



Università
Ca' Foscari
Venezia

Corso di Laurea Magistrale in
Scienze Ambientali

D.M. 270/2004

Tesi di Laurea

**Valorizzazione di rifiuti urbani tramite
processo combinato anaerobico aerobico
per la produzione di bio-polimeri
(polidrossialcanoati, PHA)**

Relatore

Prof. Paolo Pavan

Correlatori

Dott. Francesco Valentino

Dott.ssa Giulia Moretto

Laureando

Veronica Tisin

Matricola 834634

Anno Accademico

2018/2019

ABSTRACT

In questa tesi sperimentale viene presentato il lavoro di monitoraggio ed ottimizzazione del processo in scala pilota per il riutilizzo e la valorizzazione di *Frazione Organica dei Rifiuti Solidi Urbani* (FORSU) e fanghi di depurazione finalizzato alla produzione di bio-polimeri (poliidrossialcanoati, PHA), presso l'area sperimentale universitaria dell'impianto di depurazione e trattamento delle acque di Treviso.

Il processo di selezione della biomassa PHA accumulante è stato accuratamente monitorato, andando a caratterizzare la biomassa e ad esaminare i principali nutrienti coinvolti (C, N, P).

I campioni sono stati raccolti con una frequenza di due volte a settimana e sono stati analizzati presso il laboratorio dell'area sperimentale universitaria dell'impianto di Treviso, seguendo metodologie analitiche specifiche per acque reflue.

I dati raccolti sul campo sono stati elaborati al fine di ottenere un quadro generale del processo di selezione della biomassa aerobica, per andare ad identificare le condizioni operative ottimali del processo di produzione dei poliidrossialcanoati.

Sommario

ABSTRACT	
Indice delle Figure	II
Indice delle Tabelle	III
1. INTRODUZIONE	4
2. POLIIDROSSIALCANOATI.....	8
2.1 Struttura polimerica dei PHA	8
2.2 Percorsi biosintetici chiave per la produzione di PHA.....	9
2.3 Proprietà e applicazioni dei PHA	11
2.4 Produzione di PHA da MMCs	13
3. OBIETTIVI DELLA RICERCA	15
4. MATERIALI E METODI.....	15
4.1 Filiera di processo per la produzione di biopolimeri.....	15
4.1.1 Matrici trattate.....	16
4.1.2 Unità di fermentazione, reattori di selezione e accumulo della biomassa aerobica .	16
4.2 Metodi analitici	19
4.3 Elaborazione dei dati.....	20
5. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	22
5.1 Comportamento e prestazioni della biomassa in SBR1	22
5.2 Comportamento e prestazioni della biomassa nei test batch di accumulo.....	31
5.3 Rendimento complessivo di PHA e possibili prospettive future	36
6. CONCLUSIONI	38
7. BIBLIOGRAFIA.....	39

Indice delle Figure

<i>Figura 1- Unità monomerica del poliidrossialcanoato. R: catena laterale alchilica ($C_1 - C_{13}$); n: numero di CH_2 nella catena laterale; y: numero di unità ripetitive.</i>	<i>9</i>
<i>Figura 2- Percorsi di biosintesi di PHB e P(HB-HV).....</i>	<i>11</i>
<i>Figura 3- Rappresentazione schematica della piattaforma sperimentale in scala pilota.</i>	<i>16</i>
<i>Figura 4- Andamento del carico organico OLR nel reattore SBR1.</i>	<i>22</i>
<i>Figura 5- Andamento di TSS e VSS nel reattore SBR1.</i>	<i>23</i>
<i>Figura 6- Andamento della fase feast nel reattore SBR1.....</i>	<i>24</i>
<i>Figura 7- Andamento della concentrazione di PHA a fine feast e a fine ciclo nel reattore SBR1.....</i>	<i>25</i>
<i>Figura 8- Andamento della velocità specifica e del rendimento di stoccaggio del polimero nel reattore SBR1.....</i>	<i>26</i>
<i>Figura 9- Andamento del rendimento osservato nel reattore SBR1.</i>	<i>27</i>
<i>Figura 10- Andamento della percentuale di HV (g/g) nel copolimero alla fine della fase feast nel reattore SBR di selezione</i>	<i>28</i>
<i>Figura 11: Test batch di accumulo condotto con biomassa arricchita in SBR1 con F-III e acetato.....</i>	<i>31</i>
<i>Figura 12- Test batch di accumulo condotto con biomassa arricchita in SBR F-III e substrato reale (permeato da F-III).....</i>	<i>32</i>
<i>Figura 13: Diagramma dei flussi di massa della produzione di PHA da miscela di FORSU-fango.</i>	<i>36</i>

Indice delle Tabelle

<i>Tabella 1- Proprietà fisico-meccaniche di PHB, 3HB-co-3HV e PP.</i>	12
<i>Tabella 2- Potenziale di sostituibilità tecnica del PHA. (PVC: polivinilcloruro, PE-HD: polietilene ad alta densità, PE-LD: polietilene a bassa densità, P:= polistirene, PA: poliammide, PET: polietilentereftalato, PC: policarbonato, PUR: poliuretano reticolato.)</i>	13
<i>Tabella 3- Caratteristiche chimiche delle 3 miscele di fermentato (F-I, F-II, F-III) utilizzate per l'alimentazione del reattore SBR1.</i>	17
<i>Tabella 4- Parametri operativi del reattore SBR1.</i>	18
<i>Tabella 5- Valori medi e deviazioni standard dei principali parametri monitorati nel corso della marcia del reattore SBR1.</i>	29
<i>Tabella 6- Sintesi dei principali risultati ottenuti dai batch test di accumulo e confronto con studi precedenti incentrati sulla valorizzazione dei rifiuti alimentari.</i>	34

1. INTRODUZIONE

L'inquinamento ambientale legato alla dispersione di materie plastiche e le problematiche relative al loro smaltimento hanno comportato, negli ultimi anni, un aumento sempre più crescente della consapevolezza mondiale riguardo a tale tematica.

L'industria di questo materiale ha subito uno sviluppo notevole come nessun altro materiale nella storia dell'umanità; dall'era della pietra all'età del ferro, la nostra potrebbe essere ricordata come l'età della plastica.

Dagli anni '50 del secolo scorso sono stati prodotti in totale 8,3 miliardi di tonnellate di plastica, di cui 6,3 sono diventati rifiuti. Di questi, il 12% è stato destinato all'incenerimento, il 9% è stato riciclato, il 60% è finito nelle discariche o negli ambienti naturali (Gayer *et al.*, 2017). Nel 2017 la produzione globale di materie plastiche ha raggiunto 348 milioni di tonnellate, in Europa sono state prodotte 64,4 milioni di tonnellate, contribuendo all'economia europea con più di 350 miliardi di euro (PlasticsEurope, 2018). In contesti tipicamente urbani, ove è localizzata gran parte della popolazione, la gestione e lo smaltimento dei rifiuti si configurano come una delle principali problematiche. Nel 2016 in Europa sono state prodotte 246,6 milioni di tonnellate di rifiuti, mentre in Italia sono stati prodotti 30,1 Mt (ISPRA, 2018). In questi scenari, alcuni dei principali rifiuti prodotti sono i *Rifiuti Solidi Urbani* (RSU), che comprendono la *Frazione Organica dei Rifiuti Solidi Urbani* (FORSU) e i fanghi provenienti dal trattamento delle acque reflue. Solamente nel 2016 in Italia sono stati prodotti 6,1 milioni di tonnellate di frazione organica (umido e verde), e 3,2 milioni di tonnellate di fanghi di depurazione (ISPRA, 2018). In questi ultimi, la potenziale presenza di microinquinanti e sostanze fitotossiche hanno come conseguenza costi di gestione del rifiuto molto elevati: lo smaltimento in discarica costa da 70 a 150 €/t, l'uso diretto in agricoltura da 60 a 130 €/t ed il compostaggio da 95 a 125 €/t (Braguglia *et al.*, 2013).

Lo smaltimento in discarica dei rifiuti comporta in primo luogo impatti ambientali negativi, che possono interessare i diversi comparti ambientali: inquinamento atmosferico, con immissione di sostanze inquinanti nell'aria, propagazione di emissioni odorose sgradevoli e produzione di gas metano che può formare con l'aria miscele

esplosive; l'inquinamento idrico, con diffusione di sostanze tossiche e microrganismi patogeni nelle acque superficiali e nelle falde; inquinamento del suolo, con fuoriuscita del percolato e lisciviazione dei contaminanti nel suolo a causa delle infiltrazioni delle acque meteoriche (Cossu *et al.*, 2011).

Per tali motivi nell'ordine di priorità nella gestione dei rifiuti, il primo posto viene assegnato alla prevenzione, seguita dalla preparazione per il riutilizzo, riciclaggio, recupero di energia e come ultima soluzione lo smaltimento in discarica [COM(2015)].

L'Unione Europea ha recentemente fissato dei nuovi obiettivi più restrittivi per ridurre la produzione dei rifiuti e aumentarne in modo sostanziale il riciclaggio: entro il 2035 il riciclaggio dei rifiuti urbani dovrà raggiungere il 65% sul totale prodotto, mentre lo smaltimento in discarica dovrà essere al massimo il 10% [COM(2018)].

Per far fronte a tali problematiche, ci si sta indirizzando sempre più verso la ricerca di nuovi materiali, con una conseguente rapida espansione del mercato dei materiali ecosostenibili. In questo ambito si è sviluppata la produzione di bioplastiche, ossia l'insieme delle plastiche di origine rinnovabile e quelle biodegradabili¹. Le bioplastiche consentono di ridurre l'utilizzo delle risorse fossili diminuendo allo stesso tempo le emissioni durante l'intero ciclo di vita dei prodotti, la produzione di rifiuti e i conseguenti impatti ambientali per il loro trattamento e smaltimento. L'attenzione mondiale della ricerca sia accademica sia industriale si sta focalizzando sempre più su questi materiali, la capacità di produzione mondiale di bioplastiche passerà da circa 2,11 milioni di tonnellate nel 2018 a circa 2,62 milioni di tonnellate nel 2023 (European Bioplastics, 2018). Negli ultimi anni è stata riscontrata una crescita delle startup che lavorano ad alternative alla plastica tradizionale: la startup inglese Skipping Rocks Lab ha ideato Ooho, un'innovativa bottiglietta edibile a forma di goccia costituita da una doppia pellicola ottenuta dalle alghe marine, in grado di contenere qualsiasi liquido e di degradarsi in un ambiente naturale in circa 6 settimane. Anche la startup indonesiana Evoware nata nel 2016 produce pellicole, bicchieri e tazze biodegradabili e commestibili a partire dalle alghe, adottando come motto "eat your cup, save the world!".

¹ Un prodotto è definibile come biodegradabile o compostabile se conforme agli standard ASTM 6400 (USA), EN 13432 (European) o ISO 17088 (International). Lo standard EN stabilisce che almeno il 90% del materiale organico sia convertito in CO₂ entro 6 mesi.

Molte proposte tecnologiche innovative sono incentrate sul riutilizzo di scarti organici urbani attraverso la loro conversione in bioplastiche, trasformando il rifiuto in una risorsa utilizzabile e chiudendo così il ciclo di produzione in una logica di economia circolare. I progetti più innovativi inerenti a questo tema sono stati finanziati dall'Unione Europea tramite il Programma Quadro europeo per la Ricerca e l'Innovazione (HORIZON 2020). Fra questi vi è ad esempio il progetto Res Urbis (REsources from Urban Blo-waSte), finalizzato alla valorizzazione degli scarti organici urbani (FORSU, verde e fanghi di depurazione) tramite la loro trasformazione in biopolimeri (poliidrossialcanoati, PHA) per la produzione di plastiche ecocompatibili. I PHA sono poliesteri alifatici accumulati da specifici microrganismi sotto forma di corpi di inclusione intracellulari, chiamati granuli (Valera, 2001). La specie batterica maggiormente studiata per la produzione di PHA è *Cupriavidus necator*, conosciuto anche come *Wautersia eutropha*, *Ralstonia eutropha* o *Alcaligenes eutrophus* (Kunasundari e Sudesh, 2011). A livello industriale i PHA sono convenzionalmente prodotti impiegando colture pure di microrganismi selezionati, ma la commercializzazione e l'industrializzazione su larga scala ha ancora oggi delle difficoltà a causa del loro elevato costo di produzione (Reis *et al.*, 2003, Kourmentza *et al.*, 2017). L'attuale prezzo del PHA è circa di 2,2-5,0 €/Kg e non è ritenuto commercialmente competitivo se confrontato con il prezzo dei polimeri convenzionali che si attesta a meno di 1,0 €/Kg (Valentino *et al.*, 2017). L'elevato costo dei PHA derivanti da colture pure è dovuto sia al processo produttivo, che richiede condizioni sterili, infrastrutture adatte a sostenere un processo axenico e substrati ad elevata purezza come il glucosio, sia ai processi per la loro estrazione, che necessitano di elevate quantità di solventi e di manodopera (Valentino *et al.*, 2017, Kourmentza *et al.*, 2017). Un'interessante strategia alternativa mirata a minimizzare i costi di produzione del polimero consiste nell'utilizzare colture miste (*mixed microbial cultures*, MMCs) e substrati rinnovabili, come scarti organici e fanghi. Le colture miste non richiedono condizioni sterili e, riuscendo ad adattarsi ai continui cambiamenti nel substrato, possono utilizzare anche matrici complesse per le loro funzioni metaboliche (Reis *et al.*, 2003). I substrati puri possono incidere fino al 50% sul costo totale di produzione del polimero (Koller *et al.*, 2017), mentre l'utilizzo di fonti di carbonio a basso costo e rinnovabili, come i rifiuti organici, implica un duplice vantaggio: da un lato la riduzione

dei costi di produzione, dall'altro il miglioramento della gestione dei rifiuti (Akaraonye *et al.*, 2010). L'impiego di un rifiuto come substrato di partenza comporta la diminuzione di una voce di spesa consistente per il suo smaltimento, andando inoltre a valorizzare il rifiuto stesso come risorsa.

2. POLIIDROSSIALCANOATI

I PHA rappresentano un importante gruppo di biopolimeri di origine microbica, notati per la prima volta all'interno di cellule batteriche nel 1888 dal microbiologo Martinus Willen Beijerinck. La determinazione della loro composizione vi fu solamente nel 1925, quando il batteriologo Maurice Lemoigne identificò che il materiale sconosciuto prodotto dal *Bacillus Megaterium* era un omopolimero di idrossiacido, il poli-3-idrossibutirrato, P(3HB) (Chodak, 2008).

Alla fine degli anni '50 il P(3HB) fu individuato in molti altri ceppi batterici, mentre nel 1974 Wallen e Rohwedder lavorarono all'identificazione di idrossialcanoati (HA) diversi da 3HB: tra le unità HA che riconobbero vi furono il 3-idrossivalerato (3HV) e il 3-idrossiesanoato (3HHx) (Sudesh *et al.*, 2000). Questi risultati suscitarono un interesse commerciale, grazie alla possibilità di creare copoliesteri con varie proprietà meccaniche e chimiche incorporando monomeri differenti.

Verso la fine degli anni '70 iniziò la prima produzione industriale del copolimero P(3HB-co-3HV), ma a causa del basso costo del petrolio la domanda di plastiche biodegradabili rimase irrisoria. Ad oggi si conoscono più di 150 unità monomeriche che possono offrire un'ampia gamma di proprietà polimeriche, simili a quelle delle plastiche derivate dalla petrolchimica, come il polipropilene (PP) e il polietilene (PE) (Pederson *et al.*, 2006).

2.1 Struttura polimerica dei PHA

I PHA sono poliesteri prodotti da più di 250 specie di batteri Gram positivi e Gram negativi, che li sintetizzano come riserva di carbonio e di energia. Vengono immagazzinati nel citoplasma sotto forma di granuli, fino ad una concentrazione che può raggiungere il 90% del peso secco della massa batterica (Reddy *et al.*, 2003). I granuli hanno diametro di 0,2 – 0,7 mm di diametro e sono circondati da uno strato di membrana costituito da lipidi e proteine (Scott, 2013). I polimeri stoccati hanno un alto peso molecolare che può variare da 200.000 a 3.000.000 Dalton a seconda del tipo di microrganismo, della fonte di carbonio disponibile e delle condizioni di crescita (Sudesh *et al.*, 2000, Zinn, 2003).

La struttura generale dei PHA è mostrata in figura 1. Il numero delle unità monomeriche ripetitive può variare da 100 a 30.000.

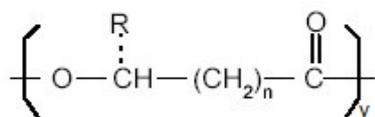


Figura 1- Unità monomerica del poliidrossialcanoato. R: catena laterale alchilica (C₁ – C₁₃); n: numero di CH₂ nella catena laterale; y: numero di unità ripetitive.

I PHA vengono suddivisi in tre diversi gruppi, sulla base del numero di atomi di carbonio presenti all'interno delle singole unità monomeriche (Zinn 2003, Keshavarz e Roy, 2010):

- I) PHA a catena corta (short-chain-length, SCL-PHA): 3-5 atomi di C
- II) PHA a catena media (medium-chain-length, MCL-PHA): 6-14 atomi di C
- III) PHA a catena lunga (long-chain-length, LCL-PHA): più di 14 atomi di C.

La lunghezza e la struttura delle unità monomeriche incorporate nelle catene polimeriche possono influenzare notevolmente le proprietà fisiche dei PHA, dando origine a omopolimeri o copolimeri. I polimeri composti esclusivamente da unità monomeriche SCL hanno generalmente proprietà termoplastiche, mentre quelli costituiti da MCL presentano proprietà elastomeriche. La composizione monomerica del polimero dipende da diversi fattori, come il ceppo microbico, la composizione del mezzo di coltura, i metodi di stoccaggio e immagazzinamento del polimero e i parametri di processo durante la biosintesi (Lu *et al.*, 2009, Keshavarz e Roy, 2010).

2.2 Percorsi biosintetici chiave per la produzione di PHA

I PHA sono prodotti attraverso una serie di reazioni enzimatiche. Il loro stoccaggio sotto forma di granuli di riserva si verifica quando le cellule microbiche non sono in grado di crescere alla stessa velocità con cui assorbono il substrato carbonioso. Questa condizione può verificarsi a causa di una limitazione esterna, come la mancanza di azoto, fosforo, ossigeno, oppure da una limitazione interna dei livelli di enzimi di crescita.

La maggior parte dei batteri PHA accumulanti utilizzano la via di Enter-Doudoroff per la degradazione catabolica dei carboidrati, che porta alla produzione di piruvato, energia (adenosintrifosfato, ATP) e riduzione degli equivalenti (nicotinammide adenina dinucleotide, NADH). In condizioni di crescita non limitanti, due molecole di acido piruvico vengono convertite in acetil-coenzima A (acetil-CoA) per decarbossilazione ossidativa e entrano nel ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA). In condizioni di crescita limitanti, l'acetil-CoA può essere convertito e immagazzinato sotto forma di PHA. Per esempio, se la sintesi proteica rallenta a causa della mancanza di una fonte esterna di azoto, NADH si accumulerebbe nella cellula, inibendo gli enzimi del ciclo TCA e indirizzando così l'acetil-CoA alla sintesi di PHA (Reis *et al.*, 2011).

La sintesi del PHB (fig. 3) avviene mediante l'azione di tre enzimi specifici: 3-chetotiolasi (PhaA), acetoacetil-CoA reduttasi (PhaB) e poli-3-idrossibutirrato polimerasi (PhaC). Due molecole di acetil-CoA vengono condensate dall'enzima PhaA per formare acetoacetil-CoA. Nella seconda reazione l'enzima PhaB NADPH-dipendente catalizza la riduzione dell'acetoacetil-CoA all'isomero R del 3-idrossibutirril-CoA, successivamente polimerizzato in PHB dall'enzima PhaC polimerasi. (Verlinden *et al.*, 2007).

In figura 2 è illustrato il percorso per la biosintesi del copolimero 3HB-co-3HV, che avviene con l'aggiunta di acido propionico o di acido valerianico al terreno di coltura contenente glucosio (Ojumu *et al.*, 2004).

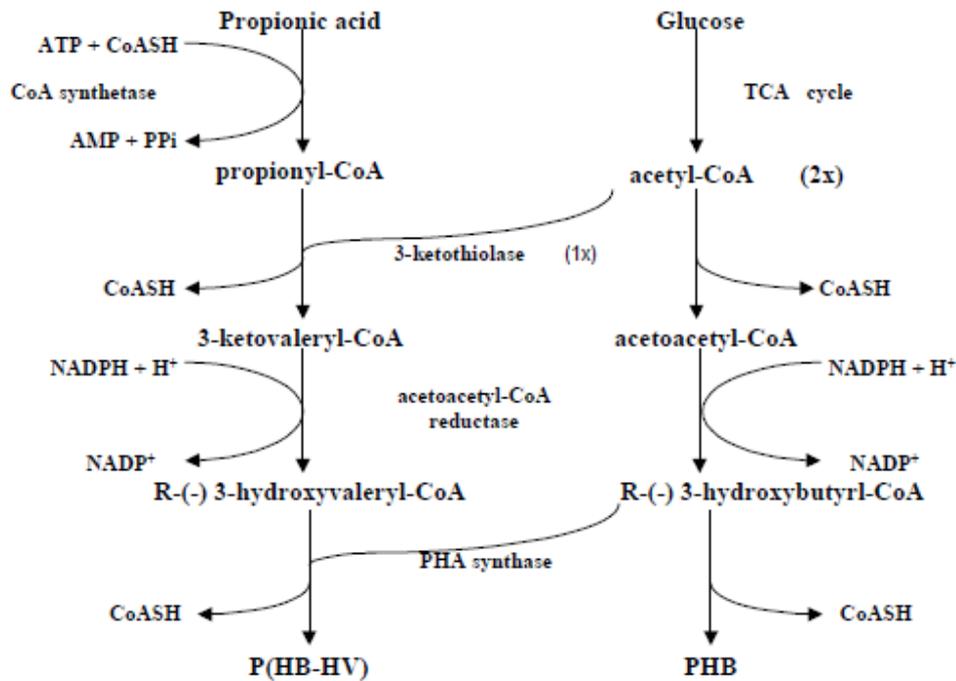


Figura 2- Percorsi di biosintesi di PHB e P(HB-HV).

2.3 Proprietà e applicazioni dei PHA

I PHA presentano alcuni importanti vantaggi rispetto alle plastiche convenzionali, primo fra tutti il fatto di essere biodegradabili in condizioni aerobiche e anaerobiche in composti come acqua e anidride carbonica (Shen *et al.*, 2009). Tale caratteristica li rende particolarmente interessanti dal punto di vista ambientale in quanto vengono degradati in tempi molto più brevi rispetto alle plastiche tradizionali. Essendo prodotti a partire da risorse rinnovabili, i PHA sono completamente “*biobased*” e indipendenti dai combustibili fossili (Koller *et al.*, 2009). Sono insolubili in acqua, presentano buona resistenza agli attacchi idrolitici ed ai raggi UV e si comportano come materiali piezoelettrici (Raza *et al.*, 2018).

Il PHB è un polimero a catena corta, termoplastico, isotattico, ortorombico, ad elevata cristallinità che comporta un’eccessiva fragilità. Ha una temperatura di transizione vetrosa (T_g) più elevata rispetto al PP e una resistenza all’urto modesta, inoltre la temperatura di fusione (175°C) prossima a quella di degradazione (circa 250°C) implica delle notevoli difficoltà di lavorazione con le tradizionali tecniche dei polimeri termoplastici (Valera, 2001).

Con l’aggiunta di HV al 20%, il P(3HB-co-3HV) è meno cristallino e più flessibile rispetto al PHB riducendo il problema della lavorabilità. La temperatura di degradazione

termica del copolimero rimane uguale, ma diminuisce la temperatura di fusione (Valera, 2001, Chen *et al.*, 2018).

In tabella 1 sono riportate le principali proprietà fisico-meccaniche di PHB e P(3HB-co-3HV) confrontate con quelle del PP.

Tabella 1- Proprietà fisico-meccaniche di PHB, 3HB-co-3HV e PP.

	PHB	P(3HB-co-3HV) _{20%}	PP
Densità [g/cm ³]	-	1.25	0.90
Tg [°C]	+15	-1	-10
Tf [°C]	175	145	176
Cristallinità [%]	80	42	70
Resistenza a trazione [MPa]	40	30	38
Allungamento a rottura [%]	8	50	40
Resistenza a flessione [GPa]	3.5	1.0	-
Resistenza all'urto Izod-n. [J/m]	60	300	100
Costante dielettrica a 1 MHz	3	3	-
Resistività [Ohm*cm]	≥10 ⁻¹⁶	≥10 ⁻¹⁶	≥10 ⁻¹⁶
Temperatura superiore di impiego [°C]	130	99	135

Grazie alle loro proprietà e alla possibilità di ottenere copolimeri con caratteristiche differenti in base al tipo di monomeri sostituiti e al grado di sostituzione, i PHA potrebbero gradualmente sostituire alcune plastiche convenzionali, come riportato nella seguente tabella 2 (Shen *et al.*, 2009).

Tabella 2- Potenziale di sostituibilità tecnica del PHA. (PVC: polivinilcloruro, PE-HD: polietilene ad alta densità, PE-LD: polietilene a bassa densità, P:= polistirene, PA: poliammide, PET: polietilentereftalato, PC: policarbonato, PUR: poliuretano reticolato.)

	PVC	PE-HD	PE-LD	PP	PS	PA	PET	PC	PUR
P(3HB)	+	+	+	+	+	-	+	-	-
P(3HB-co-HV)	+	+	+	+	-	-	-	-	+

Inizialmente i PHA furono utilizzati negli articoli di uso quotidiano, come bottiglie per shampoo, borse della spesa, contenitori di carta e in generale articoli usa e getta (Chen, 2010). Successivamente hanno trovato applicazione sotto forma di materiali da imballaggio, compresi film, scatole, rivestimenti, fibre e materiali espansi, biocombustibili, teli per pacciamatura (Khosravi-Darani e Bucci, 2015). Inoltre, grazie alla biocompatibilità con il tessuto umano e alla non cancerogenicità, possono essere utilizzati in campo medico per il rilascio controllato di farmaci, suture chirurgiche e produzione di valvole cardiache (Ali e Jamil, 2016).

2.4 Produzione di PHA da MMCs

Le colture miste sono popolazioni microbiche che operano in sistemi biologici aperti, ad esempio nei processi di trattamento biologico delle acque reflue (Morgan-Sagastume, 2016). Microorganismi PHA accumulanti possono essere selezionati a partire da MMCs utilizzando particolari condizioni, come un processo di alimentazione dinamica (*aerobic dinamic feeding*, ADF), chiamato anche regime feast famine (FF) (Valentino *et al.*, 2018; Gobi e Vadivelu, 2014). Questo processo si basa sull'alternanza di cicli in cui la popolazione è sottoposta ad un iniziale eccesso di substrato (fase feast) e ad una successiva carenza di substrato (fase famine). L'alternanza di queste fasi causa un adattamento fisiologico della coltura, che conduce alla selezione quasi esclusiva di microorganismi PHA accumulanti (Silva *et al.*, 2017). La selezione agisce anche sui componenti intracellulari per la crescita (enzimi e RNA), alcuni dei quali subiscono una diminuzione durante la famine. Al contrario, gli enzimi necessari alle reazioni di polimerizzazione, stoccaggio e degradazione del PHA rimangono sempre

attivi (Koller, 2017). La pressione selettiva applicata consente di ottenere colture con un'elevata e stabile capacità di produzione di PHA durante la fase feast e una buona capacità di crescere sul PHA stoccato durante la fase famine. I processi per la produzione di PHA da MMCs sono generalmente suddivisi in due o tre fasi, a seconda del tipo di substrato utilizzato come materia prima (Serafim *et al.*, 2008). Il processo di selezione dei microrganismi con capacità stoccanti può avvenire applicando svariate condizioni operative. A seconda delle diverse condizioni imposte al sistema biologico, si possono ottenere risposte selettive differenti. Ad esempio, possono essere applicate condizioni aerobico-anossiche, nelle quali si alternano una fase feast aerobica e una fase famine anossica, ovvero una fase in cui l'ossigeno è presente solamente legato ad altri composti (es. NO_2^- e NO_3^-). Questo permette di integrare la rimozione dell'azoto con la selezione di un consorzio microbico avente capacità stoccanti (Basset *et al.*, 2016; Frison *et al.*, 2015). Un altro esempio è quello di alternare una feast anossica e una famine aerobica, al fine di selezionare una biomassa con potenziale di accumulo di PHA stabile caratterizzato dalla capacità di rimuovere carbonio, azoto e fosforo (Anterrieu *et al.*, 2014).

3. OBIETTIVI DELLA RICERCA

La presente sperimentazione si inserisce all'interno del progetto Res Urbis. Il lavoro sperimentale svolto ha previsto il monitoraggio delle varie unità del processo di produzione dei PHA in scala pilota presso l'area universitaria del depuratore di Treviso. Il processo di selezione della biomassa PHA accumulante ed alcuni test di accumulo sono stati caratterizzati determinando le rese di processo ed esaminando i principali nutrienti coinvolti (C, N, P). Nell'ottica della gestione e del trattamento delle acque di scarico e dei rifiuti solidi, la produzione di PHA mediante MMCs rappresenta un'opportunità per il recupero e la valorizzazione delle risorse rinnovabili, decretando un sostanziale rinnovamento dei tradizionali trattamenti a valle dei rifiuti (Koller et al., 2011).

4. MATERIALI E METODI

4.1 Filiera di processo per la produzione di biopolimeri

Il processo in scala pilota si compone di una piattaforma multistadio anaerobico-aerobico. Nel primo stadio anaerobico le matrici di partenza sono convertite in acidi grassi volatili (VFA) tramite fermentazione acidogenica. La miscela ottenuta arricchita in VFA costituisce il substrato di alimentazione per i successivi due stadi aerobici: la fase di selezione della biomassa PHA accumulante, e la fase di accumulo per massimizzare la produzione di polimero. All'interno di un reattore in discontinuo la coltura mista arricchita in PHA accumulanti viene sottoposta a specifiche condizioni che massimizzano l'accumulo di PHA. Le cellule sono poi raccolte per l'estrazione e la purificazione del PHA (Serafim *et al.*, 2008; Valentino *et al.*, 2017). Lo schema di processo è illustrato in figura 3.

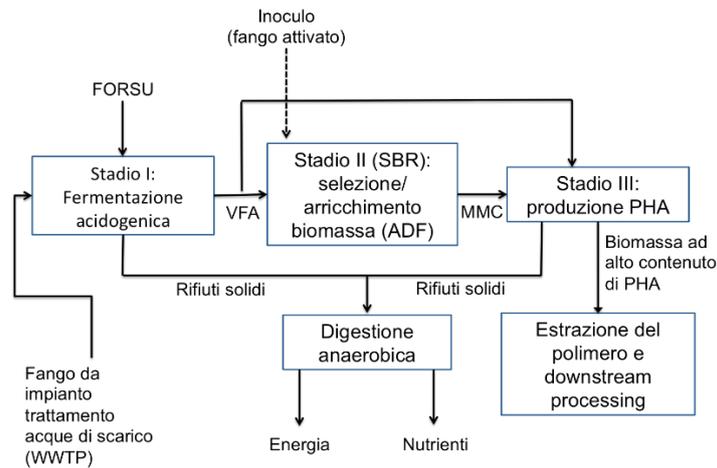


Figura 3- Rappresentazione schematica della piattaforma sperimentale in scala pilota.

La filiera si compone di un fermentatore acidogenico, due unità di separazione solido/liquido, un *sequencing batch reactor* (SBR) per la selezione della biomassa aerobica (SBR1) ed un reattore batch di accumulo (SBR2).

4.1.1 Matrici trattate

Le matrici organiche utilizzate in questo studio sono fango secondario e FORSU, entrambe reperibili presso l'impianto di Treviso. Il primo deriva dalla depurazione delle acque reflue e la FORSU dalla raccolta differenziata effettuata nella provincia di Treviso. Il rifiuto umido, raccolto porta a porta in 50 comuni della Provincia di Treviso, viene conferito all'impianto di trattamento dedicato. Qui viene eseguita una separazione solido/liquido con l'utilizzo di una macchina spremitrice. La frazione solida è destinata a compostaggio e quella liquida viene conferita presso il depuratore di Treviso e inviata a co-digestione anaerobica con i fanghi (Moretto *et al.*, 2019).

4.1.2 Unità di fermentazione, reattori di selezione e accumulo della biomassa aerobica

La fermentazione acidogenica è stata condotta in un reattore pilota con un volume di esercizio di 380 L, alimentato con tre diverse miscele che differiscono per percentuale di FORSU e fango e per temperatura di processo:

- F-I) FORSU 40-45% v/v e fango 55-60%; T 55°C;
- F-II) FORSU 30-35% v/v e fango 65-70%; T 55°C;
- F-III) FORSU 30-35% v/v e fango 65-70%; T 42°C.

Le tre condizioni sono state mantenute senza interruzione, cambiando dapprima la percentuale di FORSU e fango (da I a II) e successivamente la temperatura da termofilia (II) a mesofilia (III). La prima miscela è stata utilizzata dal giorno operativo 1 al giorno 92, la seconda dal giorno 93 al giorno 159 e infine la terza miscela dal giorno 160 al giorno 215. Le caratteristiche chimiche delle tre miscele di fermentato sono riportate in tabella 3. Il fermentato è stato successivamente sottoposto a due operazioni di separazione solido/liquido in linea: la prima consisteva in una centrifuga industriale, dotata di un sacchetto filtrante di nylon con una maglia di 5 µm. Il filtrato ottenuto risultava avere un tenore di TSS intorno a 10 g/L. Questo veniva ulteriormente trattato mediante una membrana tubolare in ceramica, con una sezione di ultrafiltrazione (Cut Off: 1 – 1000 kiloDalton) che trattiene ogni particella con diametro maggiore di 0.2 µm. Il permeato effluente era quindi chiarificato e privo di TSS, e veniva stoccato all'interno di un serbatoio di acciaio da 300 L per essere utilizzato come alimento nei due successivi reattori SBR1 ed SBR2.

Tabella 3- Caratteristiche chimiche delle 3 miscele di fermentato (F-I, F-II, F-III) utilizzate per l'alimentazione del reattore SBR1.

Parametro	Caratteristiche miscele fermentato		
	F-I	F-II	F-III
Solidi Totali (TS, g/kg)	82 ± 6	56 ± 4	57 ± 3
Solidi Totali Volatili (TVS, g/kg)	68 ± 4	46 ± 4	46 ± 2
COD_{SOL} (g/L)	45 ± 8	32 ± 5	26 ± 3
COD_{VFA} (g/L)	23 ± 6	21 ± 3	19 ± 2
COD_{VFA}/COD_{SOL}	0.53 ± 0.11	0.64 ± 0.07	0.75 ± 0.09
Azoto ammoniacale (N-NH₄⁺; mg/L)	698 ± 55	724 ± 138	562 ± 44
Ortofosfato (P-PO₄³⁻; mg/L)	155 ± 28	127 ± 22	110 ± 9
COD_{SOL}/N/P	100/5.3/0.4	100/4.1/0.4	100/4.4/0.5

Il reattore SBR1 (120 L volume di lavoro) è stato alimentato in regime ADF, utilizzando un ciclo operativo della durata di 6 h (4 cicli giornalieri). L'alimentazione avveniva in corrispondenza dell'inizio di ogni ciclo, per un periodo relativamente breve pari a 30 s. Non essendo prevista nessuna fase di sedimentazione, il tempo di residenza idraulico

(HRT) era pari all'età del fango (SRT), ovvero 1 d. La fase di spurgo avveniva immediatamente prima della fine di ciascun ciclo, anch'essa per un periodo di tempo relativamente breve (30 s) e in condizioni di completa aerazione. In tabella 4 sono riportati i principali parametri operativi del reattore SBR1.

Il reattore di accumulo ha un volume totale di 140 L; le prove sono state eseguite con substrato sintetico (acido acetico senza aggiunta di nutrienti) e con substrato reale (permeato ottenuto da F-II e da F-III), inoculando il reattore con 25 L di biomassa a fine ciclo da SBR1. La durata di ogni prova era di almeno 4 ore e veniva adottato un rapporto substrato (S) su biomassa (X) S/X maggiore rispetto a quello adottato nel reattore SBR1, al fine di saturare la capacità di stoccaggio della biomassa e di prevenire l'inibizione da substrato. Nel corso delle prove, il substrato veniva aggiunto all'inizio e dopo ogni ora, mentre i campionamenti per le analisi di PHA e VFA venivano effettuati ad intervalli regolari di 30 minuti.

Entrambi i reattori di selezione e di accumulo sono dotati di un sistema di aerazione con piattelli sul fondo delle vasche, la cui portata assicura concentrazioni di O₂ disciolto (OD) mai limitanti e comprese tra 2.0 – 8.5 mg/L. (INAIL, 2017). Tutti i reattori ed i serbatoi di stoccaggio sono costruiti in acciaio inossidabile AISI-304.

Tabella 4- Parametri operativi del reattore SBR1.

Parametro	Valore
Volume di lavoro (L)	100
Portata in ingresso (L/d)	100
Carico organico (OLR; gCOD/L·d)	3.17 – 4.25
Tempo di residenza idraulico (HRT; d)	1
Età del fango (SRT; d)	1
Ciclo operativo (h)	6
Cicli giornalieri (n)	4

SBR1 ed SBR2 sono automatizzati e controllati da un programmable logic controller (PLC) (MyRio LabView National Instruments®). I segnali di OD, *oxidation reduction potential* (ORP) e pH sono monitorati in continuo tramite sonde a immersione (Hamilton®) ed elaborati in tempo reale dal PLC.

4.2 Metodi analitici

I campioni sono stati raccolti due volte a settimana e analizzati presso il laboratorio dell'area sperimentale. I parametri caratterizzati sono solidi sospesi totali (TSS), solidi sospesi volatili (VSS), *soluble chemical oxygen demand* (COD_{SOL}), azoto ammoniacale (N-NH₄⁺), ortofosfato (P-PO₄³⁻), VFA, e concentrazione di PHA intracellulare. Le metodiche analitiche applicate per TSS, VSS, COD_{SOL}, N-NH₄⁺ e P-PO₄³⁻ sono in accordo con gli Standard Methods (APHA, AWWA, WEF, 1998). La determinazione dei VFA è stata effettuata mediante un gascromatografo Agilent 6890N equipaggiato con detector a ionizzazione di fiamma (*Flame Ionization Detector*, FID) e colonna capillare Agilent J&W DB-FFAP (lunghezza 15m, diametro 0,53 x 0,5mm). Il carrier utilizzato è idrogeno e l'iniettore lavora in modalità split con un rapporto di split 20:1. Il metodo analitico prevede una rampa di temperatura da 80°C a 200°C e l'utilizzo di acido 2-Etilbutirrico come standard interno. Prima di essere iniettato il campione viene centrifugato a 4000 giri al minuto per 5 minuti, il surnatante viene filtrato con filtri a fascia nera e successivamente con filtri per siringa di diametro 0,2 µm. La preparazione per l'analisi del P(3HB-co-3HV) viene eseguita su 5 mL di campione di fango al quale viene aggiunto 1 mL di soluzione di ipoclorito di sodio al 7 % di cloro attivo. Il campione è stato conservato in congelatore a -20°C fino al momento dell'analisi. La determinazione del polimero è stata effettuata presso i laboratori dell'Università La Sapienza di Roma, seguendo il metodo gascromatografico (Braunegg *et al.*, 1978) che prevede una metanolisi acida con metanolo acidificato con H₂SO₄ 3%: dall'idrolisi acida si formano gli esteri metilici dell'acido 3-idrossibutirrico e dell'acido 3-idrossivalerico (dopo reazione di idrolisi e derivatizzazione per l'ottenimento di monomeri volatili da sottoporre all'analisi).

4.3 Elaborazione dei dati

I parametri che definiscono l'efficienza del processo di selezione della biomassa PHA accumulante in SBR1 sono il rendimento osservato (Y_{OBS}^{SBR}), il rendimento di stoccaggio del polimero ($Y_{P/S}^{feast}$), la velocità specifica di consumo del substrato ($-qS^{feast}$) e la velocità specifica di produzione del polimero (qP^{feast}). I dati sperimentali sono stati convertiti in COD al fine di esprimere tutti i parametri in un'unica unità di misura.

La biomassa attiva (X_A) è stata calcolata alla fine della fase feast dalla differenza tra i VSS e la concentrazione di PHA, facendo riferimento alla biomassa senza considerare il peso del PHA stoccato all'interno della cellula. Il valore di biomassa attiva è stato convertito in COD attraverso l'uso del fattore di conversione di 1.42 mgCOD/mg X_A che è stato ottenuto considerando la formula della biomassa eterotrofa $C_5H_7O_2N$ (Gujer e Henze, 1991). L'equazione utilizzata è la seguente: $X_A = (VSS - PHA) \cdot 1.42$.

I PHA sono stati convertiti in COD usando i seguenti fattori di conversione: 1.67 mgCOD/mg HB e 1.92 mgCOD/mg HV.

La velocità specifica di rimozione del substrato è stata calcolata durante la fase feast come rapporto tra la quantità di substrato rimosso (ΔS) e la lunghezza della fase feast (t) moltiplicata per la biomassa attiva (X_A), come viene descritto nella seguente equazione: $-qS^{feast} = \Delta S / (t \cdot X_A)$.

La velocità specifica di produzione del polimero è stata determinata come rapporto tra la quantità di polimero stoccato (ΔPHA , ovvero la differenza tra la concentrazione di PHA a fine feast e alla fine del ciclo) e la lunghezza della fase feast (t) moltiplicata per unità di biomassa attiva (X_A): $qP^{feast} = \Delta PHA / (t \cdot X_A)$.

Il rendimento osservato è stato calcolato dal rapporto tra la concentrazione totale di biomassa (VSS) e la quantità di substrato rimosso (ΔS): $Y_{OBS}^{SBR} = VSS / \Delta S$.

Il rendimento di stoccaggio durante la fase feast è dato dal rapporto tra la quantità di polimero stoccato (ΔPHA) e la quantità di substrato rimosso (ΔS): $Y_{P/S}^{feast} = \Delta PHA / \Delta S$.

Il carico organico (*organic loading rate*, OLR) è espresso come la quantità di substrato (in termini di COD o VFA) per unità di tempo (d) riferita al volume del reattore stesso (L); si tiene pertanto conto della portata volumetrica giornaliera in ingresso (Q_{IN}): $OLR = Q_{IN} \cdot S / V$.

Nei test di accumulo, il contenuto di PHA della biomassa (% PHA) è stato calcolato dividendo la concentrazione di PHA per la concentrazione dei VSS.

La velocità specifica di produzione del polimero (qP^{batch}) indica la quantità di polimero stoccato nell'unità di tempo (t) per unità di biomassa attiva (X_A).

Il rendimento di stoccaggio del polimero ($Y_{P/VFA}^{\text{batch}}$) è dato dal rapporto tra la quantità di PHA prodotto e il substrato rimosso in termini di VFA alla fine di ogni test.

Il rendimento di crescita ($Y_{X/VFA}^{\text{batch}}$) è stato determinato come rapporto tra la nuova biomassa X_A prodotta e il substrato rimosso in termini di VFA alla fine di ogni test.

La produttività indica la concentrazione di PHA prodotto nell'unità di tempo.

5. RISULTATI E DISCUSSIONE

5.1 Comportamento e prestazioni della biomassa in SBR1

Nel seguente paragrafo vengono descritti gli andamenti temporali dei parametri monitorati nel corso della marcia di SBR1. I valori medi e le deviazioni standard sono riportati in tabella 5.

La figura 4 illustra l'andamento dell'OLR applicato al reattore in termini di COD solubile e di VFA.

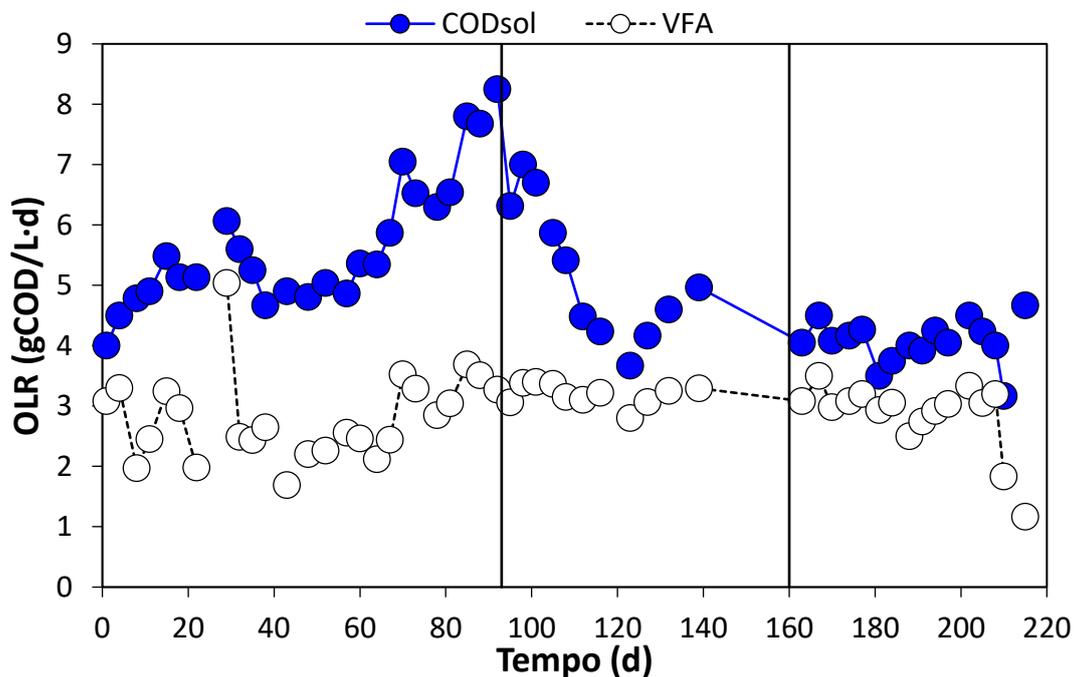


Figura 4- Andamento del carico organico OLR nel reattore SBR1.

In corrispondenza del giorno 93 e del giorno 160 è cambiato il substrato utilizzato, da F-I a F-II e da F-II a F-III rispettivamente.

L'andamento del carico organico appare nel complesso variabile, in quanto dipendente dalle caratteristiche del fermentato utilizzato: questo comporta inevitabili fluttuazioni, dovute anche alle prestazioni del fermentatore.

Nel primo periodo (da 0 a 92 giorni) si può osservare una più netta separazione tra il profilo dell'OLR calcolato sulla base del COD solubile e tra quello basato sui VFA, mentre nel secondo periodo (da 93 a 159) e ancora più marcatamente nel terzo periodo (da 160 a 215) i due profili tendono ad essere sempre più vicini. La performance della produzione di PHA da MMC è strettamente correlata alle

caratteristiche del substrato. Sono preferibili materie prime ricche in composti organici facilmente biodegradabili, come i VFA, in quanto essi sono i diretti precursori utilizzati per la sintesi di PHA (Valentino *et al.*, 2017). Un rapporto VFA/COD_{SOL} elevato potrebbe garantire un'alta conversione in PHA (Bengtsson *et al.*, 2008) e una buona efficienza di selezione della biomassa (Korkakaki *et al.*, 2016, De Oliveira *et al.*, 2019). Al contrario, la presenza di COD non VFA potrebbe favorire la crescita di popolazioni microbiche non stoccanti, andando così a peggiorare le performance del reattore in termini di selezione (Karlsson, 2010).

I valori medi dell'OLR in termini di COD_{SOL} per il primo, secondo e terzo periodo sono pari a 5.8, 5.2 e 2.9 gCOD/L-d, mentre quelli in termini di VFA si attestano 2.8, 3.2, 2.9 gCOD/L-d rispettivamente. Dal grafico e dai valori medi il terzo periodo risulta essere quello con il rapporto VFA/COD_{SOL} più elevato e più costante nel tempo, garantendo un miglior substrato per il processo di selezione. I TSS e VSS misurati a fine ciclo (figura 5) mostrano entrambi fluttuazioni alternate a periodi di stabilità.

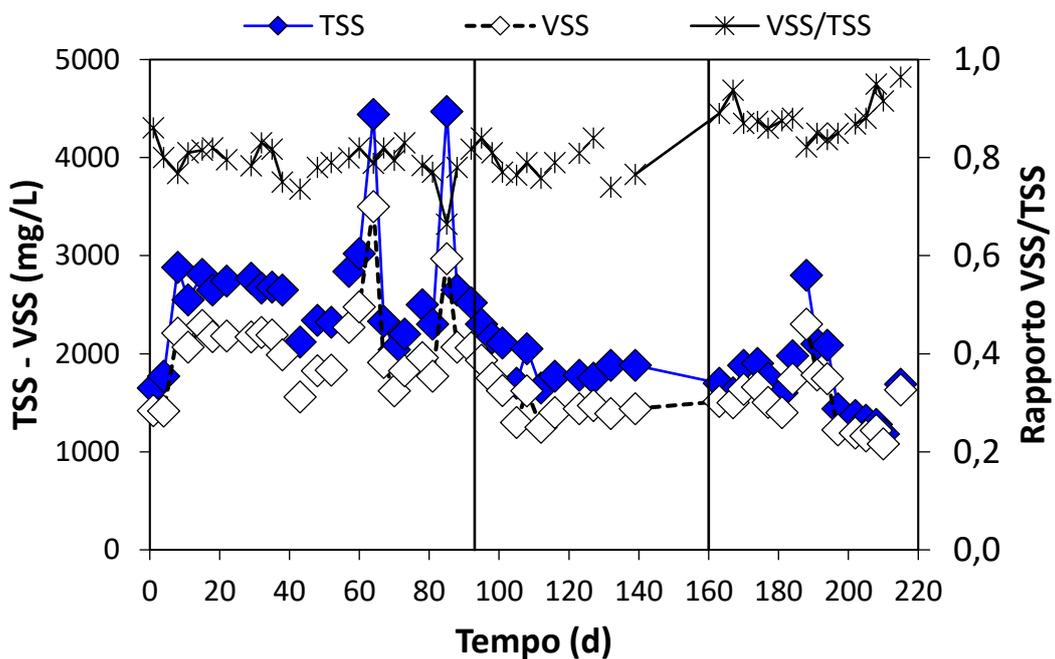


Figura 5- Andamento di TSS e VSS nel reattore SBR1.

Confrontando l'andamento dei solidi con quello dell'OLR si può notare come il valore dei solidi sospesi sia influenzato da incrementi repentini del carico organico. Ad esempio, nei giorni 64 e 85 i valori di TSS e di VSS subiscono un forte innalzamento e, osservando il grafico dell'OLR, si nota subito come questi siano stati influenzati da un

aumento del carico organico avvenuto proprio in quei giorni. Nel primo periodo l'andamento di TSS e VSS presenta un maggior numero di fluttuazioni, con valori medi rispettivamente di 2717 mg/L e 2136 mg/L. Nel secondo e terzo periodo l'andamento risulta invece essere più stabile, anche se con valori medi più bassi (1912 mg/L di TSS e 1510 mg/L di VSS per il secondo periodo, 1730 mg/L di TSS e 1518 mg/L di VSS per il terzo periodo). In figura 6 è riportato il profilo temporale del rapporto giornaliero tra la durata della fase feast e quella dell'intero ciclo.

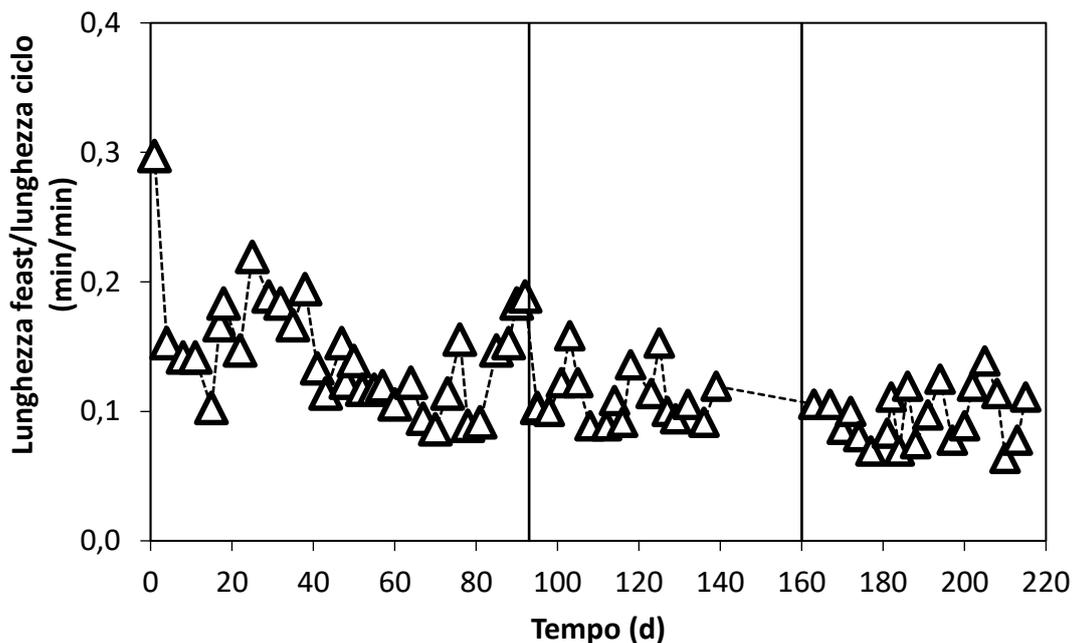


Figura 6- Andamento della fase feast nel reattore SBR1.

Il primo periodo è caratterizzato da fluttuazioni più marcate, con un valore iniziale di 0.3 tipico delle fasi di start-up. Il valore medio, pari a 51 minuti (14% dell'intero ciclo), è stato calcolato a partire dal giorno operativo 8 escludendo la fase di start-up. Nel secondo e nel terzo periodo le fluttuazioni sono minori e il valore medio si assesta su valori leggermente inferiori, 40 min e 35 min rispettivamente, corrispondenti all'11 e al 10%. Anche in questo caso l'andamento del carico organico si riflette sulla lunghezza della fase feast, in quanto il primo periodo era caratterizzato da un OLR molto variabile, mentre nel secondo e ancor di più nel terzo periodo la composizione del refluo garantiva un OLR più stabile. Nel complesso l'andamento appare decrescente, a dimostrazione del fatto che le condizioni operative del reattore garantivano una buona efficienza in termini di selezione e di arricchimento della biomassa PHA accumulante.

La fase feast, che tipicamente non deve superare il 20% per garantire una adeguata pressione selettiva, si è sempre mantenuta nei tre periodi su valori più bassi rispetto a quelli riportati in letteratura (Koller, 2017; Pittmann e Steinmetz, 2017; Wang *et al.*, 2017).

L'andamento della concentrazione di PHA misurata a fine feast e a fine ciclo è riportato in figura 7.

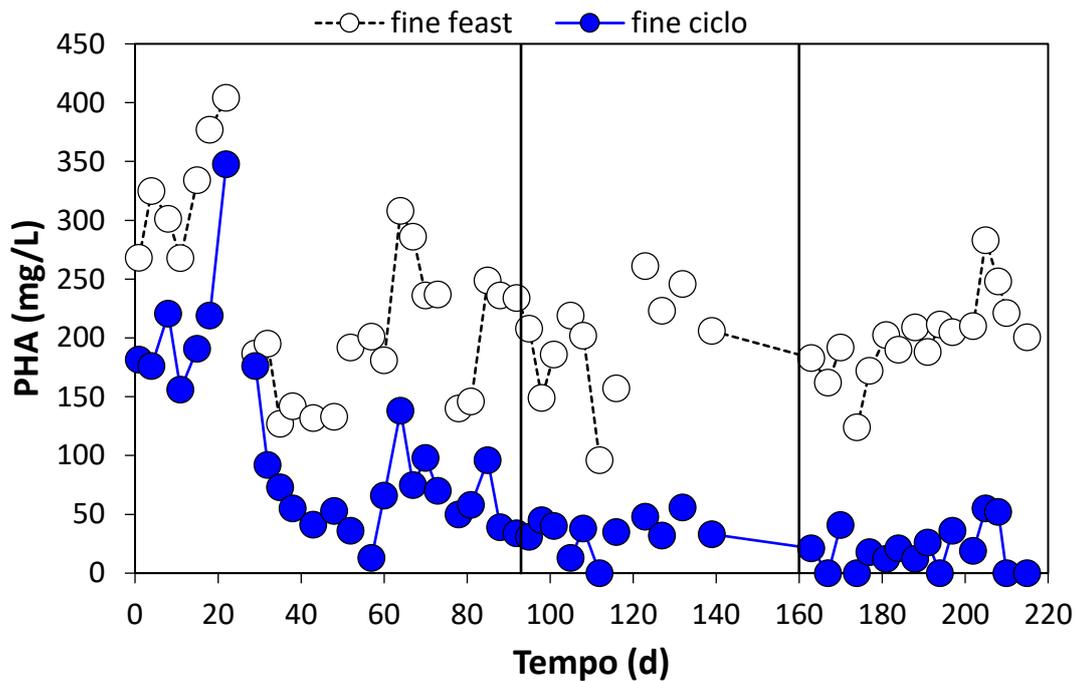


Figura 7- Andamento della concentrazione di PHA a fine feast e a fine ciclo nel reattore SBR1.

Nel complesso si può notare come nei tre periodi risulti evidente una differenza (Δ PHA) tra la concentrazione di PHA alla fine della fase feast (valore massimo) e quella alla fine del ciclo (valore minimo). Questo indica la presenza di una risposta di stoccaggio in tutti e 3 i periodi, ma con entità e stabilità differenti. Nel primo periodo si individuano un maggior numero di fluttuazioni, probabilmente dovute al fatto che il processo stesso era poco stabile a causa del fermentato alimentato, costituito solamente dal 53% di VFA (tabella 3). I valori medi di concentrazione di PHA a fine ciclo e a fine feast si attestano intorno a 104 mg/L e 228 mg/L rispettivamente. Nel secondo periodo il Δ PHA comincia ad essere più alto, divenendo via via molto più marcato e stabile soprattutto nel terzo periodo. I valori medi sono pari a 34 mg/L a fine ciclo e 196 mg/L a fine feast ed a 20 mg/L a fine ciclo e 200 mg/L a fine feast rispettivamente nel secondo e terzo periodo. Considerando il rapporto tra VFA/COD di F-II ed F-III, si nota come esso sia rispettivamente del 64% e del 75%. La presenza di una maggiore

concentrazione di VFA influenza direttamente l'entità e la stabilità di stoccaggio. Il terzo periodo risulta quindi essere caratterizzato da performance migliori.

Gli andamenti della velocità specifica di stoccaggio del polimero (qP^{feast}) e del rendimento di stoccaggio del polimero ($Y_{P/S}^{feast}$) durante la fase feast sono riportati in figura 8.

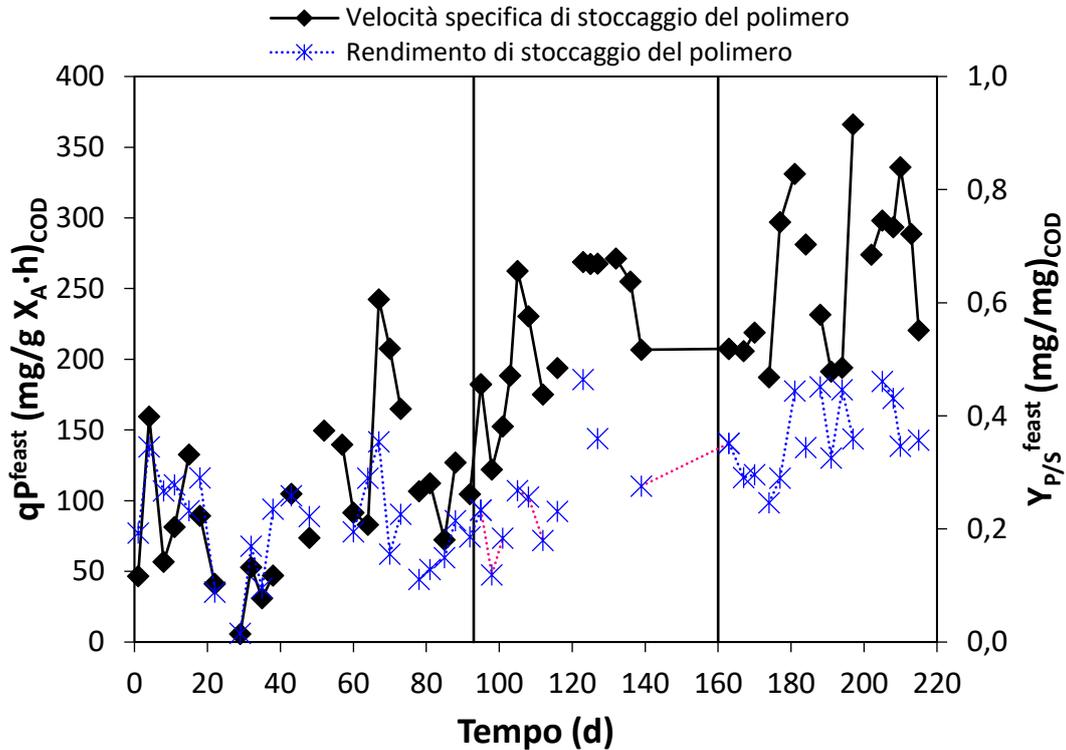


Figura 8- Andamento della velocità specifica e del rendimento di stoccaggio del polimero nel reattore SBR1.

Osservando il grafico si può notare come la qP^{feast} presenti un andamento crescente: i valori medi riferiti al primo, al secondo e al terzo periodo sono 101, 217 e 260 ($mg/g X_A \cdot h$)_{COD} rispettivamente. In ognuno dei tre periodi la velocità è caratterizzata da forti fluttuazioni, probabilmente dovute al calcolo stesso di tale velocità. Essa è infatti soggetta all'andamento di tre parametri, quali il ΔPHA , la biomassa attiva X_A (collegata alla concentrazione dei VSS) e la durata della fase feast. La compresenza di questi tre fattori può suscitare un andamento oscillatorio nella velocità.

L'andamento del rendimento $Y_{P/S}^{feast}$ riflette quello della velocità qP^{feast} , in quanto risulta essere più basso nel primo periodo (con valore medio di 0.20 mg_{COD}/mg_{COD}), mentre tende a crescere nel secondo e poi nel terzo periodo (rispettivamente 0.26 e 0.36 mg_{COD}/mg_{COD}). Il rendimento di stoccaggio risulta essere soggetto a fluttuazioni di

minore entità rispetto a qP^{feast} , in quanto è calcolato dal rapporto tra ΔPHA e ΔS e quindi influenzato da un minor numero di fattori.

Dall'andamento di qP^{feast} e di $Y_{P/S}^{feast}$ si può notare come passando dal primo al secondo periodo e infine al terzo, ci sia via via un incremento della risposta di stoccaggio, a dimostrazione del fatto che il reattore lavorava con condizioni operative sempre più idonee alla selezione di un consorzio microbico con capacità stoccante. In figura 9 viene mostrato il profilo temporale del rendimento osservato (Y_{OBS}^{SBR}).

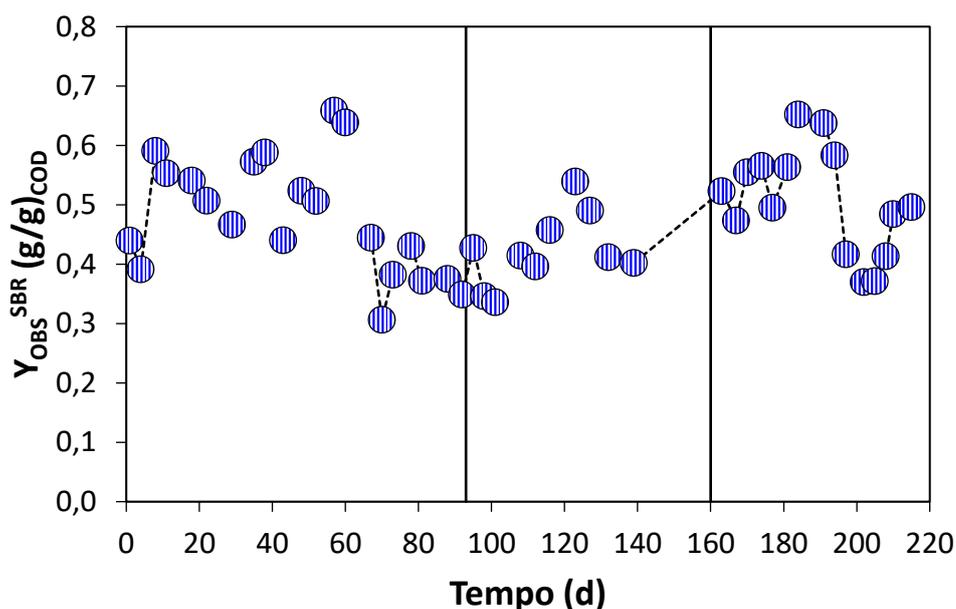


Figura 9- Andamento del rendimento osservato nel reattore SBR1.

L'andamento di Y_{OBS}^{SBR} si mantiene pressoché costante in ognuno dei tre periodi di marcia di SBR1, con valori medi nel primo, nel secondo e nel terzo periodo rispettivamente di 0.49, 0.42 e 0.51 (g/g)_{COD}. Y_{OBS}^{SBR} è un parametro tipico di questi processi biologici e definisce sia la crescita che lo stoccaggio dei microrganismi: esso infatti è una misura della quantità di VSS (biomassa + polimero) che si producono rispetto all'unità di substrato consumato. Per tale motivo non è un indice della risposta di stoccaggio, in quanto essendo i VSS dati dalla somma di biomassa e polimero, nel momento in cui si abbassa la risposta di stoccaggio, aumenta la risposta di crescita e il valore di Y_{OBS}^{SBR} non subisce grandi cambiamenti. Questo parametro viene quindi calcolato solamente per la caratterizzazione del processo, ma non fornisce informazioni utili all'individuazione della biomassa PHA accumulante e sull'entità dello

stoccaggio del polimero. In figura 10 viene riportato l'andamento della percentuale di HV nel copolimero stoccato alla fine della fase feast.

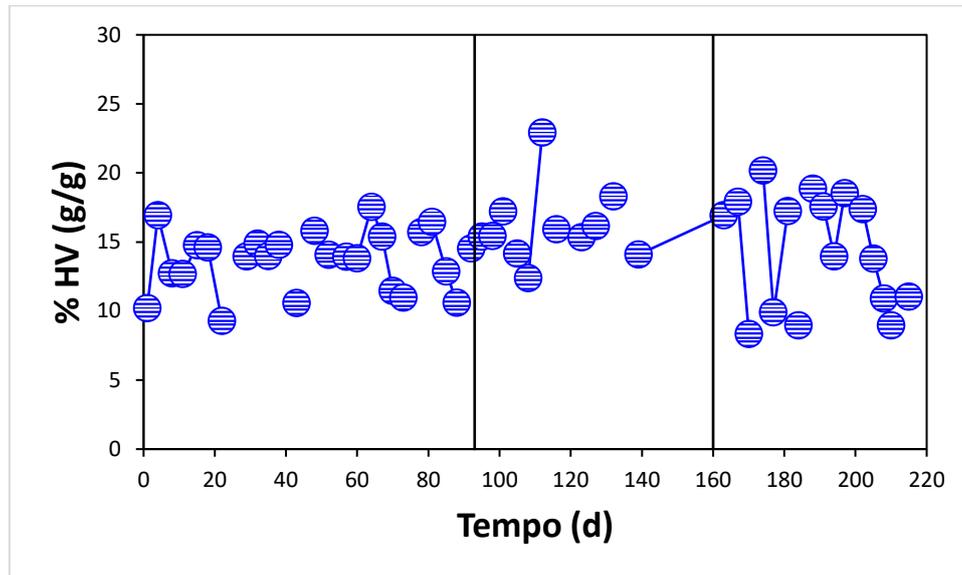


Figura 10- Andamento della percentuale di HV (g/g) nel copolimero alla fine della fase feast nel reattore SBR di selezione

È molto importante determinare la percentuale di HV presente all'interno del copolimero, in quanto essa influisce sulle proprietà del materiale finale (paragrafo 2.3). A bassi livelli di HV (< 10%) il polimero P(3HB-co-3HV) risulta essere duro e fragile come il PVC non modificato, mentre a livelli intermedi (10-25%) ha una durezza simile al PP e infine ad alti contenuti di HV (25-40%) si ottiene un polimero più soffice e resistente, come il PE (Rivera-Briso e Serrano-Arroca, 2018; Gilbert, 2016.). Osservando il grafico si può notare come la produzione percentuale del monomero HV rimane costante lungo i tre periodi di marcia del reattore, i valori medi sono pari a 13.7, 16.1 e 14 rispettivamente per il primo, secondo e terzo periodo. Nel processo di produzione di PHA da MMC, la percentuale dei monomeri nel copolimero dipende fortemente dalla composizione del substrato in termini di VFA, in quanto il copolimero prodotto riflette la diversità degli acidi organici contenuti nelle materie prime fermentate (Albuquerque *et al.*, 2011); il contenuto di HV dipende anche molto dalle condizioni operative che vengono imposte al reattore (Duque *et al.*, 2014; Reis *et al.*, 2011). Per tale motivo infatti, nonostante il cambiamento nel feedstock utilizzato, nei tre periodi non si notano grandi differenze nella percentuale di unità HV presenti all'interno del copolimero stoccato.

In tabella 5 vengono riportati i valori medi e le relative deviazioni standard dei principali parametri monitorati durante la marcia di SBR1.

Tabella 5- Valori medi e deviazioni standard dei principali parametri monitorati nel corso della marcia del reattore SBR1.

Parametro	Unità di misura	Valori medi		
		F-I	F-II	F-III
TSS	mg TSS/L	2717 ± 132	1912 ± 64	1930 ± 101
VSS	mg VSS/L	2136 ± 95	1510 ± 61	1718 ± 78
VSS/TSS	-	0.79 ± 0.02	0.80 ± 0.01	0.88 ± 0.01
Rapporto lunghezza feast/ lunghezza ciclo	h/h	0.14 ± 0.05	0.11 ± 0.02	0.10 ± 0.02
PHA (fine feast)	mg PHA/L	228 ± 58	196 ± 30	200 ± 16
PHA (fine ciclo)	mg PHA/L	104 ± 24	34 ± 12	20 ± 9
Frazione HV	g HV/g PHA (%)	13.7 ± 0.4	16.1 ± 0.8	14 ± 1
Velocità specifica di stoccaggio di PHA (qP^{feast})	mgCOD _{PHA} /gX _A ·h	101 ± 52	212 ± 35	258 ± 44
Velocità specifica di rimozione del substrato ($-qVFA^{feast}$)	mgCOD _{VFA} /gX _A ·h	332 ± 62	619 ± 54	634 ± 53
Velocità specifica di rimozione del substrato ($-qS^{feast}$)	mgCOD _{SOL} /gX _A ·h	509 ± 84	840 ± 77	725 ± 62
Rendimento di stoccaggio ($Y_{P/S}^{feast}$)	COD _{PHA} /COD _{SOL}	0.22 ± 0.05	0.26 ± 0.06	0.36 ± 0.04
Rendimento di stoccaggio ($Y_{P/VFA}^{feast}$)	COD _{PHA} /COD _{VFA}	0.30 ± 0.06	0.34 ± 0.05	0.40 ± 0.04
Rendimento osservato (Y_{OBS}^{SBR})	COD _{VSS} /COD _{SOL}	0.49 ± 0.05	0.42 ± 0.06	0.54 ± 0.08
Ammonio nell'effluente (N-NH ₄ ⁺)	mgN-NH ₄ ⁺ /L	2.6 ± 1.2	0.8 ± 0.5	3.5 ± 0.9
Fosfato nell'effluente (P-PO ₄ ³⁻)	mg P-PO ₄ ³⁻ /L	1.8 ± 0.5	1.9 ± 0.4	2.1 ± 0.3
COD _{SOL} nell'effluente	mgCOD _{SOL} /L	204 ± 37	102 ± 24	116 ± 8

La velocità specifica di rimozione del substrato riferita ai VFA ($qVFA^{feast}$) risulta essere più bassa nel primo periodo (332 mgCOD_{VFA}/gX_A·h), mentre nel secondo e nel terzo tende ad aumentare (rispettivamente 619 e 634 mgCOD_{VFA}/gX_A·h). Questo potrebbe essere dovuto ad una minore efficacia di selezione della biomassa, con presenza nel primo periodo di un consorzio microbico meno performante dal punto di vista dello stoccaggio del PHA, normale nelle fasi iniziali di start-up della selezione. Il rendimento di stoccaggio del polimero sulla base del consumo dei VFA (valori medi di $Y_{P/VFA}^{feast}$: 0.30, 0.34 e 0.40 COD_{PHA}/COD_{VFA}) risulta essere maggiore rispetto a quello basato sul COD_{SOL} (valori medi di $Y_{P/S}^{feast}$: 0.22, 0.26 e 0.36 COD_{PHA}/COD_{SOL}), in quanto quest'ultimo comprende anche quella quota di COD non VFA che non contribuisce alla produzione del polimero. Osservando i valori medi si può notare una differenza più marcata tra i due rendimenti nel primo periodo (0.22 e 0.30) mentre nel secondo e soprattutto nel terzo periodo questa differenza tende a diminuire (0.26 e 0.30 nel secondo, 0.36 e 0.40 nel terzo). Questi valori forniscono un'ulteriore conferma del fatto che nel primo periodo fossero presenti dei microrganismi non PHA accumulanti capaci di consumare COD non VFA. Il terzo periodo è caratterizzato da un rendimento di stoccaggio del polimero più alto e da una minore differenza tra i rendimenti su base VFA e COD_{SOL}, quindi il periodo con performance migliori. Per quanto riguarda la presenza di nutrienti quali ammonio, fosforo e carbonio solubile nell'effluente si può notare come nei tre periodi le concentrazioni relative a tali nutrienti si mantengono attorno a valori abbastanza bassi. Questo può influenzare positivamente il processo di stoccaggio del polimero, in quanto basse concentrazioni di azoto e fosforo possono essere favorevoli al miglioramento della produzione di PHA, limitando la sintesi proteica e portando ad una risposta biologica verso l'accumulo del polimero come riserva di carbonio ed energia (Venkateswar Reddy e Venkata Mohan, 2012).

5.2 Comportamento e prestazioni della biomassa nei test batch di accumulo

La capacità di accumulo del PHA da parte della biomassa selezionata in SBR1 è stata valutata attraverso batch test, eseguiti sia su substrato sintetico che reale. Nel primo caso è stata utilizzata una soluzione di acido acetico concentrata, mentre nel secondo è stato impiegato il permeato di membrana ottenuto da F-II e poi quello ottenuto da F-III. Si è preferito non utilizzare F-I in quanto, come discusso nel paragrafo 5.1, esso è risultato essere il substrato che ha portato a un'efficienza di selezione. In figura 11 sono riportati l'andamento del contenuto di PHA intracellulare e delle concentrazioni di PHA e di acetato. Questi parametri derivano da un test batch nel quale è stata utilizzata una biomassa selezionata e arricchita con permeato di membrana (F-III) e alimentata con acetato.

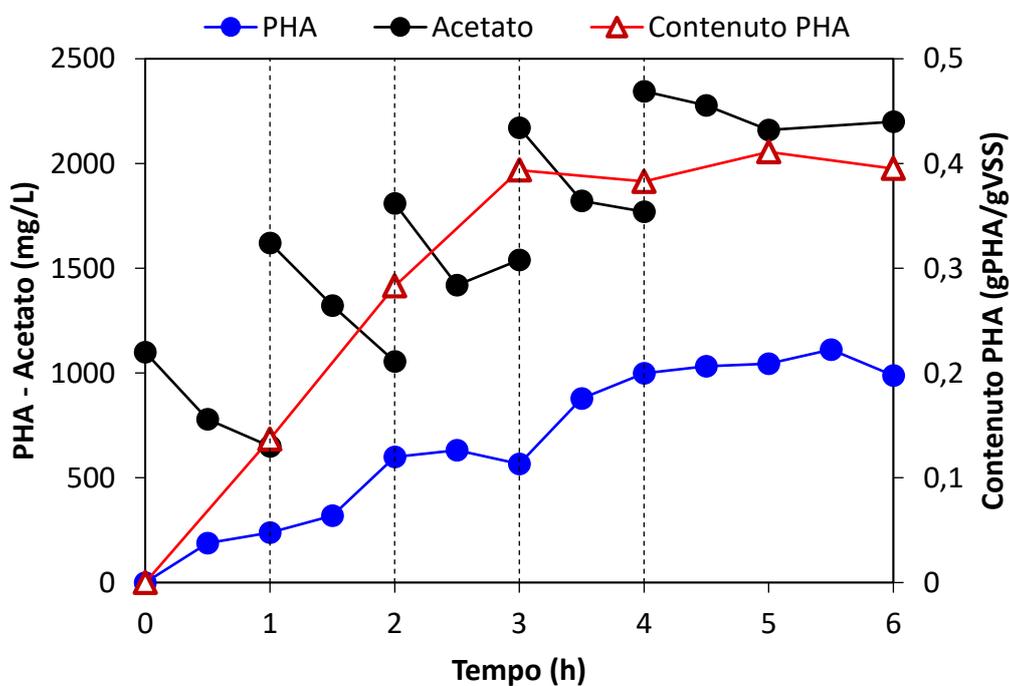


Figura 11: Test batch di accumulo condotto con biomassa arricchita in SBR1 con F-III e acetato.

Il contenuto di PHA cresce linearmente nelle prime tre ore, per poi subire qualche piccola variazione e arrivare ad un valore finale di 0.4 gPHA/gVSS, in modo simile alla concentrazione di PHA che cresce linearmente arrivando fino a 988 mg/L.

La velocità di rimozione dell'acetato si mantiene abbastanza costante fino alla quarta aggiunta, dopo la quale decresce considerevolmente.

La figura 12 mostra l'andamento del contenuto di PHA e delle concentrazioni di PHA e VFA misurate nel test batch condotto con biomassa selezionata e arricchita con permeato (F-III) e alimentata con lo stesso permeato anche nella fase di accumulo.

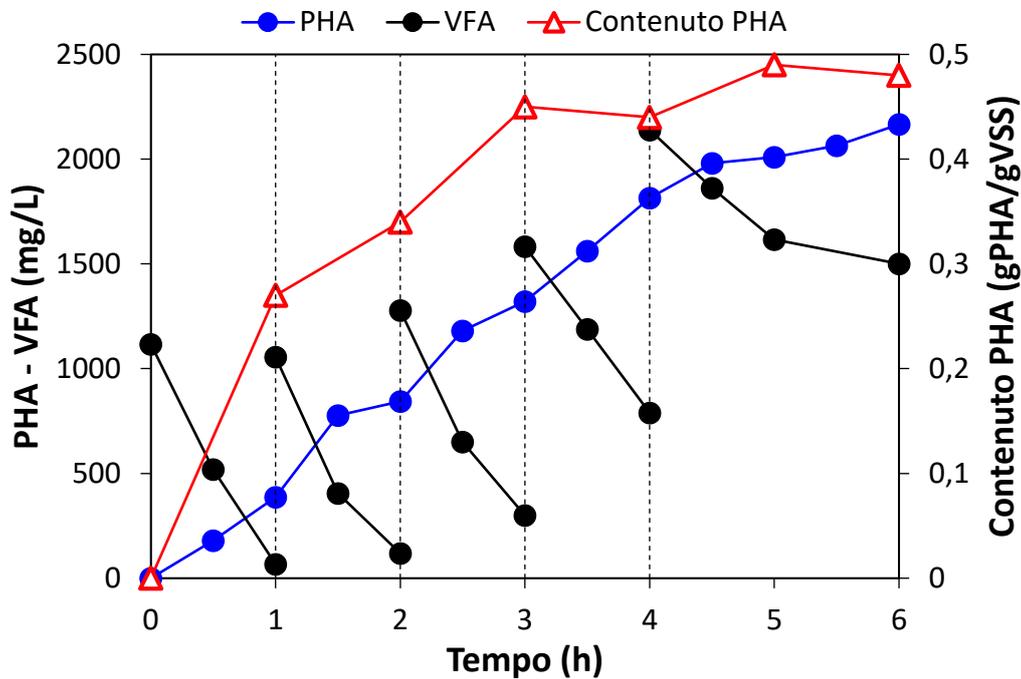


Figura 12- Test batch di accumulo condotto con biomassa arricchita in SBR F-III e substrato reale (permeato da F-III)

Il contenuto di PHA cresce linearmente fino alla quinta ora, per poi attestarsi ad un valore di 0.48 gPHA/gVSS durante l'ultima ora. La produzione di PHA è molto elevata, con una concentrazione finale di 2166 mg/L. La rimozione dei VFA risulta essere veloce nelle prime 4 ore, mentre nelle ultime due subisce un rallentamento, portando ad un accumulo di VFA nella prova. Confrontando i risultati ottenuti dalle due prove di accumulo, si può notare come il consumo del substrato sia avvenuto con tassi differenti, comportando una produzione di polimero notevolmente più consistente nella prova con substrato reale. Il consumo del substrato è stato molto più veloce nella seconda prova, come dimostrato dalla pendenza molto maggiore rispetto a quella della prima prova, dove l'acetato tende ad accumularsi nel tempo.

La produzione del polimero è avvenuta in entrambi i casi abbastanza linearmente per le prime 3 ore, ma con ritmi differenti. Il contenuto del polimero nel primo batch si ferma al 40%, mentre nel secondo arriva quasi al 50%. Nella seconda prova la concentrazione di PHA passa da 988 mg/L a 2166 mg/L, più del doppio rispetto a quella ottenuta con l'accumulo di acetato.

La produzione di polimero notevolmente superiore del secondo batch è stata probabilmente influenzata dalla presenza dei nutrienti all'interno del permeato, assenti invece nel substrato sintetico. I nutrienti hanno permesso la crescita di nuova biomassa PHA accumulante, senza limitare lo stoccaggio del PHA. Al contrario, la soluzione sintetica di acetato non ha consentito la crescita di nuova biomassa e di conseguenza l'intero potenziale di produzione di PHA del consorzio microbico era più limitato. Lo stoccaggio del PHA in questo caso è stato favorito dalla presenza di nutrienti, e quindi dalla conseguente crescita simultanea di organismi PHA accumulanti. Tuttavia, prestazioni migliori rispetto all'acetato potrebbero anche essere dovute al fatto che la biomassa era stata selezionata e arricchita in SBR1 utilizzando lo stesso permeato F-III e non una soluzione di acetato concentrata.

In tabella 6 vengono riportati i principali risultati ottenuti dai batch test eseguiti con substrati diversi (acetico, F-II e F-III), confrontandoli con esempi di letteratura nei quali sono stati usati rifiuti organici o matrici simili (lisciviato, percolato, FORSU fermentata, miscela di FORSU e fango primario, rifiuti alimentari, FORSU pretrattata, miscela di VFA sintetici).

Tabella 6- Sintesi dei principali risultati ottenuti dai batch test di accumulo e confronto con studi precedenti incentrati sulla valorizzazione dei rifiuti alimentari.

Flusso ricco di VFA	Contenuto PHA (gPHA/gVSS)	Composizione polimero (% HB/HV, g/g)	$Y_{P/VFA}^{batch}$ (COD/COD)	$Y_{X/VFA}^{batch}$ (COD/COD)	qP^{batch} (mgCOD _{PHA} /gCOD _{Xa} /h)	Produttività PHA (gPHA/L h)	Bibliografia
Acetato (sintetico) ^a	0.40 ± 0.02	100/0	0.67 ± 0.05	0.08 ± 0.01	202 ± 33	0.20 ± 0.04	Questo studio
Miscela FORSU-fango (F-II)*	0.43 ± 0.01	87/13	0.44 ± 0.03	0.24 ± 0.07	301 ± 81	0.29 ± 0.04	Questo studio
Miscela FORSU-fango (F-III)*	0.46 ± 0.05	90/10	0.50 ± 0.04	0.26 ± 0.08	279 ± 41	0.36 ± 0.05	Questo studio
Lisciviato	0.78 ^{b,c}		0.33 ^b -0.40 ^c				Korkakaki et al., 2016
Percolato*	0.41-0.48	54-57/46-43	0.66-1.13			0.18-0.29	Colombo et al., 2017
FORSU*	0.11		0.22	0.36	20		Basset et al., 2016
Miscela FORSU-fango primario*	0.09		0.011	0.47	11		
Rifiuti alimentari*	0.24	60/40			11-42		Amulya et al., 2015
FORSU pretrattata	0.39-0.52	93-87/7-13	0.43-0.57	0.19-0.28	255-436	0.28-0.49	Valentino et al., 2018
Miscela di VFA sintetici ^a	0.48 ± 0.03	88/12	0.53 ± 0.03		196 ± 13	0.17 ± 0.02	Valentino et al., 2014

*alimento fermentato

^a Senza nutrienti aggiunti (COD:N:P=100:0:0)

^b Biomassa arricchita con miscela di VFA sintetici (90% v/v) e lisciviato (10% v/v)

^c Biomassa arricchita con miscela di VFA sintetici (75% v/v) e lisciviato (25% v/v)

Il confronto con i dati riportati in letteratura in studi precedenti che adottavano la stessa configurazione di processo ha evidenziato i promettenti risultati ottenuti in questo lavoro. Nel primo studio (Korkakaki *et al.*, 2016) è stato utilizzato un lisciviato ottenuto da FORSU come substrato per la produzione di PHA. La biomassa è stata in grado di accumulare un alto livello di polimero, con un contenuto di PHA pari a 0.78 gPHA/gVSS. Questo risultato è stato ottenuto selezionando e arricchendo la biomassa con una miscela di lisciviato e VFA sintetici (prima 75% e poi 90% di VFA). Inizialmente l'arricchimento era stato effettuato solamente con lisciviato, ma la selezione di microrganismi PHA accumulanti era stata insufficiente. Nel secondo studio (Colombo *et al.*, 2017) è stato utilizzato come substrato un percolato ottenuto da FORSU ricco in VFA. Il contenuto di PHA accumulato dalla biomassa è stato di 0.41-0.48 gPHA/gVSS, simile a quello ottenuto con questo studio utilizzando F-III (0.46 gPHA/gVSS). Anche le prestazioni di stoccaggio ($Y_{P/VFA}^{batch}$, qP^{batch} e la produttività) sono comparabili con questo studio, ad eccezione della composizione del PHA. Usando il percolato come substrato, la composizione di PHA era caratterizzata da elevato rapporto di HB e HV (54-57% di HB e 46-43% di HV in peso), con un contenuto di HV maggiore rispetto a quello ottenuto con F-III (90% di HB e 10% di HV in peso). Nel terzo studio (Basset *et al.*, 2016) la fonte di carbonio utilizzata durante le fasi di selezione e accumulo era costituita da un liquido di fermentazione derivante prima da sola FORSU, e poi da una miscela di FORSU e fango primario. In entrambi i casi, la biomassa è stata in grado di accumulare fino a 0.11 gPHA/gVSS (con sola FORSU) e 0.09 gPHA/gVSS (con miscela di FORSU e fango primario), risultati molto inferiori rispetto a quelli ottenuti con il presente lavoro. Nel quarto studio (Amulya *et al.*, 2015) è stata valutata la produzione di PHA attraverso un'operazione multistadio, nella quale venivano utilizzati scarti alimentari come substrato dopo fermentazione acidogenica. La miscela di VFA veniva utilizzata poi come alimento nelle fasi di selezione e di accumulo. Il substrato ottenuto presentava basse concentrazioni di VFA (circa 6 gCOD_{VFA}/L) e un maggior contenuto di COD_{SOL}, che hanno influenzato negativamente il contenuto di PHA (0.24 gPHA/gVSS) e la velocità di produzione del polimero (11-42 mgCOD_{PHA}/gCOD_{XA}/h). Nell'ultimo studio (Valentino *et al.*, 2018) viene descritto un processo integrato multifase condotto in piattaforma pilota nella quale viene utilizzata FORSU come substrato per la produzione di PHA e biogas. Il substrato fermentato era ricco in VFA con elevato rapporto

VFA/COD_{SOL} (0.90 COD/COD), ed è stato poi utilizzato nelle successive fasi aerobiche di selezione e accumulo. Nei batch test la biomassa era in grado di accumulare alte quantità di polimero, con un contenuto di PHA pari a 0.39-0.52 gPHA/gVSS. I risultati ottenuti in questo studio sono stati comparabili con il presente lavoro in termini di contenuto di PHA, tasso di produzione, resa, produttività e composizione del polimero. Tuttavia, rispetto all'approccio precedente, lo schema di processo qui proposto offre la possibilità di trattare simultaneamente diversi flussi raccolti nella stessa area urbana. In questo modo un'unica tecnologia può essere utilizzata per una gestione efficiente e integrata dei rifiuti urbani.

5.3 Rendimento complessivo di PHA e possibili prospettive future

L'analisi dei dati di ogni unità pilota, comprese le due unità di separazione solido/liquido, è stata correlata alla quantificazione della resa complessiva di PHA, determinando la quantità di TVS necessari per la produzione di 1 kg di PHA. Il diagramma dei flussi di massa relativo alla produzione di PHA è rappresentato in figura 13.

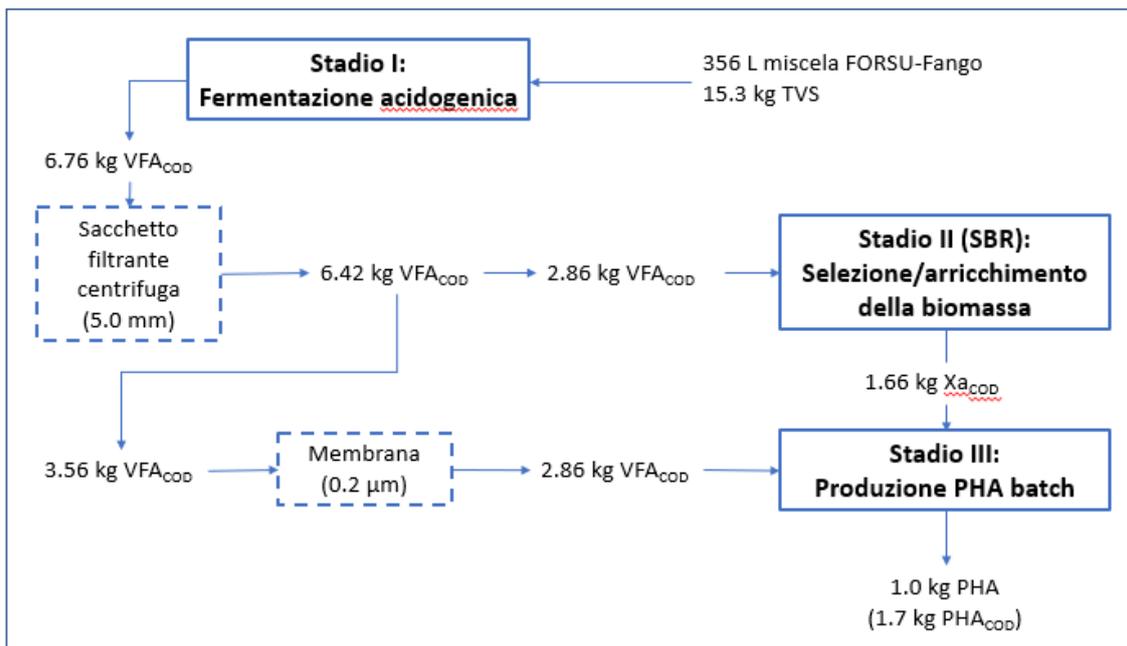


Figura 13: Diagramma dei flussi di massa della produzione di PHA da miscela di FORSU-fango.

Considerando la composizione percentuale del polimero ottenuto con F-III (14% di HV e 86% di HB in peso) e i relativi fattori di conversione, 1 kg di PHA corrisponde a 1.70 kg di PHA_{COD}. Il calcolo è stato fatto a ritroso partendo dal contenuto finale di PHA nella

biomassa, pari a 0.46 gPHA/gVSS. Per mantenere tale quantità, è necessario produrre 1.17 kg (o 1.66 kg_{COD}) di biomassa attiva X_A . Dalla resa di stoccaggio ($Y_{P/VFA}^{batch}$) pari a 0.50 PHA_{COD}/VFA_{COD}, è stata determinata la quantità di VFA necessaria per la fase di accumulo, corrispondente a 3.38 kg di VFA_{COD}^{batch}. Dalla resa osservata di X_A (Y_{XA}^{SBR}) pari a 0.58 X_{ACOD} /VFA_{COD} è stato calcolato il contributo di VFA per la fase di selezione di 2.86 kg di VFA_{COD}^{SBR}.

Per la produzione del polimero in entrambe le fasi è stato stimato un contributo totale di 6.24 kg di VFA_{COD}. Poiché l'utilizzo dell'unità di separazione solido/liquido (membrana) comporta una riduzione del carico volumetrico di F-III del 5%, la quantità di VFA_{COD} per la fase di accumulo deve essere aumentata a 3.56 kg di VFA_{COD}, per un totale di 6.24 kg di VFA_{COD}. È stata presa in considerazione anche la leggera ritenzione di F-III nel sacchetto filtrante della centrifuga (circa 5%), pertanto il consumo totale di VFA_{COD} diventa di 6.76 kg. Essendo la concentrazione di VFA in F-III pari a 19 gCOD/L, sarà necessario un volume totale di 356 L di F-III. Considerando una concentrazione di TVS di 43 g/kg nel feedstock (prima della fermentazione acidogenica), la quantità di TVS necessari per la produzione di 1 kg di PHA è pari a 15.3 kg di TVS, che corrisponde ad una resa complessiva di 65 gPHA/kgTVS.

6. CONCLUSIONI

I risultati ottenuti in questa sperimentazione hanno mostrato l'effettiva fattibilità tecnica del processo per la produzione di polimeri biodegradabili (PHA) a partire da matrici di scarto di natura organica.

L'utilizzo di un refluo fermentato con un'elevata concentrazione di VFA rispetto al COD solubile (maggiore del 70%) ha portato alla selezione e all'arricchimento di una biomassa con spiccate capacità di stoccaggio, attraverso la ben nota e consolidata tecnologia feast-famine. Nel tipico ciclo operativo la durata della fase feast presentava un valor medio del 10% rispetto alla lunghezza del ciclo, sufficientemente breve da garantire un efficiente arricchimento della coltura in microrganismi PHA-accumulanti. Al termine delle prove batch di accumulo eseguite con questa biomassa, è stato quantificato un rendimento di stoccaggio del polimero intorno al 50% COD/COD e un contenuto massimo di PHA del 46% g/g. dei rifiuti in ambito urbano.

Dal bilancio di massa effettuato in scala pilota è emerso che la resa complessiva del processo di produzione di PHA da rifiuti organici è pari al 6,5% in peso rispetto ai TVS presenti nel flusso di rifiuti in ingresso, composto da FORSU e fango di depurazione.

L'impianto pilota permetterebbe quindi lo sviluppo di una bioraffineria urbana, con valorizzazione dei rifiuti organici prodotti e raccolti all'interno della stessa area urbana. L'impiego di un rifiuto come substrato di partenza potrebbe comportare la diminuzione di una voce di spesa consistente per il suo smaltimento, andando inoltre a valorizzare il rifiuto stesso come risorsa. Questa filiera permetterebbe di ricavare prodotti con un certo valore aggiunto, che possono cambiare lo scenario della gestione dei rifiuti in ambito urbano.

7. BIBLIOGRAFIA

- Akaraonye E., Keshavarz T., Roy I. (2010). Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice. *J Chem Technol Biotechnol*; 85: pp. 732-743.
- Albuquerque M.G.E., Martino V., Pollet E., Avérous L., Reis M.A.M. (2011). Mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from volatile fatty acid (VFA)-rich streams: Effect of substrate composition and feeding regime on PHA productivity, composition and properties. *Journal of Biotechnology*; 151(1): pp. 66–76.
- Ali I., Jamil N. (2016). Polyhydroxyalkanoates: Current applications in the medical field. *Front. Biol.*; 11(1): pp. 19–27.
- Amulya K., Srinivas Jukuri, Venkata Mohan S. (2015). Sustainable multistage process for enhanced productivity of bioplastics from waste remediation through aerobic dynamic feeding strategy: Process integration for up-scaling. *Biores. Technol*; 188: pp. 231-239.
- Anterrieu S., Quadri L., Geurkink B., Dinkla I., Bengtsson S., Arcos-Hernandez M., Alexandersson T., Morgan-Sagastume F., Karlsson A., Hjort M., Karabegovic L., Magnusson P., Johansson P., Christensson M., Werker A. (2014). Integration of biopolymer production with process water treatment at a sugar factory. *New Biotechnol.*; 31: pp. 308–323.
- APAT, IRSA-CNR (2003). Metodi analitici per le acque. *APAT, Manuali e linee guida 29/2003*, Roma IT.
- APHA, AWWA, WEF (1998). Standard Methods for the Examinations of Water and Wastewater. 20th Edition. A cura di Clesceri L. S., Eaton A.D., Greenberg A. E.; *American Public Health Association*, 1015 Fifteenth Street, NW. Washington, DC 20005-2605.
- Basset N., Katsou E., Frison N., Malamis S., Dosta J., Fatone, F. (2016). Integrating the selection of PHA storing biomass and nitrogen removal via nitrite in the main wastewater treatment line. *Biores. Technol*; 200: pp. 820-829.
- Bengtsson S., Hallquist J., Werker A., Welander T. (2008). Acidogenic fermentation of industrial wastewaters: Effects of chemostat retention time and pH on volatile fatty acids production. *Biochemical Engineering Journal*; 40(3): pp 492–499.

- Braguglia C.M., Gianico A., Mininni G. (2013). Riduzione della produzione dei fanghi di depurazione. *Energie e Ambiente*; 12: pp. 41-45.
- Braunegg G., Sonnleimer B. and R.M., L. (1978). A Rapid Gas Chromatographic Method for the Determination of Poly- β -hydroxybutyric Acid in Microbial Biomass. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol*; 6: pp. 29-37.
- Chen G.Q. (2010). Plastics Completely Synthesized by Bacteria: Polyhydroxyalkanoates. *Microbiology Monographs*; 14: pp. 17-37.
- Chen Y., Hung S.T., Chou E., Wu H.S. (2018). Review of Polyhydroxyalkanoates Materials and other Biopolymers for Medical Applications. *Organic Chemistry*; 15: pp. 105-121.
- Chodak I. (2008). Polyhydroxyalkanoates: Origin, Properties and Applications. In *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*. M. Belgacem & A. Gandini. 1th Edition: pp. 451-477.
- Cossu R., Raga R., Repetti R., Testolin G. (2011). Controllo degli impatti delle discariche per RSU. *Recycling*; pp. 27-31.
- De Oliveira G.H.D., Niz M.Y.K., Zaiat M., Rodrigues J.A.D. (2019). Effects of the Organic Loading Rate on Polyhydroxyalkanoate Production from Sugarcane Stillage by Mixed Microbial Cultures. *Applied Biochemistry and Biotechnology*.
- Duque A.F., Oliveira C.S.S., Carmo I.T.D., Gouveia A.R., Pardelha F., Ramos A.M., Reis M.A.M. (2014). Response of a three-stage process for PHA production by mixed microbial cultures to feedstock shift: impact on polymer composition. *New Biotechnology*; 31(4): pp. 276–288.
- European Bioplastics (2018). Bioplastics Market Data 2018 – Global production capacities of bioplastics 2018-2023. *European Bioplastics*. https://www.european-bioplastics.org/wp-content/uploads/2016/02/Report_Bioplastics-Market_Data_2018.pdf
- European Commission (2015). Communication from the Commission to the European Parliament, the Council, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions. Closing the loop – An EU action plan for the Circular Economy. COM/2015/0614 final: pp. 9-10.
- <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A52015DC0614>

European Commission (2018). Economia circolare: con le nuove norme l'UE si pone in prima linea a livello mondiale nella gestione e nel riciclaggio dei rifiuti. *European Commission Italy News*.

https://ec.europa.eu/italy/news/20180522_economia_circolare_it

Evoware, <https://www.evoware.id> (Consultato il 15/03/2019)

Frison N., Katsou E., Malamis S., Oehmen A., Fatone F. (2015). Development of a Novel Process Integrating the Treatment of Sludge Reject Water and the Production of Polyhydroxyalkanoates (PHAs). *Environmental Science & Technology*; 49(18): pp. 10877–10885.

Geyer R., Jambeck J.R. e Law K.L. (2017). Production, use and fate of all plastic ever made. *Science Advances*; 3(17).

Gilbert M. (2016). Brydson's Plastics Materiales. 8th Edition. *Elsevier, William Andrew*; Norwich, NY, USA.

Gobi K., Vadivelu V.M. (2014). Aerobic dynamic feeding as a strategy for in situ accumulation of polyhydroxyalkanoate in aerobic granules. *Bioresource Technology*; 161: pp. 441–445.

Gujer W., Henze M. (1991). Activated sludge modelling and simulation. *Wat. Sci. Tech.*; 23: pp. 1011-1023.

INAIL, (2017). Bioprocessi per la valorizzazione di rifiuti organici. Salute e sicurezza nelle biotecnologie industriali. *Progetto Inail BRIC 2015*. Edizione 2017: pp. 44-52.

ISPRA (2018). Rapporto Rifiuti Speciali. Rapporto Rifiuti Speciali. Edizione 2018; 285: pp. 280-286.

http://www.isprambiente.gov.it/files2018/pubblicazioni/rapporti/Rapporto_285_2018.pdf

ISPRA (2018). Rapporto Rifiuti Urbani. Rapporto Rifiuti Urbani. Edizione 2018; 297: pp. 3-47.

<http://www.isprambiente.gov.it/files2018/pubblicazioni/rapporti/RapportoRif297.pdf>

Karlsson A. (2010). Production of polyhydroxyalkanoates in an open mixed culture from fermented hydrolyzed sludge under high organic loading rates. *Water Res*; 44: pp. 5196–5211.

Keshavarz T., Roy I. (2010). Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current Opinion in Microbiology*; 13: pp. 321–326.

- Khosravi-Darani K., Bucci D. Z. (2015). Application of Poly(hydroxyalkanoate) In Food Packaging: Improvements by Nanotechnology. *Chem. Biochem. Eng. Q.*; 29(2): pp. 275–285.
- Koller M., Salerno A., Dias M., Reiterer A., BrauneGG G. (2009). Modern Biotechnological Polymer Synthesis: A Review. *Food Technol. Biotechnol.*; 48(3): pp. 255–269.
- Koller M., Gasser I., Schmid F., Berg G. (2011). Linking ecology with economy: insights into polyhydroxyalkanoate-producing microorganisms. *Eng Life Sc.*; 11: pp. 222–37.
- Koller M. (2017). Advances in Polyhydroxyalkanoates (PHA) Production. *Bioengineering*; 4(88).
- Koller M., Maršálek L., Miranda de Sousa Dias M., BrauneGG G. (2017). Producing microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) biopolyesters in a sustainable manner. *New Biotechnology*; 37: pp. 24-38.
- Korkakaki E., van Loosdrecht M.C.M., Kleerebezem R. (2016). Survival of the fastest: Selective removal of the side population for enhanced PHA production in a mixed substrate enrichment. *Bioresour. Technol.*; 216: pp. 1022–1029.
- Kourmentza C., Placido J., Venetsaneas N., Burniol-Figols A., Varrone C., Gavala H., Reis M.A.M. (2017). Recent advances and challenges towards sustainable polyhydroxyalkanoates (PHA) production. *Bioengineering*; 4(2): 55.
- Kunasundari B., Sudesh K. (2011). Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. *EXPRESS Polymer Letters*; 5(7): pp. 620–634.
- Lu J., Tappel R.C., Nomura C.T. (2009). Mini-Review: Biosynthesis of Poly(hydroxyalkanoates). *Polymer Reviews*; 49(3): pp. 226–248.
- Moretto G., Ardolino F., Piasentin A., Girotto L., Cecchi F. (2019). Integrated anaerobic codigestion system for the organic fraction of municipal solid waste and sewage sludge treatment: an Italian case study. *J Chem Technol Biotechnol.*
- Morgan-Sagastume F. (2016). Characterisation of open, mixed microbial cultures for polyhydroxyalkanoate (PHA) production. *Environmental Science and Bio/Technology*; 15(4): pp. 593–625.
- Ojumu T.V., Yu J., Solomon B.O. (2004). Production of polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. *African Journal of Biotechnology*; 3(1): pp. 18-24.

Pederson E.N., McChalicher C.W. J. and Srienc F. (2006). Bacterial Synthesis of PHA Block Copolymers. *Biomacromolecules*; 7: pp. 1904-1911.

Pittmann T., Steinmetz H. (2017). Polyhydroxyalkanoate Production on Waste Water Treatment Plants: Process Scheme, Operating Conditions and Potential Analysis for German and European Municipal Waste Water Treatment Plants. *Bioengineering*; 4 (54).

PlasticsEurope (2018). Plastics-the Facts 2018.

https://www.plasticseurope.org/application/files/6315/4510/9658/Plastics_facts_2018_AF_web.pdf

Raza Z.A., Abid S., Banat I.M. (2018). Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration & Biodegradation*; 126: pp. 45–56.

Reddy C.S.K., Rashmi R. G. and Kalia V.C. (2003). Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*; 87: pp. 137–146.

Reis M.A.M., Serafim L.S., Lemos P.C., Ramos A.M. (2003). Production of polyhydroxyalkanoates by mixed microbial cultures. *Bioprocess Biosyst Eng*; 25: pp. 377-385.

Reis M.A.M., Albuquerque M., Villano M., Majone M. (2011). Mixed Culture Processes for Polyhydroxyalkanoates Production from Agro-Industrial Surplus/Wastes as Feedstocks. In *Comprehensive biotechnology.*: Fava F., Agathos S., Young M. Elsevier, Amsterdam; pp: 669-683.

Rivera-Briso A.L., Serrano-Aroca A. (2018). Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate): Enhancement Strategies for Advanced Applications. *Polymers*; 10(732).

Scott G. (2013). Degradable polymers: principles and applications. 2th Edition. *Springer Science & Business Media*; pp. 235-293.

Serafim L.S., Lemos P.C., Albuquerque M.G.E., Reis M.A.M. (2008). Strategies for PHA production by mixed cultures and renewable waste materials. *Appl Microbial Biotechnol*; 81: pp. 615-628.

Shen L., Haufe J., Patel M.K. (2009). Product overview and market projection of emerging biobased plastics (PRO-BIP 2009). European Polysaccharide Network of

Excellence (EPNOE) and European Bioplastics. University of Utrecht, The Netherlands: pp. 97-112.

Silva F., Campanari S., Matteo S., Valentino F., Majone M., Villano M. (2017). Impact of nitrogen feeding regulation on polyhydroxyalkanoates production by mixed microbial cultures. *New Biotechnology*; 37: pp. 90-98.

Skipping Rocks Lab, <https://www.skippingrockslab.com> (Consultato il 16/03/2019).

Sudesh K., Abe H., Doi Y. (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*; 25: pp. 1503-1555.

Valentino F., Morgan-Sagastume F., Campanari S., Villano M., Werker A., Majone M. (2017). Carbon recovery from wastewater through bioconversion into biodegradable polymers. *New Biotechnology*; 37: pp. 9-23.

Valentino F., Gottardo M., Micolucci F., Pavan P., Bolzonella D., Rossetti S., Majone, M. (2018). Organic fraction of municipal solid waste recovery by conversion into added-value polyhydroxyalkanoates and biogas. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*.

Valera M. (2001). Poliidrossialcanoati polimeri biodegradabili del futuro?. *Chimica & Industria*; 5: pp. 49-56.

Venkateswar Reddy M., Venkata Mohan S. (2012). Effect of substrate load and nutrients concentration on the polyhydroxyalkanoates (PHA) production using mixed consortia through wastewater treatment. *Bioresource Technology*; 114: pp. 573-582.

Verlinden R.A.J., Hill D.J., Kenward M.A., Williams C.D., Radecka I. (2007). Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*; 102: pp. 1437-1449.

Wang X., Oehmen A., Freitas E.B., Carvalho G., Reis M.A.M. (2017). The link of feast-phase dissolved oxygen (DO) with substrate competition and microbial selection in PHA production. *Water Research*; 112: pp. 269-278.

Zinn M. (2003). Tailor-made synthesis of polyhydroxyalkanoates. *European Cells and Materials*; 5: pp. 38-39.