

ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITA' DI BOLOGNA

SCUOLA DI SCIENZE

Corso di laurea magistrale in Analisi e gestione dell'ambiente

**Produzione di biopolimeri da fanghi di depurazione mediante  
processi ibridi termochimici-biologici**

Tesi di laurea in

Biocarburanti e Bioraffinerie

Relatore

Dott.ssa Chiara Samorì

Presentata da

Giuliana Cucurullo

Correlatore

Dott. Cristian Torri

IV Sessione

Anno Accademico 2016 - 2017



# Indice

<b>1. Introduzione</b> .....	5
<b>2. Scopo della tesi</b> .....	9
<b>3. Trattamenti acque reflue</b> .....	10
3.1 I fanghi attivi.....	13
3.2 Normativa .....	14
3.3 D.Lgs. 27-1-1992 n. 99 .....	16
<b>4. Polioidrossialcanoati (PHA)</b> .....	19
4.1 Produzione PHA .....	23
4.2 Produzione di PHA da MMC.....	26
<b>5. Digestione anaerobica</b> .....	29
5.1 Pretrattamenti scarti .....	37
<b>6. Pirolisi</b> .....	40
<b>7. Materiali e metodi</b> .....	42
7.1 Reagenti .....	42
7.2 Campioni per la produzione di VFA.....	42
7.3 Digestione anaerobica.....	43
7.4 Pirolisi .....	44
7.5 Digestione anaerobica accoppiata a pirolisi.....	45
7.6 GC-MS .....	45
7.7 Analisi elementare .....	46
7.8 Analisi del contenuto di ceneri .....	46
7.9 Sililazione .....	46
7.10 Campioni utilizzati per i Test di produzione di PHA .....	47
7.11 Metapirolisi .....	48
<b>8. Risultati e discussioni</b> .....	48
8.1 Analisi elementare .....	48
8.2 Caratterizzazione fase acquosa degli oli di pirolisi.....	50
8.3 Acidogenesi.....	53
8.4 Acidogenesi accoppiata a pirolisi .....	57
8.5 PHA.....	59
<b>9. Conclusioni</b> .....	59

**Bibliografia .....62**

## 1. Introduzione

La rapida crescita della popolazione umana e dell'economia globale ha portato a una massiccia produzione di rifiuti, la cui corretta gestione risulta fondamentale per ridurre al minimo l'ulteriore degrado ambientale e favorire la transizione verso una società sostenibile. Il recupero delle risorse volto a minimizzare i rifiuti e generare prodotti ad alto valore aggiunto rientra in queste strategie.

La necessità di sostituire le materie plastiche a base di petrolio con alternative sostenibili e rispettose dell'ambiente è diventata, negli ultimi anni, una priorità assoluta, a causa dell'accumulo ormai incontrollato di tali sostanze dannose nell'ecosistema, con ricadute importanti sia sull'ambiente che sulla fauna, soprattutto acquatica, e conseguente alterazione degli equilibri naturali e della catena alimentare.

Per cercare di ridurre la produzione di materie plastiche "classiche" non biodegradabili, che si accumulano ad un ritmo di 25 milioni di tonnellate ogni anno (Lee et al. 1991), e dare pertanto un contributo alla risoluzione di tali problematiche ambientali, il continuo progresso nella scienza e nella tecnologia dei materiali ha permesso lo sviluppo di biopolimeri completamente biodegradabili prodotti da risorse rinnovabili. Esempi di questi materiali sono polimeri derivati da amido, acido polilattico, polimeri cellulósici e poliidrossialcanoati (PHA) (Chanprateep 2010).

Il termine, "biodegradabile" indica una caratteristica del materiale dettata dalla presenza nell'ambiente di microorganismi decompositori quali funghi, alghe, batteri in grado di ridurre le macromolecole organiche costituenti il composto in molecole più semplici, fino a riportarle ad uno stadio inorganico, cioè in acqua e anidride carbonica. Attraverso la biodegradazione il materiale organico, giunto al suolo, tende progressivamente a decomporsi, fino a sparire. Questo fenomeno è molto importante per l'ambiente che deve smaltire i rifiuti e le scorie per far posto alla nuova vita. L'anidride carbonica così prodotta viene poi utilizzata dagli alberi, piante e alghe mediante fotosintesi per sintetizzare zuccheri e da questi tutte le altre numerose sostanze presenti in natura.

Le bioplastiche rappresentano circa l'1% delle plastiche prodotte ogni anno (circa 300 milioni di tonnellate). Secondo gli ultimi dati di mercato raccolti da European Bioplastics, associazione europea della filiera delle bioplastiche che racchiude i principali produttori di plastiche biodegradabili in Europa, il mercato globale delle bioplastiche crescerà del

20% nei prossimi cinque anni; la capacità globale di produzione di bioplastiche aumenterà da circa 2.05 milioni di tonnellate nel 2017 a circa 2.44 milioni di tonnellate nel 2022. Biopolimeri innovativi come il PLA (acido polilattico), eccellente sostituto per il PS (polistirene), il PP (polipropilene) e l'ABS (acrilonitrile butadiene stirene), di cui si stima un incremento produttivo pari al 50% per i prossimi cinque anni, e i PHA (poliidrossialcanoati), 100% bio-based e biodegradabili destinati ad un incremento produttivo pari a tre volte tanto nel 2022 rispetto al 2017.

PLA e PHA sono i principali motori di questa crescita nel campo “bio” a base di materie plastiche biodegradabili.

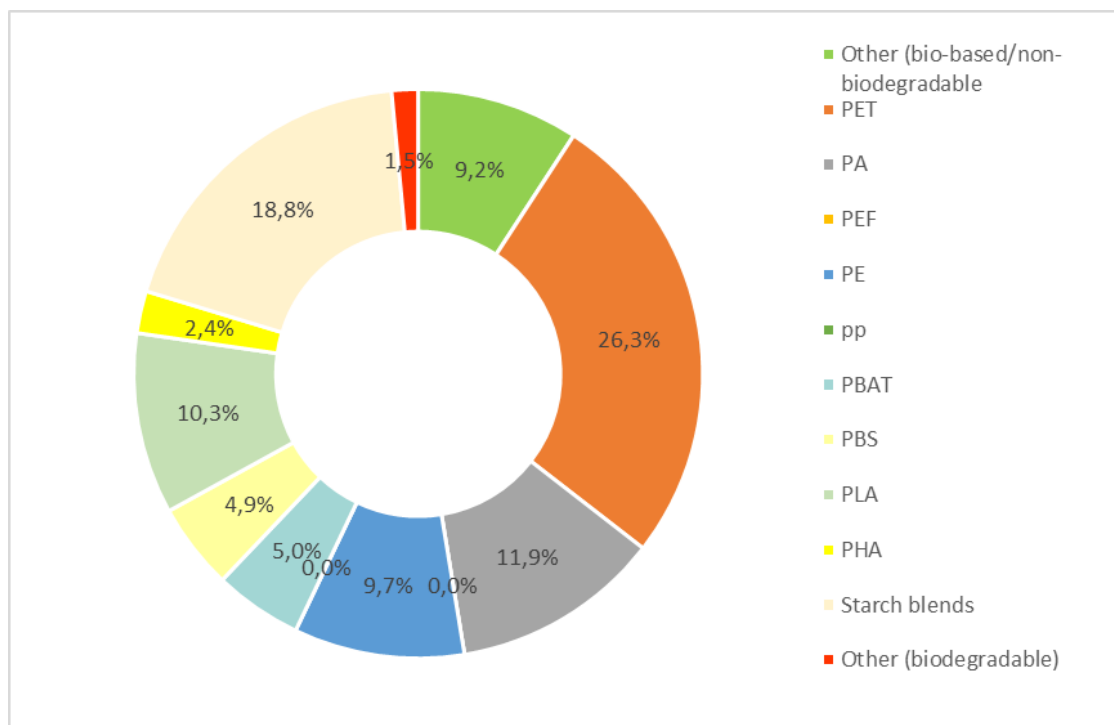


Figura 1 Capacità di produzione globale di bioplastica per tipo di materiale stimato nel 2017

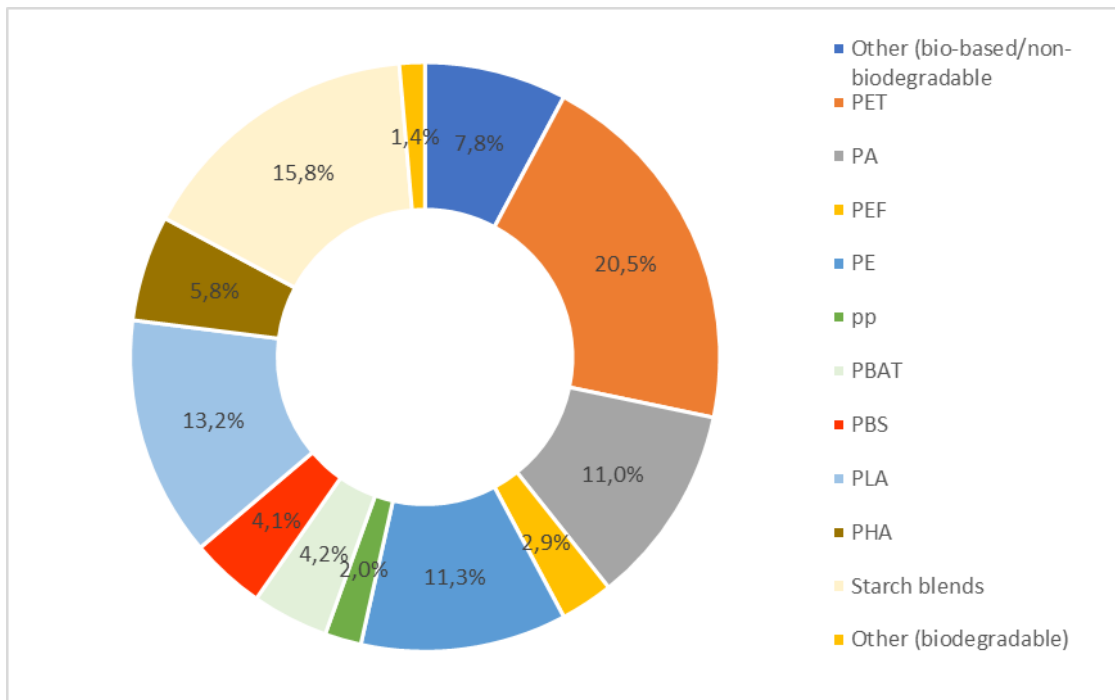
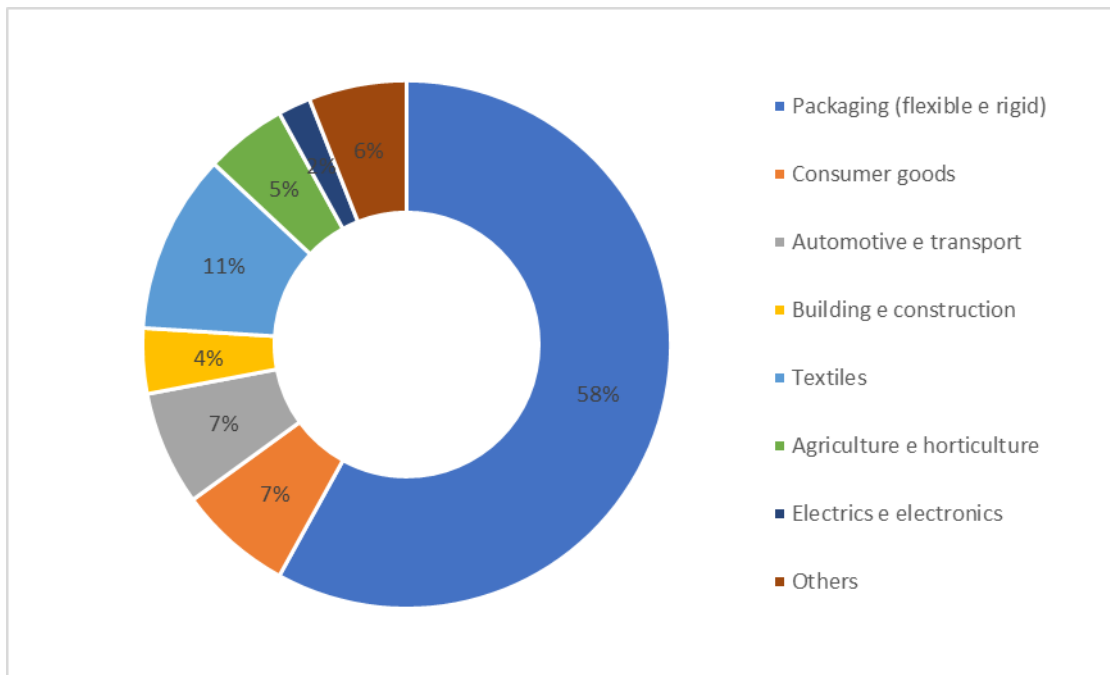


Figura 2 Capacità di produzione globale di bioplastica stimato per il 2022

Il packaging rimane il più grande campo di applicazione per tali materiali, con quasi il 60%, ovvero 1.2 milioni di tonnellate, del mercato totale delle bioplastiche nel 2017. I dati confermano anche che questi materiali sono già utilizzati in molti altri settori, inclusi tessuti, beni di consumo e applicazioni nel settore automobilistico e dei trasporti e in agricoltura e orticoltura.



*Figura 3 Capacità produttive globali di bioplastiche nel 2017*

Nell'ottica dello sviluppo delle capacità regionali, l'Asia rimane un importante centro di produzione con oltre il 50% di bioplastiche attualmente prodotte. Un quinto della capacità produttiva si trova in Europa. Si prevede che questa quota aumenterà fino al 25% entro il 2022, con l'impegno della Commissione europea per il passaggio a un modello di economia circolare che dovrebbe accelerare il ritmo di crescita e sviluppo dell'industria delle bioplastiche in Europa (Bioplastics 2017).



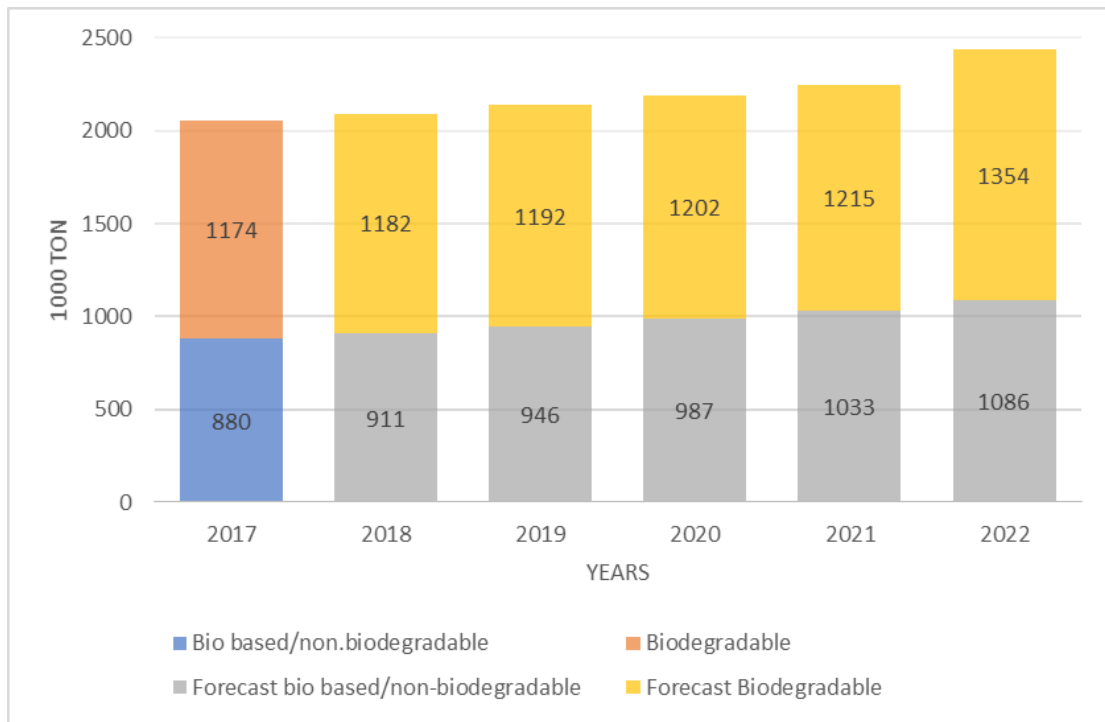


Figura 4 Capacità di produzione globale di bioplastiche

## 2. Scopo della tesi

Fra tutte le bioplastiche sopra citate, la presente tesi approfondirà in particolar modo i poliidrossialcanoati che sono tra i biopolimeri più noti, in quanto sono biosintetici, biodegradabili, del tutto riciclabili e non generano rifiuti tossici.

Questi polimeri sono stati studiati per le loro proprietà e rappresentano dei potenziali sostituti dei polimeri termoplastici di origine sintetica. Tuttavia l'uso dei PHA è attualmente limitato dall'elevato costo di produzione rispetto alle plastiche derivate dal petrolio (Jong Il Choi and Lee 1997). Questo aspetto rappresenta il principale collo di bottiglia all'obiettivo di portare sul mercato i PHA e renderli una concreta alternativa alle plastiche di origine fossile.

L'obiettivo del presente lavoro di tesi riguarda quindi lo sviluppo di un innovativo processo di produzione di PHA a basso costo e sostenibile dal punto di vista ambientale. A tal fine sono state utilizzate colture microbiche miste e substrati di scarto provenienti da fanghi di depurazione. Questi substrati, sono stati inizialmente fermentati anaerobicamente per ottenere acidi grassi volatili (VFA), diretti precursori per la sintesi dei PHA da parte delle comunità microbiche miste. Il processo di produzione sviluppato

nel presente lavoro di tesi è suddiviso in tre stadi mediante l'accoppiamento di processi termochimici e biologici:

1. Fermentazione anaerobica per produrre VFA a partire da fanghi di depurazione;
2. Eventuale pre-trattamento termochimico dei fanghi di depurazione tramite pirolisi per incrementare le rese di VFA;
3. Valutazione delle capacità delle popolazioni batteriche che compongono il fango di accumulare naturalmente PHA, attraverso dei test di arricchimento sviluppati ad hoc.

### **3.Trattamenti acque reflue**

Le acque reflue o acque di scarico sono le acque provenienti da insediamenti residenziali o industriali la cui qualità è stata deteriorata dall'azione antropica dopo il loro utilizzo, risultando quindi contaminate da diverse tipologie di sostanze organiche e inorganiche pericolose per la salute e per l'ambiente. Per questo motivo non possono essere reimmesse nell'ambiente tal quali, ma devono subire dei trattamenti al fine di poter essere immessi nelle matrici finali, quali il suolo, il mare e i corpi idrici superficiali e sotterranei.

Ai sensi del D.Lgs. 152/06, Parte III, Sez. II, Titolo I, art. 74, comma 1, lett. g e h, si definiscono:

- *Acque reflue urbane*: acque reflue provenienti da insediamenti di tipo residenziale e da servizi e derivanti prevalentemente dal consumo umano e da attività domestiche.
- *Acque reflue industriali*: qualsiasi tipo di acque reflue scaricate da edifici od installazioni in cui si svolgono attività commerciali o di produzione di beni, diverse dalle acque reflue urbane e dalle acque meteoriche di dilavamento.

Le acque reflue vengono raccolte dalle singole reti fognarie e convogliate mediante collettori all'impianto di depurazione in cui vengono sottoposte a dei trattamenti. Queste contengono sostanze indesiderabili, che si trovano allo stato di soluzione vera e propria, di dispersione colloidale, o di sospensione.

Le acque di scarico inquinate devono essere sottoposte, prima del trattamento vero e proprio, ad un pretrattamento, che consiste in una o più operazioni fisiche o meccaniche

aventi lo scopo di separare tutti quegli elementi che per natura o dimensione renderebbero difficoltoso il buon funzionamento dell'impianto di depurazione.

Il primo passo, quindi, consiste nella chiarificazione, che si ottiene mediante la rimozione delle sostanze sospese. Occorre pertanto separare le sostanze solide grossolane mediante grigliatura e sottoparle successivamente a triturazione; una volta sminuzzate vengono reimmesse nei liquami. Successivamente si esegue un'operazione di dissabbiatura accompagnata da disoleazione e sgrassatura; queste tecniche consistono nell'allontanare le sostanze silicee, oli e grassi che potrebbero usurare le parti più delicate dell'impianto e ostacolare lo svolgimento dei processi di depurazione.

Conclusa la fase di pretrattamento, i trattamenti veri e propri si dividono in:

- *Trattamenti primari*: decantazione (o sedimentazione), coagulazione, flottazione - hanno come obiettivo l'eliminazione di elevate percentuali di sostanze sedimentabili e parte delle sostanze in sospensione.
- *Trattamenti secondari*: depurazione biologica, precipitazione chimica.
- *Trattamenti terziari*: adsorbimento, filtrazione, defosfatazione, denitrificazione, sterilizzazione (ANPA - Dipartimento Prevenzione e Risanamento Ambientali 2001).

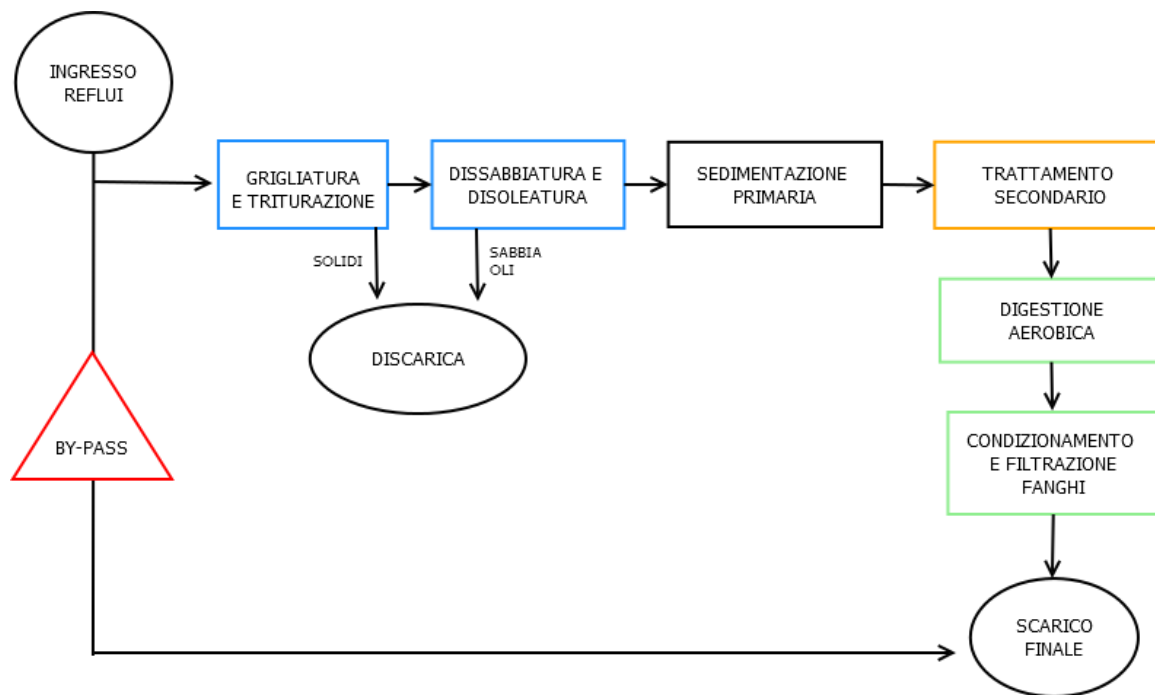


Figura 5 Schema semplificato del processo di trattamento delle acque reflue

Di tali trattamenti, la sedimentazione è il processo che porta alla formazione dei fanghi attivi; tale processo consiste nella deposizione sul fondo della vasca di raccolta con un moto più o meno veloce, dei solidi sospesi in un liquido ed aventi peso specifico superiore a quello del liquido stesso. La sedimentazione, divisa in primaria e secondaria, sfrutta la forza di gravità, le sostanze organiche fin rimaste in sospensione vengono separate; in alternativa, è possibile comunque separare le sostanze organiche sospese fin mediante filtrazione meccanica. I fanghi generati e accumulati sul fondo della vasca vengono prelevati e inviati al trattamento successivo. L'eliminazione delle sostanze disciolte e i solidi sospesi avviene nella vasca a fanghi attivi. Questo processo si basa sull'azione metabolica di batteri che utilizzano le sostanze organiche e l'ossigeno disciolti nel liquame per la loro attività e riproduzione. In questo modo si formano fiocchi costituiti da colonie di batteri facilmente eliminabili nella fase successiva. Per un'ottimale assorbimento delle sostanze è necessaria una sufficiente presenza di ossigeno, che viene fornito mediante insufflazione di aria dal fondo. Infine, la separazione dei fiocchi di fango dalla miscela aerata si ottiene per sedimentazione nella vasca di sedimentazione finale (Bianucci and Ribaldone Bianucci 1992).

### 3.1 I fanghi attivi

Il principale residuo dei trattamenti depurativi delle acque reflue è il fango di depurazione, ovvero una sospensione concentrata di solidi di varia natura, organici e inorganici, con una percentuale di sostanze secche variabile in funzione del processo che l'ha generato. I fanghi di depurazione sono principalmente prodotti nei processi di sedimentazione (Feo et al. 2013).

I sistemi depurativi per via biologica vengono solitamente impiegati come trattamenti secondari finalizzati alla rimozione delle sostanze organiche biodegradabili. Questi trattamenti consentono la rimozione dei solidi in forma colloidale non sedimentabili e quindi non separabili con trattamenti di tipo fisico. Per via biologica possono essere rimossi anche l'azoto, tramite i processi di nitrificazione-denitrificazione, e il fosforo.

In questi impianti, di gran lunga i più utilizzati per il trattamento dei reflui urbani, soprattutto in impianti di media o grande potenzialità, si favorisce lo sviluppo di una biomassa, il fango attivo, in grado di biodegradare in condizioni aerobiche il refluo in ingresso che viene ad essa miscelato dando luogo alla cosiddetta miscela aerata. L'ambiente aerobico viene assicurato da opportuni sistemi di aerazione, che devono anche garantire la miscelazione in vasca, onde evitare fenomeni di sedimentazione. All'uscita dal reattore biologico la miscela aerata viene inviata ad un successivo stadio di sedimentazione in cui il fango attivo viene separato dal refluo trattato; una porzione di fango sedimentato viene ricircolata nel reattore per mantenere la desiderata concentrazione di microrganismi, mentre la rimanente parte viene inviata alla linea trattamento fanghi, dove si provvede alla sua stabilizzazione.

Il processo biologico dei fanghi attivi ha avuto origine in Inghilterra, a Manchester. I suoi scopritori, Ardern e Lockett, eseguirono molteplici esperimenti di aerazione dei liquami di fogna. A differenza di altri studiosi non eliminarono le fanghiglie biologiche che si accumulavano durante il trattamento dovute alla crescita dei microrganismi, ma dopo aver separato la fase acquosa, al termine di un periodo di aerazione di cinque settimane, aggiunsero, ai fanghi provenienti da questi esperimenti, altra acqua di fogna. Ripetuto l'esperimento diverse volte si accorsero che il fango diventava sempre più "attivo", ovvero consentiva di ottenere un alto grado di purificazione dei liquami in un tempo sempre più breve. Dopo sei mesi il fango aveva raggiunto il massimo della sua attività, ed il processo di purificazione richiedeva poche ore.

Il processo biochimico che si compie nei fanghi attivi si suddivide in tre fasi:

- I. Fase di chiarificazione, comprende la coagulazione e flocculazione dei colloidali;
- II. Fase di ossidazione, consiste nell'ossidazione del carbonio organico contenuto nelle sostanze che si trovano nei liquami;
- III. Fase di nitrificazione, in cui avviene l'ossidazione dell'ammoniaca a nitrito e poi a nitrato (Bianucci and Ribaldone Bianucci 1992).

Le cause principali responsabili del buono o cattivo funzionamento di un impianto a fanghi attivi sono tre:

- I. La qualità tecnica dell'impianto ed il grado della sua utilizzazione
- II. Le caratteristiche delle acque di scarico
- III. La gestione e la manutenzione dell'impianto ad opera del personale.

La molteplicità degli organismi presenti nel fango attivo rappresenta la condizione principale per un rendimento ottimale della decomposizione. Grazie alle abitudini di nutrizione differenziate di questi microrganismi, il fango si adatta alla grande varietà di sostanze che sono presenti nelle acque di scarico (Harald 1979).

### 3.2 Normativa

Il testo unico ambientale, D.Lgs. 152/2006, si articola in 6 parti che riguardano il sistema Ambiente.

La parte IV è dedicata alla gestione dei rifiuti e di bonifica dei siti inquinati, in cui secondo l'articolo 184, comma 3, lettera g, vengono considerati rifiuti speciali: *“i rifiuti derivanti dalla attività di recupero e smaltimento di rifiuti, i fanghi prodotti dalla potabilizzazione e da altri trattamenti delle acque dalla depurazione delle acque reflue e da abbattimento di fumi”*. Secondo l'articolo 74, comma 1, lettera bb, della parte III che detta le norme in materia di difesa del suolo e lotta alla desertificazione, di tutela delle acque dall'inquinamento e di gestione delle risorse idriche, del TUA, per fanghi si intende: *“i fanghi residui, trattati o non trattati, provenienti dagli impianti di trattamento delle acque reflue urbane”*.

In allegato D al Decreto legislativo 5 febbraio 1997, n. 22 sono indicati i codici CER (Catalogo Europeo dei Rifiuti) riporta la classificazione dei tipi di rifiuti secondo la direttiva 75/442/CEE.

Per i fanghi prodotti da impianti di depurazione per acque reflue urbane, destinati allo smaltimento o recupero il codice allegato è il seguente: 19-08-05

- 19 Rifiuti da impianti di trattamento rifiuti, impianti di trattamento acque reflue fuori sito e industrie dell'acqua
- 19-08 rifiuti da impianti di trattamento delle acque reflue non specificati altrimenti
- 19-08-05 fanghi di trattamento delle acque reflue urbane
- 19-08-04 fanghi prodotti da impianti di depurazione per acque reflue industriali.

Secondo l'allegato B, previsto dall'articolo 5, comma 6 vengono definite le operazioni di smaltimento in cui ai sensi dell'articolo 4, *“i rifiuti devono essere smaltiti senza pericolo per la salute dell'uomo e senza usare procedimenti o metodi che possano recare pregiudizio all'ambiente”*.

Nello specifico, i fanghi possono essere depositati sul o nel suolo come ad esempio in discarica, oppure possono subire dei trattamenti, come la biodegradazione dei fanghi nei suoli.

Nell'allegato C, previsto dall'articolo 6, comma 1, lettera h, sono inserite le operazioni di recupero, in cui sempre ai sensi dell'articolo 4, *“i rifiuti devono essere recuperati senza pericolo per la salute dell'uomo e senza usare procedimenti o metodi che possano recare pregiudizio all'ambiente”*.

In questo caso, i fanghi possono essere sottoposti ad operazioni di compostaggio o essere utilizzati in agricoltura.

Secondo l'articolo 1, comma 6, allegato G-2, i fanghi provenienti dagli impianti di depurazione dell'acqua vengono considerati rifiuti pericolosi solo se contengono una o più sostanze elencate in allegato G-1, come ad esempio prodotti farmaceutici, biocidi, PCB, PCT, olii, sostanze chimiche non identificate, sostanze bituminose provenienti da operazioni di raffinazione, distillazione o pirolisi, inchiostri, coloranti, pigmenti, pitture, lacche, vernici ecc. (Bosetti 2006).

Di seguito si riportano le quantità di rifiuti speciali non pericolosi prodotti da impianti di trattamento delle acque reflue, in Italia (ISPRA 2015).

Capitolo dell'elenco	Nord (t)	Centro (t)	Sud (t)	Italia (t)
19. Rifiuti prodotti da impianti di gestione dei rifiuti, impianti di trattamento delle acque reflue fuori sito, nonché dalla potabilizzazione dell'acqua e dalla sua preparazione per uso industriale	19.027.275	8.031.457	10.463.161	37.521.893

*Tabella 1 Quantità dei rifiuti speciali non pericolosi in Italia*

### 3.3 D.Lgs. 27-1-1992 n. 99

La direttiva 86/278/CEE stabilisce una serie di norme per gli agricoltori relative all'impiego dei fanghi di depurazione come fertilizzanti, volte a evitare che tale pratica danneggi l'ambiente e la salute umana compromettendo la qualità del suolo e delle acque superficiali e sotterranee.

Il D.Lgs. 27-1-1992 n. 99 ha lo scopo di disciplinare l'utilizzazione dei fanghi di depurazione in agricoltura in modo da evitare effetti nocivi sul suolo, sulla vegetazione, sugli animali e sull'uomo, incoraggiandone nel contempo la corretta utilizzazione.

Ai sensi del presente decreto, si intendono per:

- *Fanghi*: i residui derivanti dai processi di depurazione: delle acque reflue provenienti esclusivamente da insediamenti civili e produttivi
- *Fanghi trattati*: i fanghi sottoposti a trattamento biologico, chimico o termico, a deposito a lungo termine ovvero ad altro opportuno procedimento, in modo da ridurre in maniera rilevante il loro potere fermentescibile e gli inconvenienti sanitari della loro utilizzazione.

È ammessa l'utilizzazione in agricoltura dei fanghi solo se sono stati sottoposti a trattamento, sono idonei a produrre un effetto concimante o ammendante e correttivo del terreno e che non contengano sostanze tossiche e nocive e/o persistenti, bioaccumulabili in concentrazioni dannose per il terreno, per le colture, per gli animali, per l'uomo e per l'ambiente in generale.



L'utilizzazione dei fanghi è consentita nel caso in cui la concentrazione di uno o più metalli pesanti nel suolo non superi i valori limite fissati in tabella n.2.

<b>Valore limite (mg/kg SS)</b>	
Cadmio	1.5
Mercurio	1
Nichel	75
Piombo	100
Rame	100
Zinco	300

*Tabella 2 Valori massimi di concentrazione di metalli pesanti nei suoli agricoli destinati all'utilizzazione dei fanghi di depurazione*

Possono essere utilizzati i fanghi che al momento del loro impiego in agricoltura, non superino i valori limite per le concentrazioni di metalli pesanti e di altri parametri stabiliti in tabella n.3.

<b>Valore limite (mg/kg SS)</b>	
Cadmio	20
Mercurio	10
Nichel	300
Piombo	750
Rame	1.000
Zinco	2.500

*Tabella 3 Valori massimi di concentrazione di metalli pesanti nei fanghi destinati all'utilizzazione in agricoltura*

I fanghi possono essere applicati su o nei terreni in dosi non superiori a 15 t/ha di sostanza secca nel triennio, solo se i suoli presentano le seguenti caratteristiche:

- Capacità di scambio cationico (C.S.C.) superiore a 15 meq/100 gr;
- pH compreso tra 6.0 e 7.5;

In caso di utilizzazione di fanghi su terreni il cui pH sia inferiore a 6 e la cui C.S.C sia inferiore a 15, per tenere conto dell'aumentata mobilità dei metalli pesanti e del loro maggiore assorbimento da parte delle colture i quantitativi di fango utilizzato

diminuiscono del 50%. Nel caso in cui il pH del terreno sia superiore a 7.5 si possono aumentare i quantitativi di fango utilizzato del 50%.

I fanghi possono essere utilizzati quali componenti dei substrati artificiali di colture floricole su bancali, nel rispetto della presente norma, della tutela ambientale e della salute degli operatori del settore. In particolare:

- I fanghi utilizzati devono essere disidratati e il loro contenuto di umidità non deve superare il limite di 80% espresso sul tal quale.
- I fanghi devono avere una composizione analitica che rientri nei limiti in tabella n.3.
- Il substrato artificiale di coltura deve contenere un quantitativo di fango non superiore al 20% del totale.

Secondo il D.lgs 27-1-1992 n. 99, è vietata l'utilizzazione dei fanghi tossici e nocivi ed è vietato applicare i fanghi ai terreni:

- allagati, soggetti ad esondazioni, inondazioni naturali, acquitrinosi o con falda acquifera affiorante, o con frane in atto;
- con pendii maggiori del 15% limitatamente ai fanghi con un contenuto in sostanza secca inferiore al 30%;
- con pH minore di 5;
- con C.S.C. minore di 8 meq/100 gr;
- destinati a pascolo, a prato-pascolo, a foraggiere, anche in consociazione con altre colture, nelle 5 settimane che precedono il pascolo o la raccolta di foraggio;
- destinati all'orticoltura e alla frutticoltura i cui prodotti sono normalmente a contatto diretto con il terreno e sono di norma consumati crudi, nei 10 mesi precedenti il raccolto e durante il raccolto stesso;
- quando è in atto una coltura, ad eccezione delle colture arboree;
- quando sia stata comunque accertata l'esistenza di un pericolo per la salute degli uomini e/o degli animali e/o per la salvaguardia dell'ambiente.

Inoltre è vietata l'applicazione di fanghi liquidi con la tecnica della irrigazione a pioggia, sia per i fanghi tal quali che per quelli diluiti con acqua.

Il soggetto che richiede l'autorizzazione all'utilizzazione dei fanghi è tenuto ad effettuare analisi preventive dei terreni, le analisi dei terreni devono vertere sui seguenti parametri: pH, C.S.C., cadmio, mercurio, nichel, piombo, rame e zinco.

I fanghi, così come prodotti presso gli impianti di depurazione, devono essere analizzati ogni volta che intervengano dei cambiamenti sostanziali nella qualità delle acque trattate e comunque, ogni tre mesi per gli impianti di potenzialità superiore a 100.000 abitanti equivalenti (a.c.); ogni 6 mesi per gli impianti di potenzialità inferiore a 100.000 a.c. Nel caso dei fanghi provenienti da impianti di depurazione con capacità inferiore a 5.000 a.c., si procederà ad almeno una analisi all'anno.

Qualora i fanghi siano stoccati, miscelati, trattati, additivati, essi dovranno essere sottoposti ad ulteriori analisi prima della loro utilizzazione in agricoltura, al fine della verifica del rispetto dei limiti fissati in tabella n.3.

Le analisi dei fanghi devono riguardare i seguenti parametri: sostanza secca, carbonio organico, grado di umificazione, azoto totale, potassio totale, cadmio, cromo, mercurio, nichel, piombo, rame, zinco e salmonelle.

Il produttore di fanghi destinati all'agricoltura, deve annotare sul registro di carico e scarico i quantitativi di fango prodotto e quelli forniti per uso agricolo, la composizione e le caratteristiche dei fanghi rispetto ai parametri riportati in tabella 3, il tipo di condizionamento impiegato, e i nomi e gli indirizzi dei destinatari dei fanghi e i luoghi previsti di utilizzazione dei fanghi (Gazzetta ufficiale della repubblica italiana 1992).

I fanghi attivi vengono considerati come uno dei possibili substrati per la produzione di PHA.

#### **4. Polioidrossialcanoati (PHA)**

I PHA sono una promettente famiglia di bio-poliesteri caratterizzati da una vasta gamma di proprietà fisiche e meccaniche a seconda della loro composizione chimica. Infatti gli oltre 150 diversi tipi di monomeri conferiscono specifiche proprietà e funzionalità (Steinbüchel and Valentin 1995). Nelle applicazioni industriali questa potenzialità è sfruttata producendo in modalità controllata specifici monomeri con catene a diverse lunghezze, attraverso la formazione di una serie di copolimeri "su misura". Tali copolimeri "su misura" possono essere prodotti in condizioni controllate di crescita, in quanto se viene fornita una miscela definita di substrati per un determinato tipo di microrganismi, viene formato un copolimero ben definito e riproducibile (Lenz et al. 1989).

Dal punto di vista ambientale, i PHA sono sia bio-based che biodegradabili in quanto possono essere prodotti da materie prime rinnovabili e sono degradati naturalmente da microrganismi in grado di secernere depolimerasi di poliidrossibutirrato (PHB), enzimi che idrolizzano i legami esteri in monomeri idrosolubili e oligomeri (Jendrossek and Handrick 2002). Questa caratteristica è diventata di interesse industriale per l'utilizzo dei PHA come materiali plastici naturali, biodegradabili e biocompatibili per un'ampia gamma di possibili applicazioni, come suture chirurgiche o contenitori di imballaggio (Lenz et al. 1989).

I PHA possono essere sintetizzati da più di 90 generi di batteri gram-positivi e gram-negativi, come il *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Rhodospirillum*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes/Ralstonia*, *Azotobacter*, *Rhizobium*. Quando le cellule batteriche sono temporaneamente prive di uno o più elementi nutritivi, come azoto (N), zolfo (S), fosforo (P), magnesio (Mg) oppure ossigeno (O), il loro metabolismo non funziona normalmente ed entrano in uno stato di stress. In tale circostanza la cellula può accumulare delle riserve nutritive: fosforo in forma di polifosfato (poli P) e carbonio nelle forme di PHA; quest'ultimo si accumula nel batterio sotto forma di granuli, di dimensioni comprese tra 0,2 – 0,7 µm, fino ad una quantità che può raggiungere il 90% del peso secco della massa batterica. Tali granuli vengono sfruttati come riserva di carbonio ed energia dalla cellula in mancanza di fonte di carbonio extracellulare.

L'osservazione che la quantità di PHA accumulata nella cellula batterica aumenta al diminuire dell'apporto di nutrienti essenziali risale agli anni '60, quando si intuì che i batteri producono e accumulano il polimero quando esauriscono le scorte di nutrienti necessari per la divisione cellulare, ma hanno ancora una fonte di carbonio a disposizione.

Fin dal primo ritrovamento di PHB nel 1926 (Lemoigne 1926), più di cento diverse unità monomeriche sono state identificate come costituenti di PHA in più di trecento differenti microrganismi. Quando si progettano le condizioni di coltura per l'ottimizzazione delle rese è importante quindi, tenere in considerazione le diverse esigenze di crescita dei ceppi batterici impiegati.

Sulla base di questa considerazione è possibile distinguere i batteri in due gruppi:

- Batteri che hanno bisogno di una fonte di carbonio in eccesso e di una carenza di nutrienti (P, N, S) in una determinata fase della crescita per avviare la polimerizzazione, ad esempio: *Ralstonia eutropha* e *Pseudomonas oleovorans*.

- Batteri che non richiedono carenza di nutrienti essenziali e polimerizzano PHA durante tutto il ciclo di crescita: *Alcaligenes latus* e *Escherichia coli*.

Inoltre esistono due tipi di microorganismi anaerobici in grado di immagazzinare carbonio: gli accumulatori di fosfato (*polyphosphateaccumulating organisms*, PAO) e gli organismi che accumulano glicogeno (*glycogen-accumulating organisms*, GAO). I PAO hanno la capacità di accumulare polimeri come PHA, glicogeno e polifosfati utilizzando l'energia immagazzinata come poli-P quando non è più disponibile ossigeno. I GAO sono i concorrenti dei PAO; utilizzano come substrato glicogeno, e l'energia rilasciata nel processo di glicolisi è successivamente utilizzata per accumulare prodotti di fermentazione, come acetato, sotto forma di PHB (Cech and Hartman 1993)

Il granulo prodotto, che consiste in catene di PHA, è circondato da una membrana costituita da lipidi e proteine la quale regola le interazioni tra il centro polimerico apolare e i dintorni acquosi. In ogni granulo sono localizzate migliaia di catene di PHA formanti un'elica con due filamenti tenuti insieme dalle forze di Van der Waals e dai legami a idrogeno (Koller, Niebelschütz, and Braunegg 2013). Il numero di granuli per cellula è specifico: *Ralstonia eutropha* accumula da 8 a 12 granuli di grandezza variabile, mentre per la *Pseudomonas oleovorans* si stimano uno o due granuli più grandi (Zinn, Witholt, and Egli 2001).

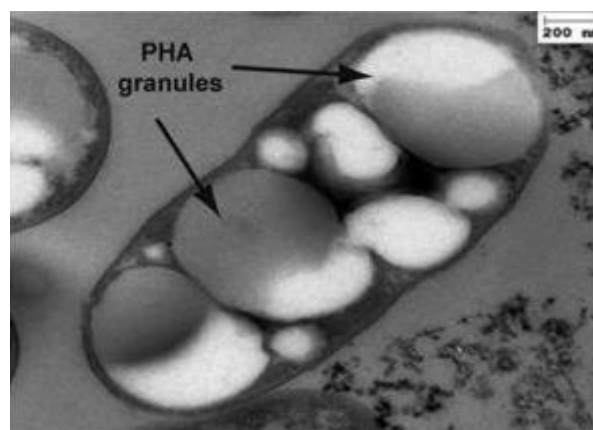
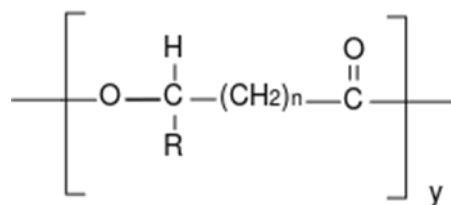


Figura 6 Immagine al TEM di *P.putida* con granuli di PHA (Martínez et al. 2016)

L'esatta composizione dei PHA dipende dal tipo di batterio da cui sono sintetizzati e dalla fonte di carbonio utilizzata durante la fase di produzione; i PHA vengono generalmente classificati come:

- PHA a catena corta, i quali hanno un gruppo R di tipo alchilico con unità monomerica dai 3 ai 5 atomi di carbonio;
- PHA a catena media, caratterizzati da un gruppo R di tipo alchilico con unità monomerica dai 6 ai 14 atomi di carbonio;
- PHA a catena lunga, ottenuti da acidi grassi a lunga catena che contengono una unità monomerica costituita da più di 14 atomi di carbonio.

La formula chimica generale di struttura è la seguente:



L'estrema variabilità della natura chimica delle catene laterali è alla base della notevole varietà delle proprietà dei PHA: si va da polimeri tipicamente termoplastici, come il poliidrossibutirrato (PHB), a gomme come il poliidrossiottanoato (PHO), con possibilità di interventi chimici secondari, ad esempio reticolazioni.

I PHA presentano comunque caratteristiche comuni quali l'insolubilità in acqua ma alta solubilità in cloroformio e altri solventi alogenati, e la resistenza alle radiazioni U.V.; sono tuttavia scarsamente resistenti agli acidi e alle basi. I PHA più comuni sono l'omopolimero PHB e il copolimero poli(3-idrossibutirrato-co-3-idrossivalerato) (PHBHV), quest'ultimo identificato come un possibile sostituto biodegradabile delle polioleofine, impiegate nella produzione di bottiglie soffiate, film per imballaggi, contenitori in plastica, posateria usa e getta, reti e corde per la pesca industriale. Questi materiali sono poliesteri termoplastici con proprietà meccaniche comparabili con quelle dei tradizionali polimeri a base di petrolio e le loro proprietà sono molto simili a quelle del polietilene (PE) e del polipropilene (PP). In particolare il poliidrossibutirrato (PHB) e il poliidrossivalerato (PHV) sono particolarmente adatti per il confezionamento

alimentare, sono meno permeabili all'ossigeno di quanto lo siano le altre plastiche, questo permette di ridurre aggiunte di componenti antiossidanti (Salehizadeh and Van Loosdrecht 2004).

#### 4.1 Produzione PHA

Attualmente, la produzione industriale dei PHA è basata sulla fermentazione di colture microbiche pure, ovvero popolazioni di microrganismi che derivano da un'unica specie microbica e risultano quindi composte da un unico ceppo batterico, su substrati ad elevato costo quali zuccheri come il glucosio, o composti contenenti carboidrati come il mais. Ciò comporta un elevato costo di produzione di tali materiali, non competitivo con quello di materie plastiche non biodegradabili e sintetizzate da fonti non rinnovabili, che rappresenta il principale limite alla diffusione su larga scala dei PHA. A causa dei costi elevati di produzione si sta affermando l'uso di colture miste che abbate la gran parte dei costi di processo, quali la selezione di microrganismi e del loro substrato di crescita (Valera 2001).

Dato il largo utilizzo e diffusione dei fanghi attivi e il fatto che gli organismi che producono PHA sono naturalmente presenti in tali bioprocessi, gran parte della ricerca per la produzione di PHA da colture miste microbiche (MMC) si è orientata verso il trattamento biologico delle acque reflue. La produzione di PHA per mezzo di MMC rappresenta un'opportunità per il recupero del carbonio organico dalle acque reflue grezze mediante il trattamento biologico (Valentino et al. 2017).

L'uso combinato di colture microbiche miste e materie prime a basso valore è attualmente oggetto di indagine al fine di ridurre i costi operativi. In particolare il prezzo del substrato ha la maggiore influenza sul costo di produzione. Il substrato più economico costa 0.18 € al kg, rispetto al costo del polipropilene che si aggira ai di 0.15 € al kg (Salehizadeh and Van Loosdrecht 2004). Altri costi sono dovuti alla fase di estrazione, cruciale poter per recuperare il polimero dall'interno della cellula.

Per migliorare la produzione di PHA, le colture miste devono essere preliminarmente arricchite in organismi che accumulano il PHA. Questo di solito viene effettuato sotto l'alimentazione dinamica di opportune fonti di carbonio per creare condizioni alternate di eccesso e mancanza di disponibilità di carbonio, designata come *feast and famine*. Per

utilizzare materie prime di scarto e surplus idonee per la produzione di PHA, il processo di fermentazione aerobica può essere accoppiato con una fermentazione acidogenica per convertire la frazione organica in acidi grassi volatili, precursori necessari per la sintesi di PHA da colture miste.

La maggior parte dei produttori di PHA attualmente sul mercato sono aziende di piccole-medie dimensioni con una capacità produttiva che si aggira intorno alle 1.000-20.000 t/a, che non possono contare sull'economia su grande scala, come ad esempio avviene nel caso per la produzione del polietilene di circa 300.000 t/y.

In tabella n.4 sono riportati i principali produttori mondiali di PHA e le relative capacità di produzione (Pessoa-Jr et al. 2005; Shen et al. 2009). E' importante sottolineare che tutti gli attori al momento su mercato basano la produzione di PHA su colture microbiche pure.

Polimero	Nome Commerciale	Produttore	Substrato	Capacità t/y	Prezzo €/Kg
PHB	Biogreen®	Mitsubishi Gas Chem. Comp. Inc. (Japan)	Metanolo	10.000	2.5-3.0
PHB	Mirel®	Telles (US)	Zuccheri da lavorazione del mais	50.000	1.50
PHB	Biocycle®	PHB Industrial Company (Brazil)	Melasso	50	n/a
PHBV e PHB	Biomer®	Biomer Inc. (Germany)	Saccarosio, siero di latte idrolizzato	50	3.0-5.0
PHBV e PHBV + Ecoflex	Enmat®	Tianan Biologic Ningbo (China)	Zuccheri da lavorazione del mais	10.000	3.26
PHBH	Nodax®	P&G	/	20.000-50.000	2.50
PHBH	Nodax®	Lianyi Biotech (China)	/	2.000	3.70
PHBH	Kaneka PHBH	Kaneka Corp. (Japan)	Scarti da produzione olio vegetale	1.000	n/a
P (3HB-co-4HB)	Green Bio	Tianjin Green Bio-Science Co/DSM	Zuccheri (non specificato)	10.000	n/a
PHA da P e G	Meredian	Meredian (US)	/	272.000	n/a

Tabella 4 Principali produttori di PHA a livello mondiale



Il primo brevetto riguardo la produzione di PHA, risale al 1959, quando la W.R.Grace & Co. di New York iniziò a produrre il PHB a scopo commerciale, tuttavia la compagnia chiuse dopo poco tempo, a causa alla mancanza di un opportuno processo di purificazione della ridotta efficienza di produzione.

Nel 1970 la ICI iniziò a commercializzare il copolimero PHBV, sotto il nome commerciale di Biopol® (Holmes 1985); nel 1996 fu venduto a Monsanto ed in seguito a Metabolix.

L'azienda Procter & Gamble in collaborazione con Kaneka Corporation, l'Università Cinese di Tsingta ed il Riken Institute Giapponese svilupparono un'ampia gamma di applicazioni del PHB e del PHBV, chiamato Nodax®, sotto forma di fibre, tessuto non tessuto, dispersioni acquose e prodotti usa e getta; Nodax® fu venduta nel 1993 e nel 2006 la partnership tra Procter & Gamble e Kaneka Corporation fu interrotta.

Recentemente la Kaneka Corporation, presso la città di Takasago in Giappone, ha iniziato la produzione del copolimero PHBH di origine vegetale, con una capacità produttiva di 10.000 t/y. Sempre in Giappone la Mitsubishi Gas Chemical produce PHB attraverso la fermentazione del metanolo con il nome commerciale di BioGreen®.

L'azienda tedesca Biomer Inc. produce PHB per applicazioni speciali a scala commerciale. Nel 1993 l'azienda acquistò la tecnologia ed i ceppi microbici dalla ditta Austriaca Petrochemia Danubia, registrando il marchio commerciale Biomer® nel 1995.

In Brasile, uno dei maggiori produttori mondiali di canna da zucchero, la PHB Industrial S.A. utilizza lo zucchero di canna per produrre il PHB, con il nome commerciale di Biocycle®, grazie ad collaborazione con il produttore di zucchero Irmaoes Biagi ed il produttore di etanolo Balbo Group; attualmente la compagnia possiede un impianto pilota da 50 t/y e sta pianificando di costruire un impianto produttivo della capacità di 3.000 t/y (Pessoa-Jr et al. 2005).

L'azienda Tianan Biological Material con sede in Ningbo, Cina, è il primo produttore mondiale di PHBV (Shen et al. 2009), la sua capacità produttiva attuale è di circa 10.000 t/y, il suo prodotto, l'Enmat®, viene prodotto sotto forma di polvere, pellet e film, oppure commercializzato in blend con l'EcoFlex.

La Tianjin Green BioSciences dal 2008 è in grado di produrre 10.000 t/y di PHBH commercializzato con il nome “GreenBio” ed attualmente sta investendo per produrre PHA destinati al mercato delle applicazioni biomediche (Shen et al. 2009).

#### 4.2 Produzione di PHA da MMC

Un' alternativa all'impiego di colture pure, come già detto in precedenza, è l'uso di colture miste (MMC), arricchite a partire da fanghi attivi per la depurazione delle acque reflue. Nei processi a fanghi attivi la biomassa cresce in condizioni non stazionarie come ad esempio nei casi di alternanza di abbondanza e carenza di substrato, in cui la crescita microbica non è bilanciata e lo stoccaggio del substrato carbonioso come polimero interno diventa un importante meccanismo di selezione dei microrganismi presenti. Questi fanghi non possono essere però direttamente usati per la produzione di polimeri, a causa della troppo bassa concentrazione di substrato carbonioso in ingresso e del conseguente basso carico organico del processo, e devono essere opportunamente arricchiti in microrganismi con elevata capacità di stoccaggio.

La produzione di PHA mediante l'uso di MMC sembra promettente perché non richiede il mantenimento di condizioni sterili e rende più facile l'uso di materie prime a basso costo, come gli effluenti di scarti agroindustriali (Reis et al. 2003; Salehizadeh and Van Loosdrecht 2004).

Questo processo offre il vantaggio di ridurre il carico inquinante e il flusso di acidi grassi e richiede fasi diverse strettamente interconnesse. Le proprietà fisiche e meccaniche del PHA finale, come già detto, dipendono anche dalla sua composizione monomerica, che a sua volta è influenzata dal tipo di acidi organici ottenuti durante la fermentazione acidogenica (Bengtsson, Hallquist, et al. 2008; Albuquerque et al. 2011). Il flusso fermentato ricco di VFA viene immesso nelle due fasi successive finalizzate alla produzione e alla selezione di microrganismi che immagazzinano il PHA e al successivo accumulo del polimero. La selezione della coltura può essere raggiunta in condizioni di *feast and famine*.

La ricerca oggi mira allo studio e all'ottimizzazione di un processo multi-stadio per la produzione di PHA mediante MMC a partire da substrati organici di scarto.

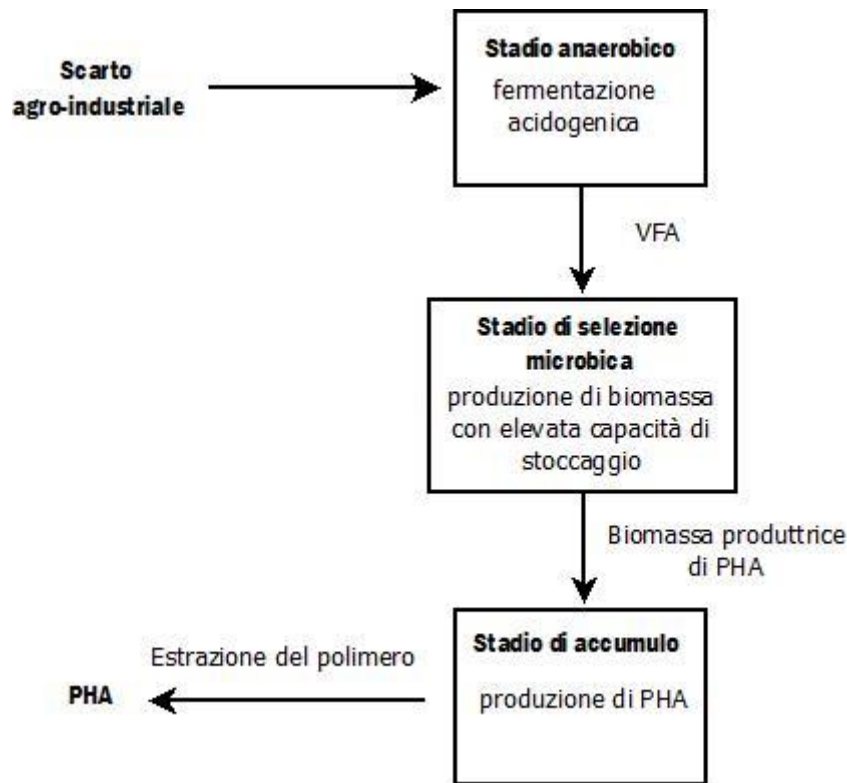


Figura 7 Schema del processo di produzione di PHA a partire da MMC da scarti agro-industriali

La produzione di PHA via MMC richiede materie prime ricche di materia organica facilmente biodegradabile e rappresenta un'opportunità per recuperare dalle acque reflue non trattate carbonio organico mediante il trattamento biologico (Valentino et al. 2017).

Le colture miste, che potenzialmente sono in grado di accumulare PHA, vengono tipicamente esposte in condizione cicliche di *feast and famine* in cui una fonte di carbonio organico prontamente biodegradabile è resa alternativamente abbondante e scarsa, cosicché popolazioni di specie diverse di microrganismi, che compongono la biomassa, devono adattarsi per sopravvivere e crescere con la mancanza ciclica di un substrato organico disponibile, *famine*, e competere nelle brevi occasioni in cui viene reso disponibile il substrato organico esterno, *feast*.

Quando i periodi di carenza dei nutrienti sono relativamente lunghi, i batteri diminuiscono l'espressione degli enzimi che sono importanti per la crescita cellulare. Se il substrato organico diventa improvvisamente disponibile, quelle popolazioni di specie di batteri che possono assimilare la fonte di carbonio più rapidamente hanno un vantaggio competitivo rispetto a tutte le altre specie presenti. La rapida assimilazione del substrato

organico esterno mediante stoccaggio intracellulare di PHA è una strategia competitiva comune a molte specie di batteri.

Il rapporto tra la durata di *feast* e la fase *famine* è un parametro cruciale che influenza le prestazioni della fase di selezione; un basso rapporto garantisce la selezione nel MMC di microrganismi che sono maggiormente in grado di immagazzinare il PHA e il loro adattamento fisiologico verso la sintesi di PHA nella fase di festa (Villano et al. 2014). In generale, se la fase di accumulo viene eseguita in condizioni di limitazione dei nutrienti, si raggiungerà un livello di saturazione del PHA. Al contrario, se la biomassa è continuamente esposta a nutrienti e substrati di carbonio, quindi in condizioni ricche di sostanze nutritive, aumenterà progressivamente la risposta di crescita, mentre la risposta allo stoccaggio diminuirà progressivamente e, di conseguenza, il contenuto massimo di PHA sarà inferiore alla capacità massima di stoccaggio dei microrganismi (Johnson, Kleerebezem, and van Loosdrecht 2010).

Il PHA accumulato dal batterio, infine, può anche essere usato come substrato organico interno durante i periodi di carestia per l'energia e la crescita; quindi si arricchiscono nel tempo quelle popolazioni di specie di batteri che esprimono il fenotipo di conservazione del PHA (Davide Dionisi et al. 2005; Salehizadeh and Van Loosdrecht 2004).

Accoppiato con i sistemi MMC, è stata prestata particolare attenzione all'uso di fonti di carbonio a costo zero, come le acque di scarico di cartiera (Bengtsson, Werker, et al. 2008), le acque di scarico dei conservifici di pomodoro (H.-Y. Liu et al. 2008), scarti del frantoio (Beccari et al. 2009), melassa di canna da zucchero (Albuquerque, Torres, and Reis 2010), scarti alimentari (Venkateswar Reddy and Venkata Mohan 2012) e acque reflue (Pozo et al. 2011). La maggior parte di queste materie prime disponibili richiede una fase preliminare di fermentazione acidogenica per convertire il loro contenuto organico in acidi grassi volatili, i substrati più adatti per la produzione di PHA quando si utilizzano i processi MMC. Inoltre, la selezione MMC e gli stadi di accumulo di PHA vengono generalmente eseguiti in fasi separate, perché le condizioni ottimali sono diverse per ogni fase (Valentino et al. 2015).

## 5. Digestione anaerobica

La digestione anaerobica è un processo biologico complesso per mezzo del quale in condizione di anaerobiosi, ovvero in assenza di ossigeno molecolare, la sostanza organica viene trasformata in biogas costituito principalmente da metano, la cui concentrazione, a seconda del tipo di sostanza organica digerita e dalle condizioni del processo, può variare dal 50% al 70%, e da anidride carbonica, utilizzabile come combustibile per una valorizzazione energetica.

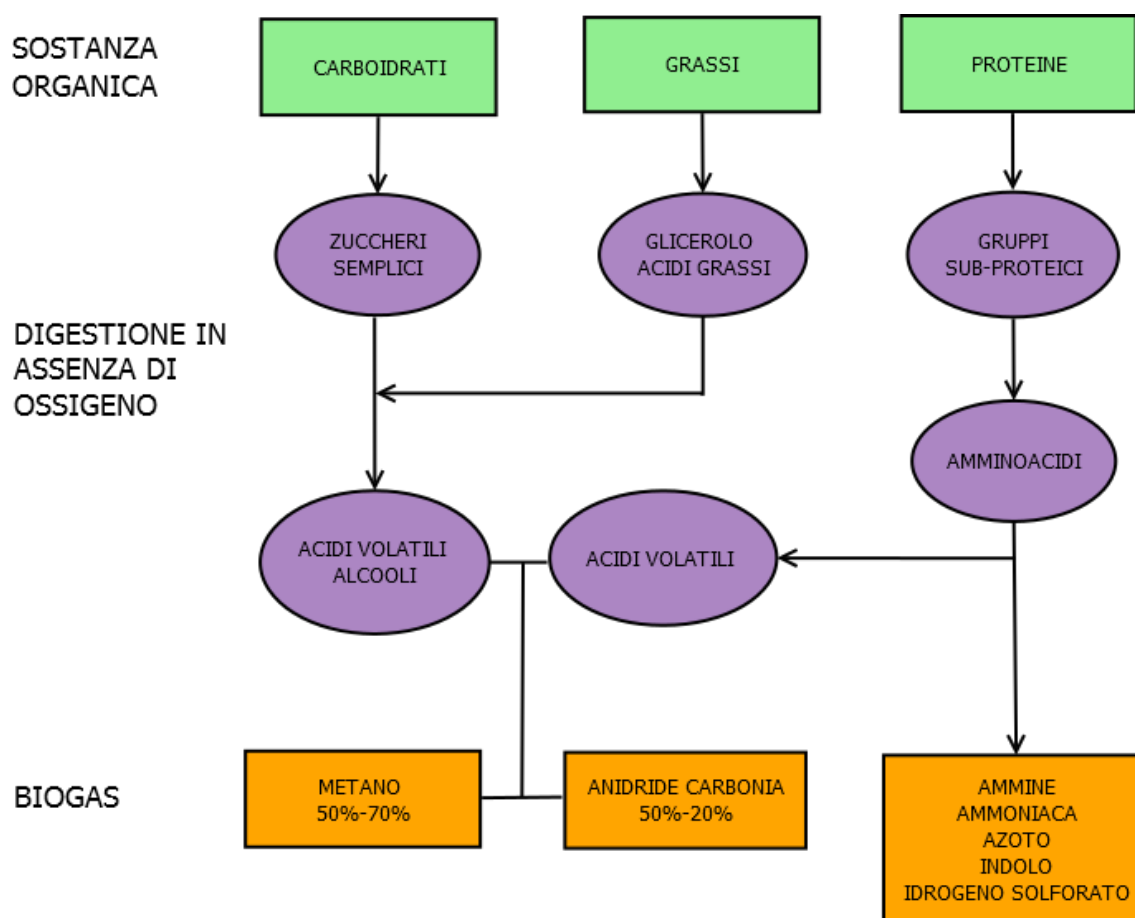


Figura 8 Schema del processo di digestione anaerobica

La trasformazione della sostanza organica in biogas avviene attraverso il coinvolgimento di diversi gruppi microbici che interagiscono tra di loro. Questi microorganismi vengono chiamati organismi anaerobici e la loro peculiarità è quella di vivere e riprodursi in assenza di ossigeno disciolto.

La digestione anaerobica può essere condotta a intervalli di temperatura differenti, in base ai tipi di microorganismi selezionati:

- mesofilia, in cui la temperatura è compresa tra i 37°C e i 42°C; a queste temperature agiscono i batteri più diffusi che si trovano in ambienti molto diversi come sul suolo, nelle acque e negli scarichi fognari.
- termofilia, in cui la temperatura è compresa tra il 42°C e i 60°C
- ipertermofilia, con una temperatura superiore ai 60°C.

Il processo di trasformazione dei substrati organici complessi in metano e anidride carbonica avviene attraverso quattro fasi, in cui partecipano almeno tre gruppi metabolici distinti di microrganismi che si differenziano sia per i substrati che per i prodotti del loro metabolismo:

- *Idrolisi*, processo in cui grazie all'azione di batteri idrolitici, le molecole organiche complesse quali proteine, grassi e carboidrati vengono scisse con la formazione di composti solubili, come aminoacidi, acidi grassi, chetoni e alcoli, che possono essere poi ulteriormente idrolizzati a monomeri semplici dai batteri che fanno uso di questi stessi prodotti e che operano la fermentazione.
- *Acidogenesi*, che avviene contestualmente alla fase precedente, in cui composti solubili derivati dall'idrolisi vengono metabolizzati dai microrganismi acidogenici fermentanti, formando molecole ancora più semplici come gli acidi grassi volatili (volatile fatty acids, VFA), principalmente acidi acetici, propionici, butirrici e valerici, con produzione di sottoprodotti come ammoniaca, anidride carbonica e acido solfidrico. L'idrolisi e l'acidogenesi coinvolgono una vasta gamma di anaerobi obbligati e facoltativi, come Batteriocidi, Clostridi, Bifidobatteri, Streptococchi e Enterobacteriaceae (Weiland 2010).
- *Acetogenesi*, per azione di batteri acidogeni, in cui a partire dagli acidi grassi ad alto peso molecolare, si ha la formazione di acido acetico, acido formico, biossido di carbonio e idrogeno molecolare. Vengono considerati due meccanismi diversi a seconda che la degradazione avvenga a partire da acidi grassi a catena lunga (LCFA, long chain fatty acids) o a catena corta (SCFA, short chain fatty acids, o VFA, volatile fatty acids) (Ahring et al. 1992).
- *Metanogenesi*, in cui avviene la formazione di metano a partire dall'acido acetico o attraverso la riduzione del biossido di carbonio utilizzando l'idrogeno come co-

substrato. La produzione di CH<sub>4</sub> rappresenta la conclusione della catena trofica anaerobica, poiché è l'unico composto non reattivo nell'intero processo di digestione anaerobica. La sua sintesi può avvenire attraverso due differenti reazioni: la dismutazione anaerobica dell'acido acetico con formazione di metano e biossido di carbonio, chiamata anche via *acetoclastica* e l'ossidazione anaerobica dell'idrogeno a metano, ad opera di batteri idrogenotrofi.

Sia l'idrolisi che l'acidogenesi sono condotte simultaneamente in un singolo reattore anaerobico e all'interno di questi digestori anaerobici si sviluppano moltissime specie di batteri classificabili in tre gruppi a seconda della loro risposta all'esposizione all'ossigeno:

- batteri aerobici obbligati, i quali sono in grado di degradare substrati solamente in presenza di ossigeno;
- batteri anaerobici facoltativi, i quali sono attivi sia in presenza che in assenza di ossigeno, come gli *Enterobacter*, e sono capaci di produrre acidi, alcoli e CO<sub>2</sub> a partire da carboidrati, lipidi e proteine;
- batteri anaerobici, i quali sono a loro volta suddivisi in specie tolleranti e intolleranti all'ossigeno. Quelli anaerobici tolleranti possono sopravvivere in presenza di ossigeno, ma essi non sono in grado di degradare substrati o compiere normali attività cellulari, a differenza dei batteri strettamente anaerobi, i quali muoiono in presenza di O<sub>2</sub>.

I primi tre step della digestione anaerobica, idrolisi, acidogenesi ed acetogenesi, sono effettuati da batteri anaerobici facoltativi e batteri anaerobici mentre la metanogenesi è affidata solamente agli archeobatteri.

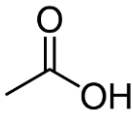
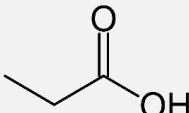
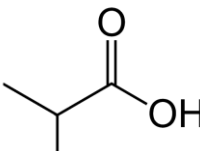
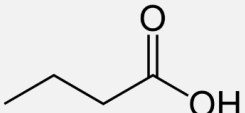
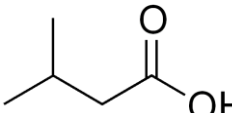
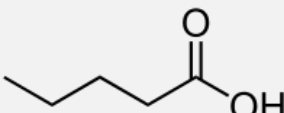
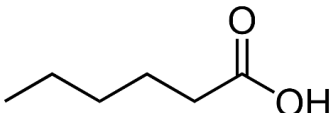
I prodotti della fermentazione, come già accennato, variano molto a seconda delle specie batteriche presenti nel digestore e di conseguenza variano le concentrazioni degli acidi o altri prodotti di digestione. Cambiano così anche i substrati disponibili per gli archea metanogenici e tutto ciò influenza la performance globale del digestore in termini di produzione di biogas e di VFA.

I microorganismi delle prime due fasi della digestione anaerobica differiscono profondamente dai metanogeni, in termini di fisiologia, esigenze nutrizionali, cinetiche di crescita e sensibilità alle condizioni ambientali. Per questo motivo, la mancanza di

equilibrio tra i due gruppi microbici è la prima causa di instabilità nei reattori (Ye Chen, Cheng, and Creamer 2008). Uno dei principali parametri che influenzano questo complesso consorzio microbico è la temperatura, che ha un importante effetto sulle caratteristiche chimico-fisiche dei componenti del substrato; inoltre influenza la velocità di crescita e il metabolismo dei batteri, condizionando quindi anche le dinamiche di popolazione nel sistema. Una temperatura di esercizio più alta ha vari benefici, tra cui la maggiore solubilità dei composti organici, l'aumento della velocità delle reazioni e l'incremento del tasso di mortalità dei patogeni. Tuttavia le alte temperature hanno diversi effetti antagonisti ed eventuali sbalzi termici possono destabilizzare il sistema e diminuire l'efficienza della metanizzazione. I metanogeni acetoclasti infatti sono uno dei gruppi più sensibili e vulnerabili all'incremento della temperatura (Lise Appels et al. 2008a).

I VFA sono acidi grassi a catena corta costituiti da due a sei atomi di carbonio, che possono essere distillati a pressione atmosferica (APHA/AWWA/WEF 2012).



Struttura	Nome comune	Numero atomi di carbonio	Peso molecolare	Punto di ebollizione
	Acetico	2	60	117-118°C
	Propionico	3	74	141°C
	Isobutirrico	4	88	153-154°C
	Butirrico	4	88	162°C
	Isovalerico	5	102	175-177°C
	Valerico	5	102	185°C
	Caproico	6	116	202-203°C

*Tabella 5 Struttura, nome e alcune caratteristiche degli acidi grassi volatili*

Questi acidi hanno una vasta gamma di applicazioni, come ad esempio nella produzione di bioplastiche, di PHA, di bioenergia e nella rimozione biologica di nutrienti dalle acque reflue (Zheng, Chen, and Liu 2010; Jin-dal-rae Choi, Chang, and Han 2011; Uyar et al. 2009; Mengmeng et al. 2009).

È interessante come la composizione dei VFA determina i monomeri di PHA. Ad esempio, i VFA con lunghezze di catena dispari, rispetto a quelle pari, influenzano il bilancio di idrossibutirrato e idrossivalerato che determinano proprietà fisiche e meccaniche del polimero diverse (Bengtsson et al. 2010; Laycock et al. 2014; D. Dionisi et al. 2004; Morgan-Sagastume et al. 2015).

Attualmente la produzione di queste molecole è ottenuta prevalentemente attraverso sintesi chimiche (Huang et al. 2002), ma l'uso dei prodotti petrolchimici non rinnovabili come materie prime e l'aumento del prezzo del petrolio ha riportato l'interesse per la produzione di VFA attraverso percorsi biologici (Akaraonye, Keshavarz, and Roy 2010).

Per produrre VFA sono stati comunemente impiegati, come principale fonte di carbonio, zuccheri puri come il glucosio e il saccarosio (Kondo and Kondo 1996; Zigová et al. 1999); un'altra fonte di carbonio è costituita da scarti come ad esempio i fanghi generati dagli impianti per il trattamento delle acque reflue, gli scarti alimentari, la frazione organica degli scarti solidi urbani e acque reflue industriali; tale utilizzo costituisce un percorso alternativo per ridurre la quantità sempre crescente di scarti generati.

La digestione anaerobica è un'attraente pratica di trattamento degli scarti in cui è possibile ottenere sia il controllo dell'inquinamento che il recupero di energia. Molti scarti agricoli e industriali sono considerati i candidati ideali per la digestione anaerobica perché contengono alti livelli di materiali facilmente biodegradabili.

Alcuni problemi, come la bassa produzione di metano e l'instabilità del processo, impediscono che questa tecnica venga ampiamente applicata. Inoltre, la causa principale della scarsa resa o del fallimento di questa tecnica è la presenza di un'ampia varietà di sostanze inibitorie, in concentrazioni significative negli scarti trattati. Gli inibitori comunemente presenti nei digestori anaerobici includono ammoniaca, solfuro, ioni di metalli leggeri, metalli pesanti e sostanze organiche. A causa della differenza di inoculi anaerobici, composizione degli scarti, metodi e condizioni sperimentali, i risultati della letteratura sull'inibizione causata da specifici agenti tossici variano ampiamente. La co-digestione con altri scarti, l'adattamento dei microrganismi alle sostanze inibitorie e l'incorporazione di metodi per rimuovere o neutralizzare le sostanze tossiche prima della digestione anaerobica possono migliorare significativamente l'efficienza del trattamento (Ye Chen, Cheng, and Creamer 2008).

Negli ultimi anni è aumentato l'interesse verso i sottoprodotti dell'industria agroalimentare, come l'industria vitivinicola, grazie anche all'interesse da parte delle industrie alla riduzione degli impatti dei loro prodotti e all'abbattimento del volume degli scarti e dei loro costi di smaltimento; ciò ha portato ad una maggiore ricerca volta ad ottenere una valorizzazione più efficiente di questi sottoprodotti.

Secondo una stima riportata dall'OIV (International Organization of Vine and Wine), nel 2014 sono stati prodotti nel mondo 279 milioni di ettolitri di vino, di cui 44.4 in Italia. I processi di vinificazione portano alla generazione di quantità significative di solidi e liquidi residui (Martinez et al. 2016). In particolare, le vinacce, che rappresentano i principali scarti solidi dell'industria vitivinicola, sono costituite per circa il 50% da bucce, per il 25% dai raspi e per il 25% dai vinaccioli. Considerando che vengono generati in media 18 kg di vinacce per 100 l di vino prodotto, circa 5 milioni di tonnellate di tali residui vengono generati ogni anno in tutto il mondo, di cui 0,8 in Italia (Rockenbach et al. 2011).

Secondo il precedente regolamento, CE 1493/99, le patate dolci e le fecce delle aziende vinicole dovevano essere trasformate dal processo di distillazione all'interno dell'UE.

Oggi, una recente riforma europea nel settore vitivinicolo, regolamento CE 479/2008, promuove il graduale ritiro delle sovvenzioni alla distillazione e, di conseguenza, revoca la distillazione obbligatoria. Ciò dovrebbe guidare la promozione di protocolli alternativi integrati, sostenibili e standardizzati per la valorizzazione degli scarti solidi delle cantine. Questo approccio consente di ottenere diversi prodotti sfruttando degli avanzi organici, riducendo così al minimo la generazione di scarti (Martinez et al. 2016).

Inizialmente si pensava che una valorizzazione alternativa della vinaccia potesse essere rappresentata dalla produzione di un biogas ricco di metano mediante processi di digestione anaerobica (Rockenbach et al. 2011). Tuttavia, sono state generalmente ottenute basse prestazioni di biometanizzazione, attribuite all'alto contenuto di lignina, che non è facilmente fermentabile.

L'alta produzione di acidi grassi volatili, e quindi il loro accumulo, è considerata un'ulteriore causa inibitoria. Pertanto, la digestione anaerobica acidogena delle vinacce per la produzione di VFA può essere considerata una valida alternativa per la valorizzazione di scarti organici.

Altri scarti utilizzati sono i fanghi di depurazione prodotti in grandi quantità negli impianti di trattamento delle acque reflue. Il trattamento e lo smaltimento appropriati di questi rappresentano in genere fino al 50% degli attuali costi operativi di un impianto di trattamento, costituendo un problema di notevole importanza. La digestione anaerobica per la produzione di metano come tecnologia consolidata per lo smaltimento dei fanghi è stata impiegata in tutto il mondo (Lise Appels et al. 2008b; Mata-Alvarez, Macé, and Llabrés 2000). Nello stadio di acidogenesi della digestione anaerobica di solito vengono prodotti diversi tipi di VFA, questi, come già detto in precedenza, sono considerati una fonte favorevole per la produzione microbica di plastiche biodegradabili (Yamin Jiang, Chen, and Zheng 2009; D. Dionisi et al. 2005), e possono essere utilizzati come fonte di carbonio per rimuovere fosforo e azoto negli impianti di trattamento delle acque reflue (Yinguang Chen, Randall, and McCue 2004; Skalsky and Daigger 1995). Pertanto, l'acidogenesi è riconosciuta come una tecnica promettente e fattibile per la produzione di prodotti a valore aggiunto dai fanghi. Sebbene non ci sia una conclusione consensuale, molti studi hanno dimostrato che la fermentazione anaerobica in condizioni alcaline può migliorare in modo significativo la produzione di VFA dai fanghi di depurazione (Yuan et al. 2006; Cai, Liu, and Wei 2004).

A tal proposito, uno studio condotto da H. Liu et al. nel 2012 hanno dimostrato che i rendimenti di VFA e la percentuale di acetato erano più alti in condizioni di pH alcalino rispetto a quelli condotti in condizioni di pH neutro o acido. Infine, il valore del pH ha influenzato in modo significativo la biodiversità e la comunità batterica nei reattori anaerobici con un fango ricco di proteine utilizzato come substrato.

Negli ultimi anni, c'è stato un crescente interesse nella produzione di PHA utilizzando come fonte di carbonio VFA generati appunto dalla fermentazione acidogenica dei fanghi in eccesso dal trattamento delle acque reflue (Morgan-Sagastume et al. 2010; Jia, Wang, and Wang 2013).

Sia i fanghi primari che i fanghi attivi che derivano da questi trattamenti, sono ricchi di materia organica con il COD totale che va da 14.800 mg/l a 23.000 mg/l, rendendoli scarti promettenti per la produzione di VFA. Comunque, il COD solubile del fango è normalmente da dieci a cento volte inferiore rispetto al suo totale COD e questo ritarda la produzione di VFA poiché l'idrolisi della materia organica nei fanghi è la fase che ne limita il tasso di produzione. Quindi, maggiore sforzo dovrebbe essere diretto per

migliorare l'idrolisi, ad esempio attraverso l'applicazione di un pretrattamento (S. Jiang et al. 2007; Ji, Chen, and Chen 2010; S. Jiang, Chen, and Zhou 2007a).

Le acque reflue generate dalle industrie agricole (D. Dionisi et al. 2005), caseifici (Bengtsson, Hallquist, et al. 2008; Demirel and Yenigun 2004; Yu and Fang 2001), della cellulosa e della carta (Bengtsson, Werker, et al. 2008; Yang Jiang et al. 2012), sono comunemente utilizzate per la produzione di VFA. Di contro, gli effluenti dell'industria petrolchimica sono ritenuti inadatti alla produzione di VFA indipendentemente dal loro alto valore di COD 11.500 mg/l, a causa della presenza di inquinanti tossici e recalcitranti petrolchimici che sono dannosi per i microrganismi. Rispetto alle acque reflue industriali, le acque reflue urbane hanno un basso contenuto organico, con COD tipico nell'intervallo di 175-600 mg/l, quindi non sono particolarmente interessanti per la produzione di VFA (Ghosh, Samanta, and Ray 2010).

Nell'insieme non è ancora chiaro quale tipo di scarto sia più adatto per la produzione di VFA a causa delle diverse condizioni operative e dei differenti criteri di valutazione delle prestazioni. Tuttavia, gli scarti comunemente usati per la produzione di VFA, in generale, sono ricchi di materia organica con COD superiore a 4000 mg/l. Questo potrebbe servire come guida preliminare per la loro selezione. Inoltre, il contenuto di ammonio negli scarti dovrebbe essere inferiore a 5000 mg/l per evitare l'inibizione della produzione di VFA (Yu and Fang 2001), sebbene sia una fonte essenziale di azoto per la crescita dei microrganismi. Oltre alle caratteristiche degli scarti, occorre tenere in considerazione la disponibilità e la quantità di scarti generati per garantirne una fornitura stabile e continua per la produzione di VFA (Salehizadeh and Van Loosdrecht 2004).

### 5.1 Pretrattamenti scarti

A causa della complessa struttura e composizione degli scarti, la produzione di VFA è limitata (Fdez.-Güelfo et al. 2011). Ad esempio, la parete cellulare e le sostanze polimeriche extracellulari nei fanghi impongono delle barriere fisiche e chimiche per l'idrolisi (Tang et al. 2010). Nel frattempo, i materiali lignocellulosici, i grassi e le proteine negli scarti alimentari, riducono il loro tasso di biodegradazione (López Torres and Espinosa Lloréns 2008; Marin, Kennedy, and Eskicioglu 2010). Quindi, generalmente vengono utilizzati vari metodi di pretrattamento per migliorare la solubilizzazione degli scarti solidi.

Il pretrattamento chimico è efficace per migliorare l'idrolisi degli scarti solidi. I reagenti comunemente usati nel pretrattamento chimico sono acidi, alcali (Elbeshbishy et al. 2011; Devlin et al. 2011), ozono (Cesaro and Belgiorno 2013; Xu et al. 2010) e perossido di idrogeno (Shahriari et al. 2012; Eskicioglu et al. 2008). L'applicazione di pretrattamenti acidi e alcalini aiuta in due modi a migliorare la solubilizzazione delle sostanze polimeriche extracellulari nei fanghi e a rompere le pareti cellulari, determinando il rilascio di materia organica intracellulare (D. H. Kim et al. 2010; Devlin et al. 2011). Oltre ai fanghi, questi due metodi di pretrattamento promuovono anche la solubilizzazione di scarti alimentari (Elbeshbishy et al. 2011). Uno svantaggio significativo è la necessità di attrezzature resistenti alla corrosione a causa degli estremi valori del pH utilizzato. D'altra parte, il pretrattamento con ozono è un'altra opzione. L'ozono è un forte agente ossidante che può decomporsi in radicali idrossili per reagire con scarti solidi, portando alla solubilizzazione (Xu et al. 2010). Tuttavia, l'alto costo ne limita l'utilizzo. Il perossido di idrogeno potrebbe essere un'alternativa meno costosa, ma è meno reattivo in quanto il potenziale di ossidazione è inferiore a quello dell'ozono.

Agenti biologici come enzimi idrolitici, *Aspergillus awamori*, compost maturo e fanghi attivi dall'impianto di trattamento delle acque reflue municipali (Fdez.-Güelfo et al. 2011) sono utilizzati per migliorare la solubilizzazione degli scarti solidi. Nel pretrattamento con enzimi, il dosaggio di una miscela di enzimi ha avuto un impatto maggiore sull'idrolisi degli scarti solidi, rispetto a un singolo enzima, perché diversi enzimi idrolizzano diversi componenti (H. J. Kim et al. 2006; Yang et al. 2010). Il pretrattamento con enzimi e colture pure può essere molto dispendioso, quindi materiali economici come il compost maturo e il fango attivo dovrebbero essere considerati in applicazioni su larga scala. Un altro fattore significativo è la durata, generalmente è più lunga nel pretrattamento da parte dei processi biologici rispetto ad altri metodi fisico-chimici.

Il pretrattamento a microonde è un'altra opzione, che migliora l'idrolisi di scarti solidi attraverso effetti termici e atermici, ma questo essendo ad alta intensità energetica, può portare alla formazione di composti recalcitranti che riducono la biodegradabilità degli scarti solidi trattati.

L'applicazione degli ultrasuoni per migliorare la solubilizzazione porta alla formazione di bolle di cavitazione, il collasso delle bolle genera forze di taglio idromeccaniche abbastanza forti da disturbare le macromolecole presenti negli scarti. Il collasso fa

aumentare anche la temperatura e la pressione, che portano alla formazione di radicali idrossilici reattivi e alla distruzione termica degli scarti solidi (Tiehm et al. 2001). Simile al pretrattamento a microonde, il pretrattamento ultrasonico è un metodo ad alta intensità energetica. In letteratura, diversi metodi di pretrattamento sono stati combinati per promuovere l'idrolisi sinergica degli scarti solidi. Ad esempio, il pretrattamento combinato alcalino e ultrasonico ha provocato una migliore disintegrazione dei fanghi di depurazione, in cui il pretrattamento alcalino ha indebolito la parete cellulare microbica, rendendolo così più vulnerabile alle forze di taglio generate dal pretrattamento ultrasonico (D. H. Kim et al. 2010).

Negli ultimi anni, sono stati utilizzati additivi come tensioattivi ed enzimi per migliorare la produzione di VFA dai fanghi. Nonostante alcuni additivi hanno effetti idrolitici/solubilizzanti sugli scarti, non sono considerati agenti di pretrattamento perché vengono aggiunti durante, anziché prima, della fermentazione acidogenica.

I tensioattivi sono noti per la loro buona capacità di solubilizzazione, pertanto, l'aggiunta di questi ai fanghi migliora la solubilizzazione delle sostanze polimeriche extracellulari che sono principalmente carboidrati e proteine (H. Liu and Fang 2002), fornendo in questo modo più substrati per l'idrolisi. In considerazione di ciò, i fanghi con un contenuto alto di tensioattivi dovrebbero essere sfruttati maggiormente. Tali potenziali fanghi provengono dagli impianti di trattamento delle acque reflue dell'industria tessile e dai prodotti di uso quotidiano (S. Jiang, Chen, and Zhou 2007b; S. Jiang et al. 2007).

Gli inibitori chimici della metanogenesi, inoltre, potrebbero migliorare la produzione di VFA sopprimendo l'attività degli archaea. He Liu et al. nel 2011, ha esaminato i diversi tipi di inibitori chimici e i loro rispettivi meccanismi di inibizione. Gli inibitori chimici della metanogenesi possono essere classificati come inibitori specifici e non specifici. Il primo inibisce gli enzimi specifici presenti solo nei metanogeni, mentre gli inibitori non specifici influenzano l'attività sia dei metanogeni che dei non-metanogeni. Esempi di inibitore non specifico sono l'etilene, acetilene e diversi idrocarburi alifatici alogenati come cloroformio, fluoroacetato e metil fluoruro.

In sostanza, la produzione di VFA può essere migliorata attraverso l'applicazione di vari metodi di pretrattamento e con l'aggiunta di tensioattivi, enzimi idrolitici e inibitori metanogeni chimici.

## 6. Pirolisi

La pirolisi è un processo termochimico che avviene ad una temperatura che varia dai 400-700°C sotto un flusso di un gas inerte, generalmente azoto; è uno dei metodi più rapidi per la depolimerizzazione delle macromolecole delle biomasse in frammenti molecolari più piccoli.

Attraverso la pirolisi si generano tre sottoprodotti:

- un liquido, il bio-olio, un liquido organico viscoso di colore scuro che si separa in due fasi: una fase acquosa e una fase organica formata da centinaia di composti organici come acidi, alcoli, chetoni, fenoli eteri, esteri, composti azotati e vari ossidi (Rezaei, Shafaghat, and Daud 2014);
- un gas di sintesi, syngas, un gas combustibile costituito principalmente da CO<sub>2</sub>, CO, H<sub>2</sub> e da altri composti come metano, etano, etilene, propano, ammoniaca, NO<sub>x</sub> e SO<sub>x</sub> (Kan, Strezov, and Evans 2016);
- un solido carbonioso, il biochar, un materiale ricco di carbonio che, se applicato ai suoli, è un potente ammendante. La sua alta porosità aumenta la ritenzione idrica e quella degli elementi nutritivi che rimangono più a lungo disponibili per le piante, inoltre migliora la struttura del terreno e le sue proprietà meccaniche (Chan et al. 2007).

Esistono tre tipi diversi di pirolisi e in base al tipo di pirolisi che viene eseguita si hanno percentuali diverse prodotti:

- *slow pyrolysis*, chiamata pirolisi lenta, è caratterizzata da una velocità di riscaldamento molto bassa e spesso avviene ad una temperatura di reazione che va dai 200 ai 350 °C, con tempi di residenza molto lunghi che variano dai 5 min ai 30 min. Questo tipo di pirolisi viene utilizzata per massimizzare la produzione di biochar, che si aggira intorno al 35%, determina una produzione di gas, anch'essa circa del 35% e una produzione di olio stimata del 30%.
- *intermediate pyrolysis*, detta anche pirolisi convenzionale o intermedia, ha moderati tempi di residenza, qualche minuto, con temperature di reazione che si aggirano sui 500°C. Attraverso questo processo si è in grado di produrre il all'incirca un 30% di biochar, circa il 20% di gas, e fino al 50% di liquido di



pirolisi con un contenuto di acqua relativamente elevato, circa il 50% (Bridgwater 2012).

- *fast pyrolysis*, pirolisi veloce, è un processo ad alta temperatura in cui la biomassa grezza è riscaldata molto velocemente; in questo processo la produzione di olio è massimizzata fino al 75%, mentre il biochar prodotto si aggira al 12% e il gas al 13%.

Nella pirolisi intermedia, a causa dell'elevata quantità di acqua di reazione prodotta, si verifica in genere la separazione di fase nel bio-olio. Questo fenomeno produce una frazione insolubile in acqua (15-30%) e uno sciroppo acquoso che costituisce l'85-70%, chiamato liquido di pirolisi acquosa, APL. Quest'ultimo è ricco in sostanze solubili in acqua quali zuccheri, idrossiacidi, oligomeri, fenoli e furani che potrebbero essere considerati come materia prima per i trattamenti biologici (Cordella et al. 2012; Oasmaa and Kuoppala 2008).

Il vantaggio intrinseco del trattamento biologico è che i batteri sono in grado di convertire, a bassa temperatura, una vasta gamma di composti con caratteristiche chimiche diverse e possono essere ottenuti prodotti con elevata purezza (Brown 2007).

Un approccio alternativo per la conversione delle biomasse consiste nel sottoporle a trattamenti termochimici, con la produzione di un prodotto intermedio uniforme, che può essere successivamente convertito biologicamente in un prodotto a base biologica. Questo percorso alternativo è noto come trattamento ibrido termochimico-biologico. Esistono due approcci distinti all'elaborazione ibrida: la gassificazione seguita dalla fermentazione della risultante miscela gassosa di monossido di carbonio (CO), idrogeno (H<sub>2</sub>) e biossido di carbonio (CO<sub>2</sub>) o la rapida pirolisi, seguita da idrolisi e/o fermentazione degli zuccheri anidro trovati nel bio-olio risultante. Una delle più semplici conversioni biologiche disponibili è per l'appunto la digestione anaerobica, la quale può essere eseguita in apparecchiature a basso costo e non sterili attraverso consorzi misti anaerobici che possono essere, in linea di principio, adattabili ad un'ampia gamma di substrati (L. Appels et al. 2011).

Torri e Fabbri nel 2014, hanno valutato in dettaglio la digestione anaerobica dell'APL e come l'aggiunta di biochar possa essere una soluzione per aumentare le prestazioni del processo di digestione anaerobica.

Questo effetto è stato attribuito alla capacità del biochar di ridurre la tossicità dei prodotti di pirolisi attraverso l'adsorbimento. L'adsorbimento sul biochar potrebbe essere selettivo nel favorire la rimozione di furani più idrofobi e tossici rispetto agli zuccheri più idrofili e digeribili rimasti nella fase acquosa e fornire supporto ai microrganismi (Monlau et al. 2015; Mumme et al. 2014).

I risultati del loro lavoro sembrano confermare questo effetto positivo e confermare che il biochar potrebbe essere considerato un "catalizzatore" a basso costo per i processi anaerobici, soprattutto in presenza di potenziali inibitori.

La capacità del biochar di agire come vettore di elettroni è stata dimostrata nel caso di co-culture di *Geobacter metallireducens* con *Geobacter sulfurreducens* o *Methanosarcina barkeri* per la conversione di etanolo, il donatore di elettroni, in fumarato o metano, l'accettore di elettroni. Materiali carboniosi elettricamente conduttivi potrebbero favorire il trasferimento di elettroni tra microrganismi, in particolare nella conversione di alcoli e VFA in acetato, che è un passo lento in nella digestione anaerobica (Zhao et al. 2015).

## **7. Materiali e metodi**

### **7.1 Reagenti**

Tutti i reagenti ed i solventi usati in questo lavoro sono stati acquistati da Sigma-Aldrich, con un grado di purezza  $\geq 99\%$  e sono stati utilizzati senza ulteriori trattamenti o purificazioni.

### **7.2 Campioni per la produzione di VFA**

Nella fase sperimentale del lavoro di tesi, è stato condotto il processo di digestione anaerobica in modalità batch ed in condizioni mesofile.

Per la produzione di VFA e biogas sono stati utilizzati quattro tipologie diverse di scarto ottenuti presso Caviro Distillerie:

- fango di depurazione;

- fango ultrafiltrato, ovvero fango aerobico ulteriormente filtrato, il quale presenta un'alta concentrazione di metalli, poco digeribili dai batteri;
- cavitato, ottenuto da un mix di fango e vinaccia cavitata;
- vinaccia esausta, uno dei maggiori sottoprodotti solidi dell'attività vitivinicola, costituisce il 10% - 20% del peso dell'uva e include la pelle, i semi e ogni altro materiale solido che vi rimane dopo la spremitura.

Per un totale di n.10 campioni, sono stati analizzati n.1 bianco, n.1 controllo (glucosio), n.4 campioni di fango e n.4 campioni di fango inseriti in autoclave a 121°C.

	g	COD mg
Controllo	0.1	100
Fango dep.	1	224.64
Fango UF	6	294.6
Cavitato	1.2	249.7
Vinaccia	0.2	280

*Tabella 6 Quantitativo delle biomasse utilizzate per la produzione di VFA*

Giornalmente sono state misurate le quantità di VFA e di gas prodotto ed è stato riportato su grafico l'andamento dei due su un arco temporale di 15 giorni in funzione alla % di COD presente.

### 7.3 Digestione anaerobica

Come digestori anaerobici sono stati utilizzati delle siringhe con una capacità massima di 100 ml le cui estremità sono state chiuse attraverso un tappo di gomma forabile ed al suo interno sono stati inseriti 20 ml di fango anaerobico. Per il controllo è stato aggiunto 100 mg di glucosio. In tutte le siringhe, per un totale di 10, è stata delicatamente tolta l'aria e incubate tutta la notte e sistemate in una stufa a 40°C.

La quantità di biogas prodotto, su ogni campione, è stata valutata mediante la quantificazione visiva del volume in ml attraverso le siringhe graduate, poiché il gas spinge lo stantuffo di quest'ultime verso l'esterno.



*Figura 9 Digestore anaerobico*

Segnati i ml di gas prodotti, ne sono stati attentamente prelevati almeno 3-4 ml attraverso il cappuccio in gomma mediante un ago e successivamente, tramite un gas cromatografo dotato di un detector a conduttività termica (TCD), è stata determinata la composizione del biogas in termini di CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>, CO e CO<sub>2</sub>.

Dopo ogni quantificazione e analisi del gas per tutti i digestori, il cappuccio di gomma è stato rimosso, il biossido di gas residuo e l'aria in entrata sono stati espulsi dalla siringa e sono stati ottenuti circa 100 mg di campione per analisi VFA.

Successivamente, la siringa è stata chiusa, la tenuta pneumatica è stata controllata tirando leggermente lo stantuffo e la siringa è stata rimessa nella stanza del termostato a 40 ° C.

#### 7.4 Pirolisi

Attraverso la pirolisi intermedia del fango di depurazione, cavitato e vinaccia, sono stati ottenuti i corrispondenti biochar e gli oli di pirolisi mediante un pirolizzatore a letto fisso, in atmosfera inerte, sotto flusso di azoto fissato a 1000 cm<sup>3</sup>/min; tale pirolizzatore è costituito da una fornace, la camera di pirolisi, in cui è inserito un tubo di quarzo all'interno del quale viene posto il campione. La camera di pirolisi presenta due aperture, una per l'introduzione della termocoppia e del porta campioni e una per introdurre il flusso di gas inerte.

All'estremità della camera di pirolisi sono state applicate delle trappole per la raccolta degli oli di pirolisi.

Il cavitato, la vinaccia e il fango di depurazione sono stati pirolizzati ad una temperatura di 500°C e per ognuna di queste biomasse sono state effettuate due pirolisi ognuna con 10 g di ogni campione, al fine di raccogliere una quantità di olio necessaria per il test di digestione anaerobica e la caratterizzazione chimica.

Una volta terminata la procedura, è stata pesata su una bilancia la quantità di biochar prodotto, mentre il liquido di pirolisi è stato calcolato come differenza tra il peso del sistema di trappole prima e dopo la pirolisi.

### 7.5 Digestione anaerobica accoppiata a pirolisi

Con i biochar e gli oli ottenuti dalla pirolisi intermedia del fango di depurazione, del cavitato e della vinaccia, sono stati creati n. 3 digestori anaerobici, costituiti da siringhe da 100 ml in cui sono stati aggiunti 20 ml di inoculo batterico. In ogni digestore sono stati addizionati 1 g biochar e 0.5 ml di olio di pirolisi prodotti delle rispettive biomasse (fango, cavitato e vinaccia). Come per i casi precedenti, questi sono stati sottoposti a trattamento termico tramite autoclave (121°C, 1 bar) e monitorati per un periodo di tempo di 15 giorni.

### 7.6 GC-MS

Attraverso un gascromatografo a spettrometria di massa (GC-MS) sono state determinate le quantità di VFA prodotti da tutti i digestori; da ogni siringa sono stati prelevati 100 µl di digestato e immessi in un vial da 2 ml; a questo sono stati addizionati 100 µl di KHSO<sub>4</sub> (solfato di potassio) e, 100 µl di standard interno, etilbutirrato ad una concentrazione di 1000 ppm e ad 1ml di solvente, il DMC (dimetilcarbonato).

Il GC-MS utilizzato è un 6850 Agilent HP collegato ad uno spettrometro di massa 5975 Agilent a quadrupolo. Con una temperatura dell'iniettore di 280°C. Gli analiti vengono separati da una colonna capillare HP-5 fused-silica (fase stazionaria poli[5% difenil/95% dimetil]silossano), 0.25 mm i.d., 0.25 mm spessore del film, con elio come gas carrier (a pressione costante e velocità lineare a 200°C di 33 cm al secondo). Gli spettri di massa sono stati registrati in ionizzazione elettronica (70 eV) ad una frequenza di 1 scan al secondo nel range di 12-600 m/z. L'analisi è stata effettuata con una temperatura iniziale

della colonna di 50°C mantenuta per 5 min. La temperatura è stata poi innalzata fino a 325°C a 10°C al minuto, con un post-run a 325°C per 1 min.

### 7.7 Analisi elementare

La composizione elementare delle biomasse e del biochar analizzate sono state determinate utilizzando un analizzatore elementare configurato per la determinazione CHNS-O (Thermo Scientific, Flash 2000, Organic Elemental Analyzer) attraverso una tecnica di combustione flash. Le analisi hanno fornito i valori percentuali di C, H, N.

### 7.8 Analisi del contenuto di ceneri

Per la determinazione delle ceneri sono stati posti 1 g di fango, cavitato e vinaccia e i corrispettivi biochar in dei crogiuoli precedentemente tarati. I crogiuoli e le biomasse sono stati posti in muffola e portati ad una temperatura di 600°C per 5 ore. Trascorso un breve tempo di raffreddamento le ceneri sono state pesate. Il contenuto di ossigeno nei campioni viene infine calcolato per differenza:  $O = 100 - \sum(CHNS + ceneri)$ .

Tutte le analisi sono state eseguite in duplicato.

### 7.9 Sililazione

Per la sililazione degli oli di pirolisi sono stati utilizzati 100 µl di standard interno, sorbitolo ad una concentrazione di 1000 ppm, 100 µl di sililante BSTFA (N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamide) e 100 µl di piridina. Dopo essere stati posti su una piastra riscaldante ad una temperatura di 60°C per due ore e lasciati raffreddare, vengono aggiunti 100 µl di solvente, acetonitrile (CH<sub>3</sub>CN); 50 µl di campione sono stati poi prelevati e portati a volume con il solvente fino a 1 ml. Successivamente sono stati iniettati, per mezzo di una siringa, 1 µl di campione in un gas cromatografo 6850 Agilent HP interfacciato ad uno spettrometro di massa a quadrupolo 5975 Agilent HP. Gli analiti sono stati separati da una colonna fused-silica HP-5MS (fase stazionaria poli[5% difenil/95%dimetil]silossano, 30 m × 0.25 mm ID, 0.25 µm film) e utilizzando elio come fase mobile (a pressione costante 33 cm al secondo velocità lineare a 200°C). Gli spettri

di massa sono stati acquisiti in condizioni di ionizzazione elettronica (EI) a 70 eV, con una frequenza di 1scan al secondo nel range 12-600 m/z.

### 7.10 Campioni utilizzati per i Test di produzione di PHA

Per questo studio sono stati effettuati diversi test su tre fanghi diversi per valutare la capacità dei batteri di accumulare PHA. Ogni fango è stato analizzato due volte a distanza di un paio di mesi al fine di evidenziare eventuali cambiamenti.

- 2 l di fango industriale preso presso Caviro Distillerie
- 2 l di fango urbano preso presso Hera Ravenna
- 2 l di fango urbano ottenuto presso Hera Forlì

Questi test consistono nel prelievo di 1 l di fango dalla vasca di accumulo dei fanghi dell'impianto scelto, seguito da un'alimentazione per 6 h del fango con 5 ml/h di acido acetico per mezzo di una pompa peristaltica. Nel corso degli esperimenti si è provveduto ad insufflare aria nella sezione di fondo del reattore aerobico; questi necessitano di elevati quantitativi di ossigeno disciolto nel mezzo di coltura.

Nel corso di questi esperimenti è stata valutata la variazione in VFA e il contenuto di PHA.

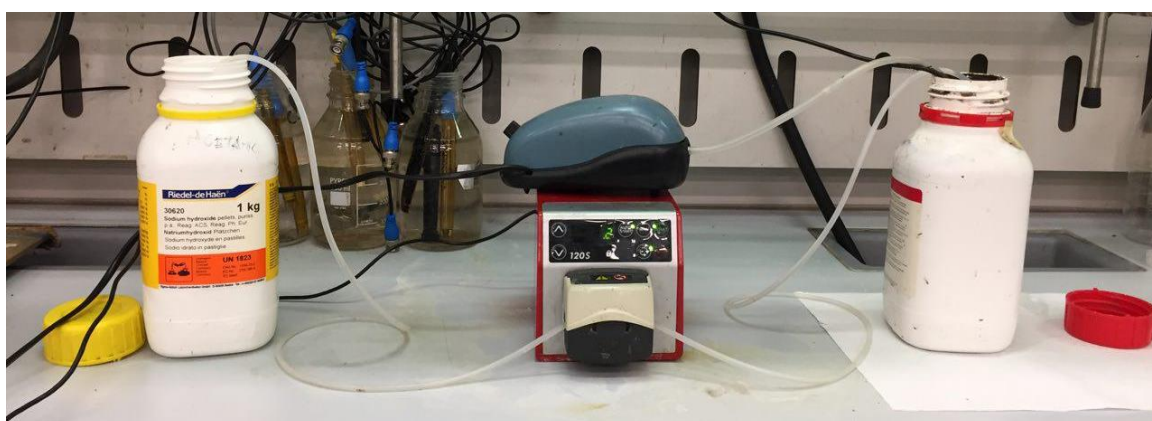


Figura 10 A sx 100g/l di acido acetico; a dx 1l di fango

Ad ogni ora, con l'ausilio di una pipetta, sono stati prelevati 10 ml di fango e inseriti in delle provette e infine centrifugati per separare la fase liquida dalla fase solida, il fango.

Dalla provetta stessa sono stati prelevati 100 ml di fase liquida per la determinazione dei VFA, al fine di verificare se l'acido acetico dosato fosse stato digerito completamente o in parte dai batteri presenti nel fango.

La fase solida, cioè il fango privato dell'acqua, è stato congelato e successivamente liofilizzato.

Trascorso un tempo di 24 h nel liofilizzatore i campioni sono stati prelevati e su ognuno di essi è stata effettuata un'analisi di metapirolisi al fine di quantificare il PHA contenuto.

### 7.11 Metapirolisi

La metapirolisi è nuovo metodo basato sull'analisi GC-MS dei prodotti di termolisi ottenuti dal trattamento dei batteri; questo metodo consente in maniera rapida e poco costosa di determinare la quantità di PHA presente nella biomassa (Abbondanzi et al. 2017).

Per la metapirolisi sono stati prelevati 5 mg di fango liofilizzato e inseriti in un vial da 4 ml. I vial vengono chiusi con dei tappi e posizionati sopra un piastra riscaldata a 350°C per 30 min.

Trascorsi 30 min e un breve tempo di raffreddamento dei vial, sono stati aggiunti 50 µl di standard interno, ovvero di 2-etilbutirrato ad una concentrazione di 5000 ppm in aceto nitrile (CH<sub>3</sub>CN), e 4 ml di CH<sub>3</sub>CN.

Da ogni fiala è stato prelevato 1 ml di soluzione, successivamente inserito in un vial da 2 ml al fine di determinare la quantità di PHA presente attraverso il GC-MS 6850 Agilent HP.

## 8. Risultati e discussioni

### 8.1 Analisi elementare

I fanghi di depurazione sono una complessa miscela eterogenea di microrganismi, sostanze organiche non digerite come carta, residui vegetali, oli o materiale fecale, materiali inorganici e umidità.



I materiali organici non digeriti contengono una miscela altamente complessa di molecole provenienti da proteine e peptidi, lipidi, polisaccaridi, macromolecole con strutture fenoliche o strutture alifatiche, insieme a microinquinanti organici (Fonts et al. 2012). I materiali inorganici presenti provengono principalmente dal suolo ma anche da polimeri sintetici di origine antropogenica.

L'azoto presente nei fanghi di depurazione deriva principalmente dalla frazione proteica di questo materiale, che ha origine nei microrganismi utilizzati per la purificazione dell'acqua. I fanghi di depurazione delle acque reflue a seconda dei processi di stabilizzazione, contengono in media il 50-70% di materia organica e il 30-50% di componenti minerali dall'1 al 4% di C e il 3.4-4.0% di N (Tyagi and Lo 2013; Fytli and Zabaniotou 2008; Samolada and Zabaniotou 2014).

I fanghi di depurazione contengono grandi concentrazioni di azoto e fosforo e possono essere considerati fertilizzanti per le piante, ma comprendono anche diversi contaminanti, sia inorganici, come metalli pesanti, e organici, come idrocarburi policiclici aromatici (IPA), policlorobifenili (PCB), pesticidi, tensioattivi, ormoni, prodotti farmaceutici, e molti altri (Siebielska 2014). Inoltre, la presenza di diverse specie patogene di organismi viventi, come batteri, virus e protozoi insieme ad altri parassiti possono creare potenziali pericoli per la salute di esseri umani, animali e piante (Kacprzak and Stańczyk-Mazanek 2003; Fijalkowski, Kacprzak, and Rorat 2014).

Di seguito sono riportate le composizioni elementari in % delle biomasse e dei suoi sottoprodotti, oli di pirolisi e biochar.

<b>Biomassa</b>	N %	C %	H %	ceneri %	O %
Fango dep	5.5	32.7	5.3	33.2	23.3
Cavitato	3.9	54.2	7.3	9.7	24.9
Vinaccia	5.2	35.1	5.3	5.6	48.8

*Tabella 7 Analisi elementare biomasse*

<b>Olio (TQ)</b>	Resa %	N %	C %	H %	ceneri %	O %
Fango dep	20.6	2.5	9.1	5.2	0	82.8
Cavitato	32.4	4.3	13.9	0.0	0	81.7
Vinaccia	27.9	1.5	6.2	8.2	0	84.1

*Tabella 8 Analisi elementare olio di pirolisi delle biomasse*

<b>Biochar</b>	Resa %	N %	C %	H %	ceneri %	O %
Fango dep	53.0	2.8	24.5	1.6	61.6	24.0
Cavitato	34.2	3.4	48.8	2.8	28.5	16.6
Vinaccia	37.3	2.4	71.2	3.5	9.2	13.7

*Tabella 9 Analisi elementare del biochar ottenuto dalle pirolisi delle biomasse*

Dalle analisi elementari delle biomasse, si evince che il cavitato contiene un contenuto di carbonio (54.2%) più alto rispetto al fango di depurazione (32.7%) e la vinaccia (35.1%); quest'ultima contiene un'alta percentuale di ossigeno (48.8%), quasi il doppio, rispetto le precedenti.

Durante il processo di pirolisi il contenuto di carbonio diminuisce drasticamente nei prodotti acquosi per tutti e tre i campioni analizzati; infatti il contenuto di ossigeno quadruplica rispetto la biomassa non pirolizzata.

Il biochar, come tale, contiene un elevato contenuto di carbonio, in maniera spiccata nella vinaccia (71.2%).

Uno studio sperimentale sulla valorizzazione energetica dei fanghi di depurazione condotto da Ischia et al. nel 2007, su un campione di fango ottenuto dall'impianto di trattamento delle acque di scarico urbano di Trento, riporta, in seguito ad un'analisi elementare, una quantità di carbonio del 36.0%, mentre idrogeno, azoto sono presenti nel campione rispettivamente al 4.5 e 5.6 %.

## 8.2 Caratterizzazione fase acquosa degli oli di pirolisi

La pirolisi di 20 g di fango di depurazione ha prodotto 5.30 g di biochar (53%), 4.13 g di olio (20.6%) formato dall'85% di APL e il 15% di prodotto insolubile, il 26.4% di gas.

Per 18g di cavitato è stato prodotto 5.84 g di olio (32.4%) formato dal 50% di APL e 50% da prodotti insolubili, 3.42 g di biochar (34.2%) e il 33.3% gas.

Infine con 12 g di vinaccia si è ottenuto 3.35 g di olio (27.9%) di cui quasi il 100% era costituito da APL, 4.47 g di biochar (37.3%) e il 34.8% di gas.

Inguanzo et al. nel 2002 hanno condotto uno studio sperimentale in cui hanno utilizzato un fango prodotto da un impianto di trattamento di acque reflue urbane come materiale di partenza per degli esperimenti di pirolisi. Lo scopo del loro lavoro è stato quello di

ottenere maggiori informazioni riguardo la produzione di biochar, olio e gas, lavorando a diverse temperature.

Lavorando ad una temperatura di 450°C, e con una velocità di riscaldamento di 60°C al minuto, in questo studio sperimentale è stato ottenuto il 51% di biochar, il 35.7% di olio di pirolisi e il 13.3% di gas, in cui hanno dimostrato che un aumento della temperatura graduale di pirolisi, determina una diminuzione della frazione solida ed un aumento della frazione gassosa, mentre quella liquida rimane costante; inoltre l'effetto della velocità di riscaldamento è importante solo alle basse temperature finali di pirolisi. A temperature superiori a 650° C è praticamente trascurabile.

Dalle loro analisi elementare è emerso un quantitativo di C del 35.7%, 5.2% di H, il 3.5% di N e il 25.4% di ossigeno, e un contenuto di ceneri pari al 29.5%.

Di seguito sono riportate le caratterizzazioni effettuate sull'APL utilizzato come additivo nella digestione anaerobica, per l'incremento della produzione di VFA del fango, cavitato e delle vinaccia.

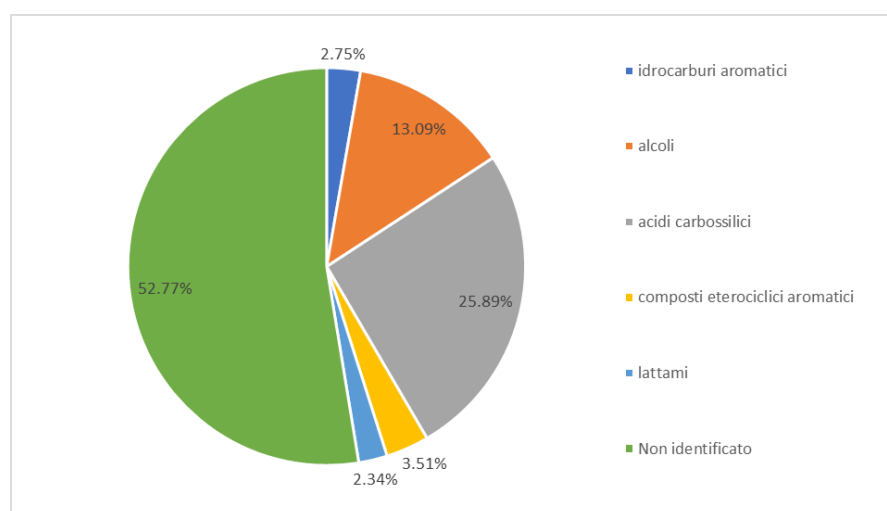


Figura 11 Risultati caratterizzazione fango

Dai risultati è emerso che le famiglie ritrovate nella fase acquosa del fango sono prevalentemente idrocarburi, alcoli ed acidi carbossilici. In particolare gli idrocarburi aromatici di cui il 1.50% è composto da pirocatecolo (1,2-diidrossibenzene), gli alcoli in cui emerge il levoglucosano con il 2.87%, acidi carbossilici con l'acido esadecanoico che

ricopre il 5.4%, tra i composti eterociclici aromatici vi troviamo con quasi il 2% il 3-idrossipiridina e in fine con il 2.34 troviamo il pirrolidone.

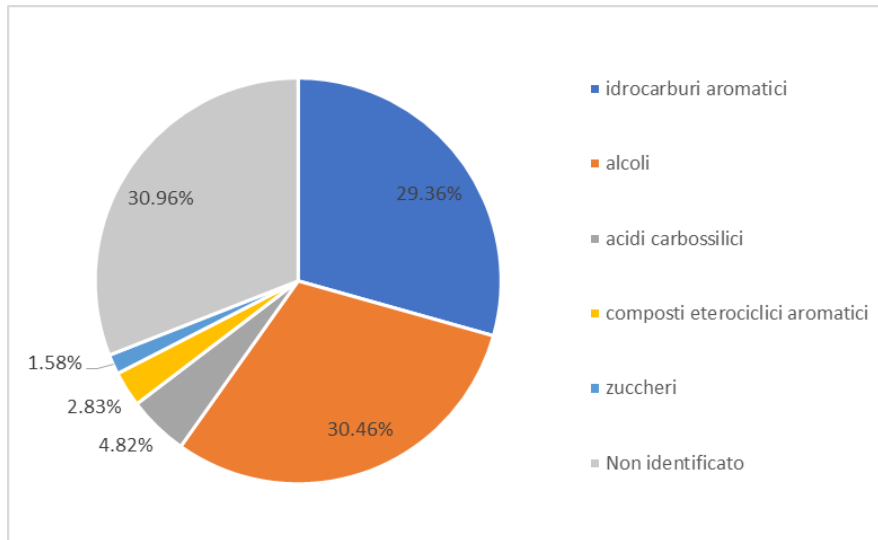


Figura 12 Risultati caratterizzazione vinaccia

Nella caratterizzazione della fase acquosa della vinaccia sono presenti prevalentemente alcoli acidi carbossilici e composti eterociclici aromatici. Tra quest' ultimi emerge con il 18.13% il pirocatecolo tra gli idrocarburi aromatici, con quasi l'11% il glicerolo tra gli alcoli, 1.45% di acido lattico tra gli acidi carbossilici, tra i composti eterociclici aromatici il 1.86% è formato dall'1,3 idrossipiridina; a differenza del fango, è stato trovato il ribosio che ricopre il 1.58% sul totale.

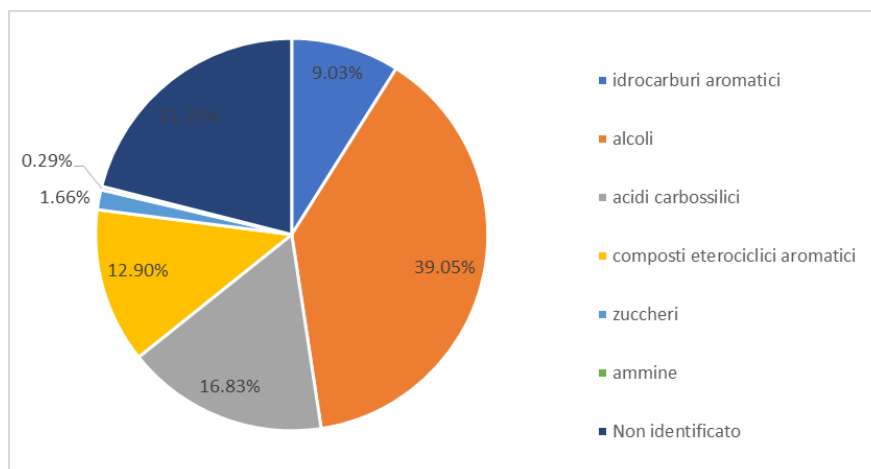


Figura 13 Risultati caratterizzazione cavitato

Anche nel caso della fase acquosa del cavitato, come nel caso della vinaccia, le famiglie prevalentemente presenti sono gli alcoli, i composti eterociclici aromatici e gli acidi carbossilici.

Tra gli idrocarburi aromatici risulta il più abbondante il diidrossibenzene con quasi l'1% sul totale, con l'8.05% abbiamo il 1,4,5- triidrossipenano tra gli alcoli, tra gli acidi carbossilici emerge con il 4.33% l'acido pensanoico, con il 7.14% la piperidina è la più abbondante tra i composti eterociclici aromatici, anche nel cavitato è stato ritrovato l'1% di ribosio e a differenza delle altre due caratterizzazioni è stata ritrovata con l'0.30% un'ammina, la n-butilammina.

### 8.3 Acidogenesi

La prima parte del lavoro di tesi è stata dedicata allo studio e allo sviluppo di una fase di fermentazione acidogenica per ottenere VFA da varie matrici di scarto dell'industria vitivinicola quali vinaccia e cavitato, e fanghi derivanti dal trattamento delle acque reflue della medesima industria.

La richiesta teorica di ossigeno, ThOD, dei campioni utilizzati, è stata calcolata dall'analisi elementare usando la seguente formula:  $ThOD = 16 * (2 * C / 12 + H / 2 + 2 * S / 32 - O / 16 - 3 * N / 28)$  (Torri and Fabbri 2014).

	% secco	ThOD
Fango dep.	21.6	1.04
Fango UF	4	1.05
Cavitato	15.3	1.36
Vinaccia	n.d	1.4

*Tabella 10 Percentuale del peso secco e ThOD delle biomasse utilizzate*

I VFA infatti sono substrati particolarmente idonei per la produzione di PHA da MMC, poiché sono prontamente disponibili e vengono convertiti in PHA in modo efficiente (Luengo et al. 2003).

Per massimizzare la produzione di VFA tramite fermentazione acidogenica, l'attività metanogenica dovrebbe essere inibita usando corti tempi di residenza, basse temperature, pH basso, o una combinazione di questi diversi approcci (Beccari et al. 2009). Per questo motivo si è provato ad autoclavare alcuni digestori al fine di incrementare la produzione di VFA e inibire quella del biogas al fine di eliminare i microrganismi incapaci di formare spore termoresistenti, come la maggior parte dei batteri metanogeni, e al contempo favorire la formazione di spore di idrogeno, favorendo così l'acidogenesi per ottenere uno scarto ricco di acidi grassi volatili.

A questo scopo, nel presente lavoro di tesi l'inoculo batterico è stato precedentemente autoclavato e comparato con l'attività di un inoculo acidogenico non autoclavato.

In questo lavoro sperimentale con il termine VFA si considera la somma degli acidi acetico, propionico, isobutirrico, butirrico, isovalerico, valerico e esanoico.

Di seguito sono riportati i rendimenti delle produzioni di VFA e biogas da ogni digestore seguito per quindici giorni ed espressi in resa rispetto ai gCOD/l in input; a sinistra sono rappresentati gli inoculi posti in stufa, a destra le quelli autoclavati.

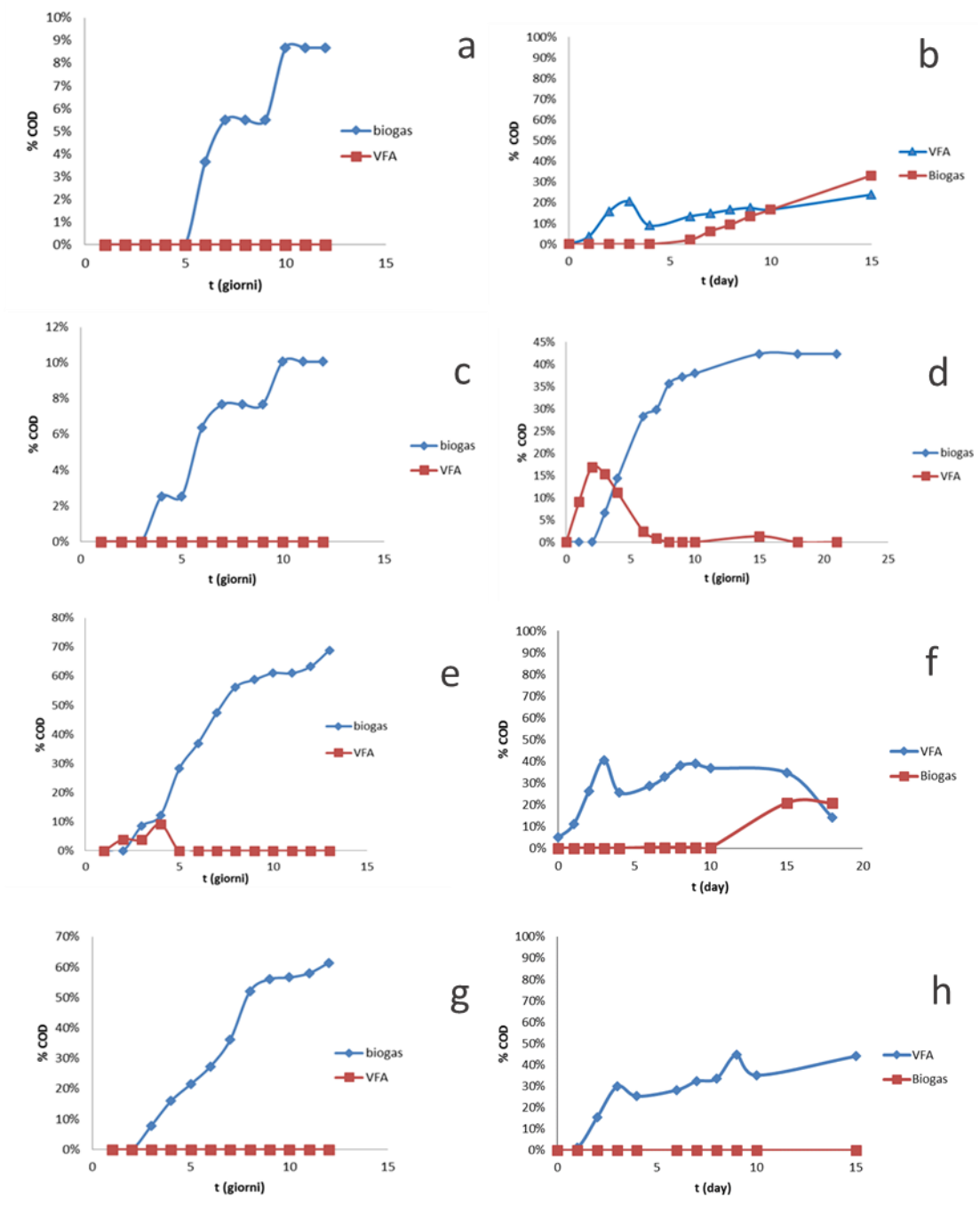


Figura 14 Rese di VFA e biogas ottenute da: a) Fango di depurazione; b) Fango di depurazione con inoculo autoclavato; c) Fango ultrafiltrato; d) Fango ultrafiltrato con inoculo autoclavato; e) Cavitato; f) Cavitato con inoculo autoclavato; g) Vinaccia; h) Vinaccia con inoculo autoclavato.

Dai risultati ottenuti si evince che:

- Il fango di depurazione (figura a) dopo dieci giorni ha una resa massima di biogas del 9%, in questo arco di tempo non ha prodotto VFA; mentre il suo corrispettivo inoculo autoclavato (figura b) il quale ha prodotto 24% di VFA, nei successivi giorni si è verificato un calo della produzione di VFA probabilmente dovuto

all'adattamento degli archea metanogenici i quali hanno prodotto CH<sub>4</sub>, con una resa del 35% dopo undici giorni.

- Il fango ultrafiltrato (figura c) presenta resa massima di biogas del 10% di dopo dieci giorni e nessuna produzione di VFA: il fango ultrafiltrato autoclavato (figura d) ha prodotto il 17% di VFA dopo tre giorni e un drastico calo nei successivi compensato da un progressivo aumento di biogas fino al 42%.
- Il cavitato (figura e) presenta una resa massima di biogas del 69% dopo dodici giorni, i VFA sono solo presenti nei primi cinque giorni con una resa del 9%; mentre il cavitato autoclavato (figura f) ha prodotto il 41% di VFA con una progressiva diminuzione, e un progressivo aumento di biogas fino ad un massimo del 21%.
- La vinaccia esausta (figura g) ha prodotto il 61% di biogas dopo undici giorni, sistematicamente, non ha prodotto nessun VFA; al contrario vinaccia autoclavata (figura h) non ha prodotto alcun biogas, ma il 45% di VFA.

Quindi solo il fango, il cavitato e la vinaccia autoclavati hanno prodotto nell'arco dell'intero esperimento VFA con una resa massima rispettivamente del 24% ,41% e del 45%; inaspettatamente, non si è evidenziata una riduzione netta nella produzione di metano per i campioni autoclavati.

Confrontando i risultati ottenuti con i dati di letteratura, Martinez et al. 2016 hanno sviluppato uno schema per la valorizzazione della vinaccia rossa; il loro obiettivo è stato quello di impiegare i VFA, prodotti dalla digestione anaerobica delle vinacce rosse de-alcolate, come substrato per la produzione di PHA da una coltura pura di *Cupriavidus necator*.

L'esperimento per la produzione di VFA è durato 16 giorni, in cui sono stati ottenuti  $22.2 \pm 0.8$  g/l di VFA totali, corrispondenti a 111 g di VFA totali per chilogrammo di vinaccia, risultato paragonabile a quello riportata in un altro studio condotto da Lappa et al. nel 2015, per lo sfruttamento della vinaccia come substrato per la fermentazione e la produzione di co-prodotti come VFA ed etanolo, al fine di produrre nuovi biocarburanti, in cui sono stati prodotti 19 g/l di VFA totali. Tale risultato si discosta dai risultati ottenuti dal presente studio, in cui sono stati prodotti 6.26 g/l di VFA totali dalla vinaccia autoclavata, mentre la vinaccia posta in stufa non ha rilevato produzione di VFA nell'arco



dei quindici giorni di sperimentazione. Probabilmente il risultato è dovuto ad un mancato pre-trattamento del fango, in cui negli studi precedenti sono stati estratti i polifenoli.

Dallo studio sperimentale condotto da Morgan-Segastume et al. nel 2014, i VFA ottenuti dalla fermentazione acidogenica dei fanghi provenienti dal trattamento di acque reflue municipali, sono risultati essere una fonte adatta per la produzione di PHA in cui i livelli massimi di VFA dalla digestione anaerobica a 42 °C sono stati di  $7.0 \pm 1.0$  g/l durante circa sei giorni di fermentazione in batch.

Tra i due fanghi analizzati in questo studio (autoclavato e non), solo inibendo la metanogenesi si è riusciti a produrre un massimo di 3.68 g/l di VFA totali.

#### 8.4 Acidogenesi accoppiata a pirolisi

Il pre-trattamento pirolitico porta a migliorare la fermentabilità degli scarti che può essere generalmente bassa a causa dell'alto contenuto di lignina o dell'elevato contenuto di sostanze inorganiche. Il bioolio e il biochar ottenuto sono stati utilizzati come substrato per alimentare le comunità microbiche miste anaerobiche del fango di depurazione e gli inoculi di cavitato e vinaccia, per la produzione di acidi grassi volatili.

Rispetto ai risultati ottenuti dalle biomasse senza l'aggiunta di olio di pirolisi e biochar, si evidenzia una produzione di VFA significativa, mentre la produzione di biogas è stata totalmente inibita, poiché i reattori sono stati posti in autoclave per inibire la metanogenesi.

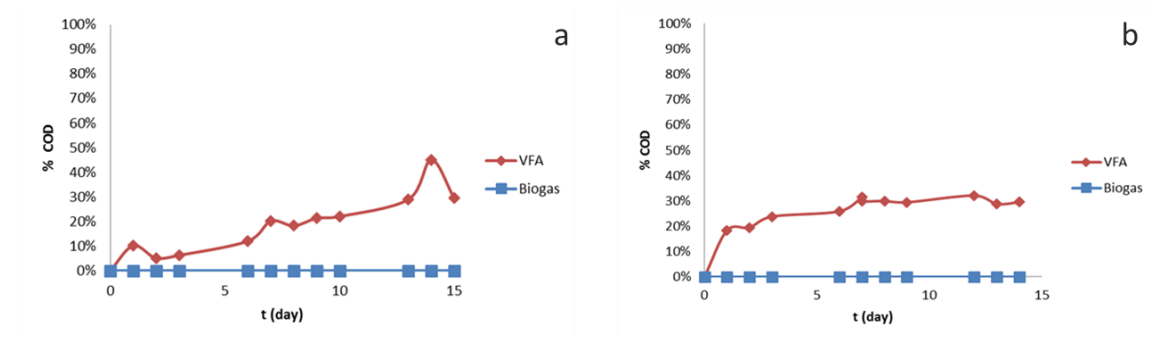


Figura 15 a) Inoculo addizionato ad olio di pirolisi e biochar del fango; b) Inoculo addizionato ad olio di pirolisi e biochar del cavitato

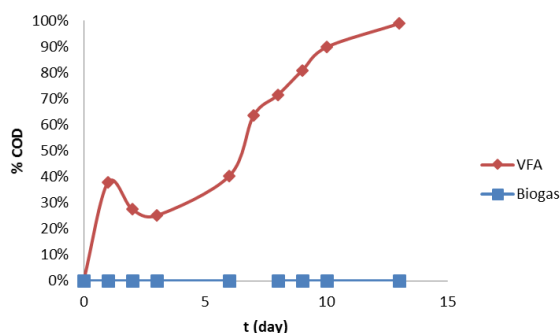


Figura 16 Inoculo addizionato a olio di pirolisi e biochar della vinaccia

Dai risultati ottenuti si deduce che tra il fango, il cavitato e la vinaccia, solo in quest'ultima si è avuta una produzione di VFA consistente, con una conversione totale del COD presente, in cui il massimo dei VFA totali ottenuti è stato di 5.22 g/l, mentre dal fango e dal cavitato sono stati ottenuti rispettivamente un massimo di 4.59 g/l e 5.07 g/l.

In tabella n.11 sono riportate le quantità di PHA ipoteticamente ottenibili traslando il processo ibrido termochimico-biologico presentato in questo lavoro di tesi.

Assumendo che:

- In Europa ogni anno vengano prodotte circa 6 Mt di fango e 3 Mt di vinaccia.
- Dalle pirolisi delle biomasse si sia ottenuto una resa di bio-olio del 21% (fango) e del 28% (vinaccia).
- Il bioolio sia costituito prevalentemente da fase acquosa APL (85%) nel caso del fango e interamente nel caso della vinaccia (100%).
- Una resa di produzione massima di VFA, come riportato in questo lavoro di tesi, del 45% dall'inoculo autoclavato e addizionato dall'APL e biochar del fango, e del 99% dall'inoculo autoclavato addizionato dall'APL e biochar della vinaccia.
- Che i batteri aerobici sono in grado di convertire i VFA in PHA con una resa del 34%, come dimostrato da studi precedenti nei laboratori Sartori.

E' possibile quindi produrre 0.17 Mt/y di VFA da fango pirolizzato e 0.10 Mt/y di VFA da vinaccia esausta pirolizzata, da cui rispettivamente si possono ottenere 0.05 e 0.03 Mt/y di PHA. Queste quantità stimate di PHA sono potenzialmente in grado di coprire la previsione futura ottenuta dall'European Bioplastics di produzione di PHA a livello europeo per il 2022 (0.07 Mt/y).

	<b>Fango</b>	<b>Vinaccia</b>
<b>Mt/y disponibile in UE</b>	6.1	3.06
<b>Bio olio (%)</b>	21%	28%
fase acquosa (%)	85%	100%
fase organica (%)	15%	0%
<b>Mt/y di bio olio</b>	1.26	0.85
fase acquosa (Mt/y)	1.07	0.85
fase organica (Mt/y)	0.19	0.00
<b>Mt/y di VFA da APL</b>	0.17	0.10
<b>Mt/y di PHA</b>	0.05	0.03

*Tabella 11 Stime Mt/y di VFA e PHA prodotti*

## 8.5 PHA

Al fine di determinare la naturale capacità dei fanghi aerobi di accumulare PHA, sono stati analizzati vari fanghi di depurazione, provenienti sia da impianti di trattamento industriali (Caviro) che urbani (Hera Ravenna e Hera Forlì). Essendo stati alimentati con solo acetato, al termine dell'esperimento tutti e tre i fanghi hanno prodotto solo PHB, anche se nessuno di essi ha prodotto quantità rilevanti di polimero.

Senza applicare nessuna selezione microbica, dal fango industriale il valore massimo di PHA ottenuto è pari a 0.32%, dal fango urbano proveniente dall'impianto di depurazione di Ravenna il massimo ottenuto è 0.51%, infine dal fango urbano proveniente da Forlì il massimo valore ottenuto è di 1.55% di PHA. Una possibile spiegazione potrebbe essere che nel fango industriale siano presenti degli inibitori che possano inibire i batteri accumulatori di PHA. Nel fango proveniente dall'impianto di depurazione di Forlì, in vista dei risultati ottenuti, è presente in misura maggiore, rispetto il fango urbano di Ravenna, una comunità batterica in grado di produrre naturalmente PHA; questo fango, sottoposto a opportuni trattamenti di carenza e somministrazione di substrato, potrebbe arricchirsi di batteri accumulatori di PHA.

## 9. Conclusioni

La rapida crescita della popolazione umana e l'economia globale hanno portato a una massiccia produzione di scarti. Una corretta gestione degli scarti è fondamentale per

minimizzare l'ulteriore degrado ambientale e favorire la transizione verso una società sostenibile. In Italia, l'approccio convenzionale alla gestione degli scarti è orientato al trattamento/smaltimento, che si concretizza principalmente sul rispetto delle normative ambientali. Questo approccio trascura tuttavia il potenziale di riutilizzare gli scarti come materia prima per la produzione di sostanze chimiche ad alto valore aggiunto. Pertanto, un approccio di gestione degli scarti più illuminato è il recupero delle risorse, come d'altronde impone la normativa europea, che consente la simultanea riduzione al minimo degli scarti e la generazione di nuovi prodotti.

Alla luce di quanto sopra, il focus di questa tesi è la produzione di VFA da vari scarti organici, che costituiscono un prezioso substrato per una varietà di applicazioni come la produzione di plastiche biodegradabili, la generazione di bioenergia e la rimozione dei nutrienti biologici.

La produzione a basso costo di acidi grassi volatili da scarti mediante fermentazione acidogenica ha determinato grande interesse nella ricerca in quanto i VFA sono un substrato critico per i microrganismi coinvolti nella produzione di plastica biodegradabile e bioenergia. Tuttavia, per migliorare le prestazioni, gli scarti fermentati devono essere ulteriormente trattati.

Nel presente lavoro di tesi, per la produzione di VFA sono stati allestiti dei reattori anaerobici al fine di condurre degli esperimenti per la fermentazione acidogenica di quattro diversi tipi di scarto provenienti da Caviro Distillerie: fango di depurazione, fango ultrafiltrato, cavitato e vinaccia.

Dall'utilizzo dei fanghi tal quali non si è riusciti a produrre VFA e quindi, per ottimizzare il processo, si è fatto ricorso ad un approccio ibrido termochimico-biologico, con inibizione degli archea metanogeni attraverso opportuni pretrattamenti. Difatti, le rese maggiori sono state ottenute dagli inoculi del fango e della vinaccia autoclavati con l'aggiunta di biochar e delle fasi acquose degli stessi.

Come altro punto cruciale di questo lavoro sperimentale, è stato investigata la naturale capacità dei fanghi aerobi di diversa natura di accumulare PHA.

All'interno della comunità batteriche presenti nei fanghi utilizzati per gli esperimenti, non è stata effettuata alcuna selezione dinamica attraverso un regime di cicli alimentari di somministrazione di carbonio. E' noto infatti che per ottenere un'alta qualità di

produzione sono necessari lunghi tempi di acclimatazione, in condizioni di crescita stressate, come l'alternanza di carenza e presenza di nutrienti, affinché i batteri siano costretti a utilizzare vie alternative per l'accumulo di carbonio ed energia.

In questo studio la comunità batterica è stata alimentata solo con acido acetico al fine di fare accumulare i batteri stessi; i fanghi provenienti dalle acque reflue urbane sono risultati più idonei per la sintesi di PHA rispetto a quelli derivanti dai reflui industriali.

Confrontando le rese di PHA prodotti da questi fanghi, il fango derivante da reflui industriali hanno prodotto la percentuale di PHA più bassa; seguono i fanghi urbani in cui quello di Forlì ha prodotto il doppio di PHA rispetto quello proveniente da Hera, ed ha una resa cinque volte maggiore rispetto a quello di Caviro, senza applicare nessuna selezione microbica.

Il risultato è dovuto al fatto che probabilmente nel fango industriale sono presenti degli inibitori che ostacolano i batteri accumulatori del polimero, mentre nel fango proveniente dall'impianto di depurazione di Forlì è presente una percentuale di comunità batterica in grado di produrre naturalmente PHA; questo fango, sottoposto a opportuni trattamenti di carenza e somministrazione di substrato, potrebbe arricchirsi di batteri accumulatori di PHA.

A livello Europeo le bioplastiche totali prodotte sono circa 0.4 Mt/y, circa un quinto rispetto alle 2.5 Mt/y di bioplastiche prodotte a livello mondiale. Di questa produzione, si stima un aumento del 20% nei prossimi anni, passando dagli attuali 0.01 Mt/y di PHA a livello europeo, fino ad un massimo di 0.07 Mt/y entro il 2022. I risultati ottenuti dal presente studio utilizzando processi ibridi-termochimici dimostrano come sia potenzialmente possibile coprire tale stima, con una produzione europea di PHA pari a 0.05 Mt/y da fanghi e 0.03 Mt/y da vinaccia.

## Bibliografia

Abbondanzi, F., Biscaro, G., Carvalho, G., Favaro, L., Lemos, P., Paglione, M., Samorì, C., Torri, C. (2017). Fast method for the determination of short-chain-length polyhydroxyalkanoates (scl-PHAs) in bacterial samples by In Vial-Thermolysis (IVT). *New Biotechnology*, 39, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.05.012>

Ahring B., Angelidaki I., Johansen K. 1992. “Anaerobic digestion of source sorted household solid wastes together with manure and organic industrial waste.” ISAD-SW, Venice 14-17 April 1992.

Akaraonye, E., Keshavarz, T., & Roy, I. (2010). Production of polyhydroxyalkanoates: The future green materials of choice. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1002/jctb.2392>

Albuquerque, M. G. E., Martino, V., Pollet, E., Avérous, L., & Reis, M. A. M. (2011). Mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from volatile fatty acid (VFA)-rich streams: Effect of substrate composition and feeding regime on PHA productivity, composition and properties. *Journal of Biotechnology*, 151(1), 66–76. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.10.070>

Albuquerque, M. G. E., Torres, C. A. V., & Reis, M. A. M. (2010). Polyhydroxyalkanoate (PHA) production by a mixed microbial culture using sugar molasses: Effect of the influent substrate concentration on culture selection. *Water Research*, 44(11), 3419–3433. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.03.021>

ANPA - Dipartimento Prevenzione e Risanamento Ambientali. (2001). *Guida alla progettazione dei sistemi di collettamento e depurazione delle acque reflue urbane* from [www.anpa.it](http://www.anpa.it)

APHA/AWWA/WEF. (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. *Standard Methods*, 541. <https://doi.org/ISBN 9780875532356>

Appels, L., Baeyens, J., Degrève, J., & Dewil, R. (2008). Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34(6), 755–781. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2008.06.002>

Appels, L., Lauwers, J., Degrève, J., Helsen, L., Lievens, B., Willems, K., ... Dewil, R. (2011). Anaerobic digestion in global bio-energy production: Potential and research challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(9), 4295–4301. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2011.07.121>

Beccari, M., Bertin, L., Dionisi, D., Fava, F., Lampis, S., Majone, M., ... Villano, M. (2009). Exploiting olive oil mill effluents as a renewable resource for production of biodegradable polymers through a combined anaerobic-aerobic process. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84(6), 901–908. <https://doi.org/10.1002/jctb.2173>

Bengtsson, S., Hallquist, J., Werker, A., & Welander, T. (2008). Acidogenic fermentation of industrial wastewaters: Effects of chemostat retention time and pH on volatile fatty acids production. *Biochemical Engineering Journal*, 40(3), 492–499. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.02.004>

Bengtsson, S., Werker, A., Christensson, M., & Welander, T. (2008). Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater. *Bioresource Technology*, 99(3), 509–516. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.020>

Bengtsson, S., Werker, A., Christensson, M., & Welander, T. (2008). Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater. *Bioresource Technology*, 99(3), 509–516. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.020>

Bianucci, G., & Ribaldone Bianucci, E. (1992). *Il trattamento delle acque inquinate*. (U. Hoepli, Ed.) (Terza).

Bioplastics, E. (2017). *Global production capacities of bioplastics 2017-2022*. Retrieved from [http://docs.europeanbioplastics.org/publications/market\\_data/2017/Report\\_Bioplastics\\_Market\\_Data\\_2017.pdf](http://docs.europeanbioplastics.org/publications/market_data/2017/Report_Bioplastics_Market_Data_2017.pdf)

Bosetti, G. (2006). Decreto legislativo 3 aprile 2006, n. 152 Norme in materia ambientale. Retrieved from [http://www.bosettiegatti.eu/info/norme/statali/2006\\_0152.htm](http://www.bosettiegatti.eu/info/norme/statali/2006_0152.htm)

Bridgwater, A. V. (2012). Review of fast pyrolysis of biomass and product upgrading. *Biomass and Bioenergy*, 38, 68–94. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.01.048>

Brown, R. C. (2007). Hybrid thermochemical/biological processing: Putting the cart before the horse? *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 137–140(1–12), 947–956. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-9110-y>

Cai, M., Liu, J., & Wei, Y. (2004). Enhanced biohydrogen production from sewage sludge with alkaline pretreatment. *Environmental Science and Technology*, 38(11), 3195–3202. <https://doi.org/10.1021/es0349204>

Cech, J. S., & Hartman, P. (1993). Competition between polyphosphate and polysaccharide accumulating bacteria in enhanced biological phosphate removal systems. *Water Research*, 27(7), 1219–1225. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(93\)90014-9](https://doi.org/10.1016/0043-1354(93)90014-9)

Cesaro, A., & Belgiorno, V. (2013). Sonolysis and ozonation as pretreatment for anaerobic digestion of solid organic waste. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(3), 931–936. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.10.017>

Chan, K. Y., Van Zwieten, L., Meszaros, I., Downie, A., & Joseph, S. (2007). Agronomic values of greenwaste biochar as a soil amendment. *Australian Journal of Soil Research*, 45(8), 629–634. <https://doi.org/10.1071/SR07109>

Chanprateep, S. (2010). Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.07.014>

Chen, S., Rotaru, A. E., Shrestha, P. M., Malvankar, N. S., Liu, F., Fan, W., ... Lovley, D. R. (2014). Promoting interspecies electron transfer with biochar. *Scientific Reports*, 4. <https://doi.org/10.1038/srep05019>

Chen, Y., Cheng, J. J., & Creamer, K. S. (2008). Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.057>

Chen, Y., Randall, A. A., & McCue, T. (2004). The efficiency of enhanced biological phosphorus removal from real wastewater affected by different ratios of acetic to propionic acid. *Water Research*, 38(1), 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.08.025>



Choi, J. Il, & Lee, S. Y. (1997). Process analysis and economic evaluation for poly(3-hydroxybutyrate) production by fermentation. *Bioprocess Engineering*, 17(6), 335–342. <https://doi.org/10.1007/s004490050394>

Choi, J., Chang, H. N., & Han, J.-I. (2011). Performance of microbial fuel cell with volatile fatty acids from food wastes. *Biotechnology Letters*, 33(4), 705–714. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0507-2>

Cordella, M., Torri, C., Adamiano, A., Fabbri, D., Barontini, F., & Cozzani, V. (2012). Bio-oils from biomass slow pyrolysis: A chemical and toxicological screening. *Journal of Hazardous Materials*, 231–232, 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.06.030>

Demirel, B., & Yenigun, O. (2004). Anaerobic acidogenesis of dairy wastewater: The effects of variations in hydraulic retention time with no pH control. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79(7), 755–760. <https://doi.org/10.1002/jctb.1052>

Devlin, D. C., Esteves, S. R. R., Dinsdale, R. M., & Guwy, A. J. (2011). The effect of acid pretreatment on the anaerobic digestion and dewatering of waste activated sludge. *Bioresource Technology*, 102(5), 4076–4082. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.043>

Dinuccio, E., Balsari, P., Gioelli, F., & Menardo, S. (2010). Evaluation of the biogas productivity potential of some Italian agro-industrial biomasses. *Bioresource Technology*, 101(10), 3780–3783. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.113>

Dionisi, D., Beccari, M., Gregorio, S. D., Majone, M., Papini, M. P., & Vallini, G. (2005). Storage of biodegradable polymers by an enriched microbial community in a sequencing batch reactor operated at high organic load rate. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80(11), 1306–1318. <https://doi.org/10.1002/jctb.1331>

Dionisi, D., Carucci, G., Petrangeli Papini, M., Riccardi, C., Majone, M., & Carrasco, F. (2005). Olive oil mill effluents as a feedstock for production of biodegradable polymers. *Water Research*, 39(10), 2076–2084. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.03.011>

Dionisi, D., Renzi, V., Majone, M., Beccari, M., & Ramadori, R. (2004). Storage of substrate mixtures by activated sludges under dynamic conditions in anoxic or aerobic

environments. *Water Research*, 38(8), 2196–2206.  
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.01.018>

Elbeshbishy, E., Hafez, H., Dhar, B. R., & Nakhla, G. (2011). Single and combined effect of various pretreatment methods for biohydrogen production from food waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(17), 11379–11387.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.02.067>

Eskicioglu, C., Prorot, A., Marin, J., Droste, R. L., & Kennedy, K. J. (2008). Synergetic pretreatment of sewage sludge by microwave irradiation in presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for enhanced anaerobic digestion. *Water Research*, 42(18), 4674–4682.  
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.08.010>

Fabbri, D., Torri, C., & Mancini, I. (2007). Pyrolysis of cellulose catalysed by nanopowder metal oxides: production and characterisation of a chiral hydroxylactone and its role as building block. *Green Chemistry*, 9(12), 1374.  
<https://doi.org/10.1039/b707943e>

Fdez.-Güelfo, L. A., Álvarez-Gallego, C., Sales, D., & Romero, L. I. (2011). The use of thermochemical and biological pretreatments to enhance organic matter hydrolysis and solubilization from organic fraction of municipal solid waste (OFMSW). *Chemical Engineering Journal*, 168(1), 249–254. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2010.12.074>

Feo, G. De, Gisi, S. De, Galasso, M., & Flaccovio, D. (2013). *Fanghi di depurazione: produzione, caratterizzazione e trattamento* (prima ediz).

Fijalkowski, K. L., Kacprzak, M. J., & Rorat, A. (2014). Occurrence changes of *Escherichia coli* (including O157:H7 serotype) in wastewater and sewage sludge by quantitation method of (EMA) real time-PCR. *Desalination and Water Treatment*, 52(19–21), 3965–3972. <https://doi.org/10.1080/19443994.2014.887499>

Fonts, I., Gea, G., Azuara, M., Ábrego, J., & Arauzo, J. (2012). Sewage sludge pyrolysis for liquid production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*.  
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.02.070>

Fytily, D., & Zabaniotou, A. (2008). Utilization of sewage sludge in EU application of old and new methods-A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2006.05.014>

Gazzetta ufficiale della repubblica italiana. (1992). DECRETO LEGISLATIVO 27 gennaio 1992, n. 99. Retrieved from <http://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/1992/02/15/092G0139/sg>

Ghosh, P., Samanta, A. N., & Ray, S. (2010). COD reduction of petrochemical industry wastewater using Fenton's oxidation. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 88(6), 1021–1026. <https://doi.org/10.1002/cjce.20353>

Grothe, E., Moo-Young, M., & Chisti, Y. (1999). Fermentation optimization for the production of poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. *Enzyme and Microbial Technology*, 25(1–2), 132–141. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00023-X](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00023-X)

Harald, B. (1979). *Microorganismi nella depurazione delle acque di scarico*. (L. Hendricus, Ed.).

Holmes, P. A. (1985). Applications of PHB - A microbially produced biodegradable thermoplastic. *Physics in Technology*, 16(1), 32–36. <https://doi.org/10.1088/0305-4624/16/1/305>

Huang, Y. L., Wu, Z., Zhang, L., Ming Cheung, C., & Yang, S. T. (2002). Production of carboxylic acids from hydrolyzed corn meal by immobilized cell fermentation in a fibrous-bed bioreactor. *Bioresource Technology*, 82(1), 51–59. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00151-1](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00151-1)

Inguanzo, M., Dominguez, A., Menendez, J. A., Blanco, C. G., & Pis, J. J. (2002). On the Pyrolysis of Sewage Sludge: The Influence of Pyrolysis Temperature on Biochar, Liquid and Gas Fractions. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 63, 209–222. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.518-523.3412>

Ischia, M., Perazzolli, C., Dal Maschio, R., & Campostrini, R. (2007). Pyrolysis study of sewage sludge by TG-MS and TG-GC-MS coupled analyses. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, *87*(2), 567–574. <https://doi.org/10.1007/s10973-006-7690-3>

ISPRA, I. S. per la P. e la R. A. (2015). Catasto Rifiuti. Retrieved from <http://www.catasto-rifiuti.isprambiente.it/index.php?pg=prodrsnazione>

Jendrossek, Dieter, and René Handrick. 2002. “Microbial Degradation of Polyhydroxyalkanoates.” *Annual Review of Microbiology* *56* (1):403–32. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160838>.

Ji, Z., Chen, G., & Chen, Y. (2010). Effects of waste activated sludge and surfactant addition on primary sludge hydrolysis and short-chain fatty acids accumulation. *Bioresource Technology*, *101*(10), 3457–3462. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.117>

Jia, Q., Wang, H., & Wang, X. (2013). Dynamic synthesis of polyhydroxyalkanoates by bacterial consortium from simulated excess sludge fermentation liquid. *Bioresource Technology*, *140*, 328–336. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.105>

Jiang, S., Chen, Y., & Zhou, Q. (2007). Effect of sodium dodecyl sulfate on waste activated sludge hydrolysis and acidification. *Chemical Engineering Journal*, *132*(1–3), 311–317. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2007.01.017>

Jiang, S., Chen, Y., & Zhou, Q. (2007). Influence of alkyl sulfates on waste activated sludge fermentation at ambient temperature. *Journal of Hazardous Materials*, *148*(1–2), 110–115. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.02.016>

Jiang, S., Chen, Y., Zhou, Q., & Gu, G. (2007). Biological short-chain fatty acids (SCFAs) production from waste-activated sludge affected by surfactant. *Water Research*, *41*(14), 3112–3120. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.03.039>

Jiang, Y., Chen, Y., & Zheng, X. (2009). Efficient polyhydroxyalkanoates production from a waste-activated sludge alkaline fermentation liquid by activated sludge submitted to the aerobic feeding and discharge process. *Environmental Science and Technology*, *43*(20), 7734–7741. <https://doi.org/10.1021/es9014458>

Jiang, Y., Marang, L., Tamis, J., van Loosdrecht, M. C. M., Dijkman, H., & Kleerebezem, R. (2012). Waste to resource: Converting paper mill wastewater to bioplastic. *Water Research*, *46*(17), 5517–5530. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.07.028>

Johnson, K., Kleerebezem, R., & van Loosdrecht, M. C. M. (2010). Influence of ammonium on the accumulation of polyhydroxybutyrate (PHB) in aerobic open mixed cultures. *Journal of Biotechnology*, *147*(2), 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.02.003>

Kacprzak, M., & Stańczyk-Mazanek, E. (2003). Changes in the structure of fungal communities of soil treated with sewage sludge. *Biology and Fertility of Soils*, *38*(2), 89–95. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0043074791&partnerID=40&md5=15d15291541f55090bb9b050fe697b75>

Kan, T., Strezov, V., & Evans, T. J. (2016). Lignocellulosic biomass pyrolysis: A review of product properties and effects of pyrolysis parameters. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.185>

Kim, D. H., Jeong, E., Oh, S. E., & Shin, H. S. (2010). Combined (alkaline+ultrasonic) pretreatment effect on sewage sludge disintegration. *Water Research*, *44*(10), 3093–3100. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.02.032>

Kim, H. J., Kim, S. H., Choi, Y. G., Kim, G. D., & Chung, H. (2006). Effect of enzymatic pretreatment on acid fermentation of food waste. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *81*(6), 974–980. <https://doi.org/10.1002/jctb.1484>

Koller, Martin, Horst Niebelschütz, and Gerhart Braunegg. 2013. “Strategies for Recovery and Purification of poly[(R)-3-Hydroxyalkanoates] (PHA) Biopolyesters from Surrounding Biomass.” *Engineering in Life Sciences*. <https://doi.org/10.1002/elsc.201300021>.

Kondo, T., & Kondo, M. (1996). Efficient production of acetic acid from glucose in a mixed culture of *Zymomonas mobilis* and *Acetobacter* sp. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, *81*(1), 42–46. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(96\)83118-7](https://doi.org/10.1016/0922-338X(96)83118-7)

Lappa, K., Kandyliis, P., Bastas, N., Klaoudatos, S., Athanasopoulos, N., Bekatorou, A., ... Koutinas, A. A. (2015). New generation biofuel: Continuous acidogenesis of sucrose-raffinose mixture simulating vinasse is promoted by  $\gamma$ -alumina pellets. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0255-6>

Lee, B., Pometto, A. L., Fratzke, A., & Bailey, T. B. (1991). Biodegradation of degradable plastic polyethylene by *Phanerochaete* and *Streptomyces* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(3), 678–685.

Lee, S. Y. (1996). Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends in Biotechnology*. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(96\)10061-5](https://doi.org/10.1016/0167-7799(96)10061-5)

Lemoigne, M. (1926). Products of dehydration and of polymerization of  $\beta$ -hydroxybutyric acid. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 8, 770–782.

Lenz, Robert W., Richard A. Gross, Helmut Brandl, and R. Clinton Fuller. 1989. "Poly( $\beta$ -Hydroxyalkanoates): Natural Biocompatible and Biodegradable Polyesters Produced by Bacteria." *Chinese Journal of Polymer Science* 7 (4):289–98. [http://en.cnki.com.cn/Article\\_en/CJFDTOTAL-GFZK198904000.htm](http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-GFZK198904000.htm).

Liu, H., & Fang, H. H. P. (2002). Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. *Journal of Biotechnology*, 95(3), 249–256. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00025-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00025-1)

Liu, H., Wang, J., Liu, X., Fu, B., Chen, J., & Yu, H. Q. (2012). Acidogenic fermentation of proteinaceous sewage sludge: Effect of pH. *Water Research*, 46(3), 799–807. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.11.047>

Liu, H., Wang, J., Wang, A., & Chen, J. (2011). Chemical inhibitors of methanogenesis and putative applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-3066-5>

Liu, H.-Y., Hall, P. V, Darby, J. L., Coats, E. R., Green, P. G., Thompson, D. E., & Loge, F. J. (2008). Production of Polyhydroxyalkanoate During Treatment of Tomato Cannery

Wastewater. *Water Environment Research*, 80(4), 367–372.  
<https://doi.org/10.2175/106143007X221535>

López Torres, M., & Espinosa Lloréns, M. del C. (2008). Effect of alkaline pretreatment on anaerobic digestion of solid wastes. *Waste Management*, 28(11), 2229–2234.  
<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2007.10.006>

Luengo, J. M., García, B., Sandoval, A., Naharro, G., & Olivera, E. R. (2003). Bioplastics from microorganisms. *Current Opinion in Microbiology*. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00040-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00040-7)

Marin, J., Kennedy, K. J., & Eskicioglu, C. (2010). Effect of microwave irradiation on anaerobic degradability of model kitchen waste. *Waste Management*, 30(10), 1772–1779.  
<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2010.01.033>

Martinez, G. A., Rebecchi, S., Decorti, D., Domingos, J. M. B., Natolino, A., Del Rio, D., ... Fava, F. (2016). Towards multi-purpose biorefinery platforms for the valorisation of red grape pomace: production of polyphenols, volatile fatty acids, polyhydroxyalkanoates and biogas. *Green Chem.*, 18(1), 261–270. <https://doi.org/10.1039/C5GC01558H>

Martínez, V., Herencias, C., Jurkevitch, E., & Prieto, M. A. (2016). Engineering a predatory bacterium as a proficient killer agent for intracellular bio-products recovery: The case of the polyhydroxyalkanoates. *Scientific Reports*, 6.  
<https://doi.org/10.1038/srep24381>

Mata-Alvarez, J., Macé, S., & Llabrés, P. (2000). Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. *Bioresource Technology*. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00023-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00023-7)

Mengmeng, C., Hong, C., Qingliang, Z., Shirley, S. N., & Jie, R. (2009). Optimal production of polyhydroxyalkanoates (PHA) in activated sludge fed by volatile fatty acids (VFAs) generated from alkaline excess sludge fermentation. *Bioresource Technology*, 100(3), 1399–1405. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.09.014>

Monlau, F., Sambusiti, C., Antoniou, N., Zabaniotou, A., Solhy, A., & Barakat, A. (2015). Pyrochars from bioenergy residue as novel bio-adsorbents for lignocellulosic

hydrolysate detoxification. *Bioresource Technology*, 187, 379–386.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.137>

Morgan-Sagastume, F., Hjort, M., Cirne, D., Gérardin, F., Lacroix, S., Gaval, G., ... Werker, A. (2015). Integrated production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with municipal wastewater and sludge treatment at pilot scale. *Bioresource Technology*, 181, 78–89. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.046>

Morgan-Sagastume, F., Karlsson, A., Johansson, P., Pratt, S., Boon, N., Lant, P., & Werker, A. (2010). Production of polyhydroxyalkanoates in open, mixed cultures from a waste sludge stream containing high levels of soluble organics, nitrogen and phosphorus. *Water Research*, 44(18), 5196–5211. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.06.043>

Morgan-Sagastume, F., Valentino, F., Hjort, M., Cirne, D., Karabegovic, L., Gerardin, F., ... Werker, A. (2014). Polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sludge and municipal wastewater treatment. *Water Science and Technology*, 69(1), 177–184. <https://doi.org/10.2166/wst.2013.643>

Mumme, J., Srocke, F., Heeg, K., & Werner, M. (2014). Use of biochars in anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 164, 189–197. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.008>

Oasmaa, A., & Kuoppala, E. (2008). Solvent fractionation method with Brix for rapid characterization of wood fast pyrolysis liquids. *Energy and Fuels*, 22(6), 4245–4248. <https://doi.org/10.1021/ef800407d>

Pessoa-Jr, A., Roberto, I. C., Menossi, M., dos Santos, R. R., Filho, S. O., & Penna, T. C. V. (2005). Perspectives on Bioenergy and Biotechnology in Brazil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121–124, 59–70. <https://doi.org/10.1385/ABAB:121:1-3:0059>

Pozo, G., Villamar, A. C., Martínez, M., & Vidal, G. (2011). Polyhydroxyalkanoates (PHA) biosynthesis from kraft mill wastewaters: Biomass origin and C:N relationship influence. *Water Science and Technology*, 63(3), 449–455. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.242>



Reis, M. A. M., Serafim, L. S., Lemos, P. C., Ramos, A. M., Aguiar, F. R., & Van Loosdrecht, M. C. M. (2003). Production of polyhydroxyalkanoates by mixed microbial cultures. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 25(6), 377–385. <https://doi.org/10.1007/s00449-003-0322-4>

Rezaei, P. S., Shafaghat, H., & Daud, W. M. A. W. (2014). Production of green aromatics and olefins by catalytic cracking of oxygenate compounds derived from biomass pyrolysis: A review. *Applied Catalysis A: General*. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2013.09.036>

Rockenbach, I. I., Rodrigues, E., Gonzaga, L. V., Caliari, V., Genovese, M. I., Gonalves, A. E. D. S. S., & Fett, R. (2011). Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. *Food Chemistry*, 127(1), 174–179. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.137>

Salehizadeh, H., & Van Loosdrecht, M. C. M. (2004). Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: Recent trends and biotechnological importance. *Biotechnology Advances*. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2003.09.003>

Samolada, M. C., & Zabaniotou, A. A. (2014). Comparative assessment of municipal sewage sludge incineration, gasification and pyrolysis for a sustainable sludge-to-energy management in Greece. *Waste Management*, 34(2), 411–420. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.11.003>

Shahriari, H., Warith, M., Hamoda, M., & Kennedy, K. J. (2012). Anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste combining two pretreatment modalities, high temperature microwave and hydrogen peroxide. *Waste Management*, 32(1), 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2011.08.012>

Shen, L., Haufe, J., Patel, M. K., & Science, G. (2009). *Product overview and market projection of emerging bio-based plastics*. *Group Science, Technology and Society*. <https://doi.org/10.1002/9780470697474.ch1>

Siebielska, I. (2014). Comparison of changes in selected polycyclic aromatic hydrocarbons concentrations during the composting and anaerobic digestion processes of

municipal waste and sewage sludge mixtures. *Water Science and Technology*, 70(10), 1617–1624. <https://doi.org/10.2166/wst.2014.417>

Skalsky, D. S., & Daigger, G. T. (1995). Waste-Water Solids Fermentation for Volatile Acid Production and Enhanced Biological Phosphorus Removal. *Water Environment Research*, 67(2), 230–237. <https://doi.org/10.2175/106143095x131402>

Steinbüchel, Alexander, and Henry E. Valentin. 1995. “Diversity of Bacterial Polyhydroxyalkanoic Acids.” *FEMS Microbiology Letters*. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(95\)00125-O](https://doi.org/10.1016/0378-1097(95)00125-O).

Tamer, I. M., Moo-Young, M., & Chisti, Y. (1998). Optimization of poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid) recovery from *Alcaligenes latus*: Combined mechanical and chemical treatments. *Bioprocess Engineering*, 19(6), 459–468. <https://doi.org/10.1007/s004490050548>

Tang, B., Yu, L., Huang, S., Luo, J., & Zhuo, Y. (2010). Energy efficiency of pre-treating excess sewage sludge with microwave irradiation. *Bioresource Technology*, 101(14), 5092–5097. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.132>

Tiehm, A., Nickel, K., Zellhorn, M., Neis, U., & Tiehm, A. (2001). Ultrasonic waste activated sludge disintegration for improving anaerobic stabilization. *Water Research*, 35(8), 2003–2009. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00468-1](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00468-1)

Torri, C., & Fabbri, D. (2014). Biochar enables anaerobic digestion of aqueous phase from intermediate pyrolysis of biomass. *Bioresource Technology*, 172, 335–341. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.021>

Tyagi, V. K., & Lo, S. L. (2013). Sludge: A waste or renewable source for energy and resources recovery? *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.05.029>

Uyar, B., Eroglu, I., Yücel, M., & Gündüz, U. (2009). Photofermentative hydrogen production from volatile fatty acids present in dark fermentation effluents. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(10), 4517–4523. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.07.057>

Valentino, F., Morgan-Sagastume, F., Fraraccio, S., Corsi, G., Zanaroli, G., Werker, A., & Majone, M. (2015). Sludge minimization in municipal wastewater treatment by polyhydroxyalkanoate (PHA) production. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(10), 7281–7294. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3268-y>

Valentino, Francesco, Fernando Morgan-Sagastume, Sabrina Campanari, Marianna Villano, Alan Werker, and Mauro Majone. 2017. “Carbon Recovery from Wastewater through Bioconversion into Biodegradable Polymers.” *New Biotechnology* 37. Elsevier B.V.:9–23. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.05.007>.

Venkateswar Reddy, M., & Venkata Mohan, S. (2012). Effect of substrate load and nutrients concentration on the polyhydroxyalkanoates (PHA) production using mixed consortia through wastewater treatment. *Bioresource Technology*, 114, 573–582. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.127>

Villano, M., Valentino, F., Barbeta, A., Martino, L., Scandola, M., & Majone, M. (2014). Polyhydroxyalkanoates production with mixed microbial cultures: From culture selection to polymer recovery in a high-rate continuous process. *New Biotechnology*, 31(4), 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.08.001>

Weiland, P. (2010). Biogas production: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*, 85(4), 849–860. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2246-7>

Xu, G., Chen, S., Shi, J., Wang, S., & Zhu, G. (2010). Combination treatment of ultrasound and ozone for improving solubilization and anaerobic biodegradability of waste activated sludge. *Journal of Hazardous Materials*, 180(1–3), 340–346. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.04.036>

Xu, S., He, C., Luo, L., Lü, F., He, P., & Cui, L. (2015). Comparing activated carbon of different particle sizes on enhancing methane generation in upflow anaerobic digester. *Bioresource Technology*, 196, 606–612. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.018>

Yang, Q., Luo, K., Li, X. ming, Wang, D. bo, Zheng, W., Zeng, G. ming, & Liu, J. jin. (2010). Enhanced efficiency of biological excess sludge hydrolysis under anaerobic digestion by additional enzymes. *Bioresource Technology*, 101(9), 2924–2930. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.012>

Yu, H. Q., & Fang, H. H. P. (2001). Acidification of mid- and high-strength dairy wastewaters. *Water Research*, 35(15), 3697–3705. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00077-X](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00077-X)

Yuan, H., Chen, Y., Zhang, H., Jiang, S., Zhou, Q., & Gu, G. (2006). Improved bioproduction of short-chain fatty acids (SCFAs) from excess sludge under alkaline conditions. *Environmental Science and Technology*, 40(6), 2025–2029. <https://doi.org/10.1021/es052252b>

Zhao, Z., Zhang, Y., Woodard, T. L., Nevin, K. P., & Lovley, D. R. (2015). Enhancing syntrophic metabolism in up-flow anaerobic sludge blanket reactors with conductive carbon materials. *Bioresource Technology*, 191, 140–145. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.007>

Zheng, X., Chen, Y., & Liu, C. (2010). Waste activated sludge alkaline fermentation liquid as carbon source for biological nutrients removal in anaerobic followed by alternating aerobic-anoxic sequencing batch reactors. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 18(3), 478–485. [https://doi.org/10.1016/S1004-9541\(10\)60246-7](https://doi.org/10.1016/S1004-9541(10)60246-7)

Zigová, J., Šturdík, E., Vandák, D., & Schlosser, Š. (1999). Butyric acid production by *Clostridium butyricum* with integrated extraction and pertraction. *Process Biochemistry*, 34(8), 835–843. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00007-2](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00007-2)

Zinn, Manfred, Bernard Witholt, and Thomas Egli. 2001. “Occurrence, Synthesis and Medical Application of Bacterial Polyhydroxyalkanoate.” *Advanced Drug Delivery Reviews*. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00218-6](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00218-6).