Università
Ca'Foscari
Venezia

Corso di Laurea magistrale in Biotecnologie per l'ambiente e lo sviluppo sostenibile

Tesi di laurea

Processi di produzione di poliidrossialcanoati (PHA) da colture microbiche miste in fase di start-up: studio dell'acclimatazione intermedia

Relatore

Prof. Francesco Valentino

Laureando

Thomas Frasson

Matricola 870683

Anno accademico

2023-2024

Indice

1 Introduzione **1**

1.1 Il trattamento dei reflui civili . . . 1

1.2 La linea fanghi . . . 3

1.2.1 Stato dell'arte sui fanghi attivi . . . 5

1.3 I Poliidrossialcanoati (PHA) . . . 7

1.3.1 Produzione di PHA da MMC mediante processo a 3 stadi. . . . 10

1.3.2 Vie metaboliche associate ai PHA in colture microbiche miste . . . 14

1.3.3 Processi di downstream . . . 15

1.3.4 Possibili scenari applicativi . . . 17

2 Materiali e metodi **22**

2.1 Approccio globale . . . 22

2.2 Set-up del bio-reattore . . . 23

2.2.1 Fase di pre-areazione . . . 25

2.2.2 Fase di acclimatazione . . . 25

2.2.3 Fase di accumulo . . . 26

2.2.4 Formazione di schiume . . . 26

2.2.5 Operazioni di pulizia . . . 27

2.3 Preparazione alimentazioni . . . 27

2.4 Metodi analitici e misure . . . 30

2.4.1 Determinazione TS . . . 30

2.4.2 Determinazione VS . . . 31

2.4.3 pH . . . 31

2.4.4 Ossigeno disciolto (OD) . . . 32

2.4.5 Coefficiente di trasferimento dell'ossigeno volumetrico (k_La) . . . 32

2.4.6 Oxygen Uptake Rate (OUR) . . . 33

2.4.7 Composti solubili . . . 36

2.4.8 PHA . . . 37

3 Risultati e discussione **40**

3.1 Concentrazioni TS e VS . . . 40

3.2 Andamento OD e pH 42
3.3 K_La 46
3.4 OUR 47
3.5 Composti solubili 55
3.5.1 Azoto ammoniacale 55
3.5.2 VFA 56
3.6 Poliidrossialcanoati (PHA) 59
3.7 Test G: focus sulle performance di processo 63

4 Conclusioni **66**

Abstract

I fanghi biologici prodotti dagli impianti di trattamento acque reflue (Wastewater Treatment Plants; WWTPs) rappresentano un rifiuto organico putrescibile ad alto tenore acquoso, da trattare opportunamente prima dello smaltimento. L'obbiettivo della seguente tesi è valutare una possibile valorizzazione dei fanghi di depurazione (o fanghi attivi) per la produzione di polimeri intracellulari quali i poliidrossialcanoati (PHA). Lo scopo della sperimentazione è stato quello di studiare il potenziale di produzione dei PHA da parte dei fanghi attivi, utilizzati come coltura microbica mista, in processi aerobici caratterizzati da brevi tempi di acclimatazione. Parametri quali pH, ossigeno disciolto (OD), k_La, oxygen uptake rate (OUR), $[NH_4{}^+]$, acidi grassi volatili (VFA) e PHA sono stati monitorati per interpretare il comportamento dei fanghi attivi alle condizioni operative imposte: brevi cicli di acclimatazione *feast-famine* (eccesso e carenza di carbonio) e successiva fase di accumulo dei PHA in regime di *permanent feast*. L'effetto della salinità è stato investigato tramite l'aggiunta di una soluzione concentrata di NaCl, tale da ottenere un dato operativo di 10 g L^{-1} nella sola fase di accumulo (*permanent feast*). La concentrazione più elevata di PHA era pari a 2.57 g PHA L^{-1}, corrispondente a circa il 20% in peso secco cellulare. Tale risultato è stato ottenuto sottoponendo i fanghi attivi a 3 cicli di *feast-famine* da 8 ore complessive in fase di acclimatazione intermedia con un tenore di nutrienti COD:N:P pari a 100:5:1 wt%, seguiti da 24 h di fase di accumulo PHA (*permanent feast*) con un tenore di nutrienti COD:N:P pari a 100:1:0.05. Gli andamenti delle concentrazioni di PHA e VFA testimonierebbero un adattamento fisiologico della biomassa iniziale (fango attivo) alle condizioni di acclimatazione imposte, le quali hanno favorito in diverse misure la capacità di accumulo di PHA intracellulare.

Capitolo 1

Introduzione

1.1 Il trattamento dei reflui civili

La fase di depurazione dell'acqua reflua rappresenta lo step più importante dell'intero ciclo urbano dell'acqua. Esso, infatti, preleva acqua reflua inquinata (rilasciata da attività civili e industriali) e rimette in circolo acqua avente caratteristiche idonee con quelle del corpo recettore.

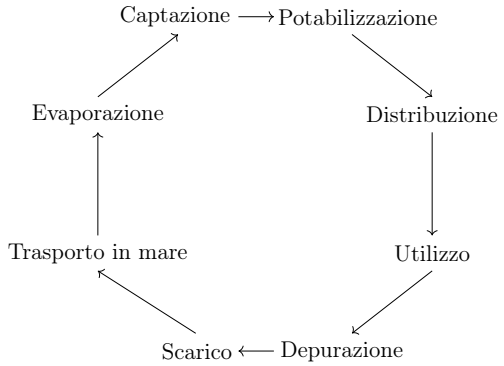


Figura 1.1. Schema del ciclo urbano dell'acqua.

In linea generale, in un impianto di trattamento acque reflue civili, vengono svolte in successione varie lavorazioni le quali possono essere suddivise nei seguenti punti:

- Pretrattamenti: volti a rendere il refluo più idoneo per le operazioni successive. I pretrattamenti più importanti sono: grigliatura, dissabbiatura e disoleatura.
- Sedimentatore primario: ha come scopo principale quello di diminuire il carico organico ed i solidi da trattare nel comparto biologico successivo, tuttavia il suo impiego spesso non risulta necessario.
- Vasche biologiche: vasche all'interno delle quali viene effettuato un trattamento biologico, i cui obbiettivi principali sono:

- l'ossidazione dei costituenti biodegradabili, solubili e particolati, in prodotti finali compatibili con l'ambiente;
- l'intercettazione dei solidi colloidali sospesi e non sedimentabili ed il loro inglobamento nei fiocchi biologici o nel biofilm;
- la rimozione dei nutrienti.

La configurazione di vasche biologiche che trova maggiore applicazione è un processo a biomassa sospesa per la rimozione combinata di carbonio, azoto e fosforo, che prende il nome di processo BNR (Biological Nutrient Removal).

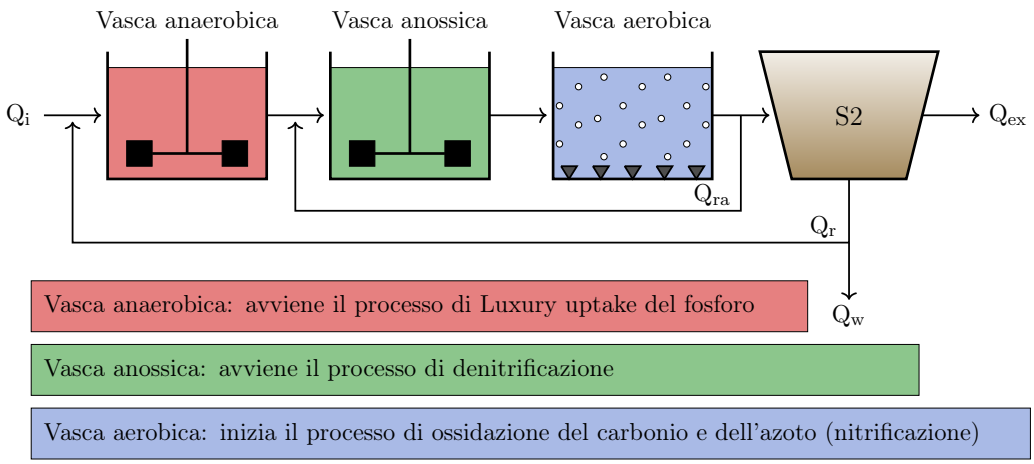


Figura 1.2. Schema semplificato del processo BNR; Q_i = portata di refluo in ingresso; Q_{ra} = portata di miscela areata ricircolata; Q_r = portata di fango attivo ispessito ricircolato; Q_w = portata di fango attivo in uscita; Q_{ex} = portata di refluo trattato in uscita; S2 = sedimentatore secondario.

Il processo di Luxury uptake del fosforo è legato alla presenza di alcuni batteri, noti come Poli-P, che:

- In condizioni anaerobiche, ed in presenza di carbonio facilmente biodegradabile, tendono a:
  - produrre molecole organiche come i poliidrossialcanoati (PHA);
  - idrolizzare le catene di polifosfati presenti all'interno del loro citoplasma, con conseguente rilascio all'esterno di ortofosfati.
- In condizioni aerobiche tendono a:
  - idrolizzare le molecole organiche (PHA) precedentemente prodotte;
  - riprendere il fosforo dall'ambiente circostante, ma in misura maggiore rispetto a quello liberato nel precedente step anaerobico (perché in condizioni aerobiche si ha un potenziale redox maggiore).

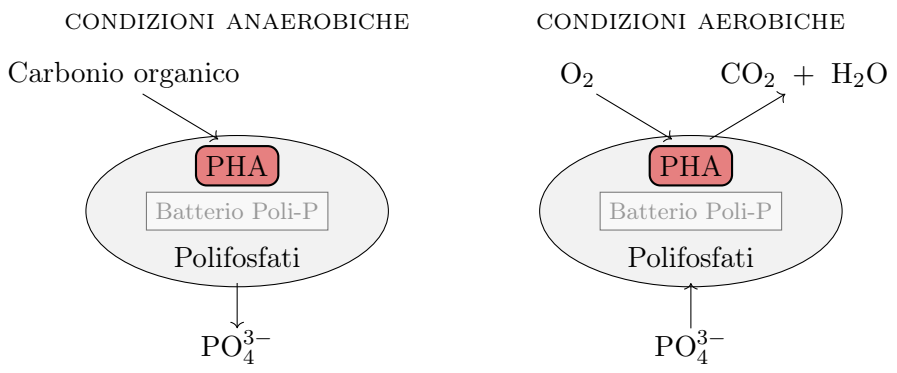


Figura 1.3. Rappresentazione stilizzata di un batterio Poli-P in condizioni anaerobiche (sinistra) e condizioni aerobiche (destra).

- Sedimentatore secondario: ha come scopo principale la separazione dell'acqua chiarificata dalla biomassa formatasi durante i processi biologici. Il fango ottenuto da questa operazione, chiamato fango attivo o fango biologico, risulta comunque composto principalmente da acqua (97-98%). Il fango attivo, viene, in parte ricircolato nelle vasche biologiche ed in parte inviato in linea fanghi per essere trattato [Kacprzak et al., 2017].

- Disinfezione: trattamenti volti a ridurre la carica batterica e virale a valori conformi ai limiti di legge imposti.

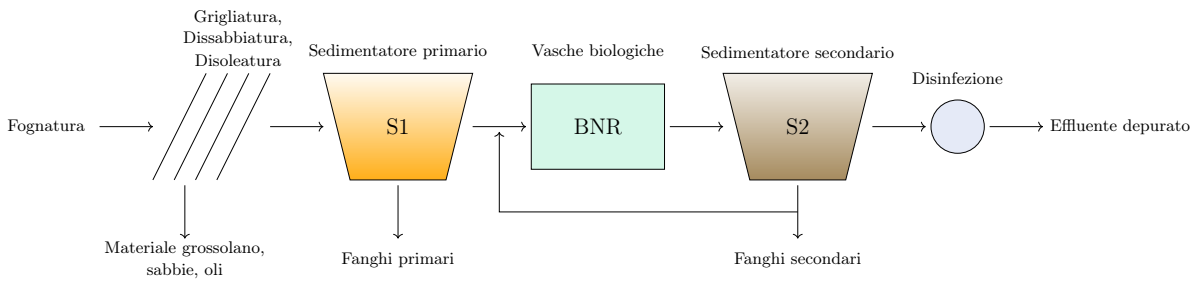


Figura 1.4. Schema semplificato dei processi di depurazione della linea acque.

1.2 La linea fanghi

La linea di trattamento acque costituisce una filiera di operazioni unitarie che permettono di convertire l'acqua reflua (di origine civile e/o industriale), in ingresso all'impianto, ad acqua depurata, ovvero avente le caratteristiche idonee per un suo rilascio nello specifico corpo recettore. Questi, però, non sono gli unici flussi in gioco. Nella gestione/progettazione di un impianto di depurazione è necessario considerare anche la gestione dei flussi di scarto provenienti dalla linea di trattamento acque.

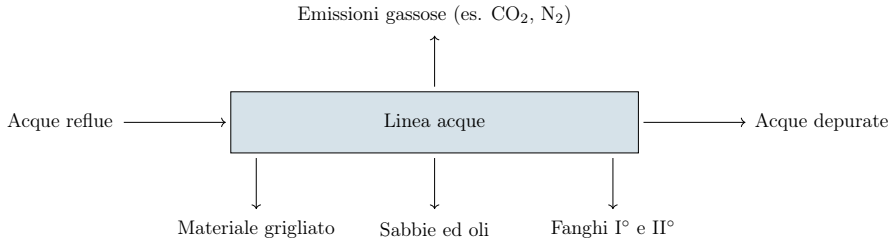


Figura 1.5. Rappresentazione grafica dei flussi di massa nella linea acque.

Per il materiale grigliato e le sabbie, in genere, si prevede una blanda azione di compattazione e lavaggio prima della loro uscita dall'impianto come rifiuto verso lo smaltimento finale (es. discarica di inerti). Per quanto riguarda i fanghi, essendo classificati come dei rifiuti organici putrescibili ad alto tenore d'acqua, è previsto, prima del loro invio verso lo smaltimento finale, una filiera di trattamento più complessa chiamata, in gergo, linea fanghi.
Schematicamente una linea fanghi può prevedere le suddette operazioni unitarie:

- Ispessimento statico;
- Trattamento chimico, termico o biologico (aerobico o anaerobico);
- Ispessimento dinamico;
- Disidratazione;
- Essiccazione (opzionale).

Tra i trattamenti impiegati per la gestione dei fanghi, la digestione anaerobica risulta essere una tecnologia molto utile, poiché permette di convertite il carbonio organico biodegradabile in biogas [Lorini et al., 2022].

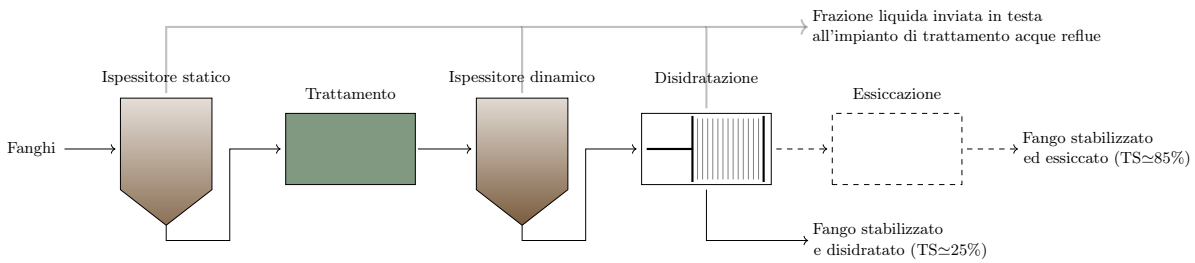


Figura 1.6. Schema semplificato delle operazioni condotte in linea fanghi.

Il fango disidratato (secco), in funzione del processo di stabilizzazione impiegato, è composto in media da un 50-70% di materiale organico e da un 30-50% di materiali inorganici, tra questi un 1-4% di carbonio inorganico, 3.4-4% di azoto (N) e 0.5-2.5% di fosforo (P). Data l'alta concentrazione di materiale organico e nutrienti, i fanghi stabilizzati e disidratati possono essere

impiegati come fertilizzanti. Tuttavia, i fanghi possono potenzialmente contenere al contempo vari contaminanti sia inorganici (quali metalli pesanti) che organici come IPA, PCB, pesticidi e molti altri. Inoltre, la presenza di vari microrganismi patogeni risulta essere un potenziale pericolo per la salute non solo umana, ma anche di animali e piante [Kacprzak et al., 2017]. La quantità di microrganismi patogeni presenti nei fanghi può essere significativamente ridotta, prima della loro applicazione nei terreni, attraverso appropriati trattamenti come, ad esempio, il trattamento con calce. Il trattamento con calce però, risulta essere un processo spesso oneroso in termini economici a causa dell'alto quantitativo di calce che bisogna utilizzare (fino al 50% del peso dei solidi nel fango). Al termine delle operazioni il fango viene solitamente stoccato per poi essere inviato in discariche, inceneritori o, se presenta determinati requisiti, utilizzato come fertilizzante in agricoltura. Un fango di depurazione, per essere impiegato come fertilizzante, deve sottostare alle condizioni riportate nel D. Lgs. 99/92[1], in particolare:

- I fanghi devono essere sottoposti a trattamento (biologico, chimico o termico) in modo da ridurre in maniera rilevante il potere fermentescibile e gli inconvenienti sanitari associati al loro utilizzo (*rif. art.3, c.1, lettera a)* - D. Lgs. 99/92);
- I fanghi devono essere idonei a produrre un effetto concimante e/o ammendante e correttivo del terreno (*rif. art. 3, c.1, lettera b)* - D.Lgs. 99/92);
- I fanghi non devono contenere sostanze tossiche e nocive, e/o persistenti, e/o bioaccumulabili in concentrazioni dannose per il terreno, per le colture, per gli animali, per l'uomo e per l'ambiente in generale (*rif. art.3, c.1, lettera c)* - D.Lgs. 99/92).

1.2.1 Stato dell'arte sui fanghi attivi

Si stima che, nel 2020, la produzione mondiale di acque reflue urbane sia stata tra i 360 e i 380 miliardi di metri cubi e si prevede che, nel 2030 e nel 2050, la produzione mondiale di questo refluo aumenterà, rispetto ai volumi appena citati, rispettivamente del 24% e del 51%. L'aumento delle acque reflue da trattare porta, di conseguenza, ad un aumento della produzione di fanghi, che dovranno essere successivamente gestiti [Popoola et al., 2023]. Negli ultimi 20 anni, nei paesi facenti parte della Comunità Europea, la produzione di fanghi da depurazione, derivante da reflui civili, è arrivata a toccare le 10 milioni di tonnellate l'anno (peso secco) [Popoola et al., 2023]. Attualmente, nell'UE, circa il 50% del fango prodotto viene impiegato nei terreni agricoli, il 28% viene incenerito ed il 18% viene smaltito in discariche, mentre il restante

[1] Decreto legislativo del 27 gennaio 1992, n.99; `https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/1992/02/15/092G0139/sg`.

4% viene smaltito attraverso altri metodi [Collivignarelli et al., 2019]. La gestione dei fanghi di scarto rappresenta il 50-60% dei costi operativi degli WWTPs Sun et al. [2021]. A causa di norme sempre più stringenti sullo smaltimento dei rifiuti (Direttiva 2008/98/CE) e dell'aumento dei prezzi associati allo smaltimento dei fanghi, emerge chiaramente il bisogno di ottimizzare la gestione di questi ultimi. Questi sono alcuni dei motivi per cui, ad oggi, sono in studio varie alternative per la valorizzazione dei fanghi. Occorre innanzitutto distinguere i fanghi in primari e secondari. I fanghi primari sono una miscela di composti inorganici inerti e composti organici facilmente degradabili, mentre i fanghi secondari, o fanghi attivi, sono composti prevalentemente da cellule e materiali cellulari dei microrganismi che hanno effettuato la depurazione del refluo [Badawi and Hassan, 2024]. Nella tabella 1.1 sono riportate le concentrazioni iniziali dei solidi totali (TS), dei solidi volatili (VS) ed il rapporto tra queste (VS/TS), rispettivamente dei fanghi primari e secondari impiegati nello studio di [Pinto et al., 2016]. I solidi totali (TS) rappresentano la massa di residuo secco che rimane a seguito di un'operazione di evaporazione di un campione di refluo (vedi pag. 30). I solidi volatili (VS) rappresentano la porzione organica dei solidi totali. Per identificarli occorre sottoporre il residuo secco ad incenerimento (vedi pag. 31).

Tabella 1.1. Concentrazioni medie e deviazioni standard dei solidi totali e dei solidi volatili [Pinto et al., 2016].

FANGHI		
	FANGO PRIMARIO (n=8)	FANGO SECONDARIO (n=8)
TS (g/L)	54.59 ± 0.39	23.80 ± 1.39
VS (g/L)	36.35 ± 3.21	18.51 ± 2.50
VS/TS	66	78

Sebbene i fanghi secondari presentino, nella maggior parte dei casi, un rapporto VS/TS maggiore rispetto ai fanghi primari, questi risultano quasi sempre meno biodegradabili. La minore biodegradabilità dei fanghi secondari è principalmente dovuta alla presenza delle membrane cellulari, che rendono i macronutrienti intracellulari meno biodisponibili [Pinto et al., 2016]. I processi a biomassa sospesa portano alla produzione di grandi volumi di fanghi attivi i quali, devono poi essere opportunamente trattati. Nonostante la digestione anaerobica sia una tecnologia sostenibile e che permette di valorizzare i fanghi attivi, studi recenti hanno indicato la possibilità di applicare tecnologie alternative con l'obiettivo di produrre prodotti di maggiore valore, come i poliidrossialcanoati (PHA) [Lorini et al., 2022].

1.3 I Poliidrossialcanoati (PHA)

I poliidrossialcanoati (PHA) sono poliesteri alifatici di origine biologica sintetizzati ed accumulati sotto forma di inclusioni cellulari. I PHA fungono principalmente da fonti di carbonio ed energia per numerose specie di microrganismi (sia Gram positivi che Gram negativi), compresi batteri anaerobici fotosintetici ed *Archaea* [Battista et al., 2020]. Questi biopolimeri risultano essere completamente biodegradabili (sia in ambiente aerobico che anaerobico) e sono caratterizzati dal fatto che possono essere biobased, ovvero totalmente o parzialmente derivati a partire da biomasse. I PHA non sono un unico polimero, ma una famiglia di copolimeri caratterizzati da un'ampia gamma di proprietà fisiche e meccaniche. Tra questi, i più comuni sono il poli(3-idrossibutirrato) o P(3HB) e il poli(3-idrossibutirrato-co-3-idrossivalerato), P(3HB-co-3HV) o, più comunemente, PHBV. Questi ultimi risultano molto interessanti, poiché presentano proprietà termoplastiche ed elastomeriche simili ai polimeri derivanti dall'industria petrolchimica, come polipropilene e polietilene [Valentino et al., 2017].

Tabella 1.2. Proprietà fisiche di vari PHA rispetto alle plastiche convenzionali [Chen and Wu, 2005]; T_m = temperatura di fusione.

Campioni	T_m (°C)	RESISTENZA ALLA TRAZIONE (MPa)	ALLUNGAMENTO A ROTTURA (%)
PHB	177	43	5
PHBV (10% HV)	150	25	20
PHBV (20% HV)	135	20	100
Polipropilene	170	34	400
Polistirene	110	50	-

La struttura generale dei PHA è rappresentata in figura 1.7, in cui il numero di atomi di carbonio e la composizione della catena laterale (R) identificano l'unità monomerica. Ad esempio, con n = 1, se il gruppo R è un metile ($-CH_3$) l'unità monomerica sarà il 3-idrossibutirrato (3-HB), se invece il gruppo R è un etile ($-C_2H_5$) o un propile ($-C_3H_7$) le unità monomeriche saranno rispettivamente il 3-idrossivalerato (3-HV) e il 3-idrossiesanoato (3-HH) [Amanat et al., 2021].

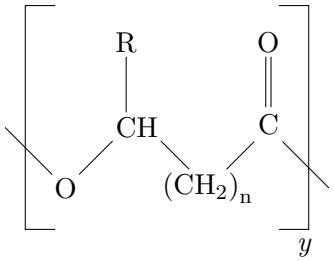


Figura 1.7. Struttura chimica generale dei PHA (R rappresenta la catena laterale alchilica variabile, n generalmente varia tra 1 e 4 e y è il numero di monomeri che può variare da 100 a 30.000).

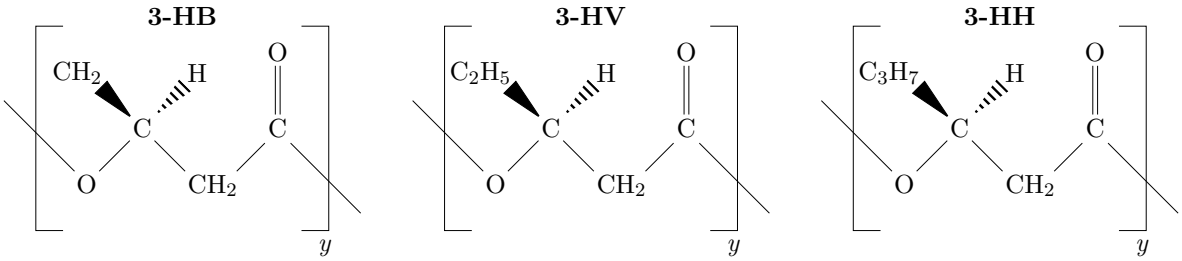


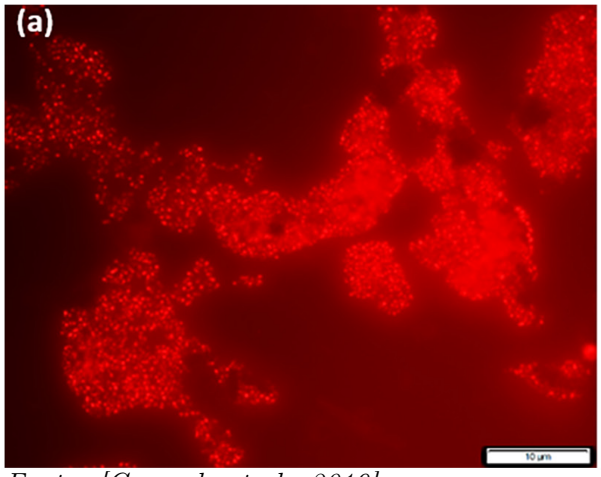
Figura 1.8. Struttura chimica delle unità monomeriche: 3-idrossibutirrato (3-HB), 3-idrossivalerato (3-HV) e 3-idrossiesanoato (3-HH).

Al giorno d'oggi, la commercializzazione dei PHA è limitata a causa degli alti costi di produzione dovuti principalmente a:

- L'utilizzo di colture pure o colture batteriche ingegnerizzate per cui sono richieste condizioni di sterilità;
- L'acquisto della fonte di carbonio, che può incidere fino ad un 40% sui costi totali di produzione;
- I processi di estrazione e purificazione del PHA [De Donno Novelli et al., 2021].

I PHA possono essere prodotti a partire da vari substrati. A livello industriale, i substrati di partenza maggiormente impiegati sono: saccarosio, mais e oli vegetali. L'utilizzo di questi substrati per produrre PHA, oltre ai costi ad essi associati e già menzionati, presenta lo svantaggio di essere in competizione con gli altri potenziali usi presenti nella filiera agro-alimentare [Vicente et al., 2023]. Negli ultimi anni sono stati studiati processi più sostenibili ed economici, basati sull'utilizzo di colture microbiche miste o Mixed Microbial Colture (MMC), specializzate nell'accumulo intracellulare di PHA. La produzione di PHA mediante MMC risulta più facile e meno costosa poiché non sono richieste condizioni di sterilità o l'impiego di attrezzature per lavorare in condizioni axeniche. Inoltre, non lavorare in condizioni di sterilità consente l'impiego, come fonte

di carbonio, di sostanze organiche a basso costo o a costo zero, come i rifiuti. Dato l'utilizzo diffuso e crescente nel mondo dei processi a biomassa sospesa per il trattamento delle acque reflue e grazie al fatto che all'interno dei fanghi attivi sono naturalmente presenti microrganismi in grado di stoccare PHA (come i batteri Poli-P), molte ricerche sulla produzione di questi biopolimeri da MMC si sono concentrate sull'impiego e sulla valorizzazione di questo rifiuto. La minimizzazione della produzione dei rifiuti rappresenta uno dei degli obbiettivi previsti dalle strategie dell'Unione Europea (UE). Queste strategie si pongono come priorità lo sviluppo di una transizione verso un economia circolare, adottando l'approccio "closing the loop" ai sistemi di produzione industriale. La conversione di prodotti a basso valore, come i fanghi attivi, in prodotti ad alto valore, come i PHA, risulta pienamente coerente con l'approccio scelto dall'UE per lo sviluppo di un economia circolare. Questa conversione rappresenta un esempio di applicazione del concetto di bioraffineria, ovvero la trasformazione di biomasse rinnovabili in prodotti a valore aggiunto minimizzando la produzione di rifiuti o il consumo di energia [Moretto et al., 2020]. Nell'ultimo decennio, le ricerche per la produzione di PHA da MMC, partendo da fanghi attivi come inoculo, si sono concentrate sullo sviluppo in scala di un processo chiamato "processo a 3 stadi" [Valentino et al., 2017].



Fonte: [Crognale et al., 2019].

Figura 1.9. Immagine, acquisita tramite microscopio a fluorescenza, di una MMC trattata con Nile Blue. Questo colorante è specifico per la colorazione delle inclusioni lipidiche ed i puntini in rosso indicano la presenza di granuli di PHA.

1.3.1 Produzione di PHA da MMC mediante processo a 3 stadi.

Questo processo richiede due ingredienti fondamentali:

- Un'alimentazione ricca di materiale biodegradabile, preferibilmente composta da VFA.
  I VFA sono acidi monocarbossilici alifatici in cui il numero di atomi di carbonio che compone la catena può variare da 2 (acido acetico) a 6 (acido caproico). A livello industriale i VFA vengono principalmente prodotti dalla lavorazione del petrolio [Battista et al., 2020].

- Una coltura microbica mista contenente microrganismi che accumulano PHA. Questa coltura microbica mista può essere selezionata partendo dai fanghi attivi.

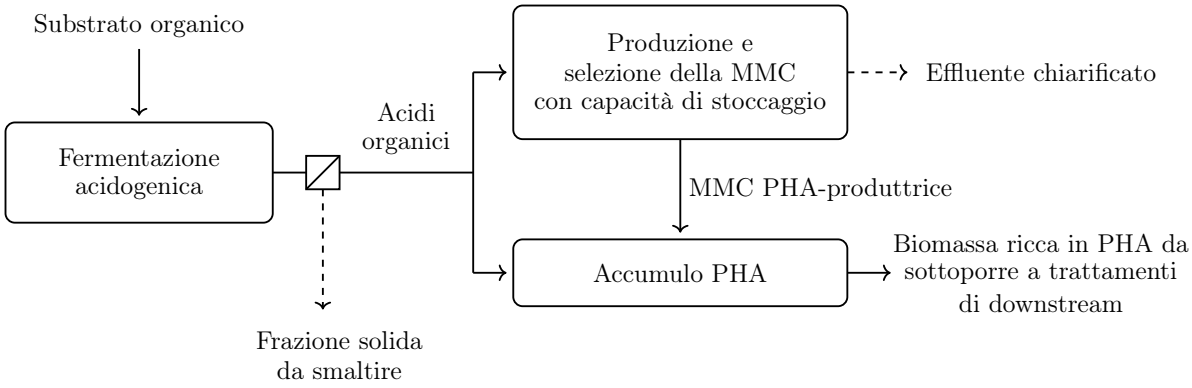


Figura 1.10. Schema generale del processo a 3 stadi [Valentino et al., 2017].

I tre stadi sono i seguenti:

1. **Preparazione dell'alimentazione e fermentazione acidogenica**
   Solitamente i processi per la produzione di PHA da colture pure prevedono l'impiego di alimentazioni a base di glucosio. Nei processi a MMC vengono, invece, utilizzate alimentazioni contenenti VFA, i quali vengono efficientemente convertiti in PHA [Valentino et al., 2017]. Questo avviene perché nelle MMC, i carboidrati vengono preferibilmente conservati sotto forma di glicogeno, mentre i VFA vengono conservati sotto forma di PHA [De Donno Novelli et al., 2021]. Un elevato rapporto VFA/COD permette di ottenere un alto tasso di conversione del COD (Chemical Oxygen Demand) in PHA [Valentino et al., 2017].
   La domanda chimica di ossigeno (COD), rappresenta la quantità di ossigeno necessaria per ossidare chimicamente, con particolari modalità operative standardizzate, le sostanze ossidabili presenti nel refluo. Queste sostanze possono essere biodegradabili o non biodegradabili, in forma solubile o di particolato.

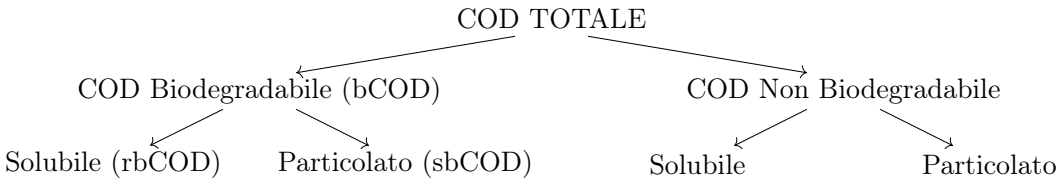


Figura 1.11. Frazionamento del COD.

Vari studi hanno confermato che l'impiego di substrati in cui il COD solubile è composto principalmente da sostanze organiche, che non sono VFA, porta ad una conversione di tali sostanze a biomassa, invece che allo stoccaggio di PHA [Battista et al., 2020]. Poiché i VFA hanno un valore di mercato e acquistarli costituirebbe un costo aggiuntivo al processo, questi possono essere ottenuti mediante un processo di fermentazione acidogenica di materiali organici grezzi, come i rifiuti agro-industriali. La produzione di VFA mediante la fermentazione acidogenica dei rifiuti, oltre a ridurre i costi rispetto alla produzione ottenuta tramite la raffinazione del petrolio, permette di: ridurre le emissioni di gas serra, evitare l'inquinamento dell'aria e l'utilizzo di materie prime non rinnovabili [Varghese et al., 2022]. Un altro vantaggio dell'utilizzo di rifiuti organici come substrato sta nella diminuzione dei costi associati al loro trattamento [Kalampokidis et al., 2024]. La fermentazione acidogenica permette di convertire composti organici quali carboidrati, lipidi e proteine in composti chimici più semplici e uniformi come i VFA. Durante la fermentazione acidogenica, l'attività metanogenica deve essere inibita operando a bassi SRT, bassi pH e/o basse temperature. I parametri di processo della fermentazione acidogenica devono essere regolati in modo tale da massimizzare la produzione di VFA [Valentino et al., 2017]. Uno dei problemi associati all'impiego dei rifiuti organici per la produzione dei substrati alimentati alle MMC è che questi sono spesso caratterizzati da variazioni nella loro composizione. Di conseguenza, sottoponendo questi rifiuti ad un processo di fermentazione acidogenica, si ottengono substrati aventi una composizione differente, in particolare un differente contenuto di VFA. La composizione dei VFA va ad influenzare direttamente la composizione dei monomeri di PHA (PHB e PHV) che si ottengono ed il rapporto di questi monomeri influenza in modo significativo le proprietà fisiche e meccaniche del polimero [Valentino et al., 2017]. Una variazione delle proprietà del prodotto coincide con una maggiore difficoltà nell'implementazione del suo impiego in determinate applicazioni. Oltre ad avere una composizione spesso non omogenea, molti rifiuti organici risultano disponibili solo in alcuni periodi dell'anno. Un substrato disponibile tutto l'anno, la cui fermentazione acidogenica porta alla produzione di elevate concentrazioni di VFA, è la Frazione Organica dei Rifiuti Solidi Urbani (FORSU), chiamata anche Organic Fraction of Municipal Solid Waste (OFMSW).

Nello studio di [Moretto et al., 2020], in cui viene proposta una filiera di bioraffineria, il processo di fermentazione acidogenica prevede l'utilizzo di OFMSW miscelato assieme a fango biologico.

Nel corso dei test condotti in questo studio si è fatto uso di alimentazioni sintetiche in cui il COD era completamente composto da acido acetico e acido propionico.

2. **Arricchimento o selezione della biomassa**

   Per ottenere una MMC composta da microrganismi che accumulano PHA è necessario procedere esponendo la biomassa a condizioni cicliche di *feast-famine*, preferibilmente all'interno di reattori batch sequenziali o Sequencing Batch Reactors (SBRs) [Battista et al., 2020]. Durante il periodo di *feast*, solitamente breve, viene fornita l'alimentazione alla biomassa, mentre durante il periodo di *famine*, solitamente lungo, la biomassa deve sopportare un periodo di carenza di substrato organico. Quando il rapporto tra il tempo del periodo di *famine* rispetto al tempo del periodo di *feast* è relativamente alto, i batteri tendono, con il passare dei cicli, a diminuire l'espressione degli enzimi associati alla crescita cellulare e, allo stesso tempo, ad assimilare più velocemente le sostanze organiche quando queste sono disponibili. Una strategia comune in molte specie di batteri per accumulare sostanze organiche consiste nella sintesi ed accumulo di PHA. In seguito, il PHA immagazzinato può essere impiegato come fonte di energia e carbonio per la crescita durante i periodi di *famine* [Valentino et al., 2017]. Attraverso l'approccio *feast-famine*, con il passare dei cicli, la maggior parte dei microrganismi che non producono PHA, o che non ne producono in quantità sufficienti, andrà in contro a morte cellulare dovuta alla mancanza di fonti di carbonio durante i periodi di *famine*. In questo senso l'accumulo intracellulare di PHA costituisce un vantaggio competitivo dei PHA-produttori nei confronti degli altri microrganismi. Utilizzando l'approccio *feast-famine* si è quindi in grado di selezionare una biomassa composta principalmente da microrganismi PHA-produttori. Per far sì che l'approccio *feast-famine* sia efficace nel selezionare la biomassa PHA-produttrice è necessario, però, che il rapporto tra il tempo del periodo di *famine* e il tempo del periodo di *feast* sia adeguato. Generalmente, al fine di selezionare microrganismi PHA-produttori, il periodo di *famine* dovrebbe durare almeno 5 volte di più rispetto a quello di *feast* [Kalampokidis et al., 2024]. Oltre al rapporto temporale dei periodi *feast-famine*, il processo di arricchimento della biomassa dipende inoltre da altri fattori quali la temperatura e la composizione dell'alimentazione. Altri fattori, fondamentali nel caso si operi con SBR, sono il tempo di ritenzione dei solidi (o Solids Retention Time; SRT) ed il tasso di carico organico (o Organic Loading Rate; OLR). Negli anni sono state proposte configurazioni di cicli *feast-famine*, dove venivano al-

ternate condizioni aerobiche e anossiche o, in alternativa, aerobiche e anaerobiche; tuttavia la maggior parte degli studi per la produzione di PHA mediante MMC prevede principalmente l'utilizzo di condizioni aerobiche [Valentino et al., 2017].

Nei test condotti in questo studio si è operato in condizioni aerobiche facendo uso dell'approccio *feast-famine* durante la fase di acclimatazione.

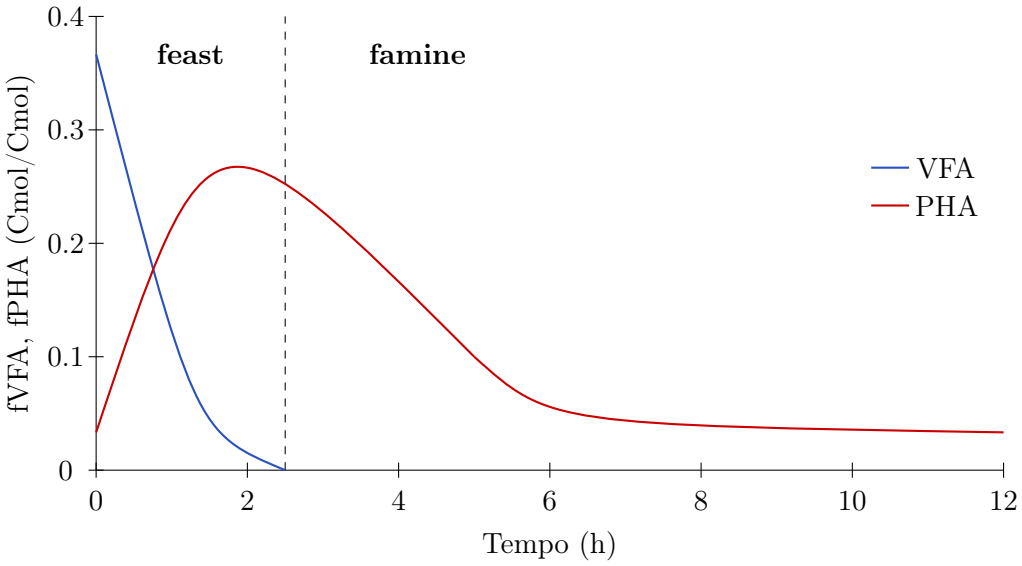


Figura 1.12. Rappresentazione grafica di un andamento delle frazioni di VFA e PHA durante un ciclo di *feast-famine*.

3. **Accumulo di PHA**

Il processo di accumulo di PHA viene spesso condotto in reattori fed-batch, dove la biomassa viene sottoposta ad un periodo di *feast* esteso (*permanent feast*). Esistono differenti strategie per la somministrazione dei VFA in modo tale mantenere le condizioni di *feast*. Una strategia consiste nell'erogazione degli acidi a intervalli temporali fissati a priori mentre altre prevedono la somministrazione dell'alimentazione quando viene rilevata una determinata variazione di parametri operativi quali l'ossigeno disciolto o il pH [Kalampokidis et al., 2024]. È stato dimostrato che in condizioni di stress, dovute ad un limitato un contenuto di nutrienti essenziali, come azoto e fosforo, e ad un eccesso di substrato carbonioso, alcuni batteri arrivano ad accumulare PHA fino al 90% del peso secco della cellula [Katagi et al., 2024]. In presenza invece di concentrazioni di nutrienti non limitanti la biomassa viene sottoposta a condizioni ideali, che tendono a far riattivare le vie metaboliche associate alla crescita cellulare (fenomeno non desiderato) [Valentino et al., 2017]. La necessità di avere un'alimentazione povera in nutrienti nella fase di accumulo, implica la ricerca di materie grezze idonee a tale scopo, come ad esempio il siero di latte (se sottoposto ad adeguate

operazioni di upstream per rimuoverne la frazione proteica). Oltre al PHA, accumulato all'interno della cellula in condizioni di stress dovute ad una limitazione di nutrienti, alcuni microrganismi producono anche esopolisaccaridi (EPS). Gli EPS, prodotti all'esterno della cellula, fungono principalmente materiale protettivo in condizioni di stress.

Durante la fase di accumulo, le alimentazioni sono state formulate addizionando basse concentrazioni di macro-nutrienti (fatta eccezione per alcuni test).

1.3.2 Vie metaboliche associate ai PHA in colture microbiche miste

Gli enzimi principali, coinvolti nella sintesi, accumulo e degradazione dei PHA sono: tiolasi, reduttasi, PHA-sintetasi e PHA-depolimerasi; con i primi tre regolati dall'operone *phaCAB*. Le tiolasi condensano i gruppi Acil-coenzima A (Acil-CoA) e le reduttasi catalizzano la successiva riduzione per formare i monomeri di idrossibutirrato (HB) e idrossivalerato (HV). Le PHA-sintetasi catalizzano l'allungamento della catena del PHA attraverso formazione di legami tra i monomeri. Le PHA-depolimerasi degradano i PHA per il loro utilizzo nel metabolismo microbico (crescita ed energia) quando i substrati, i nutrienti o gli accettori di elettroni non sono prontamente disponibili. Le reazioni specifiche, coinvolte nella sintesi di PHA in condizioni aerobiche di *feast-famine* (che comprendono assimilazione del substrato, consumo del carbonio e stoccaggio del PHA), sono state modellate sulla base dei risultati ottenuti da esperimenti sull'accumulo di PHA da parte di MMC (con acido acetico e propionico come substrati). Nonostante questi esperimenti, molto è stato dedotto dalle vie metaboliche associate a colture pure. Durante il periodo di *feast*, l'acido acetico e l'acido propionico vengono acquisiti attraverso trasporto attivo, con consumo di una mole di ATP per mole di acetato o propionato. A seguire, l'acetato e il propionato vengono convertiti rispettivamente in acetil-CoA (Ac-CoA) e propionil-CoA (Pr-CoA), utilizzando un'altra mole di ATP per mole di acetato/propionato. Una parte di Pr-CoA può essere convertita ad Ac-CoA. Gli Ac-CoA e Pr-CoA vengono poi condensati (dalle tiolasi) e ridotti (dalle reduttasi) per produrre un polimero composto da vari monomeri di 3-idrossialcanoati. I possibili monomeri prodotti sono: 3-idrossibutirrato, formato da 2 Ac-CoA; 3-idrossivalerato, formato da 1 Ac-CoA e 1 Pr-CoA; 3-idrossi-2-metilvalerato, formato da 2 Ac-CoA. Di questi monomeri di PHA solo i primi 2 sono favoriti. È stato osservato che in MMC, alimentate da substrati con un alto tenore di acido propionico, avveniva una condensazione selettiva dell'Ac-CoA con il Pr-CoA, con formazione di PHV. La produzione di PHB avveniva solo dopo che il Pr-CoA era stato esaurito. Oltre alla sintesi di PHA, Ac-CoA e Pr-CoA possono essere impiegati anche per la sintesi di biomassa o catabolizzati dal ciclo di Krebs per produrre energia. Le PHA-depolimerasi possono riconvertire i PHA ad Ac-CoA o Pr-CoA, i quali vengono impiegati dalla cellula per ricavare energia o per

crescere quando le condizioni sono limitanti [De Donno Novelli et al., 2021].

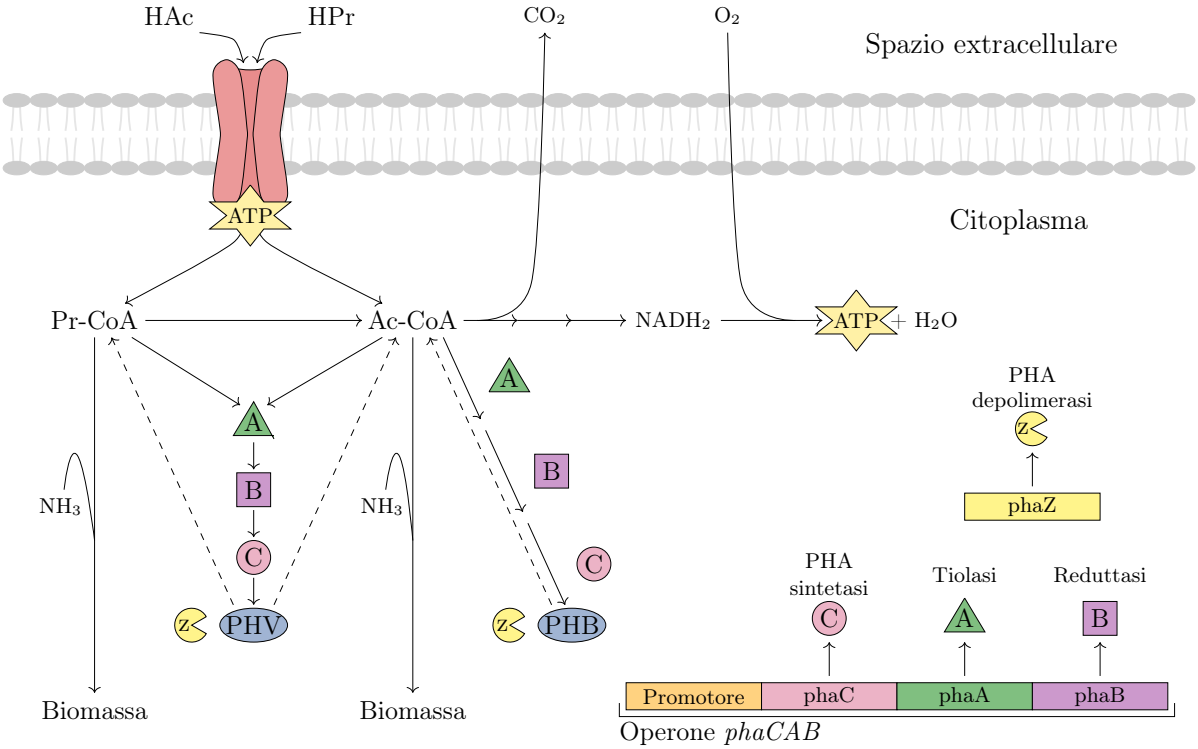


Figura 1.13. Vie metaboliche delle comunità microbiche miste (MMC) coinvolte nello stoccaggio e nella degradazione dei PHA utilizzando acido acetico e acido propionico come substrati. HAc: acido acetico, HPr: acido propionico, ATP: adenosina trifosfato, Pr-CoA: propionil-CoA, AcCoA: acil-CoA, PHB: poliidrossibutirrato, PHV: poliidrossivalerato.

1.3.3 Processi di downstream

Poiché i granuli di PHA sono sostanze intracellulari, per recuperarli è necessario effettuare delle operazioni di estrazione. Inizialmente, una volta terminato il processo fermentativo, la biomassa PHA-produttrice viene separata dalla fase liquida attraverso processi quali centrifugazione, filtrazione e sedimentazione. La biomassa può poi essere sottoposta o meno a uno o più pretrattamenti. I pretrattamenti sono dei metodi chimici, fisici o biologici impiegati per facilitare l'estrazione dei PHA. Lo scopo dei pretrattamenti è quello di indebolire le strutture cellulari che proteggono e circondano i granuli di PHA. I pretrattamenti maggiormente impiegati sono la sottoposizione della biomassa ad alte temperature, liofilizzazione, aggiunta di sali (NaCl e NaClO) e sonicazione. I pretrattamenti rappresentano uno step opzionale che permette di aumentare le rese di estrazione ed il grado di purezza del prodotto. La loro implementazione a livello industriale però non è fattibile, a meno che i vantaggi che questi portano non controbilancino i costi aggiuntivi associati al loro impiego. Si procede poi con l'estrazione dei biopolimeri. I metodi di estrazione dei PHA più studiati possono essere suddivisi in:

a) Digestione della NPCM (non- PHA cell mass), ovvero della massa cellulare che non è PHA. Si tratta di metodi in cui vengono impiegate sostanze chimiche per convertire tutto ciò che compone le cellule, ma non è PHA, in sostanze solubili in acqua. A seguire, i granuli di PHA presenti possono essere facilmente recuperati attraverso varie operazioni di separazione. Il dosaggio delle sostanze chimiche impiegate per digerire la biomassa deve essere controllato perché un loro uso eccessivo potrebbe portare anche alla degradazione dei granuli di PHA, comportando quindi una diminuzione della resa di estrazione e della qualità del prodotto. Le sostanze chimiche maggiormente impiegate per la digestione della NPCM sono NaClO, H_2SO_4, NaOH e tensioattivi (es. SDS). La digestione della NPCM può avvenire anche per via enzimatica. Enzimi quali proteasi, fosfolipasi, lisozima e nucleasi sono in grado di idrolizzare la NPCM, minimizzando la degradazione dei PHA. Al fine di aumentare la quantità e la qualità dei PHA estratti, spesso si prevede l'impiego di un cocktail di enzimi in combinazione con tensioattivi. L'estrazione dei PHA mediante digestione enzimatica permette di ottenere delle buone rese di estrazione, purezza e qualità. Gli alti costi associati agli enzimi e la complessità del processo però, costituiscono due aspetti importanti che limitano l'implementazione di questo metodo a livello industriale.

b) Estrazione con solventi

Rappresenta la pratica più diffusa per il recupero dei PHA. Il ruolo dei solventi è quello di solubilizzare i PHA. Esempi di solventi sono: composti ciclici, come il propilene o l'etilene, solventi clorurati come il cloroformio oppure miscele, come ad esempio tricloroetano con cloroformio. Il cloroformio, in particolare, viene spesso scelto poiché riduce il livello di endotossine di molti batteri gram-negativi, permettendo l'utilizzo del PHA estratto in applicazioni mediche. Attraverso l'estrazione con solventi è possibile raggiungere un'alta efficienza del processo e, allo stesso tempo, un elevato grado di purezza dei biopolimeri estratti. Nonostante ciò, l'impiego di alcuni solventi, in particolare quelli clorurati, costituisce un pericolo per l'ambiente e per gli operatori che li maneggiano. Inoltre, il processo richiede un uso massiccio di solvente per l'estrazione e di antisolvente per la precipitazione dei PHA. Per questi motivi molte ricerche sono ora orientate sullo studio di solventi green riciclabili ed ecocompatibili, come ad esempio il dimetilcarbonato (DMC).

c) Rottura meccanica

Questi metodi prevedono l'impiego di specifici macchinari per disgregare la biomassa e liberare i granuli di PHA. Il problema principale associato a questi metodi sono gli alti costi d'investimento, i lunghi tempi di trattamento e la difficoltà a scalare tali metodi a livello industriale.

Altri metodi meno comuni per estrarre i PHA sono: l'estrazione con fluidi supercritici (sCO_2) e la rottura biologica della NPCM, ovvero mediante l'impiego di virus, batteri o di organismi più complessi (es. vermi della farina). Terminata l'estrazione dei PHA questi vengono recuperati dalla soluzione attraverso operazioni unitarie quali: evaporazione, precipitazione, filtrazione, centrifugazione, sedimentazione, flottazione, estrazione liquido-liquido o l'impiego di classificatori ad aria. Come ultimo passaggio, per ottenere un prodotto commercializzabile, i PHA recuperati vengono purificati da residui, contaminanti ed endotossine, al fine di rendere il polimero adatto a determinate applicazioni. Tuttavia i metodi di purificazione attuali richiedono molta energia, comportano perdite di PHA e coinvolgono l'utilizzo di sostanze chimiche tossiche per l'ambiente [De Donno Novelli et al., 2021].

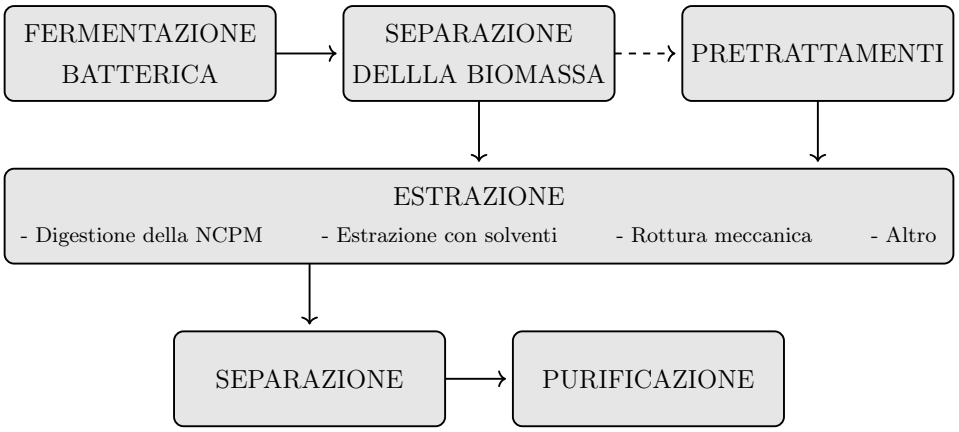


Figura 1.14. Schema dei processi di downstream per la produzione di PHA.

I processi di downstream, associati all'estrazione dei PHA, rappresentano una delle voci di costo più significative del processo produttivo. Inoltre queste operazioni risultano responsabili di oltre il 60% del Potenziale di Riscaldamento Globale (o Global Warming Potential; GWP) e circa il 70% del consumo totale di energia non rinnovabile (o Non-Renewable Energy Use; NREU) dell'intero processo [Kalampokidis et al., 2024].

1.3.4 Possibili scenari applicativi

I PHA, in funzione della loro composizione, possono potenzialmente essere impiegati in molti campi come la produzione di imballaggi, utensili usa e getta e contenitori per cosmetici. Possono, inoltre, essere usati in applicazioni mediche, come la somministrazione di farmaci (drug delivery) o in applicazioni ambientali, come il rilascio prolungato di carbonio per stimolare specifiche reazioni riduttive [Amanat et al., 2021]. Le numerose applicazioni in studio per i PHA nel campo della medicina, come ad esempio il loro impiego come materiali per l'ingegneria tissutale, sono dovute alla buona biocompatibilità di questi ultimi [Chen and Wu, 2005]. Nella maggior

parte delle applicazioni elencate, i PHA, per assolvere in modo efficiente il proprio scopo, devono rispettare determinati requisiti di purezza e standard di qualità. La presenza di impurezze, anche in tracce, può pregiudicare in modo significativo le possibili applicazioni del polimero [Valentino et al., 2017]. L'impiego dei PHA, ottenuti da MMC, in applicazioni ambientali di biorisanamento, non richiede una determinata composizione del polimero. I PHA possono di fatto essere impiegati, come materiale sostenibile e completamente biodegradabile, per il rilascio prolungato di carbonio organico al fine di stimolare reazioni biologiche di trasformazione quali la declorazione riduttiva di idrocarburi clorurati o la rimozione di nitrati o altri composti ossidati da acque di falda contaminate. Esempi di possibili scenari possono essere: l'impiego dei PHA in applicazioni *in situ* come all'interno di barriere permeabili reattive (o Permeable Reactive Barrier; PRB), oppure l'impiego in applicazioni *ex situ* utilizzati, come materiale di riempimento, in bio-reattori [Amanat et al., 2021].

Permeable Reactive Barrier (PRB)

Si tratta di una tecnologia *in situ* impiegata per il risanamento delle falde acquifere. Le barriere sono composte da materiali reattivi, in grado di ridurre, attraverso vari meccanismi (degradazione, adsorbimento, precipitazione), la concentrazione dei contaminanti delle acque di falda. Le PRB sono sistemi passivi in quanto non viene richiesta energia per il loro funzionamento. Gli inquinanti vengono trasportati verso la zona reattiva solo per effetto del gradiente idraulico. Affinché questo avvenga è necessario progettare la barriera (lunghezza, direzione) sulla base delle caratteristiche dell'acquifero (velocità e direzione del flusso, altezza) e della distribuzione del pennacchio di contaminazione, in modo tale da intercettarlo ed assicurarsi che passi attraverso il materiale reattivo (la conducibilità idraulica del materiale reattivo deve essere maggiore o uguale a quella dell'acquifero). Per questi motivi le PRB vengono costruite in direzione ortogonale al flusso della falda.

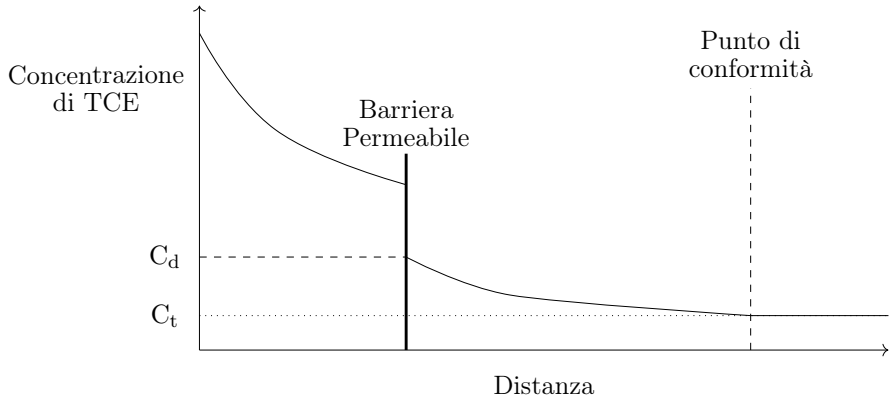


Figura 1.15. C_d: concentrazione massima in uscita dalla barriera per garantire il rispetto degli obbiettivi di qualità delle acque sotterranee; C_t: concentrazione obbiettivo, da raggiungere per rispettare gli obbiettivi di qualità; Punto di conformità: punto, teorico o reale, in corrispondenza del quale l'ente di controllo deve richiedere il rispetto degli obbiettivi di qualità delle acque sotterranee.

La barriera dovrebbe avere uno spessore tale da permettere un adeguato risanamento delle acque. Per raggiungere questo obbiettivo è necessario condurre test di laboratorio e simulazioni con modelli di trasporto. Le PRB possono avere, sulla base del caratteristiche del sito, varie configurazioni; tra le quali le più comuni sono: a barriera continua e Funnel and Gate.

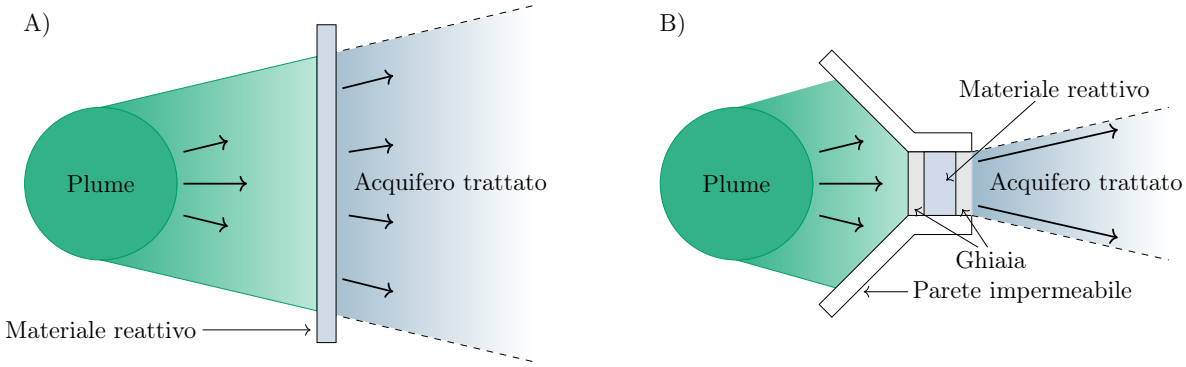


Figura 1.16. Configurazioni PRB: A) barriera continua; B) Funnel and Gate.

Le barriere Funnel and Gate sono composte da pareti laterali impermeabili che, grazie alla loro inclinazione, incanalano il flusso idrico verso un passaggio dove viene posto il materiale reattivo. Se da un lato questa configurazione permette di concentrare il materiale reattivo in un unico punto, dall'altro porta ad una modificazione del flusso dell'acquifero, aumentando la sua velocità di quasi 5 volte. Questo aspetto influisce in modo importante sulla quantità di materiale reattivo da collocare nel passaggio e di conseguenza anche sullo spessore della barriera [Thakur et al., 2020]. In dipendenza della profondità della contaminazione e del meccanismo che agisce nel ridurre la concentrazione dei contaminanti del pennacchio, le barriere possono essere inoltre suddivise in strutture sospese nell'acquifero o immorsate nell'acquitardo. La scelta del materiale

reattivo deve essere fatta sulla base di vari criteri:

- **Reattività del materiale e caratteristiche dei contaminanti:** è preferibile un riempimento che permetta di ottenere cinetiche di reazione o di assorbimento elevate. In genere la reattività aumenta all'aumentare della superficie specifica del materiale.
- **Stabilità:** intesa come tempo durante il quale il riempimento continua ad assolvere le proprie funzioni.
- **Disponibilità e costo:** è necessario ottimizzare queste due grandezze considerando anche la reattività del materiale.
- **Conducibilità idraulica:** la c.i. del materiale permeabile deve essere superiore o almeno paragonabile a quella del sistema acquifero in modo che la cattura dell'acqua contaminata sia assicurata e non si instaurino fenomeni di diversione delle linee di flusso.
- **Compatibilità ambientale:** il mezzo reattivo deve essere scelto in modo da non introdurre ulteriori fenomeni di inquinamento all'interno del sistema acquifero. In questo senso il materiale non deve contenere prodotti tossici che possano essere liberati con il tempo, né creare, nel processo di degradazione del contaminante, prodotti intermedi o finali ad elevata tossicità.

Solventi clorurati

I solventi clorurati sono, a causa del loro uso nell'industria, tra gli inquinanti più comuni presenti nelle falde acquifere. I solventi clorurati sono sostanze tossiche e recalcitranti, la cui presenza nelle falde provoca problemi sanitari e ambientali. Negli ecosistemi delle acque sotterranee sono presenti microrganismi che, attraverso un processo chiamato declorazione riduttiva biologica (o Biological Reductive Dechlorination; BRD), riescono a ridurre la concentrazione dei composti clorurati presenti in falda [Amanat et al., 2021]. La BRD è una reazione anaerobica a più step in cui composti altamente clorurati, come tetracloroetilene (PCE) e tricloroetilene (TCE), vengono convertiti prima a composti meno clorurati, come 1,2-dicloroetilene (1,2-DCE) o cloruro di vinile (VC), e poi a prodotti non clorurati come etano ed etilene [Amanat et al., 2022].

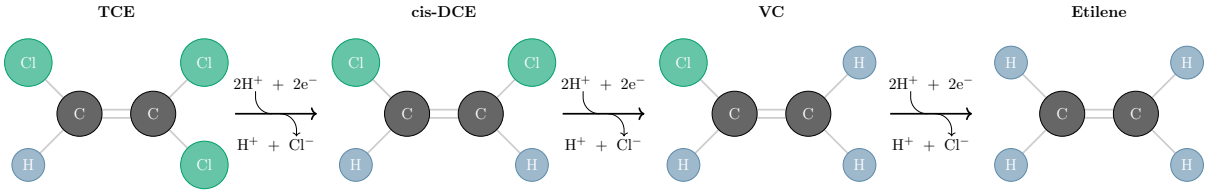


Figura 1.17. Processo di declorazione riduttiva del tricloroetilene.

Nel processo BRD i composti clorurati fungono da accettori di elettroni, mentre l'idrogeno molecolare o lo ione acetato servono come donatori di elettroni per il metabolismo dei batteri decloranti anaerobici. Studi dimostrano come la mancanza di donatori di elettroni idonei sia uno dei fattori limitanti per il processo BRD che, in alcuni casi, porta ad una declorazione riduttiva incompleta con formazione e accumulo di composti clorurati intermedi, i quali, possono essere più tossici dei composti di partenza (es. cloruro di vinile) [Amanat et al., 2021]. I PHA, in questo caso, presentano caratteristiche idonee per essere impiegati come sostanze a lento rilascio di carbonio organico che può fungere da donatore di elettroni per il processo BRD [Amanat et al., 2022]. L'applicabilità di questo processo è stata già verificata in studi condotti su scala di laboratorio, utilizzando PHA ottenuto sia da colture pure che da colture miste [Amanat et al., 2021]. In particolare [Amanat et al., 2022], in uno studio dedicato ad identificare la fonte di PHA più idonea ad essere impiegata nel risanamento di acque inquinate da TCE, ha dimostrato come l'opzione più vantaggiosa sia l'impiego di una comunità microbica mista PHA-produttrice allo stato grezzo o "MMC-raw PHA". Per MMC-raw PHA si intende una biomassa che non è stata sottoposta a trattamenti fisico-chimici di estrazione, ma solamente a trattamenti volti al suo recupero tal quale (sedimentazione, centrifugazione, filtrazione ed essiccamento). Tale biomassa era composta per il 56% (in peso secco) dal biopolimero PHBV e per il restante 44% da materiale cellulare. Rispetto alle altre fonti di PHA testate, oltre ad essere l'opzione più economica, la biomassa PHA-produttrice grezza ha mostrato una produzione di acidi organici volatili (VFA) maggiore e più duratura nel tempo. Di conseguenza, questo ha contribuito a spingere maggiormente il processo BRD, fino ad avere un effluente in cui il 92% del TCE, inizialmente immesso, era stato convertito al suo prodotto finale ovvero in etilene. Inoltre, si suppone che la rottura del materiale cellulare presente (44%), avvenuta durante l'esperimento, abbia permesso il rilascio di composti solubili come micro e macro nutrienti, i quali hanno contribuito ad un rapido avvio della fermentazione acidogenica del PHA. Dal punto di vista delle attività di biorisanamento l'impiego di queste comunità microbiche, come materiale reattivo, costituisce un esempio di biostimolazione, ovvero l'aggiunta di una sostanza che favorisce le attività metaboliche dei microrganismi autoctoni, capaci di degradare gli inquinanti.

Capitolo 2

Materiali e metodi

2.1 Approccio globale

Durante questa attività di ricerca è stato condotto un numero complessivo di prove pari a 13, come indicato nella successiva tabella 2.1. Tali prove possono essere ulteriormente suddivise in due tipologie di test. Il primo tipo di test comprende le prove dalla lettera A alla lettera K, il cui obbiettivo è stato quello di determinare la migliore fase di acclimatazione in termini di incremento del contenuto di PHA nella biomassa. I test A-K si differenziano tra loro poiché presentano varie combinazioni di parametri quali: il rapporto COD:N:P nell'alimentazione della fase di acclimatazione (100:3:0.5 o 100:5:1), il tempo associato alla fase di acclimatazione (24h o 48h), la lunghezza di ogni ciclo di *feast-famine* (8h o 12h), il rapporto COD:N:P dell'alimentazione della fase di accumulo (100:1:0.05 o 100:0:0) e la durata della fase di accumulo. Tra i test elencati nella tabella 2.1 è possibile notare che gli esperimenti dalla lettera A alla lettera E presentano una fase di accumulo della durata di 6 ore mentre in tutti gli altri test questa dura 24 ore. I test J e K invece si differenziano dagli altri per l'assenza di nutrienti nell'alimentazione della fase di accumulo (100:0:0). Il secondo tipo di test, ovvero gli esperimenti L ed M, si sono invece concentrati sull'evidenziare la variazione del processo in condizioni di salinità modificando l'alimentazione della fase di accumulo. La tabella 2.1 riepiloga le caratteristiche dei test condotti.

Tabella 2.1. Descrizione test condotti.

	FASI						
TEST	Acclimatazione			Accumulo			
	COD:N:P	Tempo	Ciclo *f-f*	COD:N:P	Tempo	Ciclo *feast*	Salinità
A	100:3:0.5	24h	8h	100:1:0.05	6h	3h	NO
B	100:5:1	24h	8h	100:1:0.05	6h	3h	NO
C	100:5:1	48h	12h	100:1:0.05	6h	3h	NO
D	100:5:1	24h	12h	100:1:0.05	6h	3h	NO
E	100:3:0.5	24h	8h	100:1:0.05	6h	3h	NO
F	100:3:0.5	24h	8h	100:1:0.05	24h	3h	NO
G	100:5:1	24h	8h	100:1:0.05	24h	3h	NO
H	100:5:1	48h	12h	100:1:0.05	24h	3h	NO
I	100:3:0.5	48h	12h	100:1:0.05	24h	3h	NO
J	100:5:1	48h	12h	100:0:0	24h	3h	NO
K	100:5:1	24h	8h	100:0:0	24h	3h	NO
L	100:5:1	24h	8h	100:1:0.05	24h	3h	SI
M	100:5:1	24h	8h	100:5:1	24h	3h	SI

2.2 Set-up del bio-reattore

Per lo svolgimento della sperimentazione è stato impiegato un vessel in vetro pyrex del volume di due litri, dotato di una camicia termica nella quale è stata fatta fluire acqua distillata ad una temperatura di circa 28°C. L'acqua veniva fatta circolare grazie all'utilizzo di tubi in plastica e mantenuta alla temperatura desiderata attraverso un termostato che regolava automaticamente il flusso. Il bio-reattore era dotato di un coperchio in HDPE con fori che permettevano di inserire all'interno del cilindro:

- il tubo per l'alimentazione;
- i due tubi in poliammide degli aeratori, dotati di diffusori composti da materiale ceramico;
- l'albero metallico di agitazione con girante a palette fisse;
- la sonda per il pH (XS Instruments);
- la sonda per l'ossigeno disciolto e la temperatura (HACH).

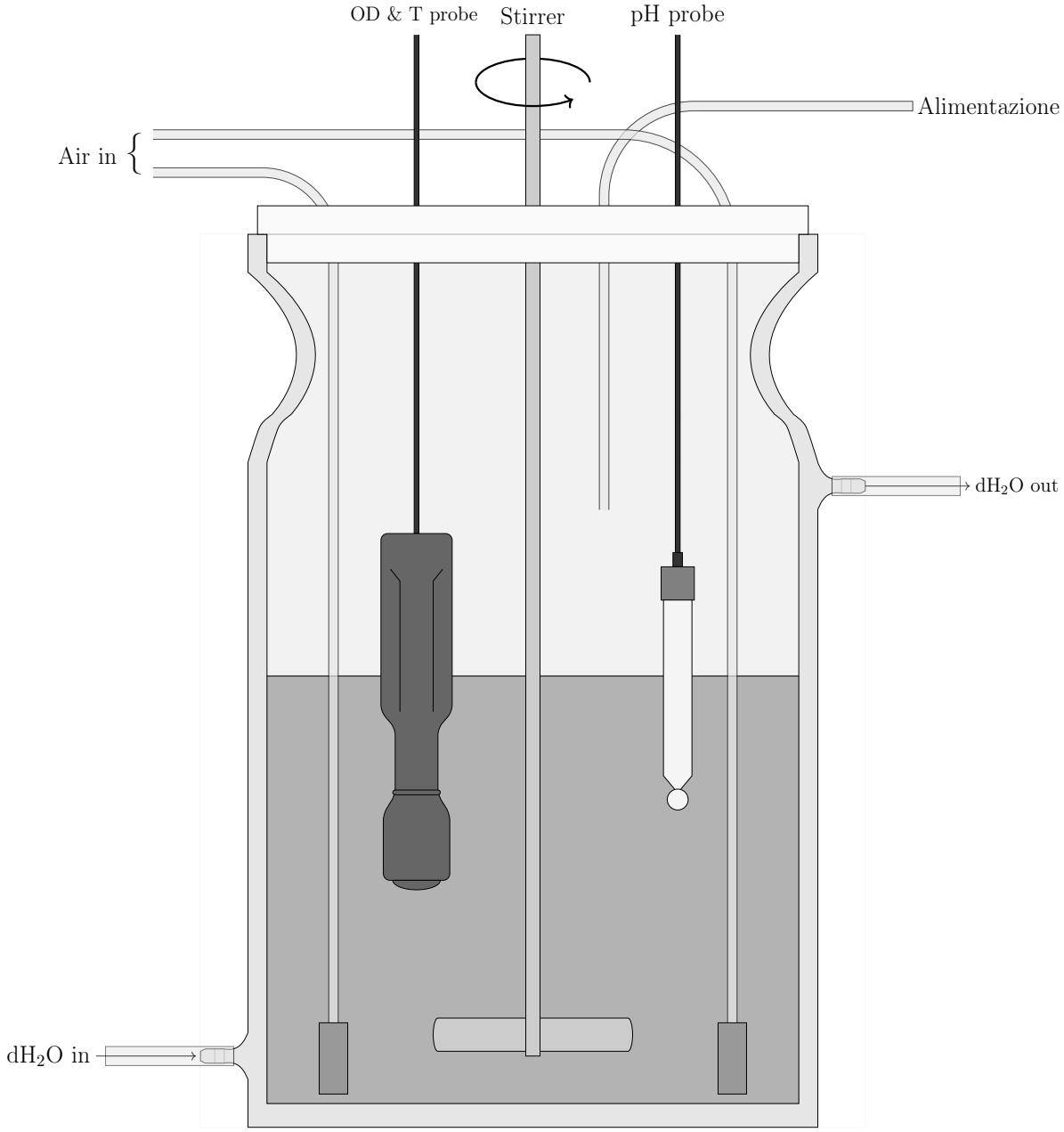


Figura 2.1. Rappresentazione grafica del bio-reattore impiegato per gli esperimenti.

Fonte: propria

Figura 2.2. Bio-reattore in funzione durante la fase di pre-areazione del test K.

2.2.1 Fase di pre-areazione

All'inizio di ogni test il bio-reattore veniva inoculato con 500 mL di fango biologico fresco e diluito con l'aggiunta di circa 500 mL di acqua di rete. Il fango utilizzato era stato precedentemente prelevato da una tramoggia di scarico di un ispessitore statico, presso l'impianto di trattamento acque reflue di Treviso (gestito da Alto Trevigiano Servizi Spa). Una volta caricato il bio-reattore, venivano accesi i sistemi di aerazione (2 da 350 L/h) e miscelazione (circa 250 rpm). Dopo circa 6 ore di areazione venivano aggiunti 3 mL di alimentazione (alimentazione della fase di acclimatazione).

2.2.2 Fase di acclimatazione

Dopo 24 ore, termina la fase di pre-areazione. La fase di acclimatazione veniva condotta in tempi variabili, da un minimo di 24 h, ad un massimo di 48 h. La fase di acclimatazione era caratterizzata da un iniziale periodo di *feast*, ovvero il dosaggio del substrato carbonioso (15 mL) nei primi 15 minuti (totale alimentato 2.5 g COD_{VFA}), mediante l'utilizzo di una pompa peristaltica, appositamente calibrata (4 rpm). Seguiva, poi, un lungo periodo di non alimenta-

zione, la cui durata poteva essere di 7 ore e 45 minuti o di 11 ore e 45 minuti, in base al test. In questo modo i microrganismi presenti nel bio-reattore erano sottoposti alla fase di *famine*, necessaria per la stimolazione da parte dei microrganismi stessi della risposta di stoccaggio. I dosaggi dell'alimentazione erano regolati da un sistema automatico che governava l'accensione e lo spegnimento della pompa peristaltica.

2.2.3 Fase di accumulo

Al termine della fase di acclimatazione seguiva la fase di accumulo, caratterizzata da una condizione di *feast* permanente, con cicli della durata di 3 ore, e dal dosaggio di un'alimentazione differente per quanto riguarda il contenuto di azoto e fosforo (unica eccezione l'alimentazione del test M, che prevedeva l'aggiunta di 10 g/L di NaCl). Ad eccezione della composizione dell'alimentazione, ogni ciclo prevedeva un periodo di *feast* analogo a quelli effettuati nella fase di acclimatazione, (15 mL in 15 minuti, 2.5 g COD_{VFA}), seguito da un periodo di non alimentazione lungo 2 ore e 45 minuti.

2.2.4 Formazione di schiume

In tutti i test, durante la fase di accumulo, si è assistito alla formazione di schiume (fenomeno di foaming). La formazione di schiuma può essere associata sia alla produzione di EPS, sia allo sviluppo di batteri filamentosi. I batteri di tipo *Nocardia* ed in particolare *Microthrix parvicella* oppure del genere *Thiothrix*, sono noti per causare problemi significativi negli impianti di trattamento delle acque reflue a causa della loro capacità di contribuire ai fenomeni di bulking e foaming [Tamang and Nogueira, 2021]. I batteri filamentosi come *Microthrix parvicella* però, sono soliti svilupparsi in condizioni di scarsità di carbonio, prediligendo acidi grassi a catena lunga (o Long Chain Fatty Acids; LCFA) [Lienen et al., 2014]. In conclusione, la presenza dei batteri filamentosi nel fango attivo utilizzato è praticamente certa ma, date le condizioni di sperimentazione presenti durante la fase di accumulo (eccesso di carbonio sotto forma di VFA), è difficile pensare che si sia verificata una loro proliferazione.

Fonte: propria

Figura 2.3. Bio-reattore al termine del processo fermentativo, prima delle operazioni di pulizia.

2.2.5 Operazioni di pulizia

In ogni test il bio-reattore è stato soggetto a brevi operazioni di pulizia delle pareti, prima dell'inizio delle fasi di acclimatazione e di accumulo e al termine della fase di accumulo. Tali operazioni prevedevano la raschiatura dei depositi di fango dalle pareti del bio-reattore mediante una spatola di ferro da laboratorio, seguita dall'agitazione della spatola nel liquido per ristabilire l'omogeneità della soluzione. Durante lo svolgimento di tali operazioni il sistema di miscelazione è stato spento e le sonde sono state rimosse dal bio-reattore per evitare che si danneggiassero. Le operazioni di pulizia effettuate al termine della fase di accumulo sono servite anche per disgregare in parte la schiuma formatasi.

2.3 Preparazione alimentazioni

Tutti i feedstock sono stati preparati con l'obbiettivo di alimentare 2.5 g COD_{VFA} ogni 15 mL di alimentazione, dove 15 mL corrispondono alla dose di alimentazione somministrata durante il periodo di *feast*. Le alimentazioni preparate per lo svolgimento dei test sono state due:

- alimentazione per la fase di acclimatazione;
- alimentazione per la fase di accumulo.

A seconda del test condotto, sono state realizzate varie tipologie di alimentazione per la fase di acclimatazione e di accumulo. Tuttavia, tutte le alimentazioni avevano la stessa concentrazione di acido acetico e acido propionico, pari rispettivamente al 70% e al 30% del COD presente nell'alimentazione (vedi tabella 2.2). A seguire, sono riportate le operazioni condotte per la preparazione di 100 mL di alimentazione per la fase di accumulo utilizzata, per i test dalla lettera A alla lettera I:

1. All'interno di un becher da 200 mL venivano dosati 0.64 g di cloruro d'ammonio (NH_4Cl) e 0.04 g di diidrogenofosfato di potassio (KH_2PO_4);
2. Dopo una piccola aggiunta di acqua distillata (circa 10 mL), venivano dosati 4.3 g di propionato di sodio ($Na(C_2H_5COO)$) e 13 mL di acido acetico (soluzione all'80%);
3. Dosaggio di una soluzione di idrossido di sodio (NaOH) 5M, e miscelazione fino al raggiungimento di un pH compreso tra 5.95 e 6.0;
4. Dosaggio di acqua distillata fino al raggiungimento di 100 mL e conservazione della soluzione a 4°C fino al momento del suo utilizzo.

Quello che cambia tra le diverse alimentazioni dei vari test è la concentrazione dei macro-nutrienti, ovvero azoto e fosforo. In linea generale, le alimentazioni della fase di accumulo erano caratterizzate da una minore concentrazione di nutrienti (unica eccezione per il test M). La tabelle 2.5 e 2.6 riportano le concentrazioni, rispettivamente di azoto e fosforo, nelle varie alimentazioni, mentre la tabella 2.7 riporta per ogni test i rapporti COD_{VFA}:N:P impiegati nelle varie alimentazioni utilizzate. Infine, le alimentazioni della fase di accumulo dei test L ed M sono caratterizzate dall'aggiunta di 10 g L^{-1} di cloruro di sodio.

Tabella 2.2. Concentrazioni dei VFA presenti in tutte le alimentazioni.

SOSTANZA	%	CONCENTRAZIONE ($\frac{gCOD_{VFA}}{L}$)	FATTORE DI CONVERSIONE ($\frac{gCOD_{VFA}}{g}$)	CONCENTRAZIONE ($\frac{g}{L}$)
A. acetico	70	116.67	1.07	109.03
A. propionico	30	50	1.51	33.11
Totale	100	166.67	-	-

Tabella 2.3. Acido acetico (mL) per litro di alimentazione (per tutte le alimentazioni).

ACIDO ACETICO		
Densità	$1.05\ \frac{g}{mL}$	$\frac{109.03\ g}{1.05\frac{g}{mL}}\ 0.8\ =\ 129.79\ mL\ \simeq\ 128\ mL$
Grado di purezza	80%	

Tabella 2.4. Propionato di sodio (g) per litro di alimentazione (per tutte le alimentazioni).

ACIDO PROPIONICO		
$PM_{C_3H_6O_2}$	$74\ \frac{g}{mol}$	$33.11\ g\ \frac{96\frac{g}{mol}}{74\frac{g}{mol}}\ =\ 42.95\ g\ \simeq\ 43\ g$
$PM_{Na(C_2H_5COO)}$	$96\ \frac{g}{mol}$	

Tabella 2.5. Cloruro di ammonio (g) per litro di alimentazione in relazione al rapporto COD_{VFA}:N:P dell'alimentazione.

AZOTO			
PM		COD_{VFA}:N:P	g_{NH_4Cl} (TOT g $COD_{VFA}\ \frac{N}{100}\ \frac{PM_{NH_4Cl}}{PM_N}$)
PM_N	$14.01\frac{g}{mol}$	100:5:1	31.82 g $\simeq$ 31.8 g
		100:3:0.5	19.09 g $\simeq$ 19.1 g
PM_{NH_4Cl}	$53.49\frac{g}{mol}$	100:1:0.05	6.36 g $\simeq$ 6.4 g
		100:0:0	0g

Tabella 2.6. Diidrogenofosfato di potassio (g) per litro di alimentazione in relazione al rapporto COD_{VFA}:N:P dell'alimentazione.

FOSFORO			
PM		COD_{VFA}:N:P	$g_{KH_2PO_4}$ (TOT g COD_{VFA} $\frac{P}{100}$ $\frac{PM_{KH_2PO_4}}{PM_P}$)
PM_P	$30.97 \frac{g}{mol}$	100:5:1	7.32 g $\simeq$ 7.3 g
		100:3:0.5	3.66 g $\simeq$ 3.7 g
$PM_{KH_2PO_4}$	$136.09 \frac{g}{mol}$	100:1:0.05	0.37 g $\simeq$ 0.4 g
		100:0:0	0g

Tabella 2.7. Rapporto COD_{VFA}:N:P per ogni test.

TEST		RAPPORTO
Acclimatazione	Accumulo	COD_{VFA}:N:P
B, C, D, G, H, J, K, L, M	M	100:5:1
A, E, F, I		100:3:0.5
	A-I, L	100:1:0.05
	J, K	100:0:0

2.4 Metodi analitici e misure

Per i test effettuati sono state condotte una serie di analisi. In tutti i test è stato determinato l'andamento delle concentrazioni di ossigeno disciolto (OD) e pH durante le prime ore delle fasi di acclimatazione e di accumulo. A partire dal test D sono state condotte ulteriori analisi, in particolare sono stati determinati: i solidi totali (TS) ed i solidi volatili (VS) dei fanghi attivi utilizzati, i coefficienti di trasferimento dell'ossigeno volumetrico (k_La) a poche ore dall'inizio della fase di aerazione e la velocità specifica di utilizzo dell'ossigeno o Oxygen Uptake Rate (OUR), in momenti diversi durante la conduzione dei test. A partire dal test E sono state determinate, in varie fasi dei test, le concentrazioni di azoto inorganico, VFA (A. acetico e A. propionico) e PHA (3-HB e 3-HV). Infine, a partire dal test I, sono stati determinati anche i VS al termine del processo. A seguire sono riportate le procedure impiegate per le suddette analisi.

2.4.1 Determinazione TS

Procedura:

- Pesare con bilancia analitica un crogiolo (M_0);

- Prelevare tot mL di fango, versarli nel crogiolo e pesare (M_1);
- Trasferire il crogiolo in stufa (105°C) per 1 ora;
- Estrarre, con una pinza, il crogiolo dalla stufa e lasciare raffreddare per 10 minuti;
- Pesare con bilancia analitica il crogiolo con i residui secchi (M_2).

Calcolo:

$$\text{TS (g/kg)} = \frac{(M_2 - M_0)}{(M_1 - M_0)} 1000$$

2.4.2 Determinazione VS

Procedura:

- Trasferire il crogiolo con i residui in una muffola (550°C) per 24 ore;
- Estrarre, con guanti da forno e pinza, il crogiolo dalla muffola e porlo in stufa per abbassarne la temperatura.
- Estrarre, con una pinza, il crogiolo dalla stufa e lasciare raffreddare per 10 minuti;
- Pesare con bilancia analitica il crogiolo con i residui rimasti post incenerimento (M_3).

Calcolo:

$$\text{ceneri (g/kg)} = \frac{(M_3 - M_0)}{(M_1 - M_0)} 1000$$

$$\text{VS (g/kg)} = \text{TS} - \text{ceneri}$$

2.4.3 pH

Il pH rappresenta l'attività degli ioni H^+ in soluzione. Tale attività influenza i processi biologici nonché la ripartizione delle specie ioniche nel campione. Il valore di pH è dato dalla concentrazione di ioni idrogeno presenti in soluzione, secondo l'equazione:

$$\text{pH} = -\log_{10}\left[H^+\right]$$

Tale valore, in una soluzione, viene determinato per via potenziometrica, utilizzando come sensore un elettrodo a vetro o a membrana, i quali sono in grado di identificare la differenza di potenziale (mV) dovuta al ponte salino che si viene ad instaurare tra la soluzione incognita e l'elettrolita presente nell'elettrodo. La taratura dello strumento prevede l'utilizzo di soluzioni tampone a pH noto. Attraverso la taratura, lo strumento è in grado di determinare il pH della soluzione incognita. Il pH è stato determinato attraverso l'utilizzo di un pH-metro, modello "XS pH 70 Vio", dotato di apposito elettrodo a membrana, modello 201T + ATC (XS INSTRUMENTS).

2.4.4 Ossigeno disciolto (OD)

Corrisponde alla quantità di ossigeno disciolto in acqua, comunemente registrata come OD, ed è espressa in milligrammi di ossigeno per litro d'acqua (mg O_2/L) o in ppm. Questo parametro è stato determinato attraverso l'impiego di un sensore a luminescenza per ossigeno disciolto, serie HQ (HACH). La determinazione della concentrazione di ossigeno disciolto è importante perché fornisce come informazione lo stato di ossidazione dell'ambiente che si va a studiare, inoltre la sua variazione nel tempo risulta un aspetto fondamentale al fine di determinare il coefficiente di trasferimento dell'ossigeno volumetrico (k_La) e la velocità specifica di utilizzo dell'ossigeno (OUR).

2.4.5 Coefficiente di trasferimento dell'ossigeno volumetrico (k_La)

È un coefficiente che esprime la capacità del sistema impiantistico di trasferire O_2 dalla fase gassosa a quella liquida ed è espresso in secondi alla meno 1 (s^{-1}). L'equazione da cui bisogna partire per la determinazione della k_La di un fango attivo è la seguente:

$$\frac{dC}{dt} = k_La\ (C_S - C) - r_M$$

- $\frac{dC}{dt}$ = variazione della concentrazione di ossigeno disciolto nel tempo;
- C_S = concentrazione di saturazione dell'ossigeno nel liquido (circa 8.5 mg/L);
- C = concentrazione dell'ossigeno in soluzione;
- r_M = velocità di consumo dell'ossigeno ad opera dei microrganismi.

La determinazione della k_La, in un fango attivo, si effettua per via sperimentale. Si procede spegnendo gli aeratori e attendendo che la concentrazione di ossigeno arrivi a valori compresi tra 1.5-2 mg O_2 L^{-1}, questa risulta essere la concentrazione iniziale C_0. Successivamente si accendono gli aeratori monitorando il trend di concentrazione di OD in soluzione. Il test finisce quando la concentrazione di OD raggiunge un plateau, ovvero non cambia in modo significativo nel tempo (la concentrazione al termine dell'esperimento viene definita C_t). Inserendo questi dati in un grafico, in funzione del tempo, si ottiene un profilo crescente come quello riportato in figura 2.4 (grafico A). La concentrazione di OD massima che si otterrebbe, qualora si lasciassero gli aeratori sempre accesi e si monitorasse il livello di OD per un periodo di tempo molto lungo (C^*), sarà sempre inferiore rispetto alla concentrazione di saturazione dell'ossigeno ($C^* < C_S$). Questo fenomeno è dovuto al consumo di ossigeno da parte dei microrganismi presenti nel fango attivo. Infatti, raggiunta la condizione di plateau, l'equazione precedente diviene:

$$\frac{dC}{dt} = k_La\ (C_S - C) - r_M \quad \rightarrow \quad r_M = k_La\ (C_S - C^*)$$

Sostituendo questo termine nell'equazione precedente, considerandola nel tratto crescente:

$$\frac{dC}{dt} = k_La\ (C_S\ -\ C)\ -\ k_La\ (C_S\ -\ C^*)$$
$$\frac{dC}{dt} = k_La\ (C^*\ -\ C)$$

Applicando il metodo di metodo di separazione delle variabili, integrando per sostituzione questa equazione e considerando che al tempo zero e al tempo t le concentrazioni siano rispettivamente C_0 e C_t:

$$\left(\frac{(C^*\ -\ Ct)}{(C^*\ -\ C_0)}\right) = e^{-(k_La)\ t}$$

Pertanto, linearizzando l'equazione in oggetto si ottiene:

$$\ln\left(\frac{(C^*\ -\ Ct)}{(C^*\ -\ C_0)}\right) = -\ (k_La)\ t \quad \rightarrow \quad \ln(C^*\ -\ C_t) = -\ (k_La)\ t\ +\ \ln(C^*\ -\ C_0)$$

In un grafico, avente in ascissa il tempo (t) ed in ordinata il logaritmo naturale della concentrazione plateau meno la concentrazione dell'OD al tempo t ($\ln(C^*\ -\ C_t)$), la pendenza della retta corrisponde a - k_La (vedi grafico B, in figura 2.4).

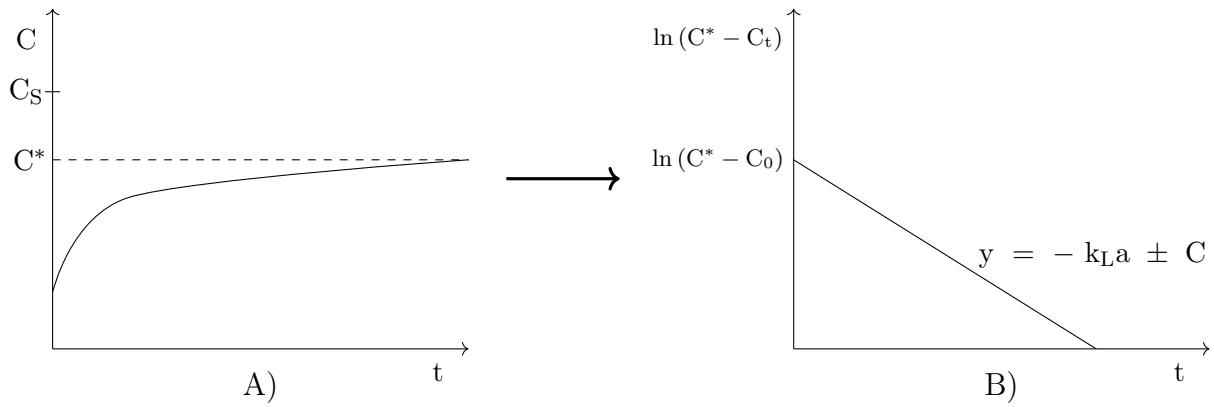


Figura 2.4. Determinazione grafica di k_La.

2.4.6 Oxygen Uptake Rate (OUR)

L'OUR, ovvero la velocità specifica di utilizzo dell'ossigeno, è un test respirometrico che permette di misurare direttamente l'attività, espressa come consumo di ossigeno, di un fango attivo. In un fango attivo (soluzione contenente biomassa), il consumo di ossigeno è dovuto principalmente ai seguenti contributi:

- La respirazione, da cui deriva l'energia necessaria a garantire le funzioni delle cellule. Questo termine, che si misura in assenza di substrato, rappresenta il contributo endogeno del consumo di ossigeno;

- La degradazione del substrato, cioè il consumo di ossigeno necessario per l'ossidazione della sostanza organica o dei composti azotati presenti nel liquame alimentato e per la sintesi di nuovo materiale cellulare. Questo termine rappresenta il contributo esogeno del consumo di ossigeno.

Si osservi il grafico in figura 2.5, che rappresenta in ascissa il tempo ed in ordinata la concentrazione di ossigeno presente nel bio-reattore, rappresentativo di un test respirometrico. La pendenza della linea presente nel grafico rappresenta la velocità volumetrica di consumo dell'ossigeno (OUR_V):

$$OUR_V = \frac{mg\ O_2}{L\ h}$$

Sempre nel grafico è possibile riconoscere varie pendenze della linea. Nel tratto 1-2 il sistema di aerazione è acceso e non c'è pendenza. Questo significa che la concentrazione di ossigeno nel mezzo è massima e non cambia nel tempo ($OUR_V = 0$). Tale condizione avviene poiché la velocità di utilizzo dell'ossigeno da parte dei microrganismi aerobi è identica alla velocità di rifornimento esterno. Si ha quindi una concentrazione di ossigeno costante, che in assenza di substrato, sarà quella massima (C^*). Nel tratto 2-3 si smette di fornire ossigeno e la sua diminuzione nel mezzo, in assenza di substrato, sarà dovuta quindi alla sola respirazione, ovvero al contributo endogeno. Nel momento in cui vi è un'aggiunta di substrato carbonioso dall'esterno (inizio del tratto 3-4), l'equilibrio cambia perché il consumo di OD non sarà dovuto solo alla respirazione endogena dei microrganismi, ma anche al contributo esogeno. La somma dei due contributi tende a far diminuire la concentrazione di OD più velocemente, fino a quando il substrato carbonioso non viene completamente consumato. Nel tratto 4-5 ormai tutto il substrato carbonioso è stato consumato e la pendenza della linea torna ad essere quella del tratto 2-3, ovvero quella associata al contributo esclusivamente endogeno. Poiché i test respirometrici terminano quando la concentrazione di OD nel mezzo va sotto i 2 mg/L, per osservare tutti i tratti appena descritti, è necessario che la quantità di substrato carbonioso alimentato sia tale da assicurarsi che questo venga completamente consumato prima del termine della prova. Anche la tipologia di substrato, ovviamente, influenza la velocità di utilizzo, in quanto i substrati rapidamente biodegradabili (rbCOD) comportano una maggior richiesta di ossigeno a breve termine rispetto ai substrati più lentamente biodegradabili (sbCOD). Tale condizione viene evidenziata nel tratto 3-4 del grafico in figura 2.5.

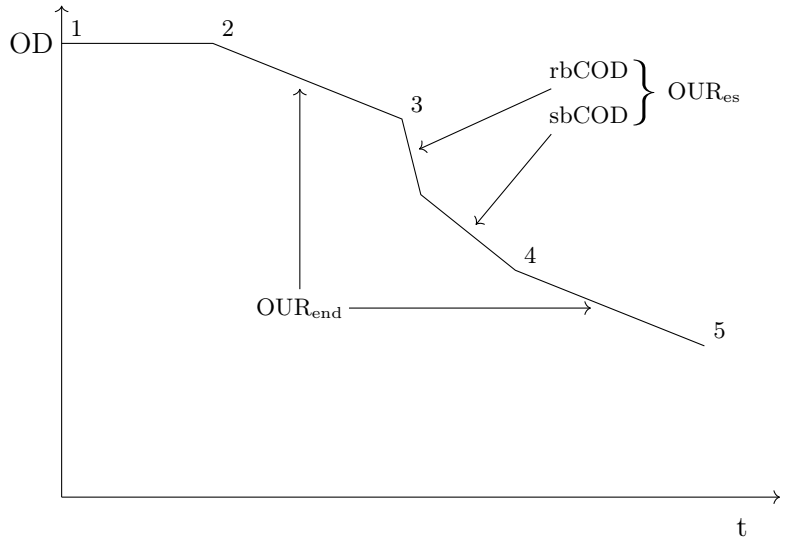


Figura 2.5. Grafico rappresentativo di un test respirometrico.

La procedura per la determinazione dell'OUR endogeno prevede il prelievo di fango attivo dalla vasca di ossidazione dell'impianto. In questo studio il fango attivo è stato prelevato da una tramoggia di scarico di un ispessitore statico e successivamente diluito (come riportato a pagina 25). Il fango viene posto in un bio-reattore dove viene mantenuto in condizioni areate per un arco di tempo che può variare da qualche ora fino anche ad un giorno. In questo modo si va ad eliminare il COD biodegradabile ancora presente nel campione (sbCOD) e, quindi, si assicura il raggiungimento della fase endogena. Successivamente è possibile determinare agevolmente l'OUR endogeno sospendendo l'areazione e monitorando il decremento della concentrazione di OD nel tempo. In tutti i test condotti, la seconda determinazione dell'OUR è stata effettuata dopo aver lasciato il fango all'interno del bio-reattore in condizioni areate overnight, ovvero per tutta la notte. Poiché l'OUR viene espresso come:

$$\text{OUR} = \frac{\frac{\text{mg O}_2}{\cancel{\text{L}}\ \text{h}}}{\frac{\text{g[MLVSS]}}{\cancel{\text{L}}}} = \frac{\text{mg O}_2}{\text{g [MLVSS] h}}$$

risulta necessario determinare anche la concentrazione dei solidi sospesi volatili (o Mixed Liquor Volatile Suspended Solids; MLVSS), presenti nel fango attivo. I grammi di MLVSS stanno ad indicare la concentrazione di biomassa. Poiché si sta operando con soluzioni acquose, la concentrazione dei MLVSS è praticamente uguale alla concentrazione dei VS (basta moltiplicare i VS per la densità dell'acqua). Per la determinazione dei VS si utilizza l'analisi gravimetrica vista precedentemente (vedi pagina 31). Nel calcolo dell'OUR si va a dividere per i grammi di biomassa in quanto più è abbondante la biomassa maggiore sarà velocità di consumo dell'ossigeno. Si tratta di un modo per standardizzare e rendere confrontabili i valori di OUR. L'OUR quindi, si ottiene determinando la pendenza della retta decrescente ottenuta con l'arresto dell'aerazione

del campione di fango e dividendola per la concentrazione dei MLVSS (o VS).

$$\text{OUR} = \frac{\left(\frac{\text{mg } O_2}{\text{L h}}\right)}{\left(\frac{\text{g[VS]}}{\text{L}}\right)}$$

2.4.7 Composti solubili

Per l'analisi dei composti solubili si sono seguiti i metodi descritti da [Peña-Picola et al., 2024]. I campioni sono stati centrifugati (15 minuti a 4500 giri/minuto). A seguire il surnatante è stato filtrato due volte, con dei filtri in fibra di vetro monouso. Nella prima filtrazione sono stati usati filtri aventi una porosità di 0.45 μm, mentre nella seconda sono stati impiegati filtri con una porosità di 0.20 μm. I campioni, contenuti all'interno di provette in plastica appositamente etichettate, sono poi stati conservati in congelatore a -20°C, fino al momento delle analisi.

Azoto ammoniacale

L'azoto presente nei campioni in forma ammoniacale è stato determinato mediante l'utilizzo di un elettrodo specifico per la determinazione dell'ammoniaca. Per l'analisi, da ciascuna provetta etichettata, sono stati prelevati, mediante l'utilizzo di pipette Eppendorf, 2 mL di campione e posti in altrettante nuove provette. I campioni, prima di essere analizzati, sono stati basificati mediante l'aggiunta di NaOH (3 gocce). L'elettrodo restituisce, come risposta, un segnale in millivolt (mV). Questo segnale è indirettamente proporzionale alla concentrazione di azoto, in forma ammoniacale, presente nel campione. Per la costruzione della retta di calibrazione sono state impiegate varie soluzioni standard, a concentrazione nota di ammoniaca, preparate mediante l'utilizzo di acqua distillata e NH_4Cl. Anche le soluzioni standard sono state trattate con NaOH.

VFA

Gli acidi grassi volatili target (acido acetico e propionico) sono stati analizzati mediante l'impiego di un gascromatografo (GC), serie Agilent 6890N, equipaggiato con colonna Agilent J&W DB-FFAP (lunghezza 15 m, diametro 0.530 mm, film 0.50 μm) e accoppiato con un detector a ionizzazione di fiamma (FID). Il metodo utilizzato, "VFA_METODO_FFAP", prevede una rampa di temperatura che cresce da 80°C a 220°C (ramp rate 20°C/min.) e termina con una fase post run a 220°C. La calibrazione è stata fatta utilizzando tre soluzioni standard contenenti: gli acidi grassi volatili target, acqua distillata per diluire (se necessario), 200 μL di acido 2-etilbutirrico come standard interno e 100 μL di acido fosforico (75%) per acidificare il campione. Per la preparazione dei campioni da ogni provetta etichettata sono stati prelevati, mediante

pipette Eppendorf, 1 mL di campione e sono stati posti in altrettante micro provette Eppendorf in plastica. Sono stati poi aggiunti, per ogni campione, sempre mediante l'utilizzo di pipette Eppendorf, 100 μL di acido fosforico (75%) e 200 μL di acido etilbutirrico. Le micro provette sono state poi chiuse e miscelate manualmente. Le operazioni condotte per iniettare sia i campioni che le soluzioni standard sono state le seguenti:

- Avvinare una siringa Hamilton per GC;
- Prelevare 1 μL di soluzione;
- Inserire l'ago nel setto tenendolo fermo ed evitando di piegare l'ago della siringa;
- Premere fino in fondo lo stantuffo;
- Togliere la siringa e premere il tasto "Start" sul GC (i punti da 3 a 6 devono essere eseguiti il più rapidamente possibile);
- Pulire la siringa con acqua distillata mediante l'impiego di una pompa da vuoto.

I risultati restituiti dal GC sono espressi in mg COD L^{-1} poiché il metodo analitico tiene conto dei fattori teorici di conversione degli acidi in COD (1.07 per l'acido acetico e 1.51 per l'acido propionico).

2.4.8 PHA

La determinazione dei PHA, in particolare 3-HB e 3-HV, è stata effettuata seguendo il metodo gascromatografico descritto da [Braunegg et al., 1978]. Tale metodo prevede una metanolisi acida mediante metanolo acidificato con H_2SO_4 (3%). Dall'idrolisi acida si formano gli esteri metilici dell'acido 3-idrossibutirrico e dell'acido 3-idrossivalerico, i quali vengono poi determinati per via gascromatografica. Il gascromatografo e la colonna sono gli stessi impiegati per la determinazione dei VFA. Il metodo utilizzato, "PHA_METODO_FFAP", prevede una rampa di temperatura che cresce da 80°C a 150°C (ramp rate 10°C/min.), con temperatura dell'iniettore e del detector rispettivamente di 230°C e 240°C. La procedura impiegata per la preparazione dei campioni prevede:

- Prelievo di 2 mL di fango, a cui venivano immediatamente aggiunti 3 mL di acqua distillata e 1 mL di soluzione di ipoclorito di sodio al 5% di cloro attivo. A seguire i campioni (contenuti in provette di plastica etichettate) venivano riposti in congelatore a -20°C, fino al momento dell'analisi.
- Scongelamento e centrifugazione dei campioni per 15 minuti (4500 giri/minuto).

- Allontanamento del surnatante e trasferimento quantitativo del residuo solido all'interno di provette in vetro pyrex mediante l'impiego di una spatola da laboratorio.
- Aggiunta di 2 mL di una soluzione di metanolo acidificato con H_2SO_4 3% v/v e di 1 mL di cloroformio,
- Chiusura delle provette con appositi tappi e collocamento delle stesse in un termostato, a 100°C per 4 ore, per favorire la digestione acida.
- Dopo il raffreddamento, aggiunta di 1 mL di acqua distillata.
- Mescolamento manuale delle provette, collocamento delle stesse in un portaprovette e attesa della formazione di 2 fasi.

Tra le due fasi è quella organica, più densa e di color giallo, che dovrà essere utilizzata per l'analisi con il GC. In figura 2.6 è possibile osservare le provette in vetro, contenenti i campioni del test M. La determinazione quantitativa di 3-HB e 3-HV è stata effettuata mediante la costruzione delle rette di taratura dell'HB e dell'HV passanti per lo zero. Per la costruzione delle rette di taratura sono state impiegate delle soluzioni standard. Per la preparazione degli standard è stato utilizzato il copolimero P(HB-HV) della Aldrich, contenente il 95% in peso di HB ed il 5% di HV. La procedura di preparazione degli standard è stata, tranne che per la fase di centrifugazione, identica a quella per i campioni. Le operazioni condotte per l'iniezione degli standard e dei campioni nel GC sono le stesse effettuate per gli standard ed i campioni relativi all'analisi dei VFA. Per le due analisi però sono state usate delle siringhe Hamilton differenti (una per analizzare solo VFA ed una per analizzare solo PHA). Il contenuto di polimero (g/L), sia esso HB o HV, è stato determinato dividendo il risultato in uscita dal GC (mg PHA/L) prima per 2, dato che i campioni sono stati preparati partendo da 2 mL di fango e poi per mille, per passare da mg a grammi. I contenuti di HB e HV all'interno della biomassa sono stati determinati dividendo il contenuto di polimero di 3-HB o 3-HV (g/L) per la concentrazione di biomassa iniziale (g VS/L). I risultati sono poi stati espressi in termini percentuali, moltiplicando per 100 i risultati ottenuti. Dividendo per la biomassa iniziale, anziché per la biomassa finale, si sta compiendo approssimazione poiché si assume che durante il processo fermentativo la biomassa non sia cresciuta.

Fonte: propria

Figura 2.6. In primo piano una provetta in vetro contenente un campione, appartenente al test M, a seguito del processo di digestione acida in cui è possibile osservare le due fasi formatesi. In secondo piano le altre provette, contenenti gli altri campioni del test M, poste in un portaprovette. Tutto il materiale visibile è collocato all'interno di una cappa chimica.

Capitolo 3

Risultati e discussione

3.1 Concentrazioni TS e VS

L'istogramma presente in figura 3.1 mostra le concentrazioni dei solidi totali e dei solidi volatili, presenti nel fango attivo iniziale, impiegato per effettuare i vari test. Inoltre, è indicato in percentuale anche il rapporto VS/TS. I valori dei TS e VS sono stati divisi per un fattore 2 in quanto il fango attivo presente nel bio-reattore è stato diluito con acqua di rete in modo da avere un valore iniziale di concentrazione non troppo elevato, e più compatibile con le successive analisi respirometriche previste. Nel grafico sono riportate le concentrazioni dei solidi di tutti i test, a partire dal test D. Sulla destra del grafico sono riportate anche le concentrazioni medie, e relative deviazioni standard, di TS, VS e del rapporto VS/TS. Le concentrazioni medie dei solidi totali e totali volatili risultano simili a quelle riportate nello studio di [Valentino et al., 2022]. La figura 3.1 serve ad evidenziare come le concentrazioni iniziali dei solidi totali, presenti nei fanghi attivi impiegati, siano state molto variabili, da un minimo di 9.59 g kg^{-1} ad un massimo di 17.06 g kg^{-1}. Il rapporto VS/TS, invece, è risultato essere abbastanza simile in tutti i test. Una possibile motivazione di tali caratteristiche del fango attivo può essere associata ad un diverso tempo di residenza dei fanghi all'interno dell'ispessitore statico corrispondente al momento del prelievo (dato tuttavia non quantificabile e non noto).

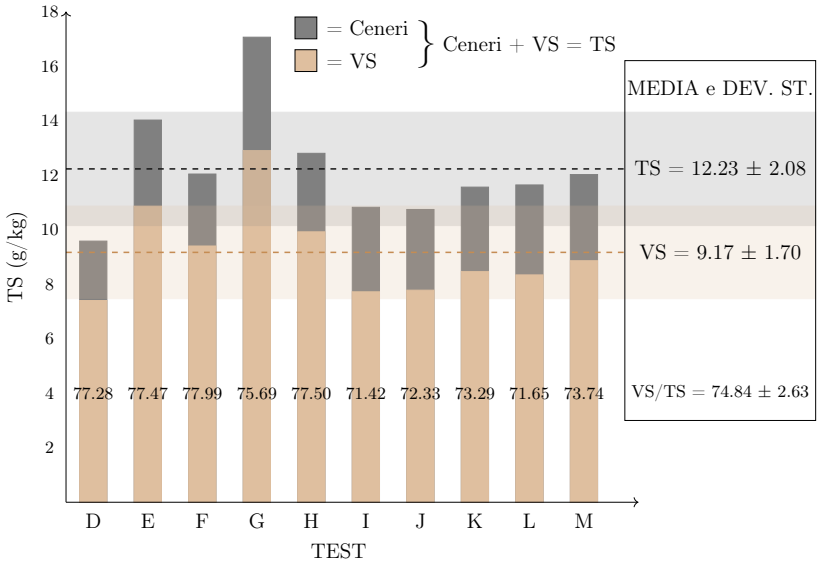


Figura 3.1. Concentrazioni di solidi totali e solidi volatili nel fango attivo iniziale.

Il grafico in figura 3.2 mostra invece le concentrazioni dei VS, a partire dal test I, presenti nel fango attivo iniziale e nel fango presente all'interno del bio-reattore al termine del processo. Il metodo effettuato per la determinazione dei VS del fango presente nel bio-reattore è analogo a quello utilizzato per la determinazione dei VS presenti fango attivo iniziale. Quello che cambia è che nel caso dei fanghi presenti nel bio-reattore al termine processo non è necessario dividere i risultati ottenuti per due in quanto questi fanghi sono stati sottoposti ad una diluizione 1 a 2. È possibile notare che la concentrazione dei VS sia mediamente aumentata di più di un grammo su chilo. Si registra un aumento dei VS in tutti i test analizzati meno il test J, dove le concentrazioni determinate risultano molto simili (7.77 g/kg all'inizio del test e 7.63 g/kg alla fine del test). Una delle motivazioni per cui i VS non sono aumentati nel test J è attribuibile ad un interruzione forzata dell'alimentazione causata da una discontinuità di funzionamento del sistema. In tutti gli altri test l'aumento dei VS può essere principalmente dovuto o a un fenomeno di crescita cellulare o ad un accumulo intracellulare di PHA (o ad entrambi).

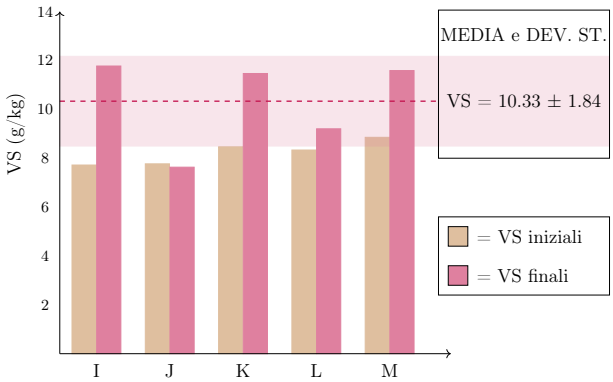


Figura 3.2. Concentrazioni dei solidi volatili nel fango attivo all'inizio e al termine del processo.

3.2 Andamento OD e pH

Il grafico in figura 3.3 rappresenta l'andamento delle concentrazioni di ossigeno disciolto e pH, di tutti i test, durante le prime ore del primo ciclo della fase di acclimatazione. Nei primi test (A-D), la raccolta dei dati è stata di natura esplorativa, con un intervallo di tempo inferiore rispetto agli altri test. Tuttavia, nonostante la durata più breve, sono stati comunque raccolti numerosi dati relativi ai primi minuti della sperimentazione, permettendo di ottenere informazioni significative su quella fase iniziale. Nei test successivi la raccolta dei dati è avvenuta per un periodo di tempo maggiore e ad intervalli regolari e prestabiliti, in modo tale da riuscire a confrontare al meglio i risultati ottenuti. La concentrazione media di ossigeno disciolto iniziale dei vari test è stata 5.44 mg L^{-1} ($\pm$0.90 mg/L). L'andamento dell'ossigeno disciolto, durante i primi minuti della fase di acclimatazione, evidenzia come, in tutti i test, si sia assistito ad un brusco calo, associato all'aggiunta dell'alimentazione (ricca in VFA), seguito da un nuovo aumento, più o meno rapido. A seguire, le concentrazioni OD registrate hanno evidenziato degli andamenti molto eterogenei. La motivazione più plausibile è che, a causa dell'elevata concentrazione di materiale particolato presente nel mezzo di reazione, la sonda dell'ossigeno sia stata soggetta ad intasamento per intervalli non regolari in alcuni test, non permettendo di registrare le reali concentrazioni di OD sperimentate dalla biomassa. Il pH iniziale dei vari test è stato 7.99 ($\pm$0.22). Se si osserva l'andamento del pH nel tempo, anche questo evidenzia un calo avvenuto all'inizio della fase di acclimatazione ed associato all'aggiunta dell'alimentazione, ricca in sostanze acide. A seguire i valori di pH, di tutti i test, mostravano un lento, ma costante aumento. L'unico test in cui il pH è diminuito su valori inferiori a 6.0, per un breve intervallo di tempo, era il test J il cui andamento iniziale si discosta sostanzialmente dagli altri test.

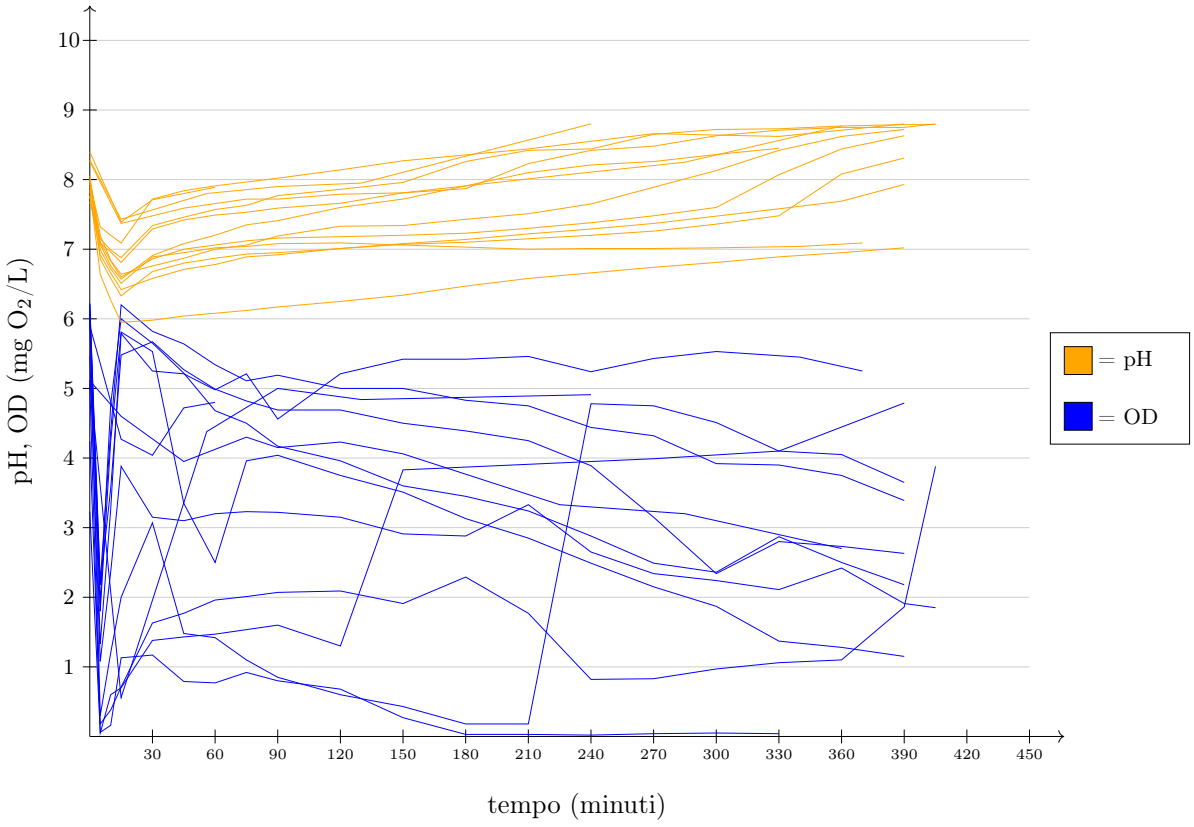


Figura 3.3. Andamento delle concentrazioni di pH ed OD, dei vari test, durante la fase di acclimatazione.

Il grafico in figura 3.4 rappresenta l'andamento delle concentrazioni di ossigeno disciolto e pH, di tutti i test, durante le prime ore della fase di accumulo. Come per il grafico precedente, i dati raccolti nei primi 4 test sono stati esplorativi. La raccolta dei dati in tutti gli altri test si è prolungata per 6 ore, comprendo due cicli della fase accumulo. I dati sono stati raccolti sempre ad intervalli regolari e prestabiliti, ma con una frequenza maggiore in corrispondenza dell'inizio dei due cicli, ovvero al tempo zero e dopo 180 minuti. La concentrazione media di ossigeno disciolto iniziale dei vari test era pari a 5.09 mg L^{-1} ($\pm$0.96 mg/L). L'andamento dell'ossigeno disciolto, in corrispondenza dei periodi rifornimento dell'alimentazione (dal minuto zero al minuto 15 e dal minuto 180 al minuto 195) è caratterizzato da un calo, più o meno brusco. Dopo questo calo, l'andamento dell'ossigeno disciolto variava caso per caso. Nei test A-C la concentrazione di OD non era mai inferiore a 1.0 mg L^{-1} mentre nei test I, J ed M la concentrazione di OD tendeva a rimanere costantemente sotto 1.0 mg L^{-1}. I test D-H ed L mostravano invece un andamento ciclico, con concentrazioni basse di OD durante le prime due ore del ciclo, seguite da un aumento dell'OD, durante o al termine della terza ora (esattamente prima dell'inizio di un nuovo ciclo di alimentazione). Questo andamento risultava maggiormente accentuato durante il secondo ciclo. Per esempio, nel test K, l'aumento di OD registrato al termine del primo ciclo non risultava significativamente alto (incrementando da 0.47 mg L^{-1} a 0.65 mg L^{-1} durante l'ultima ora del ciclo) ma lo diventava nel secondo ciclo (da 1.11 mg L^{-1} a 1.86 mg L^{-1} durante l'ultima ora del ciclo). L'incremento della concentrazione di ossigeno era probabilmente associato al termine della respirazione esogena. Il pH iniziale dei vari test era pari a 9.16 ($\pm$0.23). Si tratta di un pH piuttosto alcalino, dovuto essenzialmente a fenomeni di idrolisi basica associati ai consumi dei VFA in fase liquida e al conseguente incremento degli ioni OH^- in soluzione. L'andamento del pH, nei vari test, risultava molto lineare ed omogeneo, con lievi flessioni in corrispondenza del periodo di rifornimento dell'alimentazione.

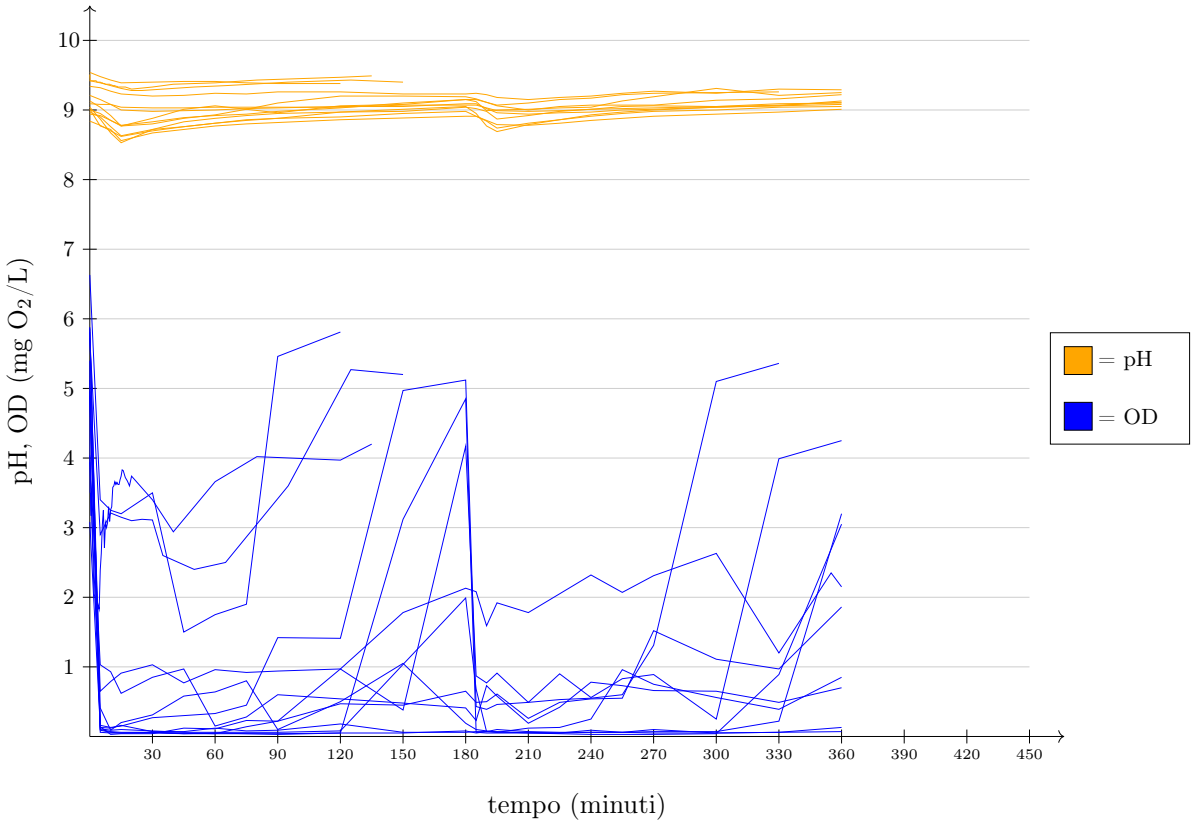


Figura 3.4. Andamento delle concentrazioni di pH ed OD, dei vari test, durante la fase di accumulo.

3.3 K_La

I valori dei coefficienti di trasferimento dell'ossigeno volumetrico, a partire dal test D, sono stati misurati dopo poche ore dall'inizio dei rispettivi test (durante la fase di pre-areazione). L'unico test in cui il k_La è stato determinato dopo un giorno dall'inizio del test (termine della fase di pre-areazione) è il test G. Nell'istogramma in figura 3.5 sono riportati i risultati. Dai calcoli effettuati risulta che il valore medio di questo coefficiente è di 0.44 min^{-1}. La deviazione standard invece risulta essere pari a 0.11 min^{-1}. Come nel caso dei TS e dei VS, anche in questo caso i valori ottenuti sono risultati molto variabili. In particolare, è possibile osservare che il test con il k_La più alto è il test D, caratterizzato dalla più bassa concentrazione di TS, mentre il k_La più basso è quello associato al test G, in cui la concentrazione di TS è la più alta. I risultati ottenuti sembrano suggerire che più la concentrazione dei solidi è alta e più lentamente aumenta la concentrazione di ossigeno nel mezzo reattivo.

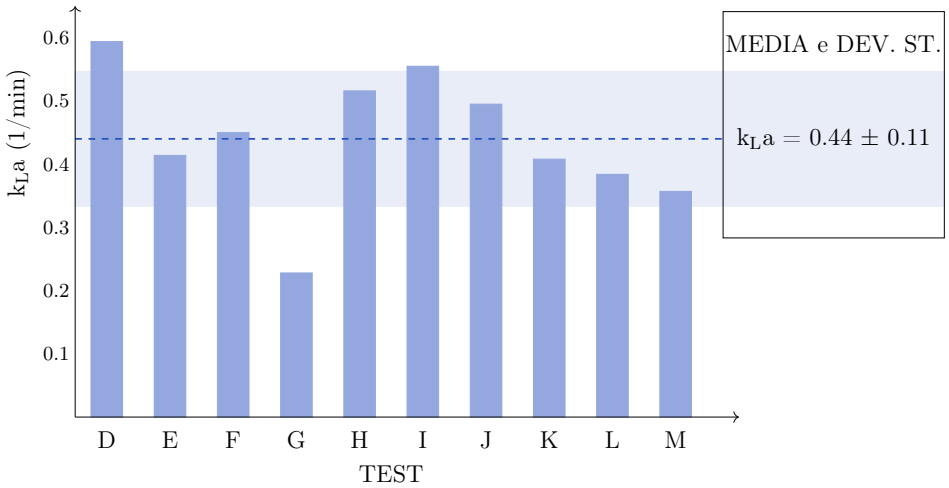


Figura 3.5. Coefficienti di trasferimento dell'ossigeno volumetrico.

3.4 OUR

L'attività del mezzo reattivo è stata monitorata effettuando diverse prove respirometriche durante i vari test, in determinati periodi di tempo per una comprensione maggiore della risposta metabolica della biomassa (fango attivo). I periodi e/o intervalli corrispondenti alla determinazione dell'OUR erano:

- poche ore dall'inizio del test, durante la fase di pre-areazione (OUR sludge);
- dopo 1 giorno dall'inizio del test, prima dell'inizio della fase di acclimatazione (OUR pre-acclimation);
- dopo 1 giorno dall'inizio della fase di acclimatazione, nei test aventi due giorni di acclimatazione (OUR acclimation);
- dopo 1/2 giorno/i dall'inizio della fase di acclimatazione, prima della fase di accumulo (OUR pre-accumulation);
- dopo 3 ore dall'inizio della fase di accumulo, prima dell'inizio del ciclo di *feast* successivo (OUR accumulation A);
- dopo 6 ore dall'inizio della fase di accumulo, prima dell'inizio del ciclo di *feast* successivo (OUR accumulation B);
- dopo 24 ore dall'inizio della fase di accumulo (OUR accumulation C).

La tabella 3.1, riporta, per ogni prova, gli OUR determinati. Le caselle verdi indicano che il test respirometrico è stato effettuato. I simboli "-" e "x" invece stanno ad indicare che il test respirometrico non è stato effettuato in quanto non previsto (-) o non quantificabile a causa dei valori troppo bassi di OD (x). Tra tutte le prove condotte, l'unica in cui non è stato possibile determinare l'OUR iniziale è stato il test G. Le basse concentrazioni di OD presenti nel fango in corrispondenza dell'inizio del test G (nonostante l'areazione e l'agitazione), possono essere associate alla presenza di sostanze organiche (seppur in difetto) o composti azotati, che hanno contribuito al consumo dell'ossigeno (contributo esogeno). In molti test (E-G, I-M) non è stato possibile determinare "OUR accumulation A". Tutti i test in cui non è stato possibile determinare "OUR accomulation B" risultano essere test in cui non è stato possibile determinare né "OUR accumulation A" né "OUR accomulation C".

Tabella 3.1. OUR misurati per ogni test.

TEST										
D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	**OUR**
			x							OUR sludge
-										OUR pre-acclimation
-	-	-	-				-	-	-	OUR acclimation
										OUR pre-accumulation
	x	x	x		x	x	x	x	x	OUR accumulation A
		x			x	x	x		x	OUR accumulation B
-	-	x			x	x	x		x	OUR accumulation C

Nelle figure a seguire sono riportati vari istogrammi, ciascuno raffigurante i valori OUR associati ad un determinato periodo di tempo. Sempre in queste figure, a destra degli istogrammi, sono riportate la media e la deviazione standard degli OUR, calcolati tenendo conto solo dei test in cui è stato ottenuto un risultato.

OUR sludge

Nonostante, nei vari test, il contenuto dei solidi volatili nei fanghi sia abbastanza differente, ciò non sembra influenzare, in modo significativo, la loro velocità di consumo dell'ossigeno. Infatti, gli OUR misurati a poche ore dall'inizio del test risultano abbastanza omogenei.

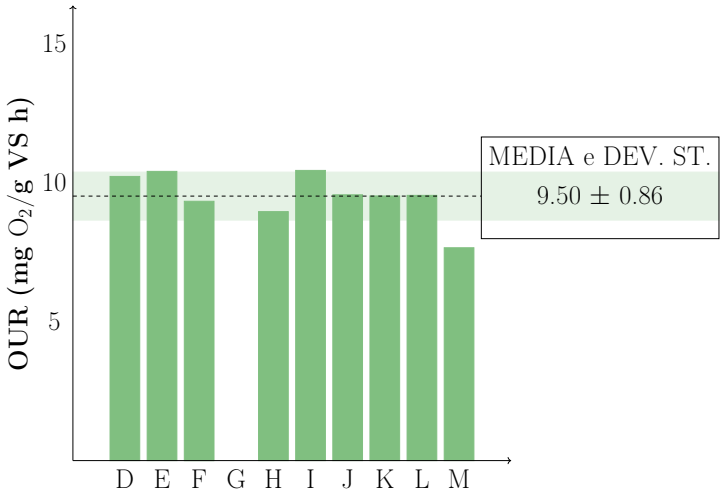


Figura 3.6. OUR sludge.

OUR pre-acclimation

Confrontando i valori di OUR presenti nei primi due grafici (OUR sludge e OUR pre-acclimation) è possibile notare che, in tutti i test, vi sia stato un netto calo. Tale diminuzione è dovuta al fatto che, molto probabilmente, all'interno del fango utilizzato per effettuare i test era ancora presente del materiale organico biodegradabile (sbCOD). Tali sostanze hanno portato, con molta probabilità, ad un maggiore consumo di ossigeno (contributo esogeno). Gli OUR determinati dopo un giorno dall'inizio dei test corrispondono agli OUR endogeni, ossia agli OUR in cui l'unico fattore che influenza il consumo di ossigeno è la respirazione dei microrganismi (contributo endogeno). Ne consegue che i valori degli "OUR pre-acclimation" sono gli OUR più bassi di ogni test (unica eccezione l'OUR determinato nel test H prima della fase di accumulo).

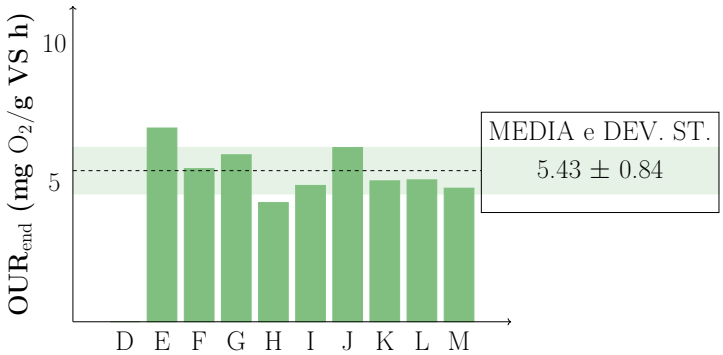


Figura 3.7. OUR pre-acclimation.

OUR acclimation

Nel grafico in figura 3.8 sono riportati solamente gli OUR dei test H, I e J dopo un giorno di acclimatazione. Questi test (ed il test C) si differenziano dagli altri test per avere dei cicli *feast-famine* di 12 ore (invece che 8h) ed una fase di acclimatazione della durata di 48 ore (al posto di 24h). I rapporti COD:N:P delle alimentazioni dei test H e J sono identici (100:5:1) mentre l'alimentazione del test I risulta avere una concentrazione di nutrienti inferiore (100:3:0.5). Nonostante i fanghi dei test H e J siano stati sottoposti, durante la fase di acclimatazione, alle stesse condizioni operative, la loro velocità di consumo l'ossigeno risulta differente. L'OUR del test H infatti risulta pari a 6.49 mg O_2 g VS^{-1} h^{-1}, contro i 9.73 mg O_2 g VS^{-1} h^{-1} determinati per il test J. Una possibile motivazione può essere che, durante il test H, la sonda per l'OD si sia ostruita parzialmente a causa del materiale particolato presente mezzo di reazione. Questa teoria si basa sul fatto che anche gli altri OUR determinati per il test H risultano essere evidentemente inferiori rispetto agli OUR determinati negli altri test. Gli OUR dei test I e J, nonostante la differenza legata al contenuto di nutrienti nell'alimentazione, risultano molto simili.

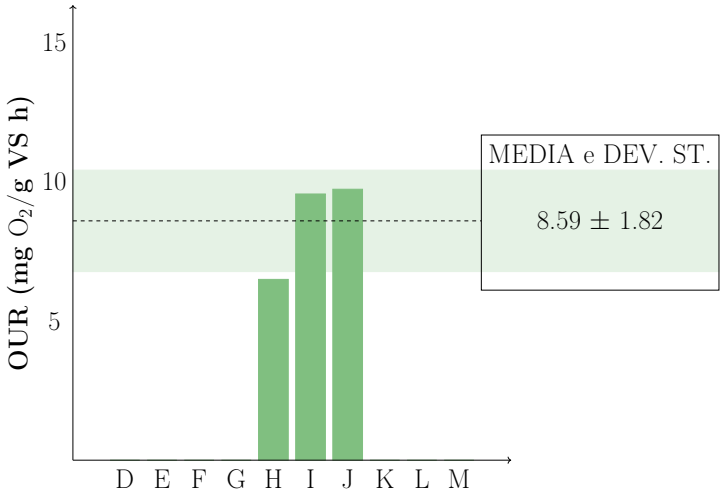


Figura 3.8. OUR acclimation.

OUR pre-accumulation

I test respirometrici effettuati prima dell'inizio della fase di accumulo evidenziano, a parte per i test H ed I, una buona attività del fango. Il basso valore riscontrato per il test H (il più basso tra tutti gli OUR determinati) è probabilmente dovuto ad un'ostruzione della sonda. Il basso OUR associato al test I è probabilmente dovuto alle basse concentrazioni di nutrienti ed ai lunghi periodi di *famine*, che hanno portato la biomassa a sperimentare condizioni molto stressanti.

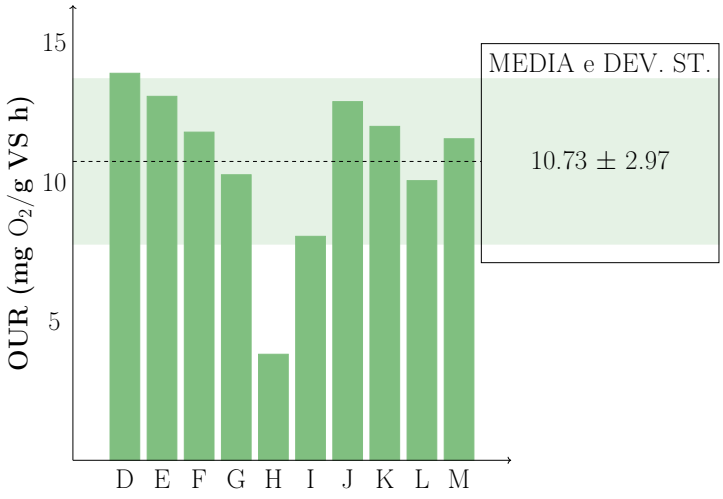


Figura 3.9. OUR pre-accumulation.

OUR accumulation A

Solo per i test D ed H le concentrazioni di OD erano tali da permettere di effettuare il test respirometrico al termine del primo ciclo di *feast*. Tenendo presente quanto detto in precedenza

per i risultati di OUR relativi al test H, risulta chiaro come la media e la deviazione standard riportate nel grafico in figura 3.10 non siano informative.

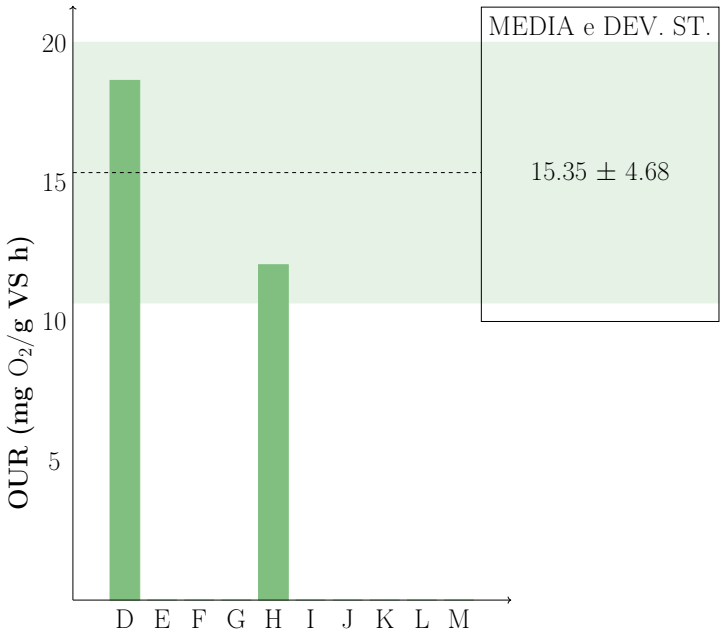


Figura 3.10. OUR accumulation A.

OUR accumulation B

Al termine del secondo ciclo di *feast* il numero dei test in cui la concentrazione di OD permette di effettuare la prova respirometrica passa da 2 a 5. Questo dato suggerisce un possibile adattamento della biomassa al nuovo regime di alimentazione imposto. Fatta eccezione per l'OUR del test H, tutti gli OUR superano i 10 mg O_2 g VS^{-1} h^{-1}, dimostrando quindi un'elevata attività dei fanghi attivi. Tra gli OUR determinati nel grafico in figura 3.11 risulta presente quello associato al test L. Il fango del test L è stato soggetto alle medesime condizioni operative del test G, con l'unica differenza di essere stato sottoposto, durante la fase di accumulo, ad un alimentazione contenente NaCl (10 g/L). L'alto valore di OUR sembrerebbe indicare come la salinità influisca positivamente sull'attività del fango attivo. Dato il basso numero di campioni e considerando il fatto che sicuramente uno dei valori riportati è soggetto ad un errore, la media e la deviazione standard calcolate non risultano molto informative.

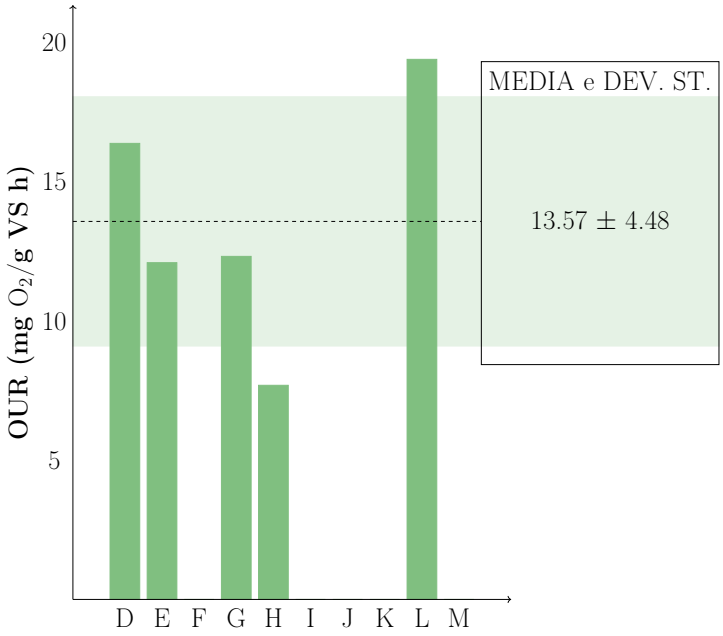


Figura 3.11. OUR accumulation B.

OUR accumulation C

Nel grafico in figura 3.12 sono riportati gli OUR dei test G, H ed L al termine delle rispettive prove. È possibile notare come questi siano gli stessi test in cui era stato possibile determinare OUR al termine del secondo ciclo di *feast*. Non sono presenti gli OUR dei test D ed E (presenti invece nel grafico precedente), poiché in quei test la fase di accumulo prevista era solo di 6 ore. L'OUR del test L risulta essere nettamente il più alto tra tutti quelli determinati, pari a 33,00 O_2 g VS^{-1} h^{-1}. Tale valore sembrerebbe avvalorare quanto riportato in precedenza, ovvero che l'attività del fango risulterebbe essere influenzata positivamente, se sottoposta a basse concentrazioni saline (pochi g/L). L'OUR del test H risulta essere simile a quello determinato al termine del primo ciclo di *feast* e nettamente maggiore rispetto a quello determinato al termine del secondo ciclo di *feast*. Questo trend di valori di OUR del test H, con un calo al termine del secondo ciclo di *feast* è probabilmente dovuto all'interruzione di corrente verificatasi durante quello specifico intervallo di tempo. L'OUR del test G, passa da 12.32 O_2 g VS^{-1} h^{-1} (relativo al termine del secondo ciclo di *feast*) a 8.34 O_2 g VS^{-1} h^{-1}. Anche in questo caso la media e la deviazione standard riportati non risultano essere informativi. Le medie degli OUR durante la fase di accumulo ("OUR accumulation A", "OUR accumulation B" e "OUR accumulation C") però, se confrontate con le medie degli OUR determinati negli altri periodi di tempo, evidenziano come, nella maggior parte dei casi, i valori di OUR tendano ad aumentare durante la fase di accumulo.

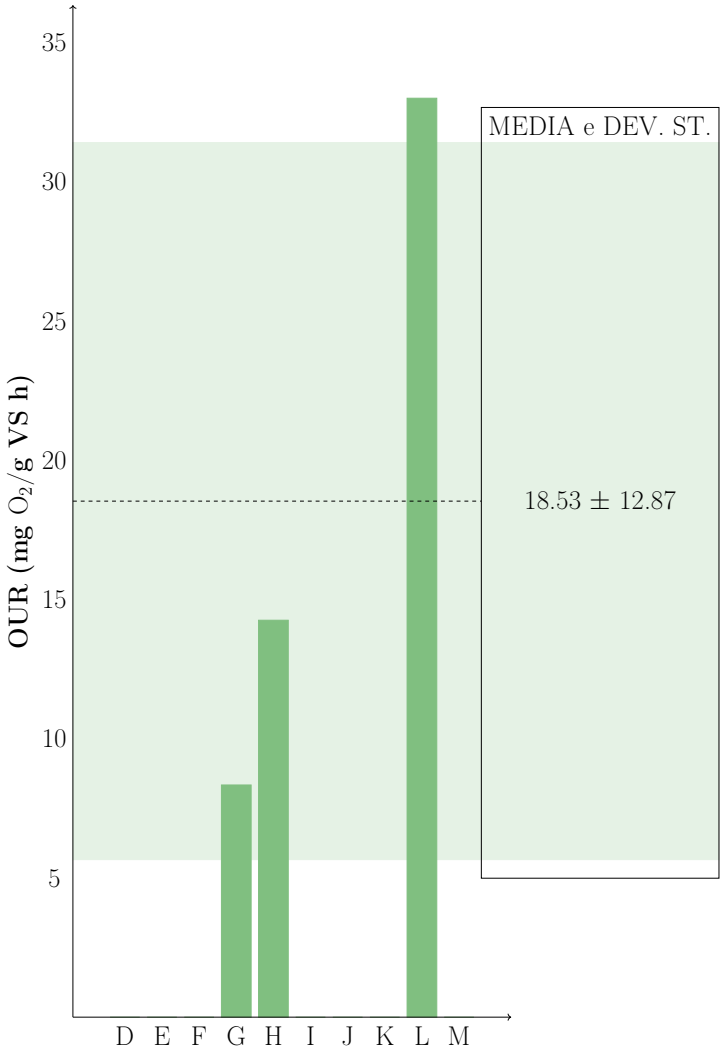


Figura 3.12. OUR accumulation C.

Nel grafico in figura 3.13 è possibile osservare tutti gli OUR determinati per ogni test e suddivisi per periodi di tempo. Da notare come, per i test F, I, J e K, non sia mai stato possibile determinare un OUR durante la fase di accumulo.

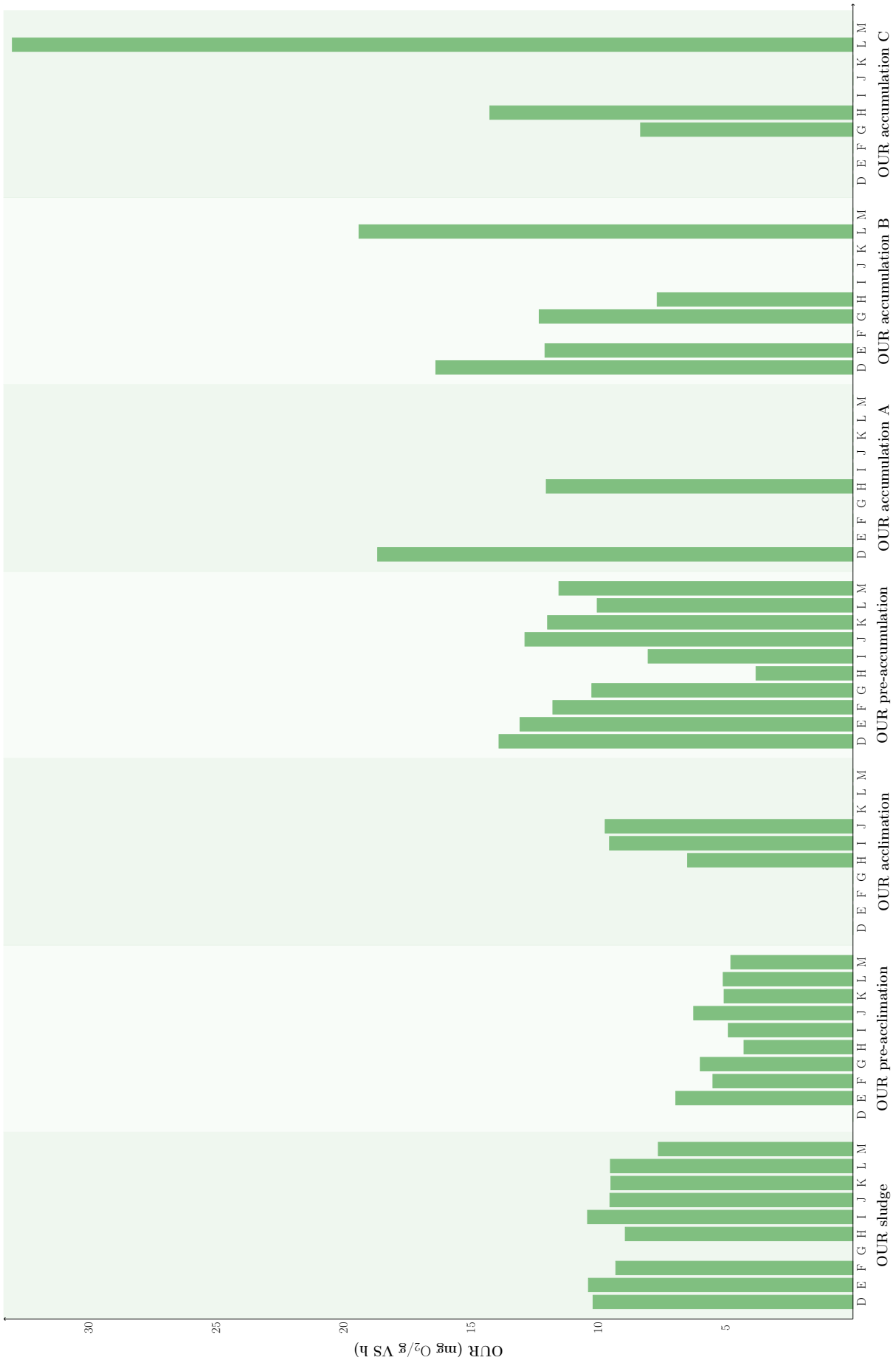


Figura 3.13. OUR per ogni test.

3.5 Composti solubili

Durante lo svolgimento dei test, il contenuto di azoto ammoniacale e di VFA presenti nel mezzo di reazione è stato determinato in diversi periodi di tempo. Nello specifico:

- dopo 1 giorno dall'inizio del test, prima dell'inizio della fase di acclimatazione (pre-acclimation);
- dopo 1 giorno dall'inizio della fase di acclimatazione, nei test aventi due giorni di acclimatazione (acclimation);
- dopo 1/2 giorno/i dall'inizio della fase di acclimatazione, prima della fase di accumulo (pre-accumulation);
- dopo 2 ore dall'inizio della fase di accumulo (accumulation A);
- dopo 5 ore dall'inizio della fase di accumulo, ovvero dopo 2 ore dall'inizio del secondo ciclo di *feast* (accumulation B);
- dopo 24 ore dall'inizio della fase di accumulo (accumulation C).

3.5.1 Azoto ammoniacale

La tabella 3.2 riporta le concentrazioni di azoto ammoniacale dei vari test. I simboli "-" e "x" stanno ad indicare rispettivamente un campionamento non previsto ed un campionamento non effettuato. Tutti i valori di concentrazione di azoto ammoniacale inferiori a 1 mg L^{-1} sono indicati con il simbolo "<1". Questa scelta è stata adottata poiché la retta di calibrazione utilizzata per l'analisi è stata costruita con soluzioni standard aventi concentrazioni comprese tra 1 e 1000 mg L^{-1}. Al di sotto di questa soglia (in riferimento a 1 mg L^{-1}), la precisione e l'affidabilità del risultato non sono garantite, rendendo i dati non significativi ai fini analitici. Oltre ai dati riportati nella tabella, per verificare le concentrazioni di azoto ammoniacale iniziali, presenti nei fanghi, sono state effettuate due misure anche del fango attivo (diluito) all'inizio dei test L ed M. I valori di concentrazione ottenuti, rispettivamente per i test L ed M sono stati 5.8 mg NH_3 L^{-1} e 4.5 mg NH_3 L^{-1}. Tali risultati suggeriscono che al tempo zero la concentrazione di NH_3 presente nei fanghi sia stata molto bassa ma comunque non trascurabile. La fase di pre-areazione garantisce il raggiungimento di concentrazioni di azoto trascurabili. Infatti, dopo un giorno di aerazione, in tutti i test la concentrazione di azoto ammoniacale iniziale è inferiore a 1 mg L^{-1}. Com'è possibile osservare dalla tabella, i primi valori di concentrazione significativi si hanno in corrispondenza dei campioni presi al termine della fase di acclimatazione. Le concentrazioni riportate sono molto variabili e di difficile interpretazione. In linea generale è possibile

affermare che, durante la fase di acclimatazione, la concentrazione dei nutrienti non dovrebbe essere limitante, ma lo dovrebbe invece essere durante la fase di accumulo. È possibile notare come in tutti i test la concentrazione di NH_3 tenda a diminuire durante la fase di accumulo. È probabile che la biomassa, trovandosi in condizioni di *permanent feast* durante la fase di accumulo, abbia consumato l'azoto presente per la produzione di biomassa. In ogni caso la crescita della biomassa durante la fase di accumulo è stata comunque limitata in quanto le alimentazioni della fase di accumulo sono state appositamente preparate con un contenuto di azoto limitante o addirittura nullo (per i test J e K). Difficilmente la diminuzione della concentrazione di azoto avvenuta durante la fase di accumulo può essere attribuita al processo di nitrificazione. Il motivo principale risiede nel fatto che il processo di nitrificazione per avvenire necessita dell'ossigeno come co-substrato. Poiché nelle fasi di accumulo dei vari test le concentrazioni di ossigeno si sono mantenute quasi sempre sotto 1 mg O_2 L^{-1} il processo di nitrificazione risulta fortemente inibito. L'unico test in cui si verifica un andamento opposto nella concentrazione dell'azoto ammoniacale è il test M. In questo test infatti la composizione dell'alimentazione tra la fase di acclimatazione e la fase di accumulo, in termini di contenuto di nutrienti, non cambia. La concentrazione finale di NH_3 nel test M è molto elevata. L'utilizzo di tutto quell'azoto nell'alimentazione, oltre ad essere svantaggioso, poiché favorisce lo sviluppo della biomassa anziché la produzione di PHA, rappresenta anche un costo aggiuntivo e un problema al termine del processo. L'acqua in uscita dal bio-reattore al termine del processo di fatto risulterebbe ricca in nutrienti e quindi necessitante di un trattamento più importante/prolungato.

Tabella 3.2. Concentrazioni di NH_3 per ogni test.

TEST									
E	F	G	H	I	J	K	L	M	**NH_3** (mg/L)
<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	NH_3 pre-acclimation
-	-	-	<1	x	<1	-	-	-	NH_3 acclimation
<1	<1	96.3	45.0	22.0	134.8	12.0	<1	2.3	NH_3 pre-accumulation
-	<1	94.4	13.2	4.2	112.7	<1	<1	68.1	NH_3 accumulation A
<1	<1	<1	<1	<1	18.7	<1	<1	127.1	NH_3 accumulation B
-	<1	<1	<1	<1	8.6	<1	<1	574.5	NH_3 accumulation C

3.5.2 VFA

Le tabelle 3.3 e 3.4 riportano rispettivamente le concentrazioni di acido acetico e acido propionico, espresse in mg COD L^{-1}, presenti nei vari test. In entrambe le tabelle è possibile notare che dopo 1 giorno dall'inizio del test, prima dell'inizio della fase di acclimatazione, le concen-

trazioni dei due acidi erano estremamente basse (non significative) o nulle. Per i test H e J, in cui è stato prelevato un campione aggiuntivo durante la fase di acclimatazione, è possibile notare un leggero aumento nella concentrazione di acido acetico. Prima dell'inizio della fase di accumulo in tutti i test viene rilevata la presenza di acido acetico, mentre non viene rilevata la presenza di acido propionico, in quanto presente in minor quantità rispetto all'acido acetico e, di conseguenza, totalmente consumato. Le concentrazioni di acido acetico prima della fase di accumulo (pre-accumulation), risultavano molto variabili, da un minimo di 15.3 mg COD L^{-1} ad un massimo di 413.5 mg COD L^{-1}. A seguire le concentrazioni di acido acetico, misurate a 2 ore dall'inizio della fase di accumulo, mostravano tutte un aumento rispetto al valore determinato in precedenza. Quello che cambia è l'entità di tale aumento. Mentre nei test F, G, ed H l'aumento di concentrazione è contenuto (non più di tre volte rispetto alle concentrazioni determinate in precedenza) nei test I, J e K tale aumento è piuttosto elevato (più di 20 volte rispetto alle concentrazioni determinate in precedenza). Da notare come questi test siano gli unici a presentare anche elevate concentrazioni di acido propionico. Un aumento così elevato è sicuramente dovuto ad una mancato consumo dei VFA alimentati (ogni ciclo vengono alimentati 2500 mg COD_{VFA}). Le motivazioni di questo mancato consumo potrebbero essere legate ad un eccesso di concentrazione di VFA (ben oltre i valori richiesti dalla biomassa per una crescita bilanciata) o a condizioni di limitazione dell'ossigeno disciolto, substrato necessario per la crescita della biomassa in condizioni aerobiche. Nei test I, J e K, infatti, non è stato possibile determinare nessun valore di OUR durante la fase di accumulo, a causa delle concentrazioni di OD troppo basse. Questi 3 test sono inoltre accomunati dal fatto di avere un basso contenuto di VS, inferiore rispetto ai test F, G ed H (vedi figura 3.1). Nei test L ed M si assiste invece ad un aumento delle concentrazioni intermedio tra i test F-H ed i test I-K. Il loro comportamento è probabilmente associato ad una nuova fonte di stress, ovvero l'aggiunta di NaCl nell'alimentazione della fase di accumulo. Dopo 5 ore dall'inizio della fase di accumulo, in quasi tutti i test si può osservare una diminuzione, più o meno marcata, delle concentrazioni di acido acetico. Gli unici test in cui questo non è avvenuto sono i test H, L ed M. L'aumento di concentrazione nel test H è probabilmente dovuto all'interruzione di corrente verificatasi durante quello specifico ciclo di *feast*. L'aumento di concentrazione di entrambi i VFA, nei test L ed M sembra essere associato alla presenza di NaCl. Il sale presente nell'alimentazione ha quindi agito come elemento di stress, rendendo più difficile l'assimilazione degli acidi. Le concentrazioni di acido acetico e propionico nei test I, J e K risultano elevate e altrettanto simili a quelle misurate in precedenza. Nell'ultima serie di campioni, le concentrazioni di acido acetico e propionico dei test I e K raggiungevano concentrazioni superiori a 10 g L^{-1} (tabella 3.5). È possibile che per questi test il quantitativo

dei VFA alimentati sia stato troppo elevato rispetto alla capacità metabolica della MMC. Nei test F-H le concentrazioni finali di acido acetico sono simili e sono tutti e 3 accomunati dall'assenza di acido propionico. Questi test, dove i VFA vengono velocemente consumati una volta riforniti, presentano un comportamento che suggerisce una buona risposta della biomassa alle condizioni operative imposte. I test L ed M, infine, presentano delle concentrazioni simili di acido acetico, ma differenti di acido propionico. Nel test M, caratterizzato da un'alimentazione in fase di accumulo ricca in nutrienti, l'acido propionico sembra essere stato quasi del tutto consumato. In questo caso il consumo dell'acido propionico, così come dell'acido acetico non può essere direttamente associato ad un accumulo di PHA. È probabile, infatti, che tali acidi siano stati utilizzati, in presenza di nutrienti, per la crescita della biomassa anziché per la produzione di PHA.

Tabella 3.3. Concentrazioni di A. acetico per ogni test.

TEST									
E	F	G	H	I	J	K	L	M	**HAc** (mg COD/L)
27	30	17	0	0	28	0	0	10	HAc pre-acclimation
-	-	-	61	x	65	-	-	-	HAc acclimation
32	230	414	47	89	88	20	15	85	HAc pre-accumulation
-	648	596	72	1830	1978	1887	203	541	HAc accumulation A
151	448	208	530	1712	1941	1755	632	765	HAc accumulation B
-	372	419	308	9064	141	9514	654	549	HAc accumulation C

Tabella 3.4. Concentrazioni di A. propionico per ogni test.

TEST									
E	F	G	H	I	J	K	L	M	**HPro** (mg COD/L)
0	0	0	0	0	0	0	0	0	HPro pre-acclimation
-	-	-	0	x	0	-	-	-	HPro acclimation
0	0	0	0	0	0	0	0	0	HPro pre-accumulation
-	99	0	0	476	578	563	107	41	HPro accumulation A
0	46	0	0	367	751	622	474	139	HPro accumulation B
-	0	0	0	1958	0	3795	385	37	HPro accumulation C

Tabella 3.5. Concentrazioni di VFA per ogni test.

TEST									
E	F	G	H	I	J	K	L	M	**VFA** (mg COD/L)
27	30	17	0	0	28	0	0	10	VFA pre-acclimation
-	-	-	61	x	65	-	-	-	VFA acclimation
32	230	413	47	89	88	20	15	85	VFA pre-accumulation
-	747	596	72	2306	2556	2451	310	581	VFA accumulation A
151	494	208	530	2079	2693	2377	1105	904	VFA accumulation B
-	372	419	308	11022	141	13309	1039	585	VFA accumulation C

3.6 Poliidrossialcanoati (PHA)

Le tabelle 3.6, 3.7 e 3.8 riportano rispettivamente le concentrazioni del 3-idrossi-butirrato (3-HB o HB), del 3-idrossivalerato (3-HV o HV) e del PHA complessivo (dato dalla somma dei due monomeri 3-HB e 3-HV), espresse in g L^{-1}, rappresentative dei diversi test. Il primo campionamento per l'analisi dei PHA in termine cronologico, è stato effettuato all'inizio del test. Questo per verificare se inizialmente nel fango ci fosse una seppur minima presenza di PHA intracellulare ad opera della coltura mista presente in linea acque (PHA sludge). Tra tutti, il campione associato al test E si differenziava dagli altri classificati come "accumulation B" per il fatto di essere stato campionato dopo 6 ore dall'inizio del test (anziché dopo 5 ore). Il fatto di aver campionato al termine del secondo ciclo di *feast*, invece di un ora prima della fine dello stesso, sembrava aver influenzato in modo non trascurabile il risultato. Infatti, se si considera il contenuto di PHB e PHA, tale campione risulta essere il migliore tra quelli analizzati associati a quel periodo di tempo. Nella tabella 3.6 è possibile notare come in quasi tutti i test il valore di concentrazione di HB maggiore è quello associato all'ultimo campione della fase di accumulo. Le uniche eccezioni sono rappresentate dai test F ed L. Nel test F la concentrazione maggiore è rappresentata dal campione preso prima dell'inizio della fase di accumulo. La biomassa presente nel test F non ha accumulato HB durante la fase di accumulo, ma al tempo stesso le concentrazioni rimanevano costanti e superiori a 0.06 g L^{-1}. Nel test L, la concentrazione maggiore di HB è stata raggiunta in corrispondenza del penultimo campionamento. Le concentrazioni di HB associate al test L sono tutte relativamente basse, sinonimo di una comunità microbica non particolarmente favorita nella produzione di tale polimero. Il campione che presentava il maggior contenuto di HB era quello relativo al test G, in cui la concentrazione risultava pari a 2.27 g L^{-1}. Le altre concentrazioni misurate per il test G, testimoniano un aumento graduale del contenuto di HB nella biomassa, avvenuto durante la fase di accumulo.

Tabella 3.6. Concentrazioni di 3-HB per ogni test.

TEST									
E	F	G	H	I	J	K	L	M	**3-HB** (g/L)
-	0.00	0.06	0.02	0.01	0.01	0.03	0.02	0.03	HB sludge
-	-	-	0.13	x	0.06	-	-	-	HB acclimation
-	1.08	0.10	0.00	0.10	0.03	0.05	0.15	0.32	HB pre-accumulation
-	0.97	0.49	0.07	0.13	0.14	0.08	0.09	0.32	HB accumulation A
1.15	0.69	0.77	0.08	0.19	0.21	0.10	0.17	0.27	HB accumulation B
-	0.83	2.27	1.27	0.35	0.39	1.26	0.15	0.41	HB accumulation C

Per quanto riguarda l'andamento di HV, i primi valori del test H, presenti nella tabella 3.7, presentavano un andamento in controtendenza rispetto a quanto visto nei test precedenti, in

quanto si era verificata una diminuzione da 0.12 g L^{-1} a 0.0 g L^{-1} prima dell'inizio della fase di accumulo (HV pre-accumulation). Da notare come il campione associato a questo periodo del test presenti un valore pari a zero anche per il 3-HB. I dati ottenuti dall'analisi del campione risultano presumibilmente errati, sulla base dell'andamento dei dati riscontrato nelle analisi precedenti e successive (possibile perdita di fase organica nella fase preparativa del campione). Gli andamenti delle concentrazioni di HV durante la fase di accumulo, determinati durante i vari test, risultano molto eterogenei e di difficile interpretazione; tale evidenza sperimentale è legata al fatto che l'acido propionico, precursore diretto nella via metabolica di sintesi di 3-HV, era presente in concentrazioni minori rispetto all'acido acetico e, pertanto, veniva consumato in tempi più brevi. La biomassa, pertanto, poteva essere soggetta per periodi più o meno prolungati alla sola presenza di acido acetico nel mezzo di crescita. Il test G risulta l'unico in cui si notava un andamento crescente delle concentrazioni di HV; tale andamento era probabilmente dovuto ad un dosaggio ottimale del substrato carbonioso durante la fase di accumulo. Identiche considerazioni possono essere fatte per il test K.

Tabella 3.7. Concentrazioni di 3-HV per ogni test.

TEST									
E	F	G	H	I	J	K	L	M	**3-HV** (g/L)
-	0.00	0.07	0.00	0.00	0.00	0.02	0.03	0.03	HV sludge
-	-	-	0.12	x	0.05	-	-	-	HV acclimation
-	0.28	0.05	0.00	0.08	0.04	0.06	0.20	0.25	HV pre-accumulation
-	0.29	0.21	0.08	0.11	0.15	0.11	0.13	0.25	HV accumulation A
0.17	0.14	0.29	0.06	0.11	0.15	0.08	0.23	0.20	HV accumulation B
-	0.07	0.30	0.37	0.10	0.23	0.46	0.10	0.18	HV accumulation C

I dati riportati nella tabella 3.8 rappresentano la somma dei valori presentati nelle due tabelle precedenti, fornendo una visione sintetica e complessiva dei risultati. Il test G si differenzia dagli altri test per il fatto di essere l'unico ad esibire una concentrazione iniziale di PHA (PHA sludge) pari a 0.12 g L^{-1}. Tale dato, almeno pari al doppio di quanto osservato negli altri test, potrebbe essere associato al tempo di campionamento della biomassa stessa all'interno dell'ispessitore. Tale attività di stoccaggio, tuttavia, viene stimolata nel corso del test stesso, fino ad ottenere un valore finale di 2.57 g L^{-1}. Questo dato non deve essere associato all'iniziale attività di stoccaggio presente nella biomassa ma anche alle modalità di conduzione della fase di acclimatazione e di accumulo. Rilevanti sono anche i valori finali di concentrazione di PHA ottenuti nei test H e K (1.64 e 1.72 g L^{-1}, rispettivamente), a testimonianza del fatto che, nonostante un basso valore di PHA iniziale, l'attività di stoccaggio può essere stimolata in funzione delle modalità di conduzione delle due fasi cruciali di acclimatazione e accumulo.

Tabella 3.8. Concentrazioni di PHA per ogni test.

TEST									
E	F	G	H	I	J	K	L	M	**PHA** (g/L)
-	0.00	0.12	0.02	0.01	0.01	0.05	0.05	0.06	PHA sludge
-	-	-	0.26	x	0.11	-	-	-	PHA acclimation
-	1.35	0.16	0.00	0.18	0.07	0.11	0.35	0.56	PHA pre-accumulation
-	1.26	0.70	0.15	0.23	0.29	0.19	0.22	0.57	PHA accumulation A
1.32	0.83	1.05	0.14	0.29	0.36	0.18	0.40	0.47	PHA accumulation B
-	0.90	2.57	1.64	0.45	0.62	1.72	0.25	0.60	PHA accumulation C

Se da un lato i test G, H e K esibivano valori più elevati di concentrazione finale di PHA, era necessario valutare la crescita eventuale di biomassa stessa (tramite i valori di VS) per determinare l'entità stessa della risposta di stoccaggio. Questo approccio consente di standardizzare i risultati e di minimizzare l'influenza di eventuali variazioni nella quantità di biomassa inizialmente presente nel fango. La tabella 3.9 riporta i rapporti tra le concentrazioni di PHA determinate per i diversi test e le loro relative concentrazioni di biomassa, espressi in termini percentuali. In questa tabella è possibile osservare chiaramente come in tutti i test si sia assisto ad un aumento del contenuto di PHA intracellulare. In alcuni test, tale aumento è stato più significativo rispetto agli altri, ovvero i test G, H e K, in cui il valore di contenuto finale di PHA nella biomassa era pari al 19.9%, 16.5% e 20.3% g PHA/g VS rispettivamente. Il test K, dal punto di vista di condizioni operative adottate, risultava molto simile rispetto al test G; nei due test, l'unico fattore che differiva in termini di condizioni operative risultava essere il contenuto di azoto e fosforo nell'alimentazione della fase di accumulo. I test L ed M, nonostante le condizioni operative delle fasi di pre-areazione e acclimatazione siano analoghe, mostrano dei risultati differenti, in termini di contenuto di PHA nella biomassa, durante la fase di accumulo. Confrontando i valori di contenuto di PHA di questi due test, prima della fase di accumulo e al termine di quest'ultima, è possibile osservare che nel test L tale valore diminuisce (passando da 4.2% a 3%) mentre nel test M il contenuto di PHA nella biomassa aumenta (da 6.3% a 6.7%). Tale cambiamento del contenuto di PHA intracellulare può essere associato ad una possibile crescita della biomassa durante la fase di accumulo del test M. In quella fase del test M i microrganismi presenti nel fango non hanno mai sperimentato condizioni limitanti per la crescita, come testimoniato dai risultati dell'analisi dell'azoto ammoniacale (vedi tabella 3.2, test M).

Tabella 3.9. Contenuto di PHA nella biomassa (g PHA/g VS) per i test E-M.

TEST									
E	F	G	H	I	J	K	L	M	**PHA intracellulare** (%)
-	0.0	1	0.2	0.2	0.1	0.6	0.6	0.7	PHA sludge
-	-	-	2.6	x	1.5	-	-	-	PHA acclimation
-	14.4	1.2	0.0	2.4	0.8	1.3	4.2	6.3	PHA pre-accumulation
-	13.4	5.4	1.5	3.0	3.8	2.3	2.7	6.4	PHA accumulation A
12.2	8.8	8.2	1.4	3.8	4.6	2.1	4.8	5.3	PHA accumulation B
-	9.6	19.9	16.5	5.8	8.0	20.3	3.0	6.7	PHA accumulation C

La tabella 3.10 riporta il contenuto di PHA nella biomassa, considerando però i VS finali della prova (solo per i test I-M in quanto era disponibile il dato di concentrazione finale di VS). Com'è possibile notare, poiché in tutti i test riportati le concentrazioni di VS sono incrementate (ad eccezione del test J), i rapporti PHA/VS risultano in lieve calo rispetto ai dati riportati in tabella 3.9, a testimonianza del fatto che, seppure limitata, era presente anche una risposta di crescita cellulare oltre che di stoccaggio di PHA.

Tabella 3.10. Contenuto di PHA nella biomassa finale (g PHA/g VS) per i test I-M.

TEST					
I	J	K	L	M	**PHA intracellulare** (%)
3.8	8.1	15.0	2.8	5.1	PHA accumulation C

L'istogramma in figura 3.14 ripropone quanto già descritto in figura 3.2 ma aggiungendo, sopra ai VS inziali, il contenuto dei PHA sviluppatosi durante il processo fermentativo. La conversione delle concentrazioni di PHA da g L^{-1} a g kg^{-1} è stata fatta considerando la densità del mezzo di reazione come uguale a quella dell'acqua (1 g/dm^3). Escludendo il test J, è possibile osservare come in tutti i test analizzati (I-M), il PHA sintetizzato durante il processo multi-stadio vada a colmare solo una parte dei VS misurati al termine del test. In ogni test è quindi apprezzabile una risposta di crescita della biomassa nonostante le condizioni di forte limitazione di N e P imposte nella sola fase di accumulo.

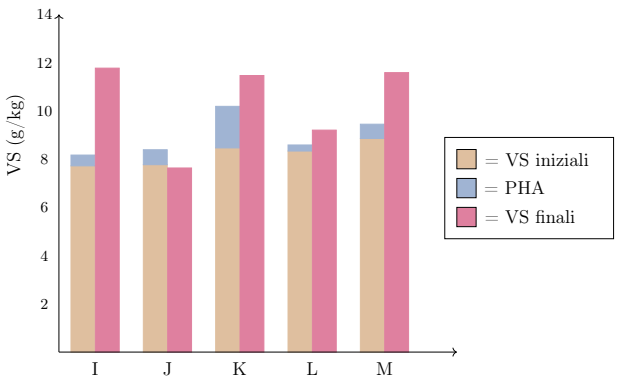


Figura 3.14. Concentrazioni dei VS nel fango attivo e PHA prodotto.

3.7 Test G: focus sulle performance di processo

Il test G è risultato quello in cui è stata riscontrata la più elevata concentrazione finale di PHA, pari a 2.57 g L^{-1}. Questo test si è distinto dagli altri già a partire dalla fase di pre-areazione. Infatti, le concentrazioni iniziali di TS e VS erano tra le più elevate di tutti i test condotti (pari a 17.06 g kg^{-1} e 12.91 g kg^{-1} rispettivamente), imputabili presumibilmente al periodo di campionamento dell'ispessitore statico della linea fanghi. Inoltre, non è stato possibile determinare l'OUR e il k_La durante le prime ore della sperimentazione a causa delle basse concentrazioni di ossigeno presenti nel bio-reattore (presumibilmente dovute alle sopra citate elevate concentrazioni di solidi). Nel grafico in figura 3.15 è possibile osservare gli andamenti di OD e pH durante le prime ore della fase di acclimatazione e durante le prime due alimentazioni (o cicli di *feast*) della fase di accumulo. Come in tutti i test, la concentrazione di OD, così come il pH, tende a diminuire in corrispondenza dell'aggiunta dell'alimentazione, a seguito quindi di una stimolazione metabolica imposta alla biomassa areata. Il pH minimo registrato era pari a 6.57, misurato dopo 15 minuti dall'inizio della fase di acclimatazione, corrispondente al termine dell'aggiunta del substrato carbonioso. Il pH tendeva poi ad incrementare a seguito dell'idrolisi basica precedentemente descritta, in funzione del progressivo consumo dei VFA (acetico e propionico). L'andamento dell'ossigeno risultava invece meno interpretabile, a causa presumibilmente di fenomeni di sporcamento della sonda (dato l'elevata concentrazione di solidi nel bio-reattore; > 10 g kg^{-1}); tuttavia, il netto calo inizialmente visualizzato è necessariamente imputabile al consumo dei VFA aggiunti (e quindi alla maggiore richiesta metabolica di O_2). Nella fase di accumulo, le diminuzioni del pH, concomitanti all'aggiunta di substrato erano di bassa intensità se confrontati con quanto avveniva in fase di acclimatazione; questa lieve flessione era meno marcata nel corso della seconda alimentazione (avvenuta attorno ai 200 minuti), in conseguenza del fatto che il sistema di reazione era piuttosto basificato in seguito al continuo consumo di VFA da parte della biomassa. Durante la fase di accumulo, le concentrazioni di OD presentavano un andamento ciclico, con un netto calo durante il dosaggio dell'alimentazione, un periodo di circa due ore in cui la concentrazione di OD rimaneva inferiore a 1 mg O_2 L^{-1}, presumibilmente a causa di una costante attività metabolica della biomassa aerobica. L'aumento dell'ossigeno durante la parte conclusiva dei due cicli di alimentazione può essere interpretato come un segnale che indicava il completo consumo dei VFA, e quindi una netta diminuzione della richiesta di ossigeno associato al contributo esogeno.

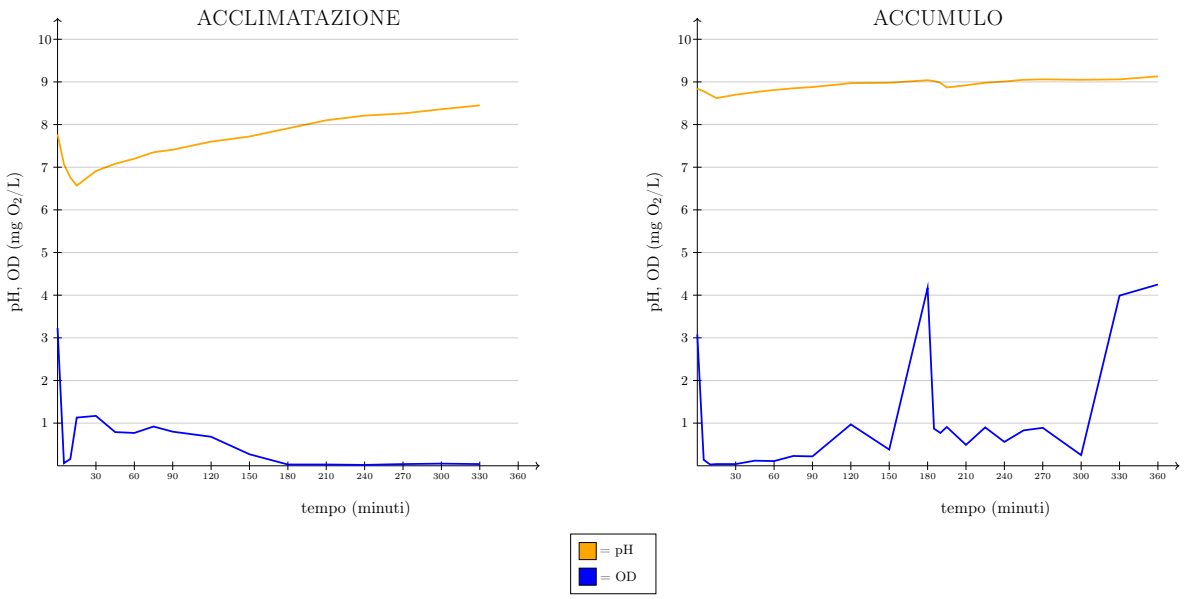


Figura 3.15. Andamento delle concentrazioni di pH ed OD del test G durante le fasi di acclimatazione (a sinistra) ed accumulo (a destra).

Nel grafico in figura 3.16 è possibile osservare l'andamento delle concentrazioni di PHA (3-HB e 3-HV) durante le varie fasi del test. Prima della fase di accumulo, le concentrazioni di PHA risultavano piuttosto basse, pari a 0.12 g PHA L^{-1} al termine della fase di pre-areazione e 0.16 g PHA L^{-1} al termine della fase di acclimatazione. Il valore ottenuto al termine della fase di pre-areazione può essere associato ad una leggera stimolazione della risposta di stoccaggio, favorita per semplice areazione e per l'aggiunta, dopo 6 ore, di 3 mL di alimentazione. La fase di acclimatazione, seppur non contribuendo alla sintesi continua di PHA (non era previsto un regime di *permanent feast*) era indispensabile per la stimolazione della risposta di stoccaggio della biomassa attraverso cicli *feast-famine* in eccesso di nutrienti (COD:N:P). La presenza non costante di carbonio non poteva quindi assicurare un accumulo intracellulare di PHA ma solo la stimolazione di quel corredo enzimatico (adattamento fisiologico) necessario per la sintesi di PHA nella fase successiva. Durante la fase di accumulo, infatti, è stato possibile osservare un graduale aumento del contenuto di PHA. I rapporti tra 3-HB e 3-HV evidenziavano esattamente la composizione del feedstock, maggiormente ricco in acetico piuttosto che in propionico. Quest'ultimo, essendo presente in quantità limitate per stimolare la composizione media di un refluo organico fermentato, era velocemente consumato dalla biomassa, la quale era pertanto soggetta a fasi prolungate in assenza di acido propionico. Tale considerazione potrebbe spiegare l'incremento quasi nullo di 3-HV nel corso della fase di accumulo; la concentrazione di 3-HV era infatti stabile intorno ad un valore di 0.3 g 3-HV L^{-1}. Per contro, la concentrazione finale di 3-HB era pari a 2.27 g 3-HB L^{-1}, incrementata di un fattore 22 rispetto al valore iniziale di 3-HB. In

questo test, il contenuto finale di PHA nella biomassa era pari a circa il 20% in peso. Tale valore non può essere ritenuto sostenibile in funzione di un utilizzo del PHA stoccato come precursore di bio-plastiche, in quanto i costi associati alla sua estrazione e purificazione sarebbero proibitivi. Tuttavia, nell'ambito della bioremediation di siti contaminati, è in studio un'applicazione di tali biomasse allo stato grezzo che permette di ovviare al problema dei costi di downstream.

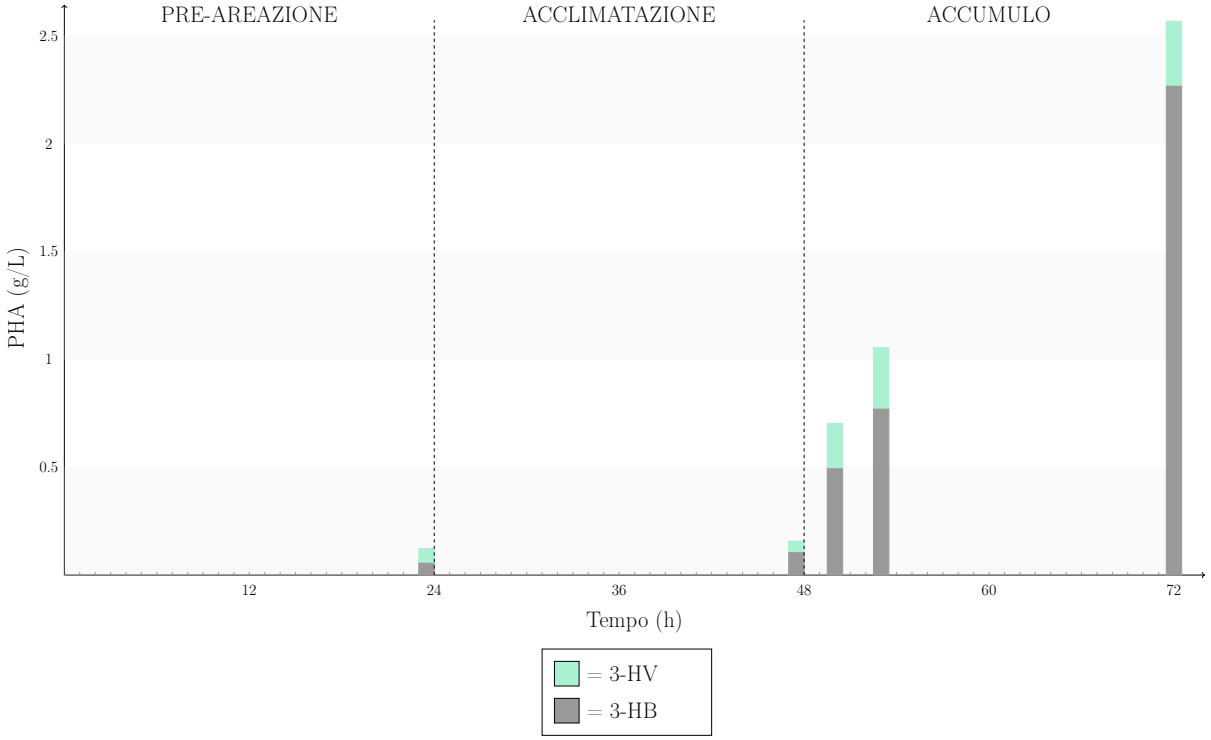


Figura 3.16. Andamento delle concentrazioni di 3-HB e 3-HV del test G.

Capitolo 4

Conclusioni

Nel presente lavoro di tesi è stato studiato il processo di produzione di PHA in fase di start-up, da MMC coltivate ad alta densità cellulare ed alimentate con substrati sintetici. I test condotti si sono concentrati principalmente sullo studio della fase di acclimatazione dei fanghi di depurazione ad elevate concentrazioni di VFA in condizioni *feast-famine*, e della successiva fase di accumulo intracellulare di PHA. Le condizioni operative e i parametri investigati erano: tempo della fase di acclimatazione e della fase di accumulo, numero di cicli *feast-famine* nella fase di acclimatazione, rapporto COD:N:P e livello di salinità (fino a 10 g L^{-1}). In tutti i test condotti è stato possibile riscontrare un aumento delle concentrazioni di PHA presenti nel mezzo di reazione. Da un punto di vista operativo, il test in cui è stata ottenuta la più elevata concentrazione di PHA (2.57 g PHA/L; test G) era caratterizzato da: fase di acclimatazione di 24 h (con 3 cicli *feast-famine*), alimentazione della fase di acclimatazione avente un rapporto COD:N:P pari a 100:5:1, alimentazione della fase di accumulo avente rapporto COD:N:P di 100:1:0.05 (senza aggiunta di NaCl). In termini di contenuto di PHA nella biomassa, tale valore era circa pari al 20% g PHA/ g VSS, risultato peraltro raggiunto in un test successivo (test K) condotto nelle stesse condizioni operative, ma con un rapporto COD:N:P dell'alimentazione della fase di accumulo pari a 100:0:0 (ovvero totale assenza di nutrienti). Tale condizione operativa aveva parzialmente limitato la produzione di PHA stessa, essendo pari a 1.72 g PHA L^{-1}. Pertanto, questi risultati suggeriscono che le condizioni di acclimatazione migliori per la selezione di biomassa PHA-produttrice sono quelle sperimentate in questi due test. Tuttavia, una maggior produzione di PHA è possibile in condizioni di limitazione di nutrienti (N e P) piuttosto che totale assenza. Le migliori condizioni per la fase di acclimatazione sono state replicate incrementando il livello di salinità nella successiva fase di accumulo (10 g L^{-1} NaCl; test L-M). I dati indicavano sostanzialmente un peggioramento della risposta di stoccaggio, con valori finali di PHA ben al di sotto di 1.0 g PHA L^{-1}; é tuttavia significativo considerare che l'incremento della salinità ha notevolmente

influenzato il metabolismo della biomassa aerobica, incrementando la sintesi di 3-HV (e quindi la composizione monomerica del PHA) su valori compresi nel range 30-40% g 3-HV/g PHA. In definitiva, lo studio condotto ha permesso di determinare le condizioni ideali per la produzione di biomassa con una certa capacità di accumulo di PHA, a partire da fanghi attivi. In particolare, è stato dimostrato come sia possibile incrementare il contenuto di PHA nella biomassa fino al 20% in peso, in condizioni di alta densità (fango ispessito). Tale performance potrebbe implicare l'uso di tale biomassa come cellule tal quali, senza il processo di separazione e purificazione di PHA, a seguito di stadi semplificati di downstream che prevedano solo una separazione tramite filtrazione o centrifugazione e successivo essiccamento. Tale materiale, infatti, potrebbe essere impiegato come additivo in barriere permeabili reattive nell'ambito della BRD, previa verifica della compatibilità ambientale data la possibile presenza di inquinanti, quali metalli pesanti o composti organici persistenti.

Ringraziamenti

Desidero esprimere la mia gratitudine a tutti coloro che mi hanno sostenuto nella realizzazione di questa tesi Ringrazio in particolare il mio relatore, il professore Valentino Francesco, per avermi offerto l'opportunità di condurre questa ricerca e di completare il mio percorso di studi. Un sentito ringraziamento va anche al mio tutor, il dottor Peña-Picola Sergi, per la sua guida e il suo supporto forniti nel corso dell'intero percorso di ricerca. Infine, un grazie di cuore a mia madre, per il suo incessante sostegno e incoraggiamento durante tutti questi anni di studio.

Bibliografia

Neda Amanat, Bruna Matturro, Marta Maria Rossi, Francesco Valentino, Marianna Villano, and Marco Petrangeli Papini. Assessment of long-term fermentability of pha-based materials from pure and mixed microbial cultures for potential environmental applications. *Water (Switzerland)*, 13(7), 2021. doi: 10.3390/w13070897. URL https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85103482382&doi=10.3390%2fw13070897&partnerID=40&md5=d0a8a541b051c10a82a8a98688437999. Cited by: 18; All Open Access, Gold Open Access, Green Open Access.

Neda Amanat, Bruna Matturro, Marianna Villano, Laura Lorini, Marta Maria Rossi, Marco Zeppilli, Simona Rossetti, and Marco Petrangeli Papini. Enhancing the biological reductive dechlorination of trichloroethylene with pha from mixed microbial cultures (mmc). *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(2), 2022. doi: 10.1016/j.jece.2021.107047. URL https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85123004075&doi=10.1016%2fj.jece.2021.107047&partnerID=40&md5=5c8af5f6d8833753c6e4c5ab3eafcc32. Cited by: 20; All Open Access, Hybrid Gold Open Access.

Ahmad K. Badawi and Raouf Hassan. Optimizing sludge extract reuse from physico-chemical processes for zero-waste discharge: A critical review. *Desalination and Water Treatment*, 319, 2024. doi: 10.1016/j.dwt.2024.100527. URL https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85196002624&doi=10.1016%2fj.dwt.2024.100527&partnerID=40&md5=be7cf0d151eb52c87323f75abac22e04. Cited by: 4; All Open Access, Hybrid Gold Open Access.

Federico Battista, Nicola Frison, Paolo Pavan, Cristina Cavinato, Marco Gottardo, Francesco Fatone, Anna L Eusebi, Mauro Majone, Marco Zeppilli, Francesco Valentino, Debora Fino, Tonia Tommasi, and David Bolzonella. Food wastes and sewage sludge as feedstock for an urban biorefinery producing biofuels and added-value bioproducts. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 95(2):328 – 338, 2020. doi: 10.1002/jctb.6096. URL https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85068153694&doi=

10.1002%2fjctb.6096&partnerID=40&md5=120193a2cac66d3b15a205f08443ba8e. Cited by: 94.

G. Braunegg, B. Sonnleitner, and R.M. Lafferty. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly--hydroxybutyric acid in microbial biomass. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 6(1):29 – 37, 1978. doi: 10.1007/BF00500854. URL https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0018122036&doi=10.1007%2fBF00500854&partnerID=40&md5=963aeb7976f2812afa4dae70b0011de0. Cited by: 1071.

Guo-Qiang Chen and Qiong Wu. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials*, 26(33):6565 – 6578, 2005. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.04.036. URL https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-22544467008&doi=10.1016%2fj.biomaterials.2005.04.036&partnerID=40&md5=1f90e084c09f2aafcc9b81fa66a24b33. Cited by: 1315.

Maria Cristina Collivignarelli, Alessandro Abbà, Andrea Frattarola, Marco Carnevale Miino, Sergio Padovani, Ioannis Katsoyiannis, and Vincenzo Torretta. Legislation for the reuse of biosolids on agricultural land in europe: Overview. *Sustainability (Switzerland)*, 11(21), 2019. doi: 10.3390/su11216015. URL https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85074862918&doi=10.3390%2fsu11216015&partnerID=40&md5=2be38a0076e8fb27541097536a20411b. Cited by: 215; All Open Access, Gold Open Access.

Simona Crognale, Barbara Tonanzi, Francesco Valentino, M. Majone, and Simona Rossetti. Microbiome dynamics and phac synthase genes selected in a pilot plant producing polyhydroxyalkanoate from the organic fraction of urban waste. *Science of the Total Environment*, 689:765 – 773, 2019. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.06.491. URL https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85068254956&doi=10.1016%2fj.scitotenv.2019.06.491&partnerID=40&md5=79dc3e035ac32072654d50a3b415bdc1. Cited by: 28; All Open Access, Green Open Access.

Laura De Donno Novelli, Sarah Moreno Sayavedra, and Eldon R. Rene. Polyhydroxyalkanoate (pha) production via resource recovery from industrial waste streams: A review of techniques and perspectives. *Bioresource Technology*, 331, 2021. doi: 10.1016/j.biortech.2021.124985. URL https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85103629664&doi=10.1016%2fj.biortech.2021.124985&partnerID=40&md5=c75dc893450a46fcf04a914d03c459d2. Cited by: 116.

Małgorzata Kacprzak, Ewa Neczaj, Krzysztof Fijałkowski, Anna Grobelak, Anna Grosser, Małgorzata Worwag, Agnieszka Rorat, Helge Brattebo, Åsgeir Almås, and Bal Ram Singh. Sewage sludge disposal strategies for sustainable development. *Environmental Research*, 156:39 – 46, 2017. doi: 10.1016/j.envres.2017.03.010. URL https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85015041202&doi=10.1016%2fj.envres.2017.03.010&partnerID=40&md5=8a2f8377b9c0617e3dce91357eaacddb. Cited by: 611.

Alexandros Kalampokidis, Eleftheria Klontza, Stergios Vakalis, Vincenzo Naddeo, and Demetris F. Lekkas. Is it possible to produce polyhydroxyalkanoate (pha) bioplastics of consistent composition from organic wastes? a review. *Circular Economy and Sustainability*, 4(4):2775 – 2797, 2024. doi: 10.1007/s43615-024-00452-9. URL https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85206677999&doi=10.1007%2fs43615-024-00452-9&partnerID=40&md5=1cd37e45ff930f9acb07dd6dd8b2456d. Cited by: 0.

Vrunda Katagi, Ramachandra Murty Vytla, and Divyashree Somashekara. Integrated production of microbial biopolymer (pha) with other value-added bioproducts: an innovative approach for sustainable production. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 17(1), 2024. doi: 10.1080/17518253.2023.2289983. URL https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85182658053&doi=10.1080%2f17518253.2023.2289983&partnerID=40&md5=463d1f0b6171cc608fe449e60dcf7d0d. Cited by: 1; All Open Access, Gold Open Access.

T. Lienen, A. Kleyböcker, W. Verstraete, and H. Würdemann. Foam formation in a downstream digester of a cascade running full-scale biogas plant: Influence of fat, oil and grease addition and abundance of the filamentous bacterium microthrix parvicella. *Bioresource Technology*, 153:1 – 7, 2014. doi: 10.1016/j.biortech.2013.11.017. URL https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84890100575&doi=10.1016%2fj.biortech.2013.11.017&partnerID=40&md5=ef550ac5f6925e2f57f2519b27b16896. Cited by: 47; All Open Access, Green Open Access.

Laura Lorini, Gianluca Munarin, Gaia Salvatori, Sara Alfano, Paolo Pavan, Mauro Majone, and Francesco Valentino. Sewage sludge as carbon source for polyhydroxyalkanoates: a holistic approach at pilot scale level. *Journal of Cleaner Production*, 354, 2022. doi: 10.1016/j.jclepro.2022.131728. URL https://www.scopus.com/inward/record.uri?

eid=2-s2.0-85128403668&doi=10.1016%2fj.jclepro.2022.131728&partnerID=40&md5=3870392e1dc6b2c8c42dc959a35f6941. Cited by: 22; All Open Access, Green Open Access.

Giulia Moretto, Ivan Russo, David Bolzonella, Paolo Pavan, Mauro Majone, and Francesco Valentino. An urban biorefinery for food waste and biological sludge conversion into polyhydroxyalkanoates and biogas. *Water Research*, 170, 2020. doi: 10.1016/j.watres.2019.115371. URL https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85076030274&doi=10.1016%2fj.watres.2019.115371&partnerID=40&md5=e9e0555b671005167708352abf30c744. Cited by: 123; All Open Access, Green Open Access.

S. Peña-Picola, A. Serra-Toro, C. Da Silva, M. Peces, M. Jordán, J. Vila, M. Grifoll, F. Valentino, S. Astals, and J. Dosta. Acidogenic fermentation of biowaste coupled with nitrogen recovery using selective membranes to produce a vfa-rich liquid with a high c/n ratio. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 12(2), 2024. doi: 10.1016/j.jece.2024.112352. URL https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85187207794&doi=10.1016%2fj.jece.2024.112352&partnerID=40&md5=833c74222482c1f601dd5bb7d6d02dcb. Cited by: 3; All Open Access, Hybrid Gold Open Access.

N. Pinto, A. Carvalho, J. Pacheco, and E. Duarte. Study of different ratios of primary and waste activated sludges to enhance the methane yield. *Water and Environment Journal*, 30(3-4):203 – 210, 2016. doi: 10.1111/wej.12188. URL https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84994026516&doi=10.1111%2fwej.12188&partnerID=40&md5=2dd44167bf5d8b3cc8676c5a91a9bf64. Cited by: 27.

Lekan Taofeek Popoola, Theophilus Ogunwumi Olawale, and Lukumon Salami. A review on the fate and effects of contaminants in biosolids applied on land: Hazards and government regulatory policies. *Heliyon*, 9(10), 2023. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e19788. URL https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85172789477&doi=10.1016%2fj.heliyon.2023.e19788&partnerID=40&md5=a32e16c4df51dd2496195036bc92cf2d. Cited by: 10; All Open Access, Gold Open Access.

Cheng Sun, Liang Guo, Yongkang Zheng, Dan Yu, Chunji Jin, Yangguo Zhao, Zhiwen Yao, Mengchun Gao, and Zonglian She. The hydrolysis and reduction of mixing primary sludge and secondary sludge with thermophilic bacteria pretreatment. *Process Safety and Environmental Protection*, 156:288 – 294, 2021. doi: 10.1016/j.psep.2021.10.026. URL https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85118167060&doi=10.1016%2fj.psep.2021.10.026&partnerID=40&md5=4d2fdbb0ebbe12a7ffbeac280300bd87. Cited by: 12.

Pravesh Tamang and Regina Nogueira. Valorisation of waste cooking oil using mixed culture into short- and medium-chain length polyhydroxyalkanoates: Effect of concentration, temperature and ammonium. *Journal of Biotechnology*, 342:92 – 101, 2021. doi: 10.1016/j.jbiotec.2021.10.006. URL https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85118587424&doi=10.1016%2fj.jbiotec.2021.10.006&partnerID=40&md5=e32738ba4bda41d664ccdcbe114d3d56. Cited by: 11.

Alok Kumar Thakur, Meththika Vithanage, Diganta Bhusan Das, and Manish Kumar. A review on design, material selection, mechanism, and modelling of permeable reactive barrier for community-scale groundwater treatment. *Environmental Technology and Innovation*, 19, 2020. doi: 10.1016/j.eti.2020.100917. URL https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85086656113&doi=10.1016%2fj.eti.2020.100917&partnerID=40&md5=f0aa1ce88303c72fd0d2ef4d40c1735a. Cited by: 76.

Francesco Valentino, Fernando Morgan-Sagastume, Sabrina Campanari, Marianna Villano, Alan Werker, and Mauro Majone. Carbon recovery from wastewater through bioconversion into biodegradable polymers. *New Biotechnology*, 37:9 – 23, 2017. doi: 10.1016/j.nbt.2016.05.007. URL https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85006375490&doi=10.1016%2fj.nbt.2016.05.007&partnerID=40&md5=b485b3807f24cd6e29f3c01d18f3a0fe. Cited by: 196.

Francesco Valentino, Aditi Chitharanjan Parmar, Federico Micolucci, Joan Dosta, Paolo Pavan, and Marco Gottardo. Valuable routes for sewage sludge utilization: Effect of temperature and hydraulic retention time in the acidogenic fermentation process. *Chemical Engineering Transactions*, 93:193 – 198, 2022. doi: 10.3303/CET2293033. URL https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85134413252&doi=10.3303%2fCET2293033&partnerID=40&md5=5fe946fbe48711360dd0bc2f63e85e34. Cited by: 2.

Vijay K. Varghese, Bhagyashri J. Poddar, Maulin P. Shah, Hemant J. Purohit, and Anshuman A. Khardenavis. A comprehensive review on current status and future perspectives of microbial volatile fatty acids production as platform chemicals. *Science of the Total Environment*, 815, 2022. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.152500. URL https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85122620768&doi=10.1016%2fj.scitotenv.2021.152500&partnerID=40&md5=469117a2190e8620f2e41de6be858888. Cited by: 48.

Diogo Vicente, Diogo Neves Proença, and Paula V. Morais. The role of bacterial polyhydroalkanoate (pha) in a sustainable future: A review on the biological diversity. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20(4), 2023. doi: 10.3390/ijerph20042959. URL https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85148963811&doi=10.3390%2fijerph20042959&partnerID=40&md5=34497804b898bed2d4521f1305cf3cca. Cited by: 39; All Open Access, Gold Open Access.