti sottodescritti che di fatto corrispondono alle prove previste dal piano sperimentale, ai tempi richiesti. I *washing* sono

stati eseguiti in doppio e i campionamenti effettuati anche ai tempi intermedi 9 e 19 ore; punti utilizzati per la validazione del modello.

Level	A	B
	Water/sand ratio	Time (h)
-1	1	4
0	5.5	14
+1	10	24

Tab 12.1 – Dominio del disegno sperimentale per il caso SL – 2 factors

12.2 RSM applicato a SL – 2 factors: analisi statistica della risposta

Applicata ANOVA, viene esaminata la significatività dei parametri del modello predittivo. In *tab 10.2* sono elencate le 13 *run* sperimentali: valori assunti per ogni parametro di processo (A, B) e risposta delle singole prove (Yield %). La concentrazione di Solec F è stata fissata a 2.6 g/100ml, quella di IFO180 a 20 g/kg e la velocità di mixing a 150 rpm.

Run	A:water/soil ratio ml/g	B:Time h	HC removal %
1	1	4	57.6
2	10	4	68.5
3	1	24	73.0
4	10	24	89.0
5	1	14	67.7
6	10	14	85.4
7	5.5	4	69.2
8	5.5	24	86.6
9	5.5	14	84.7
10	5.5	14	83.7
11	5.5	14	81.9
12	5.5	14	83.2
13	5.5	14	84.1

Tab.12.2 Matrice degli esperimenti svolti per SL -2 factors

I valori di rimozione possono in questo caso essere riprodotti graficamente, data la semplicità del modello. Si tratta infatti di *washing* eseguiti in tre distinte condizioni (variando

il termine A). E' evidente che il punto centrale (A=5.5; B=14 ore) è stato misurato durante 5 distinte prove di *washing*. Dalla rappresentazione grafica, *fig. 12.1*, già si evincono due importanti evidenze: già dalle 14 ore di trattamento le rimozioni appaio quasi massime (per A = 1 si osservano rimozioni pari a 67.7% e 73.0% rispettivamente dopo 14 e 24 ore; per A= 5.5 si osservano rimozioni pari a 83.7% e 86.6% rispettivamente dopo 14 e 24 ore; per A = 10 si osservano rimozioni pari a 85.4% e 89.0% rispettivamente dopo 14 e 24 ore) e diminuendo il consumo di acqua (A da da 10 a 5.5) non si osservano significative dimunuizioni di resa di rimozione degli idrocarburi (dopo 14 ore di *washing* si osservano rimozioni pari a 83.7% e 85.4% per A = 5.5 e 10 rispettivamente; dopo 24 ore di *washing* si osservano rimozioni pari a 86.6% e 89.0% per A = 5.5 e 10 rispettivamente)

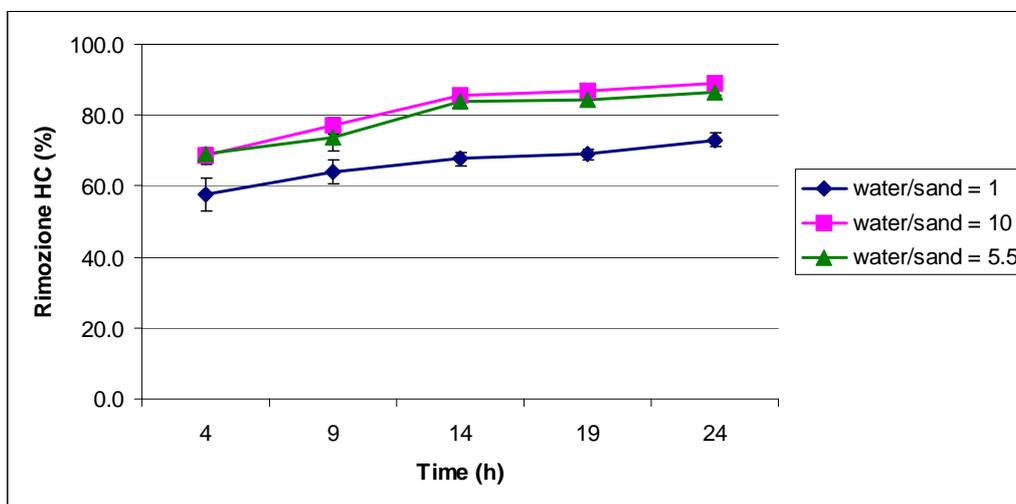


Fig. 12.1 SL-2 factors - washing eseguiti in tre distinte condizioni, A=1 (blue), 5.5 (verde),10 (lilla)

A seguire le *tab 12.3* e *tab. 12.4* riassumono l'analisi della varianza ed illustrano i termini del modello significativi. Dal polinomio selezionato per descrivere il processo sono stati eliminati i termini poco significativi per il modello o comunque non migliorativi del *LoF*. Le seguenti tabelle mostrano che i valori calcolati dal test di Fischer per 'F-value' e 'p-value' per il parametro *Model* sono rispettivamente 123.3 e <0.0001, questi valori indicano che il modello selezionato è altamente significativo ed esiste solo lo 0.01% di probabilità che la risposta sia casuale. Il valore associato di *p-value* minore di 0.05 per il modello (ovvero $\alpha = 0.05$ o 95% del livello di confidenza) indica che il modello è statisticamente significativo. Il valore R^2 (0.984), superiore a 0.75, suggerisce una buona adeguatezza del modello ed indica che l'98.4% della variabilità della risposta può essere spiegata dal modello. Il *LoF*, risulta non significativo, come è desiderabile.

La tab.12.2 mostra che water/sand ratio (A, A^2 p -value < 0.001) e time (B, B^2 p -value < 0.001) sono termini altamente significativi del modello. Il modello statistico, così sviluppato, risulta molto accurato e può essere utilizzato per la predizione e ottimizzazione della resa di rimozione (*Model significant*), anche oltre il dominio operativo selezionato (*LoF not significant*).

ANOVA for Response Surface Reduced Quadratic model						
	Sum of		Mean	F	p-value	
Source	Squares	df	Square	Value	Prob > F	
Model	1103.53	4	275.88	123.03	< 0.0001	significant
<i>A-water/soil ratio ratio</i>	331.53	1	331.53	147.85	< 0.0001	
<i>B-time</i>	473.48	1	473.48	211.15	< 0.0001	
A^2	114.60	1	114.60	51.10	< 0.0001	
B^2	71.59	1	71.59	31.93	0.0005	
Residual	17.94	8	2.24			
<i>Lack of Fit</i>	13.45	4	3.36	3.00	0.1565	<i>not significant</i>
<i>Pure Error</i>	4.49	4	1.12			

Tab. 12.3 ANOVA per il modello quadratico applicato a SL-2 factors – F test

Std. Dev.	1.50	R-Squared	0.9840
Mean	78.05	Adj R-Squared	0.9760
C.V. %	1.92	Pred R-Squared	0.9412
PRESS	65.99	Adeq Precision	35.139

Tab. 12.4 ANOVA per il modello quadratico applicato a SL – 2 factors – parametri statistici

Per descrivere la superficie di risposta, i dati sperimentali sono stati ottimizzati utilizzando un'equazione polinomiale di secondo grado. Si riportano i coefficienti finali in termini di fattori codificati x_i :

HC removal (%)	=
+83.37	
+7.43	* A
+8.88	* B
-6.44	* A^2
-5.09	* B^2

Tab. 12.5 Coefficienti polinomiali nel caso studio SL-2 factors

Diagnostica dei residui. L'analisi dei residui è necessaria per confermare che i presupposti dell'ANOVA siano rispettati. L'assunzione di normalità può essere verificata valutando il grafico *predicted vs actual* mostrato in fig.12.2.

Design-Expert® Software
HC removal

Color points by value of
HC removal:

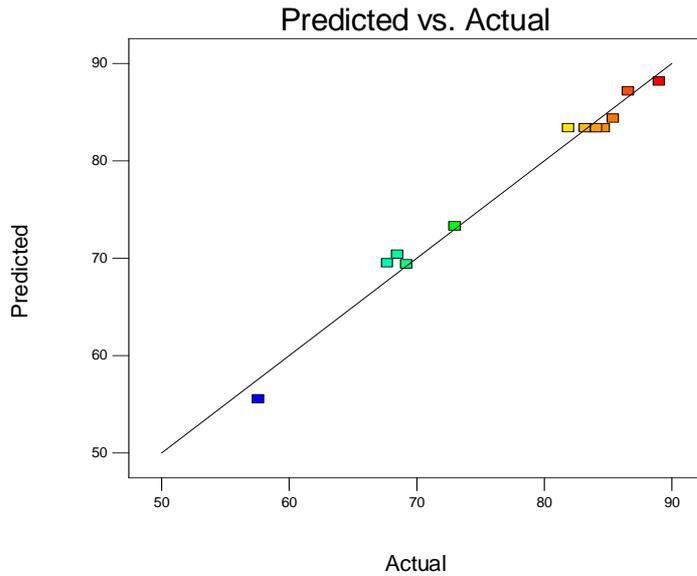


Fig 12.2 Plot dei *Predicted vs. Actual* – SL – 2 factors

Nel caso in esame si nota una disposizione randomica che conferma che i presupposti dell'ANOVA sono rispettati. Fra i diagrammi di influenza si riporta a titolo di esempio il grafico dei leverage: non sono presenti punti con leverage elevato, cioè punti che presentino grande influenza sulla scelta del modello (fig 12.3).

Design-Expert® Software
HC removal

Color points by value of
HC removal:

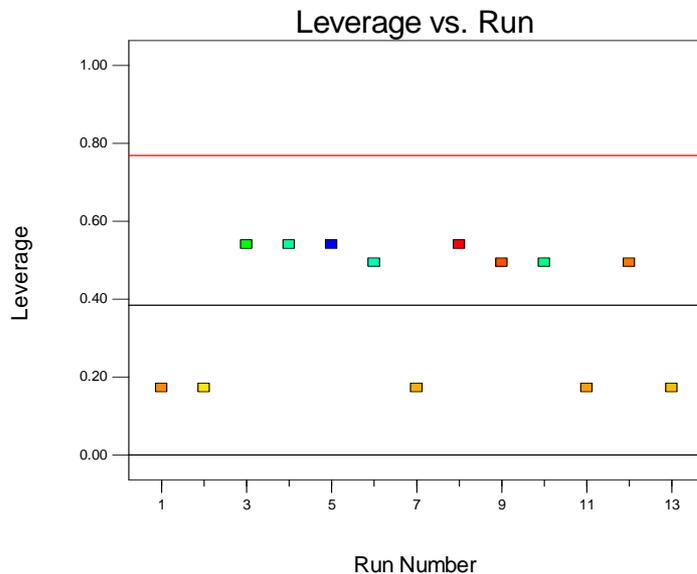


Fig 12.3 Plot dei *Leverage vs. Run* – SL-2 factors

Dalla diagnostica è risultato che il modello predittivo della risposta è accettabile. E' possibile descrivere l'andamento della risposta in funzione dei fattori considerati (superficie di risposta).

12.3 RSM applicato a SL – 2 factors: influenza dei parametri sulla risposta e validazione/ottimizzazione del processo

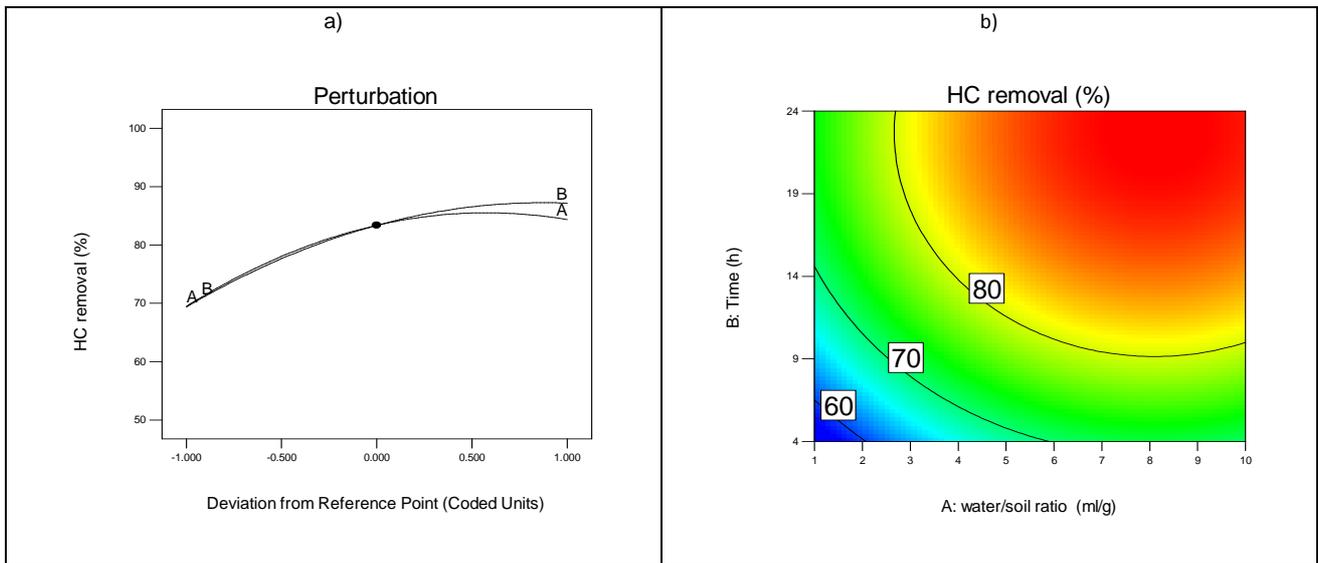


Fig. 12.4 a) Perturbation plot. b) Contour plot. SL – 2 factors

SL – 2 factors : Model validation			
[SL conc. = 2.6 (% v/w); mixing rate = 150 (rpm); IFO180 conc. = 20 (g/kg)]			
A	B	HC removal (%) predicted	HC removal (%) observed
Water/sand (v/w)	Time (h)		
1	9	64.4 ± 1.3	63.8 ± 3.5
5.5	9	77.7 ± 1.3	73.8 ± 3.8
10	9	78.0 ± 1.3	77.0 ± 2.3
1	19	72.0 ± 1.3	69.0 ± 1.4
5.5	19	86.5 ± 1.3	84.4 ± 1.8
10	19	88.2 ± 1.3	86.8 ± 1.4
A	B	HC removal (%) observed	HC removal (%) observed
Water/sand (v/w)	Time (h)	SL – 4 factors	
1	24	75.9 ⁱ ± 2.4	73.0 ± 1.8
5,5	24	85.9 ⁱⁱ	86.6 ± 1.2

Tab. 12.6 SL – 2 factors – Model validation i) da tab. 10.25 – valore sperimentale corrispondente ad un punto adoperato per l'ottimizzazione del modello ii) da tab. 10.16 run 24 punto sperimentale per costruire la superficie di risposta

Dalla *fig. 12.4* si possono dedurre le seguenti conclusioni:

A - effetto del water/sand ratio (ml/g) sulla resa di rimozione: all'aumentare del parametro si riscontra anche un aumento delle rese di rimozione. Tale *trend* è maggiormente evidente sino al centro del dominio sperimentale ($A=5.5$ e $B=14$ ore); oltre il quale vi è un appiattimento delle rimozioni. Ciò significa che se il *washing* si esegue sino ed oltre le 14 ore, utilizzare un quantitativo di acqua elevato non comporta ulteriore miglioramento delle rese di rimozioni.

B - effetto time (ore) sulla resa di rimozione: all'aumentare del parametro si riscontra anche un aumento delle rese di rimozione. Tale *trend* è maggiormente evidente sino al centro del dominio sperimentale ($A=5.5$ e $B=14$ ore); oltre il quale vi è un appiattimento delle rimozioni, anche se meno marcato rispetto alla analisi precedente. Ciò significa che se il *washing* si esegue utilizzando un rapporto fisso di $A = 5.5$, protrarre il washing sino a tempi maggiori di 14 ore non comporta un eccessivo miglioramento delle rese di rimozioni.

L' interazione A/B presenta ovviamente una forte influenza sulle rese di rimozione.

Gli esperimenti di validazione del modello sono stati condotti in doppio: i risultati, media e deviazione standard sono riportati in *tab. 12.6*. A tal scopo si sono utilizzati due fonti di dati sperimentali: il primo gruppo appartiene al presente esperimento, in quanto sono stati prelevati campioni di sabbia a tempi intermedi non facenti parte del disegno sperimentale (4 e 9 ore); il secondo gruppo corrisponde a punti sperimentali precedenti (SL – 4 factors – *tab 10.25* e *tab 10.16*)

Dall'analisi degli esperimenti di validazione, si osserva la sovrapposizione degli intervalli di confidenza fra i valori predetti e quelli osservati. Si evidenzia il basso valore di model SD at level confidence of 95% del presente modello (1.3) in linea con il valore di R^2 prossimo ad 1 ($R^2 = 0.984$).

13. Conclusioni

L'inquinamento delle acque del mare è di primario interesse ambientale, tema ampiamente affrontato nel progetto EU FP-7 project Kill Spill - *Integrated Biotechnological Solutions for Combating Marine Oil Spills*, nel cui contesto si inserisce questa ricerca. La contaminazione delle acque marine è dovuta a varie cause, tra cui gli scarichi fluviali, gli scarichi dovuti ad esplorazioni e sfruttamenti delle risorse naturali del sottosuolo marino, gli sversamenti di idrocarburi trasportati dalle petroliere oppure causati da incidenti in piattaforme *offshore* (Fingas, 2014). Si stima che nel periodo tra il 1970 - 2009 siano state sversate in mare circa 5.7 milioni di tonnellate di petrolio a causa di 1.789 incidenti (<http://www.itopf.com>). Oggetto del presente studio è la sperimentazione di nuovi materiali mobilizzanti biogenici e biosurfattanti microbici, utilizzabili per favorire processi di emulsione e la biodisponibilità degli idrocarburi del petrolio alla degradazione microbica. Una importante applicazione operativa di tali materiali (alcuni già in via di sperimentazione altri del tutto innovativi secondo la letteratura corrente) consiste nel *soil washing* di sabbie contaminate da carburante marino. La tecnica *ex situ* del *soil washing* è per certo fra le maggiormente diffuse per il trattamento di suoli/sabbie contaminati. L'applicazione dei surfattanti nel trattamento *ex-situ* di *soil washing* è stata studiata da vari autori (Desphande *et al.*, 1999; Mulligan *et al.*, 2005; Franzetti *et al.*, 2009; Mao *et al.*, 2015). Il *soil washing* spesso comporta l'aggiunta di soluzioni acquose di surfattanti di sintesi per il rilascio di sostanze contaminanti nella fase acquosa senza che queste vengano distrutte chimicamente (Mann 1999), in quanto l'aggiunta del surfattante alla soluzione di lavaggio riduce la tensione interfacciale aria/acqua e olio/acqua, riducendo così la forza capillare che trattiene l'olio al suolo, che di conseguenza viene più facilmente mobilizzato e solubilizzato (Kosaric *et al.*, 1987; Bai *et al.*, 1997; Cheah *et al.*, 1998; Deshpande *et al.*, 1999). I biosurfattanti biogeni/microbici, oggetto di studio, sono sostanze costituite da una parte idrosolubile (idrofila) ed un'altra parte olio solubile (idrofobi), hanno quindi la tendenza ad accumularsi nell'interfaccia olio/soilo e olio/acqua dove agiscono come emulsionanti. Numerosi studi di laboratorio hanno dimostrato che le soluzioni acquose di (bio)surfattanti sono efficaci in terreni contaminati da idrocarburi del petrolio (Bhandari *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2000; McCray *et al.*, 2001; Mulligan *et al.*, 2001). L'interesse crescente verso tali applicazioni è origine di questa sperimentazione che utilizza materiali mobilizzanti e biosurfattanti che, disciolti nelle acque di lavaggio di sabbie contaminate da IFO180 (*soil washing*), favoriscono la biodisponibilità dell'inquinante (in termini di

idrocarburi totali *HC* e le sue due frazioni *n-alcani* e *IPA*), e risultano non tossici per l'ambiente oltre che biodegradabili, quindi ecosostenibili.

Agenti testati

La prima fase del piano sperimentale è stata dedicata allo *screening* degli agenti mobilizzanti, surfattanti biogenici e microbici, scelti per essere testati nelle prove preliminari di *washing*. La selezione è stata condotta, sulla base della letteratura di settore, considerando gli agenti già presenti in commercio e i surfattanti microbici disponibili nell'ambito del progetto Kill Spill, nonché la diversa origine degli agenti (vegetale, animale, microbica) e differenze nelle proprietà chimiche degli stessi, in particolare il diverso carattere idrofilo/lipofilo (*HLB*). Gli agenti testati sono stati i seguenti:

- agenti mobilizzanti e surfattanti di origine vegetale e animale - SOLEC™ F (Solec F), Textrol F-10, idrossipropil- β -ciclodestrine (HPB-CD), RAMEB (*randomly methylated β -cyclodextrins*) e acidi biliari bovini (BB). Essi svolgono una buona azione solubilizzante o mobilizzante e hanno come vantaggio principale, essendo biodegradabili, il non persistere nell'ambiente. Oltre a non causare effetti tossici sulla biomassa, favoriscono la crescita dei microrganismi indigeni, fungendo da fonti di carbonio ed energia. Grazie al loro basso costo, il loro utilizzo risulta essere molto promettente.
- quattro prodotti di pulizia commerciali (SuperSolvSafetySolvent, SC1000, Aircraft Cleaner, OmniBrite Acid Cleaner) forniti dalla ditta BioBased Europe; già testati per la pulizie di superfici, di origine vegetale, biodegradabili;
- tre surfattanti microbici, fra i maggiormente isolati e studiati: soforolipidi (SR) isolati da diverse specie di *Candida*, ramnolipidi (RL) glicolipidi prodotti da *Pseudomonas aeruginosa* e la surfattina SF, lipopeptidi prodotti da *Bacillus subtilis*;
- Triton X-100 (TX), surfattante di sintesi. tensioattivo commerciale sintetico non ionico, riconducibile alla famiglia degli alchil-fenol etossilati (isocetil-fenossi-polietossietanolo).

Come noto, ogni evento di contaminazione è a sé stante in termini di matrice solida, proprietà chimico-fisiche del contaminante e condizioni ambientali, non prevedibile e difficilmente riproducibile (*fig.1.2*). L'inquinante può variare notevolmente per proprietà chimico-fisiche (viscosità, solubilità, pH ecc.), ugualmente la matrice contaminata

(contenuto organico, porosità, umidità, granulometria ecc..) e di conseguenza le interazioni matrice/contaminate; nonché i processi ambientali in funzione dei tempi di contatto e delle condizioni climatiche che matrice solida/contaminante subiscono, non sono sempre descrivibili. Per tali ragioni nella sperimentazione si è scelta una matrice rappresentativa delle caratteristiche medie delle sabbie mediterranee e un contaminate marino di caratteristiche rappresentative (IFO180), focalizzando l'attenzione sulla metodologia di studio (cap. 6). Le condizioni medie iniziali adottate per selezionare i surfattanti maggiormente performanti, sono state valutate sulla base della letteratura (Berselli *et al.*, 2005; Kalali *et al.* 2011; Urum *et al.*, 2013, 2015) mentre nella fase di ottimizzazione delle condizioni operative con cui eseguire il *washing*, ci si è avvalsi di un approccio statistico, al fine di impostare la ricerca tenendo conto di più variabili in un ampio range di valori (dominio sperimentale). Questa generalizzazione iniziale rappresenta un tipo di approccio utile per processi non completamente noti. I *washing* nella fase di *screening* sono stati svolti nelle seguenti condizioni considerate quindi rappresentative: concentrazione agente = 1% w/v; eccetto per soforolipidi, ramnolipidi e surfattine per i quali la conc. agente = 0.1% w/v; rapporto acqua/sabbie = 7; velocità di *mixing* = 150 rpm; concentrazione IFO180 = 5 g/kg.

Il *washing* realizzato con il surfattante Triton X-100 (TX) ha permesso di rimuovere il 71.0 ± 3.1 % e 82.7 ± 0.5 % degli idrocarburi totali dalla sabbia, dopo 4 e 48 ore, rispettivamente. Alti valori di rimoziioni degli idrocarburi totali, paragonabili a quelli del TX, sono stati ottenuti con la lecitina di soia più idrofila (SL; HLB= 7): 68.8 ± 1.6 % e 82.9 ± 0.4 % rispettivamente dopo 4 e 48 ore di trattamento. Le rimoziioni ottenute con la lecitina di soia più idrofoba (Tetrol F-10) sono molto più basse rispetto al TX, dell'ordine di circa 39% dopo 48 ore dall'inizio del processo. Soddisfacenti percentuali di rimoziione degli idrocarburi totali si osservano per la ciclodestrina più polare (HPB-CD) rispetto a quella più idrofoba (RAMEB-CD), anche se inferiori al TX (56.2 ± 0.7 % e 60.9 ± 2.0 % dopo 4 e 48 ore). I prodotti commerciali di pulizia estratti da piante e gli acidi biliari hanno esibito efficienze di rimoziione degli idrocarburi totali molto inferiori al TX (mediamente intorno al 40% per gli agenti di pulizia commerciali e circa 20% per gli acidi biliari, dopo 48 ore di trattamento). I biosurfattanti di origine microbica hanno mostrato significative rimoziioni di idrocarburi totali, in particolare nel caso dei soforolipidi (SR) e delle surfattine (SF) le rimoziioni superano il 50% di quelle riscontrate con l'utilizzo del TX. SR ha infatti mostrato efficienze di rimoziione del 57.3 ± 1.0 % e 63.2 ± 2.9 % e SF del 56.7 ± 0.5 % e 63.3 ± 4.4 % dopo 4 e 48 ore rispettivamente. I soforolipidi e le surfattine presentano quindi una

efficienza di rimozione praticamente uguale. I ramnolipidi (RL) hanno rese di rimozione del $27.1 \pm 1.2 \%$ e $45.6 \pm 3.1 \%$ dopo 4 e 48 ore rispettivamente.

In generale si osserva che le rimozioni più alte sono state ottenute per gli agenti solubilizzanti più idrofili (con un HLB maggiore); tale risultato è imputabile al fatto che agenti con una maggiore porzione idrofila risultano essere più affini alla frazione polare di IFO180, riducendo l'adsorbimento del tensioattivo alle particelle del suolo e alla fase oleosa, e favorendo quindi il trasferimento degli idrocarburi alla fase acquosa. La Solec F (SL), le idrossipropil- β -ciclodestrine (HPB-CD) e i soforolipidi (SR) e le surfattine (SF) hanno mostrato rimozioni degli idrocarburi totali paragonabili, o comunque superiori al 70%, a quelle ottenute col tensioattivo sintetico (TX). Questi agenti meritano attenzione sia per il fatto che facilitano il processo di mobilizzazione degli inquinanti dalla fase solida a quella acquosa in modo eccellente, sia perché ecosostenibili.

Per quanto riguarda la rimozione degli *n-alcani* (C11-C32), Solec F (SL) e Triton X-100 (TX) hanno mostrato rimozioni fra loro paragonabili; sono state infatti ottenute rimozioni del $75.2 \pm 0.7 \%$, $73.9 \pm 1.4 \%$, a 48 ore, rispettivamente; tali agenti presentano rese di rimozione della frazione *n-alcani* sensibilmente inferiore rispetto a quella osservata per gli HC totali. Percentuali soddisfacenti di rimozione dei *n-alcani* sono stati ottenuti anche con soforolipidi (SR) surfattine (SF): $60.8 \pm 2.0 \%$, $62.7 \pm 1.5 \%$, a 48 ore, rispettivamente; in tal caso le rese di rimozione risultano paragonabili a quelle degli HC totali. Meno soddisfacenti i risultati osservati per HPB-CD, la cui resa di rimozione è di $38.3 \pm 2.6 \%$ a 48 ore, inferiore a quella osservata per HC totali. A sostegno dei risultati ottenuti nella prima fase sperimentale, relativi alle percentuali di rimozione in termini di idrocarburi totali, è stata svolta la verifica del bilancio di massa. I risultati appaiono soddisfacenti, i bilanci di massa perlopiù rientrano nel range 100 – 120 %.

Ottimizzazione parametri operativi

Il successivo obiettivo è consistito nella ottimizzazione del processo di *soil washing*, utilizzando i tre agenti selezionati (Lecitina disoleta (SL) – prodotto commerciale SOLEC™; hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPB-CD) – prodotto commerciale con elevato carattere idrofilico e soforolipidi (SR) – surfattante microbico) che presentano percentuali di rimozione confrontabili o pari al 70% di quelle mostrate dal surfattante sintetico (Triton X-100). Sono state studiate le condizioni di *washing*, variando i parametri operativi ritenuti influenti sulla rimozione degli idrocarburi totali, nel dominio operativo di interesse: A -

concentrazione del surfattante; B - rapporto acqua/suolo utilizzato nel reattore; C - velocità di miscelazione del reattore; D - concentrazione dell'inquinante nelle sabbie (IFO180).

Tramite approccio *RSM* (Responce Surface Methodology) con il supporto del software statistico *Design-Expert*, è stata applicata ANOVA alle prove sperimentali relative al *washing* dopo 24 ore di processo, per ogni agente di interesse. L'approccio statistico (RSM) permette di descrivere il fenomeno con modelli predittivi, in grado di valutare le interazioni esistenti fra i parametri del processo, e di ottimizzare le condizioni operative, secondo criteri scelti nel processo stesso.

La metodologia *RSM* applicata ai dati sperimentali e la successiva ottimizzazione dei parametri di processo sono stati sviluppati per 5 casi studio: *blank* (*washing* senza agente), TX (surfattante sintetico di confronto), SL, HPB-CD e SR (i tre agenti selezionati durante il primo *screening*).

Il *DoE* utilizzato per le nostre sperimentazioni è il CCD a facce centrate ($\alpha=1$), secondo il seguente schema:

Factor	Name	Units	-1	0	+1
A	SR conc. TX, SL, HPB-CD conc.	g/100 ml	0.02 0.1	0.11 2.55	0.2 5
B (A – <i>blank</i>)	Water/Sand ratio	ml/g	1	5.5	10
C (B – <i>blank</i>)	Mixing rate	rpm	80	150	220
D (C – <i>blank</i>)	IFO180 conc.	g/kg	0.5	10.25	20

L'obiettivo raggiunto è stata la determinazione di modelli predittivi in grado di evidenziare le relazioni esistenti fra i parametri di processo, caso per caso, e di valutare le condizioni operative ottimali. La validazione ed ottimizzazione del modello è stata eseguita sui campioni delle 24 ore per tutti i casi studio. Il modello è stato validato applicando il

washing a sabbie contaminate con IFO180 a concentrazioni intermedie, comprese nel dominio sperimentale (sabbie contaminate con circa 2.5 e 6.5 g/kg di IFO180); mentre l'ottimizzazione del processo è stata sviluppata secondo due criteri:

- **Maximum HC removal predicted (%)**: per ogni IFO180 conc. di interesse (0.5; 10.25; 20 g/kg) si sono ricercate le condizioni operative (A, B, C – A, B per *blank*) tali da rendere massima la resa di rimozione alle 24 ore.
- **Optimum HC removal (%)**: per ogni IFO180 conc. di interesse (0.5; 10.25; 20 g/kg) si sono ricercate le condizioni operative (A, C – B per *blank*) tali da rendere massima la resa di rimozione alle 24 ore e minimo il consumo di acqua. Tale scelta è finalizzata alla riduzione dei costi derivanti dal consumo di surfattante e di acqua:

Con questo approccio si è valutata la massima potenzialità di ogni agente, nel rimuovere gli idrocarburi totali dell'IFO180 dalle sabbie contaminate, sia senza imporre vincoli sui parametri di processo, sia minimizzare i consumi di acqua (riduzione dei costi operativi e di gestione dei volumi del refluo da trattare a seguito del *soil washing*), nel range operativo prescelto. A seguire si riassumono i risultati ottenuti per ogni caso studio.

Washing in assenza di agente (*blank*)

In assenza di surfattante la decontaminazione delle sabbie è guidata dalla solubilità di IFO180 in acqua, infatti al crescere del livello di contaminazione si osserva un effetto negativo sulla rimozione degli idrocarburi. Aumentando i volumi di acqua di lavaggio, si riscontra un aumento della resa di rimozione degli idrocarburi totali con un andamento lineare. Le rimozioni calcolate sono massime per concentrazioni di sabbie intermedie (48.0 ± 5.4). Minimizzando il consumo di acqua le rimozioni sono significativamente inferiori rispetto a quanto calcolato con il criterio *Maximum HC removal predicted (%)* solo per sabbie fortemente contaminate (21.5 ± 0.0), in questo caso il sistema di lavaggio richiede un valore del parametro water/sand ratio pari a 4.5.

Triton X-100 (TX)

I risultati indicano che la percentuale di rimozione aumenta sensibilmente in modo lineare sia con l'aumento della concentrazione del surfattante, sia del consumo di acqua (che corrisponde a maggior consumo di tensioattivo), sia della velocità di miscelazione. Non sono state individuate delle concentrazioni di TX ottimali. Al crescere delle concentrazioni di IFO180, si evidenzia un effetto positivo sulla rimozione degli idrocarburi, mantenendo

elevato il consumo di surfattante TX. La decontaminazione di sabbie inquinate con IFO180 20 g/kg supera l'80% solo massimizzando tutti i parametri. Minimizzando i consumi di acqua si osserva un significativo calo delle rese. Nel caso del TX viene sempre richiesto l'utilizzo del TX alle massime concentrazioni.

Solec F (SL)

La percentuale di rimozione aumenta con l'aumento della concentrazione di SL; si osserva il massimo delle rese quando questa assume valore ~ 2.6 (g/100 ml), individuata come concentrazione ottimale; analogamente all'aumentare del consumo di acqua, ma in questo caso con andamento lineare. Anche l'aumento della velocità di miscelazione ha un effetto positivo sulla resa di rimozione. Tali risultati sono in accordo con quanto pubblicato da Urum *et al.* (2004), Han *et al.* (2009), Peng *et al.* (2011), Kalali *et al.* (2011). L'effetto della concentrazione di IFO180 conc. (g/kg) sulla resa di rimozione risulta irrilevante; risultato questo di notevole importanza che rende Solec F di particolare interesse applicativo.

L'andamento delle superfici di risposta per SL è così riassumibile: alti valori di rimozione degli idrocarburi del petrolio si ottengono per concentrazioni intermedie di Solec F comprese tra 2.5 – 2.7 (g/100ml), il livello di contaminazione è molto poco influente sulle rese e il modello calcola rese massime sino al $97.8 \pm 7.3\%$. Fissata la concentrazione di SL e la *mixing rate* (150-220), il minimo consumo di acqua incide in modo significativo: nelle condizioni di *Optimum HC removal %* tali rimozioni calano sino a $81.9 \pm 7.3\%$. I risultati mostrano che SL è molto performante, oltre ad essere molto interessante anche per le condizioni di ottimizzazione riscontrate. La decontaminazione di suoli, utilizzando *washing* con soia lecitina, è stata poco studiata in letteratura. Oltre ai lavori di Urum sopraccitati ricordiamo lo studio relativo a suoli storicamente contaminati da PCBs (Occulti F *et al.*, 2007) con tecniche di *washing*. Occulti *et al.* hanno utilizzato concentrazioni sensibilmente superiori alle CMC, rapporto acqua/soilo 1:7 e velocità di *mixing* pari a 120 rpm.

Idrossipropil- β -ciclodestrine (HPB-CD)

I risultati indicano che la percentuale di rimozione aumenta con l'aumento della concentrazione di HPB-CD, sino ad un massimo di ~ 3.3 (g/100 ml); individuata come concentrazione ottimale. Il quantitativo di acqua utilizzata nel *washing* (water/sand ratio), risulta praticamente ininfluenza sulle rese di rimozione. L'effetto della *mixing rate* sulla resa di rimozione presenta un comportamento interessante: per bassi livelli di contaminazione

la *mixing rate* troppo elevata è inibente nel processo di mobilizzazione dell'inquinante. Questo andamento, apparentemente anomalo, si osserva solo nel caso di HPB-CD. Nel caso in esame non abbiamo la formazione di micelle, le ciclodestrine sono dei mobilizzanti che interagiscono con il contaminante legandone le molecole all'interno della propria cavità. Trattandosi di un processo sterico, probabilmente la velocità di miscelazione elevata sfavorisce la corretta interazione fra contaminante e molecola di HPB-CD. Si osserva invece un forte calo delle rese all'aumentare del livello di contaminazione.

L'andamento delle superfici di risposta è così riassumibile: per HPB-CD il massimo della rimozione si verifica sempre in prossimità di concentrazioni intermedie di HPB-CD (nell'intervallo 2.6 - 3.3 g/100ml), basse concentrazioni di contaminazione, basse velocità di *mixing*, a prescindere dal quantitativo di acqua utilizzato (water/sand ratio praticamente ininfluente). In dettaglio, nelle condizioni di *Maximum HC removal* (%) le condizioni operative riscontrate sono le seguenti: concentrazione di HPB-CD 2.6 – 3.3 (g/100ml), water/sand ratio ininfluente (ml/g), velocità di *mixing* tra 80-85 rpm e sabbia contaminata sino a 2.5 g/kg. In tali condizioni la resa di rimozione, ottimizzata dal *software*, raggiunge valori circa dell' 85.3 % (dato non verificato sperimentalmente). I risultati mostrano che HPB-CD può essere impiegato *nel washing* di suoli contaminati da idrocarburi del petrolio con buone efficienze, il mobilizzante risulta ottimale nel trattare sabbie poco contaminate, riducendo consumi di acqua e di energia. In letteratura diversi autori si sono interessati alle ciclodestrine, focalizzando l'attenzione sulla capacità di queste molecole di rimuovere IPA da matrici contaminate (Wang *et al.*, 1995; Berselli *et al.* 2004; Ye M *et al.*, 2014; Sun MM *et al.*, 2013)

Soforolipidi (SR)

I risultati indicano che la percentuale di rimozione aumenta quasi linearmente con l'aumento della concentrazione di soforolipide, sino ad un valore di circa 0.11 (g/100 ml); analogamente all'aumentare del consumo di acqua e della velocità di miscelazione, ma con andamenti lineari. La crescente concentrazione di idrocarburi totali, mostra un effetto negativo sulla rimozione degli idrocarburi: le rese aumentano fino a concentrazioni di circa 5 g/kg per poi diminuire drasticamente all'aumentare della concentrazione di contaminazione. I risultati sono in accordo con quanto pubblicato da Urum *et al.* (2004), Han *et al.* (2009), Peng *et al.* (2011), Kalali *et al.* (2011) e Luna *et al.* (2009).

L'andamento delle superfici di risposta è così riassumibile: alti valori di rimozione degli idrocarburi del petrolio si ottengono per concentrazioni intermedie di soforolipidi, basse

concentrazioni di contaminazione, elevate velocità di *mixing* ed elevati volumi di soluzione contenente il biosurfattante microbico (water/sand ratio elevato). In dettaglio, nelle condizioni di *Maximum HC removal* (%) le condizioni operative riscontrate sono le seguenti: SR conc. tra 0.11-0.13 (g/100ml), water/sand ratio 8.7-10 (ml/g), *mixing rate* tra 205-220 e conc. IFO180 sino a 6.5 g/kg. In tali condizioni la resa di rimozione, ottimizzata dal *software*, raggiunge valori circa dell' 80 % (dato non verificato sperimentalmente). I risultati mostrano che il biosurfattante soforolipide può essere impiegato *nel washing* di suoli contaminati da idrocarburi del petrolio con buone efficienze; SR risulta interessante soprattutto per le concentrazioni particolarmente basse, in corrispondenza delle quali raggiunge condizioni ottimali.

Valutando complessivamente i processi studiati si desume che, utilizzando nel *soil washing* solo acqua priva di tensioattivi e in condizioni operative ottimali, si possono ottenere rimozioni di idrocarburi totali nell'intervallo 30 - 49 %, in funzione della concentrazione di IFO180, mentre si raggiungono rimozioni da 66 % a 86 %, in condizioni di IFO180 conc. crescente, utilizzando nel *soil washing* il surfattante TX.

Si osservano rimozioni nei range 77 - 85 % per HPB-CD e 79 - 81 % per SR, principalmente quando la conc. di IFO180 nelle sabbie non è elevatissima in entrambi i casi; mentre le massime rimozioni di idrocarburi (circa 98 %) si ottengono con SL, indipendentemente dalla concentrazione di IFO180, utilizzando in tutti i casi elevate quantità di acqua (water/sand ratio). Quando la quantità di acqua utilizzata viene ridotta al minimo, le rimozioni di idrocarburi variano nei range 68 - 81 %, 59 - 69 % e il 82 - 83 %; per HPB-CD, SR e SL, rispettivamente.

Sulla base dei *trend* osservati si evincono le seguenti conclusioni:

- SL pur richiedendo maggior consumo di acqua e una sostenuta velocità di miscelazione per raggiungere le condizioni ottimali, mantiene elevatissime percentuali di rimozioni, quasi indipendentemente dal livello di contaminazione. Le rese di rimozioni che si possono ottenere con SL sono superiori a quanto osservato per il TX, specie se il livello della contaminazione non è elevato. Il consumo di surfattante SL ottimale, 2.5 – 2.7 (g/100ml), è sempre inferiore a quello del TX, 5 (g/100ml); anche questo aspetto rende SL biosurfattante di massimo interesse, per applicazioni al *soil washing*. L'aspetto dei consumi di acqua ed energia, nelle

condizioni ottimali di *washing* utilizzando SL, sono state oltremodo approfondite nella sperimentazione conclusiva (SL-2 fattori);

- HPB-CD risente meno dell'effetto del parametro water/sand ratio, la diminuzione di utilizzo delle acque di lavaggio non influenza le rese di rimozioni in modo significativo; soprattutto per basse concentrazioni dell'inquinante e qualora utilizzato alle concentrazioni ottimali (HPB-CD conc. 2.6 – 3.3 g/100ml). Emerge che questo mobilizzante, in virtù del meccanismo di rimozione che lo caratterizza, lavora in modo più soddisfacente a basse velocità di miscelazione, con consumi di acqua contenuti, qualora il livello della contaminazione non sia elevato;
- SR in condizioni ottimali raggiunge rese dell' 80%; risulta significativamente influenzato dal livello di contaminazione delle sabbie, che non deve essere eccessivo, come pure dai quantitativi di acqua e velocità di miscelazione, che devono essere non trascurabili. Ciò che rende particolarmente interessante SR è la concentrazione di utilizzo ottimale, particolarmente bassa, individuata nel range 0.11-0.13 (g/100ml).

Separazione frazione n-alcani/IPA

In corrispondenza delle condizioni operative ottimali, si è inteso inoltre valutata la % di rimozione dell'inquinante in termini di *IPA* (idrocarburi policiclici aromatici) che rappresenta la frazione maggiormente tossica/cancerogena di IFO180. Il protocollo per la separazione della frazione *n-alcani/IPA* ha previsto l'utilizzo della colonnina Upti - Clean SI/CN.

La frazione n-alcani

n-alcani rappresentano in genere la frazione di idrocarburi del petrolio maggiormente insolubile in acqua: nella fase di *screening* è infatti emerso che la percentuale di rimozione degli *n-alcani* dalle sabbie contaminate è generalmente inferiore a quella degli idrocarburi totali. Se, nell'evidenza, risulta che gli *n-alcani* sono una frazione meno biodisponibile rispetto agli idrocarburi totali, è anche vero che sono quelli più facilmente degradabili. In letteratura non vi sono molti lavori dedicati alla rimozione di *n-alcani* da prodotti del petrolio utilizzando agenti biogeni. I surfattanti microbici sono stati testati anche per valutare applicazioni di *bioremediation* a *n-alcani*, in fanghi petroliferi, arricchiti con consorzi ammendanti di ramnolipidi e nutrienti (Rahaman *et al.*, 2003).

La frazione IPA

Contaminazioni di *IPA* a causa di sversamenti di petrolio, sono molto diffuse e pongono seri problemi nel trattamento delle zone costiere, per cui l'indagine della loro presenza dopo uno sversamento risulta necessaria per stimare l'impatto sull'ambiente (Liu *et al.*, 2013; Huguenot *et al.*, 2015). Gli *IPA* sono contaminanti di grande interesse ambientale a causa della tossicità, cancerogenicità e mutagenicità già note da tempo, che li contraddistingue, anche a basse concentrazioni (Pothuluri *et al.*, 1998; Van Agteren *et al.*, 1998). Le abbondanze relative delle specie *IPA* riconosciute in IFO180 sono state così quantificate: antracene (31,0%), 2-metil-naftalene (25,1%), acenaftalene (11,9), fluorantene (8,8%), naftalene (5,4%), crisene (4,4%), acenaftene (3,8%), fenantrene e pirene (2,9%), fluorene (2,6%) e benz[*a*]antracene (1,3%).

La rimozione degli *IPA* a fronte del *washing* con la sola acqua (*blank*), segue in termini percentuali il seguente andamento: $n\text{-alcani} < HC < IPA$. Tale *trend* è in accordo con quanto previsto in termini di solubilità delle classi di composti. *IPA*; le percentuali di rimozione variano da 42.5 ± 3.9 a 67.5 ± 1.2 .

La rimozione degli *IPA* a fronte del *washing* con l'utilizzo rispettivamente di TX e SL, segue in termini percentuali il seguente andamento: $n\text{-alcani} \sim HC < IPA$. Il range di valori riscontrati è relativamente ristretto (per TX da $81.3 \pm 1.7\%$ a $87.8 \pm 0.8\%$; per SL da $74.8 \pm 1.6\%$ a $82.5 \pm 1.4\%$), ad indicare la buona capacità del Solec F di decontaminare suoli contaminati dalla frazione *IPA*, in modo poco dipendente dalle condizioni di lavaggio. Dalla letteratura è noto che il Triton X-100 è in grado di includere *IPA* nelle proprie micelle, aumentando considerevolmente la solubilità apparente degli inquinanti, qualora utilizzato a concentrazioni superiori alle *CMC* (Wang *et al.*, 1995). Altri lavori hanno messo a confronto la capacità di rimozione degli *IPA* delle ciclodestrine rispetto al Triton X-100 (Berselli *et al.*, 2004) mentre nulla è noto sul comportamento delle lecitine di soia, circa le rese di rimozione degli *IPA* da matrici contaminate.

La rimozione degli *IPA* a fronte del *washing* con l'utilizzo di HPB-CD, segue in termini percentuali il seguente andamento: $n\text{-alcani} < HC < IPA$. Il range di valori riscontrati di rimozione degli *IPA* da suoli contaminati da FO180 è da $67.1 \pm 1.0\%$ a $82.1 \pm 2.3\%$; si evidenzia che i migliori risultati si ottengono su sabbie poco contaminate. Per HPB-CD si conferma quindi una buona capacità di decontaminazione della frazione *IPA*. In letteratura sono riportati diversi studi in merito alla capacità delle β -CD e HPB-CD di desorbire dal suolo composti idrofobici, come gli *IPA* e i *PCB*, e nel biorisanamento di suoli contaminanti da idrocarburi, quali oli minerali e *IPA* (Gómez *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 1995; Berselli *et*

al.,2004; Chiel et al., 2002; Reid et al, 1998; 1999; 2000; Ye M et al., 2014; Sun MM et al., 2013; Sàncchez-Trujillo et al.,2013).

La rimozione degli IPA a fronte del *washing* con l'utilizzo di SR, segue in termini percentuali il seguente andamento: $n\text{-alcani} < HC < IPA$, nelle condizioni di ottimizzazione del processo, mentre $n\text{-alcani} < HC = IPA$ per i restanti casi. Il range di valori riscontrati di rimozione degli IPA da suoli contaminati da FO180 è da $60.6 \pm 4.3\%$ a 91.9 ± 0.1 ; presenta quindi una forte variabilità. La rimozione del naftalene da suoli contaminati, trattati con biosurfattanti microbici, è stata studiata da Cumaraswamy et al. (2000) che ha osservato un aumento della solubilità del contaminante IPA di almeno 30 volte, rispetto all'acqua pura.

SL-2 fattori

Infine si è applicata una ulteriore sperimentazione utilizzando la lecitina di soia disoleta (SL) – prodotto commerciale Solec F- agente maggiormente performante nella rimozione degli idrocarburi totali dalle sabbie. L'obiettivo è stato di individuare al meglio le condizioni operative corrispondenti a minori consumi di acqua e di energia. In questo caso si sono mantenute fisse le condizione ritenute ottimali, sulla base delle risultanze pregresse, per i parametri operativi SL conc., *mixing rate* e IFO180 conc., inserendo nel processo solo due variabili : A - rapporto acqua/suolo; B – tempo.

In tal modo è stato possibile disegnare la superficie di risposta in grado di massimizzare le rese, mantenendo un buon compromesso fra i consumi A e B, cioè consumi di acqua e durata del processo.

Il *DoE* utilizzato per le nostre sperimentazioni è il CCD a facce centrate ($\alpha=1$); ha previsto 2 fattori : A – water/sand ratio (g/100ml) e B – time (ore); ed una risposta - HC removal (%). A ha assunto 3 livelli (1; 5.5; 10) analogamente a B (4, 14, 24)

Si sono dedotte due importanti conclusioni: già dalle 14 ore di trattamento le rimozioni appaio quasi massime (per A = 1 si osservano rimozioni pari a 67.7% e 73.0% rispettivamente dopo 14 e 24 ore; per A= 5.5 si osservano rimozioni pari a 83.7% e 86.6% rispettivamente dopo 14 e 24 ore; per A = 10 si osservano rimozioni pari a 85.4% e 89.0% rispettivamente dopo 14 e 24 ore) e diminuendo il consumo di acqua (A da da 10 a 5.5) non si osservano significative diminuzioni di resa di rimozione degli idrocarburi (dopo 14 ore di *washing* si osservano rimozioni pari a 83.7% e 85.4% per A = 5.5 e 10

rispettivamente; dopo 24 ore di *washing* si osservano rimozioni pari a 86.6% e 89.0% per A = 5.5 e 10 rispettivamente)

A - effetto del water/sand ratio (ml/g) sulla resa di rimozione: all'aumentare del parametro si riscontra anche un aumento delle rese di rimozione. Tale *trend* è maggiormente evidente sino al centro del dominio sperimentale (A=5.5 e B=14 ore); oltre il quale vi è un appiattimento delle rimozioni. Ciò significa che se il *washing* si esegue sino ed oltre le 14 ore, utilizzare un quantitativo di acqua elevato non comporta ulteriore miglioramento delle rese di rimozioni in modo rilevante.

B - effetto time (ore) sulla resa di rimozione: all'aumentare del parametro si riscontra anche un aumento delle rese di rimozione. Tale *trend* è maggiormente evidente sino al centro del dominio sperimentale (A=5.5 e B=14 ore); oltre il quale vi è un appiattimento delle rimozioni, anche se meno marcato rispetto alla analisi precedente. Ciò significa che se il *washing* si esegue utilizzando un rapporto fisso di A =5.5, protrarre il *washing* sino a tempi maggiori di 14 ore non comporta un eccessivo miglioramento in termini di rese di rimozioni.

Si è riscontrato che il surfattante Solec F, nel caso di trattamento con *soil washing* applicato a sabbie contaminate con IFO180 (comune carburante marino) nel range 0.5-20 g/kg, è in grado di rimuovere con elevata efficienza gli idrocarburi totali del petrolio, raggiungendo in condizioni operative ottimali il 98% di rimozione dopo 24 ore di trattamento. Per raggiungere tali percentuali, Solec F viene utilizzato in concentrazioni ottimali (circa 2.6 g/100ml) con *mixing rate* pari a 150-220 rpm e water/sand ratio uguale a 10. Le rese di rimozione appaiono pressoché indipendenti dal livello di contaminazione. Qualora si intendano applicare condizioni operative economicamente più vantaggiose (minor consumo di acqua e trattamento più breve) Solec F è in grado di rimuovere 83.7% di idrocarburi totali dalle sabbie contaminate con 20 g/kg di IFO180, con un trattamento di *soil washing* di sole 14 ore, applicando water/sand ratio = 5,5. Le considerevoli rese di rimozione riscontrate, oltre alla economicità, ecosostenibilità e flessibilità applicativa indicano Solec F quale surfattante di massimo interesse applicativo.

Bibliografia

- Abdul SA, Gibson TL, Rai DN (1990) Selection of surfactants for the removal of petroleum products from shallow sandy aquifers. *GroundWater* 28(6): 920–926
- Abdel-mawgoud A, Lépine F, Déziel E (2010) Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86(5):1323-36
- Alzaga R, Montuosi P, Ortiz L, M.Bayona J, Albaijes J (2004) Fast solid-phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry procedure for oil fingerprinting. Application to the Prestige oil spill. *Journal of Chromatography A*, 1025:133-138
- Anderson MJ, Kraber SL. Soluzioni per un DoE corretto. Consultants, Stat-Ease, Inc., Minneapolis, traduzione a cura di D'Ambrosio M.Pia
- Anderson R, Rasor E, Van Ryn F (1999) Particle size separation via soil washing to obtain volume reduction. *J. Hazard. Mater.* 66(1–2): 89–98
- Arima K, Kakinuma A, Tamura G (1968) Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 31:488–494
- API (American Institute of Petroleum) (2001) Effects of oil and chemically dispersed oil in the environment. Publication number 4693
- Banat IM, Franzetti A, Gandolfi F, Bestetti G, Martinotti MG, Fracchia L, Smyth TJ, Marchant R (2010) Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87:427-444
- Bai G, Brusseau ML, Miller RM (1997). Biosurfactant enhanced removal of residual hydrocarbon from soil. *J. Contam. Hydrol.* 25(1–2): 157–170
- Bhandari A, Novak JT, Dove DC. (2000) Effect of soil washing on petroleum-hydrocarbon distribution on sand surfaces. *J. Hazard. Subst. Res.* 2(7): 1–13

Biowise (2000) Bio-wise biotechnology at work; contaminated land — an industrial legacy[online]. Available from www.biowise.org.uk/docs/2000/publications/newslet6.pdf.

Beck AJ, Jones KC (1995) Limitations to the in situ remediation of soils contaminated with organic chemicals in relation to the potential to achieve cleanup criteria. In: Van den Brink WJ, Bosman R & Arendt F (eds), *Contaminated Soil '95*, 327-336

Berselli S, Milone G, Canepa P, Di Gioia D, Fava F (2004) Effects of cyclodextrins, humic substances and rhamnolipids as organic pollutant mobilizing agents on the washing of a historically contaminated soil and on the subsequent aerobic bioremediation of the resulting effluents. *Biotechnology and Bioengineering* 88:111-120

Berselli S, Benitez E, Fedi S, Zannoni D, Medici A, Marchetti L, Fava F (2005) Development and assessment of an innovative soil-washing process based on the use of cholic acid-derivatives as pollutant-mobilizing agents. 93:761-770

Biliardo U, Mureddu G (2000) *Traffico Petrolifero e Sostenibilità Ambientale*. Unione Petrolifera

Billingsley KA, Backus SM, Ward OP (1999) Effect of surfactant solubilization on biodegradation of polychlorinated biphenyl congeners by *Pseudomonas* LB400. *Appl Microbiol Biotechnol* 52:255–260

Biosurfactants Market- Global Scenario, Raw Material and Consumption Trends, Industry Analysis, Size, Share and Forecasts, 2011- 2018 [database on the Internet]. [cited 10/11/2012]. Available from: <http://www.transparencymarketresearch.com>)

Bagnolo G (1999) Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids Surf. A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 152(1–2): 41–52

Bonmatin JM, Genest M, Petit MC, Gincel E, Simorre JP, Cornet B, Gallet X, Caille A, Labbe H, Vovelle F, Ptak M (1992) Progress in multidimensional NMR investigations of

peptide and protein 3-D structures in solution. From structure to functional aspects. *Biochimie*. 74:825– 836

Bonomo L, Sezenna E (2005) *Criteri per la selezione delle tecnologie di bonifica dei siti. Caratterizzazione e tecnologie di risanamento*. McGraw-Hill Milano

Bravo-Linares C, Ovando-Fuentealba L, Mudge SM, Loyola-Sepulveda R (2012) Application of response surface methodology to oil spill remediation. *Fuel* 103:876-883

Brugnoli E, Massarelli C, Uricchio VF, Zurlini G (2014) In: *Tecnologie di bonifica dei siti contaminate – Principi funzionali ed esempi di applicazione*. Cucucci Ed.

Cameotra SS, Makkar RS (2010) Biosurfactant-enhanced bioremediation of hydrophobic pollutants. *Pure Appl Chem*. 82(1): 97-116

Castanedo S, Juanes JA, Medina R, Puente A, Fernandez F, Olabarrieta M, Pombo C (2009) Oil spill vulnerability assessment integrating physical, biological and socio-economical aspects: Application to the Cantabrian coast (Bay of Biscay, Spain). *Journal of Environmental Management* 91:149-159

Ceschia E, Harjani JR, Liang C, Ghoshouni Z, Andrea T, Brown RS, Jessop PG (2014) Switchable anionic surfactants for the remediation of oil-contaminated sand by soil washing. *Royal Society of Chemistry* 4:4638-4645

Chang WN, Liu CW, Liu HS (2009) Hydrophobic cell surface and bioflocculation behavior of *Rhodococcus erythropolis*. *Process Biochem* 44:955–962

Cheah EPS, Reible DD, Valsaraj KT, Constant WD, Walsh B, Thibodeaux L.J. (1998). Simulation of soil washing with surfactants. *J. Hazard. Mater.* 59(2–3): 107–122

Cohen MA (2013) Water Pollution from Oil Spills. In: *Encyclopedia of Energy, Natural Resource and Environmental Economics*, DOI:10.1016/B978-0-12-375067-9.00094-2

- CONCAWE (Conservation of Clean Air and Water in Europe) (1998) Heavy fuel oils, CONCAWE, Product Dossier no. 98/109
- Cooper DG, Paddock DA (1984) Production of a Biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Applied and Environmental Microbiology* 47:173-176
- Cumaraswamy V, Xupeng R (2000) Enhanced solubility and biodegradation of naphthalene with biosurfactant. *Journal of environmental engineering* 126(7):629-634
- Cuypers C, Pancras T, Grotenhuis T, Rulkens W. (2002). The estimation of PAH bioavailability in contaminated sediments using hydroxypropyl- β -cyclodextrins and Triton X-100 extraction techniques. *Chemosphere* 46:1235-1245
- Deshpande S, Shiau BJ, Wade D, Sabatini DA, Harwell JH (1999) Surfactant selection for enhancing ex situ soil washing. *Water research* 33:351-360
- EEA European Environmental Agency (1999) Management of contaminated sites in Western Europe
- EPA (United States Environmental Protection Agency) (1998) Innovative Site Remediation Technology-Soilwashing/Soilflushing, 133. EPA, 542-B-93-012
- EPA (United States Environmental Protection Agency) (1999a) Understanding Oil Spills And Oil Spill Response, EPA 540-K-99-007
- EPA (United States Environmental Protection Agency) (1999b) In-Use Marine Diesel Fuel, EPA420-R-99-027
- Eugloreh (2009) The report on the Status of Health in the European Union
- Farrington JW (2014) Oil Pollution in the Marine Environment II: Fates and Effects of Oil Spills. In: *Environment Science and Policy for Sustainable Development*, DOI: 10.1080/00139157.2014.922382

- Fava F, Di Gioia D, Marchetti L, Fenyvesi E, Szejtli J (2002) Randomly methylated β -cyclodextrins (RAMEB) enhance the aerobic biodegradation of polychlorinated biphenyl in aged-contaminated soils. *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry* 44 :417-421
- Fingas M (2011) Introduction to Oil Chemistry and Properties. In: Fingas M (ed) *Oil Spill Science and Technology*, DOI:10.1016/B978-1-85617-943-0.10003-6
- Francy DS, Thomas JM, Raymond RL, Ward CH (1991) Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. *J. Ind. Microbiol.* 8: 237–246
- Franzetti A, Caredda P, Ruggeri C, La Colla P, Tamburini E, Papacchini M, Sestetti G (2009) Potential applications of surface active compounds by *Gordonia* sp. strain BS29 in soil remediation technologies. *Chemosphere* 75:801-807
- Franzetti A, Tamburini E, Banat IM (2010) Applications of biological surface active compounds in remediation technologies. In: Sen R. (ed) *Biosurfactants*, ISBN: 978-1-4419-5978-2
- GA2LEN (2010) Global Allergy and Asthma European Network; ga2len.net
- Garcia-junco M, Gomez-lahoz C, Niqui-arroyo JL, Ortega-calvo JJ (2003) Biosurfactant- and biodegradation-enhanced partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons from nonaqueous-phase liquids. *Environmental science & technology* 37(13): 2988-96
- Gatchett A., Banerjee P (1995) Evaluation of the biogenesis SM soil washing technology. *J. Hazard. Mater.* 40(2): 165–173
- Gómez J, Teresa Alcántara M, Pazos M, Sanromán MA (2010) Soil washing using cyclodextrins and their recovery by application of electrochemical technology. *Chemical Engineering Journal* 159:53-57

- Gong Y, Zhao X, Cai Z, O'Reilly SE, Hao X, Zhao D (2014) A review of oil, dispersed oil and sediment interactions in the aquatic environment: Influence on the fate, transport and remediation of oil spills. *Marine pollution bulletin* 79:16-33
- Han M, Guodong J, Jinren N (2009) Washing of field weathered crude oil contaminated soil with an environmentally compatible surfactant, alkylpolyglucoside. *Chemosphere* 76:579-586
- Han M, Ji G, Ni J (2009) Washing of field weathered crude oil contaminated soil with an environmentally compatible surfactant, alkylpolyglucoside. *Chemosphere* 76: 579-586
- Harvey S, Elashvilli I., Valdes JJ, Kamely D, Chakarbarty AM (1990) Enhanced Removal of Exxon Valdez Spilled Oil from Alaskan Gravel by a Microbial Surfactant. *BIO/Technology*, 8: 228–230
- Heyd M, Kohnert A, Tan TH, Nusser M, KirschhÄfer F, Brenner-Weiss G, *et al.* (2008) Development and trends of biosurfactant analysis and purification using rhamnolipids as an example. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391(5): 1579-90
- Heitzer A, Webb OF, Thonnard JE, Saylor GS, (1992) Specific and quantitative assessment of naphthalene and salicylate bioavailability by using a bioluminescent catabolic reporter bacterium. *Applied Environmental and Microbiology* 58:1839-1846
- Henkel M, Müller MM, Kügler JH, Lovaglio RB, Contiero J, Syldatk C, *et al.* Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: Concepts for next-generation rhamnolipid production (2012) *Process Biochemistry* 47(8): 1207-19
- Hirata Y, Ryu M, Oda Y, Igarashi K, Nagatsuka A, Furuta T, Sugiura M (2009) Novel characteristics of sophorolipids, yeast glycolipid biosurfactants, as biodegradable low-foaming surfactants. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 108:142-146
- Holstein M, McCann J, Angelosanto FA, Nicols WW (1979) Short-term. tests for carcinogens and mutagens. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* 65:133-226

Huguenot D, Mousset E, van Hullebusch ED, Oturan MA (2015) Combination of surfactant enhanced soil washing and electro-Fenton process for the treatment of soils contaminated by petroleum hydrocarbons. *Journal of Environmental Management* 153:40-47

Jain DK, Lee H, Trevors JT (1992) Effect of addition of *Pseudomonas eruginosa* UG2 inocula or Biosurfactants on biodegradation of selected hydrocarbons in soil. *J. Ind. Microbiol* 10: 87–93

Integrated Biotechnological Solutions for Combatting Marine Oil Spill (Kill Spill, FP7 project contract No. 312139)

ISO. ISO8217 (2005) Petroleum products - fuels (class F) - specifications of marine fuels. 3rd ed

ISPRA (Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale) (2011) Sversamenti di prodotti petroliferi: sicurezza e controllo del trasporto marittimo. Rapporti 149/2011, ISBN 978-88-448-0520-3

ISPRA (Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale) ARPA-APPA (Sistema delle Agenzie Ambientali) (2011) Procedura per l'analisi degli idrocarburi >C₁₂ in suoli contaminati. Manuale linee guida 75/2011

ISS (Istituto Superiore della Sanità) (2001) Determinazione degli idrocarburi policiclici aromatici (IPA). Metodo per gascromatografia con rivelazione a ionizzazione di fiamma e gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa. Metodi ufficiali per le acque destinate al consumo umano ai sensi del Dlgs 31/2001

ITOPF (International Tanker Owners Pollution Federation), www.itopf.com

Kalali A, Ebadi T, Rabbani A, Moghaddam SS (2011) Response surface methodology approach to the optimization of oil hydrocarbon polluted soil remediation using enhanced soil washing. *International Journal of Environmental Science & Technology* 8:389-400

- Kameda Y, Oira S, Matsui K, Kanatomo S, Hase T (1974) Antitumor activity of *Bacillus natto*. V. Isolation and characterization of surfactin in the culture medium of *Bacillus natto* KMD 2311. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 22:938–944
- Kang SW, Kim YB, Shin JD, Kim EK (2010) Enhanced biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial biosurfactant, sophorolipid. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160:780-790
- Khuri AI, Mukhopadhyay S (2010) Response surface methodology. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics* 2:128-149
- Kleidon, Axel (2011) How does the earth system generate and maintain thermodynamic disequilibrium and what does it imply for the future on the planet?. Cornell University library, arXiv:1103.2014
- Kracht M, Rokos H, Ozel M, Kowall M, Pauli G, Vater J (1999) Antiviral and hemolytic activities of surfactin isoforms and their methyl ester derivatives. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 52:613– 619
- Kronemberger FDA, Santa Anna LMM, Fernandes ACLB, Menezes RRD, Borges CP, Freire DMG (2008). Oxygen-controlled biosurfactant production in a bench scale bioreactor. *Appl Biochem Biotechnol*.
- Laha S, Tansel B, Ussawarujikulchai A (2009) Surfactant- soil interactions during surfactant-amended remediation of contaminated soils by hydrophobic organic compounds: A review. *Journal of Environmental Management* 90:95-100
- Lai CC, Huang YC, Wei YH, Chang JS (2009) Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials* 167:609-614

- Lang S, Wullbrandt D (1999). Rhamnose lipids—biosynthesis, microbial production and application potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51(1): 22–32
- Lee SY, Lee DY, Kim TY (2005) Systems biotechnology for strain improvement. *Trends Biotechnol.* 23(7): 349-58
- Leitgib L, Gruiza K, Fenyvesib É, Balogha G, Murányic A (2008) Development of an innovative soil remediation: “Cyclodextrin-enhanced combined technology”. *Science of the Total Environment* 392:12-21
- Liu X, Hongliang J, Wang L, Qi H, Ma W, Hong W, Guo J, Yang M, Sun Y, Li YF (2013) Characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons in concurrently monitored surface seawater and sediment along Dalian coast after oil spill. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 90:151–156
- Liu Z, Zeng G, Zhong H, Fu H, Liu X (2010) Production and characterization of biosurfactant from *Bacillus subtilis* CCTCC AB93108. *Journal of Central South University of Technology* 17:516–521
- López-Vizcaíno R, Sáez C, Cañizares P, Rodrigo MA (2012) The use of a combined process of surfactant-aided soil washing and coagulation for PAH contaminated soils treatment. *Separation and Purification Technology* 88:46-51
- Luna JM, Sarubbo LA, Campos-Takaki GM (2009) A new biosurfactant produced by *Candida glabrata* UCP1002: characteristics of stability and application in oil recovery. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 52:785-793
- Manuale pratico per realizzare Disegni degli Esperimenti (2007), Six Sigma In Team snc, Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN
- Mann J.M. (1999) Full-scale and pilot-scale soil washing. *J. Hazard. Mater.* 66: 119–136
- Manning, FS, Thompson RE (1995) *Oilfield Processing of Petroleum: Crude Oil*: Pennwell Corporation

- Makkar RS, Cameotra SS (2002) An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Appl Microbiol Biot* 58:428–434
- Makkar, RS, Rockne KJ (2009) Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental toxicology and chemistry*.22(10): 2280-92
- Mao X, Jianga R, Xiao W, Yu J (2015) Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: A review. *Journal of Hazardous Materials* 285:419-435
- Maier RM, Soberón-Chávez G (2000) *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Appl. Microbiol.Biotechnol.* 54(5): 625–633
- McCray JE, Bai G, Maier R., Brusseau ML (2001) Biosurfactant-enhanced solubilisation of NAPL mixtures. *J. Contam. Hydrol.* 48(1–2): 45–68
- Marchant R, Banat IM (2012) Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. *Trends in Biotechnology* 30:558-565
- Mnif I, Sahnoun R, Ellouze-Chaabouni S, Ghribi D (2014) Evaluation of *B. subtilis* SPB1 biosurfactants' potency for diesel-contaminated soil washing: optimization of oil desorption using Taguchi design. *Environmental Science and Pollution Research* 21:851-861
- Montgomery DC (2005) Progettazione e analisi degli esperimenti. In: McGraw-Hill (eds), 5th ed Milano, ISBN 88- 386-6179-0
- Mulligan CN, Yong RN, Gibbs BF (2001) Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. *Engineering Geology* 60:371-380
- Mulligan CN, Eftekhari F (2003) Remediation with surfactant foam of PCP-contaminated soil. *Engineering geology.* (2003) 70(3): 269-79

Mulligan CN (2005) Environmental applications for biosurfactants. *Environmental pollution* 133:183-198

Mulligan CN (2009) Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 14:372-378

Multifactor RSM Tutorial (2013), Design-Expert 9 User's Guide

Mukherjee S, Das P, Sen R (2006) Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends Biotechnol.* 24(11): 509-15

Müller MM, Kügler JH, Henkel M, Gerlitzki M, Hörmann B, Pöhnlein M, *et al.* (2012). Rhamnolipids-Next generation surfactants? *Journal of Biotechnology*.

Müller M, Hausmann R (2011). Regulatory and metabolic network of rhamnolipid biosynthesis: Traditional and advanced engineering towards biotechnological production. *Applied Microbiology and Biotechnology*.91(2): 251-64

Myers RH, Montgomery DC (2002) *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*. In: Wiley J & Sons (eds), 2nd ed New York

Nadarajah N, Singh A, Ward OP (2002) De-emulsification of petroleum oil emulsion by a mixed bacterial culture. *Process Biochemistry* 37(10): 1135-41

Nguyen TTL, Edelen A, Neighbors B, Sabatini DA (2010) Biocompatible lecithinbased microemulsions with rhamnolipid and sophorolipid biosurfactants: Formulation and potential applications. *Journal of Colloid and Interface Science* 348:498–504

Nikolopoulou M, Pasadakis N, Norf H, Kalogerakis N (2013) Enhanced ex situ bioremediation of crude oil contaminated beach sand by supplementation with nutrients and rhamnolipids. *Marine Pollution Bulletin* 77:37–44

- Nitschke M, Araújo L, Costa S, Pires R, Zeraik A, Fernandes A, *et al.* (2009) Surfactin reduces the adhesion of food borne pathogenic bacteria to solid surfaces. *Letters in applied microbiology* 49(2): 241-7
- Nitschke M; Costa S, Haddad R, Gonçalves LAG, Eberlin MN, Contiero J (2005) Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. *Biotechnol Prog.* 21(5): 1562-6
- Oberbremen A, Muller-Hurting R, Wagner F (1990) Effect of the addition of microbial surfactants on hydrocarbon degradation in a soil population in a stirred reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* 32:485-489
- Occulti F, Rodoa GC, Berselli S, Fava F (2008) Sustainable Decontamination of an Actual-Site Aged PCB-Polluted Soil Through a Biosurfactant-Based Washing Followed by a Photocatalytic Treatment. *Biotechnology and Bioengineering* 99(6): 1525:1533
- Owens EH (2011) Shoreline Countermeasures. In: Fingas M (ed) *OilSpill Science and Technology*, DOI:10.1016/B978-1-85617-943-0.10003-6
- Pacwa-Plociniczak M, Płaza GA, Piotrowska-Seget Z, Cameotra SS (2011) Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances. *International Journal of Molecular Sciences* 12:633-654
- Paria S (2008) Surfactant-enhanced remediation of organic contaminated soil and water. *Advances in Colloid and Interface Science* 138:24-58
- Peng S, Wu W, Chen J (2011) Removal of PAHs with surfactant-enhanced soil washing: Influencing factors and removal effectiveness. *Chemosphere* 82:1173-1177
- Pekdemir T, Ishigami Y, Uchiyama H. (1999) Characterisation of Aescin as a biosurfactant for environmental remediation. *J. Surfactants deterg.* 2(3): 337–341
- Pereira MG and Mudge SM (2004) Cleaning oiled shores: laboratory experiments testing the potential use of vegetable oil biodiesels. *Chemosphere* 54:297-304

- Perfumo A, Rancich I, Banat IM (2010) Possibilities and challenges for biosurfactants use in petroleum industry, vol 672. In: Sen R (ed) Biosurfactants' advances in experimental medicine and biology. Springer, Berlin, 135–157
- Petitgirard A, Djehiche M, Persello J, Fievet P, Fatin-Rouge N (2009) PAH contaminated soil remediation by reusing an aqueous solution of cyclodextrins. *Chemosphere* 75:714-718
- Polman JK, Miller KS, Stoner DL, Breckenridge CR (2004) Solubilization of bituminous and lignite coals by chemically and biologically synthesized surfactants. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 61(1):11–17
- Pornsunthornatavee O, Arttaweeporn N, Paisanjit S, Somboonthanate P, Abe M, Rujiravanit R, Chavadej S (2008) Isolation and comparison of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* PT2 and *Pseudomonas aeruginosa* SP4 for microbial surfactant-enhanced oil recovery. *Biochemical Engineering Journal* 42:172-179
- Potter TL, Simmons KE (1998) Composition of petroleum mixtures. In: Vol. 2. Amherst, MA: Amherst Scientific Publishers
- Pothuluri JV, Cerniglia CE (1998). Current aspects on polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation processes. In: Sikdar, S.K., Irvine, R.L. (Eds.), *Bioremediation: Principles and Practice*, vol. 2. Technomic Publishing Company, Lancaster, pp. 461–520
- Rahman KS, Rahman TJ, Kourkoutas Y, Petsas I, Marchant R, Banat IM (2003) Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresour Technol. Epub* 2003/08/05 90(2): 159-68
- Raza ZA, Rehman A, Khan MS, Khalid ZM (2007) Improved production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* mutant using vegetable oil refinery wastes. *Biodegradation* 18:115–121

- Reid G, Burton J (2002) Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes Infect* 4:319–324
- Reid G, Bruce A, Smeianov V (1998) The role of *Lactobacilli* in preventing urogenital and intestinal infections. *Int Dairy J* 8:555–562
- Reid G, Bruce AW, Fraser N, Heinemann C, Owen J, Henning B (2001) Oral probiotics can resolve urogenital infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 30:49–52
- Reis RS, Pacheco GJ, Pereira AG, Freire DMG (2013) Biosurfactants: Production and Applications. In: Chamy R (ed) *Biodegradation - Life of Science*, DOI:10.5772/56144
- REMPEC (Regional Marine Pollution Emergency Response Centre for the Mediterranean Sea) (2011) *Statistical analysis - Alerts and Accidents Database*.
- Riganti V, Vaccari M, Collivignarelli MC (2007) Bonifiche ex-situ - La tecnologia "Soil washing" tra ambiente e sicurezza. In: *Tecnologie & soluzioni, Ambiente e Sicurezza*, 5:41-47
- Robinson TJ, Wulff SS (2006) Response surface approaches to robust parameter design. In: Khuri AI (ed) *Response surface methodology and related topics*, World Scientific, Singapore, ISBN: 978-981-256-458-0
- Rosen R, Ron EZ (2002) Proteome analysis in the study of the bacterial heat-shock response. *Mass Spectrom Rev.* 21(4): 244-65
- Rosenberg E., Ron EZ (1999) High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52:154 –162
- Rouse JD, Sabatini DA, Suflita JM, Harwell JH (1994) Influence of surfactants on microbial degradation of organic compounds. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 24:325-370

- Saari E, Peramaki P, Jolonen J (2010) *Microchemical Journal*. Evaluating the impact of GC operating settings on GC-FID performance for total petroleum hydrocarbon (TPH) determination. 94: 73-78
- Saenger W (1980) Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry. *Angewandte Chemie International Edition in English* 19:344-362
- Sánchez-Trujillo MA, Morillo E, Villaverde J, Lacorte S (2013) Comparative effects of several cyclodextrins on the extraction of PAHs from an aged contaminated soil. *Environmental Pollution* 178:52-58
- Santa Anna LM, Soriano AU, Gomes AC, Menezes EP, Gutarra MLE, Freire DMG, *et al.* (2007) Use of biosurfactant in the removal of oil from contaminated sandy soil. *J Chem Technol Biotechnol*. 82(1) . 687-91
- Shete AM, Wadhawa G, Banat IM, Chopade BA (2006) Mapping of patents on bioemulsifier and biosurfactant: A review. *Journal of Scientific and Industrial Research* 65(2): 91-115
- Scheibenbogen K, Zytner RG, Lee H, Trevors JT (1994) Enhanced removal of selected hydrocarbons from soil by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactants and some chemical surfactants. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 59:53-59
- Sims RC and Overcash MR (1983) Fate of polynuclear aromatic compounds (PNAs) in soil-plant systems. *Residue Reviews* 88:1-68
- Singh A, VanHamme JD, Ward OP (2007) Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnology Advances* 25:99-121
- Sun M, Luo Y, Teng Y, Jia Z, Li Z, Deng S (2013) Remediation of polycyclic aromatic hydrocarbon and metal-contaminated soil by successive methyl- β -cyclodextrin-enhanced soil washing-microbial augmentation: a laboratory evaluation. *Environ Sci Pollut Res Int*. 20(2):976-86

- Urum K, Pekdemir T, Gopur M (2003) Optimum conditions for washing of crude oil contaminated soil with biosurfactant solutions. *Process Safety and Environmental Protection* 81:203-209
- Urum K, Pekdemir T (2004) Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. *Chemosphere* 57:1139-1150
- Urum K, Pekdemir T, Çopur M (2004) Surfactants treatment of crude oil contaminated soils. *Journal of Colloid and Interface Science* 276:456-464
- Urum K, Grigson S, Pekdemir T, McMenamy S (2006) A comparison of the efficiency of different surfactants for removal of crude oil from contaminated soils. *Chemosphere* 62:1402-1410
- Urum K, Pekdemir T, Çopur M (2015) Screening of biosurfactant for crude oil contaminated soil washing. *Journal of environmental engineering and science* 6: 487-496
- Vollenbroich D, Ozel M, Vater J, Kamp RM, Pauli G (1997a) Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. *Biologicals*. 25:289 –297
- Vollenbroich D, Pauli G, Ozel M, Vater J (1997b) Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbial.* 63:44–49
- Van Agteren MH, Keuning S, Janssen DB (1998) *Handbook on Biodegradation and Biological Treatment of Hazardous Organic Compounds*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Van Bogaert INA, Saerens K, Muynck CD, Develter D, Soetaert W, Vandamme EJ (2007) Microbial production and application of sophorolipids. *Applied Microbiology and Biotechnololy* 76:23-34

- Van Dyke, MI, Couture P, Brauer M, Lee H, Trevors JT (1993) *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactants: structural characterisation and their use in removing hydrophobic compounds from soil. *Can. J. Microbiol* 39(11): 1071–1078
- Vincent O, Akpoveta M.Sc, Osakwe S, Egharevba F, Mejjor W.O, Asia I.O, Ize-Iyamu O.K (2012) Surfactant Enhanced Soil Washing Technique and its Kinetics on the Remediation of Crude Oil Contaminated Soil. *The Pacific Journal of Science and Technology*. 13(1):443:456
- Volkering F, Braure AM, Rulkens WH (1998) Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. *Biodegradation* 8:401-407
- Von Lau E, Gan S, Ng HK, Poh PE (2014) Extraction agents for the removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from soil in soil washing technologies. *Environmental Pollution* 181:640-649
- Wei YH, Chou CL, Chang JS. Rhamnolipid production by indigenous (2005) *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. *Biochemical Engineering Journal* 27(2): 146-54
- Wang JM., Marlowe EM., Miller-Maier RM., Brusseau ML (1998) Cyclodextrin enhanced biodegradation of phenanthrene. *Environ. Sci. Technol.* 32, 1907–1912
- Wang Z, Yang C, Kelly-Hooper F, Hollebone B, Peng X, Landriault M, Brown C.E., Sun J, Yang Z (2009). Forensic differentiation of biogenic organic compound from petroleum hydrocarbons in biogenic and petrogenic compound cross-contaminated soils and sediments. *Journal of Chromatography*, 1216:1174-1191
- Whang LM, Liu PWG, Ma CC, Cheng SS. (2008) Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. *Journal of hazardous materials* 151(1): 155-63

- Weissenfiels WD, Klewer HS, Langhoff J (1992) Adsorption of PAHs by soil particles: influence of biodegradability and biotoxicity. *Applied Microbiology and Biotechnology* 36:689-696
- Whang LM, Liu PW, Ma CC, Cheng SS (2008) Application of biosurfactants, rhamnolipid and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. *Journal of Hazardous Materials* 151:155-163
- Wong JWC, Fang M, Zhao Z, Xing B. (2004) Effect of surfactants on solubilization and degradation of phenanthrene under thermophilic conditions. *Journal of environmental quality* 33(6): 2015-25
- Yang Z, Yang C, Wang Z, Hollebone B, Landriault M, Brown Carl E. (2011). Oil fingerprinting analysis using commercial solid phase extraction (SPE) cartridge and gas chromatography –mass spectrometry (GC-MS). *Analytic Methods*, 3:628-635
- Ye M, Sun M, Kengara FO, Wang J, Ni N, Wang L, Song Y, Yang X, Li H, Hu F, Jiang X (2014) Evaluation of soil washing process with carboxymethyl- β -cyclodextrin and carboxymethyl chitosan for recovery of PAHs/heavy metals/fluorine from metallurgic plant site. *J Environ Sci (China)* 26(8):1661-72
- Zhou M, Rhue RD. (2000) Screening commercial surfactants suitable for remediating DNAPL source zones by solubilisation. *Environ. Sci. Technol.* 34(10): 1985–1990
- Zhou W, Zhu L. (2007) Efficiency of surfactant-enhanced desorption for contaminated soils depending on the component characteristics of soil-surfactant-PAHs system. *Environmental Pollution* 147(1): 66-73
- Zouboulis A, Matis K, Lazaridis N, Golyshin P (2003) The use of biosurfactants in flotation: application for the removal of metal ions. *Minerals Engineering.* (2003) 16(11): 1231-6

