

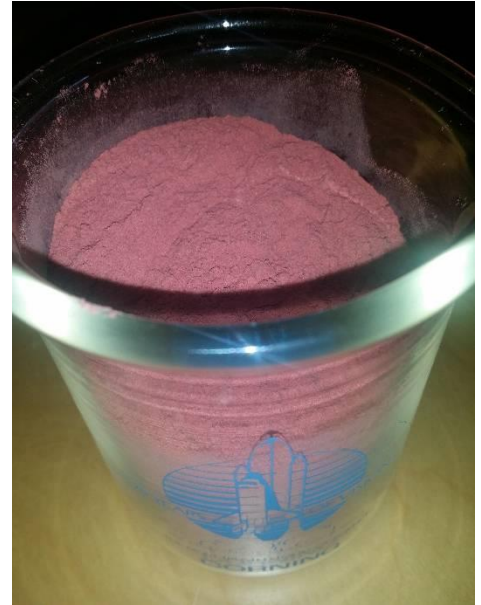
Provect-CH4™

Methane Inhibitor / ERD and ISCR Supplement

DESCRIZIONE DELLA TECNOLOGIA

Provect-CH4 è un prodotto food-grade, fonte naturale di monacolina K (altrimenti nota come lovastatina) che viene usata per prevenire la formazione di metano (CH₄) inibendo la crescita e la proliferazione dei batteri metanogeni Archea. Nelle applicazioni di risanamento ambientale, esso può essere usato come supplemento agli ammendanti tradizionali per la dealogenazione riduttiva migliorata (ERD) e la riduzione Chimica in situ (ISCR) rendendoli più sicuri e più efficaci. Questi includono:

- ◆ oli
- ◆ oli emulsionati
- ◆ zuccheri (lattato, destrosio, glucosio)
- ◆ altre fonti di carbonio (i.e. melassa, siero di latte)
- ◆ carbonio di origine vegetale (i.e. cellulose e emicellulosa)
- ◆ carbonio + ZVI (reagenti ISCR tradizionali)



La gestione della produzione di metano in applicazioni di bonifica è stata tentata, con diversi gradi di successo, con altri approcci, come la gestione del pH e l'utilizzo di fonti di carbonio a lento rilascio a base di cellulosa (i batteri ligninolitici sono comunemente noti per non produrre metano). Tuttavia, **Provect-CH4** è l'unico reagente progettato per **controllare attivamente la produzione di metano** in modo sicuro, affidabile e prevedibile (US Patent Office Scalzi *et al*, 2013, 2014). Oltre ai problemi di sicurezza, associati ad elevato metano nelle acque sotterranee, nei gas interstiziali e nell'aria indoor, questo effetto promuove anche un uso più efficiente dei donatori di idrogeno.

QUAL E' IL PROBLEMA CON IL METANO?

Ci sono benefici riconosciuti ai batteri metanogeni ed alla metanogenesi limitata. Per esempio, i) i metanogeni sono conosciuti per svolgere ruoli importanti nell'ecologia microbica sinergica, ii) la loro attività metabolica può aiutare a mantenere condizioni anossiche nelle zone di trattamento (attraverso variazioni stagionali), e iii) l'attività del metano monoossigenasi e di altri enzimi può stimolare l'attività co-metabolica di TCE/DCE/VC nelle zone di trattamento. Quindi, una limitata produzione di metano è parte di una corretta applicazione ERD/ISCR. Tuttavia, l'eccessiva produzione di metano può essere pericolosa e rappresenta uno spreco costoso di reagente.

Problemi di costi ed efficienza: La produzione di metano è una indicazione diretta che l'idrogeno generato dai reagenti donatori di elettroni è stato usato dai metanogeni invece che dai microbi di interesse (i.e. *Dehalococcoides spp.*), riducendo sostanzialmente l'efficienza di applicazione. La tabella 1 (riportata sotto) presenta l'esempio di un sito in cui la domanda di idrogeno viene calcolata per una zona, di volume pari a ca. 1.415 mc, altamente aerobica e ossidata. La domanda di idrogeno per la completa dechlorazione di tutta la massa di PCE e TCE in etene all'interno dell'area sorgente in esempio, comprendente sia i contaminanti adsorbiti che in fase disciolta, è inferiore al reagente consumato per produrre 20 mg/L di metano. Lo stesso vale per ridurre l'ossigeno disciolto, i nitrati, i solfati, ed il ferro e manganese biodisponibili, accettori di elettroni concorrenti all'interno dell'ipotetica zona di trattamento. Quindi, anche se questo sito in esempio è altamente ossidato e con concentrazioni relativamente alte di PCE e TCE, la produzione di solo 20 mg/L di metano costituisce un consumo di reagente, basato sulle moli di H₂, maggiore del 33%.

Tabella 1. Domanda di idrogeno per la completa dechlorazione di PCE/TCE in una ipotetica area di sorgente

Constituent	Groundwater Concentration (mg/L)	Molecular Weight (g/mol)	Moles of H ₂ to Reduce Mole Analyte	Moles of H ₂ Acceptor In Treatment Area
Contaminant Electron Acceptors (To End Product Ethene)				
Tetrachloroethene (PCE)	10.0	165.8	4	1,393
Trichloroethene (TCE)	7.0	131.4	3	364
cis-1,2-Dichloroethene (cDCE)	0.0	96.9	2	0
Vinyl Chloride (VC)	0.0	62.5	1	0
Complete Dechlorination (Soil+Groundwater) Subtotal				1,757
Native Electron Acceptors				
Dissolved Oxygen	9.0	32	2	199
Nitrate (as Nitrogen)	9.0	62	3	682
Sulfate	50.0	96.1	4	736
Fe ⁺² Formation from Fe ⁺³	20.0	55.8	0.5	63
Mn ⁺² Formation from Mn ⁺⁴	10.0	54.9	1	64
Baseline Geochemistry Subtotal				1,745
Hydrogen Waste for Methane Formation				
Methane Formed	20.0	16	4	1,769
Initial Treatment Area Hydrogen Usage				5,271

Potenziati problemi di salute e sicurezza: Il metano è considerato uno dei principali gas serra. E' esplosivo, con un LEL del 5% e un UEL del 15%. Come risultato di un processo di fermentazione microbica, il metano sarà prodotto in molti casi in cui si utilizzano ammendanti tradizionali per ERD o ISCR. Una produzione eccessiva e prolungata di metano può provocare un aumento delle concentrazioni nelle acque sotterranee (sono state riportate concentrazioni fino a 1.000 ppm) che può portare all'accumulo nei gas interstiziali e un successivo impatto nell'aria indoor. Mentre questo è forse più rilevante nelle aree urbane dove il metano può accumularsi negli scantinati, sotto le fondazioni e/o migrare lungo sottoservizi, una eccessiva produzione di metano è stata osservata anche in contesti rurali o in spazi aperti.

Aspetti normativi nuovi ed emergenti: Negli USA sono stati promulgati regolamenti statali specifici per il metano nelle acque sotterranee, e altri sono in emanazione per i gas interstiziali e l'aria indoor. Per esempio, le normative vigenti per il metano variano da ca. 10 a 28 mg CH₄/L (Indiana Department of Environmental Management, 2014). In particolare, diversi progetti con ERD che prevedevano di utilizzare sorgenti liquide di carbonio (oli emulsionati) non sono riusciti ad ottenere l'approvazione a causa dei problemi associati all'eccessiva produzione di metano durante precedenti applicazioni (comunicazione personale – Stato della California, Stato del Minnesota). Come risultato, molti progettisti di interventi ERD/ISCR considerano l'implementazione di contingencies nel caso in cui il metano ecceda un livello di soglia variabile da 1 a 10 ppm nelle acque di falda. Queste contingencies comportano spesso sistemi costosi per il trattamento di metano nei gas interstiziali o nei vapori recuperati con sistemi tipo SVE.

PROVTECT-CH4: MODALITA' DI AZIONE – COME LAVORA?

Cos'è un metanogeno? Negli anni settanta, il Dr. Carlo Woese (1928-2012) ed i suoi colleghi dell'università dell'Illinois – Urbana studiarono le relazioni tra procarioti utilizzando sequenze di DNA e scoprirono che i microbi che producono metano – o metanogeni – sono gli Archea (Woese e Fox, 1977). L'identificazione di questo nuovo dominio di microrganismi è stata molto importante per molte ragioni, ma dal nostro punto di vista la grande differenza nella composizione genetica significa che i metanogeni sono significativamente diversi dai tipici batteri eterotrofi ed eucarioti. In altre parole, i *Dehalococcoide ethenogenes* sono diversi dai metanogeni.

Cos'è una statina? Una statina può essere definita come “una classe di farmaci ipolipemizzanti che riducono i livelli di colesterolo nel sangue inibendo un enzima chiave nella biosintesi del colesterolo”. La lovastatina è una statina forte, ampiamente conosciuta, usata per decenni per ridurre il colesterolo nel sangue inibendo l'enzima HMG-CoA reduttasi (3-idrossi-3-metilglutaril coenzima A reduttasi), un enzima chiave nella biosintesi del colesterolo (Alberts *et al.*, 1980). E' stata la prima statina approvata dallo United States Food and Drug Administration nel 1987 come farmaco per curare l'ipercolesterolemia.

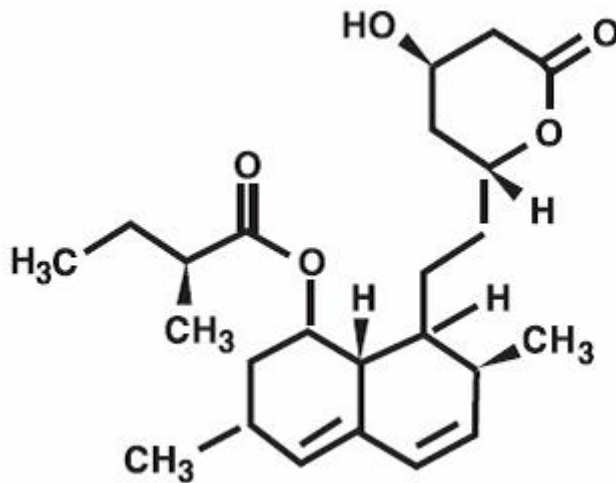


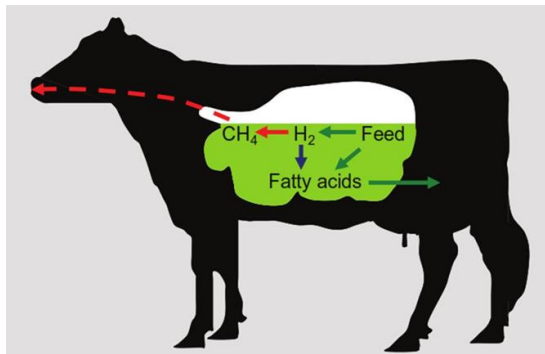
Figura 2. Struttura chimica della lovastatina

Cos'è l'estratto di lievito di riso rosso? L'estratto di lievito di riso rosso (RYR), che è un componente del [Provect-CH4](#), è una sostanza estratta dal riso che è stato fatto fermentare con un tipo di lievito chiamato *Monascus purpureus*. L'estratto di lievito rosso è stato utilizzato nell'industria del bestiame per decenni con l'obiettivo di gestire la microbiologia ruminale e controllare la produzione di metano nelle vacche (Henderson *et al.*, 2010). Inoltre è stato utilizzato come colorante alimentare, additivo alimentare/conservante, ed è ampiamente consumato dagli essere umani. L'estratto di RYR contiene una serie di monacoline – la più importante delle quali è la monacolina K, altrimenti conosciuta come lovastatina o mevinolina. La monacolina K è una statina di origine naturale. Oltre alla monacolina K, l'estratto di RYR contiene anche altre statine, acidi grassi monoinsaturi, vitamine e altri nutrienti che stimolano efficacemente i batteri anaerobici nel sottosuolo.

In che modo [Provect-CH4](#) inibisce un metanogeno? La monacolina K può inibire gli archeobatteri metanogeni perchè la produzione di membrane cellulari negli archea condivide un percorso simile con la biosintesi del colesterolo (Miller e Wolin, 2001). Più specificatamente, le pareti cellulari dei batteri sono prevalentemente costituite da mureina (peptidoglicano). Gli archea, tuttavia, non producono mureina; piuttosto, le loro pareti cellulari sono composte da vari solfati – eteropolisaccaridi, proteine e glicoproteine/lipidi insieme a pseudomureina – una struttura analoga alla mureina – che viene biosintetizzata tramite una attività simile a quella dell'HMG-CoA reduttasi che produce il colesterolo nell'uomo. In presenza di una statina l'enzima HMG-CoA reduttasi è inibito, il percorso di biosintesi della pseudomureina è interrotto, e i metanogeni sono limitati nella crescita e nella proliferazione. E poichè i metanogeni sono particolarmente differenti dai batteri, l'effetto inibitorio del [Provect-CH4](#) non si osserva nei microbi che sono tipicamente associati con i) catabolismo dei contaminanti organici (come le specie *Pseudomonas*) e/o, ii) alorepirazione/biodegradazione dei solventi clorurati (come le specie *Dehalococcoides*).

TRATTAMENTO ERD/ISCR PIU' SICURO, PIU' EFFICIENTE

La riduzione chimica *in situ* (ISCR) descrive l'effetto combinato di consumo biologico stimolato di ossigeno (mediante fermentazione di una fonte di carbonio organico), riduzione chimica diretta con ferro zero valente (ZVI) o altri metalli ridotti. Come descritto da Brown *et al* (2009), le corrispondenti reazioni termodinamiche stimolate di decomposizione che avvengono in condizioni di potenziale redox (Eh) ridotto consentono una più efficace mineralizzazione di molti composti di interesse (COIs). Esistono un certo numero di substrati per la dealogenazione riduttiva stimolata (ERD) o altre tecnologie di biorisanamento anaerobico accelerato (i.e. oli emulsionati, oli non emulsionati, composti a base di carbonio a rilascio di idrogeno, ammendanti a base di materia vegetale + ZVI) che facilitano la biodegradazione dei composti correlati. **Provect-IR**, substrato antimetanogenico per ISCR, combina l'estratto di RYR con una varietà di reagenti selezionati per indurre vere condizioni ISCR e facilitare la distruzione dei COIs in maniera più sicura e più efficace. **Provect-IR** è stato utilizzato su vasta scala per migliorare acquiferi impattati da solventi clorurati, pesticidi, metalli pesanti e altri COIs (Provectus Environmental Products, Inc. – <http://www.provectusenvironmental.com/>).



Feed is normally fermented in the rumen to produce hydrogen (H₂) and, importantly, the volatile fatty acids that form a major part of the animal's nutritional needs [green arrows]. Methanogens use hydrogen to form methane (CH₄) which exits the rumen into the atmosphere [red arrows]. When the methanogens are inhibited, the activity of homoacetogens could form volatile fatty acids from the hydrogen instead [blue arrow].

Figura 1. Cosa succede all'H₂ quando i metanogeni sono inibiti?
(By Henderson *et al.*, 2011)

I metanogeni sono spesso gli idrogenotrofi (i.e. consumatori di idrogeno) dominanti in molti ambienti perchè hanno una più bassa soglia per l'H₂ degli acetogeni e perchè l'energia ceduta dalla trasformazione di CO₂ e H₂ in metano è maggiore di quella per la trasformazione ad acetato. Tuttavia, quando i metanogeni sono inibiti, gli acetogeni come *Clostridium* e molti altri microbi con una vasta gamma di capacità cataboliche prospereranno e produrranno acetil-CoAQ/acetate e altri VFAs da H₂ e CO₂ mediante il percorso Wood-Ljungdahl (vedi **Figura 1**). Inibendo la crescita e la proliferazione degli Archea produttori di metano, i batteri clororespiratori possono diventare la popolazione di batteri dominante. In un ambiente anaerobico, gli alorespiratori e altri batteri come i *Desulfobacter* spp. e i *Desulfuromonas* spp. utilizzeranno in modo più efficace l'idrogeno disponibile per la dechlorazione dei COIs, e i VFAs saranno fermentati per produrre infine CO₂ (Schauder *et al.*, 1986).

PROVA DI FUNZIONAMENTO

In collaborazione con la Western Michigan University, sono stati predisposti due reattori anaerobici con biomasse che contenevano una popolazione metanogena attiva. I reattori sono stati alimentati una volta alla settimana per raggiungere 2.000 mg/l di COD e sono stati fatti funzionare come reattori anaerobici batch in sequenza a 22-24 °C. Dopo una settimana di incubazione, è stata aggiunta in ogni reattore una sabbia limosa risultante in uno slurry avente una concentrazione di solidi in peso del 20%. I reattori sono stati fatti funzionare per un'altra settimana con la sabbia limosa, per assicurarsi che la sabbia non influenzasse l'attività metanogena. Durante le prime due settimane entrambi i reattori sono stati gestiti in modo identico in modo da fissare le condizioni metanogene iniziali. Durante la terza settimana è stato aggiunto **Provect-CH4** ad un reattore in modo da raggiungere una concentrazione di 40 mg/L, mantenendo il secondo come reattore di controllo (senza aggiunta di **Provect-CH4**). Poiché la dose di 40 mg/L di **Provect-CH4** ha ridotto la produzione di metano nel reattore in modo molto rapido e completo (vedi sotto), è stato deciso di aggiungere nel reattore di controllo 20 mg/l di **Provect-CH4** durante la quarta settimana.

Nel corso dello studio, il volume di biogas prodotto è stato rilevato prelevando periodicamente un campione di gas, utilizzando una siringa in vetro inserita attraverso un setto in cima ad ogni reattore (**Figura 2**). Il contenuto di metano nei campioni di gas è stato quantificato con un gas cromatografo con rilevatore a ionizzazione di fiamma (GC-FID). I reattori erano dotati anche di sonde per la misura di pH e ORP. Dopo ogni ciclo (i.e. prima dell'alimentazione) è stata inserita una sonda nel reattore per misurare i TDS, ed è stato prelevato un campione per misurare il COD. Il miscelatore è stato spento durante il campionamento e l'alimentazione in modo da minimizzare l'introduzione di ossigeno nel reattore.

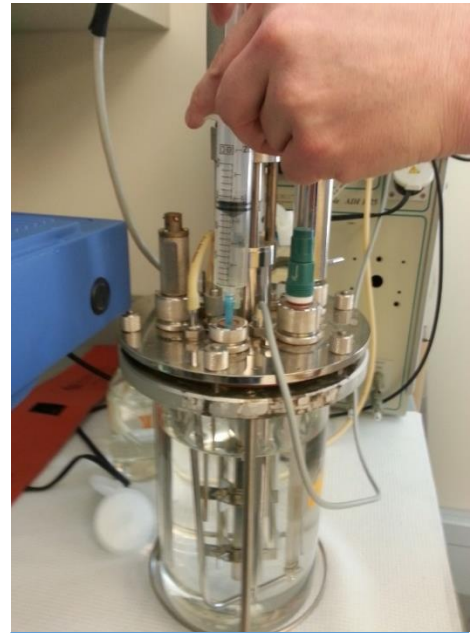


Figura 2. Dettaglio che mostra il campionamento del biogas con una siringa per monitorare il metano

RISULTATI:

La **Tabella 1** mostra il volume di biogas prodotto, i valori di pH e ORP e le concentrazioni di COD e TDS misurate nel reattore di controllo ed in quello di test durante le prove. Il volume di biogas prodotto ad ogni ciclo (i.e. ogni settimana) nei reattori è risultato variabile da 72 a 82 ml. Si noti che il volume di gas prodotto nel reattore non è stato influenzato dall'introduzione della sabbia limosa durante la Settimana 2. Le misura di COD dopo ogni ciclo di alimentazione va da 56 a 108 mg/L. I reattori sono stati alimentati, ad ogni ciclo, con 2.000 mg/l di COD, apparentemente consumato rapidamente dalla coltura anaerobica. I valori di pH variano da 6,1 a 6,4. I valori di ORP sono stati sempre vicino a -300 mV, che sono tipici di condizioni metanogene. Il valore di TDS non è variato nel tempo, ed è risultato compreso tra 1.200 e 1.250 mg/L.

Tabella 1. Volume di biogas, valori di pH e ORP, concentrazioni di COD e TDS nel reattore di controllo ed in quello di test durante le prove

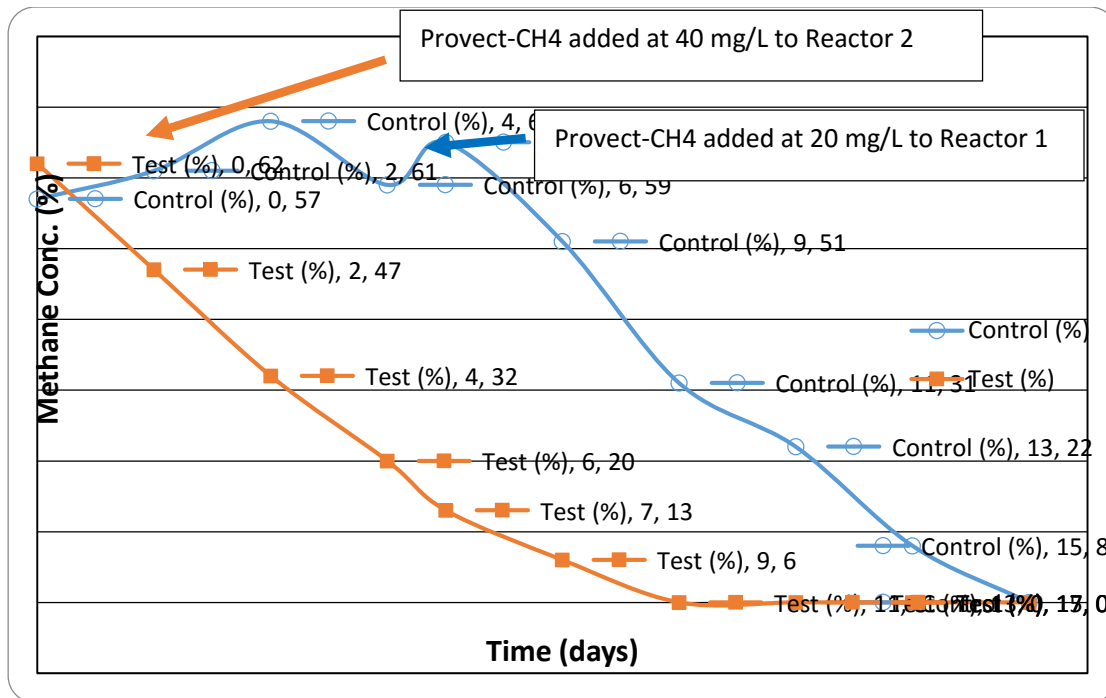
Period	Gas Vol. (mL)	COD (mg/L)	pH	ORP (mV)	TDS (mg/L)
Reactor 1					
Startup-Week 1	81	56	6.4	-302	1213
Startup-Week 2	72	91	6.3	-306	1241
Test-Week 3	75	61	6.2	-289	1258
Test-Week 4 (Provect-CH4 at 20 mg/L)	73	108	6.3	-296	1220
Reactor 2					
Startup-Week 1	79	72	6.2	-285	1244
Startup-Week 2	75	83	6.2	-298	1265
Test-Week 3 (Provect-CH4 at 40 mg/L)	82	62	6.1	-306	1263
Test-Week 4	72	97	6.4	-287	1247

Prima dell'aggiunta di **Provect-CH4**, le concentrazioni di metano variavano tra circa 55% e 70% (**Tabella 2**), ad indicare una coltura metanogena attiva. Successivamente all'aggiunta di 40 mg/L di **Provect-CH4** nel reattore 2 il contenuto di metano nel biogas è stato rapidamente ridotto dal 62% al di sotto dei limiti di rilevabilità (0,05%) dopo 11 giorni (**Figura 3**). Con una sola aggiunta di **Provect-CH4** al sistema chiuso la concentrazione di metano è rimasta al di sotto dei limiti di rilevabilità fino al giorno 17, quando il reattore è stato smantellato. L'aggiunta di 20 mg/L di **Provect-CH4** nel reattore 1 al giorno 7 ha ridotto il contenuto di metano nel biogas dal 65% al di sotto dei limiti di rilevabilità (0,05%) al giorno 17 (dopo 10 giorni). Durante il periodo di prova, il volume totale di biogas prodotto in ogni reattore non è cambiato in modo apprezzabile (Tabella 1), ma solo la concentrazione di metano nel biogas (il gas conteneva soprattutto CO₂).

Tabella 2. Concentrazioni di metano (%) nel biogas durante i 17 giorni di test (dopo aver dosato l'inibitore di metano)

Activity	Time (days)	Reactor 1 Methane (%)	Reactor 2 Methane (%)
Reactor 2 dosed with Provect-CH4 at 40 mg/L	0	57	62 (+ Provect CH4)
	2	61	47
	4	68	32
	6	59	20
Reactor 1 dosed with Provect-CH4 at 20 mg/L	7	65 (+ Provect CH4)	13
	9	51	6
	11	31	0
	13	22	0
	15	8	0
	17	0	0

Figura 3. Andamento delle concentrazioni di metano nel tempo (dati della Tabella 2)



CONCLUSIONI:

Questi studi hanno dimostrato che in un sistema chiuso e controllato, l'aggiunta di almeno 20 ppm di **Provect-CH4** ha fermato in modo efficace la produzione di metano in una coltura metanogena attiva. In un ambiente acquifero, è generalmente raccomandato un dosaggio obiettivo di 50 ppm: studi di trattabilità sito specifici possono essere condotti per aiutare a validare la potenziale efficacia e ottimizzare le specifiche di progetto.

CARATTERISTICHE PRINCIPALI:

Provect-CH4 è l'unico integratore per ERD/ISCR in grado di migliorare rapidamente le prestazioni di bonifica e contemporaneamente prevenire o minimizzare in modo significativo la produzione di metano. I vantaggi sono notevoli:

- ◆ **Più efficiente = Più conveniente:** La produzione di metano è un'indicazione diretta che l'idrogeno generato dagli ammendanti a base di carbonio organico è stato utilizzato dai metanogeni e il reagente è stato sprecato perchè non è stato utilizzato dagli acetogeni o dalla dealoespirazione. Inibendo la crescita e proliferazione degli Archea produttori di metano, i batteri clororespiratori possono diventare la popolazione di batteri dominante.
- ◆ **Più sicuro:** Il metano è esplosivo con un LEL del 5% ed un UEL del 15%. La produzione di metano risulterà dall'aggiunta di un qualsiasi ammendante tradizionale per ERD o ISCR: una produzione eccessiva o prolungata di metano può provocare un aumento delle concentrazioni nelle acque sotterranee (sono state riportate concentrazioni fino a 1.000 ppm) che può portare ad un accumulo nei gas interstiziali e in un successivo impatto dell'aria indoor. Negli USA sono stati promulgati regolamenti statali specifici per il metano nelle acque sotterranee, altri sono in emanazione per i gas interstiziali e l'aria indoor.

- ◆ **Facile da utilizzare:** Ecologico e sostenibile. Tutti i componenti integrati in un'unica confezione. Logistica senza sorprese.
- ◆ **Tecnologie brevettate:** Gli utilizzatori finali della tecnologia e i loro clienti sono pienamente protetti da ogni brevetto e altre questioni legali.

ESEMPIO DI APPLICAZIONE (50 ppm di Provect-CH4 nelle acque sotterranee):

Dimensione della zona di trattamento

Larghezza della zona di trattamento (perpend. al flusso di falda)	46	m
Lunghezza della zona di trattamento (parallela al flusso di falda)	38	m
Profondità del top della zona di trattamento	3	m
Profondità del bottom della zona di trattamento	6	m
Spessore della zona di trattamento	3	m
Volume calcolato	5.245	m3

Calcoli dell'inibitore di metano

Porosità stimata	35	%
Liquido impattato calcolato	1.835	m3
Inibitore di metano per il progetto	ARROTONDATO 204.8	lbs (92 kg) A 25 lb

* **CONTATTACI PER INFORMAZIONI** (techsupport@baw-env.it)

BIBLIOGRAFIA:

Alberts, A., J. Chen, G. Kuron, V. Hunt, J. Huff, C. Hoffman, J. Rothrock, M. Lopez, H. Joshua, an E. Harris; 1980. Mevinolin: a Highly Potent Competitive Inhibitor of Hydroxymethylglutaryl-coenzyme A Reductase and a Cholesterol-Lowering Agent. Proceedings of the National Acadaemy of Sciences of the United States of America 77:3957-3961.

Brown, R., J. Mueller, A. Seech, J. Henderson and J. Wilson. 2009. Interactions between Biological and Abiotic Pathways in the Reduction of Chlorinated Solvents. Remediation Journal Winter 2009, pages 9-20.

Henderson, G., G.E. Naylor, S.C. Leahy and P.H. Janssen. 2010. Presence of novel, potentially homoacetogenic bacteria in the rumen as determined by the analysis of formyltetrahydrofolate synthetase sequences from ruminants. Appl. Environ. Microbiol. 76:2058-2066.

Miller, T.L. and M.J. Wolin. 2001. Inhibition of growth of Methane-Producing Bacteria of the Rumen Forestomach by HydroxymethylglutarylISCoA Reductase Inhibitors. J. Dairy Sci. 84:1445-1448.

Scalzi, M. and A. Karachalios. 2013 and 2014. Inhibition of Methane Production during Anaerobic Reductive Dechlorination. US PTO 13/ 785,840 and CIP 14/268,637.

Schauder, R., B. Eikmanns, R.K. Thauer, F. Widdel and G. Fuchs. 1986. Acetate Oxidation to CO₂ in Anaerobic Bacteria via a Novel Pathway not Involving Reactions of the Citric Acid Cycle. Arch. Microbiol. 145:162-172.

Woese, C.R. and G.E. Fox. 1977. Phylogenetic Structure of the Prokaryotic Domain: the Primary Kingdoms. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **74** (11): 5088–5090.

CONTATTACI PER UNA VALUTAZIONE GRATUITA

BAW s.r.l.

Via Galimberti, 50 – 12030 Manta (CN)

Tel: 0175 - 86642 | Fax: 0175 - 571028 | techsupport@baw-env.it



PROVECTUS ENVIRONMENTAL PRODUCTS, INC.

2871 West Forest Road, Suite 2 | Freeport, IL 61032

Tel: (815) 650-2230 | Fax: (815) 650-2232 | Info@Provectusenv.com

Multiple remedial contracting options available via strategic providers

Turn-Key, Risk-Reward, Pay-for Performance, Remedial Guarantees/Warranties