

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BOLOGNA**

---

**FACOLTA' DI INGEGNERIA**

**Corso di Laurea Specialistica in Ingegneria per l'Ambiente e il Territorio**

**Materia di Tesi: Microbiologia e biotecnologia ambientali LS**

**PROCESSO BIOTECNOLOGICO A CELLULE  
IMMOBILIZZATE PER LA PRODUZIONE DI ACIDI  
GRASSI VOLATILI DA ACQUE DI VEGETAZIONE**

**Tesi di Laurea di:**

**CRISTINA VITULLI**

**Relatore:**

**Prof. FABIO FAVA**

**Correlatori:**

**Dott. Ing. LORENZO BERTIN**

**Dott. Ing. DANIELA TODARO**

**Prof. LEONARDO MARCHETTI**

---

**Anno Accademico 2006-2007**

**Sessione I**

# INDICE

<b>1.</b>	<b>INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Produzione e smaltimento dei rifiuti plastici</b>	<b>1</b>
1.2	<b>Biopolimeri</b>	<b>3</b>
1.2.1	Biodegradabilità dei materiali polimerici	5
1.2.2	Poliidrossialcanoati (PHAs)	8
1.2.2.1	Produzione dei PHAs	14
1.2.3	Normativa	19
1.3	<b>Acque di vegetazione: produzione, caratteristiche, impatto ambientale</b>	<b>20</b>
1.3.1	Produzione delle acque di vegetazione	20
1.3.2	Processi produttivi	22
1.3.3	Tossicità e impatto ambientale delle AV	25
1.3.4	Normativa	27
1.4	<b>Trattamenti depurativi delle acque di vegetazione</b>	<b>30</b>
1.4.1	Trattamenti biologici	31
1.5	<b>Valorizzazione delle AV mediante trattamenti biotecnologici</b>	<b>32</b>
1.5.1	Trattamento anaerobico per il recupero di biogas	33
1.5.2	Trattamento anaerobico per la produzione di acidi grassi volatili	36
1.6	<b>Bioreattori per il trattamento delle AV</b>	<b>37</b>
1.6.1	Bioreattori aerobici e anaerobici	37
1.6.2	Bioreattori a cellule sospese e a cellule immobilizzate	39
<b>2.</b>	<b>SCOPO DELLA TESI</b>	<b>43</b>
2.1	<b>Valorizzazione delle acque di vegetazione</b>	<b>43</b>
2.2	<b>Produzione di PHA da substrati ricchi di VFA</b>	<b>43</b>
2.3	<b>Fasi del processo di produzione di PHA a partire da AV</b>	<b>44</b>
2.4	<b>Obiettivo del presente lavoro</b>	<b>45</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>47</b>
3.1	<b>Materiali impiegati</b>	<b>47</b>
3.1.1	Prodotti e materiali impiegati	47

3.1.2	AV impiegate nel corso della sperimentazione	48
<b>3.2</b>	<b>Apparato sperimentale</b>	<b>50</b>
3.2.1	Supporti utilizzati per l'immobilizzazione cellulare	50
3.2.2	Descrizione e allestimento dei reattori	52
<b>3.3</b>	<b>Modalità di esecuzione delle prove</b>	<b>58</b>
<b>3.4</b>	<b>Metodi analitici</b>	<b>62</b>
3.4.1	Misura del volume di biogas prodotto	62
3.4.2	Analisi della composizione di biogas prodotto	63
3.4.3	Analisi della concentrazione di acidi grassi volatili	65
3.4.4	Analisi della richiesta chimica di ossigeno (COD)	67
3.4.5	Misura della concentrazione di fenoli	68
<b>4.</b>	<b>RISULTATI</b>	<b>71</b>
<b>4.1</b>	<b>Primo esperimento (E35)</b>	<b>71</b>
4.1.1	Produzione di VFA	73
4.1.2	COD	79
4.1.3	Produzione di biogas	81
4.1.4	Fenoli	84
<b>4.2</b>	<b>Secondo esperimento (E25)</b>	<b>85</b>
4.2.1	Produzione di VFA	86
4.2.2	COD	92
4.2.3	Produzione di biogas	94
4.2.4	Fenoli	97
<b>5.</b>	<b>DISCUSSIONE</b>	<b>100</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONI</b>	<b>106</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>107</b>
<b>8.</b>	<b>RINGRAZIAMENTI</b>	<b>111</b>

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Produzione e smaltimento dei rifiuti plastici

Il mercato delle plastiche derivate dal petrolio è sempre più consistente; ormai in Europa supera i 40 milioni di tonnellate annue e, nei Paesi ad economia avanzata, circa un quarto dei rifiuti è costituito da materiali polimerici. In tali Paesi si è registrato un consumo di plastica pro-capite intorno a un valore di 10 kg/anno, con la previsione di raggiungere i 100 kg/anno entro fine secolo. Negli ultimi decenni quindi l'utilizzo delle materie plastiche è giunto ad un livello tale da rendere urgente la soluzione del loro smaltimento che avviene attualmente per incenerimento, stoccaggio in discariche, riciclaggio o biodegradazione.

La combustione della maggior parte dei polimeri non causa molti problemi di inquinamento da fumi e presenta il vantaggio di fornire notevoli quantitativi di energia. Si possono verificare però emissioni tossiche se nelle ceneri si depositano quantità non trascurabili di metalli pesanti o ci può essere produzione di diossine nel caso in cui tra i polimeri di rifiuto vi siano materiali clorurati, come il PVC. La formazione di diossine, sostanze altamente cancerogene, può essere evitata solo se la combustione viene condotta ad elevatissime temperature.

Per quanto riguarda lo stoccaggio della plastica nell'ultimo ventennio ci si è mossi decisamente verso una riduzione dell'uso di discariche, nonostante attualmente siano progettate in modo da interrare in maniera sicura i rifiuti affinché le degradazioni incontrollate non vadano ad inquinare le acque del sottosuolo. Disporre i rifiuti in discarica viene sempre più visto come uno spreco di risorse di valore: da qui la necessità di massimizzare la deviazione dei rifiuti dalla discarica verso altri flussi di riutilizzo.

I sistemi principali adottati per il riciclo sono: la rilavorazione e la depolimerizzazione. La rilavorazione comprende il riciclo primario, cioè lo

sminuzzamento o la macinazione dei materiali, ed il riciclo secondario, cioè la trasformazione in un prodotto secondario. Un esempio di riciclo è rappresentato dal PET utilizzato per i contenitori di bevande, che può essere recuperato per ottenere pannelli isolanti. L'altra alternativa per il riciclo è costituita dal cosiddetto riciclo terziario, che consiste in un trattamento chimico o termico delle plastiche di riciclo, per ottenere monomeri che possono essere reimpiegati per produrre resine vergini. Questa strategia è adatta per i polimeri di condensazione, come poliesteri, poliammidi, e poliuretani. Attualmente, le plastiche destinate al riciclaggio rappresentano circa il 4,1% di tutti i rifiuti plastici prodotti in Europa, cioè risultano pari a 2,2 milioni di tonnellate su un totale di 50 milioni di tonnellate annue. Le percentuali relative al vetro, alla carta, all'acciaio, e all'alluminio sono invece rispettivamente del 20, 30, 15 e 40 %. Questa situazione è dovuta principalmente ai maggiori costi delle operazioni di raccolta, di cernita e di rilavorazione delle materie plastiche.

Infine la biodegradazione degli oggetti in plastica tradizionali è lentissima; essi riescono ad essere assorbiti in natura dopo lunghi periodi di tempo: una busta di plastica lasciata galleggiare nel mare resiste all'attacco di qualsiasi batterio per secoli, una bottiglia di plastica necessita di 400 anni per decomporsi.

Un'altra interessante alternativa alla soluzione dello smaltimento dei rifiuti in plastica è la produzione di materiali polimerici a limitato impatto ambientale a fine vita, cioè biodegradabili. Le plastiche biodegradabili possono infatti rappresentare una soluzione ai sempre più onerosi, sia in termini economici che ambientali, problemi di smaltimento post consumo. La bioplastica si dissolve senza lasciare residui inquinanti e in base alla composizione chimica la sua completa degradazione può necessitare da pochi giorni a 4-5 anni.

## 1.2 Biopolimeri

Già dagli anni '70, in seguito alla crisi petrolifera e al sempre più marcato problema di inquinamento iniziò ad esserci un forte interesse per polimeri in grado di sostituire quelli di origine petrolchimica senza causare problemi ecologici dovuti al loro smaltimento, cioè per i polimeri biodegradabili o biopolimeri.

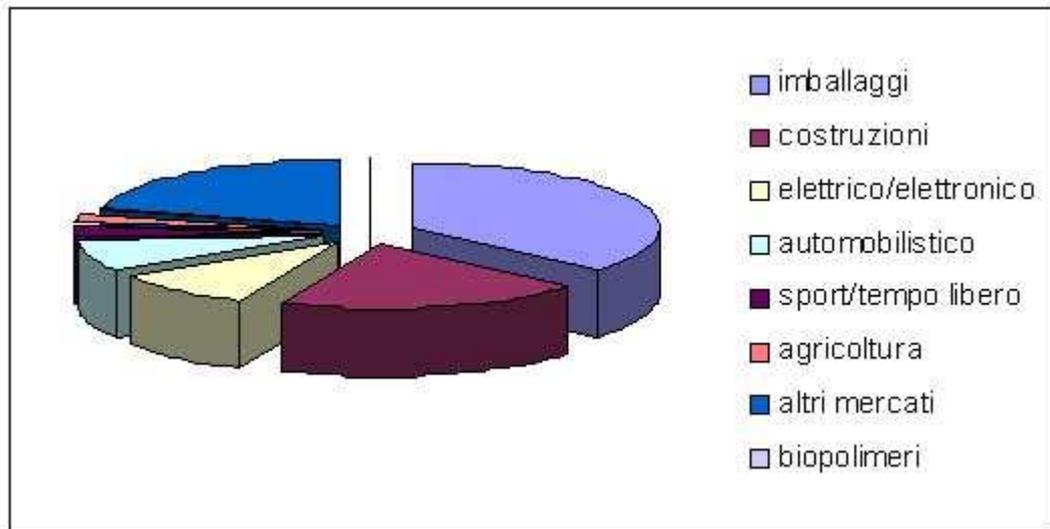
La definizione di polimeri biodegradabili recita: “polimeri progettati per andare incontro a cambiamenti di struttura chimica, ad opera di organismi viventi come batteri, funghi, alghe, che hanno come risultato la perdita di alcune proprietà”[2].

I biopolimeri o bioplastiche (BP) sono polimeri caratterizzati da un'elevata biodegradabilità. Possono essere di origine sintetica, come ad esempio i derivati di alcuni poliesteri, prodotti da alcune polietereammidi, da alcol polivinilico oppure derivati da materiali di origine vegetale e quindi rinnovabili come l'amido e le miscele di amido e l'acido polilattico (PLA) derivato da zuccheri, la cellulosa o la lignina, i polidrossialcanoati (PHA) e altri. L'amido ed il destrosio finora utilizzati per la produzione delle maggiori quantità di BP provengono da mais alimentare e sono reperiti secondo le disponibilità e i prezzi del mercato internazionale.

Di grande interesse ambientale sono le sperimentazioni per produrre BP da materiali di scarto, come ad esempio quelli derivanti dall'industria agroalimentare, ma anche da alghe, stoppie di mais o da raccolta differenziata della frazione organica dei rifiuti urbani [1].

Rispetto al vasto mercato delle plastiche derivate dal petrolio i BP hanno un mercato di circa 40.000 t/anno, incentrato principalmente sul consumo di imballaggi. Quindi le potenzialità di crescita del settore sono molto elevate: la previsione è che in Europa saranno utilizzate fino ad un milione di tonnellate nel 2010 e fino a 5 milioni nel 2020 [29].

Figura 1.2.1: suddivisione del consumo di plastiche in Europa in 15 paesi nel 2003, i biopolimeri rappresentano meno dello 0.1%. Fonte:IBAW [1]



Fra i polimeri biodegradabili figurano: i polimeri a base di amido, i polilattidi, i polilattoni (fondamentalmente come componenti dei polimeri a base di amido), i poliesteri alifatici/aromatici di policondensazione di un biacido con un bialcool e i poliidrossialcanoati.

Finora praticamente non esistono ancora colture dedicate alla produzione di BP poichè la materia prima viene spesso reperita al prezzo più basso e non sulla base di pluriennali accordi di filiera agro-industriale. La concorrenza a livello di prezzi con il mercato delle plastiche risulta infatti molto difficile essendo il settore delle plastiche derivanti dal petrolio già ampiamente collaudato ed affermato ed operando ad un livello di economia di scala.

Diversi studi del ciclo di vita dei prodotti (LCA) dimostrano però che l'utilizzo di BP determina notevoli benefici ambientali, sia in termini di energia consumata che in termini di risparmio di CO<sub>2</sub>, quindi ci sono tutti i presupposti per rendere i BP potenzialmente molto interessanti come sostituti delle materie plastiche tradizionali.

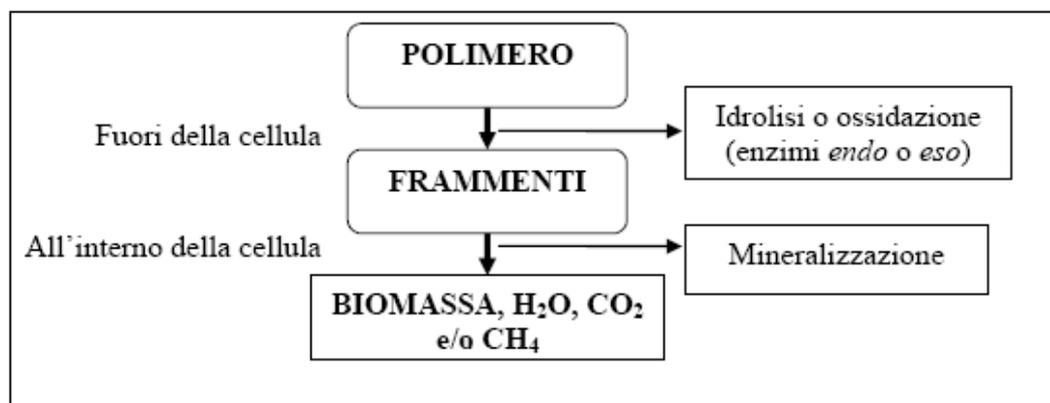
## 1.2.1 Biodegradabilità dei materiali polimerici

Parlare di biodegradabilità ha un senso se si stabilisce un tempo utile entro cui un prodotto deve biodegradarsi e un ambiente in cui questo processo deve avvenire. I tempi di biodegradazione devono essere il più possibile ristretti, esistono pertanto standard che indicano le condizioni (temporali e chimico-fisiche) della degradazione.

Quando i microrganismi provocano la biodegradazione di macromolecole per utilizzarne i frammenti come fonte di carbonio, i prodotti ultimi della biodegradazione sono essenzialmente biomassa, acqua, anidride carbonica e, nel caso di microrganismi anaerobici, metano.

E' noto che, a livello biologico, le macromolecole naturali sono degradate mediante reazioni di idrolisi ed ossidazione catalizzate da enzimi. Uno dei requisiti fondamentali perché un polimero possa subire processi di biodegradazione è che in catena principale siano presenti legami chimici idrolizzabili o ossidabili []. Il processo di biodegradazione può essere schematizzato come mostrato in figura.

Figura 2.1.1.1: processo di biodegradazione del polimero



Per evitare i problemi ambientali causati dalla degradazione dei poliesteri è essenziale studiare la capacità di degradazione dei polimeri da parte dell'ambiente, gli effetti dei prodotti ottenuti e il ruolo dei microrganismi ambientali. Per quest'ultimo settore sono necessari studi ecologici e

tassonomici che permettano di stimare il numero e le caratteristiche dei microrganismi in un determinato ambiente per ottenere la decomposizione di materiali plastici. Tale stima è molto importante poiché la degradabilità delle plastiche dipende dai microrganismi, in grado di degradare, disponibili nell'ambiente. Uno dei metodi più efficaci per valutare la presenza nell'ambiente di microrganismi capaci di degradare i polimeri è il metodo della “*Clear-zone*”, mentre per la loro identificazione e caratterizzazione si eseguono studi filogenetici che si basano sull'analisi della sequenza del 16S rRNA. Il metodo “*Clear-zone*” consiste nel porre a contatto i microrganismi da testare con film polimerici: la formazione di zone limpide attorno alle colonie indica che il polimero è stato idrolizzato dagli enzimi microbici e che si sono ottenuti prodotti solubili. La biodegradazione inizia quando il microrganismo comincia a crescere sulla superficie del film e secerne enzimi che riducono il polimero in monomeri. Con questi test è stato stimato che i microrganismi in grado di degradare i PHB (polidrossibutirrato) sono lo 0,5-9,6% delle colonie totali presenti nell'ambiente, mentre dagli studi filogenetici è risultato che i microrganismi che degradano i PHB sono distribuiti nelle famiglie delle *Pseudonocardiaceae*, *Thermonosporaceae*, *Treptosporangiaceae* e *Streptomycetaceae*. La maggior parte di essi sono in grado di degradare i PHB a temperatura ambiente o a temperature mesofile, solo pochi necessitano di alte temperature [2].

In generale le caratteristiche chimiche e fisiche dei poliesteri hanno un importante effetto sulla biodegradabilità:

- un basso peso molecolare favorisce la biodegradabilità;
- una alta temperatura di fusione ( $T_m$ ) riduce la degradazione enzimatica.

La prima fase della biodegradazione avviene esternamente alla cellula, per via dell'alto peso molecolare e dell'insolubilità caratteristica della maggiore parte dei polimeri in mezzi acquosi. Gli enzimi che catalizzano il primo stadio (idrolisi o ossidazione) sono enzimi extracellulari, che possono operare mediante un meccanismo *endo* (attacco a legami “interni” della catena principale) o *eso* (attacco ad un terminale della catena e distacco

sequenziale delle unità terminali). La seconda fase del processo di biodegradazione (mineralizzazione) prevede il trasporto all'interno della cellula dei frammenti di macromolecola ottenuti nella prima fase, che vengono metabolizzati dal microrganismo.

Oltre alla presenza di legami labili nella catena principale del polimero, ci sono altri requisiti perché la catalisi enzimatica possa avvenire: il polimero, infatti, deve poter assumere una conformazione tale da garantire l'incastro, secondo una geometria ben definita, del tratto di catena contenente il legame labile entro il sito attivo dell'enzima. Ciò richiede una certa libertà conformazionale della macromolecola ed è per questo motivo che, a parità degli altri parametri, i poliesteri alifatici, ad esempio, biodegradano con facilità, mentre quelli aromatici (molto più rigidi) non mostrano velocità di biodegradazione apprezzabile. Altri parametri importanti sono il grado e il tipo di ramificazioni, la cui presenza può richiedere l'intervento di enzimi aggiuntivi specifici rispetto alla struttura chimica della catena laterale o al legame di innesto di questa ultima sulla catena principale. Anche il grado di idrofobia della macromolecola è un fattore significativo, che può condizionare l'azione enzimatica con notevoli ripercussioni sulla velocità del processo di biodegradazione. Oltre alla struttura chimica, un altro parametro che gioca un ruolo fondamentale nel processo di biodegradazione è la morfologia del materiale polimerico puro, vale a dire il grado di cristallinità, la dimensione e la distribuzione dei domini cristallini. Per le miscele polimeriche, inoltre, il numero, la concentrazione e il grado di distribuzione delle fasi influenza molto l'efficacia dell'attacco enzimatico. In tabella sono mostrati i risultati riguardanti la biodegradabilità di omo e copolimeri misurata in ambienti diversi (aerobici e anaerobici) con metodologie diverse.

Tabella 2.1.1.2: Biodegradabilità di omo e copolimeri [2]

<i>Indice di biodegradabilità</i>	<i>Tempo richiesto</i>
100% perdita peso *	
- scarichi anaerobici	40-45 giorni
- scarichi aerobici	Circa 1 anno
- suolo (interramento)	circa 1,5 anni
80% perdita peso (compostaggio controllato) **	100 giorni
60% perdita peso (interramento) **	280 giorni
Sviluppo CO <sub>2</sub> anaerobico (80%)	30 giorni

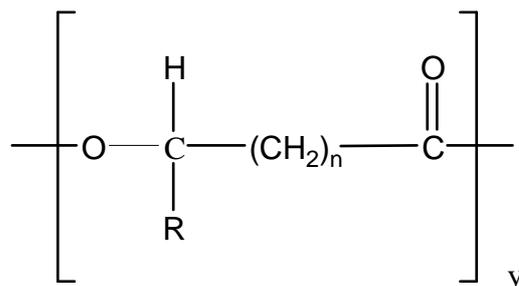
\* su provini di spessore 1 mm \*\* su pellicole sottili

## 1.2.2 I poliidrossialcanoati (PHAs)

I poliidrossialcanoati sono macromolecole, in particolare poliesteri termoplastici, sintetizzate da più di 90 generi di batteri Gram+ e Gram- (ad esempio Bacillus, Rhodococcus, Rhodospirillum, Pseudomonas, Alcaligenes/Ralstonia, Azotobacter, Rhizobium).

La struttura chimica generale dei PHAs è riportata di seguito:

Figura 2.1.2.1 : Struttura chimica generale dei PHAs



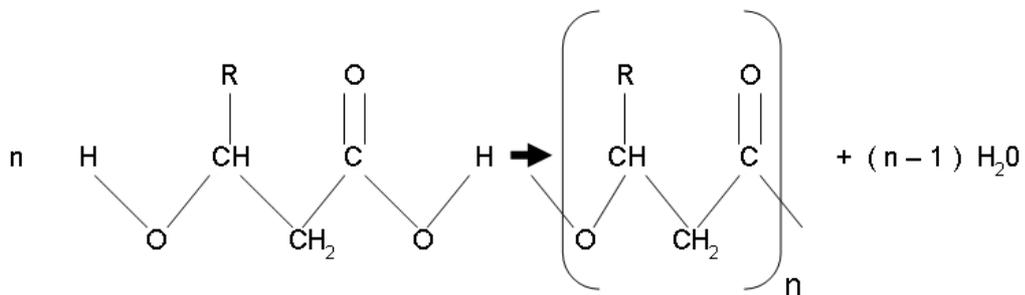
$$y=100-30.000$$

In condizioni di coltura appropriate, ed in particolare in carenza di qualche nutriente (ad esempio N, P, S), i poliidrossialcanoati si accumulano nei batteri che durante la loro crescita li utilizzano come fonte di carbonio di riserva o per ridurre il consumo di energia. I PHAs sono accumulati nelle cellule come granuli discreti, la cui dimensione e numero per cellula varia nelle diverse specie ed appaiono al microscopio elettronico come inclusioni rifrangenti. Possono arrivare fino ad una concentrazione del 90% del peso secco della massa batterica.

I principali tipi di poliidrossialcanoati finora identificati sono poliesteri lineari testa-coda.

La chiralità dei monomeri (solo eccezionalmente assente) dà origine a polimeri dotati di regolarità sterica. Lo schema sintetico di polimerizzazione è riportato in figura:

Figura 2.1.2.2: schema di polimerizzazione di PHAs [2]



Il gruppo laterale R in posizione (3) è un alchile con C=1÷13, che può essere lineare o ramificato, saturo o insaturo, epossidato, con sostituenti aromatici o alogenati.

I PHAs sono classificati in funzione del numero di atomi di carbonio che ne costituisce l'unità monomerica: i PHAscl (short-chain-length) sono costituiti da 3-5 atomi di C mentre i PHAmcl (medium-chain-length) da 6-15 atomi di C. Solo pochi batteri sono in grado di sintetizzare entrambi i tipi di PHAs. I PHAscl hanno un alto grado di cristallinità mentre i PHAmcl sono elastomeri a bassa cristallinità e bassa temperatura di fusione [2].

La composizione precisa dei poliidrossialcanoati dipende dal tipo di batterio da cui sono sintetizzati e dal mezzo di coltura.

Per la sintesi dei poliidrossialcanoati i diversi tipi di batteri utilizzano monomeri provenienti da percorsi metabolici diversi.

L'estrema variabilità della natura chimica delle catene laterali è alla base di una notevole varietà di proprietà dei poliidrossialcanoati (si va da polimeri tipicamente termoplastici, quale il poliidrossibutirrato, a gomme quale il poliidrossiottanoato) e di possibilità di interventi chimici secondari.

Una descrizione della struttura chimica dei principali poliidrossialcanoati prodotti in natura è riassunta in tabella.

Tabella 2.1.2.1: Struttura chimica dei principali PHAs prodotti in natura [2]

	<i>n=1</i>	<i>n=2</i>	<i>n=3</i>	<i>n=4</i>
R=H	poli (3-idrossipropionato)	poli (4-idrossibutirrato)	poli (5-idrossivalerato)	
R=CH <sub>3</sub>	poli (3-idrossibutirrato)	poli (4-idrossivalerato)	poli (5-idrossiesanoato)	
R=C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	poli (3-idrossivalerato)			
R=C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	poli (3-idrossiesanoato)			
R=C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	poli (3-idrossiottanoato)			
R=C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>				poli (6-idrossidodecanoato)
R=C <sub>9</sub> H <sub>19</sub>	poli (3-idrossidodecanoato)			

n = numero di CH<sub>2</sub> nella catena lineare

I PHAs possiedono proprietà comparabili alle plastiche convenzionali ed il vantaggio di essere biodegradati molto facilmente sia in condizioni aerobie sia anaerobie.

Poiché è possibile variare le proprietà chimiche e fisiche dei poliesteri microbici cambiando esclusivamente la fonte di carbonio alle colture dei microrganismi che li producono, i PHAs risultano di notevole interesse per la produzione industriale (es: variando la fonte di carbonio ad *Alcaligenes*

*eutrophus* si può ottenere un copolimero più flessibile e con inferiore cristallinità), soprattutto nel settore dei biomateriali.

Il peso molecolare dei polimeri è compreso tra i  $2 \cdot 10^5$  e  $3 \cdot 10^6$  daltons e dipende dal tipo di microrganismo e dalle condizioni di crescita.

Uno dei PHAs più presenti in natura e maggiormente studiato sia dal punto di vista dei meccanismi di sintesi biologica sia da quello delle proprietà e impieghi è il poliidrossibutirrato (PHB).

Il poliidrossibutirrato estratto con cloroformio da colture batteriche cresciute su carboidrati è stato accuratamente caratterizzato sia sotto il profilo chimico-fisico, sia sotto il profilo delle proprietà meccaniche e di lavorabilità. Si tratta di un polimero termoplastico, isotattico, ortorombico, ad elevata cristallinità, otticamente attivo, con una massa molecolare di circa  $0,5 \cdot 10^6$  Da. La cristallinità del polimero, così come sintetizzato dai batteri, è inferiore a quella che si misura dopo estrazione. È stata in proposito avanzata l'ipotesi che nel contesto batterico le molecole polimeriche siano allo stato plastificato ad opera di fluidi cellulari o si trovino in equilibrio tra due forme: la forma chetonica e la forma enolica.

Il batterio *A. eutrophus* sintetizza i PHB da acetil-CoA grazie all'azione di tre enzimi. Il primo enzima, 3-chetotiolasi, catalizza la condensazione di due molecole di acetil-CoA a acetoacetil-CoA. Successivamente l'enzima acetoacetil-CoA reduttasi riduce l'acetoacetil-CoA a R(-)-3-idrossibutiril-CoA. Infine la PHA sintetasi polimerizza l' R(-)-3-idrossibutiril-CoA per ottenere i PHB. *A. eutrophus* è in grado di accumulare PHB fino all'80% del suo peso secco quando viene coltivato in terreni contenenti un eccesso di carbonio (ad esempio glucosio) e in mancanza di un nutriente essenziale (ad esempio azoto o fosfati).

I PHB presentano caratteristiche comparabili alle plastiche convenzionali (più precisamente i PHB sono simili al polipropilene) e per questo sono dei buoni candidati per la loro sostituzione.

Ma il più promettente candidato per la sostituzione delle plastiche derivanti dal petrolio è il copolimero 3-idrossibutirrato/3-idrossivalerato [P(HB)/HV],

chiamato commercialmente BIOPOL perché le sue proprietà fisico-meccaniche e di lavorabilità sono le più adatte a soddisfare le esigenze applicative pratiche. Tale materiale gode infatti di una notevole resistenza agli impatti e di un'alta flessibilità, data dalla presenza di HV nelle catene polimeriche. Le sue proprietà chimiche e termiche sono fortemente influenzate dalla frazione di HV presente: la temperatura di fusione decresce in modo significativo con l'aumentare della frazione dell'HV nel copolimero mentre la temperatura di degradazione non viene alterata e ciò riduce notevolmente il problema della fragilità e della lavorabilità. Le proprietà meccaniche sono strettamente correlate con il peso molecolare medio del polimero, in particolare la resistenza aumenta all'aumentare della lunghezza delle catene e quindi del peso molecolare.

L'introduzione di unità monometriche a lunga catena, diverse dall'HV, tende a diminuire la cristallinità del polimero e le temperature di transizione; ciò consente di mettere sul mercato prodotti adatti alle varie esigenze.

Il P(HB)/HV, è stato scoperto e sviluppato dall'ICI negli anni '80; della sua produzione se n'è in seguito occupata Zeneca e più tardi Monsanto che nel 2001 ha venduto tutta la sua produzione alla Metabolix [3].

In tabella sono confrontate le proprietà fisico-meccaniche dell'omopolimero PHB, del copolimero PHB/PHV e del polipropilene PP.

Tabella 2.1.2.2: Proprietà fisico meccaniche di PHB, PHB/PHV e PP [2]

	<b>PHB</b>	<b>PHB/HV<sub>20%</sub></b>	<b>PP</b>
Densità (g/cm <sup>3</sup> )	-	1,25	0,90
T transizione vetrosa (°C)	+ 15	-1	-10
T fusione (°C)	175	145	176
Cristallinità (%)	80	42	70
Resistenza a trazione (Mpa)	40	30	38
Allungamento a rottura (%)	8	50	40
Resistenza a flessione (Gpa)	3,5	1,0	-
Resistenza all'urto (J/m)	60	300	100
Costante dielettrica a 1 MHz	3	3	-
Resistività (ohm-cm)	≥ 10 <sup>16</sup>	≥ 10 <sup>16</sup>	≥ 10 <sup>16</sup>
T superiore di impiego (°C)	130	99	135
<i>Resistenza chimica*</i>			
Acidi	1	1	4
Alcali	1	1	4
Alcoli	2	2	4
Oli e grassi	3	3	2/3
Resistenza agli UV*	2	2	1

PHB- poliidrossibutirrato;

PHB/HV- copolimero poliidrossibutirrato/idrossivalerato;

PP- polipropilene

\* 1- scarsa; 2-discreta; 3- buona; 4-ottima;

Come risulta dalla tabella, il poliidrossibutirrato è per molti aspetti simile al polipropilene, ma a differenza di questo ha una temperatura di transizione vetrosa (T<sub>g</sub>) troppo elevata e una resistenza all'urto troppo bassa. Inoltre, la temperatura di fusione è molto vicina a quella di degradazione, il che rende problematica, se non impossibile, la lavorazione con le tecniche convenzionali in uso per i polimeri termoplastici.

### 1.2.2.1 Produzione dei PHAs

Ciò che ha inibito la produzione di PHAs è sempre stato l'alto costo di produzione. Infatti attualmente la produzione industriale di PHAs è basata su colture pure di specifici microrganismi, chiamati *Ralstonia eutropha* in un processo a due stadi: nel 1° stadio la biomassa è fatta crescere e proliferare in un ambiente ricco di nutrienti e sorgenti di carbonio e si ha una piccola produzione di PHAs; nel 2° stadio un nutriente essenziale (come N o P) diventa limitante (limitazione trofica esterna) e si accumulano PHAs; un'alternativa al 2° stadio potrebbe essere una limitazione metabolica esterna, in questo caso un gruppo ristretto di microrganismi riuscirebbe a sintetizzare molti PHAs anche durante la loro fase di crescita, cioè durante il 1° stadio. In tutti i casi la composizione del polimero accumulato dipende dalla natura della sorgente di carbonio aggiunta nel mezzo di crescita.

Un'attraente alternativa alle colture microbiche pure per la produzione di PHAs potrebbe essere rappresentata dalle colture miste il cui utilizzo offre molti vantaggi primo tra tutti il notevole risparmio, (4 euro/Kg a fronte di 8 euro/Kg) dovuto al minor costo del substrato (85 % in meno) e degli investimenti (50 % in meno). Inoltre il processo permette anche lo smaltimento di rifiuti organici e può essere eseguito più facilmente non essendoci rischio di contaminazione di colture pure.

L'impatto ambientale provocato dall'uso di colture miste può essere confrontato con quello causato dalle colture pure, come mostra la seguente tabella [6].

Tabella 1.2.2.1.1: Confronto tra l'impatto ambientale causato dalla produzione di polipropilene e di PHA con colture pure o miste [5]

	<b>PHA con colture miste [kg/ton]</b>	<b>PHA con colture pure [kg/ton]</b>	<b>Polipropilene [kg/ton]</b>
<i>Composti clorurati</i>	<20	119	0.24
<i>Metalli pesanti</i>	0	0.7	5.77
<i>Composti azotati nelle acque</i>	<10	364	0.4
<i>Altre emissioni nelle acque</i>	5.24	5.24	0.9
<i>CO<sub>2</sub> nell'aria</i>	< 3000	8920	4257
<i>Energia consumata</i>	39	99.7	6.2

Ovviamente si può notare che l'impatto ambientale del processo basato su colture miste è molto più basso di quello basato su colture pure, ed è confrontabile con quello della produzione di polipropilene. Il principale problema ambientale però per la produzione di polipropilene consiste nel fatto che è basata su una risorsa non rinnovabile e che il prodotto finale non è biodegradabile e quindi si accumula nell'ambiente.

L'unico svantaggio che comporta l'uso delle colture miste è dato dallo scarso consumo di substrato e dalla bassa velocità di deposito di PHAs rispetto ai valori ottenuti con le colture pure. Questo può essere dovuto al basso valore di carico organico e di COD e dal fatto che solo una frazione di microrganismi presenti nei fanghi attivi riesce a immagazzinare PHAs. Un modo per aumentare la velocità di produzione di PHAs potrebbe essere l'arricchimento di tale frazione di microrganismi con carico organico o sorgenti di carbonio appropriate [4].

Un tipo di colture miste può essere quello associato ai fanghi attivi derivanti dalle acque di vegetazione.

Un recente ricerca, Dionisi *et al.* [7], si è proposta proprio lo scopo di sviluppare un processo integrato anerobico-aerobico per produrre polimeri biodegradabili (poliidrossialcanoati) a partire da acidi grassi volatili (VFA), ottenuti dall'acidogenesi di acque di vegetazione da scarti di frantoio quindi utilizzando una materia prima economicamente vantaggiosa. Il processo proposto si avvale di tre fasi: 1) fermentazione acidogenica delle acque di vegetazione al fine di ottenere un effluente ad alta concentrazione di acidi organici volatili; 2) processo aerobico a fanghi attivi in cui l'effluente precedentemente ottenuto viene sottoposto a cicli di *feast* (alta disponibilità di substrato) e *famine* (carenza di substrato) al fine di selezionare popolazioni microbiche aerobiche altamente in grado di incorporare gli acidi grassi volatili disponibili in poliidrossialcanoati durante la fase di *feast*; 3) trattamento aerobico in eccesso di substrato per ottenere alte quantità di poliidrossialcanoati dai batteri selezionati nella fase 2. Oggetto di studio di questa tesi sarà il primo punto, ossia l'ottimizzazione di un processo biotecnologico in grado di favorire la produzione di un effluente ricco in VFA.

Per selezionare i microrganismi per la produzione industriale di PHAs si considerano: la capacità delle cellule di utilizzare fonti di C economiche, la velocità di crescita, la produttività e la massima capacità di accumulo del polimero.

Per quanto riguarda l'estrazione di poliidrossialcanoati finora si è proceduto nei seguenti modi: per shock termico si blocca il processo biosintetico, provocando la lisi cellulare, si concentra la sospensione e si procede al recupero e purificazione del polimero per estrazione. Per la produzione del polimero commerciale Biopol, Ici aveva messo a punto un processo basato su una preventiva estrazione di lipidi e fosfolipidi mediante riflusso a caldo con metanolo. A questo stadio faceva seguito un'estrazione, sempre a caldo, con cloroformio o cloruro di metilene. La soluzione era poi sottoposta a filtrazione per eliminare i prodotti in sospensione e il polimero era precipitato per raffreddamento ed essiccato sotto vuoto. Successivamente,

allo scopo di ridurre i costi e la complessità del processo, sono stati utilizzati procedimenti di estrazione e di purificazione a base di tensioattivi ed enzimi.

Si ottiene in ogni caso un polimero sotto forma di polvere bianca, che è successivamente granulata per estrusione a caldo secondo la tecnologia tradizionale dei polimeri di sintesi petrolchimica. A seconda delle modalità di estrazione e purificazione impiegate si ottengono valori di peso molecolare e polidispersità diversi.

Altre ricerche hanno condotto alla produzione di PHAs da altri tipi di materiale di scarto come rifiuti ortofrutticoli e potature (VAM), amido di patate (AVEBE), inulina, barbabietole da zucchero (CSM), acque di rifiuto derivanti dalla lavorazione della birra e rifiuti organici domestici (OWF). I dati relativi a tali processi di trasformazione sono riportati in tabella [5].

Tabella 1.2.2.1.2: dati relativi a processi di produzione di PHA da vari tipi di materiale di scarto [5]

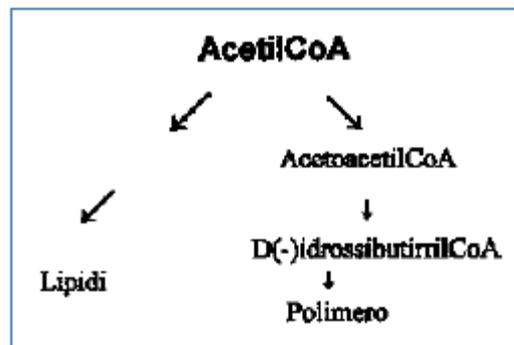
Sorgente di substrato	Portata [m <sup>3</sup> /h]	Disponibilità [mesi/anno]	COD [Kg <sub>COD</sub> /m <sup>3</sup> ]	Capacità [ton <sub>COD</sub> /m <sup>3</sup> ]	Produzione [ton <sub>PHA</sub> /anno]
AVEBE	300	12	2,5	6750	2431
Inulina	60	5	14,0	3066	1134
CSM	3750	3	1,9	15,604	5773
Rifiuti da birra	300	12	2,8	7358	2723
VAM	90	12	15	11,774	4356
OWF	30	12	50	13,333	4933

Come si evince dalla tabella il percolato derivante dalla frazione organica dei rifiuti domestici risulta essere il substrato più idoneo per la produzione di PHAs perché ha un'alta concentrazione di acidi grassi volatili, è disponibile in grande quantità e può essere trasportato facilmente. Infine il

contenuto di metalli pesanti può essere rimosso facilmente mediante precipitazione ed è quindi possibile il loro riciclo.

Un'altra alternativa alle colture pure è la produzione di PHAs ad opera delle piante coltivate mediante interventi di ingegneria genetica e metabolica. Fin dal 1992 si è pensato di inserire in esse i geni batterici dell'operone del poliidrossibutirrato per produrre polimeri biodegradabili su scala agronomica, utilizzando l'acetilCoA delle piante, sottratto quindi alla naturale produzione di lipidi, come schematizzato in figura:

Figura 1.2.2.1.1: Produzione di biopolimeri dall'AcetilCoA delle piante [2]



Tuttavia si è notato che le percentuali di polimero così ottenute erano molto basse ed era danneggiata la vitalità delle piante e la loro resa in semi. Si è pensato quindi a due possibili soluzioni: fare avvenire il processo di sintesi in un'area particolare della cellula vegetale, ricca di acetilCoA e capace di ospitare quantità rilevanti di materiali polimerici di riserva senza mostrare segni di malessere oppure realizzare la sintesi del polimero nei semi delle piante erbacee coltivate di uso commerciale come la colza e la soia, che garantivano un'ottima disponibilità della molecola base del processo, l'AcetilCoA. Quest'ultimo processo risulta particolarmente vantaggioso anche perché rende possibile l'estrazione del polimero contestualmente alle lavorazioni cui le piante erbacee vengono sottoposte per i loro utilizzi tradizionali. I risultati dei lavori condotti in Monsanto alla fine degli anni Novanta, mostrano in sintesi che è possibile accumulare polimero in semi maturi di colza transgenica fino a un livello dell'8% sul secco [2].

### ***1.2.3 Normativa***

Sotto gli auspici della *Basel Convention* (Convenzione di Basilea sull'esportazione di rifiuti pericolosi), sono state recentemente messe a punto linee guida per la protezione della salute umana e dell'ambiente dal trattamento o smaltimento impropri di rifiuti in materie plastiche.

Queste linee guida rispondono a crescenti preoccupazioni dovute dal fatto che molte nazioni in via di sviluppo mancano della necessaria legislazione e degli strumenti per affrontare la drammatica crescita quantitativa di questo tipo di rifiuti. In molti Paesi, le materie plastiche sono smaltite bruciandole all'aria aperta senza controllo o tramite discariche.

La plastica tradizionale è comunemente prodotta da derivati del settore della petrolchimica e, oltre a causare l'esaurimento delle riserve petrolifere, è soggetta a costi crescenti per l'approvvigionamento della materia prima.

Oltre al forte impatto ambientale delle materie plastiche è importante sottolineare anche l'elevato "costo sociale" del trattamento dei rifiuti in plastica. Una discarica implica lo stoccaggio di lunghi periodi, l'incenerimento della plastica comporta l'emissione di tossine, il riciclaggio, invece, ha costi molto elevati.

Dato l'alto impatto ambientale causato dai rifiuti plastici la Commissione Europea si è rivelata molto attenta al tema della tossicità degli imballaggi stabilendo limiti di cessione e i materiali utilizzabili, grazie alle Direttive 89/109/CEE, 94/62/CE e successive integrazioni.

Un primo passo effettuato in questa direzione dal nostro Paese riguarda il divieto di commercializzazione di bastoncini per la pulizia delle orecchie non biodegradabili (L.93/2001 art.19) ma la ben più rilevante iniziativa è stata la recente approvazione da parte dell'Aula della Camera di un emendamento che recepisce una normativa comunitaria: la EN13432, "Requisiti per imballaggi recuperabili mediante compostaggio e biodegradazione – schema di prova e criteri di valutazione per l'accettazione

finale degli imballaggi”. In Italia è stata adottata con la denominazione UNI EN 13432; essa fornisce presunzione di conformità con la Direttiva Europea 94/62 EC sugli imballaggi e rifiuti da imballaggi [12]. E in essa sono definite le caratteristiche che un materiale deve possedere per poter essere definito “compostabile” ed è un punto di riferimento per i produttori di materiali, le autorità pubbliche, i compostatori e i consumatori [11]. In particolare tale legge ritiene indispensabile, a partire dal 1° gennaio 2010, la sostituzione degli *shopper* in polietilene con sacchetti biodegradabili, che privilegino l’utilizzo di materie prime di origine agricola contribuendo così alla riduzione dei gas ad effetto serra e alimentando lo sviluppo di nuovi comparti industriali strettamente collegati alle produzioni agricole locali. Tale provvedimento porterà ad una consistente riduzione dell’impatto ambientale, se si tiene conto che nel nostro Paese si stima che attualmente vengano prodotte ogni anno circa 300.000 tonnellate di *shopper* di plastica, pari a 430.000 tonnellate di petrolio, con un’emissione di CO<sub>2</sub> in atmosfera di circa 200.000 tonnellate.

## **1.3 Acque di vegetazione: produzione, caratteristiche, impatto ambientale**

### ***1.3.1 Produzione delle acque di vegetazione***

Le acque di vegetazione (AV) costituiscono il refluo liquido proveniente dai processi di estrazione dell’olio di oliva. Tale estrazione rappresenta una delle più importanti industrie alimentari del Mediterraneo, anche da un punto di vista economico. Circa il 95% della produzione mondiale di olio di oliva proviene, ogni anno, dall’area mediterranea ed in particolare dall’Italia, dalla Spagna, dalla Grecia, dalla Tunisia, dal Libano, dalla Siria e dal Portogallo [15]. La quantità di AV prodotte in tale area risulta essere

circa 11 milioni di tonnellate di olive prodotte ogni anno e 1,7 milioni di tonnellate di olio estratto [8].

Insieme all'olio di oliva queste industrie producono sottoprodotti come acque di vegetazione e frammenti di olive i quali rappresentano un serio problema ambientale. Infatti tali rifiuti sono caratterizzati da un alto carico organico (80-300 g/l di COD) e da una bassa biodegradabilità dovuta al pH acido e alla presenza di composti fenolici e lipidici, ben conosciuti come tossici per i batteri [16], [17].

Si è stimato che ad ogni tonnellata di olio di oliva prodotto corrispondono circa 0,8 ton di acque di vegetazione [8]. I Paesi del Mediterraneo quindi sono responsabili della produzione di acque pari a circa 30 milioni di m<sup>3</sup> all'anno [18]. Si pensi che solo in Italia operano circa 6000 frantoi in grado di lavorare una quantità di olive pari, in media, a 3 milioni di tonnellate annue dalle quali si producono circa 530.000 tonnellate di olio di oliva e fino a 2,2 milioni di tonnellate di acque di vegetazione.

Il carico inquinante di tale quantità di refluo, dato dalla composizione chimica e dalle concentrazioni dei parametri analitici di maggiore rilievo, è stimabile complessivamente in 100 milioni di abitanti equivalenti. Si definisce abitante equivalente (a.e.) il carico organico giornaliero biodegradabile pari a 60 gBOD<sub>5</sub>/day. La sigla BOD<sub>5</sub> esprime la domanda biologica di ossigeno e cioè la quantità di ossigeno consumato durante un tempo determinato (5 giorni), a 20°C, per decomporre biologicamente le sostanze organiche contenute in un determinato volume di una definita matrice acquosa.

Gli stabilimenti presenti in Italia sono caratterizzati da dimensioni medio-piccole e da una dislocazione sul territorio frammentata. Ciò comporta una grande varietà di tipologie e collocazione degli impianti. Si osservano infatti frantoi situati in zone rurali o prive di collegamento, e frantoi collocati in centri urbani che non hanno la possibilità di installare vasche di accumulo per lo stoccaggio dei reflui o impianti per la loro depurazione.

### ***1.3.2 Processi produttivi***

Dal processo di lavorazione delle olive, finalizzato all'estrazione dell'olio, si ottengono dei reflui e dei sottoprodotti in quantità cospicue. Tali materiali prendono comunemente il nome di sanse e di acque di vegetazione.

La sansa è costituita da detriti macinati di buccia, polpa, nocciolo e mandorla dell'oliva e contiene una percentuale di olio pari mediamente al 5%. Essa comprende una parte molle (bucchiotta), buon mangime per il bestiame, e una parte legnosa (frattume), impiegabile come combustibile. Dalla sansa si estrae un olio combustibile (olio di sansa di olive, di qualità molto inferiore all'olio di oliva) per estrazione con solventi (esano più eptano) e successiva rettificazione. L'olio rettificato può essere utilizzato per la fabbricazione del sapone.

Le AV nascono dall'unione dall'acqua naturalmente contenuta nelle olive, che viene separata dall'olio, con quella aggiunta nel corso della lavorazione.

Mentre la sansa può essere vista come una fonte di reddito, le acque di vegetazione costituiscono un reflu; data la loro natura inquinante, risulta necessario provvedere allo smaltimento della quantità prodotta durante la campagna olearia. Esse, non potendo essere scaricate direttamente nell'ambiente, devono essere sottoposte a trattamenti che ne riducano il carico inquinante. Dal momento che le caratteristiche delle AV sono estremamente variabili, le valutazioni di impatto ambientale risultano di notevole complessità. Fra i fattori che influiscono maggiormente sulla qualità delle AV si annoverano il tipo di olive utilizzate, la pratica adottata per la loro raccolta (pelatura meccanica, scuotimento o raccolta da terra), il grado di maturazione raggiunto, le condizioni climatiche e le caratteristiche del ciclo produttivo.

Nel ciclo produttivo dell'olio di oliva si possono distinguere due fasi: una fase di preparazione della pasta di olive ed una di estrazione dell'olio.

Durante la prima fase, comune ai due tipi di processi, le olive vengono lavate e successivamente sottoposte a frangitura e a gramolatura.

Nella fase di frangitura la polpa ed i noccioli vengono lacerati a fondo attraverso le molazze o i moderni frangitori a martelli. Si ottiene così una pasta formata da polpa e nocciolo entrambi frantumati. Mentre nella tecnologia tradizionale si usano macine di granito, ovvero ruote che, girando su una lastra anch'essa di granito, schiacciano con il loro peso le olive, nel metodo moderno si utilizzano frangitori a martelli o a dischi rotanti, che frantumano velocemente le olive fino a quando la pasta ottenuta non fuoriesce dal frangitore attraverso una grata forata. Questi frangitori consentono di ottenere una pasta dalla consistenza più uniforme rispetto a quella che si ottiene con le macine tradizionali. Essi inoltre frantumano una quantità maggiore di olive nell'unità di tempo, ma poiché lacerano troppo in fretta la pasta delle olive, producono un aumento repentino della temperatura della pasta che provoca una alterazione delle caratteristiche organolettiche, inducendo i sapori amaro e piccante. Nel caso di utilizzo delle ruote di granito, lo svantaggio sta nella bassa produttività del processo.

Successivamente si attua l'operazione di gramolatura che consiste in un continuo e prolungato rimescolamento della pasta di olive proveniente dalla frangitura. Ciò favorisce l'unione delle goccioline d'olio in gocce sempre più grandi, tali che queste si separino più facilmente dalla parte solida nella fase seguente. Nel caso di utilizzo di frangitori meccanici, tale fase è indispensabile in quanto deve favorire la rottura delle emulsioni acqua olio, formatesi durante la rapida frangitura. Una volta pronta la pasta di olive, si procede alla fase di estrazione vera e propria, che si svolge in modo diverso a seconda del tipo di processo:

- il processo discontinuo, che è quello tradizionale, prevede l'estrazione dell'olio per pressione meccanica: la pasta viene posta su sacchi a disco di fibra vegetale chiamati fiscoli, che oggi più spesso vengono costruiti in materiali sintetici. Essi vengono impilati sotto la pressa dove la pressione crescente, nell'arco di circa un'ora, fa

fuoriuscire la componente liquida oleosa separandola dalla sansa che rimane adesa ai fiscoli. Segue poi la centrifugazione del filtrato per separare l'olio dall'acqua di vegetazione. Negli ultimi anni si è assistito alla ricerca di sistemi di estrazione in grado di svolgere il processo in modo automatico e senza l'intervento diretto dell'uomo. Questo ha determinato una sensibile riduzione dell'impiego di apparecchiature operanti in pressione, per la loro maggiore richiesta di manodopera, e una sempre più diffusa utilizzazione di impianti continui che sostituiscano alla pressione altri principi fisici per la separazione delle fasi;

- il processo continuo invece si basa sul sistema estrattivo per centrifugazione che, sfruttando il diverso peso specifico dei singoli componenti, conduce prima alla separazione della sansa e della parte liquida e, in seguito, isola la componente oleosa dall'acqua di vegetazione.

Sia dai processi continui che discontinui si genera un refluo acquoso, le acque di vegetazione, con caratteristiche diverse. Il processo continuo, proprio in virtù dell'aggiunta di acqua, dà luogo ad un maggiore quantitativo di AV con una concentrazione di inquinante minore, mentre il processo discontinuo genera un effluente più concentrato e in quantitativo minore. Ne risulta che le AV prodotte costituiscono il 90-110% del peso delle olive lavorate nel caso dei processi continui e solo il 40-50% nel caso dei processi discontinui.

Altri due aspetti, riconducibili al ciclo produttivo, esercitano la loro influenza sulla qualità delle acque di vegetazione in uscita dal processo di estrazione dell'olio. Essi sono: le norme igieniche seguite durante la lavorazione e la stagionalità della stessa. Relativamente alle norme igieniche bisogna specificare che, se il lavaggio delle olive prima della pressatura non è accurato, insetti, loro frammenti e muffe possono ritrovarsi nelle AV e ivi innescare processi degradativi che ne alterano la composizione. La stagionalità della lavorazione influenza la durata dello stoccaggio delle AV:

la campagna olearia dura dai due ai sei mesi a seconda della zona e durante lo stoccaggio le AV possono subire variazioni di tipo chimico-fisico.

### ***1.3.3 Tossicità e impatto ambientale delle AV***

Le acque di vegetazione, pur contenendo sostanze naturali di origine vegetale, sono considerate refluo a tasso inquinante fra i più elevati nell'ambito dell'industria agroalimentare. La componente organica presente oscilla fra 29 e 90 g/l in termini di BOD<sub>5</sub> e fra 50 e 208 g/l in termini di COD, a seconda del tipo di processo di estrazione adottato [9]. Essa risulta inoltre recalcitrante alla biodegradazione: è stato stimato che solo circa il 25% delle sostanze in esso contenute risulta completamente biodegradabile. La tossicità delle AV è determinata in massima parte dalla componente fenolica; infatti, fra tutte le frazioni presenti, è quella che viene degradata più lentamente. I fenoli, presenti in concentrazioni di circa 5 g/l, svolgono una azione antimicrobica,

soprattutto antibatterica, ed è stata osservata un'incidenza negativa non solo sulla vita vegetativa, ma anche sui processi di differenziazione cellulare (sporulazione e germinazione) [10]. In questi microrganismi l'azione battericida dei fenoli è stata attribuita alla loro capacità di denaturare le proteine della parete cellulare presumibilmente attraverso legami a idrogeno facilmente formabili da tutti i composti fenolici. Questo meccanismo ostacola sensibilmente la biodegradazione dei reflui dell'industria olearia, soprattutto dei glucidi semplici e complessi e comporta un notevole rallentamento della naturale riduzione del carico inquinante. E' stato inoltre dimostrato che composti come i polifenoli, solubili in acqua, sono responsabili di fenomeni di inibizione della germinazione, crescita e sviluppo di molte piante erbacee.

Solitamente i reflui fenolici, compresi quelli industriali, presentano un'intensa colorazione per via della presenza di polimeri catecol-melaninici

che ne riducono enormemente la biodegradabilità all'aumentare del grado di polimerizzazione. I pesci che vivono in un fiume inquinato da fenoli, decedono quando la concentrazione di tali fenoli supera i 3-5 mg/l.

Questi composti sono stati oggetto anche di studi che ne hanno testato la capacità inibente nei confronti della metanogenesi ma la maggiore responsabilità è attribuita ai lipidi presenti in tale acque.

La consistente presenza di sali di potassio nelle acque di vegetazione, benché possa risultare positiva per l'irrigazione, risulta tossica per la flora microbica dei comuni depuratori e per questo motivo è impedita l'adozione di tecniche tradizionali di smaltimento.

L'acidità presentata dalle AV e la loro elevata capacità tamponante possono abbassare il normale pH delle acque superficiali ( $\text{pH} \cong 6.5$ ) e, qualora utilizzate per la fertirrigazione, il normale pH del terreno.

Per valutare l'impatto ambientale delle AV è necessario stimare la quantità di acque reflue prodotte dall'industria olearia nazionale, tenendo conto degli effettivi quantitativi di olive lavorate durante ciascuna campagna e dei diversi metodi di estrazione impiegati. Gli impianti caratterizzati da processi continui rappresentano circa il 40% del numero totale di frantoi, tuttavia ad essi si attribuisce il 62% della lavorazione totale delle olive per campagna. Tenendo presente che, per gli impianti tradizionali, il rapporto tra le acque di vegetazione prodotte e le olive lavorate è circa 0.4, cioè per ogni kg di olive lavorate con pressatura si ottengono 0.4 kg di AV, e che per quelli continui tale rapporto è circa 1, il quantitativo totale di AV risulta pari a circa il 78% in peso delle olive lavorate per campagna olearia. Considerando poi che la produzione media nazionale è di oltre 25 milioni di quintali di olive lavorate, il quantitativo totale di acque reflue può essere stimato intorno ai 20 milioni di quintali per campagna.

Per esprimere il carico inquinante di una particolare utenza industriale in termini omogenei e confrontabili con le utenze civili, si ricorre al concetto di abitante equivalente. Come già indicato a pagina 1, si definisce abitante

equivalente (a.e.) il carico organico giornaliero biodegradabile avente una richiesta biochimica di ossigeno, dopo 5 giorni, pari a 60 grammi di ossigeno al giorno.

In Italia si lavorano, come detto, mediamente 25 milioni di quintali di olive per stagione, producendo 100 milioni di kg di BOD<sub>5</sub>. L'inquinamento potenzialmente prodotto dall'industria olearia in una stagione, escludendo l'intervento di processi depurativi, corrisponde a quello prodotto da circa 1.6 miliardi di persone. Il rapporto tra BOD<sub>5</sub> delle AV e BOD<sub>5</sub> di un abitante equivalente è pari a 130. Questo è un dato che fa riflettere, perché significa che le AV, a parità di volume, comportano un inquinamento 130 volte maggiore dei reflui civili.

### ***1.3.4 Normativa***

In passato la legge Merli (L.319/10.05.1976) aveva fissato i limiti, in termini di g<sub>COD</sub>/l, a cui dovevano adeguarsi gli scarichi civili e produttivi per poter essere riversati in pubblica fognatura o in acque superficiali. Per la maggior parte dei frantoi erano stati previsti limiti particolarmente restrittivi: le tabelle A e C della suddetta legge fissavano rispettivamente 160 mg<sub>COD</sub>/l per lo scarico in acque superficiali e 500 mg<sub>COD</sub>/l per quello in pubblica fognatura.

La stagionalità delle AV, le dimensioni medio-piccole delle aziende produttrici di olio e la loro dispersione sul territorio nazionale hanno portato, negli ultimi anni, all'emanazione di una lunga serie di provvedimenti tampone atti a permettere l'effettivo adeguamento alle norme vigenti. Deroghe alla legge Merli consentivano, fino all'entrata in vigore dell'attuale normativa, l'applicazione di metodi quali la fertirrigazione (ossia lo smaltimento sul terreno agrario dei reflui provenienti dai frantoi), lo smaltimento in pubblica fognatura, trattamenti con impianti pilota o stoccaggio in vasche di evaporazione. Il trattamento più semplice ed

economico risulta essere il lagunaggio che consiste nell'accumulo dei reflui in bacini di grande capacità dove avviene un parziale abbattimento del carico organico. Tuttavia ad esso sono imputabili problemi quali la produzione di cattivi odori, la necessità di disporre di grandi superfici ed il rischio ambientale legato alla incompleta rimozione del carico inquinante e alla possibilità di contaminare il suolo e le falde qualora i bacini non fossero perfettamente impermeabilizzati.

Nell'ambito delle norme transitorie per gli impianti oleari, è stato consentito il trasporto di acque reflue in impianti di lagunaggio idonei con mezzi autorizzati dal Comune competente. Alcune Regioni hanno promosso la realizzazione di strutture centralizzate per lo smaltimento dei reflui. Tali strutture prevedevano impianti di depurazione per il trattamento completo degli scarichi fino ai limiti di accettabilità previsti per l'immissione nei corpi ricettori finali e, nel caso in cui i liquami avessero dovuto essere trasferiti ad un altro impianto di depurazione, prevedevano opere ed attrezzature funzionalmente integrate per il trasferimento dei liquami secondo le modalità ed i limiti stabiliti dall'ente gestore dell'impianto recettore. Tali propositi sono stati comunque vanificati dalla non idoneità degli impianti proposti per la depurazione dei reflui.

La legge n° 574 dell'11/11/1996 [32], "Nuove norme in materia di utilizzazione agronomica delle acque di vegetazione e di scarichi di frantoi oleari" stabilisce le modalità con cui effettuare la fertirrigazione. Essa stabilisce i limiti di accettabilità pari a 50 m<sup>3</sup> per ettaro di superficie interessata nel periodo di un anno per le acque provenienti da frantoi a ciclo tradizionale e di 80 m<sup>3</sup> per ettaro di superficie interessata nel periodo di un anno per le acque di vegetazione provenienti da frantoi a ciclo continuo [15]. Tali limiti possono essere resi più restrittivi nel caso si accertasse un grosso rischio per le acque, il suolo, il sottosuolo e per le altre risorse ambientali. L'utilizzazione agronomica delle AV deve essere preceduta da uno studio nel quale si illustri l'assetto pedogeomorfologico, le condizioni idrologiche e le caratteristiche generali dell'ambiente ricevitore. Debbono

essere inoltre esplicitati i tempi di spandimento ed i mezzi meccanici che si intendono utilizzare per una idonea distribuzione. Per idonea distribuzione si intende, ai sensi dell'articolo 4 della suddetta legge, uno spandimento che preservi l'approvvigionamento idrico e l'intero sistema ecologico da ogni pericolo e che consenta altresì una efficiente incorporazione del refluo nel suolo senza dare luogo a fenomeni di ruscellamento. Si stabilisce in 30 giorni il tempo massimo di stoccaggio delle AV in silos, cisterne o vasche interrate o sopraelevate.

L'11/05/1999 è stato varato il Decreto Legislativo n°152 che dispone della tutela delle acque dall'inquinamento, recependo diverse norme europee. Il presupposto fondamentale di tale decreto risiede nel concetto di qualità dei corpi idrici: la legge Merli, fissando i limiti entro cui dovevano adeguarsi gli scarichi civili e produttivi per poter essere riversati in fogna o in acque superficiali, non considerava gli effetti di accumulo e interazione fra più scarichi nel medesimo corpo recettore. Nel decreto sono presenti indicazioni incentrate su questo principio, volte prima a capire le qualità dei corpi idrici ed il loro uso, e poi ad autorizzare eventuali scarichi. Tale decreto, come modificato dal Decreto Legislativo n°258/2000, definisce "*acque reflue urbane*" le acque reflue domestiche o il miscuglio di acque reflue domestiche, di acque reflue industriali ovvero meteoriche di dilavamento convogliate in reti fognarie, anche separate, e provenienti da agglomerato.

Considerando le disposizioni dei predetti Decreti è stato redatto dal Ministro delle politiche agricole e forestali il Decreto 6 luglio 2005 [31] che disciplina l'intero ciclo (produzione, raccolta, stoccaggio, trasporto e spandimento) dell'utilizzazione agronomica delle acque di vegetazione dei frantoi oleari e delle sanse umide. Lo spandimento deve essere praticato nel rispetto di criteri generali di utilizzazione delle sostanze nutritive ed ammendanti e dell'acqua in esse contenute che tengano conto delle caratteristiche pedomorfolologiche, ideologiche ed agro alimentari del sito e che siano rispettosi delle norme igienico sanitari, di tutela ambientale ed urbanistica.

Recentemente è stato varato il Decreto Legislativo 3 aprile 2006, n. 152, aggiornato con il Decreto legge del 3 ottobre 2006 n. 262, che sostituisce a partire dal 29 aprile 2006 (data della sua entrata in vigore) la maggior parte delle preesistenti norme in materia ambientale (quale ad esempio il Dlgs n°152 dell'11/05/1999), mediante la loro espressa abrogazione. Nel Decreto sono introdotte precisazioni relativamente all'utilizzazione di scarti agronomici, ovvero al loro utilizzo irriguo e fertirriguo. Le regioni disciplinano le attività di utilizzazione agronomica sulla base dei criteri e delle norme tecniche generali adottati con decreto del ministro delle politiche agricole e forestali di concerto con i ministri dell'ambiente, dell'industria, del commercio e dell'artigianato, della sanità e dei lavori pubblici. Il Decreto, quanto alle norme tecniche per l'utilizzazione agronomica delle AV, rinvia alla legge°574/1996.

## **1.4 Trattamenti depurativi delle acque di vegetazione**

La difficoltà riscontrata nel trovare un metodo adatto allo smaltimento delle AV è legata principalmente all'alto contenuto di COD, alla natura tossica di alcuni dei costituenti (ad esempio i fenoli) e alla produzione stagionale delle AV che dura circa due mesi all'anno [19]. Negli ultimi anni sono state proposte e studiate numerose tecnologie per il trattamento delle AV: la ricerca si è indirizzata da un lato allo sviluppo di una serie di processi innovativi e dall'altro al tentativo di migliorare tecnologie già esistenti. Su scala industriale gli impianti attualmente installati utilizzano essenzialmente trattamenti termici delle AV tal quali, e trattamenti biologici su soluzioni diluite con reflui urbani.

In laboratorio sono stati sperimentati quasi tutti i trattamenti impiegati nella depurazione dei reflui urbani e industriali: i risultati non sono tuttavia ancora soddisfacenti né sotto il profilo economico né pratico.

Le tecnologie proposte e studiate possono essere classificate in:

- ✓ utilizzazione agronomica;
- ✓ trattamenti chimico-fisici;
- ✓ trattamenti termici;
- ✓ trattamenti con membrane;
- ✓ trattamenti biologici.

Le tipologie di impianto adottabili sono riconducibili essenzialmente a:

- ✓ grandi impianti centralizzati (piattaforme comunali o consortili);
- ✓ impianti di piccole o medie dimensioni per singoli oleifici.

Io in questo studio mi occuperò di un trattamento biologico e quindi descriverò solo questo tipo di trattamento.

### ***1.4.1 Trattamenti biologici***

Normalmente i trattamenti dei reflui oleari di tipo convenzionale richiedono costi di investimento e di manutenzione troppo elevati per la stagionalità delle campagne olearie. Per questo ed altri motivi, negli ultimi anni si è assistito allo sviluppo dei processi biotecnologici per il risanamento di aree contaminate e di reflui inquinanti di varia natura. Tali trattamenti, oltre alla maggiore economicità, presentano i seguenti vantaggi:

- bassi consumi energetici dovuti alle condizioni operative (temperatura e pressione ambientali);
- basso impatto ambientale grazie all'effettiva degradazione degli inquinanti da parte dei microrganismi;
- possibilità di trattare grandi volumi di acqua anche quando il carico inquinante è modesto.

I principali svantaggi dell'utilizzo dei processi biotecnologici sono:

- necessità di valutare in anticipo l'efficacia del trattamento microbico, con riferimento ai nutrienti richiesti ed ai possibili metaboliti;

- necessità di controllare continuamente le condizioni del sistema per mantenere le caratteristiche che rendono ottimale la sopravvivenza e lo sviluppo dei microrganismi;
- conoscenza limitata delle possibilità di biodegradazione di composti xenobiotici e della biodisponibilità dei contaminanti da rimuovere;
- instabilità dell'espressione del fenotipo degradativo, dal momento che l'informazione genetica per la degradazione degli xenobiotici è spesso contenuta nel DNA plasmidiale o su elementi mobili del genoma.

La maggior parte degli studi, che per lo più sono di tipo sperimentale, relativi a trattamenti delle acque di vegetazione riguarda:

- degradazione anaerobica e riduzione della tossicità delle AV mediante processi anaerobici;
- trattamenti chimici accoppiati a trattamenti microbiologici anaerobici;
- combinazione di trattamenti degradativi aerobici ed anaerobici;
- rimozione della componente fenolica dei reflui oleari attraverso l'impiego di fenolo-ossidasi, cioè enzimi che ossidano i fenoli.

## **1.5 Valorizzazione delle AV mediante trattamenti biotecnologici**

Le acque di vegetazione rappresentano, come già detto in precedenza, un consistente rifiuto costituito tipicamente da macromolecole, come polisaccaridi, lipidi, proteine e numerosi composti aromatici monomerici e polimerici che costituiscono la cosiddetta "frazione fenolica" [20]. Lo smaltimento di tali scarti è stato oggetto di numerosi studi, ma se da un lato rappresentano un importante problema di carattere ambientale ancora non completamente risolto, dall'altro costituiscono una potenziale risorsa rinnovabile da valorizzare.

### ***1.5.1 Trattamento anaerobico per il recupero di biogas***

Il trattamento anaerobico consiste nella digestione, da parte di batteri anaerobi, del carico organico disciolto nelle AV. Da questo processo si ottiene la produzione di biogas a basso potere calorifico contenente principalmente CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>S. Si tratta di uno dei processi di smaltimento più utilizzati poiché presenta, rispetto al trattamento aerobico, i seguenti vantaggi:

- ✓ possibilità di recupero energetico sotto forma di biogas;
- ✓ minore produzione di fanghi da smaltire per il fatto che i rendimenti di crescita della biomassa risultano inferiori;
- ✓ condizioni meno restrittive per quanto riguarda l'aggiunta di nutrienti;
- ✓ possibilità di riattivare i digestori anaerobici anche dopo diversi mesi di inattività (caratteristica questa che si adatta molto bene alla stagionalità della campagna olearia).

Il fatto di poter recuperare energia sotto forma di metano fa sì che il trattamento anaerobico delle AV non possa essere considerato un processo di smaltimento in senso stretto, ma uno smaltimento associato alla valorizzazione del refluo. Nonostante gli indubbi vantaggi del trattamento anaerobico, sono stati riscontrati alcuni problemi [21], [22]:

- necessità di alzare il pH acido delle AV;
- presenza di composti quali fenoli e sali di potassio, inibitori per la flora metanogena;
- elevato carico organico del refluo che comporterebbe la necessità di diluire il refluo stesso.

I composti di tipo fenolico hanno un potere batteriostatico e, a volte, anche battericida; considerando che le AV ne contengono dai 3 ai 5 g/l, a seconda della tecnica di estrazione dell'olio utilizzata, e che la soglia di inibizione

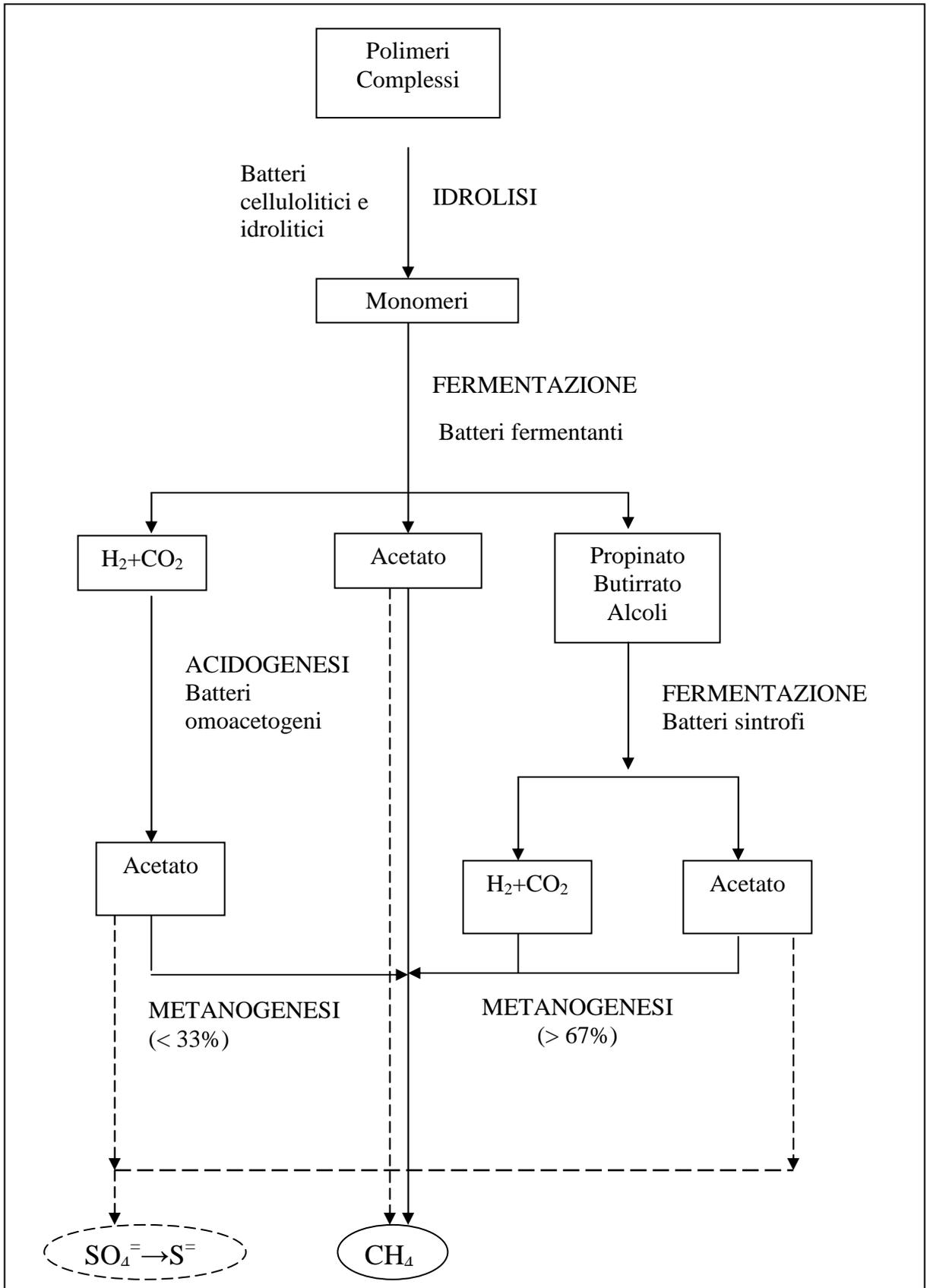
verso i batteri metanogeni è di 1 g/l [23], risulta evidentemente necessario un trattamento combinato delle AV con acque di scarico nei digestori.

Il processo di digestione anaerobica di molecole organiche avviene attraverso due principali fasi sequenziali:

- 1) **acidogenesi**: si ha la fermentazione della sostanza organica (dopo eventuale idrolisi in sostanze solubili) a  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$  e acidi grassi volatili quali acetico, propionico, butirrico;
- 2) **metanogenesi**: si ha la conversione dei prodotti ottenuti mediante l'acidogenesi in  $\text{CO}_2$  e  $\text{CH}_4$ .

Lavorando con reattori anaerobici su piccola scala, alimentati sia con AV naturali che con soluzioni sintetiche di composizione nota, si è verificato che le sostanze fenoliche e polifenoliche vengono degradate esclusivamente durante la fase metanogenica, mentre quelle lipidiche in entrambi le fasi. Con questi studi si è dimostrato inoltre che un digestore anaerobico a due fasi può essere efficacemente impiegato nella degradazione delle AV. Nella seguente figura è sinteticamente illustrato il processo di degradazione anaerobica.

Figura 1.5.1.1 Schema della degradazione anaerobica del materiale organico



La digestione anaerobica, come già detto, è un trattamento biologico molto promettente per le AV, sia per la decontaminazione, sia per la loro valorizzazione con la produzione di metano. Tuttavia non sempre è in grado di dare risultati soddisfacenti per quanto riguarda la rimozione dei composti fenolici che tendono a rimanere all'interno dei reattori e negli effluenti. È stato dimostrato [24] che è possibile risolvere questo problema con l'utilizzo di bioreattori a cellule immobilizzate riempiti con carbone attivo granulare (GAC) o con granuli di silice (SB) "Manville". Sono stati condotti esperimenti in regime *batch* in laboratorio mediante bioreattori riempiti con entrambi i supporti e si sono studiate la stabilità e le prestazioni dei processi. Il reattore impaccato con GAC si è dimostrato molto efficace per quanto riguarda la rimozione di COD e la rimozione dei composti fenolici, riuscendo a sopportare più elevati carichi organici rispetto ai digestori a cellule sospese [25]. I risultati ottenuti sono stati i seguenti: la percentuale di rimozione dei composti fenolici è stata del 90% utilizzando GAC e del 51% utilizzando SB. La produzione di metano (da cui deriva la valorizzazione delle AV), misurata in termini di litri di metano prodotto/grammi di COD degradato, è stata di 0,08 per il GAC e di 0,18 per il SB [25].

### ***1.5.2 Trattamento anaerobico per la produzione di acidi grassi volatili***

Lo scopo di questo tipo di trattamento è quello di fermarsi alla prima fase della degradazione anaerobica del materiale organico presente nelle AV: favorire l'acidogenesi rispetto alla metanogenesi per ottenere un effluente ricco di acidi grassi volatili da utilizzare poi come materiale di partenza per la produzione di PHA [4]. Nell'effluente sarà presente una miscela di VFA, in cui i componenti più importanti sono: acido acetico, propionico, butirrico. In questa tesi verrà studiata la fattibilità di tale processo utilizzando tecnologie e variabili operative che saranno descritte in seguito.

## **1.6 Bioreattori per il trattamento delle AV**

### ***1.6.1 Bioreattori aerobici e anaerobici***

I reattori aerobici differiscono da quelli anaerobici principalmente perché questi ultimi, durante il loro funzionamento, devono essere preservati dall'ossigeno che potrebbe interferire con il metabolismo anaerobico dei microrganismi impiegati; devono anche essere dotati di un appropriato sistema di scarico per rimuovere i gas che si producono durante le reazioni, in particolare metano ed anidride carbonica. Al contrario, i bioreattori aerobici necessitano di elevati quantitativi di ossigeno disciolto nel mezzo di coltura e, per questo motivo, si provvede ad insufflare aria nella sezione di fondo del reattore. La modesta solubilità dell'ossigeno in acqua (circa 8 ppm a temperatura ambiente) ed il suo difficoltoso trasporto dalle bolle d'aria all'acqua, giustificano l'esigenza di creare un'estesa interfaccia aria-acqua per fornire al sistema il necessario quantitativo di ossigeno. Tipicamente questo comporta l'uso di uno o più agitatori che frantumino le bolle d'aria e le disperdano nel mezzo liquido implicando un significativo dispendio di energia.

I sistemi aerobici riescono a trattare notevoli volumi d'acqua contaminata, riducendo in modo significativo sia il COD sia il tenore di azoto e fosforo; inoltre i processi che si svolgono entro tali reattori sono più stabili e più facilmente controllabili rispetto a quelli aventi luogo in sistemi anaerobici. A causa del più lento metabolismo proprio dei microrganismi, i bioreattori operanti in condizioni anaerobiche richiedono un prolungato tempo di permanenza degli inquinanti nel sistema di reazione, quindi è necessario disporre di un maggiore volume di reazione per trattare lo stesso quantitativo di sostanze contaminanti. Il lento metabolismo comporta inoltre che i microrganismi anaerobici necessitino di un periodo più lungo per colonizzare il reattore, quindi l'avviamento del processo è più lento, così

come il ripristino delle condizioni di pieno esercizio nel caso di un errore di processo. Nei bioreattori anaerobici occorre eseguire anche un controllo continuo e molto accurato dei parametri operativi, quali la temperatura e il pH [13].

Mentre la degradazione aerobica è di norma mediata da numerosi organismi anaerobici che operano parallelamente e indipendentemente, i batteri anaerobici vivono in *consortia* in cui diverse popolazioni sono responsabili di uno specifico stadio del processo di degradazione complessivo. Questo rende i reattori anaerobici più esposti a pericoli di guasto riconducibili soprattutto al sovraccarico idraulico, organico e tossico del sistema [13].

Il sovraccarico idraulico si verifica quando il bioreattore operante in regime di tipo continuo è alimentato con una portata troppo alta e la velocità di crescita dei microrganismi è bassa, come avviene nel caso degli anaerobi, provocando così il *wash-out* della popolazione batterica.

Il sovraccarico organico si manifesta quando le acque contaminate da trattare contengono una elevata concentrazione di sostanze organiche: questo provoca la rapida produzione di una significativa quantità di acidi volatili da parte dei microrganismi del *consortium* (batteri acetogeni) che svolgono le fasi intermedie del processo degradativo, con conseguente inibizione dei batteri metanogeni (gli ultimi microrganismi che operano all'interno del *consortium* anaerobico) e blocco del bioreattore.

Il sovraccarico tossico è causato dall'introduzione di un'eccessiva quantità di agenti tossici per i microrganismi, con ripercussioni negative sulle funzioni metaboliche di questi ultimi.

Riassumendo, i processi anaerobici presentano indubbi vantaggi: possono lavorare con alti carichi organici, non richiedono energia per l'insufflazione e la dispersione di aria e producono meno biomassa per unità di substrato degradato; inoltre essi sono più adatti a trattare correnti contaminate da materiali volatili che potrebbero altrimenti essere rimossi dal liquido mediante l'aria insufflata all'interno di un reattore aerobico.

### ***1.6.2 Bioreattori a cellule sospese e a cellule immobilizzate***

Per massimizzare la ritenzione della biomassa entro il reattore bisogna evitare che le cellule batteriche lascino il sistema di reazione, trascinate dall'effluente. Questo scopo può essere raggiunto immobilizzando la biomassa su di un supporto solido che non venga rimosso dalla corrente in uscita dal reattore. Quando una popolazione microbica è presente in un medium liquido sotto forma di singole cellule disperse, il suo comportamento fisico è governato dalle proprietà della massa liquida, quindi le cellule si comportano come elementi del fluido entro cui sono sospese e, qualora sia necessario rimuovere i liquidi di processo dal reattore, anche una parte della popolazione microbica complessiva verrebbe con essi eliminata. Ciò rappresenta un grande limite per il funzionamento del processo, dal momento che le cellule potrebbero essere riutilizzate in cicli successivi sia *batch* che continui.

L'immobilizzazione delle cellule è un sistema che consente di stabilizzare gran parte dei microrganismi in una ben definita regione dello spazio all'interno del bioreattore, in modo che essi acquisiscano un comportamento indipendente da quello del liquido circostante.

L'utilizzo dei supporti determina una maggiore attività metabolica ed una maggiore concentrazione microbica, dal momento che su di essi vengono adsorbiti i nutrienti; quindi la concentrazione dei nutrienti stessi su di una superficie può essere molto più elevata di quanto non lo sia in una soluzione acquosa. I microrganismi colonizzano le superfici costituendo i biofilm che sono formati da microcolonie di cellule batteriche, racchiuse in una matrice di polisaccaridi, secreti dalle cellule stesse, che permettono l'adesione alla superficie [14], [26].

A queste considerazioni di carattere prettamente biologico, vanno aggiunti tutti i miglioramenti che l'immobilizzazione cellulare apporta allo sviluppo ingegneristico del processo biodegradativo. Essi sono:

- possibilità di operare in continuo evitando il rischio del *wash-out*: infatti le cellule rimangono adese al loro supporto mentre la fase liquida di reazione vi fluisce attraverso;
- aumento globale della produttività in termini di prodotto degradato o di metabolita desiderato (diretta conseguenza della elevata densità cellulare all'interno del bioreattore);
- possibilità di condurre processi in condizioni *batch* utilizzando più volte il medesimo biofilm, semplicemente eliminando dal bioreattore il mezzo di coltura esausto ed introducendone di fresco;
- miglioramento del trasporto di materia tra fase gassosa e liquida (aspetto particolarmente interessante in processi aerobici) dovuto alla diminuzione della viscosità del mezzo (determinata, quest'ultima, da una minore concentrazione di cellule disperse);
- possibilità di variare sensibilmente la portata di liquido all'interno del bioreattore senza che questo comporti un'apprezzabile variazione della concentrazione cellulare;
- possibilità di immobilizzare contemporaneamente diversi ceppi batterici su di un medesimo supporto: questo consente inoltre di riservare alle varie specie microbiche aree diverse all'interno del bioreattore.

Le tecniche impiegate per realizzare l'immobilizzazione cellulare si distinguono a seconda dei processi fisici che coinvolgono, ossia:

#### 1) *Adesione o Adsorbimento*

E' un processo che si può definire di immobilizzazione naturale poiché molti microrganismi aderiscono spontaneamente a diverse superfici. Tale caratteristica rende questa tecnica particolarmente semplice ed economica, in quanto non necessita della presenza di un operatore che segua il processo. Talvolta però è richiesta l'aggiunta di particolari sostanze chimiche che

favoriscano l'immobilizzazione cellulare. Il processo è estremamente semplice in quanto basta inviare una sospensione cellulare (inoculo) all'interno del reattore, preventivamente riempito con il materiale di supporto, perché le cellule aderiscano spontaneamente alla superficie di quest'ultimo. Lo spessore del biofilm può arrivare a misurare anche alcuni millimetri, come nel caso degli impianti di trattamento di acque civili o industriali. Il supporto di immobilizzazione può essere di dimensioni molto ridotte: questo al fine di avere una elevata superficie disponibile all'attacco cellulare per unità di volume di supporto. Per la semplicità della sua realizzazione questa tecnica di immobilizzazione è stata la prima ad essere usata, in particolare per la produzione dell'aceto, dove i batteri sono immobilizzati su trucioli di legno.

Supporti impiegati comunemente all'interno di bioreattori a biomassa adesa sono: vetro smerigliato; carbone attivo granulare; poliuretano (Bertin *et al.*, 2001); silice espansa "Manville" [27].

## 2) *Intrappolamento*

Questo tipo di immobilizzazione può essere realizzato in due modi diversi, il primo dei quali prevede l'utilizzo di supporti di immobilizzazione porosi, sia con pori molto piccoli (carbone, vetro sinterizzato, ceramiche) che con pori di dimensioni più grandi (diametro maggiore di 0,1 mm). Il fenomeno di intrappolamento è causato dalla crescita microbica che provoca una vera e propria "cattura", da parte dei pori, del materiale cellulare. La seconda tecnica di intrappolamento consiste nell'utilizzo di sostanze gelificanti che vengono miscelate alla coltura liquida in cui sono state preventivamente fatte crescere le cellule. Il gel che viene a formarsi consente ancora alle cellule di svilupparsi e riprodursi, ma si sfalda se la quantità di biomassa in esso contenuta diventa superiore al 30%. Le sostanze gelificanti utilizzate attualmente sono composti polisaccaridici come kappa-carragenano, agar e alginati; i vari gel vengono poi trasformati in sferule o cilindretti (di circa 5 mm di diametro) ed utilizzati all'interno dei vari tipi di reattori (a letto fisso o miscelati).

### 3) *Contenimento*

Viene realizzato impiegando particolari membrane semipermeabili, le quali permettono la diffusione delle sostanze verso le cellule, mentre impediscono il passaggio di queste ultime nel mezzo di coltura. A questo scopo vengono impiegate membrane per ultrafiltrazione e microfiltrazione: tale metodo è quindi adatto per i casi in cui il fluido non debba contenere biomassa. Lo stesso vantaggio si ha anche quando si utilizza una sospensione cellulare emulsionata in un solvente organico; disperdendo il solvente in un liquido acquoso, l'immiscibilità delle due fasi fa sì che le cellule rimangano confinate nella fase organica.

### 4) *Aggregazione.*

Consiste nel processo naturale per cui le cellule tendono ad aggregarsi, fino a formare fiocchi di dimensioni tali da poter essere separati dal mezzo di reazione per semplice decantazione (caratteristica che permette a questa tecnica di essere utilizzata in sistemi che lavorano in continuo). Il fenomeno, detto flocculazione, può essere favorito chimicamente aggiungendo sostanze come silice attivata e polielettroliti.

## **2. SCOPO DELLA TESI**

### **2.1 Valorizzazione delle acque di vegetazione**

La produzione di acque di vegetazione (AV), inevitabilmente legata alla produzione di olio di oliva, è un serio problema ambientale sia a causa della loro quantità (30 milioni di m<sup>3</sup> ogni anno nei Paesi del Mediterraneo) [18], sia del loro elevato contenuto di COD che oscilla fra 50 e 150 g/l [19]. Sono considerate refluo a tasso inquinante fra i più elevati nell'ambito dell'industria agroalimentare e la tossicità è determinata in massima parte dalla componente fenolica. Quindi lo smaltimento di tale scarto ed i processi depurativi sono stati oggetto di numerosi studi. Ma se da un lato rappresentano un importante problema di carattere ambientale ancora non completamente risolto, dall'altro costituiscono una potenziale risorsa rinnovabile da valorizzare: diversi studi sono stati condotti a tale scopo [24]. Nel presente lavoro si è cercato di sfruttare l'elevato contenuto di COD delle AV attraverso la fermentazione anaerobica acidogenica di tali acque per ottenere acidi grassi volatili.

### **2.2 Produzione di PHA da substrati ricchi di VFA**

I polidrossialcanoati (PHA) sono biopolimeri che costituiscono un'interessante alternativa ai polimeri sintetici in quanto provengono da fonti rinnovabili e sono in genere biodegradabili. Gli attuali processi di produzione dei PHA sono basati su colture pure e su substrati a composizione definita: pertanto, in tali processi tradizionali, la selezione ed il mantenimento delle colture e la produzione di substrato sono i fattori critici di costo, abbassati i quali esiste il potenziale per un allargamento del mercato dei PHA. Negli ultimi anni sono stati studiati nuovi processi che

utilizzano substrati diversi, più economici, e colture microbiche miste. I substrati utilizzati sono materiali di scarto, come le acque di vegetazione dell'industria olearia, fonti rinnovabili e a basso prezzo che forniscono ai microrganismi i substrati utilizzati per la produzione e l'accumulo intracellulare dei PHA.

## **2.3 Fasi del processo di produzione di PHA a partire da AV**

Recentemente è stato sviluppato un nuovo processo per produrre PHA [7], basato sull'utilizzo di fanghi attivi in condizioni aerobiche per ottenere colture miste in grado di produrre questi biopolimeri con velocità e rendimenti notevoli. Le colture miste sono prodotte dai fanghi attivi arricchiti periodicamente con acidi grassi volatili (VFA) in condizioni aerobiche. L'intero processo si compone di tre fasi ed ha come scopo la produzione di PHA da materiali organici di scarto. In particolare il processo prevede l'impiego di acque di vegetazione dell'industria olearia, una fonte rinnovabile e a basso prezzo. Le tre fasi sono le seguenti:

- 1) fermentazione acidogenica (in condizioni anaerobiche) delle AV al fine di ottenere un effluente ad alta concentrazione di VFA;
- 2) processo aerobico a fanghi attivi, condotto in un reattore discontinuo sequenziale (SBR), alimentato con l'effluente precedentemente ottenuto mediante cicli di *feast* (alta disponibilità di substrato) e *famine* (carenza di substrato) al fine di selezionare popolazioni microbiche aerobiche altamente in grado di trasformare gli acidi grassi volatili disponibili in polidrossialcanoati durante la fase di eccesso di substrato, e di utilizzarli in seguito come fonte interna di carbonio durante la fase di carenza, acquisendo quindi un vantaggio

metabolico nei confronti delle popolazioni non in grado di accumulare i PHA come riserva di carbonio;

- 3) impiego della biomassa selezionata durante la seconda fase del processo in un reattore *batch* alimentato dall'effluente ricco in VFA ottenuto dalla fermentazione acidogenica delle AV.

## 2.4 Obiettivo del presente lavoro

La ricerca nella quale si è inserito il lavoro sperimentale svolto nell'ambito della presente tesi fa parte di un progetto più ampio che mira alla produzione di PHA in condizioni favorevoli economicamente e pertanto competitive con le convenzionali tecniche di produzione di plastiche non biodegradabili. In particolare il mio lavoro ha riguardato la prima delle tre fasi descritte nel paragrafo precedente e l'obiettivo finale di tale ricerca è lo sviluppo di un processo continuo biotecnologico anaerobico per la fermentazione acidogenica delle AV. Si è scelto di allestire un processo a cellule immobilizzate funzionante in regime continuo poiché tale condizione permette di avere tempi di permanenza inferiori rispetto a quelli che si avrebbero nel caso di un processo *batch* e questo permette di inibire in parte i batteri metanogeni che per la loro crescita e attività necessitano di tempi più lunghi rispetto agli acidogeni.

Per tempo di permanenza  $\tau$  si intende il tempo medio trascorso da un elemento di fluido entro il reattore. Numericamente  $\tau$  è definito come il rapporto fra il volume del reattore  $V$  e la portata volumetrica  $Q$ :

$$\tau = \frac{V}{Q}$$

Si è scelto di immobilizzare le cellule su supporti poiché, lavorando con processi in continuo e con alimentazione avente carico organico alto e piuttosto fluttuante, tale soluzione risulta essere quella che comporta meno rischi di wash out. Inoltre in letteratura si sono trovati numerosi casi in cui si è appurato che la microflora batterica in condizioni di cellule immobilizzate

è in genere più efficiente nella degradazione biologica degli inquinanti organici presenti in acque contaminate.

Allo scopo di studiare l'influenza del tipo di supporto si sono allestiti e messi in opera due reattori anaerobici di identica configurazione ma su due tipi di letti fissi: in uno il letto impaccato sul quale sviluppare il biofilm batterico era costituito da carbone attivo granulare (GAC), nell'altro da filtri ceramici Vukopor S10.

Un altro parametro preso in considerazione è stato la temperatura: nel primo esperimento si è mantenuta una temperatura di 35°C; nel secondo si è abbassata a 25°C.

Infine si è studiata l'influenza del carico organico in ingresso, lavorando nei due esperimenti condotti, con diversi valori di tale parametro.

La ricerca opera in una prospettiva futura volta a ottimizzare le condizioni di esercizio tali da massimizzare la produzione di VFA, in previsione di uno sviluppo su scala industriale.

## 3. MATERIALI E METODI

### 3.1 Materiali impiegati

#### *3.1.1 Prodotti e materiali impiegati*

I prodotti utilizzati per le analisi del COD e della concentrazione dei fenoli totali sono stati forniti dalle seguenti ditte: carbonato di sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) e reattivo di Folin-Ciocalteu dalla Sigma-Aldrich (Milano, Italia); reagente in provette contenente MgIII dalla Hach Company (Loveland, USA). I prodotti utilizzati per la preparazione della AV sono stati forniti dalle seguenti ditte: soluzione di acido cloridrico dalla Sigma-Aldrich (Milano, Italia); urea dalla Merck (Darmstadt, Germania); idrossido di sodio dalla Carlo Erba (Milano, Italia).

I solventi impiegati nelle analisi cromatografiche e a scambio ionico sono stati forniti dalla Baker Italia (Milano, Italia).

Come supporto di immobilizzazione si è usato il carbone attivo granulare (*granular active carbon*, GAC) sotto forma di cilindri regolari di lunghezza 10 mm e 3 mm di diametro, (fig. 3.2.1.1) fornito dalla ditta Chemviron Carbon (Feluy, Olanda) e il Vukopor S10, fornito dalla ditta Lanik (CZ) (fig. 3.2.1.2).

Il corpo dei bioreattori era in vetro, così come i sistemi a “T”, che posti a metà della linea di ricircolo permettevano il campionamento del brodo di coltura, il collettore di testa (fig. 3.2.2.3) dei reattori in cui venivano poste le sonde potenziometriche per la misura del pH, la “Mariotte” (fig. 3.4.1.1) utilizzata per la misura del volume del gas prodotto ed i contenitori utilizzati per la raccolta degli effluenti dei reattori nella sperimentazione in continuo.

Il serbatoio contenente l’AV utilizzata per l’esperimento era in plastica.

Le varie linee di collegamento e i ricircoli erano costituite da Teflon, i raccordi erano in Viton mentre i tubi interni alle pompe erano di Tygon della ditta Cole-Parmer (Vernon Hills, USA). Le pompe peristaltiche (fig. 3.2.2.7) utilizzate per l'alimentazione e il ricircolo sono state fornite dalla Cole-Parmer (Vernon Hills, USA).

Per la misurazione del pH delle AV è stato utilizzato un elettrodo pH Ag/AgCl (Orion, mod. 81-04). Esso richiede, a monte della misurazione, un'operazione di taratura mediante due soluzioni a pH noto [28].

Per filtrare il brodo colturale campionato si usavano filtri sterili (Albet, Spagna) in acetato di cellulosa con *cut off* pari a 0,2 µm.

### ***3.1.2 AV impiegate nel corso della sperimentazione***

Le acque di vegetazione, impiegate negli esperimenti sono state gentilmente e gratuitamente fornite dal frantoio Sant'Agata D'Oneglia in provincia di Imperia. Alla famiglia Mela, proprietaria della struttura, vanno i nostri più sentiti ringraziamenti.

Le olive da cui viene estratto l'olio sono di qualità Taggiasca. Esse vengono raccolte con il sistema di bacchiatura su reti sospese, vengono lavate, molite con pietra colombina e l'estrazione dell'olio avviene con il sistema di spremitura a freddo, mediante processo di tipo continuo.

Le acque di vegetazione utilizzate nella sperimentazione sono caratterizzate dai parametri riportati nelle seguenti tabelle:

Tabella 3.1.2.1: valori dei parametri dell'AV utilizzata prima della diluizione

<i>Peso specifico</i>	1,000 g/ml
<i>Peso secco</i>	0,020 g/ml
<i>Solidi volatili</i>	0,012 g/ml
<i>pH</i>	4,3
<i>Fenoli</i>	2,900 g/l
<i>COD</i>	25,316 g/l

Tabella 3.1.2.2: Concentrazione di anioni inorganici nell'AV utilizzata prima della diluizione

<i>Cloruri</i>	309,70 mg/l
<i>Nitrati</i>	31,55 mg/l
<i>Solfati</i>	219,33 mg/l

Tabella 3.1.2.3: Concentrazione degli acidi grassi volatili nell'AV utilizzata prima della diluizione

<b>Acidi grassi volatili</b>	<b>Concentrazione (mg/l)</b>	<b>Concentrazione (mg<sub>COD</sub>/l)</b>
<i>Acido Acetico</i>	417,87	222,68
<i>Acido Propionico</i>	83,74	100,40
<i>Acido Isobutirrico</i>	11,66	9,32
<i>Acido Butirrico</i>	19,25	15,38
<i>Acido Isovalerico</i>	6,12	10,60
<i>Acido Valerico</i>	5,17	8,96
<i>Acido Isocaproico</i>	2,79	5,94
<i>Acido Caproico</i>	5,37	11,44
<i>Acido Eptanoico</i>	6,12	15,50
<b><i>Totale acidi</i></b>	<b>558,09</b>	<b>400,22</b>

## 3.2 Apparato sperimentale

### 3.2.1 Supporti utilizzati per l'immobilizzazione cellulare

Per la ricerca sono stati allestiti due reattori impaccati con due tipi di supporto.

In uno dei due reattori è stato inserito Carbone Attivo Granulare (GAC) (Fig. 3.2.1.1), sterilizzato preventivamente in autoclave in bottiglie di vetro riempite d'acqua a 121°C per 20 minuti. Grazie alla sua elevatissima porosità tale materiale ha eccellenti performance di adsorbimento. La porosità è classificata da IUPAC in 3 famiglie:

- a) Macropori: > 500 Angstrom
- b) Mesopori: 20 ÷ 500 Angstrom
- c) Micropori: < 20 Angstrom.

Di seguito sono rappresentati campioni di GAC e una tabella in cui si riportano le caratteristiche di tale materiale.

Figura 3.2.1.1: cilindretti di carbone attivo granulare di lunghezza di circa 1 cm



Tabella 3.2.1.1: caratteristiche del GAC da noi utilizzato

<b>Porosità</b>	1.000-1.500 mm <sup>2</sup> /g
<b>Colore</b>	Grigio scuro
<b>Forma</b>	Cilindretti lunghi circa 1 cm

Nell'altro reattore il materiale di supporto era Vukopor S10, un materiale costituito da una matrice ceramica composta da un sistema di celle interconnesse che è generalmente adoperato per il filtraggio di metalli fusi (ghisa, bronzo, ottone) in fonderie, dove è utilizzato per la capacità di aumentare il grado di purezza dei metalli. I filtri Vukopor sono prodotti in tre diversi tipi di porosità: 10, 20 e 30 *ppi* (*pores per linear inch*). Il corpo ceramico è composto da materiali di alta qualità quali SiC e Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, i quali grazie ad un efficace sistema legante garantiscono una straordinaria stabilità fino a temperature di 1450°C. Di seguito sono rappresentati due campioni di Vukopor S10 per dare un'idea delle dimensioni del supporto e una tabella in cui si riportano le caratteristiche dei filtri Vukopor.

Figura 3.2.1.2: Supporto Vukopor utilizzato

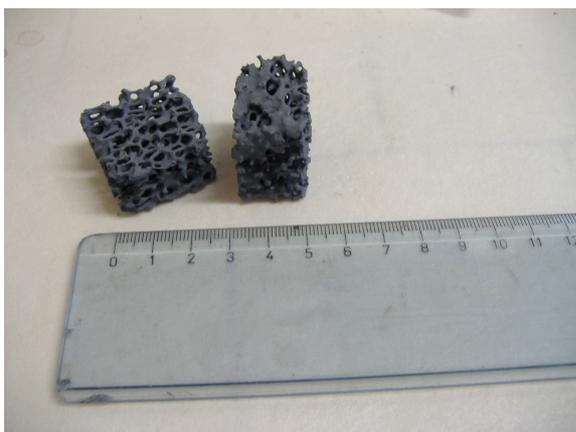


Tabella 3.2.1.2: Caratteristiche dei filtri Vukopor da noi utilizzati

<b>Composizione chimica</b>	SiC, Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , SiO <sub>2</sub>
<b>Legame</b>	Ceramico
<b>Porosità</b>	10 <i>ppi</i>
<b>Temperatura massima</b>	1.450 °C
<b>Colore</b>	Grigio chiaro
<b>Forma</b>	Quadrata, rettangolare, circolare

A seguire, per comodità, i reattori saranno denominati GAC35, VS35, GAC25 e VS25, sigle che definiscono il supporto e la temperatura di esercizio.

### ***3.2.2 Descrizione e allestimento dei reattori***

I due reattori allestiti erano di identica configurazione, erano costituiti da un corpo cilindrico verticale in vetro di altezza pari a 45 cm e diametro 8 cm.

Il reattore riempito con carbone attivo granulare possedeva un volume totale pari a 2420 ml, compresa la linea di ricircolo, un volume utile di 1500 ml che era occupato dal supporto per un volume pari a un 920 ml con un peso di 1.228,12 g. Il VS possedeva un volume totale pari a 2,47 l compresa la linea di ricircolo, un volume utile di 2,25 l che era occupato dal supporto per un volume pari a un 0,22 l. I dati dimensionali sono riassunti nella seguente tabella.

Tabella 3.2.2.1: Parametri dimensionali relativi ai reattori

<b>Reattore</b>	<b>Volume totale (l)</b>	<b>Volume occupato dal supporto (l)</b>	<b>Volume effettivo (l)</b>
<b>GAC</b>	<b>2,42</b>	<b>0,92</b>	<b>1,50</b>
<b>VS</b>	<b>2,47</b>	<b>0,22</b>	<b>2,25</b>

I reattori erano incamiciati con una serpentina di silicone al cui interno fluiva acqua alla temperatura impostata col termostato al fine di mantenere all'interno di tutto il reattore tale temperatura.

Figura: 3.2.2.1: Reattore incamiciato



Figura: 3.2.2.2: Termostato impostato a 25°C



La parte alta del cilindro era connessa ad un collettore di testa (fig. 3.2.2.3), ossia una camera a 3 vie, provvisto di un collegamento per l'inserimento di sonde potenziometriche per la misurazione del pH, di un collegamento con la linea di ricircolo, di uno con la linea di uscita delle acque esauste e di una valvola di intercettazione che, se aperta, permetteva la comunicazione con il sistema "Mariotte" (descritto in seguito) per la misura del volume di biogas prodotto.

Figura 3.2.2.3: Collettore di testa



Le acque esauste, insieme al biogas prodotto, erano poi raccolte in bottiglie di vetro da 5 litri poste alla base dei reattori (fig. 3.2.2.4).

Figura 3.2.2.4: Bottiglia di raccolta del biogas e delle AV esauste



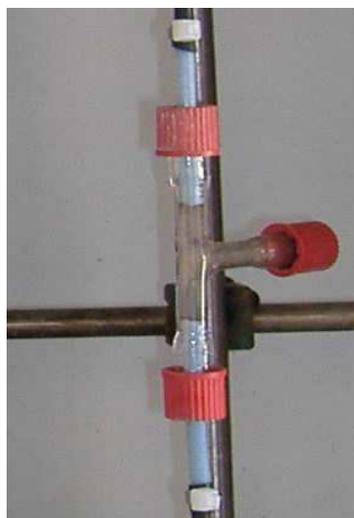
A monte dell'alimentazione, collegato alle pompe mediante tubi di Viton è stato posto un serbatoio in plastica (fig. 3.2.2.5), della capacità di circa 40 litri, chiuso ermeticamente, riempito di AV pretrattata, mediante la quale il sistema era alimentato. L'aspirazione era facilitata anche dal fatto che l'AV all'interno del serbatoio era miscelata (quindi omogeneizzata) continuamente per mezzo di un agitatore azionato da un motore elettrico.

Figura 3.2.2.5: Serbatoio di alimentazione



Un sistema a “T” era posto lungo la linea di alimentazione per poter campionare l’AV in entrata ai reattori, mediante una siringa.

Figura 3.2.2.6: Sistema a “T”



Il ricircolo era effettuato dall'alto verso il basso attraverso un tubo di Teflon, lungo il quale era posto un altro raccordo a "T" in vetro che serviva per effettuare i campionamenti. La linea di ricircolo partiva, come già detto, dal collettore (che era riempito per metà dal brodo di coltura); una pompa volumetrica peristaltica permetteva così al liquido di rientrare nel reattore dal basso.

Per ogni reattore quindi erano presenti due pompe (fig. 3.2.2.7): una di ricircolo e una di alimentazione che spingeva l'acqua dalla base alla testa dei reattori.

Figura 3.2.2.7: Pompe di alimentazione (a sinistra) e di ricircolo (a destra)



### 3.3 Modalità di esecuzione delle prove

Sono stati eseguiti due esperimenti in regime continuo della durata di tre settimane ciascuno. L'andamento dei processi è stato seguito monitorando la concentrazione di acidi grassi volatili prodotta nell'effluente, quella del COD, la produzione e la composizione del biogas e la concentrazione dei composti fenolici. La tabella sottostante riporta le condizioni operative degli esperimenti effettuati.

Tabella 3.3.1: Condizioni operative degli esperimenti effettuati

<b>Esperimenti</b>	<b>Sigla esperimento</b>	<b>Durata</b>	<b>Regime</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Carico organico</b>
1° esperimento	E35	21 giorni	continuo	35°C	12 mg/l d
2° esperimento	E25	22 giorni	continuo	25°C	8 mg/l d

Le acque di vegetazione, prima di essere utilizzate per alimentare i reattori, sono state diluite di un fattore 1:2 con acqua di rubinetto, setacciate per privarle dei residui di olive che avrebbero potuto ostruire i tubi delle pompe di alimentazione e addizionate di urea ad una concentrazione di 0,45 g/l come fonte di azoto e correzione di pH. L'AV esausta veniva raccolta in continuo e con essa anche il biogas prodotto nelle bottiglie da 5 litri.

Per la misura del volume di biogas prodotto si è adottato il sistema "Mariotte" la cui tecnica di funzionamento verrà spiegata in seguito nelle metodiche analitiche.

Si effettuavano periodici campionamenti dalla linea di ricircolo dei due reattori e dalla linea proveniente dall'alimentazione, prelevandola dal sistema a "T".

Il brodo prelevato veniva subito filtrato con un filtro sterile (Albet; Spagna) in acetato di cellulosa con *cut off* pari a 0,2 µm: 2 ml venivano conservati in boccette di vetro in frigorifero per essere sottoposti alle analisi relative a COD e fenoli; 0,5 ml venivano invece dosati in *vials*, addizionati con

un'uguale quantità di acido ossalico 60 mM e utilizzati per l'analisi degli acidi grassi volatili.

Periodicamente si provvedeva anche alla misurazione e al campionamento del biogas (con modalità che saranno descritte in seguito), alla misurazione del pH dell'alimentazione e del brodo di coltura; quest'ultima effettuata direttamente dal collettore di testa, insufflando contemporaneamente CO<sub>2</sub> e azoto per mantenere l'anaerobiosi all'interno dei reattori. Il pH-metro utilizzato è rappresentato nella seguente figura.

Figura 3.3.1: pH-metro utilizzato

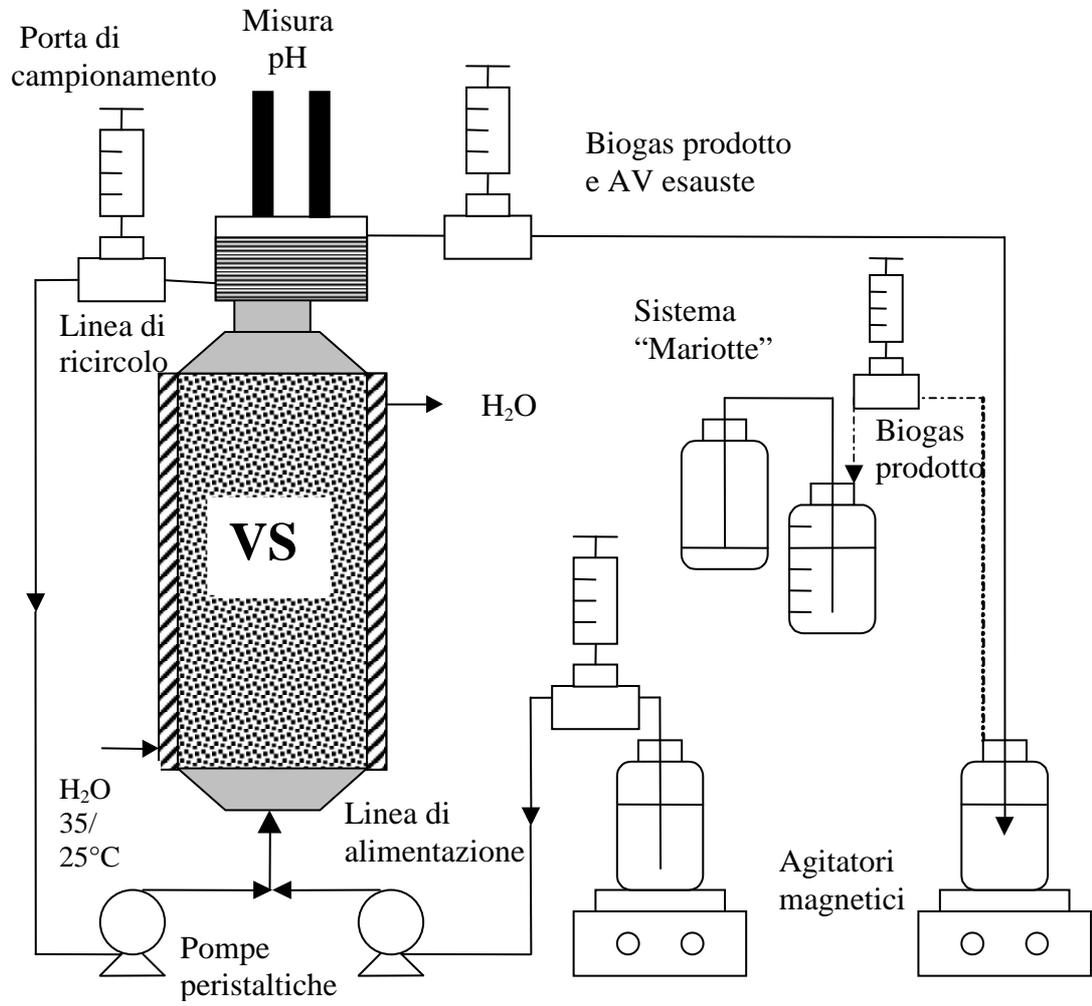


In figura 3.3.2 sono riportati i due reattori durante il funzionamento in continuo e in figura 3.3.3 si riporta uno schema dell'impianto a cellule immobilizzate.

Figura 3.3.2 Reattori operanti in continuo



Figura 3.3.3: Schema dell'impianto a cellule immobilizzate



## 3.4 Metodi analitici

### 3.4.1 Misura del volume di biogas prodotto

La misura del volume di biogas prodotto è stata effettuata con il sistema “Mariotte” il quale veniva collegato allo spazio di testa del collettore situato nella parte superiore del reattore. Il sistema è costituito da un cilindro graduato riempito con acqua e collegato, a mezzo di un sifone, ad una bottiglia da mezzo litro, anch’essa contenente acqua, ermeticamente collegata allo spazio di testa del reattore; il gas prodotto premendo contro l’acqua contenuta nella bottiglia ne provoca lo spostamento verso il cilindro. L’innalzamento del livello dell’acqua, misurato grazie alla gradazione del cilindro, è pari al volume di biogas prodotto. Il sistema è rappresentato nella seguente figura.

Figura 3.4.1.1 Sistema “Mariotte” per la misurazione del biogas in continuo



### ***3.4.2 Analisi della composizione di biogas prodotto***

Per il campionamento del biogas si utilizzava una bottiglietta di vetro della capacità di 30 ml chiusa da un tappo di gomma ad alta tenuta nella quale era stato precedentemente creato il vuoto; la bottiglietta veniva collegata mediante un tubo in Teflon allo spazio di testa dei reattori, veniva aperta la valvola di intercettazione ed il gas passava dai reattori all'interno della bottiglia attraverso l'ago di una siringa, collegata al tubo di Teflon, che perforava il tappo, come mostrato in figura.

Figura 3.4.2.1: Prelievo di biogas



I campioni di biogas così ottenuti sono stati analizzati mediante un gascromatografo del tipo GC-TCD (Varian TCD 3300) equipaggiato con colonna Carbosieve SII SS 1/8" di una lunghezza di 3 m; il gas di trasporto (*carrier*) utilizzato era elio ad una pressione di 40 psi a 60°C e di 56 psi a 200°C e il volume di iniezione era pari a 0,5 ml.

Figura 3.4.2.2: Gas-cromatografo del tipo GC-TCD



La temperatura di iniezione era di 150°C, quella del detector di 220°C e quella del filamento di 250°C.

Le condizioni operative sono state le seguenti:

- temperatura iniziale della colonna: 60°C ;
- isoterma di 5 min;
- rampa di temperatura di 10°C/min fino a 200°C ;
- isoterma di 5 min.

Sono state costruite curve di calibrazione per l'azoto (N<sub>2</sub>), l'ossigeno (O<sub>2</sub>), il metano (CH<sub>4</sub>) e l'anidride carbonica (CO<sub>2</sub>).

Dal cromatogramma che si otteneva è stato possibile effettuare un'analisi qualitativa ed un'analisi quantitativa della composizione di biogas prodotto:

- l'analisi qualitativa è stata effettuata in base al tempo di ritenzione di ogni picco, da cui si può dedurre l'identità del composto presente nel campione;
- l'analisi quantitativa si è basata sull'area del picco di ogni composto ed è stata possibile grazie alla curva di calibrazione con cui è stato in precedenza tarato il gas-cromatografo.

Dal cromatogramma che si otteneva è stato possibile effettuare un'analisi qualitativa e quantitativa della composizione di biogas prodotto in base al tempo di ritenzione di ogni picco, da cui era dedurre l'identità del composto presente nel campione.

E' necessario precisare che dove è stata evidenziata la presenza di ossigeno si sono corretti i dati supponendo che una corrispondente quantità di aria fosse entrata all'interno del campione. E' stata quindi sottratta alla miscela di gas una quantità di ossigeno e azoto, considerando il loro rapporto volumetrico nell'aria, e ricalcolate le percentuali degli altri componenti sulla base di tale correzione.

### ***3.4.3 Analisi della concentrazione di acidi grassi volatili***

L'analisi della concentrazione di VFA veniva effettuata sui campioni di liquido ottenuti campionando il brodo di ricircolo, mediante siringhe, dal raccordo a "T" posto lungo il ricircolo. Dai campionamenti filtrati dei due reattori e dell'alimentazione venivano prelevati 0,5 ml e posti in *vials* in cui si aggiungevano 0,5 ml di acido ossalico 60 mM per far sì che i VFA fossero presenti nel mezzo acquoso in forma protonata. Avendo mescolato un uguale volume di campione e di acido ossalico, nelle *vials* risultava quindi una concentrazione finale di VFA dimezzata. Gli acidi grassi volatili di cui era misurata la concentrazione erano: acido acetico, propionico, isobutirrico, butirrico, isovalerico, valerico, isocaproico, caproico, eptanoico.

Per la misurazione è stato utilizzato un gas-cromatografo del tipo GC-FID 5890 della Hewlett-Packard equipaggiato con colonna capillare Supelcowax-10 di lunghezza 30 m, diametro interno 0,53 mm con uno spessore del film pari a 1,0  $\mu\text{m}$  della Supelco (Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA); come gas *carrier* veniva utilizzato  $\text{N}_2$  ad una velocità di flusso pari a

17,6 ml/min; il volume di iniezione era di 2  $\mu$ l. La temperatura del detector era mantenuta a 280°C.

Figura 3.4.3.1: gas-cromatografo del tipo GC-FID 5890



L'analisi avveniva attraverso le seguenti condizioni operative:

- temperatura iniziale della colonna: 60°C;
- isoterma di 1 min;
- rampa di temperatura di 6°C/min fino a 180°C;
- rampa di temperatura di 20°C/min fino a 240°C;
- isoterma di 5 min.

Per effettuare l'analisi qualitativa e quantitativa dei VFA è stata preparata una curva di calibrazione iniettando campioni a composizione nota. Sono state effettuate quindi considerazioni di tipo qualitativo e quantitativo.

### ***3.4.4 Analisi della richiesta chimica di ossigeno (COD)***

La Domanda Chimica di Ossigeno è stata determinata mediante l'utilizzo del kit *ManganeseIII COD* (Hach Company, U.S.A.) e dello spettrofotometro (Cary 100 Scan Varian), illustrato in figura.

Figura 3.4.4.1: Spettrofotometro



Il campione da analizzare, precedentemente prelevato dai reattori e filtrato, veniva diluito 1:20 con acqua HPLC e dalla soluzione ottenuta si prelevavano 500  $\mu\text{l}$  che venivano aggiunti alle provette contenenti il reagente MnIII. Le provette erano poi inserite nel termostato a 148°C per 1 ora. Dopo averle raffreddate a temperatura ambiente, se ne prelevava una quantità di liquido tale da riempire le cuvette la cui assorbanza veniva letta nello spettrofotometro, settato ad una lunghezza d'onda pari a 510 nm.

### 3.4.5 Misura della concentrazione dei fenoli

La concentrazione dei fenoli è stata determinata utilizzando lo stesso spettrofotometro (Cary 100 Scan Varian) usato per il COD. Il metodo prevede che, oltre ai campioni, si prepari una curva di calibrazione, costituita da sei provini a concentrazione di fenoli nota, che verrà utilizzata per determinare la concentrazione dei campioni in esame. Prima di procedere alla preparazione di tutti i matracci (curva di calibrazione e campioni veri e propri), è necessario preparare una soluzione di carbonato di sodio al 20% ed una soluzione *standard* di fenoli.

- *Preparazione della soluzione di carbonato di sodio al 20%:*

si sciolgono 200 g di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anidro in 1 litro di acqua portando ad ebollizione. Si lascia raffreddare, si tolgono i cristalli e si filtra dopo 24 ore. La filtrazione si esegue con un sistema Whatman mediante l'utilizzo di membrane in nitrato di cellulosa (Albet; Spagna) con una porosità di 0,2  $\mu\text{m}$ .

- *Preparazione della soluzione standard di fenoli:*

si sciolgono 500 g di acido 4-idrossibenzoico in 10 ml di etanolo, si raccoglie con acqua e si porta a volume in matraccio classe A con una capacità di 100 ml.

Per la preparazione della curva di calibrazione sono necessari sei matracci classe A di 100 ml. Dalla soluzione *standard* di fenoli si prelevano e si mettono nei matracci rispettivamente 0 ml, 1 ml, 2 ml, 3 ml, 5 ml, 10 ml; da ognuno di questi matracci, portati a volume con acqua, si preleva 1 ml di liquido e lo si pone in altri sei matracci dello stesso tipo. In ognuno vanno aggiunti 60 ml di acqua e, miscelando, 5 ml di reattivo di Folin-Ciocalteu.

Dopo 30 secondi almeno e prima di otto minuti, bisogna aggiungere 15 ml della soluzione di carbonato di sodio al 20% e provvedere a miscelare accuratamente la soluzione così ottenuta in ciascun matraccio. Infine si porta a volume con acqua. I matracci corrispondono rispettivamente ad una concentrazione di fenoli pari a: 0 mg/l, 50 mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l, 250 mg/l, 500 mg/l.

Il campione va preparato in modo analogo: posto nel matraccio (da 100 ml) 1 ml di campione si aggiungono 60 ml di acqua, 5 ml del reattivo di Folin-Ciocalteu e si agita la soluzione ottenuta. Con le stesse modalità temporali illustrate sopra si aggiungono 15 ml della soluzione di carbonato di sodio; infine si provvede alla miscelazione e si porta a volume con acqua.

Tutti i matracci preparati (quelli relativi alla curva di calibrazione e quelli relativi ai campioni) vanno posti in stufa per due ore a 75°C. Una volta prelevati dalla stufa, i campioni relativi alla curva di calibrazione (con esclusione di quello a concentrazione nulla che è incolore) mostrano una colorazione blu che aumenta di intensità all'aumentare della concentrazione dei fenoli in essi contenuti, come si può notare in figura 3.4.5.1. La colorazione presentata dai campioni veri e propri è invece compresa fra il massimo e il minimo della curva di calibrazione. I matracci vanno raffreddati fino a temperatura ambiente e quindi si preleva una quantità di liquido tale da riempire le cuvette che saranno utilizzate nella macchina spettrofotometrica.

Figura 3.4.5.1: Standard per la costruzione della curva di calibrazione

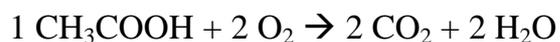


Lo spettrofotometro viene settato ad una lunghezza d'onda pari a 765 nm e si eseguono le letture dell'assorbanza delle soluzioni standard della curva di calibrazione. Si ottiene una corrispondenza fra le loro concentrazioni e i valori di assorbanza che viene espressa mediante un coefficiente di correlazione. Una volta terminata la calibrazione si procede alla lettura dei campioni.

La concentrazione di VFA è stata espressa in termini di COD per poter essere confrontata con il COD presente nell'acqua.

Esprimere un parametro in termini di COD significa calcolare quanto ossigeno è necessario per ossidare completamente il composto considerato.

Nel caso dell'acido acetico, ad esempio, si prende in considerazione la reazione della sua completa ossidazione:



Da cui si evince che sono necessarie 2 moli di  $\text{O}_2$  per ossidare completamente una mole di acido acetico e quindi, sapendo il peso molecolare dell'acido (60 kg/kmol) e dell'ossigeno (16 kg/kmol) si ricava la massa di ossigeno per ossidare completamente le moli di acido presenti.

## 4. RISULTATI

### 4.1 Primo esperimento (E35)

Il primo esperimento è stato condotto in parallelo su entrambi i reattori impaccati rispettivamente con Carbone Granulare Attivo (GAC) e con Vukopor S10 (VS). I reattori sono stati riempiti anaerobicamente con l'acqua di vegetazione diluita di un fattore 1:2 con acqua di rubinetto; la concentrazione iniziale di COD che era pari a 25,316 g/l dovrebbe essersi ridotta quindi a 12,658 g/l sulla base della caratterizzazione delle AV. La durata della prova è stata di 21 giorni e per questo tempo si è cercato di mantenere all'interno dei reattori una temperatura pari a 35°C e un carico organico di 12 mg/l-d, fornendo una portata di alimentazione calcolata nel seguente modo:

$$Q_{in} = \frac{C.O. \cdot V}{COD}$$

Dove:

$Q_{in}$ : portata di alimentazione in ingresso

C.O.: carico organico

V: volume del reattore vuoto

COD: concentrazione di COD nell'alimentazione.

Il rapporto di ricircolo è stato fissato pari a 0.97, perché si è valutato che con tale valore di ricircolo si può considerare il reattore perfettamente miscelato.

Si può calcolare quindi la portata di ricircolo con la formula:

$$Q_r = \frac{Q_{in} \cdot R}{1 - R}$$

Dove:

$Q_r$ : portata di ricircolo

$Q_{in}$ : portata di alimentazione in ingresso

R: rapporto di ricircolo.

Il tempo di residenza dell'acqua di vegetazione all'interno del reattore si calcola con la formula:

$$t = \frac{V}{Q_{in}}$$

Dove:

t: tempo di residenza

V: volume effettivo del reattore

$Q_{in}$ : portata di alimentazione in ingresso

I valori dei parametri utilizzati sono riportati in tabella.

Tabella 4.1.1: Parametri utilizzati nel 1° esperimento

	<b>T</b> [°C]	<b>COD</b> [g/L]	<b>Carico organico</b> [g/L·d]	<b>Vol effettivo reattore</b> [L]	<b><math>Q_{in}</math></b> [L/d]	<b><math>Q_r</math></b> [L/d]	<b>Tempo di residenza</b> [d]
<b>GAC</b>	35	11,654	12,394	1,511	1,607	51,960	0,940
<b>VS</b>	35	11,654	12,394	2,251	2,395	77,438	0,940

Dalle analisi eseguite il COD è risultato pari al valore riportato in tabella e quindi leggermente diverso da quello che avevamo assunto per calcolare la portata di alimentazione in ingresso. Anche il carico organico quindi si discosta, anche se di poco, dal valore che avevamo imposto e si calcola invertendo la formula precedentemente riportata:

$$C.O. = \frac{Q_{in} \cdot COD}{V}$$

Sono state effettuate analisi periodiche del liquido alimentato e di quello all'interno di ogni reattore, prelevandone campioni dai raccordi a "T"

[paragrafo 3.2.2]. Si sono inoltre misurati e campionati i volumi di biogas prodotti.

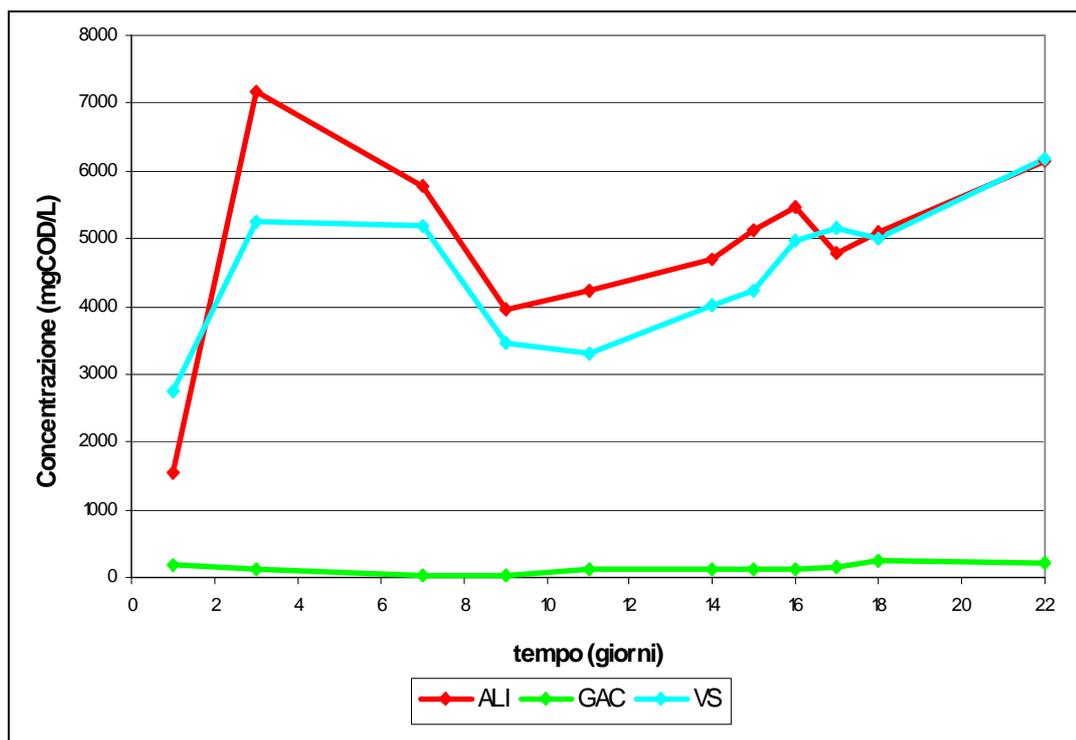
Nei paragrafi seguenti sono riportati i profili dei vari parametri misurati in funzione del tempo per entrambi i reattori: VFA, COD, biogas, fenoli. Il tempo presente in ascissa corrisponde ai giorni di durata dell'esperimento e i punti sperimentali ottenuti rappresentano i valori puntuali misurati nel giorno indicato dall'ascissa.

### 4.1.1 Produzione di VFA

I campionamenti di liquido e le misure della concentrazione di acidi grassi volatili sono stati molto frequenti per poter meglio definire il raggiungimento dello stato stazionario.

Nel grafico seguente sono riportate le concentrazioni espresse in termini di COD dei VFA totali in funzione del tempo per i due reattori e per l'alimentazione.

Figura 4.1.1.1: Andamento della concentrazione di VFA totali, espressa in termini di COD, in funzione del tempo per i due reattori e per l'alimentazione



La concentrazione di VFA è espressa in termini di COD per poter essere confrontata con il COD presente nell'acqua.

Si può notare che le concentrazioni di VFA nel GAC si mantengono sempre su valori molto bassi, mentre quelle nel VS seguono indicativamente l'andamento di quelle dell'alimentazione, pur rimanendo quasi sempre leggermente inferiori. Inizialmente i valori risultano alquanto oscillanti, mentre dopo qualche giorno tendono a stabilizzarsi, avvicinandosi a una condizione di stazionarietà.

Nella tabella 4.1.1.1 sono riassunti i risultati ottenuti, in termini di produzione di VFA, per entrambi i reattori:  $VFA_{in}$  è la concentrazione di acidi grassi entrante nei reattori, data dalla media dei valori misurati in alimentazione allo stato stazionario e  $VFA_{out}$  è la concentrazione presente nell'effluente in uscita dai reattori, calcolato sempre tramite una media dei valori misurati con i vari campionamenti dal ricircolo dei reattori. Si può constatare, anche da questi dati, che in entrambi i reattori non vi è produzione di VFA, anzi si ha un consumo di acidi grassi volatili che quindi, con tutta probabilità, intervengono nel metabolismo dei microrganismi presenti nelle acque.

Tabella 4.1.1.1: Risultati ottenuti in termini di produzione di VFA al termine dell'esperimento

	$VFA_{in}$ (g <sub>COD</sub> /L)	$VFA_{out}$ (g <sub>COD</sub> /L)	VFA prodotti (g <sub>COD</sub> /L)	VFA prodotti/(tempo·volume) (g <sub>COD</sub> /L·d)
<b>GAC</b>	6,464 ± 0,247	0,188 ± 0,026	- 6,276	- 6,675
<b>VS</b>	6,464 ± 0,247	6,231 ± 0,297	- 0,233	- 0,248

Di seguito è riportato l'andamento della concentrazione dei vari VFA rispetto al tempo, nell'alimentazione e nei due reattori.

Figura 4.1.1.2: Concentrazione espressa in termini di COD dei vari acidi grassi in funzione del tempo nell'alimentazione

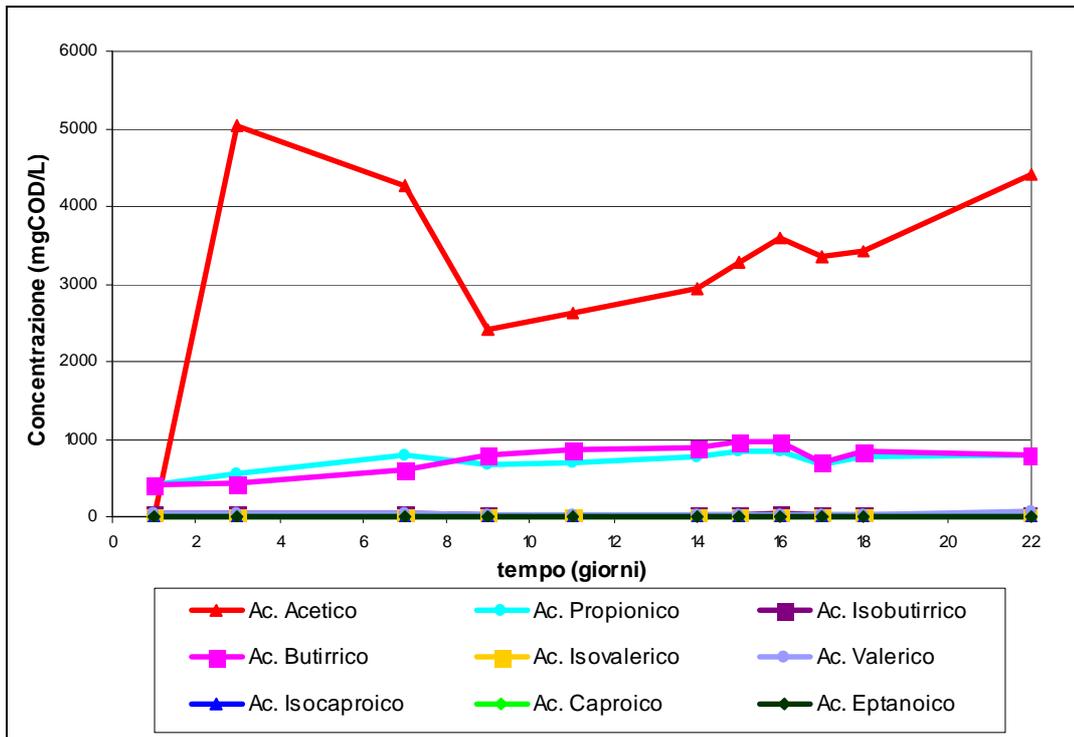


Figura 4.1.1.3: Concentrazione espressa in termini di COD dei vari acidi grassi in funzione del tempo nel reattore GAC

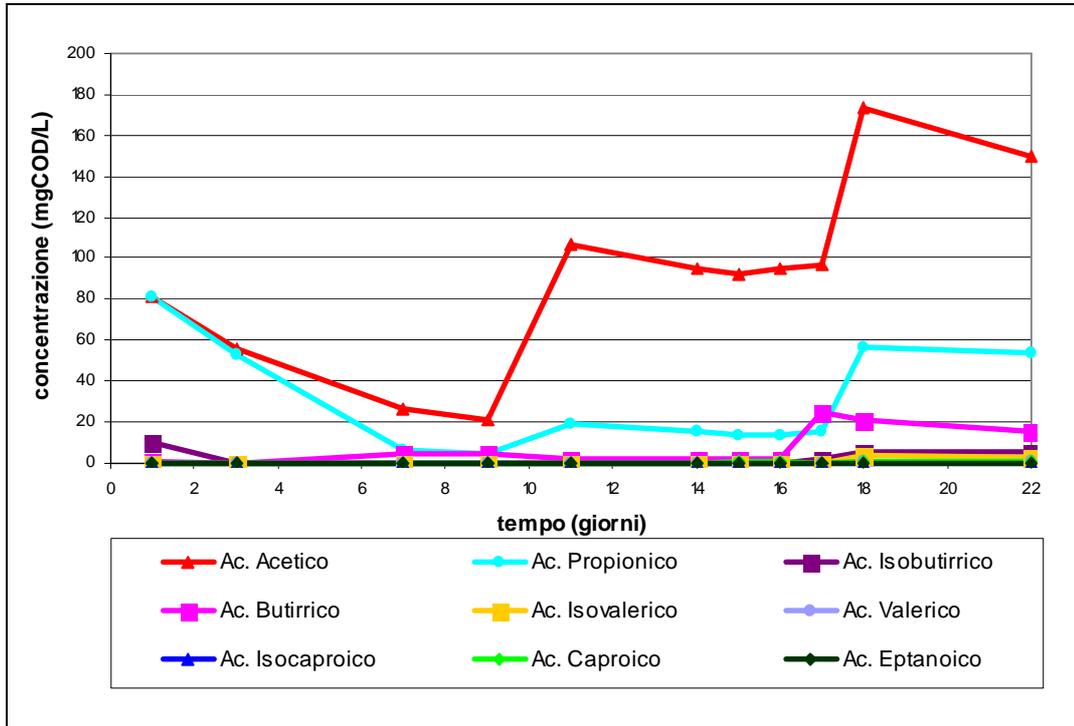
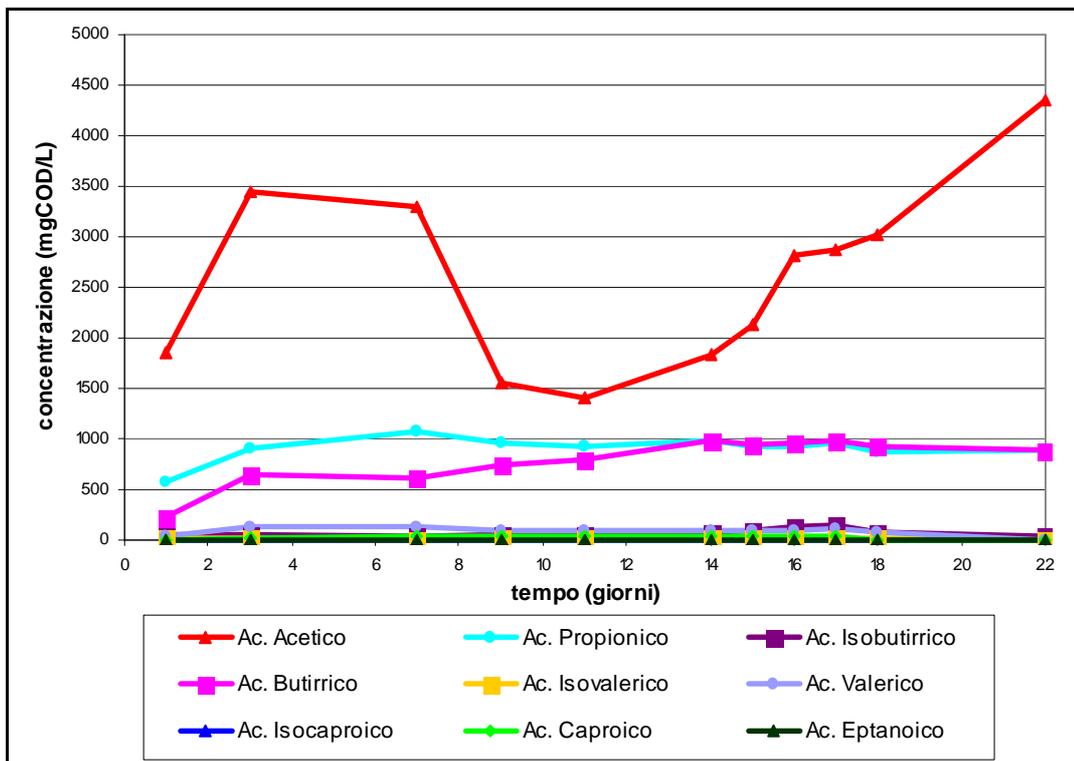


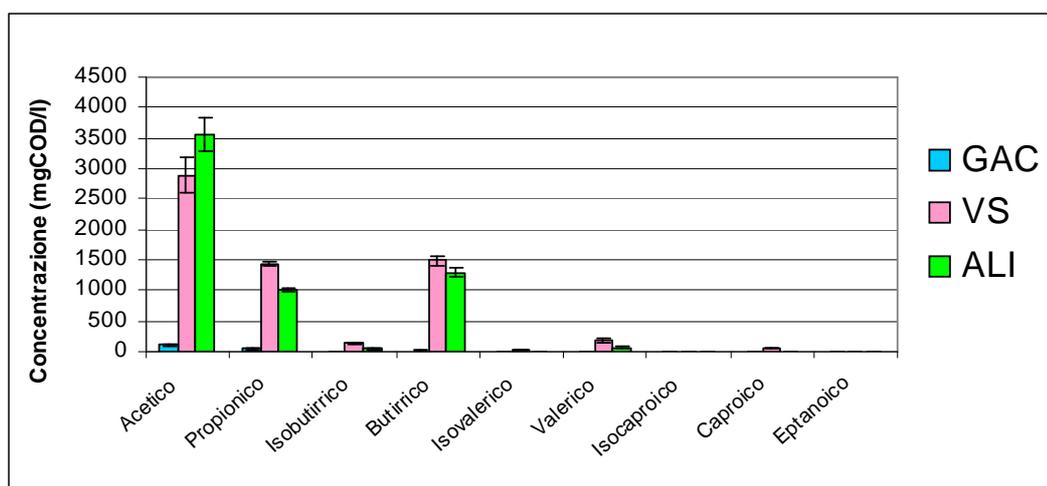
Figura 4.1.1.4: Concentrazione espressa in termini di COD dei vari acidi grassi in funzione del tempo nel reattore VS



Nel grafico di figura 4.1.1.5 sono riportate le concentrazioni medie dei singoli VFA in termini di COD per i due reattori e per l'alimentazione e le loro deviazioni standard rispetto alla rispettiva media.

Si può osservare che nei due reattori la concentrazione dell'acido acetico è inferiore di quella nell'alimentazione, mentre quella relativa agli altri acidi aumenta leggermente nel reattore VS e cala nel GAC. In particolare si nota che sia nell'alimentazione sia nei reattori predomina la presenza di acidi grassi a corta catena: in particolare acetico, propionico, butirrico.

Figura 4.1.1.5: Concentrazione media dei singoli VFA, espressa in termini di COD, per i due reattori e l'alimentazione



Nella tabella 4.1.1.2 sono riportate le percentuali dei singoli acidi grassi volatili presenti negli effluenti dei due reattori da cui si può ancora una volta constatare che predominano acido acetico, propionico e butirrico.

Tabella 4.1.1.2: Percentuali dei VFA sugli effluenti dei due reattori

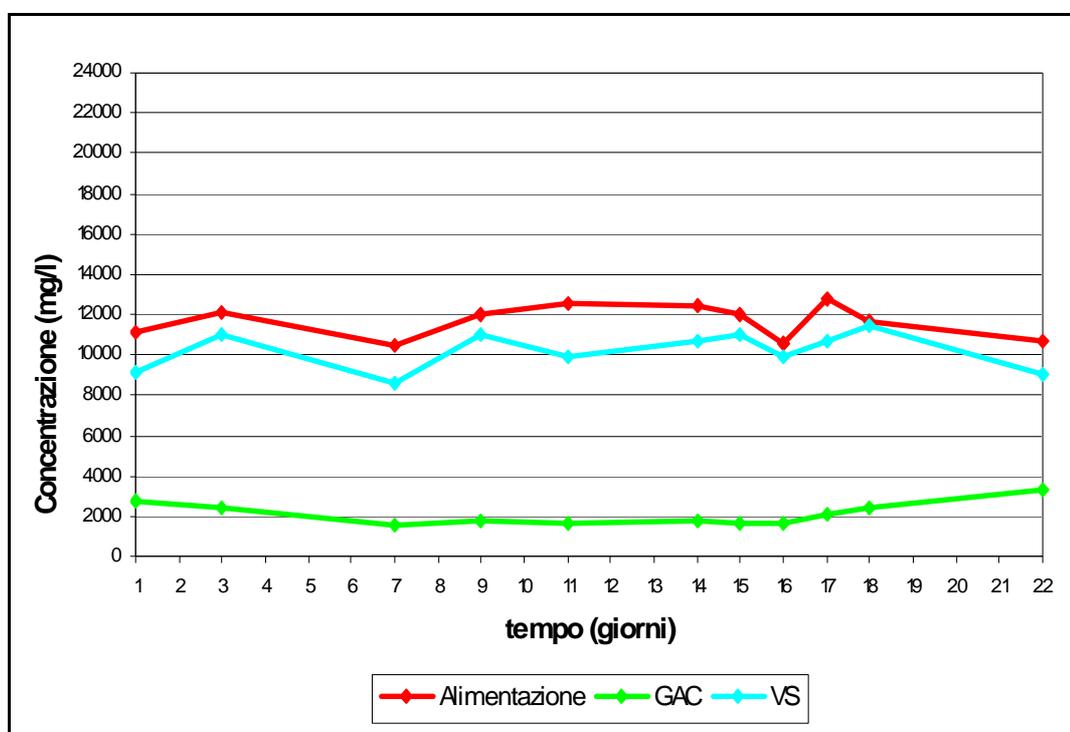
<b>Acidi grassi volatili</b>	<b>% su VFA totale GAC</b>	<b>% su VFA totale VS</b>
<i>Acido Acetico</i>	60,00 ± 9,111	46,33 ± 4,935
<i>Acido Propionico</i>	28,49 ± 7,305	22,97 ± 0,444
<i>Acido Isobutirrico</i>	2,39 ± 1,172	2,23 ± 0,342
<i>Acido Butirrico</i>	7,92 ± 2,984	24,02 ± 1,275
<i>Acido Isovalerico</i>	0,72 ± 0,492	0,47 ± 0,073
<i>Acido Valerico</i>	0,25 ± 0,154	2,91 ± 0,394
<i>Acido Isocaproico</i>	0,29 ± 0,072	0,02 ± 0,004
<i>Acido Caproico</i>	0,40 ± 0,127	0,89 ± 0,145
<i>Acido Eptanoico</i>	0,00 ± 0,000	0,15 ± 0,013

## 4.1.2 COD

E' stata eseguita l'analisi del COD dei numerosi prelievi effettuati dal brodo di coltura dei due reattori e dell'alimentazione.

L'andamento del COD in funzione del tempo è rappresentato in figura 4.1.2.1.

Figura 4.1.2.1: Andamento della concentrazione di COD in funzione del tempo per il reattore GAC, il reattore VS e per l'alimentazione.



Si può notare che le concentrazioni medie dei due reattori sono inferiori a quella media dell'alimentazione; questo a prova del fatto che il COD è stato in parte degradato, anche se per il VS la differenza risulta essere minima. Si può inoltre constatare che i valori si mantengono approssimativamente costanti quindi si può dire che si sono raggiunte condizioni di sufficiente stazionarietà.

Di seguito si riportano due tabelle: nella prima vi sono i valori ottenuti, espressi in termini di rimozione del COD; nella seconda i dati ottenuti da

bilanci di materia fra l'inizio e fine dell'esperimento che mettono in relazione il consumo di COD con la produzione di VFA. Essendo l'esperimento in continuo, è interessante indicare il valore del COD degradato per unità di tempo e di volume dei reattori (produttività volumetrica di rimozione del COD).

Tabella 4.1.2.1: Valori di COD misurati nei due reattori

	<b>COD<sub>in</sub> (g/L)</b>	<b>COD<sub>out</sub> (g/L)</b>	<b>COD degradato (g/L)</b>	<b>COD degradato (%)</b>	<b>COD degradato/(tempo·vol) [g/(L·d)]</b>
<b>GAC</b>	11,654 ± 0,250	2,082 ± 0,168	9,573	82,14	10,200
<b>VS</b>	11,654 ± 0,250	10,219 ± 0,290	1,435	12,32	1,524

La seguente tabella mostra i rapporti tra la concentrazione di VFA e COD in ingresso e in uscita dai due reattori; il rapporto tra i VFA prodotti e il COD iniziale, non costituito da VFA, e il rapporto tra i VFA in uscita e il COD in ingresso, indice che, in condizioni ottimali, dovrebbe tendere al rapporto tra VFA in uscita e COD in uscita poiché la quantità di COD degradata dovrebbe risultare quanto più bassa possibile.

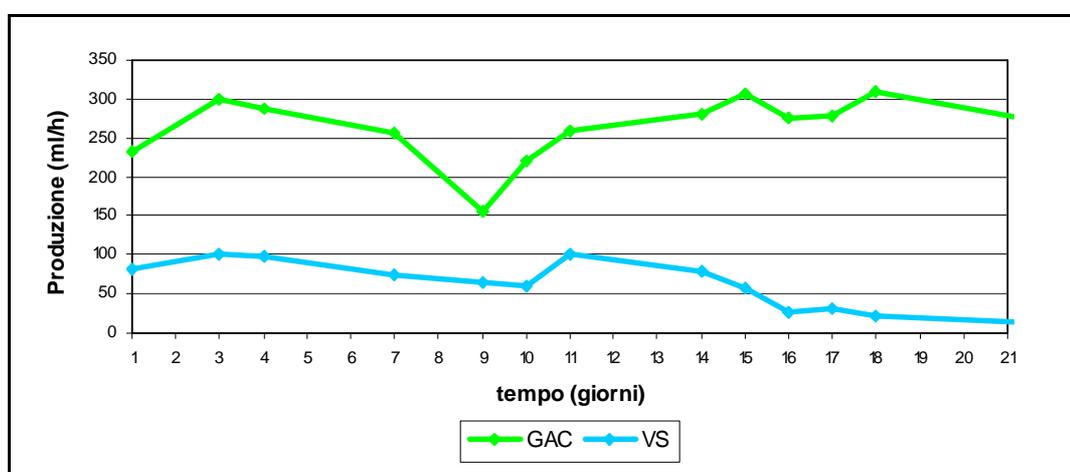
Tabella 4.1.2.2: Relazioni tra VFA prodotti e COD degradato per i due reattori

<b>Relazioni tra VFA prodotti e COD degradato</b>	<b>GAC</b>	<b>VS</b>
VFA <sub>in</sub> /COD <sub>in</sub> (%)	55,46	55,46
VFA <sub>out</sub> /COD <sub>out</sub> (%)	9,03	60,97
VFA prodotti/ (COD <sub>in</sub> -VFA <sub>in</sub> ) (%)	-120,92	- 4,49
VFA <sub>out</sub> / COD <sub>in</sub> (%)	1,61	53,47

### 4.1.3 Produzione di biogas

Del biogas è stata effettuata una misura quantitativa e una qualitativa. Per la prima si è utilizzato il sistema “Mariotte” con cui si è misurato il volume di biogas totale prodotto in un’ora; in figura 4.1.3.1 è graficato l’andamento del volume di biogas nel tempo nei due reattori.

Figura 4.1.3.1: Andamento della produzione di biogas in funzione del tempo per i reattori GAC e VS



Nel GAC la produzione di biogas è nettamente superiore rispetto al VS e dall’11° giorno (dal 16° giorno per il VS) la produzione si può considerare sufficientemente stazionaria.

Per l’analisi qualitativa sono state effettuate analisi con il gas-cromatografo, ottenendo la composizione percentuale dell’ O<sub>2</sub> e dei vari composti costituenti il biogas, cioè di N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>. Moltiplicando tali percentuali per il volume di biogas totale si sono ottenute quindi le portate dei vari gas prodotti ed è stata posta particolare attenzione alla produzione di metano. Nelle figure 4.1.3.2 e 4.1.3.3 sono riportate le portate di biogas totale prodotto (rappresentati dall’altezza totale dei blocchi bicolori), la parte costituita da metano e quella formata da gas diversi dal metano.

Figura 4.1.3.2: Portata di metano prodotto sulla portata totale di biogas in funzione del tempo per il reattore GAC

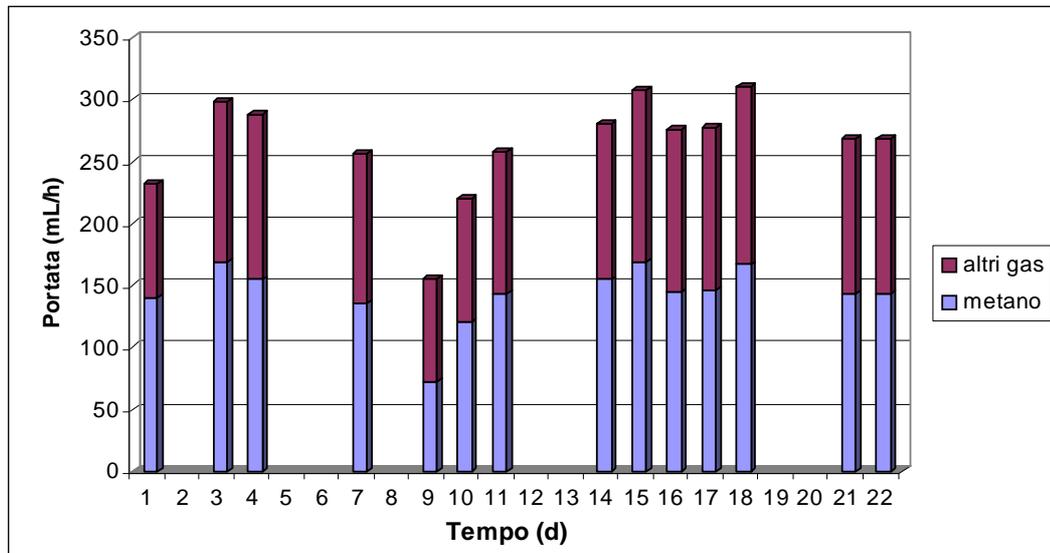
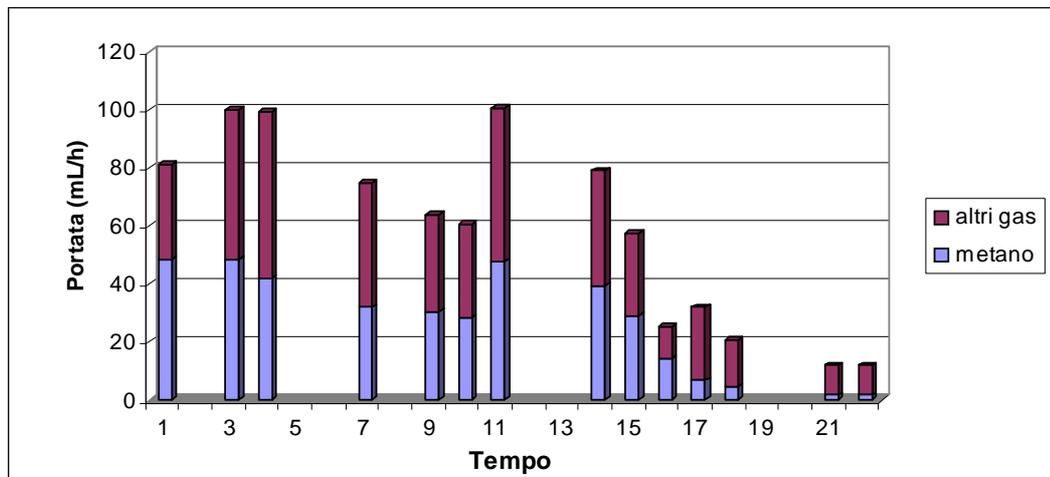


Figura 4.1.3.3: Portata di metano prodotto sulla portata totale di biogas in funzione del tempo per il reattore VS



Vi sono dati solo in corrispondenza dei giorni in cui abbiamo effettuato le misure; si può notare che c'è sempre stata produzione di biogas e il metano occupa sempre una buona parte della portata totale nel caso del GAC, mentre nel VS, soprattutto negli ultimi giorni, solo una minima parte del biogas è costituita da metano.

La misura del metano prodotto è particolarmente importante per comprendere l'attività dei batteri metanogeni che sono in grado di utilizzare i VFA come substrato di crescita. Esiste quindi un'interdipendenza tra la

produzione di VFA e CH<sub>4</sub> e, per ottenere un effluente ricco di VFA, è opportuno riuscire a fermare la fermentazione prima di arrivare alla produzione di metano.

Nella tabella 4.1.3.1 è riportata la produzione media di metano misurata durante tutto l'esperimento e la relazione tra questa produzione e la rimozione del COD: i litri di metano prodotti divisi per i grammi di COD degradato sono stati messi in relazione con il massimo valore di COD convertito a metano che si può teoricamente avere (0,35 g/l) sulla base di calcoli stechiometrici, considerando il gas come ideale a 273 K.

Tabella 4.1.3.1: Produzione di metano e relazione con la rimozione di COD per i due reattori

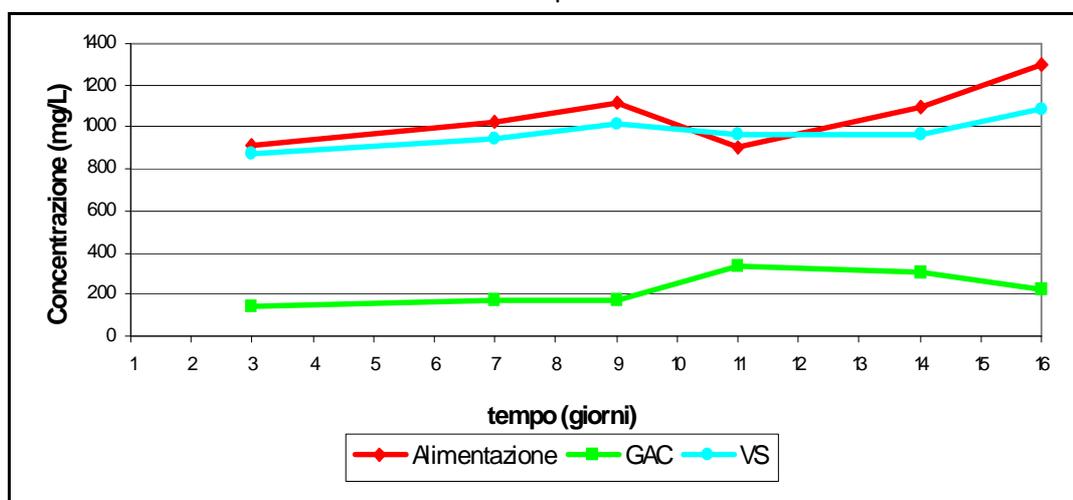
	<b>CH<sub>4</sub> prodotto (L/d)</b>	<b>CH<sub>4</sub>prodotto/CODdegradato (L/g)</b>	<b>COD convertito in CH<sub>4</sub> (%)</b>
<b>GAC</b>	3,660 ± 0,098	0,238	68,00
<b>VS</b>	0,170 ± 0,063	0,049	14,13

Anche dai valori della tabella si evince che nel reattore impaccato con GAC la produzione di metano è maggiore, così come la percentuale di COD convertito in metano.

## 4.1.4 Fenoli

I fenoli sono i maggiori responsabili della tossicità delle AV, quindi è importante ottenerne un'efficiente rimozione. Per questo motivo è stato osservato l'andamento della loro concentrazione nel tempo, riportato nei grafici della figura 4.1.4.1.

Figura 4.1.4.1: Andamento della concentrazione di fenoli in funzione del tempo per il reattore GAC, VS e per l'alimentazione



Non abbiamo a disposizione i dati corrispondenti a tutti i giorni perché alcune volte non è stato possibile misurare la concentrazione di fenoli a causa della torbidità delle soluzioni nei matracci all'uscita dalla stufa.

Si può notare che la concentrazione si mantiene pressoché stazionaria nel corso dell'esperimento. Nel caso del GAC vi è un netto calo della concentrazione di fenoli presente nell'alimentazione, mentre per il VS la diminuzione è decisamente meno evidente e ciò significa che la degradazione di fenoli risulta meno consistente.

Nella tabella sottostante sono riassunte le concentrazioni in ingresso e in uscita dei fenoli, i fenoli degradati rispetto al tempo e al volume e la percentuale di fenoli degradati la quale è decisamente superiore per il GAC.

Tabella 4.1.4.1: Risultati ottenuti in termini di rimozione dei fenoli per i due reattori

	<b>Fenoli<sub>in</sub></b> <b>(g/L)</b>	<b>Fenoli<sub>out</sub></b> <b>(mg/L)</b>	<b>Fenoli</b> <b>degradati</b> <b>(%)</b>	<b>Fenoli</b> <b>degradati/(tempo·volume)</b> <b>[mg/(L · d)]</b>
<b>GAC</b>	1,056 ± 0,060	0,226 ± 0,031	78,60	0,884
<b>VS</b>	1,056 ± 0,060	0,974 ± 0,028	7,73	0,086

## 4.2 Secondo esperimento (E25)

Anche il secondo esperimento è stato condotto in parallelo su entrambi i reattori impaccati con Carbone Granulare Attivo (GAC) e con Vukopor S10 (VS). All'interno dei reattori è stata mantenuta la stessa acqua di vegetazione in condizioni anaerobiche. La durata della prova è stata di 22 giorni e per questo tempo si è cercato di mantenere all'interno dei reattori una temperatura pari a 25°C e un carico organico di 8 mg/l-d, fornendo una portata di alimentazione calcolata come descritto nel paragrafo 4.1.

Il rapporto di ricircolo e il volume dei due reattori sono gli stessi di quelli utilizzati nel 1° esperimento.

I valori dei parametri riferiti al 2° esperimento sono riassunti in tabella.

Tabella 4.2.1: Parametri utilizzati nel 2° esperimento

	<b>T [°C]</b>	<b>COD</b> <b>[g/L]</b>	<b>Carico</b> <b>organico</b> <b>[g/L·d]</b>	<b>Volume</b> <b>effettivo</b> <b>reattore</b> <b>[L]</b>	<b>Q<sub>in</sub></b> <b>[L/d]</b>	<b>Q<sub>r</sub></b> <b>[L/d]</b>	<b>Tempo di</b> <b>residenza</b> <b>[d]</b>
<b>GAC</b>	25	11,849	8,399	1,511	1,071	34,629	1,411
<b>VS</b>	25	11,849	8,399	2,251	1,597	51,636	1,409

Come descritto nel paragrafo 4.1 il COD medio misurato nell'alimentazione si discosta un poco da quello che avevamo considerato per calcolare la portata in ingresso e quindi anche il carico organico è risultato essere leggermente diverso da quello calcolato sulla base della precedente caratterizzazione delle AV.

Sono state effettuate anche in questo caso analisi periodiche del liquido alimentato e di quello all'interno di ogni reattore, prelevandone campioni dai raccordi a "T". Si sono poi misurati e campionati i volumi di biogas prodotti.

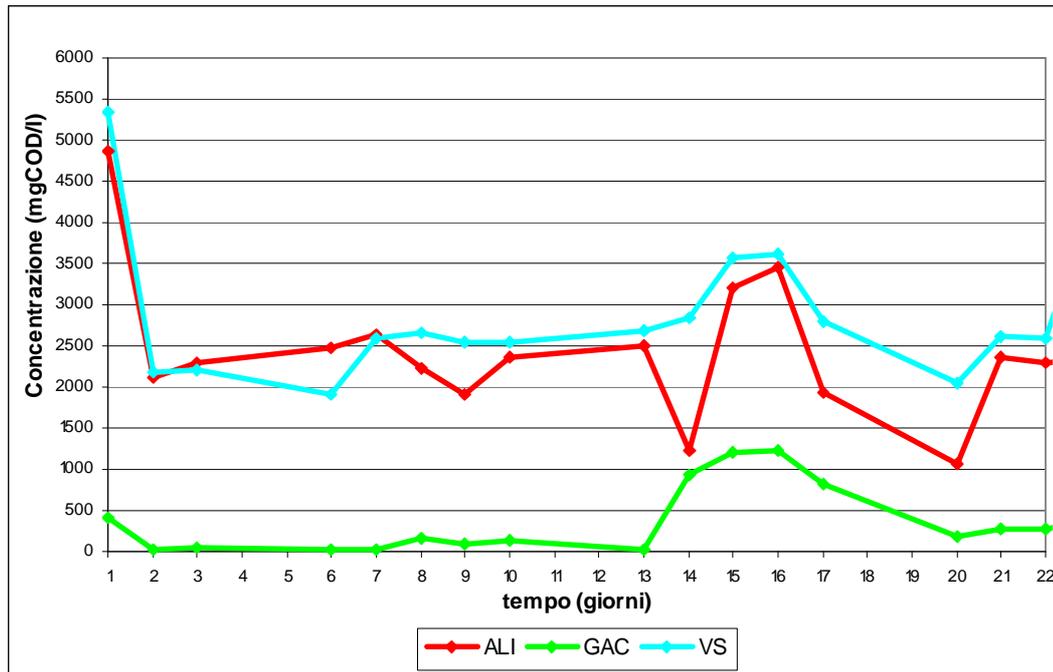
Nei paragrafi seguenti sono riportati i profili dei vari parametri in funzione del tempo per entrambi i reattori: VFA, COD, biogas, fenoli.

### ***4.2.1 Produzione di VFA***

I campionamenti di liquido e le misure della concentrazione di acidi grassi volatili sono stati anche in questo caso molto frequenti.

Nel grafico di figura 4.2.1.1 sono riportate le concentrazioni espresse in termini di COD dei VFA totali, in funzione del tempo, per i due reattori e per l'alimentazione.

Figura 4.2.1.1: Andamento della concentrazione di VFA totali, espressa in termini di COD, in funzione del tempo per i due reattori e per l'alimentazione



Si può notare che i profili di concentrazione dei VFA in entrambi i reattori seguono indicativamente l'andamento di quello relativo all'alimentazione; in particolare nel GAC si mantengono, anche questa volta, su valori più bassi rispetto all'alimentazione, mentre nel VS la concentrazione di VFA in uscita è leggermente superiore di quella in entrata; vi è quindi stata una modesta produzione di VFA.

Nella tabella 4.2.1.1 sono riassunti i risultati ottenuti, in termini di produzione di VFA, per entrambi i reattori. Si può constatare anche da tali valori che nel caso del GAC non si ha una produzione di VFA, bensì un loro consumo, mentre nel VS se ne ha una piccola produzione.

Tabella 4.2.1.1: Risultati ottenuti in termini di produzione di VFA

Reattori	VFA <sub>in</sub> (g <sub>COD</sub> /L)	VFA <sub>out</sub> (g <sub>COD</sub> /L)	VFA prodotti (g <sub>COD</sub> /L)	VFA prodotti/(tempo·volume) (g <sub>COD</sub> /L·d)
<b>GAC</b>	2,666 ± 0,282	0,573 ± 0,168	-2,093	- 1,483
<b>VS</b>	2,666 ± 0,282	3,397 ± 0,196	0,731	0,519

Di seguito è riportato l'andamento della concentrazione dei vari VFA rispetto al tempo, nell'alimentazione e nei due reattori.

Figura 4.2.1.2: Concentrazione espressa in termini di COD dei vari acidi grassi in funzione del tempo nell'alimentazione

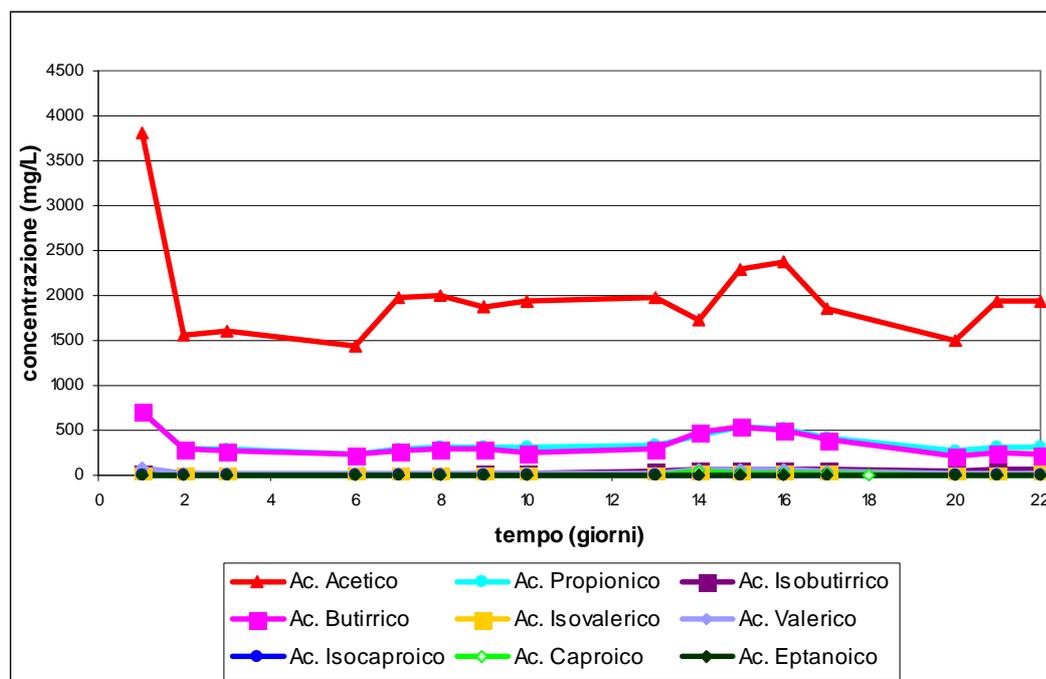


Figura 4.2.1.3: Concentrazione espressa in termini di COD dei vari acidi grassi in funzione del tempo nel reattore GAC

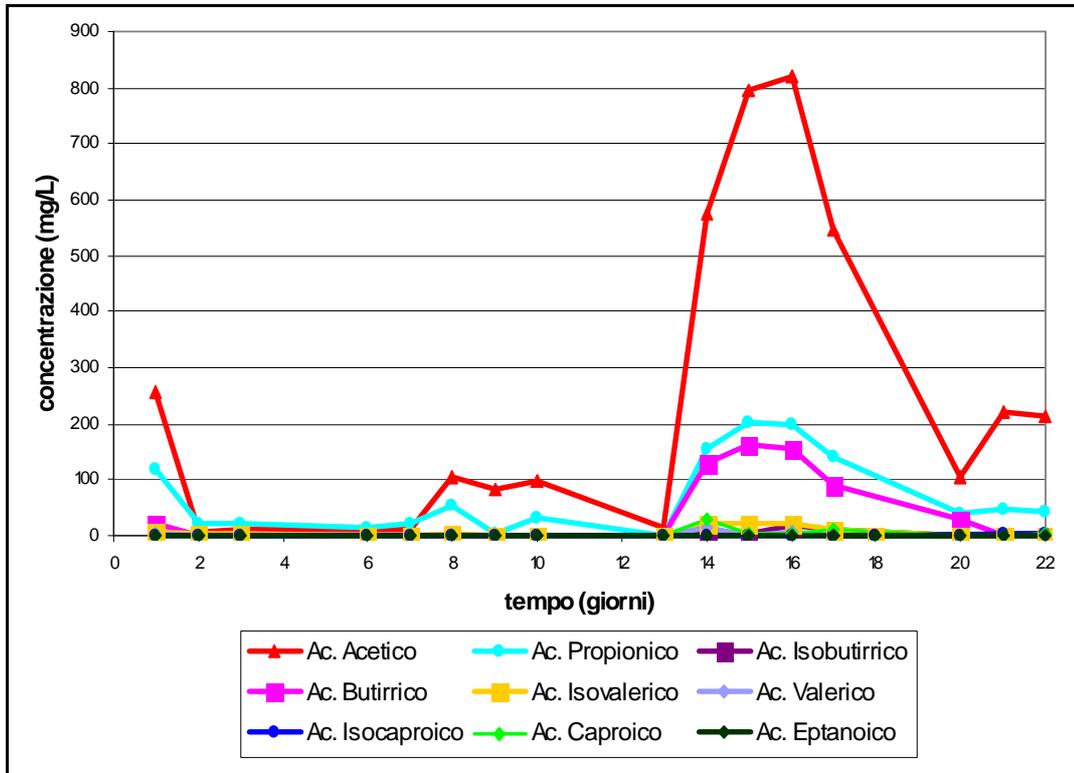
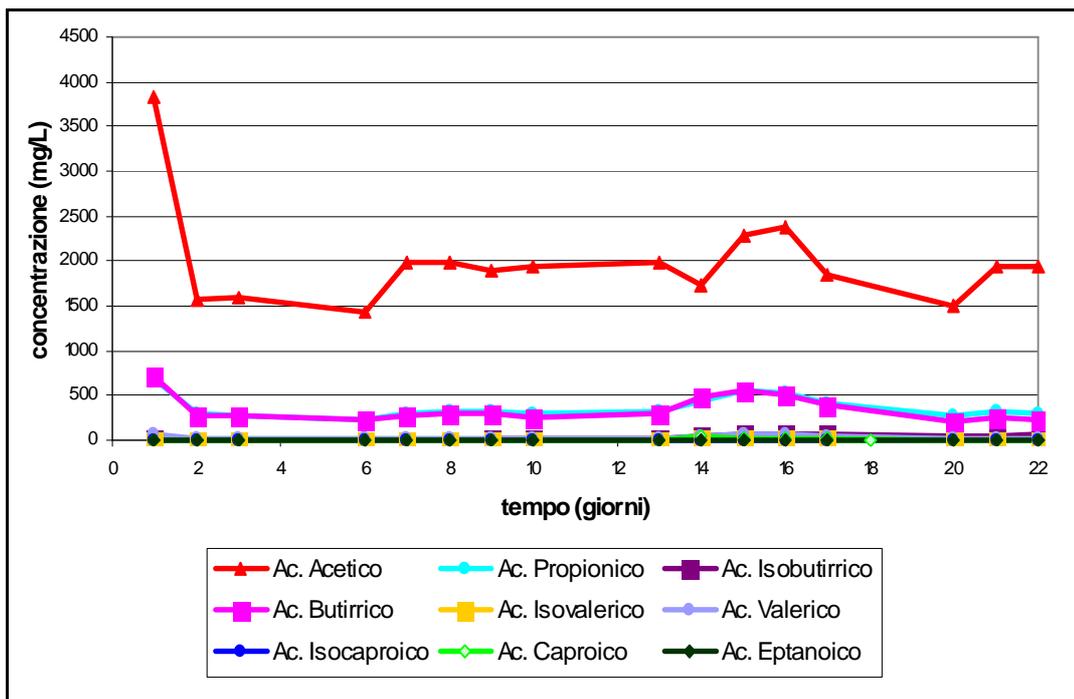


Figura 4.2.1.4: Concentrazione espressa in termini di COD dei vari acidi grassi in funzione del tempo nel reattore VS

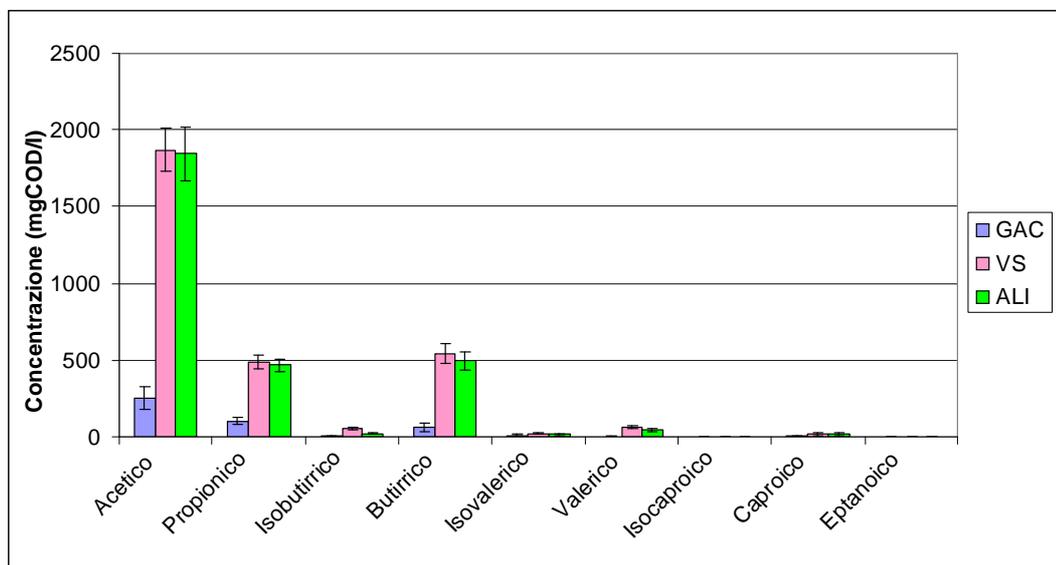


Nel grafico di figura 4.2.1.5 sono riportate le concentrazioni medie dei singoli VFA in termini di COD per i due reattori e per l'alimentazione.

Sono graficate anche la deviazioni standard dei valori misurati rispetto alla loro media.

Si può osservare che, anche in questo esperimento, in entrambi i reattori predomina la produzione dell'acido acetico, propionico e butirrico.

Figura 4.2.1.5: Concentrazione media dei singoli VFA, espressa in termini di COD, per i due reattori e l'alimentazione



Nella tabella 4.2.1.2 sono riportate le percentuali dei singoli acidi grassi volatili presenti negli effluenti dei due reattori.

Tabella 4.2.1.2: Percentuali dei VFA sugli effluenti dei due reattori

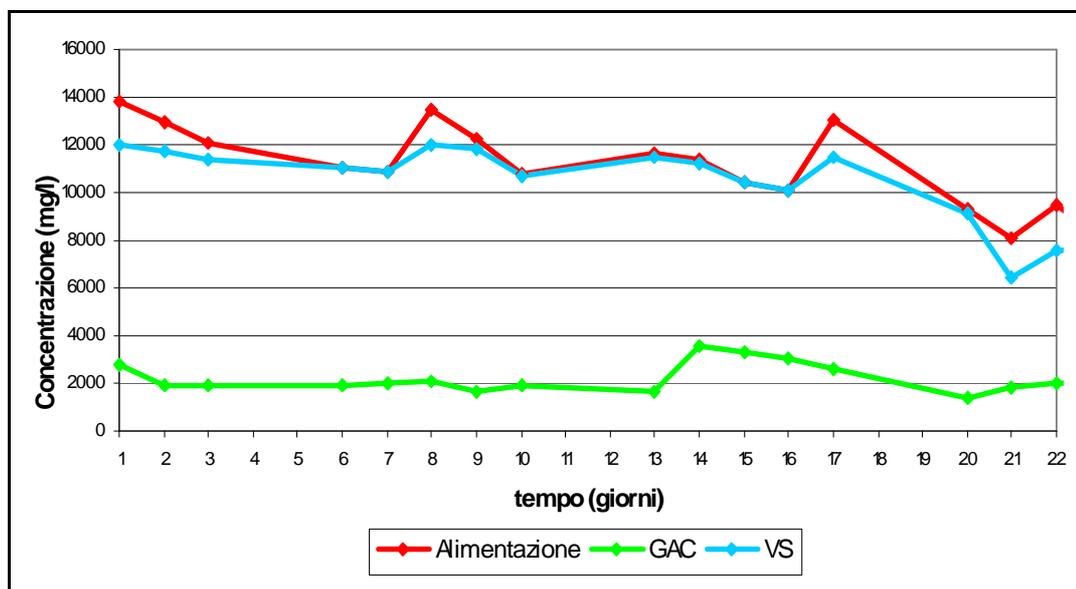
<b>Acidi grassi volatili</b>	<b>% su VFA totale GAC</b>	<b>% su VFA totale VS</b>
<i>Acido Acetico</i>	56,37 ± 15,92	61,02 ± 4,11
<i>Acido Propionico</i>	23,08 ± 5,54	15,99 ± 1,35
<i>Acido Isobutirrico</i>	1,03 ± 0,51	1,85 ± 0,30
<i>Acido Butirrico</i>	14,35 ± 5,82	17,78 ± 1,89
<i>Acido Isovalerico</i>	2,54 ± 0,92	0,65 ± 0,13
<i>Acido Valerico</i>	0,726 ± 0,45	2,051 ± 0,27
<i>Acido Isocaproico</i>	0,275 ± 0,15	0,047 ± 0,02
<i>Acido Caproico</i>	1,536 ± 0,87	0,581 ± 0,22
<i>Acido Eptanoico</i>	0,087 ± 0,05	0,000 ± 0,02

## 4.2.2 COD

Anche in questo esperimento è stata eseguita l'analisi del COD dei numerosi prelievi del brodo di coltura dei due reattori e dell'alimentazione.

L'andamento del COD in funzione del tempo è rappresentato in figura 4.2.2.1.

Figura 4.2.2.1: Andamento della concentrazione di COD in funzione del tempo per il reattore GAC, il reattore VS e per l'alimentazione



Si può notare che le concentrazioni medie del COD relative ai due reattori sono ancora una volta inferiori a quella media relativa all'alimentazione; ma per il VS la degradazione del COD presente nell'alimentazione è molto ridotta.

Di seguito sono riportate due tabelle: nella prima vi sono i valori ottenuti, espressi in termini di rimozione del COD e nell'ultima colonna è indicato anche il valore del COD degradato per unità di tempo e di volume dei reattori (produttività volumetrica di rimozione del COD).

Nella seconda vi sono i dati ottenuti da bilanci di materia fra l'inizio e la fine dell'esperimento che mettono in relazione il consumo di COD con la produzione di VFA.

Tabella 4.2.2.1: Valori di COD misurati nei due reattori

Reattori	COD <sub>in</sub> (g/L)	COD <sub>out</sub> (g/L)	COD degradato (g/L)	COD degradato (%)	COD degradato/(tempo·vol) [g/(L·d)]
<i>GAC</i>	11,849 ± 0,420	1,840 ± 0,149	10,008	84,47	7,094
<i>VS</i>	11,849 ± 0,420	11,111 ± 0,415	0,738	6,23	0,524

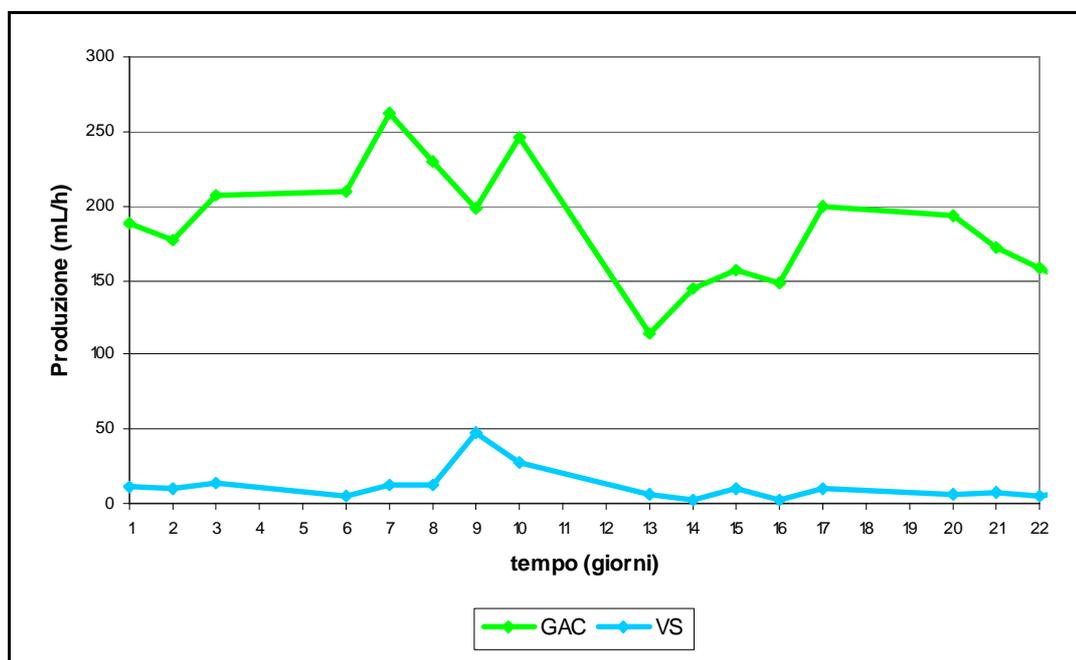
Tabella 4.2.2.2: Relazioni tra VFA prodotti e COD degradato per i due reattori

Relazioni tra VFA prodotti e COD degradato	<i>GAC</i>	<i>VS</i>
VFA <sub>in</sub> / COD <sub>in</sub> (%)	22,50	22,50
VFA <sub>out</sub> / COD <sub>out</sub> (%)	31,14	30,57
VFA prodotti / (COD <sub>in</sub> -VFA <sub>in</sub> ) (%)	- 16,15	5,65
VFA <sub>out</sub> / COD <sub>in</sub> (%)	4,83	28,66

### 4.2.3 Produzione di biogas

Anche in questo esperimento è stata effettuata una misura quantitativa e una qualitativa del biogas. L'andamento del volume di biogas totale prodotto nei due reattori, misurato con il sistema "Mariotte, è mostrato in figura 4.2.3.1 in funzione del tempo.

Figura 4.2.3.1: Andamento della produzione di biogas in funzione del tempo per i reattori GAC e VS



Nel GAC la produzione di biogas è nettamente superiore rispetto al VS.

Per quanto riguarda l'analisi qualitativa, di seguito sono riportati i risultati delle analisi eseguite con il gas-cromatografo; in particolare si possono leggere i valori delle portate di biogas totale prodotto, della parte costituita da metano e di quella formata da gas diversi dal metano.

Si fa sempre riferimento a valori a cui è stata applicata una correzione che tenga conto della presenza di aria nel campione.

Nelle figure 4.2.3.2 e 4.2.3.3 sono riportate le portate di biogas totale prodotto (rappresentati dall'altezza totale dei blocchi bicolori), la parte costituita da metano e quella formata da gas diversi dal metano.

Figura 4.2.3.2: Portata di metano prodotto sulla portata totale di biogas prodotto in funzione del tempo per il reattore GAC

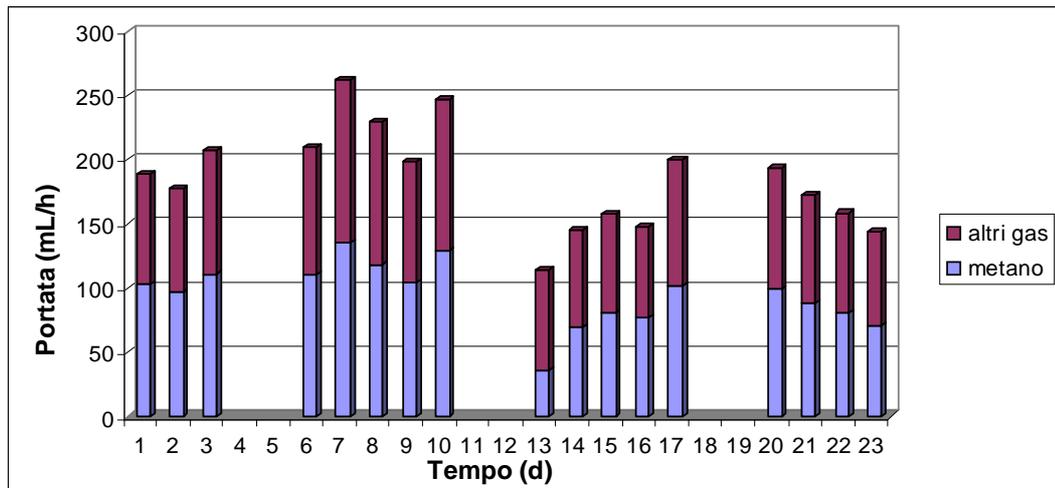
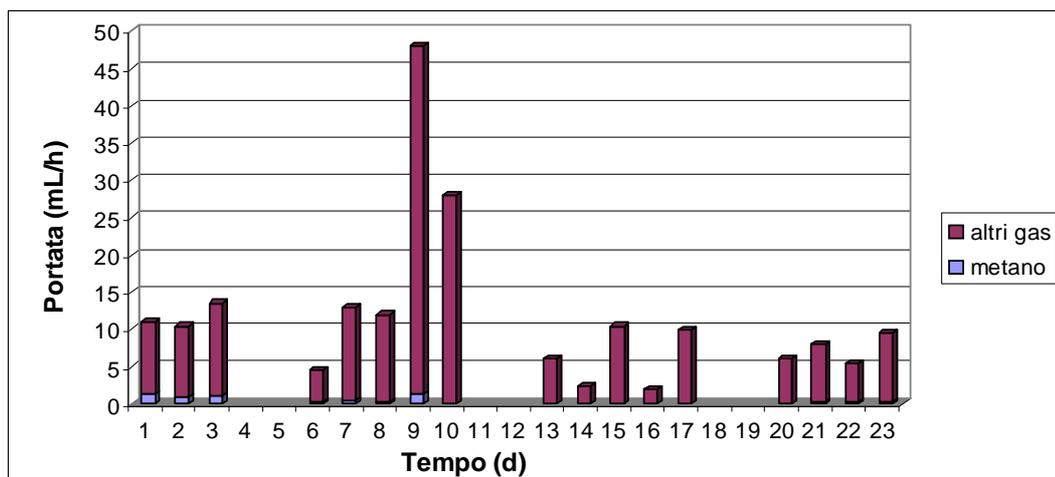


Figura 4.2.3.3: Portata di metano prodotto sulla portata totale di biogas prodotto in funzione del tempo per il reattore VS



Anche in questo caso vi sono dati solo in corrispondenza dei giorni in cui abbiamo effettuato le misure: è evidente che in entrambi i reattori c'è sempre stata produzione di biogas. Tale produzione per il GAC si è mantenuta quasi sempre tra i 150 e i 200 ml/h; mentre per il VS i valori erano notevolmente inferiori: quasi tutti tra i 5 e i 15 ml/h.

Inoltre si può facilmente notare che nel GAC il metano occupa una buona percentuale della portata totale, mentre nel VS solo una minima parte del biogas è costituita da metano che in alcuni casi è addirittura assente. Questo

prova che nel caso del VS si è riusciti a fermare la fermentazione prima di arrivare alla metanogenesi.

Nella tabella 4.2.3.1 è riportata la produzione media di metano che si è registrata durante l'esperimento e la relazione tra questa produzione e la rimozione del COD.

Anche i valori in tabella dimostrano che la produzione di metano è più consistente nel GAC.

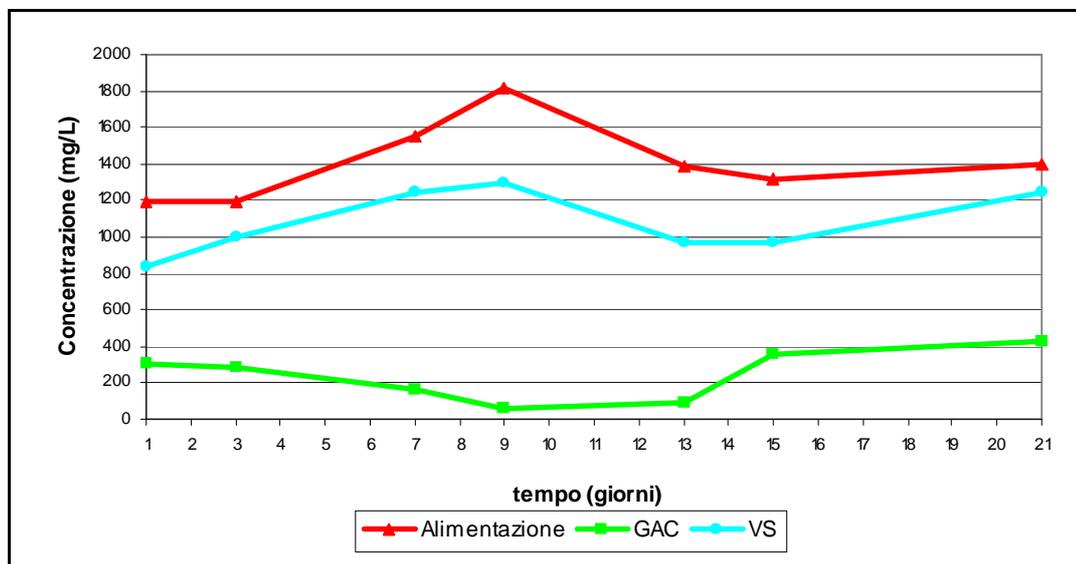
Tabella 4.2.3.1: Produzione di metano e relazione con la rimozione di COD per i due reattori

<b>Reattori</b>	<b>CH<sub>4</sub> prodotto (L/d)</b>	<b>CH<sub>4</sub>prodotto/CODdegradato (L/g)</b>	<b>COD convertito in CH<sub>4</sub> (%)</b>
<b>GAC</b>	2,050 ± 0,106	0,191	54,57
<b>VS</b>	0,010 ± 0,003	0,008	2,28

## 4.2.4 Fenoli

Come già detto i fenoli sono un parametro da tenere in considerazione in quanto sono tra i maggiori responsabili della tossicità delle AV a causa della loro azione antimicrobica; è quindi importante ottenerne un'efficiente rimozione. Per questo motivo è stato osservato l'andamento della loro concentrazione nel tempo, riportato nei grafici della figura 4.2.4.1.

Figura 4.2.4.1: Andamento della concentrazione di fenoli in funzione del tempo per il reattore GAC, VS e per l'alimentazione



Si può notare che la concentrazione si mantiene pressoché stazionaria dal 13° giorno in poi. Nel caso del GAC vi è un netto calo della concentrazione di fenoli presente nell'alimentazione, mentre per il VS, anche in questo esperimento, il calo è meno evidente e quindi la degradazione di fenoli risulta meno consistente.

Nella tabella sottostante sono riassunte le concentrazioni in ingresso e in uscita dei fenoli, i fenoli degradati rispetto al tempo e al volume e la percentuale di fenoli degradati che, come già detto, risulta decisamente superiore per il GAC.

Tabella 4.2.4.1: Risultati ottenuti in termini di rimozione dei fenoli per i due reattori

Reattori	Fenoli <sub>in</sub> (g/L)	Fenoli <sub>out</sub> (g/L)	Fenoli degradati (%)	Fenoli degradati/(tempo·volume) [g/(L·d)]
<b>GAC</b>	1,408 ± 0,083	0,242 ± 0,051	82,79	0,831
<b>VS</b>	1,408 ± 0,083	1,079 ± 0,067	23,33	0,233

La tabella seguente riassume i valori di tutti i parametri significativi per valutare il raggiungimento dello scopo della sperimentazione svolta.

Tabella 4.2.4.2: Tabella riassuntiva dei parametri più significativi

		VFA in uscita (g/L)	Produzione VFA (g <sub>COD</sub> /L)	COD degradato (%)	COD convertito in VFA (%)	COD convertito in CH <sub>4</sub> (%)	Fenoli degradati (%)
<b>E35</b>	<i>GAC</i>	0,188	- 6,276	82,14	- 120,92	68,00	78,60
	<i>VS</i>	6,231	- 0,233	12,31	- 4,49	14,13	7,73
<b>E25</b>	<i>GAC</i>	0,573	- 1,483	84,47	- 16,15	54,57	82,79
	<i>VS</i>	3,397	0,519	6,23	5,65	2,28	23,33

I VFA in uscita rappresentano un parametro discriminante per stabilire la possibilità di proseguire o meno il processo proposto da Dionisi *et al.*[7]; la produzione di VFA consente di stabilire se vi è stato un netto positivo; la percentuale di COD degradato è indicativa nel definire il raggiungimento del nostro obiettivo il quale non è tanto la degradazione del COD quanto piuttosto la sua trasformazione in VFA. Nella quarta e quinta colonna infatti

è riportata la percentuale di COD convertita rispettivamente in VFA e in metano; infine nell'ultima colonna vi è la percentuale di fenoli degradata, indicativa della tossicità rimossa dalle acque.

## 5. DISCUSSIONE

Le acque di vegetazione (AV) costituiscono un serio problema di carattere ambientale, sia a causa della loro elevata produzione (30 milioni di m<sup>3</sup> ogni anno nei paesi del Mediterraneo) [18], sia per l' elevato contenuto di COD che oscilla fra 50 e 150 g/l [19]. Le AV sono considerate un refluo a tasso inquinante fra i più elevati nell'ambito dell'industria agroalimentare e la loro tossicità è determinata in massima parte dalla componente fenolica [30]. Quindi lo smaltimento di tale scarto ed i processi depurativi sono stati oggetto di numerosi studi. Ma se da un lato rappresentano un importante problema di carattere ambientale ancora non completamente risolto, dall'altro costituiscono una potenziale risorsa rinnovabile: diversi studi sono stati condotti a tale scopo [25].

Recentemente si è proposto l'utilizzo di AV per la produzione di VFA da impiegare in un successivo stadio aerobico, in particolare è stato studiato un nuovo processo per produrre PHA, con velocità e rendimenti notevoli, da colture miste, molto più economiche di quelle pure [7]. In tale processo le colture miste sono prodotte dai fanghi attivi alimentati, in condizioni di alternanza di eccesso e carenza di substrato, con acidi grassi volatili (VFA) in condizioni aerobiche. L'intero processo si compone di tre fasi e utilizza come materia prima le acque di vegetazione (AV). La fermentazione acidogenica (in condizioni anaerobiche) delle AV è quindi condotta al fine di ottenere un effluente ad alta concentrazione di VFA. Più in dettaglio, di seguito vengono elencate e descritte le tre fasi del processo proposto da Dionisi *et al.*, (2005):

- 4) fermentazione acidogenica (in condizioni anaerobiche) delle AV al fine di ottenere un effluente ad alta concentrazione di VFA;
- 5) processo aerobico a fanghi attivi, condotto in un reattore discontinuo sequenziale (SBR), in cui l'effluente precedentemente ottenuto viene sottoposto a cicli di *feast* (alta disponibilità di substrato) e *famine* (carenza di substrato) al fine di selezionare popolazioni microbiche

aerobiche altamente in grado di trasformare gli acidi grassi volatili disponibili in polidrossialcanoati durante la fase di eccesso di substrato, e di utilizzarli in seguito come fonte interna di carbonio durante la fase di carenza, acquisendo quindi un vantaggio metabolico nei confronti delle popolazioni non in grado di accumulare i PHA come riserva di carbonio;

6) impiego della biomassa selezionata durante la seconda fase del processo in un reattore *batch* alimentato dall'effluente ricco in VFA ottenuto dalla fermentazione acidogenica delle AV.

In questa tesi è stata studiata la possibilità di sottoporre le AV ad un processo di digestione anaerobica finalizzato alla produzione di acidi grassi volatili, nell'ottica di utilizzare tali acque come materia prima per il processo sopra descritto.

A tale scopo sono stati utilizzati due bioreattori anaerobici a biomassa adesa, di identica configurazione, con cui si sono condotti due esperimenti in continuo a diverse temperature e carichi organici al fine di studiare l'influenza di tali parametri sul processo. Il primo esperimento è stato condotto a 35°C e carico organico pari a 12,394 g/L·d, il secondo a 25°C e carico organico pari a 8,399 g/L·d.

Si è scelto di allestire e mettere in opera un processo a cellule immobilizzate in quanto questa tecnologia si è rivelata vantaggiosa nel trattamento continuo di reflui ad alto contenuto di COD e carichi variabili (paragrafo 1.6.2). Inoltre si è scelto di lavorare in continuo poiché tale condizione, per debiti tempi di ritenzione idraulica, consente di minimizzare la metanogenesi, mediata da microrganismi con basse velocità specifiche di crescita. Per costituire il letto fisso dei due reattori si sono utilizzati due diversi tipi di supporto, in modo da poter studiare anche l'influenza di tale parametro, in particolare si è fatto uso di carbone attivo granulare (GAC) e filtri ceramici Vukopor S10 (VS). Il primo è stato scelto perché già dalle precedenti sperimentazioni, era risultato vincente nella digestione anaerobica delle AV [24], il VS perché si tratta di un materiale dotato di

grande stabilità meccanica e porosità, caratteristiche promettenti per un supporto di immobilizzazione.

Per rendere lo studio più efficiente si sono poi confrontati i risultati ottenuti nelle suddette sperimentazioni con quelli ricavati da alcune precedenti in cui entrambi i reattori erano mantenuti prima a 35°C e poi a 55°C, con carico organico pari a 8,399 g/L·d.

Confrontando i risultati si è visto che la massima quantità di VFA prodotta nell'ambito del presente studio si ha nel VS mantenuto a 25°C: in tale condizione (denominata VS25) si arriva infatti ad un valore di VFA prodotti pari a 0,731 g<sub>COD</sub>/L. Inoltre l'effluente in uscita risulta più concentrato in termini di VFA rispetto a quello in entrata: nell'alimentazione la percentuale di materiale organico presente sottoforma di acidi grassi volatili era del 22,50 % e tale percentuale, in uscita dai reattori, ha raggiunto il 30,57 %.

Il VS25 rappresenta anche la condizione in cui il COD degradato si è trasformato in percentuale minore a metano (2,28 %) e questo a prova del fatto che l'acidogenesi ha prevalso sulla metanogenesi.

Anche nella condizione più favorevole alla produzione di VFA però, si è riusciti ad ottenere una loro concentrazione in uscita (3,397 g/L) inferiore rispetto a quella di tentativo per il processo di produzione di PHA, sviluppato da Dionisi e collaboratori [7] relativa ad un medium sintetico (8,500 g/L di VFA).

Si può constatare che la modesta produzione di VFA non è dovuta all'eccessiva degradazione del COD, essendo questa nel VS25 appena pari al 6,23%, ma piuttosto è dovuta ad una scarsa concentrazione di VFA in uscita. Questo è di buon auspicio nell'ottica di ottimizzare il processo migliorandone le prestazioni, poiché è possibile aumentare tale concentrazione aumentando la conversione di COD in VFA che nel VS25 è pari a solo 5,65 %.

Per aumentare tale valore si può agire su vari parametri, quali la temperatura e il carico organico.

Confrontando gli esperimenti eseguiti con lo stesso reattore (VS) e stesso carico organico (pari a 8,399 g/L·d) ma a diverse temperature (25°C; 35°C;

55°C) si vede chiaramente che le basse temperature riducono la degradazione del COD, in particolare favoriscono la sua conversione in VFA e inibiscono l'attività metanogenica; cioè a temperature inferiori il COD si trasforma prevalentemente in acidi grassi piuttosto che in metano. Infatti i valori della conversione del COD in VFA sono stati pari a 5,65 % per il reattore a 25°C, pari a 6,6 % per quello a 35°C (il COD però è degradato in una percentuale che è 5 volte maggiore di quella del reattore a 25°C) e pari a 4,6 % per quello a 55°C; inoltre la conversione in metano era del 2,28 % a 25°C; 15,50 % a 35°C e 31,70 % a 55°C.

Per vedere l'influenza del carico organico si sono messi a confronto gli esperimenti eseguiti a 35°C a diverso carico organico (8,399 g/L·d e 12,394 g/L). Si è potuto constatare che in presenza di un minore carico organico una maggiore percentuale di COD veniva rimosso (32 % contro il 12 %) e di quello rimosso una percentuale, seppure bassa, veniva convertita in VFA (4,9 %) mentre con carico organico pari a 12,394 g/L i VFA venivano addirittura consumati per un'attività metabolica presente nel brodo di coltura. E' però da notare che con il carico organico più basso era maggiore anche la percentuale di COD iniziale convertita in metano (16 % contro 14%).

Quindi si evince che con minore carico organico l'attività metabolica del reattore risulta più elevata, non solo per quanto riguarda la fermentazione acidogenica, ma anche per quanto riguarda la metanogenesi.

Una soluzione quindi potrebbe essere utilizzare carichi organici alti, cercando di ottenere una maggiore conversione di COD in VFA lavorando a basse temperature.

Per quanto riguarda il reattore impaccato con carbone attivo la produzione di VFA è molto ridotta per tutti i valori di temperatura e carichi organici utilizzati. Si può quindi pensare ad un'applicazione diversa di tale tipo di reattore, ad esempio per la produzione di metano e quindi di energia.

Per poter proseguire su questa strada si dovrebbe però ottimizzare il processo in modo da rendere il rapporto tra il metano prodotto e il COD degradato il più possibile vicino a 0,35, cioè al valore massimo di COD

convertibile in metano [24]. Nelle mie sperimentazioni il valore massimo di tale conversione è stato raggiunto dal GAC a 35°C, in presenza di un carico organico pari a 12,394 g/L ed era pari a 0,238 L/g; in tali condizioni si è prodotto un quantitativo di metano pari a 3,660 L/d.

Analizzando comunque la produzione di VFA in reattore impaccato con GAC si vede che al diminuire della temperatura aumenta la percentuale di COD trasformata in metano e diminuisce quella convertita in VFA; è però da precisare che in condizioni termofile (55°C) la fermentazione acidogenica diminuisce notevolmente. Inoltre per temperature più basse la frazione di COD degradata è molto maggiore e questo non è di buon auspicio nell'ottimizzazione del processo, poiché aumentare la concentrazione di VFA in uscita non basterebbe ad averne una quantità sufficiente. Si può quindi dire che, per quanto riguarda la temperatura, quella ottimale risulta essere 35°C. Sempre per quanto riguarda il GAC, considerando come parametro variabile il carico organico si è visto che, per lo scopo da noi prefissato, è più favorevole un carico organico basso poiché, nonostante si abbia in entrambi i casi un consumo di VFA, nel caso di un carico organico più basso il consumo risulta notevolmente inferiore (- 16,15 %) mentre per alto carico organico si ha una produzione di VFA pari a - 120,92 %, quindi un più elevato consumo. Inoltre in corrispondenza di carico organico più basso vi è una minore conversione del COD iniziale in metano e in generale una minore degradazione del COD.

Studiando ora la composizione di VFA nei due reattori si vede chiaramente che in tutte le condizioni analizzate l'effluente era formato prevalentemente da acido acetico, propionico e butirrico. Tali acidi sono substrati determinanti per la produzione del copolimero P[(HB/HV)] nell'ambito del processo a tre fasi sopra descritto [7]: in particolare, l'acido propionico è il substrato impiegato nell'attività metabolica per la produzione di HV.

Analizzando l'influenza di temperatura e carico organico su ognuno dei tre acidi si può vedere che per l'acido acetico sono più favorevoli le basse temperature e i ridotti carichi organici; per l'acido propionico le basse temperature e gli alti carichi organici; infine per il butirrico sono più

favorevoli le basse temperature e i carichi organici bassi per il VS, i carichi più alti per il GAC.

La percentuale di rimozione dei composti fenolici è stata molto più contenuta nel VS piuttosto che nel GAC, ciò potrebbe contribuire a spiegare la quasi nulla produzione di metano nei reattori impaccati con VS; infatti è stato testato che i composti fenolici hanno capacità inibente nei confronti della metanogenesi [16]. Si dovrà pertanto trovare un compromesso tra il livello di tossicità tollerabile nelle acque, in termini di concentrazione fenolica, e la presenza di un'attività metanogenica. In particolare si è verificato che per il GAC la maggiore rimozione di fenoli si ha per più alti carichi organici e basse temperature; mentre per il VS si ha per carichi organici inferiori e temperature intermedie (35°C).

Concludendo, i risultati ottenuti in termini di produzione di acidi grassi volatili non sono stati ancora del tutto soddisfacenti, anche se comunque si sono ottenuti effluenti con una maggiore concentrazione di VFA rispetto alle precedenti sperimentazioni. Nei futuri esperimenti in continuo dovranno essere variati alcuni parametri di esercizio eventualmente in grado di influenzarne la produzione al fine di aumentare le *performances* del sistema. In particolare è opportuno verificare le risposte del sistema al variare delle condizioni in alimentazione: allo scopo si potrebbe tentare di lavorare con acque di vegetazione più concentrate, cioè con un COD maggiore, ottenendo così un effluente avente una concentrazione tale da permettere il proseguo del processo per la produzione di PHA, secondo le indicazioni preliminari della ricerca condotta da Dionisi e collaboratori [7].

Sarà anche opportuna un'integrazione di questo processo anaerobico con quello aerobico a fanghi attivi in SBR per verificare la risposta del processo aerobico qualora l'alimentazione sia costituita dall'effluente in uscita dai reattori invece che dalla miscela sintetica di acidi grassi utilizzata da Dionisi *et al.*[7]. L'effluente in uscita dai reattori, infatti, è costituito da una miscela contenente una vasta gamma di composti organici oltre ai VFA e potrebbero anche essere presenti composti tossici in concentrazioni tali da inibire il reattore SBR.

## 6. CONCLUSIONI

Sono stati allestiti due bioreattori anaerobici a biomassa adesa, di identica configurazione, differenziati solo dal tipo di supporto utilizzato come letto fisso: in uno vi era carbone attivo granulare, nell'altro Vukopor S10.

Con tali reattori si sono condotti due esperimenti per la fermentazione acidogenica di acque di vegetazione (AV) al fine di ottenere un effluente ricco di acidi grassi volatili (VFA) che potesse alimentare le successive fasi di un processo di produzione di PHA.

Per ottimizzare il processo, già studiato in precedenti sperimentazioni, sono stati condotti due esperimenti in continuo a diversi valori di temperatura e carico organico al fine di studiare l'influenza di tali parametri sul processo. Nel primo la temperatura è stata mantenuta a 35°C e il carico a 12,394 g/L·d, nel secondo la temperatura era di 25 °C e il carico organico pari a 8,399 g/L·d.

Il maggiore accumulo di VFA si è ottenuto all'interno del reattore impaccato con VS e tenuto a 25°C; in tali condizioni la conversione di COD a VFA era circa del 6% e l'effluente conteneva acidi grassi volatili ad una concentrazione di  $\approx 3,40 \text{ g}_{\text{COD}}/\text{L}$ .

E' stata quindi ottenuta una concentrazione di acidi grassi volatili circa 2,5 volte inferiore a quella di tentativo applicata nella ricerca di Dionisi *et al.* [7]. Si rendono quindi necessari ulteriori esperimenti allo scopo di massimizzare la produzione di VFA. Si potrebbe utilizzare l'impianto biotecnologico impaccato con VS, alimentato con acque di vegetazione più concentrate, cioè con un COD maggiore, ottenendo così un effluente con una concentrazione di VFA tale da favorire il proseguo del processo produttivo di PHA.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- [1] L. D'Avino, L. Lazzeri *Biopolimeri e nuovi materiali rinnovabili*. Chimica Verde, <http://www.chimicaverde.it/biopolimeri.php>
- [2] M. Valera (2001) Polioidrossialcanoati, polimeri biodegradabili del futuro? *Chimica e industria*.
- [3] D. Dionisi , M. Beccari, S. Di Gregorio, M. Majone, M. Petrangeli Papini, G. Vallini (2005) Storage of biodegradable polymers by an enriched community in a sequencing community in a sequencing *batch* reactor operated at high organic load rate. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **80**: 1306-1318.
- [4] D. Dionisi, M. Majone, V. Papa, M. Beccari (2004) Biodegradable polymers from organic acids by using activated sludge enriched by aerobic periodic feeding, *Biotechnonology and bioengineering* **85**: 569-579.
- [5] H. Salehizadeh, M.C.M. Van Loosdrecht (2004) Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance, *Biotechnonology Advances* **22**: 261-279.
- [6] M.A.M. Reis, L.S. Serafim, P.C. Lemos, A.M. Ramos, F.R. Aguiar, M.C.M. Van Loosdrecht (2003) *Bioprocess Biosyst Engineering* **25**: 377-385.
- [7] D. Dionisi, G. Carucci, M. Petrangeli Papini, C. Riccardi, M. Majone, F. Carrasco (2005) Olive oil mill effluents as a feedstock for production of biodegradable polymers, *Water research* **39**: 2076-2084.
- [8] Aktas E.S., Imre S., Ersoy L., (2001) Characterization and lime treatment of olive mill wastewater. *Water research*,**35** (9), 2336-2340.
- [9] Boari G., Mancini I.M. (1987) *Trattamenti delle acque di vegetazione*. *Ingegneria sanitaria* **12**:165-172.

- [10] Capasso R., Evidente A., Schivo L., Orru G., Marcialis M.A., Cristinzio G. (1995) Antibacterial polyphenols from olive mill wastewaters. *J. Appl. Bacteriol* **79**: 393-398, 1995.
- [11] Polimerica – attualità e notizie del mondo della plastica
- [12] relazione finale del progetto ACTIVA promosso e cofinanziato da ARSIA - Regione
- [13] Armenante P.M. (1998) Suspended-biomass and fixed-film reactors. In Lewandowski G.A. and De Filippi L.J. (Eds.) *Biological treatment of hazardous wastes*. Wiley New York, 1-34.
- [14] Fletcher M. (1984) Comparative physiology of attached and free-living bacteria. In *Microbial Adhesion and Aggregation*, ed. M. Marshall. Dahlem Konferenzen *Life Sciences Research Rep.* **31**, Springer, Berlin: 223-232.
- [15] Bettazzi E., Morelli M., Caffaz S., Caretti C., Azzari E., Lubello C. (2006) Olive mill wastewater treatment: an experimental study. *Water Science & Technology*, **54**, No 8, 17-25.
- [16] Beccari M., Majone M., Riccardi M., Bavarese C., Torrisi L., (1999) Integrated treatment of olive oil mill effluents: effect of chemical and physical pretreatment on anaerobic treatability. *Water Science and Technology*, **40** (1), 347-355.
- [17] Gernjak W., Maldonado M.I., Malato S., Caceres J., Krutzler T., Glaser A., Bauer R., (2004). Pilot-plant treatment of olive mill wastewater (OMW) by solar TiO<sub>2</sub> photocatalysis and solar photo-Fenton. *Solar Energy*, **77**, 567-572.
- [18] Dionisi D., Carucci G., Petrangeli Papini M., Magone M., Carrasco F., (2002). Olive oil mill effluents as a feedstock for production of biodegradable polymers. *Water Research*, **39** (10), 2076-2084.
- [19] Rozzi A., Malpei F. (1996) Treatment and disposal of olive mill effluents, *International biodeterioration & biodegradation* 135-144.
- [20] Ehaliotis C., Papadopoulou K., Kotsu M., Mari I., Balis C. (1999) Adaptation and population dynamics of *Azotobacter vinelandii* during

aerobic treatment of olive-mill wastewater. *FEMS Microbiology Ecology* **30**:301-311.

[21] Andreozzi R., Longo G., Majone M., Modesti G. (1998) Integrated treatment of olive oil mill effluent: study of ozonation coupled with anaerobic digestion. *Water Research* **32**: 2357-2364.

[22] Carlini C. (1992) Trattamento dei reflui: le acque di vegetazione dei frantoi oleari. *CEEP/Ambiente*, n° 3 (suppl.).

[23] Fedorak P.M., Hrudey S.E. (1984) The effects of phenols and some alkyl phenolics on *batch* anaerobic methanogenesis. *Water Research*, **18**: 361-367.

[24] Bertin L., Berselli S., Fava F., Petrangeli-Papini M., Marchetti L. (2004) Anaerobic digestion of olive mill wastewater in biofilm reactors packed with granular activated carbon and “Manville” silica beads. *Water research* **38**: 3167-3178.

[25] Bertin L., Colao M.C., Ruzzi M., Fava F. (2004) Performances and microbial features of a granular activated carbon packed-bed biofilm reactor capable of an efficient anaerobic digestion of olive mill wastewaters. *FEMS microbiology ecology* **48**: 413-423.

[26] Shreve, G. S. & Vogel, T. M. (1993) Comparison of substrate utilization and growth kinetics between immobilized and suspended *Pseudomonas* cells. *Biotechnology & Bioengineering*. **41**: 370-379.

[27] Bertin L., Majone M., Di Gioia D., Fava F. (2001) An aerobic fixed-phase biofilm reactor system for the degradation of the low molecular weight aromatic compounds occurring in the effluents of anaerobic digestors treating olive mill wastewaters. *Journal of Biotechnology* **87**: 161-177.

[28] Fava F., Di Gioia D., Marchetti L., Quattrini G. (1996b) Aerobic dechlorination of low-chlorinated biphenyls by bacterial biofilms in packed-bed bioreactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**: 562-568.

[29] D’Avino L., L. Lazzeri (2007) Biopolimeri e nuovi materiali rinnovabili.

[30] Cabrera F., Lopez R., Martinez-Bordiù A., Dupuy de Lome E., Murillo J.M. (1996) Land treatment of olive oil mill wastewater. *International biodeterioration & biodegradation* 215-225.

[31] Decreto 6 luglio 2005, n. 152, Criteri e norme tecniche generali per la disciplina dell'utilizzazione agronomica delle acque di vegetazione e degli scarichi di frantoio oleari), *Ministero delle Politiche Agricole e Forestali*.

[32] Legge 11 novembre 1996, n. 574, Nuove norme in materia di utilizzazione agronomica delle acque di vegetazione e di scarichi di frantoi oleari.

## 8. RINGRAZIAMENTI

Al termine di questa mia esperienza universitaria desidero ringraziare:

- il prof. Fabio Fava per avermi proposto questa interessante ricerca grazie a cui ho imparato l'utilizzo di vari strumenti di laboratorio e di tecniche di analisi di cui prima avevo solo sentito parlare; inoltre lo ringrazio per aver avuto sempre fiducia nelle mie capacità;
- Lorenzo Bertin, una persona veramente ammirevole che con la sua infinita disponibilità, calma e serenità è riuscito a placare le mie ansie; senza di lui non sarebbe stato possibile portare a termine questa ricerca che, grazie anche alla sua simpatia, è risultata essere molto piacevole;
- Daniela Todaro, per avere avuto una gran pazienza nei miei confronti, soprattutto i primi giorni, quando la tempestavo di domande sul funzionamento di ogni strumento, per avermi insegnato i tanti "segreti" del laboratorio e per la disponibilità e interessamento che mi ha dimostrato in questi mesi;
- tutti i ragazzi che frequentavano il laboratorio: Juan per la sua amicizia e disponibilità, Marta, Luigi, Daniele, Lele, Andrea, Sara, Laura, Sara, Giulio, Andrea e Maria per l'accoglienza e la simpatia e che mi hanno dimostrato; con loro era davvero piacevole trascorrere il tempo in laboratorio!
- I miei genitori, così premurosi e comprensivi; a loro il ringraziamento più grande perché mi hanno permesso di iniziare questa importante esperienza universitaria e di portarla a termine nella facoltà che preferivo, anche se più lontana da casa, accettando, con non pochi dispiaceri, che abitassi a Bologna per questi due anni. Per me è stata un'esperienza davvero piacevole, utile e importante e gliene sarò riconoscente per sempre;
- Il mio ragazzo Tiziano, non so proprio come avrei fatto a superare tutte le mie paure e preoccupazioni (molte volte esagerate) senza di lui! Con infinita pazienza mi ha sostenuto nei periodi di intenso

studio, mi ha aiutato a credere nelle mie capacità e soprattutto non mi ha mai fatto mancare il suo appoggio e la sua comprensione anche quando era difficile sopportarmi e trovarmi con la mente completamente libera per lui!! Mi ha aiutato molto, non solo psicologicamente, ma anche con le sue utili consulenze informatiche, anche notturne, facendomi capire che posso contare su di lui in ogni momento;

- La mia fidata sorellina Silvia e mio cognato Simone, anche se spesso lontani sono sempre stati interessati (anche se non si ricordavano mai il nome “complicato” dell’esame che dovevo fare!) e a me molto vicini nelle delusioni e nei successi, scolastici e non. Mi hanno aiutato con preziosi consigli e soprattutto regalato piacevoli ore in loro compagnia appena potevano tornare a San Martino, trasmettendomi una gran carica e gioia di vivere;
- Lo zio Erio e la zia Vanna sempre pronti a sostenermi i giorni prima degli esami; senza le verdure fresche del loro orto non sarei riuscita a mandare giù niente in quei giorni;
- Luana e Savi, insieme formavamo un trio veramente fantastico con cui ho passato i più bei momenti di questi due anni a Bologna; un trio che rimpiangerò e ricorderò sempre con tanto piacere. Luana si è dimostrata un’amica con la “A” maiuscola, tra noi è nata una profonda amicizia basata sulla lealtà e complicità. Senza di lei non sarei arrivata qui: i primi mesi in una nuova facoltà, in cui non conoscevo nessuno, non sono stati facili e senza il suo sostegno probabilmente non sarei riuscita a portare avanti la mia scelta. Inoltre sostenere gli esami insieme a lei è stato per me un grande aiuto, grazie alla sua semplicità e spensieratezza e al sostegno che mi ha sempre dato, facendomi credere che ce la potevo fare. Savi è stato ed è tuttora per me un esempio di disponibilità. Credo non lo ringrazierò mai abbastanza per quello che ha fatto in questi anni per me;
- Chiara, la mia compagna di “viaggio” da una vita; per fortuna la nostra amicizia è rimasta salda come prima, nonostante questi due

anni trascorsi in facoltà diverse e affrontando esperienze diverse. Pur essendo impegnata in mille cose, non mi ha mai fatto mancare l'”in bocca al lupo” per ogni esame, mi è stata vicina nei momenti in cui ero demoralizzata ed è stata pronta a tutto per aiutarmi a risolvere ogni problema, anche mobilitando mezzo mondo. Le devo davvero tanto!

- La mia Annola, amica di cui vado molto orgogliosa! Grazie a lei ogni problema diventava una sciocchezza; quando a volte mi lasciavo prendere dalla mia vita un po' frenetica mi ha ricordato quali sono le cose veramente importanti nella vita e di cui devo essere felice e riconoscente. Con lei ho trascorso praticamente tutta la mia vita e nonostante negli ultimi due anni (in cui ero spesso a Bologna) ci vedessimo meno è sempre stata presente e soprattutto interessata alla mia vita universitaria e non e per me è stato davvero importante;
- Enrica, un'amica riscoperta in questi ultimi anni, con cui sono stata contenta di condividere gioie e dolori; una persona così pronta ad ascoltarmi non l'ho mai conosciuta!
- Le mie “colleghe” ballerine; con cui negli ultimi mesi ho trascorso gran parte del mio tempo libero; nonostante il tanto impegno che ci richiedevano grazie a loro il tempo volava ed era un piacere fare le prove!
- I miei compagni di corso di questi due anni: Manu, sempre così disponibile e pronta ad aiutarmi per ogni cosa, dai passaggi in macchina alle liste chilometriche di domande che le facevo per telefono, ai tantissimi appunti che mi ha prestato. Con lei è nata una bella amicizia che spero non finirà con la fine di questa nostra esperienza insieme. Il gruppo modenese con cui ho spesso trascorso anche i viaggi in treno: Fra, Christian, Giuly, Betta, Sara. Fra “Manager” per la sincera amicizia che mi ha regalato, e di cui ammiro la schiettezza e la simpatia; Sara per la sua allegria e voglia di vivere, con lei sono riuscita a instaurare subito un bel rapporto che spero riusciremo a mantenere; infine ringrazio Valentina

(Alessandrini), Lorenza, Elena, Alessandra e Valentina (Bonsegna) per la simpatia che mi hanno dimostrato. Un ringraziamento particolare anche a Luca che mi ha pazientemente sopportato prima del mio ultimo esame, dimostrandomi un'infinita disponibilità;

- Le mie care coinquiline Tatiana, Samuela, Katiuscia, Ginevra: mi hanno fatto sentire davvero accolta e coccolata aiutandomi anche nelle piccole cose di tutti i giorni, mi consideravano proprio la loro sorellina minore. Grazie a loro mi sono sentita a casa anche in una grande città, a me del tutto nuova;
- Tutte le persone hanno contribuito a rendere questi due anni a Bologna veramente indimenticabili tra cui Tania, Angelica, Sara, Graziano, Stefano, Paolo, Davide, Orazio, Vincenzo, Alessandro e Cristian.