

BIOPROCESSI INNOVATIVI PER LA VALORIZZAZIONE DI RIFIUTI ORGANICI

INAIL

Salute e sicurezza nelle biotecnologie industriali
Progetto Inail BRIC 2015

2017



Biotecnologie
Biogas
Bioidrometano
Biopolimeri

COLLANA **SALUTE E SICUREZZA**

BIOPROCESSI INNOVATIVI PER LA VALORIZZAZIONE DI RIFIUTI ORGANICI

INAIL

Salute e sicurezza nelle biotecnologie industriali
Progetto Inail BRIC 2015

2017

Pubblicazione realizzata da

Inail

Dipartimento innovazioni tecnologiche
e sicurezza degli impianti, prodotti e insediamenti antropici (*Dit*)

Responsabili scientifici del progetto

Biancamaria Pietrangeli¹
Mauro Majone²

Segreteria scientifica

Roberto Lauri¹
Emma Incocciati³
Mara Stefanelli¹

1 *Inail, Dit*

2 *Università di Roma "Sapienza" (Unirm), Dipartimento di Chimica*

3 *Consulenza Tecnica Accertamento Rischi e Prevenzione (Contarp)*

Immagine di copertina

Chiara Piccirilli

per informazioni

Inail

Dipartimento innovazioni tecnologiche e sicurezza degli impianti,
prodotti e insediamenti antropici
Via Roberto Ferruzzi 38/40 - 00143 Roma
dit@inail.it
www.inail.it

© 2017 Inail

ISBN 978-88-7484-584-2

Gli autori hanno la piena responsabilità delle opinioni espresse nella pubblicazione, che non vanno intese come posizioni ufficiali dell'Inail.

Distribuita gratuitamente. Vietata la vendita e la riproduzione con qualsiasi mezzo.
È consentita solo la citazione con l'indicazione della fonte.

INDICE

INTRODUZIONE	5
Basi razionali dello studio	5
Articolazione dello studio in obiettivi specifici	7
CAPITOLO 1: Innovazioni nella digestione anaerobica	11
Attività 1.1: Processo termofilo a due fasi (scala pilota)	11
Attività 1.2: Processo con pretrattamento termico (scala di laboratorio)	19
CAPITOLO 2: Valutazione dei rischi igienico-sanitari connessi alla digestione anaerobica	23
Attività 2.1: Aspetti di igiene e sicurezza del lavoro nei bioprocessi innovativi proposti	23
Attività 2.2: Valutazioni igienico-sanitarie connesse al riuso del digestato come fertilizzante	37
CAPITOLO 3: Bioprocessi per la produzione di polimeri biodegradabili	44
Attività 3.1: Sviluppo di un bioprocesso a colture miste (scala pilota)	44
Attività 3.2: Verifica della stabilità della biocenosi del bioprocesso a colture miste e verifica della potenziale selezione di agenti patogeni	52
Attività 3.3: Studio di un bioprocesso a coltura pura con microrganismo geneticamente modificato (MOGM)	55
Attività 3.4: Verifica sperimentale del MOGM e del possibile rilascio ambientale di materiale genetico	57
CAPITOLO 4: Downstream del bioprocesso a coltura mista per la produzione di polimeri biodegradabili	65
Attività 4.1: Processo innovativo di estrazione/purificazione	65
Attività 4.2: Aspetti di salute e sicurezza dei processi di estrazione .	77
CAPITOLO 5: Analisi di mercato	79
5.1: Obiettivi, regole e costruzione del consenso	79
5.2: Consumi e produzione di energia da fonti rinnovabili	82
5.3: Produzione e trasformazione dei rifiuti organici urbani in Italia	89
5.4: Realizzazione e gestione di impianti di produzione e valorizzazione del biogas in Partenariato Pubblico-Privato	92
CAPITOLO 6: Considerazioni conclusive	98

INTRODUZIONE

Biancamaria Pietrangeli* e Mauro Majone**

*Inail, Dipartimento innovazioni tecnologiche e sicurezza degli impianti, prodotti e insediamenti antropici (Dit), Roma

** Dipartimento di Chimica, Università di Roma "Sapienza" (Unirm), Roma

Basi razionali dello studio

La presente Monografia si inquadra nelle finalità dell'attività di ricerca Inail-Dit "Sviluppo di processo nelle biotecnologie industriali e connessi aspetti di salute e sicurezza" ed è relativa ai risultati del progetto Inail BRIC 2015 **"Bioprocessi innovativi per la valorizzazione di rifiuti organici mediante produzione integrata di biogas/bioidrometano e polimeri biodegradabili: sviluppo di processo e connessi aspetti di salute e sicurezza"**.

La stessa descrive uno studio sperimentale multidisciplinare che è stato impostato a partire da due considerazioni iniziali:

- Le biotecnologie industriali hanno grande potenziale per lo sviluppo di processi di produzione a basso impatto ambientale ed a partire da materie prime rinnovabili. In tale ambito sono particolarmente interessanti i processi biotecnologici che utilizzano come materia prima i rifiuti organici, consentendone la piena valorizzazione verso prodotti utili e innovativi, in un'ottica di "economia circolare" che potrebbe contribuire alla ripresa economica del paese.
- Anche se i processi biotecnologici possono essere considerati come tendenzialmente "dolci", il loro sviluppo deve includere l'attenzione agli aspetti della salute e della sicurezza dei lavoratori sin dalla fasi iniziali dello sviluppo dei processi stessi [Pietrangeli et al., 2014]. Infatti, tali processi non sono del tutto esenti da stadi di tipo chimico-fisico, cui si aggiungono problematiche specifiche connesse all'impiego di agenti biologici.

Altri fattori da considerare sono:

- Ai fini dello sviluppo di filiere industriali efficaci dal punto di vista ambientale ed economico, la materia prima rinnovabile (il "feedstock" della filiera) deve avere caratteristiche peculiari, ovvero a) larga e diffusa disponibilità sul territorio, b) effettiva richiesta sul mercato dei prodotti ottenibili e c) scarsa disponibilità di usi alternativi (prima di tutto se in filiere "food"). Ciò motiva la scelta di utilizzare per questo progetto la frazione organica dei rifiuti solidi urbani (cosiddetta FORSU), ovvero la frazione dei rifiuti urbani con minor tasso di recupero "efficace". Attualmente, la principale via di recupero della FORSU è rappresentata dalla produzione del compost che però trova difficoltà di collocazione sul mercato, in particolare quando la FORSU non deriva da raccolta differenziata molto selettiva e capillare.
- Anche la valorizzazione mediante digestione anaerobica (DA) con produzione di biogas porta ad un prodotto di limitato valore aggiunto: il biogas ha infatti un elevato tenore di CO₂ e quindi non è utilizzabile tal quale in rete o per autotrazione. Inoltre, l'utilizzo del digestato anaerobico come fertilizzante in agricoltura incontra qualche difficoltà per possibile scarsa stabilizzazione e potenziale presenza di sostanze chimiche e microrganismi. Pur con questi limiti, la DA è oggi una tecnologia di grande interesse per la valorizzazione energetica e per il recupero di nutrienti dalla FORSU.

Partendo da queste considerazioni, lo studio si inquadra in un'ottica di "bioraffineria", puntando alla diversificazione dei prodotti ottenibili dalla FORSU, nonché all'incremento del loro valore economico.

Il progetto parte da una modifica sostanziale della DA, prevedendo un processo termofilo a due fasi, per arrivare alla produzione accoppiata di biogas/bioidrometano e di polimeri biodegradabili per bioplastiche.

Dal punto di vista della sostenibilità ambientale e della salute e sicurezza occupazionale, il bioprocesso proposto presenta molte delle caratteristiche salienti della DA e questo conferisce valenza anche più generale allo studio svolto. Nella filiera industriale da FORSU sono infatti individuabili rischi occupazionali di diversa natura che variano in relazione alla biomassa di partenza, ai pretrattamenti applicati ed alle diverse configurazioni di processo.

Il *feedstock* di partenza è un rifiuto organico ricco di microrganismi, tra i quali anche patogeni e/o patogeni opportunisti fonte di *biohazard* a seguito dell'esposizione del lavoratore a bioaerosol e polveri inalabili aero-disperse. Inoltre, i processi anaerobici possono produrre una selezione della flora microbica tale da promuovere la presenza di gruppi microbici di interesse sanitario, quali per esempio i clostridi, inizialmente poco rappresentati nella matrice di partenza. Due le aree di rischio biologico: la prima relativa al rischio occupazionale connesso alla esposizione dei lavoratori ad agenti biologici in ambienti, confinati e non dell'impianto, in cui sia previsto lo stoccaggio e la movimentazione di biomassa da avviare al processo anaerobico od in uscita dallo stesso [Traversi et al., 2015]. La seconda è relativa alla valorizzazione del fango di digestione che può costituire un veicolo di contaminazione microbica soprattutto se utilizzato come fertilizzante e quindi con un potenziale impatto occupazionale ed ambientale [Bonetta et al., 2014]. A tali problematiche, tipiche della DA, si aggiungono alcune peculiarità del processo di produzione del biopolimero.

Nel progetto sono stati considerati specifici aspetti di salute e sicurezza relativi a:

- Il *biohazard* connesso alla presenza di agenti biologici nelle diverse fasi dei bioprocessi sviluppati a partire da colture microbiche miste e da colture pure, inclusi microrganismi geneticamente modificati (MOGM), in condizioni sia aerobiche che anaerobiche.
- I potenziali impatti in termini di sostenibilità ambientale e sicurezza sul lavoro degli stadi di estrazione e purificazione dei prodotti (*downstream* del processo) di tipo chimico/fisico.

Pertanto, la presente monografia descrive le attività ed il derivante incremento delle conoscenze disponibili sulla tematica sopra delineata. In estrema sintesi:

- Incremento delle conoscenze su un bioprocesso ampiamente consolidato (DA convenzionale con produzione di biogas e digestato), ma sul quale persistono dubbi in materia di biosicurezza in relazione all'utilizzo di rifiuti come materie prime ed alla gestione del digestato anaerobico.
- Sviluppo di innovazioni specifiche rispetto alla DA convenzionale che possono conferire sia migliori prestazioni che maggiori garanzie in termini di abbattimento di agenti patogeni potenzialmente presenti (sviluppo di un processo termofilo a due fasi con eventuali pretrattamenti termici).
- Ulteriore innovazione con integrazione nella DA a due fasi di una filiera di produzione di polimeri biodegradabili, ovvero i poliidrossialcanoati (PHA) [Reis et al., 2011]; ciò aumenta il potenziale applicativo del processo complessivo per il maggior valore economico dei prodotti ottenuti.
- In quest'ultimo ambito sono state valutate due alternative di produzione del polimero, basate su a) colture microbiche miste e b) colture pure geneticamente modificate (MOGM). Le valutazioni in termini di salute e sicurezza sono state relative al controllo della stabilità della biocenosi e della potenziale selezione di agenti patogeni per le colture miste ed alla verifica del contenimento del MOGM e del possibile rilascio ambientale di materiale genetico.
- Specifica ulteriore innovazione per il miglioramento della sicurezza del *downstream* del processo, ossia gli stadi di estrazione e purificazione del polimero biodegradabile, con

l'eliminazione dell'uso di solventi clorurati, attualmente largamente impiegati a livello industriale, e minimizzazione delle condizioni operative di temperatura e/o pressione.

- Incremento delle conoscenze in materia di *biohazard* dei bioprocessi innovativi studiati, in relazione alla esposizione dei lavoratori a bioaerosol e polveri (PM 10 aerodisperso e contenuto endotossinico) durante le diverse operazioni ed alle caratteristiche igienico-sanitarie del digestato, in modo da orientare le azioni di prevenzione e controllo del rischio biologico.
- Analisi di mercato del ruolo che le bioenergie rivestono nell'ambito delle fonti energetiche rinnovabili ed indicazioni delle opportunità e criticità funzionali allo sviluppo di bioprocessi da rifiuti organici.

Articolazione dello studio in obiettivi specifici

La presente monografia riporta i risultati del progetto Inail BRIC 2015.

Le attività relative ai processi sviluppati ed agli aspetti di salute e sicurezza considerati sono riportate in sintesi nella Tabella 1.

Tabella 1 - Processi investigati e relativi fattori di rischio.

Sviluppo di processo	Livello di innovazione	Scala sperimentale	Partner principale	Aspetti di salute e sicurezza	Partner principale
Digestione anaerobica	Convenzionale come "benchmark" (monostadio, mesofila o termofila)	Pilota	UNIVE	Monitoraggio indicatori microbiologici: - Nelle varie sezioni di processo; - Nel digestato da avviare a spandimento. Monitoraggio polveri organiche inalabili.	UNITO
	Avanzata (processo termofilo a due fasi)	Pilota			
	Pretrattamento termico	Laboratorio	IRSA		
Produzione di biopolimero (da effluente della fase acidogenica)	Mediante colture microbiche miste	Pilota	UNIRM	Monitoraggio stabilità biocenosi. Identificazione ceppi.	IRSA/ UNIRM
				Mitigazione processo di estrazione/purificazione.	UNINA/ UNIRM
	Mediante colture microbiche pure geneticamente modificate (MOGM)	Laboratorio	UNIBO	Studio specifico sul contenimento del MOGM.	UNIBO

Come riportato in maggior dettaglio nella Tabella 2, il Progetto è stato ulteriormente articolato in obiettivi ed attività specifiche assegnate alle 8 Unità Operative che hanno composto il gruppo di lavoro.

Tabella 2 - Attività specifiche delle Unità Operative del Progetto

UNITÀ OPERATIVE COINVOLTE		
Unità Operativa 1	Responsabile	Compiti
Dipartimento di Chimica Università di Roma "Sapienza" (UNIRM)	Mauro Majone	Coordinamento scientifico del progetto Attività 3.1 Sviluppo bioprocesso di produzione biopolimero a colture miste. Attività 6.2 Contributo diffusione risultati.
Unità Operativa 2	Responsabile	Compiti
Dipartimento di Scienze Ambientali, Informatica e Statistica, Università di Venezia (UNIVE)	Paolo Pavan	Attività 1.1 Sviluppo processo avanzato di digestione anaerobica (termofilo a due fasi). Attività 6.2 Contributo diffusione risultati.
Unità Operativa 3	Responsabile	Compiti
Dipartimento di Ingegneria Civile, Chimica, Ambientale e dei Materiali, Università di Bologna (UNIBO)	Fabio Fava	Attività 3.3 Sviluppo bioprocesso di produzione biopolimero a coltura pura (MOGM). Attività 3.4 Valutazione del contenimento del ceppo (MOGM) e del materiale genetico. Attività 6.2 Contributo diffusione risultati.
Unità Operativa 4	Responsabile	Compiti
Dipartimento di Ingegneria chimica, dei Materiali e della Produzione Industriale, Università di Napoli (UNINA)	Roberto Andreozzi	Attività 4.1 Sviluppo processo innovativo di estrazione/purificazione del biopolimero. Attività 4.2 Valutazione in termini di salute e sicurezza. Attività 6.2 Contributo diffusione risultati.
Unità Operativa 5	Responsabile	Compiti
Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica e Pediatriche, Università di Torino (UNITO)	Giorgio Gilli	Attività 2.1: Valutazione <i>biohazard</i> per i lavoratori del settore della digestione anaerobica. Attività 2.2 Valutazione igienico-sanitaria del digestato per l'impiego come fertilizzante. Attività 6.2 Contributo diffusione risultati.
Unità Operativa 6	Responsabile	Compiti
Istituto di Ricerca sulle Acque, Consiglio Nazionale delle Ricerche (IRSA)	Camilla Braguglia	Attività 1.2 Sviluppo processo avanzato di digestione anaerobica (pretrattamento termico). Attività 3.2 Verifica stabilità della biocenosi del bioprocesso a colture miste e possibile selezione patogeni. Attività 6.2 Contributo diffusione risultati.
Unità Operativa 7	Responsabile	Compiti
Centro Ricerche Economiche Sociali di Mercato per l'Edilizia e il Territorio (CRESME)	Lorenzo Bellicini	Attività 5.1 Analisi di mercato bioenergie. Attività 6.2 Contributo diffusione risultati.
Unità Operativa Interna 8	Responsabile	Compiti
INAIL - Dipartimento Innovazioni Tecnologiche e Sicurezza degli Impianti, Prodotti e Insediamenti Antropici (Dit)	Biancamaria Pietrangeli	Monitoraggio progetto in raccordo con il Piano di attività della ricerca INAIL. Attività 6.1 Monitoraggio delle diverse fasi del Progetto. Attività 6.2 Monitoraggio attività connesse al trasferimento dei risultati.

BIBLIOGRAFIA

- Bonetta Si, Bonetta Sa, Ferretti E, Fezia G, Gilli G, Carraro E. 2014. Agricultural reuse of the digestate from anaerobic co-digestion of organic waste: microbiological contamination, metal hazards and fertilizing performance. *Water Air & Soil Pollution*, 225: 2046-2056.
- Pietrangeli B, Lauri R, Accardi DS. 2014. *Biotechnologie per lo sviluppo sostenibile: applicazioni e sicurezza*. Monografia INAIL Ricerca. p.1-183. ISBN 978-88-7484-385-5.
- Reis M, Albuquerque MG, Villano M, Majone M. 2011. Mixed Culture Processes for Polyhydroxyalkanoate Production from Agro-Industrial Surplus/Wastes as Feedstocks. In Moo-Young M, editor. *Comprehensive Biotechnology*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier, 2011. p. 669-83.
- Traversi D, Gorrasi I, Bonetta S, Leinardi R, Pietrangeli B, Carraro E, Gilli G. 2015. Green job bio-aerosol exposure during anaerobic digestion for biomass energetic valorization. *Environmental Research*, 138: 425-431.

CAPITOLO 1 - Innovazioni nella digestione anaerobica

Paolo Pavan*, **Marco Gottardo***, **Federico Micolucci***, **Camilla M. Braguglia****, **Agata Gallipoli****, **Andrea Gianico**** e **Pamela Pagliaccia****

* *Dipartimento di Scienze Ambientali, Informatica e Statistica, Università di Venezia (Unive), Venezia*

** *Istituto di Ricerca sulle Acque, Consiglio Nazionale delle Ricerche (Irsa), Roma*

In un'ottica di economia circolare si impone che le risorse vengano utilizzate in quantità limitate e in modo più sostenibile possibile: trasformare i rifiuti in risorsa entro il 2020 è uno degli obiettivi chiave della tabella di marcia verso un'Europa efficiente nell'impiego delle risorse [Commissione Europea, 2015].

Nel caso dei rifiuti solidi di origine urbana la strategia passa attraverso la raccolta differenziata, il riciclaggio e la valorizzazione delle risorse seconde. Una volta separata, la frazione organica dei rifiuti urbani (FORSU), biodegradabile, può essere trattata tramite un consolidato processo di tipo aerobico, detto compostaggio, oppure attraverso un processo di DA. Per quest'ultimo si prevede un trend di crescita significativo soprattutto per i vantaggi connessi alla possibilità di localizzazione degli impianti in aree peri-urbane, dove si può avere un'agevole combinazione con gli impianti di depurazione. Inoltre, il biometano, biocombustibile rinnovabile generato dall'*upgrading* del biogas prodotto dalla DA, può rappresentare una nuova frontiera nell'economia circolare, soprattutto nel settore dei trasporti.

Nel 2015 sono stati censiti in Europa circa 290 impianti di DA che trattano FORSU sia da raccolta differenziata che da selezione meccanica a valle, con una capacità di trattamento di circa 9 milioni di tonnellate/anno [De Baere and Mattheeuws, 2015]. Un'analisi più dettagliata del settore attuale e delle sue prospettive di sviluppo è riportata nel Capitolo 5 a cura del CRESME.

L'attività di ricerca ha avuto per oggetto lo sviluppo di innovazioni rispetto alla DA convenzionale, ossia lo sviluppo di un processo termofilo a due fasi con eventuali pretrattamenti termici, che possano conferire sia migliori prestazioni che maggiori garanzie in termini di abbattimento di agenti patogeni potenzialmente presenti nella matrice da trattare.

Attività 1.1: Processo termofilo a due fasi (scala pilota)

A cura di Paolo Pavan, Marco Gottardo e Federico Micolucci.

Nell'ambito del trattamento anaerobico della FORSU, lo studio condotto ha avuto come obiettivo quello di sviluppare un processo avanzato di DA, contraddistinto da quello "convenzionale", sia per il regime termico che per la configurazione reattoristica adottata. In un recente studio [De Baere and Mattheeuws, 2015], gli Autori evidenziano come, nel contesto Europeo, il trattamento anaerobico della FORSU venga generalmente condotto in un unico reattore (processo a singola fase) e ad una temperatura di esercizio compresa tra i 35°C ed i 40°C (regime termico mesofilo). Il processo proposto prevede al contrario l'adozione di una configurazione a fasi separate, ovvero conducendo i processi di fermentazione e metanogenesi in due reattori distinti, ed operando l'intero processo in condizioni di regime termico termofilo (55°C).

Tale scelta di procedere in condizioni operative "non convenzionali" è motivata dal fatto che il processo a fasi separate permette di produrre, oltre al tradizionale biogas, anche idrogeno, attraverso i processi metabolici fermentativi della prima fase. L'aggiunta di idrogeno (5-10% in

volume) al biogas favorisce la sua efficienza di combustione. Tale miscela, nota come BioHythane (o bioidrometano), rappresenta pertanto un biocombustibile di seconda generazione per motori a combustione interna che permette una riduzione delle emissioni di inquinanti atmosferici (NO_x e idrocarburi incombusti) rispetto a quelle ottenibili dal biogas tradizionale [Giampieri et al., 2007; Porpatham et al., 2007; Cavinato et al., 2012].

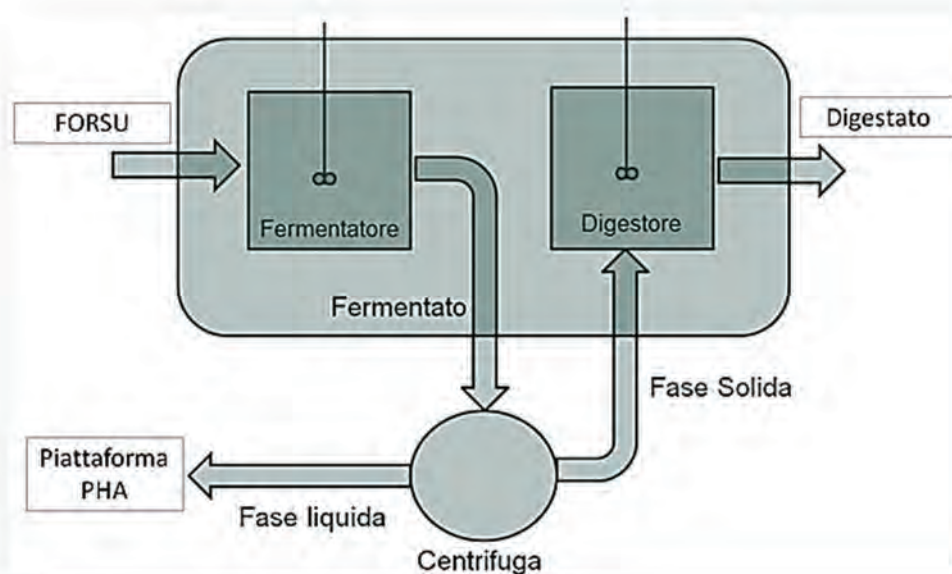
Inoltre, ponendo a valle del fermentatore un'unità di filtrazione, è possibile disporre anche di un flusso a basso tenore di solidi e ricco in acidi grassi volatili o VFA (acidi grassi la cui catena alifatica può contenere fino a 6 atomi di carbonio). La produzione di VFA ha assunto negli anni un crescente interesse sia nel settore bioenergetico, come precursori nella produzione di metano, che in quello della depurazione delle acque, come fonte di carbonio per i processi di denitrificazione e defosfatazione biologica. In tempi più recenti, i VFA sono stati valutati anche in altre filiere ancora più sofisticate [Lee et al., 2014], tra cui la produzione di bioplastiche, valutata anche in questo studio (Capitolo 3).

L'idea di separare fisicamente il processo di fermentazione da quello metanogenico non è una novità. Il processo di DA a fasi separate, infatti, è stato sviluppato già all'inizio degli anni '70 [Pohland and Ghosh, 1971] con l'intento di far avvenire i suddetti processi, i cui gruppi microbici differiscono ampiamente in termini fisiologici (per substrati, cinetiche di crescita e sensibilità alle condizioni ambientali), nelle loro condizioni ottimali, con la logica conseguenza di ottenere rese migliori in termini di degradazione della sostanza organica e di produzione di biogas. Tuttavia, per ottimizzare la produzione di idrogeno e VFA, durante la fase fermentativa è necessario operare un controllo del pH affinché non raggiunga valori troppo bassi (pH < 5), tali da influenzare negativamente l'attività microbica [Valdez-Vasquez et al., 2009; Lee et al., 2014]. Tale controllo prevede in genere l'aggiunta di composti chimici, come ad esempio l'idrossido di sodio e di potassio.

Come innovazione sostanziale rispetto alla letteratura, nella presente attività, data la possibilità di accoppiare il processo fermentativo ad uno metanogenico, si è optato di non utilizzare per il controllo del pH nel reattore di fermentazione i prodotti chimici precedentemente citati, bensì di ricircolare una parte del digestato in uscita dal reattore metanogenico, il quale, per sua natura, è caratterizzato da un discreto contenuto di alcalinità. Tale scelta garantisce un evidente vantaggio economico rispetto al più classico approccio di controllo del pH mediante composti chimici.

Infine per quanto riguarda la temperatura di esercizio, il regime termofilo rispetto a quello mesofilo, permette, oltre all'incremento delle rese di conversione del rifiuto organico in metano, idrogeno e VFA, il miglioramento del processo di stabilizzazione del digestato finale, con possibile ricaduta positiva in termini di minori rischi igienico-sanitari connessi al suo riutilizzo.

Lo schema processuale dell'attività 1.1 è riportato nella Figura 1.

Figura 1 - Schema processuale dell'attività 1.1 e connessione con attività 3.1

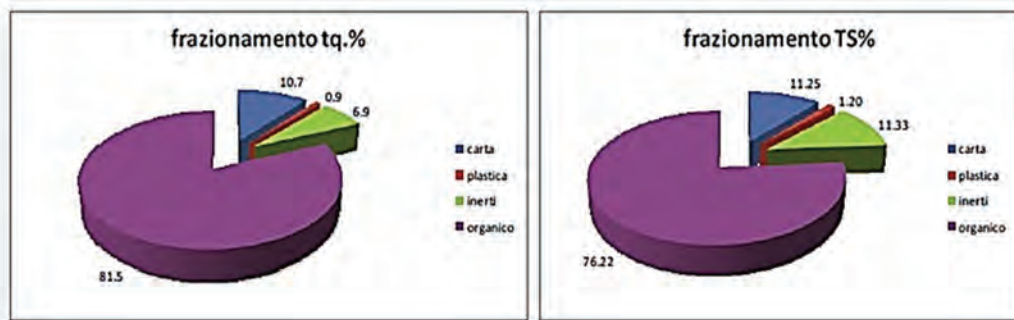
La FORSU utilizzata è stata conferita con cadenza settimanale dalla Contarina S.p.A. e proviene dalla raccolta differenziata effettuata nella provincia di Treviso. Il rifiuto conferito è stato caratterizzato sulla base del suo contenuto di solidi totali (TS), solidi totali volatili (TVS) e richiesta chimica di ossigeno (COD). Gli ultimi due parametri indicano il contenuto di carbonio organico presente, nonché i nutrienti, quali azoto totale (Total Kjeldahl Nitrogen, TKN) e fosforo totale (P tot). La composizione riscontrata (Tabella 3) non ha evidenziato particolari differenze rispetto a FORSU caratterizzate in altri lavori presenti in letteratura [Cecchi et al., 2005]. Tale condizione conferisce chiaramente un carattere più generale ai risultati ottenuti dal suddetto studio.

Tabella 3 - Analisi chimico-fisica della FORSU conferita

Parametro	Unità di Misura	Media ± Dev.Std.	Minimo	Massimo
TS	gTS/Kg	271 ± 27	221	312
TVS	gTVS/Kg	212 ± 20	176	246
COD	gCOD/Kg	256 ± 26	206	296
TKN	gN/Kg	6.7 ± 1	4.6	7
P tot	gP/Kg	1.5 ± 0.7	0.84	2.8

In Figura 2 vengono riportate le frazioni ponderali per ciascuna tipologia di materiale, in termini di peso umido e secco. Dall'analisi merceologica si evidenzia che il contenuto di materiale organico, inteso come residuo alimentare, è pari al 82% del peso umido; gli scarti sono costituiti principalmente da carta (11%) ed inerti (7%).

Figura 2 - Distribuzione delle frazioni merceologiche in termini di peso secco e umido



A seguito del suo conferimento, il rifiuto umido è stato pretrattato mediante una doppia triturazione: la prima, condotta a secco, è stata eseguita mediante un mulino a coltelli (Figura 3) ed ha avuto lo scopo di ridurre la pezzatura del materiale rendendolo più idoneo alla seconda triturazione. La seconda triturazione, questa volta attuata con aggiunta di acqua in proporzione 1 a 1 in peso, è stata eseguita mediante una pompa trituratrice (Figura 4) e ha avuto lo scopo di ridurre ulteriormente la pezzatura e al contempo di catturare buona parte del materiale inerte (e.g. metallo, ossa, plastiche) separandolo quindi dal substrato alimentante il processo fermentativo.

Figura 3 - Mulino a coltelli



Figura 4 - Pompa trituratrice



Tale trattamento ha permesso di ridurre sensibilmente il contenuto di solidi inerti presenti nel rifiuto come dimostrato dal minore contenuto di solidi totali a fronte della contemporanea invarianza dei restanti parametri, legati alla presenza di materiale organico (Tabella 4).

Tabella 4 - Analisi chimico-fisica della FORSU pretrattata

Parametro	Unità di Misura	Media \pm Dev.Std.	Minimo	Massimo
TS	gTS/Kg	244 \pm 32	202	300
TVS	gTVS/Kg	213 \pm 27	175	270
COD	gCOD/Kg	230 \pm 34	185	299
TKN	gN/Kg	6.7 \pm 1	4.6	11
P tot	gP/Kg	1.1 \pm 0.5	0.6	2

Per quanto riguarda i reattori utilizzati, sia per il fermentatore che per il digestore sono stati utilizzati reattori a mescolamento (CSTR) in scala pilota, di volumetria utile rispettivamente pari a 0.2m³ e 0.76m³ (Figura 5).

Figura 5 - Reattori pilota utilizzati nella sperimentazione

Le condizioni operative adottate sono riportate nella Tabella 5.

Tabella 5 - Condizioni operative

Fermentatore			Digestore				
HRT	OLR		T	HRT	OLR		T
d	KgTVS/ (m ³ d)	KgCOD/ (m ³ d)	°C	d	KgTVS/ (m ³ d)	KgCOD/ (m ³ d)	°C
3.3	19	21.7	55	16.7	3.2	3.7	55

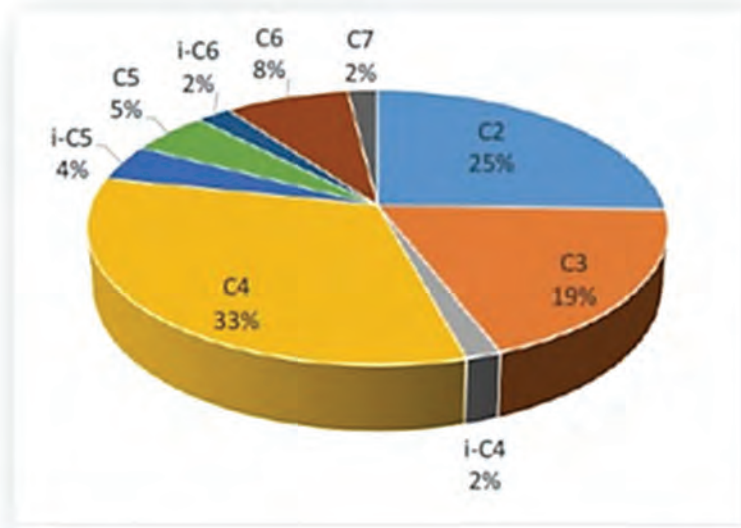
(HRT: tempo di residenza idraulico espresso in giorni; OLR: carico organico espresso come Kg di TVS e COD caricati al giorno, per volume di reattore)

Per il mantenimento della temperatura di esercizio, entrambi i reattori sono stati riscaldati mediante un sistema di ricircolo di acqua calda nella camicia esterna dei reattori, controllato mediante una sonda termostatica PT100.

Per quanto concerne la produzione di VFA nel processo fermentativo, considerando i dati ottenuti nell'intero arco della sperimentazione, la concentrazione media di VFA presenti nel fermentato è

stata di 16.6 gCOD/L ed è costituita per il 77% dalla somma di acido acetico (25%), propionico (19%) e butirrico (33%) (Figura 6).

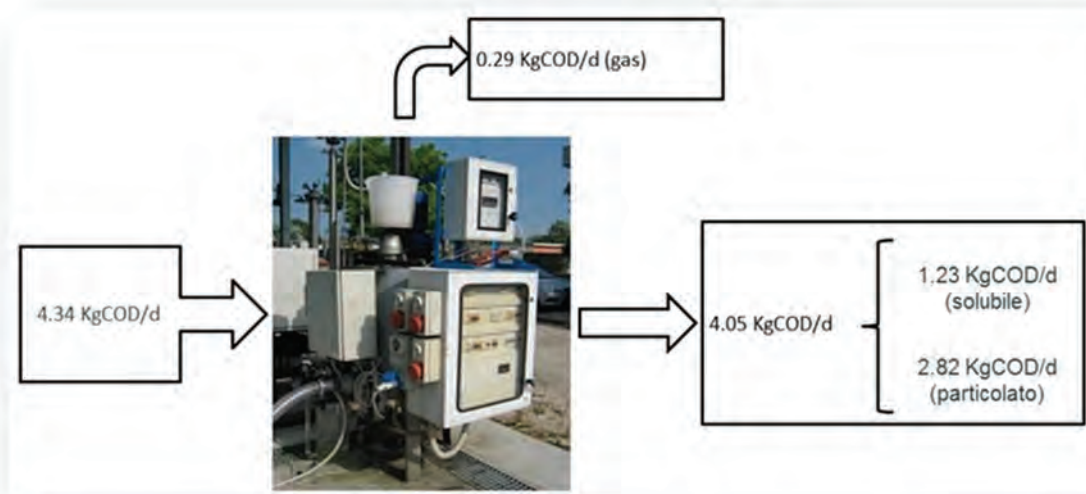
Figura 6 - Composizione VFA nel fermentato



(C2: Acido acetico; C3: Acido propionico; C4: Acido butirrico; i-C4: Acido isobutirrico; C5: Acido valerico; i-C5: Acido isovalerico; C6: Acido caproico; i-C6: Acido isocaproico; C7: Acido eptanoico).

Sulla base dei dati di caratterizzazione del substrato e del fermentato nonché del gas prodotto, è stato eseguito un bilancio di massa del fermentatore (Figura 7).

Figura 7 - Bilancio di massa del fermentatore



Come si evince dalla Figura 7, dal processo fermentativo circa il 30% del COD alimentato è stato convertito in COD solubile (sCOD); il rimanente è stato convertito in gas idrogeno (5%) o è rimasto come COD particolato (65%).

In Tabella 6 si riportano le principali caratteristiche chimico - fisiche del mezzo di reazione, i parametri di stabilità e le rese di produzione relative alla processo fermentativo.

Tabella 6 - Parametri di stabilità, caratteristiche chimico-fisiche e rese di produzione del processo fermentativo

Parametro	Unità di Misura	Media \pm Dev.Std.	Minimo	Massimo
TS	gTS/Kg	53 \pm 5	46	61
TVS	gTVS/Kg	44 \pm 4	39	46
COD	gCOD/Kg	47.5 \pm 8	41	59
TKN	gN/Kg	1.6 \pm 0.7	0.9	2.6
P tot	gP/Kg	0.48 \pm 0.1	0.45	0.5
pH	-	5.48 \pm 0.1	5.3	5.66
VFA	gCOD/l	16.6 \pm 0.26	0.96	23.2
sCOD	gCOD/l	20.6 \pm 7.7	12.8	26
Produzione Specifica di Gas	Nm ³ /KgTVS	0.17 \pm 0.01	0.165	0.172
H ₂	%	35 \pm 2	31	44
CO ₂		58 \pm 2	47	65
CH ₄		7 \pm 1	5	10

Il fermentato prodotto è stato successivamente sottoposto ad una fase di separazione solido-liquido mediante centrifuga (Figura 8): il flusso di massa a basso contenuto di solidi è stato inviato al settore adibito alla produzione di PHA, mentre il flusso restante, a maggior contenuto di solidi, è stato inviato a DA.

Figura 8 - Centrifuga

Il digestore anaerobico è stato quindi alimentato con un carico di 3.2 KgTVS/(m³d) e con un tempo di residenza idraulico di 16.7 giorni (Tabella 5) in modo da garantire un tempo di residenza complessivo del substrato pari a 20 giorni.

Dalle variabili monitorate, il processo di digestione ha evidenziato condizioni di robusta stabilità.

In Tabella 7 sono riportate le principali caratteristiche chimico-fisiche del mezzo di reazione, i parametri di stabilità e le rese di produzione relative al processo metanigeno.

Tabella 7 - Parametri di stabilità, caratteristiche chimico-fisiche e rese di produzione del processo metanigeno.

Parametro	Unità di Misura	Media \pm Dev.Std.	Minimo	Massimo
TS	gTS/Kg	13.2 \pm 4	6	18
TVS	gTVS/Kg	10 \pm 3	5	14
COD	gCOD/Kg	12 \pm 2	9	14
TKN	gN/Kg	1.5 \pm 0.2	1	1.8
P tot	gP/Kg	0.21 \pm 0.1	0.1	0.25
pH	-	8.15 \pm 0.1	8.1	8.2
Alcalinità Parziale	mgCaCO ₃ /l	3280 \pm 72	3145	3498
Alcalinità Totale		5254 \pm 51	5157	5377
VFA	mgCOD/l	638 \pm 70	514	781
Ammoniaca Totale	mgN-NH ₄ ⁺ /l	726 \pm 0,7	492	865
Produzione Specifica di Gas	Nm ³ /KgTVS	0.75 \pm 0.02	0.71	0.79
CO₂	%	33 \pm 2	29	35
CH₄		67 \pm 2	64	70

Considerando il sistema nel suo complesso, il biogas prodotto ha avuto una composizione media pari al 51% in metano, 40% in diossido di carbonio e 9% in idrogeno (Tabella 8).

Tabella 8 - Parametri di produzione e composizione media del biogas prodotto dal sistema

Parametro	Unità di Misura	Media \pm Dev.Std.	Minimo	Massimo
Produzione Specifica di Gas	Nm ³ /KgTVS	0.65 \pm 0.2	0.61	0.73
H₂	%	9 \pm 0.5	8	11
CO₂		40 \pm 1	38	42
CH₄		51 \pm 1	50	53

In conclusione, il sistema condotto in scala pilota ha raggiunto gli obiettivi preposti sia in termini di produzione di bioidrometano che di VFA: nel primo caso, infatti, la produzione di idrogeno nella fase fermentativa è stata sufficiente a permettere una composizione del gas complessivo che presenta le caratteristiche del BioHythane. Per quanto concerne la produzione di VFA, è stata osservata una produzione specifica media di 0.28 KgCOD per Kg di COD alimentato, costituita dal 25% da acido acetico, 19% da acido propionico, 33% da acido butirrico e dal restante 23% dai rimanenti acidi organici monitorati (acido valerico, caproico ed eptanoico). Tale produzione ha permesso di supportare i carichi richiesti nell'alimentazione dei reattori impiegati nella produzione di PHA. Si sottolinea, infine come l'azione di filtrazione del fermentato, e quindi la rimozione di una parte del carico organico al reattore metanigeno, non ha comportato una riduzione della produzione di biogas tale da incidere in maniera significativa sulla fattibilità del processo.

Attività 1.2: Processo con pretrattamento termico (scala di laboratorio)

A cura di Camilla M. Braguglia, Agata Gallipoli, Andrea Gianico e Pamela Pagliaccia

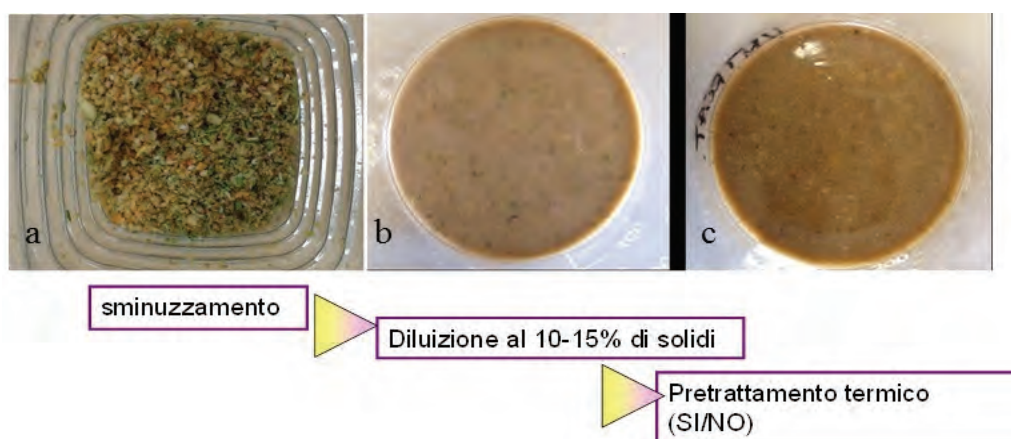
L'efficienza di conversione dei rifiuti organici in un processo anaerobico convenzionale può essere limitata dalla degradazione enzimatica della frazione meno biodegradabile, come la frazione lignocellulosica, presente in quantità variabili nella FORSU e negli scarti di cibo da ristoranti e mense. In questi casi un pretrattamento meccanico/termico può essere un approccio promettente per incrementare la velocità di idrolisi di scarti alimentari ricchi di cellulosa, emicellulosa e lignina e aumentare così la disponibilità dei composti organici risultanti per la successiva azione batterica. Pertanto, una completa caratterizzazione chimica della matrice da sottoporre a DA riveste un ruolo determinante al fine di individuare il potenziale metanigeno teorico della matrice ed il margine per un'ottimizzazione della resa di conversione mediante pretrattamento meccanico/termico.

In questo ambito, i pretrattamenti termici studiati finora operano con temperature che variano tra 50 e 250°C per lo più su substrati quali i fanghi di depurazione e gli scarti lignocellulosici. Ad oggi, si sa molto poco sull'impatto della temperatura e della pressione sulla DA della FORSU, ed il relativo effetto sugli eventuali agenti patogeni presenti.

Gli scarti alimentari studiati per questa attività sono stati campionati nella cucina della mensa dell'Area di Ricerca di Montelibretti (Roma), e la composizione è stata "ricostruita" con circa il 70% in peso da scarti di verdura e frutta, e 30% da pasta e latticini non consumati, al fine di simulare la composizione tipica della frazione di scarti organici da raccolta differenziata in Italia [Braguglia et al., 2017].

Per studiare l'effetto del pretrattamento termico (a temperatura di circa 130°C e alla pressione di 3,2 bar) sulla solubilizzazione della frazione organica, lo scarto alimentare è stato opportunamente diluito 1:5 con acqua di rete e una parte è stata sottoposta a pretrattamento termico per 20min (Figura 9).

Figura 9 - Scarto alimentare prima della diluizione (a), dopo diluizione con acqua (b), e dopo pretrattamento termico (c)



La caratterizzazione dello scarto alimentare dopo omogenizzazione e triturazione (tal quale), e dopo pretrattamento termico è riportata nella Tabella 9.

Tabella 9 - Caratterizzazione dello scarto alimentare della mensa CNR

Parametro	Tal quale	Pretrattato
pH	4.2	4.1
Solidi totali (g/kg _{ww})	189±11	187±3
Solidi volatili (g/kg _{ww})	179±8	177±3
VS/TS (%)	95±2	95±2
COD tot (g/kg _{ww})	265±11	270±10
COD tot/VS	1.5±0.1	1.5±0.1
Azoto tot (%TS)	3.6±0.1	3.8±0.1
COD solubile (g/L)	53±3	75±4
Carboidrati solubili (gCOD/L)	42±1	57±1
Proteine solubili (gCOD/L)	14±0.8	24±1

I solidi totali e volatili non subiscono variazioni apprezzabili dopo pretrattamento termico, evidenziando che le condizioni operative adottate non provocano effetti di mineralizzazione della componente solida né fenomeni di evaporazione. Per quanto riguarda invece l'effetto di solubilizzazione, si è riscontrato un aumento di circa il 40% della componente solubile nel campione pretrattato (COD solubile da 53 a 75 gCOD/L), mettendo in evidenza come, nonostante una temperatura e una pressione non particolarmente elevate, si sia solubilizzata parte della sostanza organica complessa presente (emicellulosa, amido e proteine). Come atteso, il trattamento termico non ha avuto effetti sulla concentrazione totale dell'azoto, mentre è riscontrabile un aumento della frazione solubile delle proteine rispetto a quelle totali.

Al fine di valutare la biodegradabilità dello scarto alimentare e l'efficacia del pretrattamento termico sul processo di DA sono stati effettuati test di conversione a metano (BioMethane Potential test, BMP) in regime termofilo, seguendo in continuo la produzione di idrogeno e/o metano così come la variazione temporale della sostanza organica all'interno dei reattori.

L'analisi del BMP è stata condotta in *batch* in laboratorio, simulando, in ambiente controllato, quanto avviene in un digestore anaerobico. Il campione di scarto alimentare, sia tal quale che pretrattato termicamente, è inizialmente analizzato e poi miscelato ad un inoculo termofilo "sgasato", cioè un substrato organico predigerito (come da protocollo standard per i BMP tests). La predigestione dell'inoculo ha lo scopo di ridurre la generazione di gas non specifico, diminuendo di conseguenza l'influenza dello stesso sul risultato finale.

Nelle prime 48 ore di marcia dei reattori si è osservata una significativa produzione di idrogeno, con conseguente abbassamento del pH. Parallelamente alla produzione di idrogeno si è osservata via via anche la produzione di metano, che tendeva ad aumentare al diminuire dell'idrogeno. Grazie alle analisi chimiche condotte sul digestato dopo 48h di marcia è stato possibile riscontrare una significativa degradazione dei carboidrati solubili, che per lo scarto alimentare tal quale è stata di circa il 90±1%, mentre per quello pretrattato ha raggiunto il 98%. La drastica diminuzione dei carboidrati solubili nelle prime ore, significativamente più elevata per le prove con scarto alimentare pretrattato, coincide con la massima produzione di idrogeno.

Il pretrattamento termico quindi, aumentando la frazione di sostanza organica biodisponibile (per lo più costituita da carboidrati), incide prevalentemente sulla produzione di idrogeno, con un guadagno rispetto al tal quale che è dell'82±2%.

Per quanto riguarda invece il metano, come detto precedentemente, la produzione è aumentata progressivamente nel corso di ogni prova, per raggiungere dopo circa 70h di digestione una percentuale stabile nel biogas (tra il 53 ed il 62%).

Il valore di BMP sperimentale, cioè la resa di metano dalla conversione anaerobica di un grammo di sostanza organica è aumentata sia a basso carico, passando da 280 ± 4 mLgVS⁻¹ per lo scarto alimentare tal quale a 318 ± 5 per lo stesso scarto alimentare, ma pretrattato termicamente, che ad alto carico da 335 ± 5 a 350 ± 6 mLgVS⁻¹, seppure in maniera meno consistente. Va precisato che il processo durante la marcia non ha mai presentato fenomeni di inibizione ed instabilità.

Per quantificare meglio il guadagno ottenuto in termini di produzione specifica, bisogna tener conto anche degli effetti sulla produzione di idrogeno, quindi è necessario far riferimento ai BMP teorico (che tiene conto della composizione della sostanza organica in termini di carboidrati, proteine, lipidi e lignina) per valutare la resa effettiva del processo.

Di seguito è riportata la biodegradabilità del substrato calcolata dal rapporto tra il BMP ottenuto sperimentalmente e il valore massimo teorico (che è risultato essere di 580 mLgVS⁻¹) (Tabella 10).

Tabella 10 - Biodegradabilità dello scarto alimentare, tal quale e pretrattato, a basso e alto carico

	BASSO CARICO		ALTO CARICO	
	Scarto alimentare tal quale	Scarto alimentare pretrattato	Scarto alimentare tal quale	Scarto alimentare pretrattato
BIODEGRADABILITÀ (%)	58	71	67	77

La biodegradabilità aumenta significativamente grazie al pretrattamento termico, evidenziando che il pretrattamento consente un maggiore sfruttamento del potenziale metanigeno disponibile per grammo di VS nell'alimentazione.

Nello stesso tempo, pur tenendo conto di un numero di campioni limitato, le analisi (di cui al capitolo successivo) indicano come il pretrattamento termico consenta la completa igienizzazione del digestato (Tabella 16), con rimozione degli agenti patogeni indagati, permettendone pertanto l'uso agronomico come ammendante nell'ottica del recupero in economia circolare.

BIBLIOGRAFIA

- Braguglia CM, Gallipoli A, Gianico A, Pagliaccia P. 2017. Anaerobic bioconversion of food waste into energy: a critical review. *Bioresource Technology*, *in stampa*.
- Cavinato C, Giuliano A, Bolzonella D, Pavan P, Cecchi F. 2012. BioHythane production from food waste by dark fermentation coupled with anaerobic digestion process: A long - term pilot scale experience. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37: 11549-11555.
- Cecchi F, Battistoni P, Pavan P, Bolzonella D, Innocenti L. 2005. Digestione anaerobica della frazione organica dei rifiuti solidi. Aspetti fondamentali, progettuali, gestionali, di impatto ambientale ed integrazione con la depurazione delle acque reflue. Edizioni APAT: Agenzia per la Protezione dell'Ambiente e per i Servizi Tecnici. Manuali e Linee Guida. 13/2005, Roma.
- Commissione Europea: Closing the loop - An EU action plan for the Circular Economy. 2015; disponibile su http://ec.europa.eu/environment/circular-economy/index_en.htm
- De Baere L, Mattheeuws B. 2015. Anaerobic Digestion of the Organic Fraction of Municipal Solid Waste in Europe. Status, experience and prospects. In: Thomè - Kozmiensky Karl J, Thiel S. *Waste Management*, vol. 3: Recycling and Recovery. p.517-526.

- Giampieri R, Nigliaccio G, Salgò C. 2007. Studio sull'utilizzo della miscela idrogeno/gas naturale (idrometano) come carburante, per l'alimentazione di autobus circolanti in ambito urbano, nei comuni capoluogo di provincia nella regione Emilia-Romagna. ERG - Laboratorio Energia. ENEA.
- Lee W, Chua A, Yeoh H, Ngoh G. 2014. A review of the production and applications of waste-derived volatile fatty acids. *Chemical Engineering Journal*, 235: 83-99.
- Pohland F, Ghosh S. 1971. Developments in anaerobic stabilization of organic wastes: The two phase concept. *Environmental Letters*, 1: 255-266.
- Porpatham E, Ramesh A, Nagalingam B. 2007. Effect of hydrogen addition on the performance of a biogas fuelled spark ignition engine. *International J of Hydrogen Energy*, 32: 2957-2065.
- Valdez-Vazquez I, Poggi-Varaldo H. 2009. Hydrogen production by fermentative consortia. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13: 1000-1113.

CAPITOLO 2 - Valutazione dei rischi igienico-sanitari connessi alla digestione anaerobica

Deborah Traversi*, Silvia Bonetta* e Giorgio Gilli*

**Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica e Pediatriche, Università di Torino (Unito), Torino*

Attività 2.1: Aspetti di igiene e sicurezza del lavoro nei bioprocessi innovativi proposti

2.1.1 Introduzione

A livello mondiale si osserva, negli ultimi decenni, una consolidata tendenza ad incentivare l'uso di biomassa allo scopo di produrre energia. Questo conferisce una lettura diversa a molteplici aspetti dell'economia e del mercato del lavoro.

Nello specifico la DA di biomasse nelle aziende agricolo-zootecniche permette in tutta Europa una produzione di 30.340GWh di energia che è più o meno equivalente alla produzione di due centrali nucleari. Il numero di impianti complessivo sul territorio europeo è circa 13.800, dei quali il 63% è collocato in Germania. Segue l'Italia, dove secondo una recente indagine, negli ultimi anni, il numero di installazioni sul territorio è aumentato considerevolmente fino a raggiungere circa un migliaio di impianti.

L'attenzione è rivolta, oggi, all'impiego di matrici considerate rifiuti difficili da smaltire e caratterizzate da un impatto maggiore in termini ambientali. Si assiste, quindi, alla nascita di vere e proprie bioraffinerie diffuse sul territorio nelle quali vengono convogliate diverse matrici potenzialmente inseribili nei digestori anaerobici. Ad oggi il numero di impianti alimentati con fanghi di trattamento delle acque reflue e/o la FORSU sono circa il 10% del totale [ENAMA, 2011]. Se da un lato, l'impiego di matrici quali la FORSU, presenta una interessante alternativa agli onerosi processi di compostaggio, dall'altro presenta dei rilevanti problemi gestionali riferibili sia alla stabilità del processo che allo smaltimento del fango prodotto in uscita (digestato).

Negli impianti già esistenti per il trattamento dei rifiuti organici la FORSU è pretrattata attraverso un accurato processo di vagliatura, spesso ancora manuale, per eliminare elementi estranei come plastica, sabbia, inerti di vario genere e vetro e poi indirizzata alla DA che, a seconda del processo industriale, può essere umida (con l'aggiunta di acqua per l'ottenimento di una polpa organica) o secca (senza l'aggiunta di acqua).

Il proliferare degli impianti sul territorio ha portato all'aumento del numero di addetti del settore potenzialmente esposti a rischi professionali per i quali è necessaria una nuova valutazione. La normativa vigente pone particolare attenzione alla necessità di aggiornare e rinnovare la valutazione del rischio di fronte a dei cambiamenti nei processi produttivi.

Nel caso specifico, tra i rilevanti cambiamenti per i quali è necessario operare una valutazione che tenga conto della natura e della massa di materiale organico trattato, riveste particolare importanza il rischio biologico [Traversi et al., 2015]. Tale rischio è stato storicamente sottovalutato (per es. negli allevamenti) e la sua percezione non è generalmente adeguata (per es. negli impianti di compostaggio). La natura stessa del rischio biologico fa sì che esso sia estremamente variegato in funzione della diversità microbica presente nel materiale organico che certamente include anche patogeni, patogeni opportunisti e macromolecole di origine microbica potenzialmente dannose per la salute umana. In prima istanza il rischio esiste per i lavoratori direttamente coinvolti nei processi ed esposti in modo più rilevante, in secondo luogo per le comunità residenti in prossimità degli impianti.

Infine è necessario valutare l'impatto ambientale potenzialmente causato dal rilascio di effluenti della digestione (liquidi, solidi, semi-liquidi) che debbono essere trattati in modo tale da non produrre ulteriori rischi. In questo contesto assume particolare rilevanza l'eventuale valorizzazione del fango di digestione come ammendante. A fine processo tale fango viene suddiviso attraverso dei separatori in una fase liquida ed una fase solida (o semi-solida). La fase liquida viene generalmente reimpiegata nell'impianto in quanto produce un miglioramento del processo di digestione essendo ricca dei microrganismi selezionati durante la DA stessa. Essa presenta però alcune criticità, per quel che concerne la presenza di azoto, che tende ad aumentare nel tempo, rendendo impossibile un riciclo totale. Risulta pertanto necessario un processo di depurazione di una frazione della corrente liquida stessa. La fase solida, invece, può essere impiegata come fertilizzante in campo o come base per un successivo processo di compostaggio aerobico. Tale sottoprodotto ha un valore che può essere monetizzato ponendo però particolare attenzione, dal punto di vista igienico-sanitario, alle sue caratteristiche microbiologiche, in quanto, in relazione alla natura delle biomasse introdotte nel digestore, la presenza di patogeni è probabile [Zhang et al., 2014] ed alle sue caratteristiche chimiche per l'eventuale presenza di metalli pesanti [Fuess and Garcia, 2014].

2.1.2 Scopo del lavoro

Per quanto precedentemente descritto è doveroso tenere conto del rischio biologico per gli operatori del settore in relazione all'espletamento delle diverse mansioni nei nuovi processi produttivi proposti, al fine di valorizzarli e renderli economicamente e socialmente sostenibili. Pertanto gli obiettivi specifici dell'attività proposta vertono sulle implicazioni igienico-sanitarie del processo in studio, ed in particolare includono la valutazione del *biohazard* connesso sia alle lavorazioni previste che al riuso del digestato.

2.1.3 Valutazione delle possibili implicazioni igienico-sanitarie per la salute dei lavoratori occupati nei processi di produzione innovativi proposti.

La valutazione del rischio di infezione è generalmente condotta considerando la lista dei patogeni inclusi nella Direttiva 2000/54/EC. Tale riferimento normativo illustra le disposizioni per la protezione dei lavoratori dai rischi relativi all'esposizione ad agenti biologici nei luoghi di lavoro [Montano, 2014]. Secondo tale direttiva, gli agenti biologici includono solo entità microbiologiche cellulari o non-cellulari capaci di riprodursi e di provocare infezioni o altre malattie. Riguardo al rischio di infezione, gli agenti patogeni sono classificati in 4 gruppi di rischio in relazione alla forza della relazione causale tra esposizione e malattia ed alla possibilità di neutralizzare e contenere le infezioni.

In generale, il gruppo 1 include agenti che non causano malattie all'uomo; nel gruppo 2 sono inseriti gli agenti che possono causare malattie; nel gruppo 3 agenti che possono causare gravi malattie e sono un rilevante rischio per i lavoratori. Gli agenti del gruppo 4, invece, possono causare gravi patologie umane e costituiscono un serio rischio per la salute del lavoratore, inoltre nessun tipo di profilassi o trattamento è disponibile.

Nonostante questa classificazione riguardi i rischi di sole infezioni, la direttiva afferma esplicitamente il bisogno di includere effetti allergici e tossici nella valutazione del rischio degli agenti biologici. In aggiunta, effetti tossici e/o effetti sensibilizzanti causati da agenti biologici riguardano alcune componenti degli agenti biologici stessi quali i prodotti del loro metabolismo o componenti cellulari. Tra questi troviamo: le endotossine (lipopolisaccaridi presenti nelle membrane delle cellule dei Gram-negativi rilasciati durante la lisi della cellula); le micotossine (metaboliti tossici a basso peso molecolare di muffe come la gliotossina) e sostanze tossiche ad alto peso molecolare costituenti la membrana cellulare di funghi rilasciate durante la disgregazione cellulare (β -1-3 glucani). Alcuni fattori spiegano come i settori delle biotecnologie, gestione dei rifiuti ed il settore agro-zootecnico siano identificati come settori a maggior rischio biologico. Ciò è

legato sia alla natura delle mansioni lavorative che al contesto ambientale e sociale nel quale il lavoratore opera (es. impianti di trattamento rifiuti, laboratori, allevamenti, ecc.) [Montano, 2014]. Inoltre sono elementi rilevanti:

- le eterogenee caratteristiche degli agenti biologici;
- la via di esposizione;
- la patogenicità ed i meccanismi di trasmissione (orale, aerea, per contatto ecc.);
- i meccanismi di veicolazione (acqua, suolo, aria) e la presenza di vettori;
- l'habitat naturale degli agenti biologici;
- le particolari caratteristiche dell'ospite;
- le implicazioni cliniche della malattia.

Per la salute occupazionale, tuttavia, l'aerosol e le trasmissioni per contatto giocano un ruolo dominante nelle strategie della valutazione del rischio biologico.

Batteri, virus, funghi, endotossine e micotossine sono spesso presenti nel bioaerosol, i quali possono indurre malattie dell'apparato respiratorio, della pelle e degli occhi. Inoltre, gli agenti patogeni possono essere trasmessi in seguito ad ingestione, diffusi tramite vettori come zecche e mosche ed attraverso la cute.

Nonostante i grandi miglioramenti che ci sono stati nei paesi industrializzati riguardanti il rischio infettivo per alcune rilevanti patologie quali tubercolosi, epatite ed influenza, nei lavoratori e, più in generale, in tutta la popolazione, persiste un elevato rischio di infezione [Haagsma et al., 2012].

L'esposizione a bioaerosol causa inoltre in veterinari, contadini, allevatori e lavoratori del settore rifiuti, frequenti zoonosi, infezioni batteriche e parassitosi oltre che reazioni di ipersensibilità. Inoltre, i contadini, i lavoratori del comparto zootecnico, così come i lavoratori impiegati nella trebbiatura e setacciatura del grano, nella trebbiatura del lino, nei processi di compostaggio e nella lavorazione del legno, hanno un rischio maggiore di disturbi cronici all'apparato respiratorio e presentano una intensa esposizione a microrganismi allergenici. In particolare, le endotossine sono associate ad asma, ipersensibilità bronchiale, fatica, reazioni infiammatorie, declino della funzione polmonare ed effetto protettivo rispetto alla sensibilizzazione allergica [Liebers et al., 2007].

L'emergenza dei batteri resistenti agli antibiotici nella zootecnia di massa ha sollevato ulteriori preoccupazioni riguardanti l'esposizione occupazionale e le possibili conseguenze sulla salute pubblica. Una particolare attenzione è stata posta sullo *Stafilococcus aureus* resistente alla metilina (MRSA) e sui patogeni Gram-negativi resistenti a diverse classi di antibiotici.

Mentre la prevalenza di MSRA nella popolazione generale è stata stimata attorno il 5%, tale percentuale è stata stimata decisamente più elevata, tra il 10 e il 18%, in ambienti veterinari e in piccoli centri per animali [Montano, 2014].

La conoscenza ad oggi della diversità microbica ascrivibile al bioaerosol, in impianti di compostaggio ed impianti simili, è largamente concentrata su batteri e muffe. Per molto tempo, gli actinomiceti, *Aspergillus fumigatus* e diverse specie di produttori di penicilline sono stati riconosciuti come i microrganismi coltivabili, dominanti nel bioaerosol di questi ambienti. Tuttavia, le tecniche basate sui metodi colturali, sistematicamente sottostimano la diversità del bioaerosol. Albrecht mostrò che solo l'1.5-15.3% dei batteri del bioaerosol si può facilmente individuare con la conta diretta dopo l'incubazione in agar TSA [Wery, 2014]. La selezione di specie sporulanti durante l'aerosolizzazione potrebbe spiegare la dominanza di *Firmicutes* e *Actinobacteria* negli impianti di compostaggio o laddove si utilizzano FORSU. *Actinobacteria*, *Thermoactinomyces* e *Bacillus* spp., producono infatti spore resistenti che si disperdono facilmente. I potenziali cambiamenti nella diversità microbiologica del bioaerosol, generato dal compostaggio e processi simili, rimane comunque ancora da chiarire. Alcuni microrganismi utilizzati come indicatori sono presenti in diverse matrici. Per esempio sono noti i microrganismi di origine enterica nei fanghi provenienti da impianti di depurazione delle acque

reflue e negli effluenti zootecnici ma tali indicatori possono non essere presenti nella FORSU ad una concentrazione rilevabile. Inoltre tali microrganismi possono essere rapidamente inattivati dal calore sia per effetto dei processi di DA termofili, che per il basso pH raggiunto nella prima fase dei processi a 2 stadi (come quello proposto in questo studio). Un meccanismo analogo di inattivazione dei microrganismi indicatori è stato anche osservato durante il processo di compostaggio.

Il bioaerosol generato dai processi di compostaggio e di trattamento della FORSU include numerosi patogeni opportunisti, che esplicano azione patogena in presenza di ospiti caratterizzati da un sistema immunitario indebolito. Per esempio una prolungata esposizione ad *Aspergillus fumigatus* può essere causa di una aspergillosi invasiva in soggetti immunodepressi.

2.1.4 Valutazione dell'esposizione dei lavoratori a bioaerosol e polveri contenenti possibili macromolecole di origine biologica come le endotossine batteriche.

È fondamentale sottolineare sin da ora che il processo in studio è condotto su scala pilota. I campionamenti sono volti all'identificazione dei pericoli in modo da poter individuare misure di contenimento sufficienti nella fase di trasferimento della tecnologia su scala industriale. Per quanto concerne la verifica sperimentale del *biohazard* sono state pianificate alcune campagne di campionamento di seguito descritte:

- **Campagna 1**, volta alla valutazione della contaminazione di fondo del sito nel quale è stato inserito l'impianto pilota. Tale sito è un impianto di depurazione delle acque reflue che riceve anche la FORSU di Treviso per trattamenti paralleli;
- **Campagna 2**, volta alla valutazione del potenziale impatto della fase di triturazione della FORSU, condotta in modo autogestito e con metodi scarsamente automatizzati che non prevedono metodologie di contenimento dell'esposizione degli operatori collettive o individuali, pur se gli stessi indossano indumenti, comprese le scarpe antinfortunistiche, dedicati all'attività;
- **Campagna 3**, volta alla valutazione della contaminazione residua insita nell'impiego, per la DA, della parte liquida della FORSU, pressata ad opera di un processo industriale esterno all'impianto pilota;
- **Campagna 4**, volta alla valutazione delle caratteristiche microbiologiche degli effluenti fermentati e/o digestati in uscita dall'impianto.

Ciascuna campagna prevede il campionamento di particolato PM10 aerodisperso, sul quale è stata poi effettuata la valutazione del contenuto endotossico, ed il campionamento del bioaerosol in diverse postazioni dell'impianto.

Campionamento PM10. A tale scopo, è stato utilizzato un campionatore ad alto flusso per polveri PM10. Il suo funzionamento si basa sull'ingresso di particelle aerodisperse nel sistema ad impatto a cascata ad alto volume. Le membrane vengono condizionate e sottoposte ad analisi gravimetrica prima e dopo il campionamento in modo da determinare la concentrazione in massa di particelle aerodisperse. La durata di ciascun campionamento è stata di almeno 4 ore consecutive [Traversi et al., 2015].

Campionamento bioaerosol. Il presente campionamento è stato effettuato con campionatore SAS Super 180 (PBI International). Tale metodo consente la crescita, a temperatura controllata, dei microrganismi che si sono depositati durante il campionamento sul terreno di coltura. Dal conteggio del numero di colonie formate dai microrganismi (UFC), si risale al grado di contaminazione microbica dell'aria esaminata (MPN/m³). I parametri inclusi nella valutazione ed i rispettivi terreni impiegati sono elencati nella Tabella 11. In tutti, a parte ovviamente il Sabouraud, è stato aggiunto un antimicotico (cycloheximide 0.2g/L) per evitare la contaminazione fungina [Fracchia et al., 2006].

Tabella 11 - Parametri microbiologici determinati

Parametro	Terreno di coltura
Conta tot 22°C	Plate Count Agar (Merck VM361263 202)
Conta tot 37°C	Plate Count Agar (Merck VM361263 202)
Conta tot 55°C	Plate Count Agar (Merck VM361263 202)
Funghi/lieviti	Sabouraud glucose 4% Chloramphenicol Agar (Sigma 89579)
Pseudomonaceae	Cetrimide (Merck VM077084 930)
Bacillus	Hi-crome Bacillus Agar (Fluka 92325)
Clostridia	mCP (SIFIN TN1288 base +suppl.)
Gram-negativi	Agar MacConkey (Biolife 4016702)
Salmonella/ Shigella	XLD-D (Biomeriex 51049)
Actinomiceti	Starch casein Agar (US Biological S7968-25)

Valutazione endotossine

Per l'estrazione, sono state utilizzate delle porzioni equivalenti ad 1/8 di ciascun filtro. Ogni porzione è stata poi tagliata in frazioni più piccole, ed è stata posta in falcon apirogene da 50ml contenenti 15 ml di terreno RPMI-1640, con l'aggiunta dello 0.025% di Tween-20. Le falcon sono state sistemate in bagno ad ultrasuoni per 10min, e poi vortexate per altri 5min per 3 volte consecutive. I campioni sono poi stati centrifugati a 5000 RPM per 10min così da rimuovere il filtro, e si è prelevato il surnatante, che è stato congelato a -20°C. Le endotossine sono state analizzate attraverso il metodo endpoint cromogenico LAL (*Limulus Amebocyte Lysate*, QLC-1000 n° 50-648U, Lonza) a 37°C, utilizzando un lettore automatico di micropiastre (Infinite 200 PRO, Tecan), seguendo le istruzioni del produttore. Come endotossina standard, è stata utilizzata endotossina di *E. coli* 0111:B4. È stata ottenuta una curva di riferimento utilizzando sei diverse concentrazioni note di endotossina, sospese in terreno RPMI-1640 (Sigma), diluito 1:10 con acqua MilliQ autoclavata ed avente pH compreso tra 6.0 e 8.0; la curva, per essere accettata, deve avere un coefficiente di regressione di almeno 0.98. Il limite di rivelabilità (LOD) si attesta a 0.01 EU/ml. Sono stati ritenuti validi soltanto i valori quantificati tra il primo e l'ultimo punto della curva.

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita con il software SPSS 24.0. È stata applicata una trasformazione logaritmica delle variabili che non hanno una distribuzione normale, la correlazione di Spearman per valutare la relazione tra le variabili, il T-test di Student per comparare le medie, le tecniche statistiche ANOVA per l'analisi multivariata assumendo una varianza eguale, seguite da Tukey post-hoc per le comparazioni. Le differenze tra le medie e le correlazioni sono state ritenute significative per p value <0.05.

DESCRIZIONE DELLE CAMPAGNE DI CAMPIONAMENTO

Campagna 1

La prima campagna è stata condotta con l'obiettivo di stabilire il livello di contaminazione di fondo, pre-esistente rispetto all'installazione dell'impianto pilota oggetto dello studio. Un'area ben designata all'interno dell'impianto di depurazione di Treviso è dedicata al pilota.

I punti di campionamento identificati in questa prima campagna sono stati:

P1: Posizione centrale nella quale è stato posizionato il campionatore ad alto flusso PM10

P2: Posizione adiacente al punto che sarà di ingresso della FORSU pretrattata attraverso triturazione e/o pressatura

P3: Area dedicata alla preparazione della FORSU triturata attraverso mulino a coltelli e successiva triturazione fine dopo diluizione con pompa tritratrice. Tale operazione è stata condotta solo nella

prima fase di progetto in attesa della matrice liquida risultante dalla pressatura industriale della FORSU.

Campagna 2

La triturazione della FORSU nell'area preparazione (P3) prevede: l'apertura degli appositi contenitori di raccolta differenziata che giungono incellofanati, il recupero e l'apertura manuale dei singoli sacchetti di rifiuto organico, una fase di grossolana cernita del materiale contenuto nei sacchetti (eliminando inerti e sacchetti), il rovesciamento del materiale nel trituratore. Il materiale fuoriesce triturato con una pezzatura inferiore ai 20mm (Figura 10).

Figura 10 - Operazioni di apertura e rovesciamento dei sacchetti contenenti FORSU



La seconda fase (P2) invece implica il passaggio del materiale risultate dalla prima triturazione in un secondo trituratore nel quale si inserisce il materiale introdotto mediante l'ausilio di una pala e nel quale si aggiunge dell'acqua in modo da favorirne lo sminuzzamento (Figura 11).

Figura 11 - Seconda triturazione della FORSU ed alimentazione del fermentatore



Campagna 3 e 4

In quest'ultima campagna di campionamento non si sono realizzate in impianto operazioni di pretrattamento della FORSU. In questo caso, perveniva direttamente una frazione liquida derivante da un processo di spremitura/pressatura realizzato in un altro luogo rispetto al depuratore, in particolare presso l'azienda che si occupa della raccolta della FORSU secondo un sistema spinto "porta a porta".

In questa occasione quindi è stata valutata la presenza di bioaerosol durante le fasi di carico e scarico sia del fermentatore che del digestore.

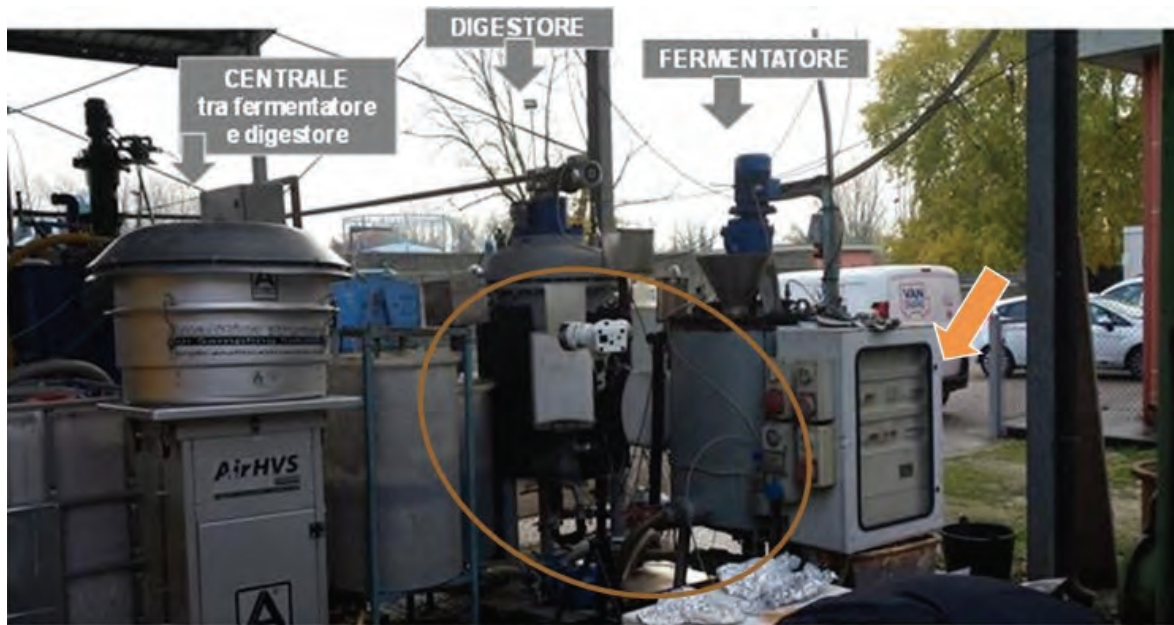
Con particolare attenzione a:

- carico dello spremuto nel fermentatore,
- scarico del fermentato,
- carico del digestore,
- scarico del digestato.

Le postazioni nelle quali sono stati effettuati i campionamenti sono illustrate nella Figura 12. L'area di carico fermentatore e digestore è caratterizzata da spazi limitati per cui è stato possibile collocare i campionatori in una posizione centrale tra fermentatore e digestore ed in prossimità dell'uscita fermentatore, verso il lato esterno indicato dalla freccia arancione.

Non risulta possibile distinguere l'area nella quale avviene il carico del fermentatore da quella del carico digestore, in quanto perfettamente attigue tra loro, come evidenziato dal cerchio marrone impresso nella Figura 12.

Figura 12 - Immagine del sito di campionamento durante la campagna 3-4



In Figura 13 sono invece dettagliate le fasi a maggior rischio espositivo degli operatori a bioaerosol ed in particolare: in particolare lo scarico, sia del fermentato che dello spremuto, in quanto questo viene raccolto in vasche. Nel caso del fermentato in uscita dall'impianto è osservabile anche una sorta di gorgogliamento all'uscita del fermentato prima che questo venga convogliato nel tubo di scarico e nella vasca di raccolta sottostante (immagine centrale Figura 13). In merito a questo punto specifico va sottolineato che le soluzioni tecniche adottate sono legate alla scala pilota della struttura. Il trasferimento alla piena scala comporterebbe la realizzazione di sistemi di scarico sostanzialmente diversi, sicuramente più contenitivi in termini di emissioni per unità di massa trattata. Pertanto, l'analisi condotta consente di aumentare la conoscenza rispetto alle specie microbiche associate alla matrice e potenzialmente diffusibili in aria, ma non può essere utilizzata per valutare le quantità realmente emesse in un impianto su scala reale. Quest'ultima valutazione non può prescindere da un monitoraggio specifico considerando volumi di materiale diversi e soluzioni tecnologiche volte sia all'automatizzazione delle fasi di carico e scarico che al contenimento del rischio tipiche della scala reale di processo.

Figura 13 - Immagine dei punti di carico e scarico degli influenti ed effluenti nell'impianto pilota oggetto dell'indagine



In questa ultima campagna è stato possibile effettuare una unica valutazione di PM10, in quanto le operazioni di carico e scarico del fermentatore e del digestore avvengono simultaneamente solo al mattino per una durata complessiva ridotta (tempo massimo complessivo ~1h).

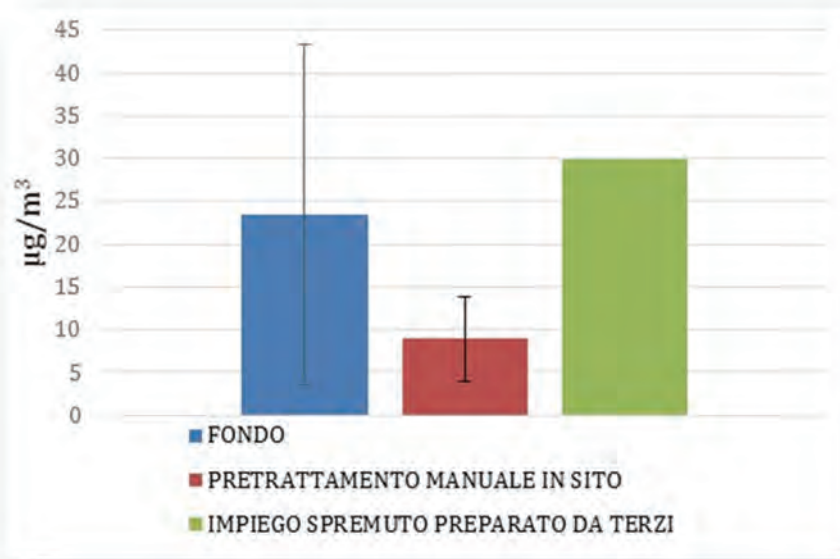
RISULTATI E DISCUSSIONE

Risultati valutazione PM10

La valutazione del particolato aerodisperso ha mostrato valori di PM10 (Figura 14) piuttosto contenuti e conformi all'atteso per un'area extraurbana (~7 km dal centro città) ubicata all'interno di un'area parco. I valori più elevati riscontrati sono pari a $37.5\mu\text{g}/\text{m}^3$ nel pomeriggio-sera del 10/03 (dalle h 14 alle h 19) mentre i valori più contenuti sono stati registrati nella mattinata del 4/05 (dalle h 6 alle h 11) in condizioni di moderata presenza di correnti d'aria ($6\mu\text{g}/\text{m}^3$).

I livelli sono decisamente inferiori ai valori previsti per le polveri PNOC (*Particulate Not Otherwise Classified*) respirabili ($3\text{mg}/\text{m}^3$) in ambiente lavorativo (TLV-TWA, ACGHI 2014) e sono, inoltre, inferiori ai valori stabiliti per l'aria dal D.Lgs 155/10 (PM10 giornaliera $< 50\mu\text{g}/\text{m}^3$).

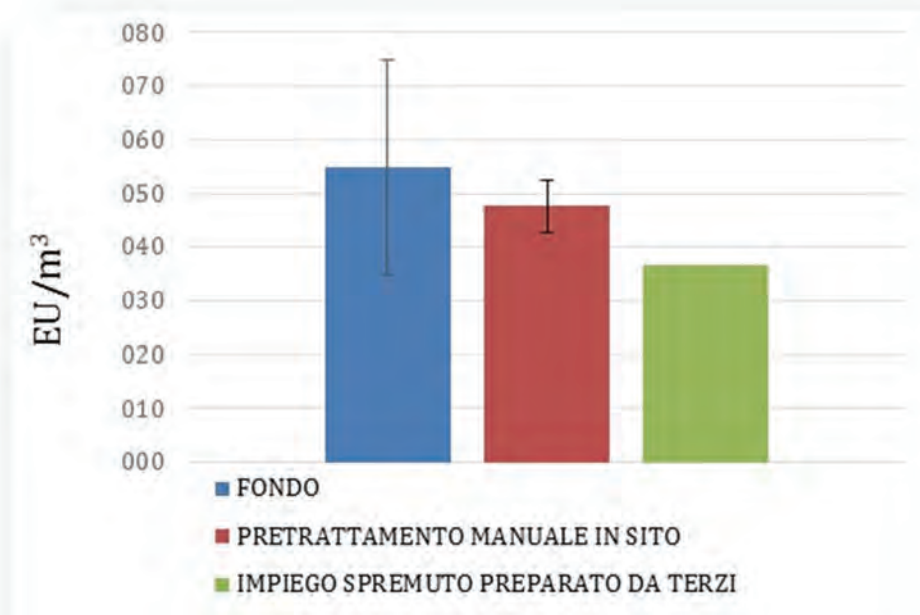
Figura 14 - Media e deviazione standard delle concentrazioni di PM10 nelle 3 campagne di campionamento



Risultati valutazione endotossine

Il contenuto endotossinico misurato nel PM10 risulta conforme a quanto atteso per siti analoghi e comunque inferiori ai valori proposti come valore limite in ambiente lavorativo [90 EU/m³, Health Council of Netherlands, 2012]. Non si osservano livelli di endotossine in aumento dovuti all'impiego della FORSU come evidenziato in Figura 15.

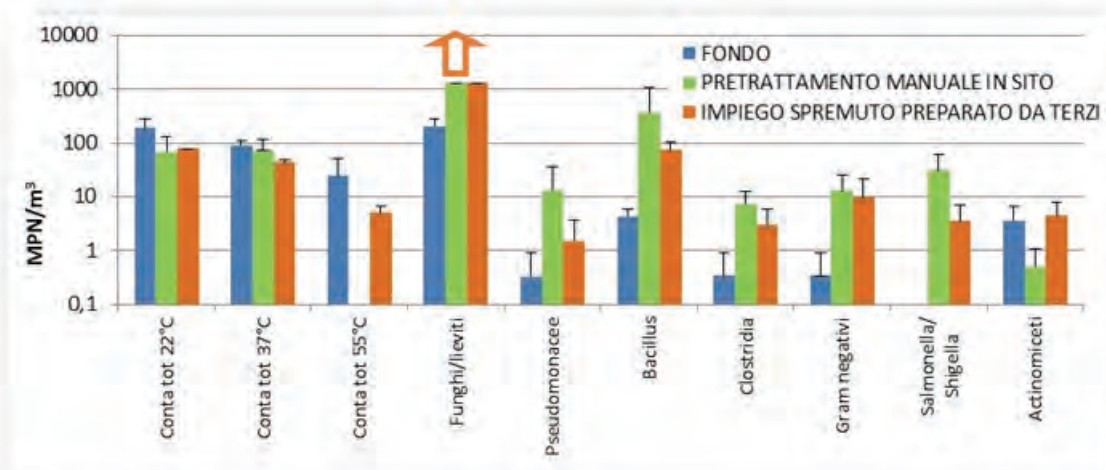
Figura 15 - Media e deviazione standard delle concentrazioni di endotossine misurate nelle 3 campagne di campionamento



Risultati monitoraggio bioaerosol

La valutazione del bioaerosol nelle 3 campagne di campionamento ha evidenziato le concentrazioni illustrate in Figura 16. In particolare si sottolinea che, per i funghi ed i miceti, si è osservato un aumento delle concentrazioni tale da portare le piastre a confluenza anche con campionamenti ridotti in termini di litri di aria campionati.

Figura 16 - Concentrazione di agenti microbici nelle 3 campagne di campionamento condotte



Inoltre si segnala che nella seconda campagna di campionamento non è stato possibile stimare con precisione la conta a 55°C e gli actinomiceti a causa di una contaminazione diffusa, ad opera di bacilli che presentano colonie crostose e che hanno inibito la crescita di altri microorganismi.

A conferma della massiva presenza di *Bacillus* si evidenzia che le piastre con terreno selettivo specifiche per tale genere sono risultate confluenti quando utilizzate per il campionamento effettuato durante la seconda triturazione della FORSU.

La differenza fra le medie condotta per ciascun parametro considerando le tre campagne di campionamento ha evidenziato un risultato significativo per:

- Funghi (Anova $p < 0.01$, in particolare il fondo risulta più basso delle successive 2 campagne in presenza di FORSU);
- *Bacillus* (Anova $p < 0.05$, in particolare il fondo risulta più basso della successiva campagna in presenza di FORSU manualmente triturato);
- *Clostridium* (Anova $p < 0.05$, in particolare il fondo risulta più basso della successiva campagna in presenza di FORSU manualmente triturato).

I dati illustrati mostrano che:

- è presente una bassa contaminazione di fondo pur se non trascurabile, trattandosi di un sito non confinato sebbene protetto da una tettoia e con una limitata dispersione dovuta alla presenza di edifici circostanti su 2 lati;
- la contaminazione aumenta in modo considerevole durante la fase di triturazione della FORSU con un Indice Globale di Contaminazione Microbica (sommatoria delle conte ambientali mesofile e di funghi e miceti) [Grisoli et al., 2009] che cresce notevolmente (da 485 a > 1400 MPN/m³), raggiungendo dei livelli di contaminazione considerabili alti per gli ambienti confinati;
- l'indice di contaminazione mesofila (conta mesofila in rapporto alla conta ambientale) (Grisoli et al., 2009) aumenta sia in presenza di FORSU pretrattata manualmente in sito, sia in

presenza di FORSU "pressata" presso soggetto terzo, rispettivamente di 2.31 e 1.22 volte, indicando un peggioramento delle condizioni di contaminazione dal punto di vista igienico-sanitario;

- il genere *Bacillus* potrebbe essere rappresentativo quale indicatore della contaminazione legata alla FORSU. È in grado di produrre endospore ed è indicato in letteratura quale parametro critico in processi analoghi come il compostaggio o gli impianti di trattamento di materie prime secondarie di origine vegetale. Anche in questo caso possiamo osservare che tale indicatore passa da valori < ad 1 log MPN/m³ durante la prima campagna di monitoraggio a valori decisamente superiori. Le concentrazioni risultano più elevate di 2.6 log durante la triturazione della FORSU in sito rispetto alla contaminazione di fondo. Inoltre, permane una contaminazione da bacilli anche in presenza di FORSU "pressata" di 1.3 log rispetto al valore di fondo;
- nell'ambito della seconda campagna di campionamento si osserva un livello di contaminazione critico soprattutto per il monitoraggio condotto nel pomeriggio del primo giorno in corrispondenza del quale sono state osservate contaminazioni microbiche rilevanti ed in particolare si sottolinea l'elevato numero di microrganismi appartenenti al genere *Bacillus* e la presenza di crescita su terreni selettivi per enterobatteri;
- tra i microrganismi successivamente isolati ed identificati attraverso test rapidi di identificazione (API) elencati nelle Tabelle 12, 13 e 14 si riscontra la presenza di alcuni patogeni e numerosi opportunisti trasmissibili prevalentemente per via aerea, per contatto e per via oro-fecale. Alcuni di questi microrganismi hanno un significato sanitario e sono classificati in classe 2: citiamo, a titolo di esempio, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*. Quest'ultimo microrganismo è attualmente ritenuto emergente per infezioni ricorrenti, soprattutto in ambito nosocomiale dovute a ceppi spesso antibiotico-resistenti.

Come considerazione conclusiva, è opportuno ricordare ancora che tutta la campagna di monitoraggio ha avuto come oggetto una struttura pilota, che risente quindi di soluzioni tecniche particolari e non direttamente scalabili ad un impianto industriale. Su scala industriale ogni operazione unitaria della filiera va ripensata in termini non solo di efficienza ma anche di requisiti igienico-sanitari per la tutela della salute dei lavoratori e dell'ambiente di vita circostante. I risultati ottenuti hanno quindi importanza sostanziale nel definire il primo passaggio della valutazione del rischio (*hazard identification*) in termini di individuazione di contaminanti emessi che costituiscono un potenziale pericolo sia per la salute dei lavoratori che per la potenziale dispersione in ambiente. D'altra parte una valutazione del rischio completa richiede la quantificazione specifica dei flussi di massa emessi in ogni fase di lavorazione e non può prescindere da un monitoraggio condotto in piena scala. In definitiva, quindi, è comunque fin da ora auspicabile un processo industriale, sia di eventuale trattamento della FORSU in loco che di impiego della FORSU "pressata", che tenga conto delle evidenze emerse in modo da attuare un adeguato contenimento del rischio.

Tabella 12 - Microorganismi identificativi a livello di specie mediante test biochimici (API BiomeriueX) a partire dalle piastre campionate durante la Campagna 1

Microrganismo identificato	%	Significato per la salute / classificazione all. XLVI d.lgs.81	Vie di trasmissione	Diffusione ambientale	Descrizione generica
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99.5	Patogeno opportunist/2	Aerea	Ubiquitario	G -, Pseudomonadaceae
<i>Serratia rubidaea</i>	81.2	Patogeno opportunist	Parenterale	Acqua, suolo	G -, Enterobacteriaceae
<i>Photobacterium damsela</i>	95.0	Patogeno	Oro-fecale	Acqua, alimenti	G -, Vibrionaceae
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	75.2	Patogeno opportunist	Oro-fecale, Parenterale	Suolo acque superficiali	G -, Pseudomonadaceae

Conferme indicatori: no *C. perfringens*; no *E. coli*

Tabella 13 - Microorganismi identificativi a livello di specie mediante test biochimici (API BiomeriueX) a partire dalle piastre campionate durante la Campagna 2

Microrganismo identificato	%	Significato per la salute / classificazione all. XLVI d.lgs.81	Vie di trasmissione	Diffusione ambientale	Descrizione generica
<i>Hafnia alvei</i>	99	Patogeno opportunist	Oro-fecale	Suolo, alimenti	G -, enterobatteri
<i>Serratia marcescens</i>	98	Patogeno opportunist	Contatto diretto	Ubiquitario	G -, enterobatteri
<i>Proteus vulgaris</i>	99.9	Patogeno/2	Contatto	Suolo, concimi, liquami	G -, enterobatteri
<i>Serratia liquefaciens</i>	90.3	Patogeno opportunist		Suolo, rifiuti, acque reflue	G -, enterobatteri
<i>Serratia odorifera</i>	99.9	Patogeno opportunist		Ubiquitario	G -, enterobatteri
<i>Pseudomonas luteola</i>	82.6	Patogeno opportunist	Aerea	Ubiquitario	Pseudomonadaceae
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	98	Patogeno opportunist/2	Aerea	Ambienti umidi, impianti idrici	Enterobacteriaceae
<i>Klebsiella oxytoca</i>	99.6	Patogeno opportunist/2		Ubiquitario	Enterobacteriaceae
<i>Bacillus cereus</i>	99.9	Patogeno	Oro-fecale	Suolo, polvere, alimenti	G +, Bacillaceae
<i>Pantoe spp</i>	99.8	Patogeni opportunisti	Parenterale	Acqua, suolo	Enterobacteriaceae
<i>Bacillus licheniformis</i>	99.9	Patogeno opportunisti	Aerea	Suolo	G +, Bacillaceae
<i>Citrobacter freundii</i>	76	Patogeno opportunist	Oro-fecale	Acque, suolo	Enterobacteriaceae

Conferme indicatori : no *C. perfringens*; no *E. coli*

Tabella 14 - Microorganismi identificativi a livello di specie mediante test biochimici (API BiomeriueX) a partire dalle piastre campionate durante la Campagna 3-4

Microrganismo identificato	%	Significato per la salute/ classificazione all. XLVI d.lgs.81	Vie di trasmissione	Diffusione ambientale	Descrizione generica
<i>Pantoea 1 spp</i>	98.8	Patogeni opportunisti	Parenterale	Acqua, suolo	G-, Enterobacteriaceae
<i>Enterobacter cloacae</i> (2)	99.0; 98.7	Patogeni opportunisti	Contatto/aerea	Acqua ubiquitario	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99.0	Patogeno opportunistista/2	Aerea	Ubiquitario	Pseudomonadaceae
<i>Pseudomonas luteola</i> (2)	98.6; 89.0	Patogeno opportunistista	Aerea	Ubiquitario	Pseudomonadaceae
<i>Pseudomonas putida</i> (2)	98.8; 91.0	Patogeno opportunistista	Aerea	Nosocomiale	Pseudomonadaceae
<i>Citrobacter freundii</i>	97.8	Patogeno opportunistista	Oro-fecale	Acque, suolo	Enterobacteriaceae
<i>Enterobacter aerogens</i>	99.0	Patogeni opportunisti	Contatto/aerea	Acqua ubiquitario	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	97.9	Patogeno opportunistista/2	Aerea	Ambienti umidi, acqua	Enterobacteriaceae
<i>Proteus vulgaris</i>	99.0	Patogeno/2	Contatto diretto/indiretta	Suolo, concimi, liquami	Enterobacteriaceae

Conferma indicatori : 1 *C. perfringens*; assenza di *E. coli*

Attività 2.2: Valutazioni igienico-sanitarie connesse al riuso del digestato come fertilizzante

2.2.1 Premessa

Milioni di tonnellate di rifiuti solidi sono prodotti annualmente da fonti di origine domestica, industriale ed agricola e la decomposizione di questi rifiuti può portare a contaminazione su larga scala delle diverse matrici ambientali (es. acqua ed aria) [Nasir et al., 2012]. D'altra parte, la Commissione europea ha fissato l'ambizioso obiettivo di aumentare l'energia da fonti rinnovabili dall' 8,5% nel 2005 fino al 20% nel 2020 [EREC, 2008]; per raggiungere questo obiettivo, si è ipotizzato un aumento cospicuo dell'uso di tutti le fonti di energia rinnovabile disponibili, inclusi i rifiuti solidi di natura organica.

La DA rappresenta una valida opzione per la produzione di energia rinnovabile sotto forma di biogas e può essere utilizzata per il trattamento di rifiuti organici come concimi, fanghi, scarti di lavorazione dei prodotti alimentari, fanghi di depurazione e FORSU [Rajeshwari et al., 2000; Ward et al., 2008]. In aggiunta al biogas, la DA produce un digerito (o digestato) che può essere utilizzato come fertilizzante in agricoltura poiché i nutrienti inorganici presenti nella matrice in ingresso rimangono disponibili dopo il trattamento di digestione [Alkanok et al., 2014; Diaz et al., 2011; Lehtomaki and Bjornsson, 2006].

È importante però considerare che l'applicazione del digerito in campo può potenzialmente rappresentare una via di diffusione di microrganismi patogeni in ambiente. Il potenziale rischio per la salute è in parte legato alla tipologia di substrato utilizzato per la DA. In particolare rifiuti di origine animale oppure umana possono contenere batteri patogeni (es. *Salmonellae*, *Enterobacter*, *Clostridiaceae* e *Listeria*), parassiti (es. *Ascaris*, *Giardia* e *Cryptosporidium*), virus (es. norovirus, enterovirus, rotavirus, virus dell'Hepatite A) e funghi (*Candida*, *Aspergillus* e *Trichophyton*) [Sahlstrom, 2003; Sidhu and Toze, 2009; Venglovsky et al., 2006; Bonetta et al., 2014]. La possibile presenza di patogeni può essere ipotizzata anche nella FORSU [Hassen et al., 2001] sebbene specifiche informazioni sulla diffusione di microrganismi patogeni in questa matrice non siano disponibili in letteratura. Alcuni studi hanno inoltre evidenziato che i microrganismi patogeni possono sopravvivere dopo la DA [Sidhu and Toze, 2009; Bonetta et al., 2011; Fu et al., 2015] ed anche dopo l'applicazione in campo [Johansson et al., 2005], mettendo in luce il possibile rischio per la salute connesso al reimpiego in agricoltura dei prodotti della digestione.

2.2.2 Attività sperimentale

L'attività svolta è riferita ai seguenti due casi:

- Digestato prodotto dopo DA su scala pilota (condizioni di termofilia e processo a due fasi, di cui all'attività 1.1), a partire da FORSU.
- Pre-trattamento termico della FORSU (in scala di laboratorio, di cui all'attività 1.2).

Nella prima fase del lavoro sono stati scelti gli indicatori microbiologici da ricercare nei campioni in ingresso ed uscita degli impianti di digestione alimentati con FORSU, anche in considerazione del possibile riutilizzo in agricoltura del digerito. Per questo scopo, in assenza di una specifica normativa sul digerito ottenuto da FORSU, si è fatto riferimento ai parametri microbiologici previsti nella normativa sui fertilizzanti [D.Lgs. 75/2010 e successive modifiche] e nella recente normativa sul riutilizzo agronomico del digerito [DM n.5046 del 25 Febbraio 2016]. In particolare la normativa sui fertilizzanti prevede per gli ammendanti organici (ammendante compostato misto da FORSU) e per il separato solido del digestato essiccato la ricerca di *Salmonella*, che deve risultare assente in 25 g di prodotto e la ricerca di *Escherichia coli* che deve presentare una carica <1000 UFC/g (<3 Log UFC/g). Nella normativa sul riutilizzo agronomico del digerito, dove però non è citata la possibilità di

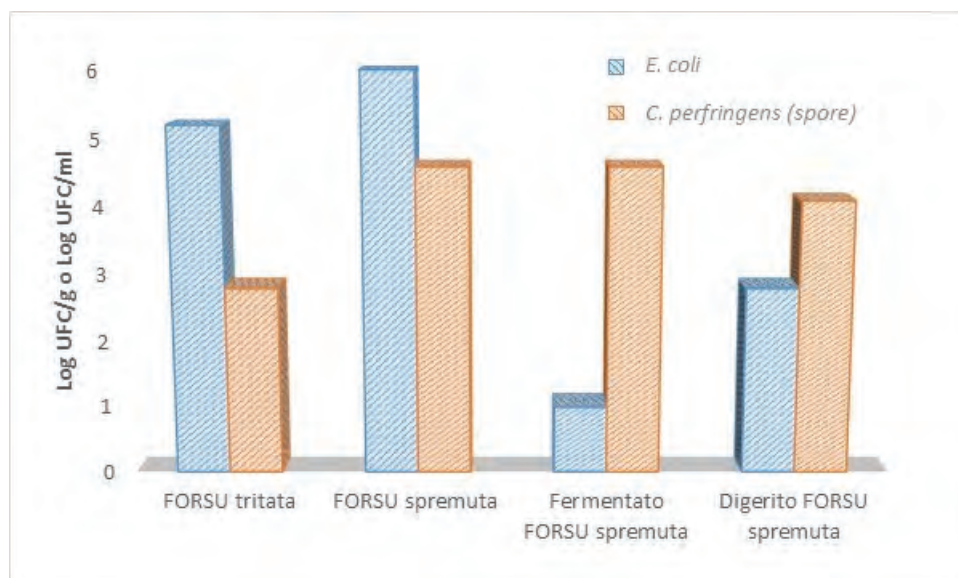
utilizzare il digerito prodotto da FORSU, è invece prevista la sola assenza di *Salmonella* in 25 g di digerito analizzato.

In questo studio si è scelto di ricercare *E. coli* quali indicatore di contaminazione fecale e parametro di riferimento normativo per l'impiego agronomico del digerito ottenuto da FORSU; è stata inoltre aggiunta la ricerca delle spore di *Clostridium perfringens* sia come indicatore della capacità di sopravvivenza ai trattamenti (digestione termofila, pre-trattamento al calore) dei microrganismi più resistenti sia per il possibile ruolo di indicatore igienico-sanitario. È stata inoltre effettuata la ricerca di *Salmonella* spp. quale indicatore della presenza di altri patogeni, come previsto dalla normativa sui fertilizzanti e sul digerito, e la ricerca di *Listeria monocytogenes* in considerazione dei risultati ottenuti in precedenti studi che hanno evidenziato una diffusione di questo microrganismo patogeno in campioni di digerito [Bonetta, 2011; Bonetta, 2014].

La ricerca di *E. coli* e spore di *C. perfringens* è stata effettuata con metodi colturali classici ed i risultati ottenuti sono stati espressi come UFC/g di campione. La ricerca di *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* è stata effettuata seguendo metodiche molecolari tratte da bibliografia [Burtscher et al., 2003; Tao et al., 2015; Bonetta et al., 2016]. I risultati ottenuti sono stati espressi come presenza/assenza.

Per quanto riguarda la valutazione del *biohazard* associato al riutilizzo in agricoltura del digerito prodotto dopo DA a partire da FORSU sono stati analizzati i seguenti campioni: I) 1 campione di FORSU ottenuto mediante triturazione manuale della raccolta differenziata della città di Treviso; II) 5 campioni di spremuto ottenuto da FORSU fornito dalla Società Contarina; III) 2 campioni di fermentato ottenuto dopo trattamento dello spremuto (1° fase del processo termofilo), IV) 3 campioni di digerito ottenuto dopo digestione dello spremuto (2° fase del processo termofilo). I risultati ottenuti per gli indicatori microbiologici ed i microrganismi patogeni sono riportati in Figura 17 ed in Tabella 15.

Figura 17 - Concentrazioni medie dei microorganismi indicatori in ingresso, dopo fermentazione e dopo digestione termofila di FORSU (tritata o spremuta).



N.B. In assenza di crescita del microorganismo nel grafico è stato riportato il limite di rilevazione del metodo

Tabella 15 - Frequenza (%) dei microorganismi patogeni indicatori nelle differenti tipologie di campione analizzati

Campione	<i>Salmonella</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>
FORSU tritata	0 (0/1)	100 (1/1)
FORSU spremuta	100 (5/5)	100 (5/5)
Fermentato FORSU spremuta	0 (0/2)	0 (0/2)
Digerito FORSU spremuta	0 (0/3)	0 (0/3)

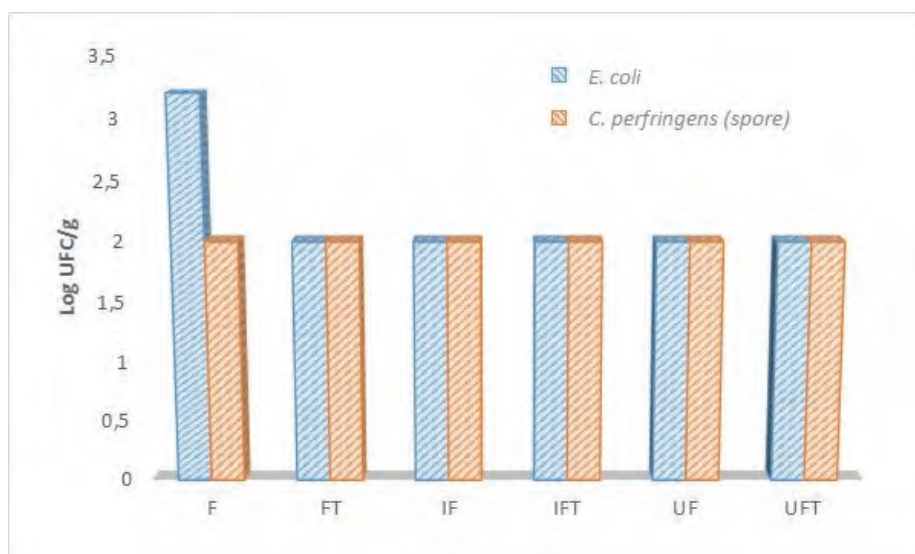
In generale si è osservata una carica microbica superiore nei campioni di FORSU spremuta rispetto al campione tritato, soprattutto per quanto riguarda la concentrazione delle spore di *C. perfringens*; mentre, valori confrontabili con la FORSU spremuta di questo microrganismo sono stati ottenuti sia nei campioni fermentati che nei campioni dopo la fase metanigena (digerito finale). Ciò risulta in accordo con diversi studi bibliografici nel quale viene riportato come le spore di *C. perfringens* non vengano inattivate dai processi di DA, anche in condizioni termofile [Sahlstrom, 2003; Bagge et al., 2005]. È stata invece osservata una riduzione marcata della concentrazione di *E. coli* dopo la fase di fermentazione, mentre la carica di *E. coli* rimane comunque inferiore all'ingresso anche dopo la fase metanigena. La scarsa resistenza di *E. coli* a processi di DA termofila è stata riportata anche in altri studi [Franke-Whittle et al., 2013; Levantesi et al., 2015]. Per quanto riguarda la presenza dei microorganismi patogeni, *L. monocytogenes* è stata rilevata in tutti i campioni di FORSU analizzati (sia tritata che spremuta), mentre *Salmonella* spp. nell'83% (5/6) dei campioni analizzati, evidenziando come questi microrganismi possano essere presenti in questa tipologia di matrice. Non è stata invece osservata la presenza di entrambi i microrganismi nei campioni di fermentato e di digerito in accordo con quanto riportato in altri studi sulla inattivazione di *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* dopo digestione termofila [Wagner et al., 2008; Wagner et al., 2009; Franke-Whittle et al., 2013].

Per quanto riguarda la possibilità di riutilizzo agronomico del digerito ottenuto dopo trattamento termofilo a due stadi (fermentazione + fase metanigena) di FORSU spremuta, i campioni analizzati sia di fermentato che di digerito rientrano nei parametri previsti nella normativa sui fertilizzanti ed in quella relativa al riutilizzo del digestato. Ovviamente è importante sottolineare come sarebbe necessario effettuare le analisi su un maggior numero di campioni per confermare tutti i risultati ottenuti anche in relazione alla rappresentatività del campione, poiché i microrganismi possono non distribuirsi in modo omogeneo nel campione stesso. Inoltre i campioni di uscita non corrispondono ai campioni in ingresso testati evidenziando la necessità di ulteriori approfondimenti per confermare l'efficacia di abbattimento del processo termofilo a due stadi.

Per valutare l'efficacia di riduzione della carica microbica in seguito al pretrattamento termico della FORSU sono stati analizzati: i) 2 campioni di FORSU (un campione tal quale ed uno pretrattato termicamente); ii) 2 campioni di FORSU addizionata di inoculo anaerobico prima della DA mesofila (un campione ottenuto da FORSU tal quale ed uno da FORSU pretrattata termicamente); iii) 2 campioni di digerito finale, ottenuti dopo digestione mesofila, dei campioni descritti al punto ii).

I risultati ottenuti per gli indicatori microbiologici ed i microrganismi patogeni sono riportati in Figura 18 ed in Tabella 16.

Figura 18 - Concentrazioni dei microorganismi indicatori nelle prove effettuate per valutare l'efficacia del pretrattamento termico



F: FORSU; **FT:** FORSU pretrattata al calore; **IF:** Ingresso digestore FORSU; **IFT:** Ingresso digestore FORSU pretrattata al calore; **UF:** Uscita digestore FORSU; **UFT:** Uscita digestore FORSU.

N.B. In assenza di crescita del microorganismo nel grafico è stato riportato il limite di rilevazione del metodo

Tabella 16 - Presenza dei microorganismi patogeni indicatori nelle differenti tipologie di campione analizzati

Campioni	<i>Salmonella</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>
F	+	+
FT	-	-
IF	+	+
IFT	-	-
UF	+	-
UFT	-	-

+: presenza amplificata; - assenza amplificata; **F:** FORSU; **FT:** FORSU pretrattata al calore;

IF: Ingresso digestore FORSU; **IFT:** Ingresso digestore FORSU pretrattata al calore;

UF: Uscita digestore FORSU; **UFT:** Uscita digestore FORSU.

I risultati ottenuti, seppur limitati ad un unico campione, sembrano mostrare l'efficacia del pretrattamento termico sia nella riduzione del carico microbico che nell'abbattimento di microrganismi patogeni in accordo con i dati bibliografici [Franke-Whittle et al., 2013; Levantesi et al., 2015]. È importante però sottolineare come il processo mesofilo testato, in assenza di pre-trattamento della FORSU, non sia in grado di eliminare la presenza di *Salmonella* nel digerito finale. Anche in questo caso, sarebbe necessario effettuare le analisi su un maggior numero di campioni per confermare i risultati ottenuti.

Considerazioni conclusive

I risultati precedentemente discussi si riferiscono alla situazione specifica ed occorre evidenziare alcuni fattori confondenti ed in particolare:

- la stagionalità che comporta sia mutevoli condizioni meteo-climatiche che una differente composizione della FORSU;
- le lavorazioni durante l'attività di campionamento hanno subito molteplici modifiche che si sono rese necessarie al fine del miglioramento del processo in funzione degli obiettivi tecnologici. Tali modifiche hanno necessariamente reso non costanti le condizioni operative durante i campionamenti.

È necessario sottolineare che tutti i rilevamenti fatti sono relativi alle operazioni di una struttura impiantistica su scala pilota, che ovviamente comporta soluzioni tecniche sostanzialmente diverse e meno rigorose dal punto di vista della igiene e sicurezza sul lavoro rispetto ad una struttura operante in continuo ed in modo standardizzato in piena scala.

Sulla base delle evidenze riscontrate, è opportuno tuttavia considerare che il ricevimento e la manipolazione della FORSU rappresentano una fonte di *biohazard* aggiuntivo nei processi di DA che è potenzialmente elevato nel caso in cui avvenga una triturazione del rifiuto manuale, operazione ovviamente non proponibile in un impianto su scala reale. Per configurazioni di processo che eventualmente dovessero prevedere tale operazione è necessario, quindi, predisporre una valutazione del rischio accurata e delle misure di contenimento idonee.

Dai risultati ottenuti, seppur limitati ad un unico campione, si evince che il pretrattamento termico riduce a livelli prossimi allo zero il *biohazard* connesso alle caratteristiche microbiologiche della matrice, mentre la triturazione e la spremitura/pressatura non garantiscono un abbattimento delle cariche microbiche, ma, al contrario, si evidenzia una più elevata concentrazione microbica sia per i patogeni che per gli indicatori misurati nella FORSU spremuta. Va ovviamente considerato il fatto che, in piena scala, il rifiuto spremuto, che è di fatto un liquido piuttosto che un solido, sarebbe veicolabile con modalità proprie di un flusso liquido, e quindi all'interno di tubazioni e contenitori sostanzialmente chiusi, riducendo in modo importante le possibilità di aerodispersione microbica.

La fermentazione e la seguente digestione, condotte in termofilia, riducono ampiamente la presenza dei microrganismi indagati. Ciononostante permane una contaminazione da sporigeni, evidenziata sia dalla presenza di *Clostridium* che dalla diffusa contaminazione da *Bacillus* riscontrata durante il campionamento del bioaerosol, ovviamente in ogni caso da considerare come determinate quantitativamente in un contesto su scala pilota.

BIBLIOGRAFIA

- Alkanok G, Demirel B, Onay TT. 2014. Determination of biogas generation potential as a renewable energy source from supermarket wastes. *Waste Management*, 34: 134-140.
- Bagge E, Sahlstrom L, Albiñ A. 2005. The effect of hygienic treatment on the microbial flora of biowaste at biogas plant. *Water Research*, 39: 4879-4886.
- Bonetta Si, Pignata C, Lorenzi E, De Cegli M, Meucci L, Bonetta Sa, Gilli G, Carraro E, 2016. Detection of pathogenic *Campylobacter*, *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in wastewater by PCR assay. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(15): 15302-15309.
- Bonetta Si, Bonetta Sa, Ferretti E, Fezia G, Gilli G, Carraro E. 2014. Agricultural reuse of the digestate from anaerobic co-digestion of organic waste: microbiological contamination, metal hazards and fertilizing performance. *Water Air & Soil Pollution*, 225: 2046-2056.

- Bonetta Si, Ferretti E, Bonetta Sa, Fezia G, Carraro E. 2011. Microbiological contamination of digested products from anaerobic co-digestion of bovine manure and agricultural by-products. *Letters in Applied Microbiology*, 53: 552-557.
- Burtcher C, Wuertz S. 2003. Evaluation of the use of PCR and Reverse Transcriptase PCR for detection of pathogenic bacteria in biosolids from anaerobic digestors and aerobic composters. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 4618-4627.
- Decreto Interministeriale n. 5046 del 25 Febbraio 2016. Criteri e norme tecniche generali per la disciplina regionale dell'utilizzazione agronomica degli effluenti di allevamento e delle acque reflue di cui all'art. 113 del Decreto legislativo 3 aprile 2006 n. 152, nonché per la produzione e l'utilizzazione agronomica del digestato di cui all'art. 52, comma 2-bis del decreto legge 22 giugno 2012, n. 83, convertito in legge 7 agosto 2012 n. 134.
- Decreto Legislativo 29 aprile 2010, n.75. Riordino e revisione della disciplina in materia di fertilizzanti, a norma dell'articolo 13 della legge 7 luglio 2009, n. 88. GU Serie Generale n. 121 del 26 maggio 2010.
- Decreto 28 giugno 2016. Modifiche degli allegati 1, 2, 3, 6 e 7 del decreto legislativo 29 aprile 2010, n. 75, recante: «Riordino e revisione della disciplina in materia di fertilizzanti, a norma dell'articolo 13 della legge 7 luglio 2009, n. 88.». GU Serie Generale n.188 del 12-8-2016.
- Diaz JP, Reydes IP, Lundin M, Horvath IS. 2011. Co-digestion of different waste mixture from agro-industrial activities: kinetic evaluation and synergetic effects. *Bioresource Technology*, 102: 10834-10840.
- ENAMA. 2011. Studio Progetto Biomasse. Stato dell'arte degli impianti di produzione di energia da biomasse.pp.15 (www.progettobiomasse.it).
- EREC. 2008. Digestion of biowaste: laboratory experiments and in situ validation. *Anaerobe* 14, 181-183. Renewable energy technology roadmap 20 % by 2020. European Renewable Energy Council. pp. 24.
- Fracchia L, Pietronave S, Rinaldi M, Martinotti MG. 2006. Site-related airborne biological hazard and seasonal variations in two wastewater treatment plants. *Water Research*, 40: 1985-1994.
- Franke-Whittle IH, Insam H. 2013. Treatment alternatives of slaughterhouse wastes, and their effect on the inactivation of different pathogens: a review. *Critical Reviews in Microbiology*, 39: 139-151.
- Fu B, Jiang Q, Liu H. 2015. Quantification of viable but nonculturable *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. during sludge anaerobic digestion and their reactivation during cake storage. *Journal of Applied Microbiology*, 119: 1138-1147.
- Fuess LT, Garcia ML. 2014. Implications of stillage land disposal: A critical review on the impacts of fertigation. *Journal of Environmental Management*, 145: 210-229.
- Grisoli P, Rodolfi M, Villani S, Grignani E, Cottica D, Berri A, Picco AM, Dacarro C. 2009. Assessment of airborne microorganism contamination in an industrial area characterized by an open composting facility and a wastewater treatment plant. *Environmental Research*, 109: 135-142.
- Haagsma JA, Tariq L, Heederik DJ, Havelaar AH. 2012. Infectious disease risks associated with occupational exposure: a systematic review of the literature. *Occupational and Environmental Medicine*, 69: 140-146.
- Hassen A, Belguith K, Jedidi N, Cherif A, Cherif M, Boudabous A. 2001. Microbial characterization during composting of municipal solid waste. *Bioresource Technology*, 80: 217-225.
- Johansson M, Emmoth E, Salomonsson, AC, Albihn A. 2005. Potential risks when spreading anaerobic digestion residues on grass silage crops-survival of bacteria, moulds and viruses. *Grass and Forage Science*, 60: 175-185.

- Lehtomaki A, Bjornsson L. 2006. Two-stage anaerobic digestion of energy crops: methane production, nitrogen mineralization and heavy metal mobilization. *Environmental Technology*, 27: 209-218.
- Levantesi C, Beimfohr C, Blanch AR, Carducci C, Gianico A, Lucena F, Tomei MC, Mininni G. 2015. Hygienization performances of innovative sludge treatment solutions to assure safe land spreading. *Environmental Science and Pollution Research*, 22: 7237-7247.
- Liebers V, Raulf-Heimsoth M, Linsel G, Goldscheid N, Düser M, Stubel H, Brüning Th. 2007. Evaluation of Quantification Methods of Occupational Endotoxin Exposure. *Journal of Toxicology and Environmental Health (Part A)*, 70: 1798-1805.
- Montano D. 2014. Chemical and biological work-related risks across occupations in Europe: a review. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 9 (113).
- Nasir MI, Mohd Ghazi TI, Omar R. 2012. Production of biogas from solid organic wastes through anaerobic digestion: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95: 321-329.
- Rajeshwari KV, Balakrishnan M, Kansal A, Lata K, Kishore VVN. 2000. State-of-the-art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 4: 135-156.
- Sahlstrom L. 2003. A review of survival of pathogenic bacteria in organic waste used in biogas plants. *Bioresource Technology*, 87: 161-166.
- Sidhu JPS, Toze SG. 2009. Human pathogens and their indicators in biosolids: a literature review. *Environment International*, 35: 187-201.
- Tao T, Chen Q, Bie X, Lu F, Lu Z. 2015. Mining of novel species-specific primers for PCR detection of *Listeria monocytogenes* based on genomic approach. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31: 1955-1966.
- Traversi D, Gorrasi I, Bonetta S, Leinardi R, Pietrangeli B, Carraro E, Gilli G. 2015. Green job bio-aerosol exposure during anaerobic digestion for biomass energetic valorization. *Environmental Research*, 138: 425-431.
- Venglovsky J, Martinez J, Placha I. 2006. Hygienic and ecological risks connected with utilization of animal manures and biosolids in agriculture. *Livestock Science*, 102: 197-203.
- Wagner AO, Gstraunthaler G, Illmer P. 2008. Survival of bacterial pathogens during the thermophilic anaerobic of biowaste: laboratory experiments and in situ validation. *Anaerobe*, 14(3): 181-183.
- Wagner AO, Malin C, Gstraunthaler G, Illmer P. 2009. Survival of selected pathogens in diluted sludge of a thermophilic waste treatment plant and in NaCl-solution under aerobic and anaerobic conditions. *Waste Management*, 29: 425-429.
- Ward AJ, Hobs PJ, Holliman PJ, Jones DL. 2008. Optimization of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresource Technology*, 99: 7928-7940.
- Wery N. 2014. Bioaerosols from composting facilities-a review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4: 42-1.
- Zhang T, Shao M, Li Ye. 2012. 454 Pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants. *The ISME Journal*, 6: 1137-1147.

CAPITOLO 3 - Bioprocessi per la produzione di polimeri biodegradabili

Mauro Majone*, **Francesco Valentino***, **Lorenzo Bertin****, **Simona Rossetti*****, **Giulio Zanaroli****, **Gonzalo Martinez****, **Andrea Nuzzo****, **Salvatore Puccio**** e **Fabio Fava****

* Dipartimento di Chimica, Università di Roma "Sapienza" (Unirm), Roma

** Dipartimento di Ingegneria Civile, Chimica, Ambientale e dei Materiali, Università di Bologna (Unibo), Bologna

*** Istituto di Ricerca sulle Acque, Consiglio Nazionale delle Ricerche (Irsa), Roma

In quest'attività sono state studiate due alternative di produzione di un polimero biodegradabile, il poliidrossialcanoato (PHA) da:

- a) Processi basati su colture microbiche miste (MMC);
- b) Processi basati su monoculture geneticamente modificate (MOGM) e valutazione degli aspetti di sicurezza connessi.

Attività 3.1: Sviluppo di un bioprocesso a colture miste (scala pilota)

A cura di Mauro Majone e Francesco Valentino

3.1.1 Introduzione

I PHA sono poliesteri completamente biodegradabili che possono essere prodotti per via biologica a partire da fonti rinnovabili, contrariamente alla maggior parte dei materiali termoplastici diffusi oggi sul mercato, che sono ricavati da petrolio e di solito recalcitranti alla biodegradazione.

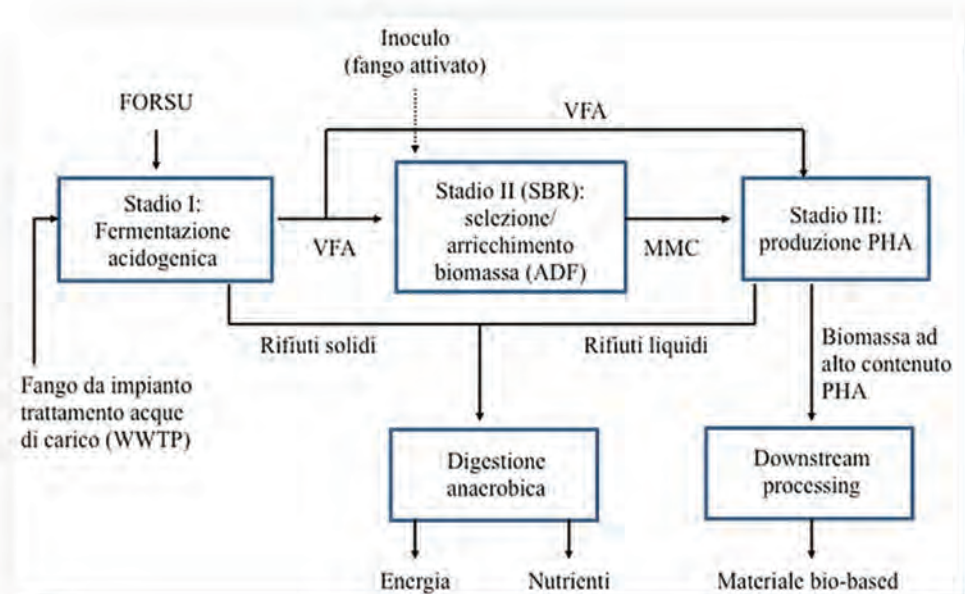
All'interno della grande famiglia dei PHA, i più comuni e maggiormente diffusi sono l'omopolimero poli(3-idrossibutirrato) ed il copolimero poli(3-idrossibutirrato-co-3-idrossivalerato), rispettivamente P(3HB) e P(3HB-co-3HV). Questi materiali sono poliesteri termoplastici con analoghe proprietà meccaniche a quelle dei polimeri convenzionali, in particolare il polipropilene [Laycock et al., 2013]. Il prezzo attuale del PHA commerciale, a partire da 5.0 €/Kg, è strettamente correlato alla via di produzione industriale che impiega colture pure di ceppi alto-produttori che utilizzano zuccheri come fonte di carbonio; tali valori non sono ancora competitivi rispetto al prezzo di mercato dei polimeri convenzionali (<1,0 €/Kg) [Gholami et al., 2016]. L'aspetto economico è pertanto cruciale per la successiva possibilità di commercializzazione di tali materiali e strategie alternative sono state dapprima sviluppate su scala di laboratorio ed hanno oggi portato alla implementazione dei primi prototipi su scala pilota. Tali strategie consistono nella coltivazione di MMC e l'utilizzo di reflui organici a basso costo (o a costo zero) come substrati per l'alimentazione in sostituzione di quelli sintetici.

Gli stadi finali di estrazione del PHA dalle cellule e sua eventuale purificazione (downstream processing) sono anch'essi di fondamentale importanza per l'economia del processo, anche tenendo conto che influenzano fortemente la qualità del polimero ottenuto, il che regola le possibilità di applicazione e ovviamente il suo valore di mercato [Koller et al., 2011].

In linea di principio, qualsiasi rifiuto organico fermentabile può essere convertito in PHA attraverso un processo anaerobico-aerobico multistadio. Solitamente si fa riferimento ad un processo a tre stadi, quello maggiormente investigato e più dettagliatamente discusso in letteratura [Valentino et al., 2016]. Tale processo (schematicamente riportato in Figura 19) prevede una prima fermentazione del refluo organico (Stadio I) in una miscela ricca in acidi grassi volatili (VFA), substrati diretti e di elezione per la sintesi di PHA. La miscela fermentata ricca in VFA viene alimentata nei due stadi aerobici successivi, operanti in condizioni differenti per assicurare obiettivi altrettanto differenti. Nello

specifico, lo Stadio II consiste in un reattore sequenziale (SBR) in cui il regime di alimentazione dinamica imposto (*Aerobic Dynamic Feeding*, ADF) è finalizzato ad ottenere la ciclica alternanza di brevi periodi di presenza di substrato (fase “*feast*”) con lunghi periodi di difetto del substrato (fase “*famine*”). In queste condizioni sono favoriti i microrganismi che sono in grado di attivare un ciclico alternarsi di stoccaggio del PHA (fase *feast*) e suo consumo (fase *famine*), il che a sua volta favorisce la selezione ed l’arricchimento di un consorzio microbico misto (MMC) PHA-produttore [Majone et al., 1999]; lo Stadio III, sfruttando le potenzialità del consorzio selezionato, è finalizzato all’incremento sostanziale del contenuto intracellulare di PHA e quindi è lo stadio dove avviene la produzione di PHA vera e propria. Questo stadio prevede condizioni operative batch, con carichi organici applicati (OLR) di gran lunga superiori (anche di un fattore 10) rispetto ai tipici OLR applicati nei reattori SBR di selezione. Al termine dello Stadio III di accumulo del PHA, la biomassa ricca in PHA viene convogliata nelle fasi finali di processo (*downstream*) per la rottura della parete cellulare dei microrganismi ed il recupero del PHA prodotto.

Figura 19 - Processo multi-stadi implementato in scala pilota per la produzione di PHA da FORSU



3.1.2. Metodi

Implementazione del processo su scala pilota

In questo studio, sulla base di conoscenze di laboratorio pregresse, è stata effettuata direttamente una sperimentazione alla scala pilota, mediante una piattaforma che ripropone i tre stadi di processo sopra descritti è riportati in Figura 19.

Per la sperimentazione relativa allo stadio di fermentazione e DA si fa riferimento al sistema doppia fase descritto nel capitolo 1 e riportato in Figura 1. Le parti impiantistiche installate ed utilizzate per lo stoccaggio del fermentato, la coltivazione della biomassa (SBR), accumulo ed estrazione del PHA sono illustrate nella Figura 20.

Il refluo organico utilizzato, per la sua valorizzazione e conversione in PHA, era la FORSU, fornita settimanalmente presso la sede stessa operativa dell’impianto pilota, ovvero presso l’impianto di depurazione acque di Treviso (ATS S.r.l., Alto Trevigiano Servizi).

Figura 20 - Unità di processo installate ed operative per la produzione di PHA (dalla coltivazione della biomassa alla fase finale estrattiva del prodotto)



La sperimentazione ha previsto una fase iniziale di start up del reattore SBR di selezione che a tal fine è stato inoculato con il fango dell'impianto di depurazione e poi alimentato con un substrato sintetico costituito interamente da acido acetico, diluito con acqua di rete e digerato anaerobico per l'apporto di micro- e macro-nutrienti necessari alla crescita cellulare. Dato che il contenuto di azoto e fosforo presente nel digestato anaerobico non era sufficiente per ottenere un tipico rapporto di crescita bilanciata COD:N:P=100:5:1 (g/g) nella soluzione di alimentazione, azoto e fosforo venivano forniti in seguito all'aggiunta di una aliquota fissa di una soluzione concentrata di NH_4Cl e KH_2PO_4 . A partire dal 50° giorno dallo start up, per l'alimentazione del reattore di selezione è stato invece utilizzato il fermentato proveniente da FORSU tritata (giorni 50-69) e poi dal 69° giorno, il fermentato proveniente dallo spremuto di FORSU pressata, in accordo con l'evoluzione temporale della sperimentazione di cui all'Obiettivo 1. Le caratteristiche chimiche della soluzione sintetica a base di acetato e del fermentato da FORSU (incluso sia FORSU tritata che pressata) sono riportati in Tabella 17. Considerato l'intervallo di variabilità piuttosto ampio dei parametri caratterizzanti il fermentato, si è preferito fare riferimento all'intervallo di variazione piuttosto che al valor medio di ogni parametro.

Tabella 17 - Caratteristiche chimiche della soluzione sintetica a base di acetato e del fermentato da FORSU utilizzate per l'alimentazione del reattore SBR di selezione

Parametro	Valore	
	Acido Acetico (gg 0 - 49)	FORSU fermentata (gg 50 - 130)
COD solubile (sCOD; g/L)	24.0	11.2 - 31.1
VFA (gCOD/L)	21.0	9.9 - 27.3
VFA/COD (%)	87.5	67.2 - 94.4
N-NH ₄ ⁺ (g/L)	0.95	0.32 - 0.91
P-PO ₄ ³⁻ (g/L)	0.25	0.08 - 0.22
PH	6.0	4.2 - 5.0
COD : N : P	100 : 4.0 : 1.0	100 : 3.0 : 0.7

Per inoculare il reattore di selezione, sono stati utilizzati circa 20 L di fango aerobico ispessito, proveniente dall'impianto di trattamento acque di scarico di Treviso (ATS). Il reattore SBR è stato alimentato in regime ADF, utilizzando un ciclo operativo della durata di 6 h con una fase di alimentazione che avveniva in corrispondenza dell'inizio di ogni ciclo, per un periodo relativamente breve pari a 3 min. L'eccesso di biomassa veniva spurgata per 1min, immediatamente prima della fine di ciascun ciclo. Non essendo prevista nessuna fase di sedimentazione, il tempo di residenza idraulico (HRT) era pari all'età del fango (SRT), ovvero 1.0 d. Il carico organico applicato (OLR) era compreso tra 2.5 - 4.0 gCOD/L d, sulla base della variabilità del tenore di COD del substrato utilizzato. La Tabella 18 riassume i principali parametri operativi del reattore SBR di selezione.

Il reattore SBR non era dotato di un controllo del pH né di un controllo di temperatura; era continuamente areato per mezzo di apposite soffianti, la cui portata assicurava concentrazioni di O₂ disciolto mai limitanti e comprese tra 2.0 - 8.5 mg/L.

Tabella 18 - Parametri operativi del reattore SBR di selezione

Parametro	Valore
Volume di lavoro (L)	140
Portata in ingresso* (L/d)	35
Carico organico applicato (OLR; gCOD/L d)	2.5 - 4.0
Tempo di residenza idraulico (HRT; d)	1.0
Età del fango (SRT; d)	1.0
Ciclo operativo (h)	6
Cicli giornalieri (n)	4
pH	7.5 - 8.0
Temperatura (T; °C)	19 - 29

* portata in ingresso equivalente a quella in uscita

Le potenzialità di stoccaggio della biomassa selezionata sono state poi testate nel corso di prove batch di accumulo, effettuate saltuariamente con substrato sintetico (acetato) e reale (fermentato da FORSU spremuta). Per quanto riguarda la fase finale di estrazione del PHA dalla biomassa, è stato utilizzato come agente estraente una soluzione di NaClO al 7% Cl₂, dosato a fine accumulo in un rapporto volumetrico pari a 0.2 NaClO/biomassa. Le condizioni operative dei due reattori aerobici e della fase estrattiva sono state stabilite in base a precedenti evidenze sperimentali in scala di laboratorio [Valentino et al., 2014; Villano et al., 2014].

Le analisi dei solidi sospesi (totali e volatili, TSS e VSS), azoto ammoniacale e PHA sono state effettuate secondo le metodiche analitiche descritte in Valentino et al. [Valentino et al, 2014]; COD, VFA ed ortofosfati sono stati analizzati con i metodi illustrati in Micolucci et al. [Micolucci et al., 2014].

Preparazione dei campioni di PHA-biomassa per attività 4.1

(Sviluppo processo innovativo di estrazione/purificazione del biopolimero)

La sperimentazione su scala pilota a supporto dell'attività 4.1, prevedeva la conduzione di test batch di accumulo effettuati con substrato sintetico (acetato) o con FORSU fermentata, mirati alla produzione di biomassa ad alto contenuto di PHA intracellulare da sottoporre ad estrazione mediante i metodi illustrati nel paragrafo dedicato all'attività 4.1. I campioni di biomassa utilizzati nella sperimentazione relativa all'attività 4.1 sono stati ottenuti da quattro test di accumulo, condotti nei giorni di funzionamento 29 (su acetato), 99, 113 e 120 (su fermentato) del processo. In tutti i quattro test effettuati, la biomassa veniva fatta sedimentare per gravità per circa 30min al termine della prova; la frazione ispessita era poi sottoposta a centrifugazione e essiccazione in forno a 60°C. Parte della biomassa proveniente dal test effettuato su acetato (giorno 29) e su fermentato (giorno 120) è stata sottoposta ad un test di estrazione con una soluzione di NaClO (7% Cl₂).

Calcolo di velocità e rese in SBR e nelle prove batch

Per esprimere rendimento ($Y_{P/S}^{feast}$) e velocità di produzione di PHA (qP^{feast}), parametri caratterizzanti l'efficienza di selezione di una coltura mista MMC PHA-produttrice, si è preferito convertire i dati sperimentali in termini di COD, unificando tutte le concentrazioni in un'unica unità di misura. Per la velocità, si fa riferimento all'unità di tempo "t" definito come fase "feast", ovvero l'effettiva durata del substrato nel mezzo di coltura. Le grandezze specifiche sono riferite per grammo "g" di biomassa attiva (X_A), ovvero senza considerare il peso del PHA stoccato all'interno della cellula:

$$X_A = (VSS-PHA) \cdot 1.42.$$

Questo valore era convertito in COD, secondo il fattore di conversione 1.42 gCOD/gX_A [Gujer and Henze, 1991]. Pertanto:

$$b) qP^{feast} = \Delta PHA / (t \cdot X_A), \text{ dove } \Delta PHA = \text{PHA prodotto nella fase } feast,$$

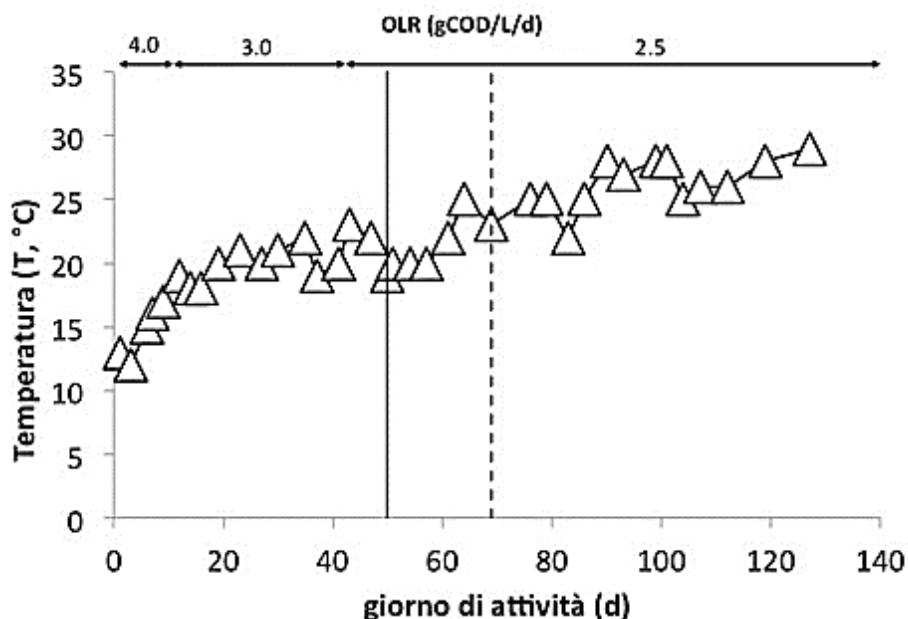
$$c) Y_{P/S}^{feast} = \Delta PHA / \Delta S, \text{ dove } \Delta S = \text{sCOD rimosso}$$

3.1.3. Risultati

Reattore SBR di selezione/arricchimento della biomassa (Stadio II)

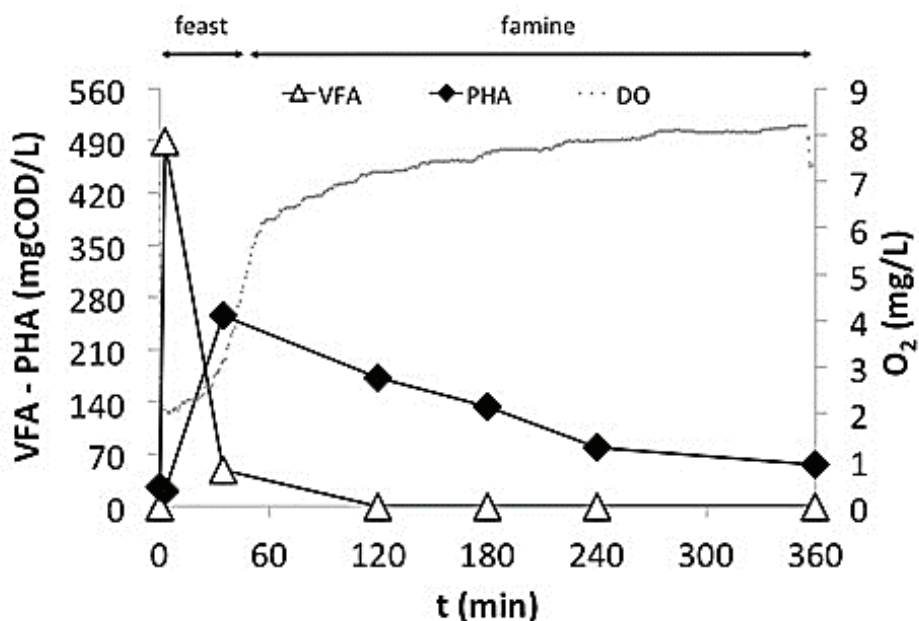
Come già menzionato nel paragrafo relativo ai metodi sperimentali, gli impianti installati non erano provvisti di controllo temperatura; pertanto tale parametro, misurato all'interno del volume areato del reattore, variava considerevolmente a seconda del giorno e della stagione. In Figura 21 è riportato l'andamento della temperatura rilevata nel mezzo di coltura: al momento dell'avvio del reattore, la T misurata era poco superiore a 10°C per poi raggiungere valori prossimi ai 30°C nell'ultima fase sperimentale (Luglio 2016). Di conseguenza, principalmente nel periodo iniziale di funzionamento, l'OLR applicato è stato ridotto rispetto al valore prestabilito (4.0 gCOD/L d) al fine di mantenere comunque fasi "feast" sufficientemente brevi per consentire la selezione del consorzio PHA-accumulante.

Figura 21 - Andamento della temperatura (°C) nel reattore SBR di selezione (giorno 0= start up con acetato)



In Figura 22 è possibile visualizzare gli andamenti di PHA, VFA e O₂ disciolto in seguito ad analisi di dettaglio fatta su un tipico ciclo operativo in condizioni di funzionamento ottimali del processo. Nel caso specifico illustrato, la fase *feast* aveva una durata di 35min, pari al 9.7% della lunghezza del ciclo. Pertanto, tale breve durata assicurava una pressione selettiva adeguata alla selezione di uno specifico consorzio microbico PHA-produttore. Il caso illustrato in Figura 22 è relativo al giorno 89, periodo in cui il reattore SBR era alimentato con fermentato da FORSU spremuta.

Figura 22 - Andamento di PHA, VFA ed O₂ disciolto (con rispettive fasi *feast-famine*) in un tipico ciclo operativo (giorno 89, substrato: fermentato da FORSU spremuta)

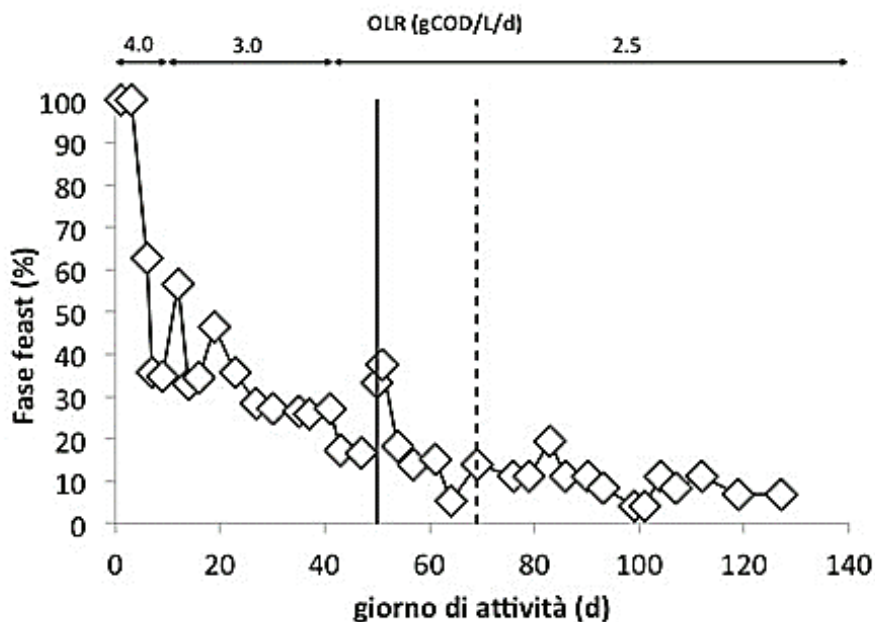


L'utilizzo poi del fermentato ottenuto da FORSU tritata (tramite utilizzo di pompa trituratrice) a partire dal giorno 50, e da FORSU pressata a partire dal giorno 69, ha comportato inevitabili fluttuazioni

dell'OLR applicato, in funzione delle variabili prestazioni del fermentatore. Tali periodi corrispondenti ai diversi OLR applicati e al cambiamento del substrato sono stati pertanto indicati anche nella successiva Figura 23, che riporta l'andamento della fase di "feast" (%), calcolata rispetto alla lunghezza totale del ciclo operativo (6 h).

La durata della fase *feast* assumeva un andamento continuamente decrescente, a dimostrazione del fatto che le condizioni di funzionamento del processo erano idonee per la selezione ed arricchimento del consorzio misto desiderato. Una piccola fluttuazione è osservabile in corrispondenza del giorno 50; fatto non casuale perché dovuto al cambiamento di substrato e quindi ad un parziale riadattamento fisiologico della biomassa. Nel periodo in cui è stato utilizzato il fermentato, la durata della fase *feast* era mediamente pari al 13% rispetto alla durata del ciclo, valore perfettamente idoneo per permettere la selezione di microorganismi PHA-produttori [tipicamente $\leq 20\%$, Valentino et al., 2016]. Tale dato era indice del progressivo adattamento fisiologico al regime ADF imposto e di una selezione del consorzio MMC efficace verso popolazioni con spiccata capacità di stoccaggio del PHA.

Figura 23 - Andamento della fase *feast* nel corso della marcia del reattore SBR



Nel periodo di utilizzo dell'acetato come unica fonte di carbonio, il polimero prodotto era l'omopolimero P(3HB) (Poli-3-idrossibutirrato). A partire dal giorno 50, il cambiamento di substrato ha portato ad una variazione della composizione chimica del PHA, non più omo- ma co-polimero, costituito da due monomeri: il 3-idrossibutirrato (3HB) e il 3-idrossivalerianato (HV), quest'ultimo presente mediamente al 12% (gHV/gPHA).

In Tabella 19, vengono riportati i dati medi di alcuni dei parametri monitorati relativi allo studio della marcia del reattore SBR. I valori medi sono stati calcolati nei due periodi di funzionamento caratterizzati da differenti substrati, acetato (giorni 1-49) e fermentato (50-130).

Tabella 19 - Valori medi e deviazioni standard dei principali parametri monitorati nel corso della marcia SBR

Parametro	Acetato (gg 0-49)	FORSU fermentata (gg 50-130)
	valor medio	
Fase feast (%)	42 ± 6	13 ± 2
qP^{feast} (mg/g X_A h) _{COD}	46 ± 22	245 ± 33
$Y_{P/S}^{feast}$ (COD _{PHA} /S _{COD})	0.16 ± 0.08	0.40 ± 0.04
Frazione HV (%)	0	12 ± 1

Reattore di accumulo PHA (Stadio III) ed estrazione del prodotto

In termini di capacità di accumulo, la biomassa selezionata era in grado di stoccare polimero fino ad un contenuto pari circa al 40% (w/w) del peso secco cellulare. In particolare, ciò avveniva nei giorni 121 e 127, avendo nel reattore SBR fasi *feast* piuttosto brevi ($\leq 7\%$).

I test di estrazione, condotti sulla biomassa proveniente dalle prove d'accumulo, hanno permesso di ottenere contenuti percentuali di PHA intorno all'80% w/w in seguito a prove condotte utilizzando acetato, e non superiori al 60% w/w utilizzando fermentato. Ciò è da attribuirsi alla presenza di solidi sospesi inerti nel fermentato, non totalmente rimossi nonostante si sia anche introdotto un trattamento intermedio del fermentato acido per centrifugazione prima di avviarlo all'alimentazione dei reattori aerobici. In Tabella 20 sono riportati i risultati relativi ad alcune prove di accumulo (in termini di massimo contenuto di PHA intracellulare ottenuto) e dei rispettivi test di estrazione.

Tabella 20 - Prestazioni relative allo stadio di accumulo e di estrazione del PHA prodotto (tutti trattamenti estrattivi sono stati condotti utilizzando NaClO al 7% Cl₂)

Giorno di funzionamento dallo start-up	Substrato selezione (SBR)	Substrato accumulo	Pretrattamento substrato (filtrazione)	Fase <i>feast</i> (%) (ciclo SBR)	%PHA fine accumulo (w/w)	%PHA fine estrazione (w/w)
29	Acetato	Acetato	-	19.4	n.d	76
30	Acetato	Acetato	-	26.2	n.d	80
35	Acetato	FORSU fermentata	-	27.4	n.d	45
106	FORSU fermentata	FORSU fermentata	-	8.3	27	51
120	FORSU fermentata	FORSU fermentata	-	7.2	32	54
121	FORSU fermentata	FORSU fermentata	-	6.9	40	42
127	FORSU fermentata	FORSU fermentata	-	6.4	43	60

n.d.: dato non disponibile

Considerazioni conclusive

I risultati ottenuti in questa sperimentazione hanno mostrato l'effettiva realizzabilità del processo in scala pilota per la produzione di polimeri biodegradabili (PHA), evidenziando come da un'alimentazione reale fermentata sia possibile selezionare un consorzio misto con una buona risposta di stoccaggio. Infatti, considerando un periodo di funzionamento pressappoco stabile (non soggetto a continue variazioni di temperatura), nel tipico ciclo operativo del reattore SBR è stato ottenuto un valore medio di durata della fase *feast* compresa tra il 6.4 e 17%.

Sono presenti sicuramente margini di miglioramento sulle tecniche di pretrattamento dell'alimentazione delle prove d'accumulo, in quanto è risultato evidente l'incremento del contenuto di PHA nella biomassa al termine delle prove batch (40% w/w) ed in relazione alle performance estrattive (60% w/w), successivamente alla rimozione di solidi inerti.

Attività 3.2: Verifica della stabilità della biocenosi del bioprocesso a colture miste e verifica della potenziale selezione di agenti patogeni

A cura di Simona Rossetti

3.2.1 Introduzione

Ogni processo biotecnologico che si avvale di comunità microbiche selezionate per il trattamento o la trasformazione di materiali di scarto in prodotti ad alto valore aggiunto necessita di comunità microbiche stabili ed efficienti caratterizzate da un certo grado di biodiversità e da simile ripartizione delle varie componenti microbiche ("evenness") senza la predominanza di una o poche specie sulle altre componenti presenti. Sono a disposizione diversi strumenti per valutare la stabilità della biocenosi e la sua capacità di adattarsi in modo efficiente anche a transitorie variazioni delle condizioni operative. In questo studio, la stabilità temporale della biocenosi selezionata nell'impianto pilota finalizzato alla produzione di biopolimeri a partire da acetato e da fermentato di FORSU è stata valutata mediante specifiche analisi biomolecolari che hanno consentito di definire la struttura e la composizione della biomassa, di seguirne le dinamiche nel tempo e di verificare inoltre l'eventuale selezione di microrganismi patogeni o microrganismi con potenziale rischio sanitario.

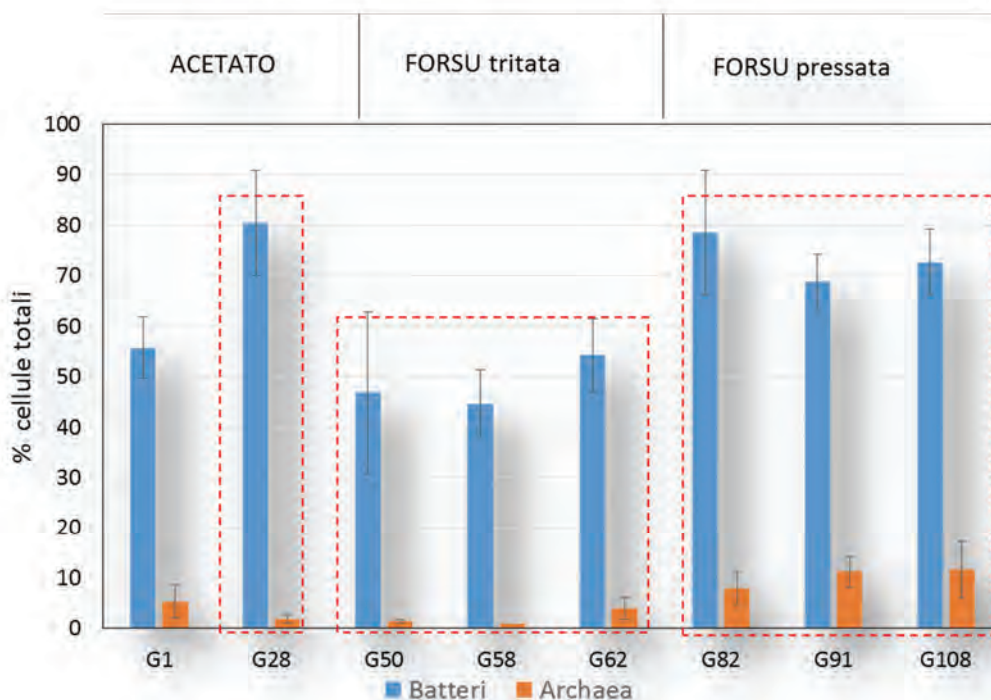
3.2.2 Risultati

L'analisi microbiologica è stata effettuata mediante applicazione di tecniche di sequenziamento di ultima generazione (NGS, *Next Generation Sequencing*) e di identificazione cellulare *in situ* (tecnica FISH, *Fluorescence In Situ Hybridization*). Quest'ultima metodologia è stata applicata in combinazione con un colorante, utilizzato in microbiologia per rilevare la presenza all'interno delle singole cellule di polimeri di PHA (colorazione Nilo Blue), per associare in modo univoco la capacità di stoccaggio di biopolimeri a specifici microrganismi.

Come descritto nei paragrafi precedenti, l'impianto sperimentale è stato avviato con biomassa (fango attivo) prelevata da un sistema di trattamento di reflui urbani e inizialmente alimentata con substrato prontamente biodegradabile (acetato) per ottenere un primo arricchimento di biomassa PHA-accumulante; successivamente si è passati ad alimentazione con fermentato da FORSU.

Le analisi microbiologiche effettuate su campioni prelevati nel corso della sperimentazione hanno rilevato livelli di attività della biomassa nel periodo di alimentazione con fermentato da FORSU pressata confrontabili con quelli riscontrati nel periodo di alimentazione con acetato (75-80% dei batteri attivi rispetto al totale). La popolazione di *Archaea* è risultata essere una componente marginale della biocenosi, con abbondanze $\leq 10\%$ della biomassa totale (Figura 24).

Figura 24 - Abbondanza relativa di batteri e *Archaea* stimati mediante FISH nei diversi campionamenti effettuati nel corso della sperimentazione. Sull'asse delle ascisse si riportano i campioni analizzati con riferimento al giorno di campionamento



La composizione microbica di ciascun campione di biomassa è stata definita mediante applicazione di sonde molecolari phylum- e classe-specifiche. L'analisi ha evidenziato la dominanza di specie affiliate ai beta-*Proteobacteria*, in particolar modo nei campioni prelevati al termine della fase di alimentazione con acetato, con abbondanze piuttosto elevate che variano dal 70 al 75% dei batteri totali. Una più ampia varietà di microrganismi è stata osservata nella biocenosi selezionata nella marcia con fermentato da FORSU. In questo caso sono stati infatti riscontrati non solo *Proteobacteria* (alfa-, beta-, gamma- e delta-*Proteobacteria*) ma anche specie appartenenti a *Cytophaga*, *Flexibacter* e *Bacteroidetes*.

E' stato inoltre effettuato un monitoraggio mediante FISH finalizzato alla specifica identificazione dei batteri in grado di stoccare PHA. In particolare, l'analisi è stata effettuata con sonde biomolecolari genere-specifiche per i taxa appartenenti ai beta-*Proteobacteria* comunemente riportati nella letteratura scientifica come PHA-accumulanti. Nella fase di alimentazione con acetato la biomassa PHA-accumulante è risultata prevalentemente composta da specie appartenenti ai generi *Thauera* e *Azoarcus*, che rappresentano la totalità dei beta-*Proteobacteria*.

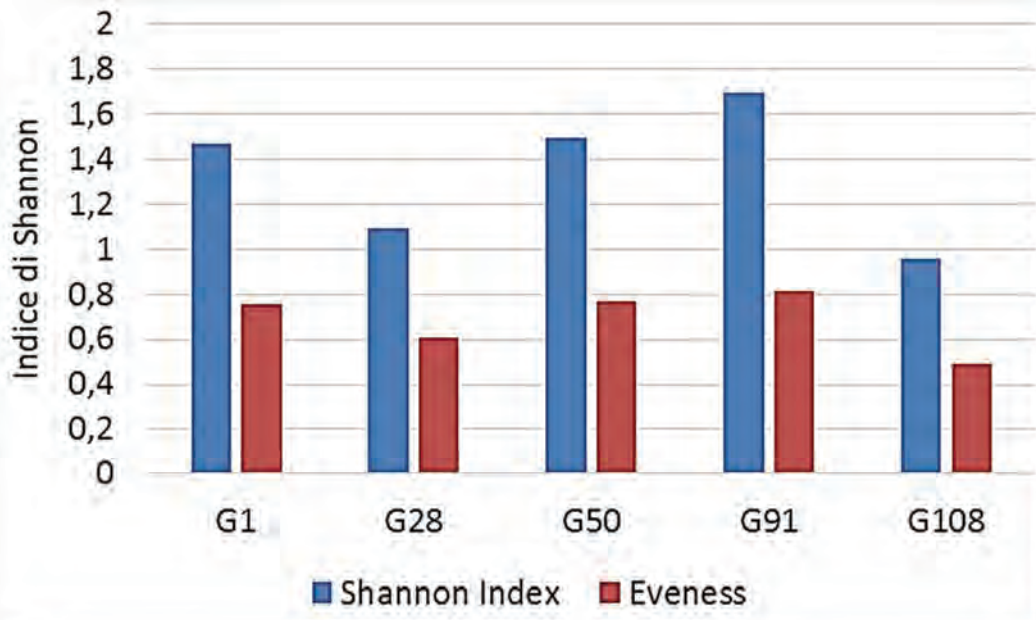
I microrganismi appartenenti ai generi *Thauera* e *Azoarcus* tendono poi a diminuire nel tempo e rappresentano una componente marginale nella fase di alimentazione con fermentato da FORSU (~ 7-12% dei batteri totali). La colorazione Nilo Blue ha evidenziato la presenza di granuli di PHA nelle cellule identificate come *Thauera/Azoarcus* in tutti i campioni prelevati nel corso della sperimentazione.

Sulla base dei dati quantitativi ottenuti mediante analisi FISH sono stati calcolati gli indici di biodiversità (indice "Shannon") e di uniformità di specie (indice "Eveness") (Figura 25).

Entrambi gli indici mostrano valori più elevati nella fase di alimentazione con fermentato da FORSU (G91) rispetto alla fase di alimentazione con acetato (G28 e G50). Tuttavia, sia la biodiversità che l'uniformità di specie tendono a diminuire drasticamente nel giorno 108 probabilmente a causa delle elevate temperature di esercizio che sono incrementate notevolmente nel corso della

sperimentazione (Figura 21). L'impianto pilota ha infatti operato senza controllo della temperatura e ciò ha probabilmente influito notevolmente sulla composizione della biomassa PHA-accumulante.

Figura 25 - Andamento degli indici Shannon e Eveness stimati dai dati FISH nelle due fasi sperimentali di alimentazione con acetato (G1, G28 e G50) e fermentato da FORSU pressata (G91 e G108)

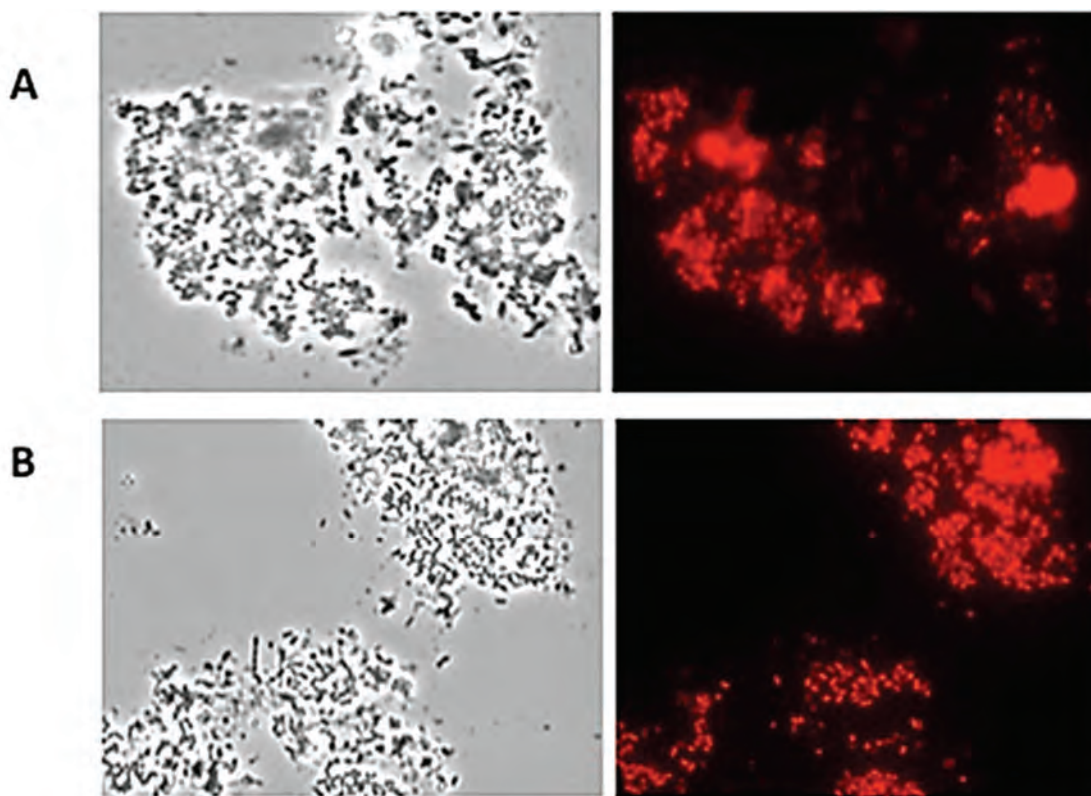


I dati di pirosequenziamento relativi ai campioni prelevati a fine fase di alimentazione con acetato (G50) e durante il funzionamento in stato stazionario del sistema alimentato con fermentato da FORSU pressata (G91, G108 e G119) confermano i risultati ottenuti con la tecnica FISH ed indicano i *Proteobacteria* come componente principale (80-90% delle OTUs, *Operational Taxonomic Units*). La composizione della biocenosi si modifica nel tempo con una prevalenza di specie appartenenti ai *beta-Proteobacteria* (quali *Thauera*, *Acidovorax*, *Comamonas*, *Hydrogenophaga*, *Parapusillimonas*) e *alpha-Proteobacteria* (*Amaricoccus*, *Brevundimonas* e *Meganema*). Molte delle specie riscontrate sono state in precedenza descritte come microrganismi in grado di accumulare PHA in sistemi sequenziali quali quello adottato nell'ambito della sperimentazione o in sistemi in piena scala per il trattamento di acque di rifiuto.

L'alimentazione con fermentato da FORSU pressata infatti influenza notevolmente la composizione microbica della biomassa che risulta essere costituita da una grande varietà di specie PHA accumulanti note e, diversamente dalla fase di alimentazione con acetato, anche da specie solo parzialmente descritte in letteratura in quanto prodotte da precedenti analisi clonali o di pirosequenziamento e senza alcun rappresentante isolato in coltura pura. I risultati sono pertanto di interesse in quanto tutta la biomassa è risultata in grado di accumulare PHA, come rilevato con la colorazione Nilo Blue (Figura 26), e ciò indica la presenza di nuovi ceppi PHA accumulanti che meritano un approfondimento ulteriore.

Come aspetto rilevante, l'analisi dei dati di pirosequenziamento non ha evidenziato la presenza nel fango biologico di specie patogene note o indicatori di contaminazione fecale.

Figura 26 - Sinistra: agenti microbici (immagine in contrasto di fase); Destra: stesso campo in microscopia ad epifluorescenza (filtro CY3). I granuli intracellulari di PHA sono di colore rosso fluorescente ed occupano tutto il volume cellulare. A) Acetato; B) Fermentato da FORSU



Attività 3.3: Studio di un bioprocesso a coltura pura con microrganismo geneticamente modificato (MOGM)

A cura di Lorenzo Bertin, Giulio Zanaroli e Fabio Fava

3.3.1 Introduzione

Come già riportato, la produzione di PHA per mezzo di colture microbiche pure rimane ad oggi l'unico processo a maturità tecnologica adeguata per la scala industriale, ancorché di applicazione limitata per l'elevato costo di produzione e per le limitate applicazioni dell'omopolimero poliidrossibutirrato (PHB), che rappresenta il tipo di PHA più facilmente prodotto con tali processi. Tuttavia, l'impiego di microrganismi differenti potrebbe portare alla produzione di copolimeri aventi specifiche caratteristiche, le cui particolari applicazioni potrebbero ampliare l'interesse del mercato. Ad esempio, i poliidrossiesanoati (PHH) sono un tipo di PHA avente una maggior lunghezza dell'alchile laterale della catena polimerica, risultante in una minor rigidità e fragilità del polimero. Inoltre, anche le colture pure possono essere alimentate con scarti organici invece che con zuccheri puri, da cui in parte deriva l'elevato costo industriale dei PHA accumulati nelle medesime colture microbiche pure. Infine, le colture pure possono consentire di ottimizzare i processi di recupero del prodotto intracellulare, dal momento che il processo di estrazione dei PHA è applicato su cellule del medesimo ceppo aventi stesse caratteristiche fisiologiche e che quindi sono ugualmente sensibili al metodo utilizzato.

3.3.2 Strategia per la produzione di PHA mediante coltura pura di MOGM

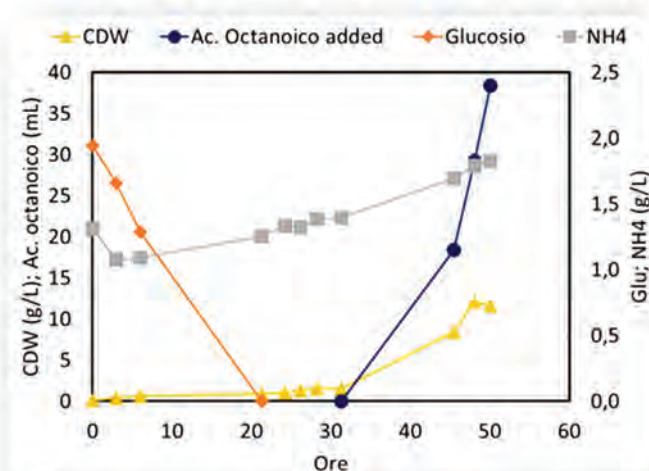
Al fine di ottimizzarne le produttività, molti processi biotecnologici industriali utilizzano ceppi geneticamente modificati (MOGM). Nel presente studio, è stata valutata la possibilità di produrre PHA da un ceppo MOGM denominato *Pseudomonas putida* KTOY06, fornito dal Prof. Guo-Qiang Chen (Tsinghua University, Beijing) ed ottenuto dal ceppo naturale *P. putida* KT2440. Questo microrganismo è noto per la sua capacità di utilizzare come fonte di carbonio VFA a catena media, ad esempio, acido caproico, convertendoli in PHA a catena media.

Una sperimentazione preliminare su scala di laboratorio, alla temperatura di 30°C, ha consentito di definire quale fosse il terreno colturale più adatto alla crescita del MOGM, e di valutare la sua capacità di produrre PHA utilizzando come precursori VFA a catena media. Una volta estratto, il polimero accumulato nelle cellule al termine della crescita microbica è stato determinato mediante analisi di termogravimetria (TGA) [Talon and Berezina, 2011] ed è stato osservato che la percentuale di PHA era pari al 29% del peso secco cellulare.

Definiti i principali parametri di processo, il MOGM è stato coltivato in bioreattore (volume utile pari a 1 L) e successivo *scale-up* al fine di studiare lo sviluppo del processo biotecnologico. In dette condizioni è infatti possibile monitorare e controllare in tempo reale parametri quali la pO₂, la temperatura e il pH. La crescita è stata effettuata in 1L di terreno minerale con la seguente composizione: (NH₄)₂SO₄ 4.7 g/L; MgSO₄*7H₂O 0.8 g/L; Na₂HPO₄ 4.77 g/L; KH₂PO₄ 2.03 g/L; soluzione di microelementi 10mL/L. Come fonte di carbonio sono stati utilizzati 2 diversi substrati: glucosio ad una concentrazione di 2g/L, per permettere la crescita iniziale delle cellule; ed acido ottanoico alimentato in modalità *fed-batch* per consentire l'accumulo di PHA (Figura 27). La fermentazione è stata condotta alla temperatura di 30°C e a pH 7.5. Per seguire il processo fermentativo, sono state monitorate nel tempo le concentrazioni di glucosio, peso secco cellulare (*cell dry weight*, CDW) e ioni ammonio.

La concentrazione di glucosio è stata determinata tramite HPLC-IR; l'azoto ammoniacale è stato valutato per mezzo di un elettrodo selettivo per lo ione ammonio NH₄⁺ (CRISON 9663 C). Il CDW è stato valutato dal materiale cellulare (*pellet*) ottenuto dalla centrifugazione di 2mL di brodo fermentativo, a 12000rpm, per 10min. Il *pellet* è stato prima lavato con H₂O distillata e successivamente con etanolo, lasciato quindi evaporare in stufa a 50 °C.

Figura 27 - Profili di concentrazione nel tempo (ore) di glucosio, CDW, ione ammonio (g/L) e acido ottanoico aggiunto (mL)



Al termine della fermentazione è stata valutata la quantità di PHA accumulata. La misura è stata fatta tramite GC-FID (Agilent Technologies, Milano, Italia). Il *pellet* ottenuto è stato trattato con una reazione di metanolisi per la determinazione di PHA. La percentuale di PHA rilevata (% w/w) è stata del 30% rispetto al CDW, coerente con quanto osservato mediante la prova preliminare condotta in beuta.

Attività 3.4: Verifica sperimentale del MOGM e del possibile rilascio ambientale di materiale genetico

A cura di Giulio Zanaroli, Lorenzo Bertin, Gonzalo Martinez, Andrea Nuzzo, Salvatore Puccio e Fabio Fava

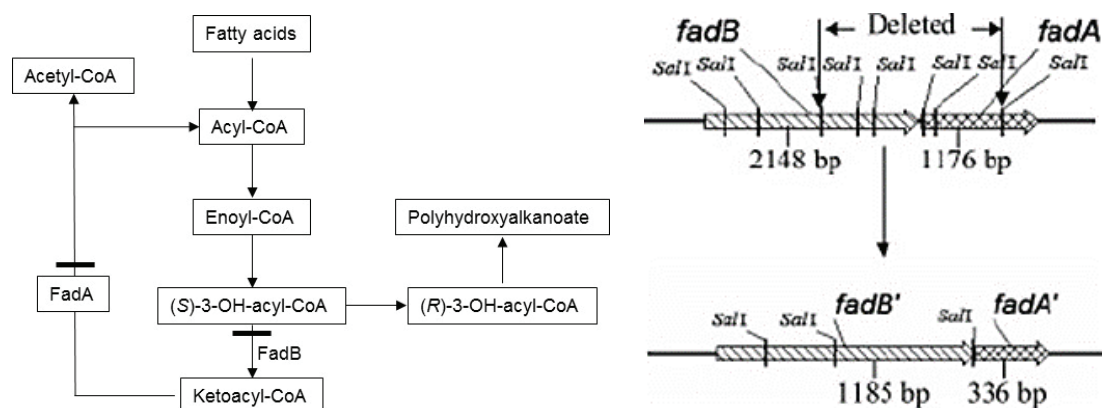
3.4.1. Introduzione

Molti processi biotecnologici condotti su scala industriale utilizzano MOGM secondo norme che ne regolano l'impiego in sistemi chiusi ed isolati rispetto all'ambiente. Tuttavia, in caso di incidente, le fasi liquide contenute in fermentatori industriali potrebbero essere veicolate verso sistemi convenzionali per il trattamento biologico di acque reflue. In tali ambienti, la purificazione delle acque è mediata da colture microbiche miste, le cui dinamiche interne sono difficilmente prevedibili. Risulta quindi di notevole interesse indagare quale possa essere il destino di MOGM e del loro materiale genetico in impianti di depurazione biologica. In particolare, il monitoraggio di questo materiale genetico risulta strategico, in quanto la sua persistenza potrebbe portare altre specie microbiche ad acquisire il pattern genico modificato. L'attività di ricerca descritta nel presente capitolo ha quindi avuto come obiettivo la valutazione della persistenza della sequenza genomica caratterizzante il MOGM impiegato per produrre PHA all'interno di un processo convenzionale per il trattamento biologico di acque reflue.

3.4.2 Sviluppo del protocollo di monitoraggio del MOGM in impianti di depurazione a fanghi attivi

Il MOGM selezionato per lo studio, *Pseudomonas putida* KTOY06 fornito dal Prof. Guo-Qiang Chen (Tsinghua University, Beijing), è stato ottenuto dal ceppo "wild type" *P. putida* KT2440 in seguito a delezione parziale dei geni che codificano per gli enzimi 3-chetoacil-CoA tiolasi (FadA) e 3-idrossiacil-CoA deidrogenasi (FadB) che catalizzano gli ultimi step della β -ossidazione (Δ *fadB* Δ *fadA*) [Liu and Chen, 2007; Ouyang et al., 2007] (Figura 28). Tali geni nel ceppo *wild type* sono adiacenti e spaziati da una breve sequenza nucleotidica; il MOGM contiene invece una sequenza genica costituita dalla porzione 3' del gene *fadB* fusa con la porzione 5' del gene *fadA*.

Figura 28 - Sinistra: "Pathway" della β -ossidazione con evidenziate le reazioni biochimiche catalizzate dagli enzimi FadB e FadA; Destra: delezione dei geni *fadB* e *fadA* nel ceppo di *P. putida* KTOY06 [da Ouyang et al., 2007]



Il MOGM (KTOY06) è noto per crescere più lentamente del ceppo "wild type" (KT2440), ma è in grado di accumulare maggiori quantità di omopolimeri di PHA a catena media.

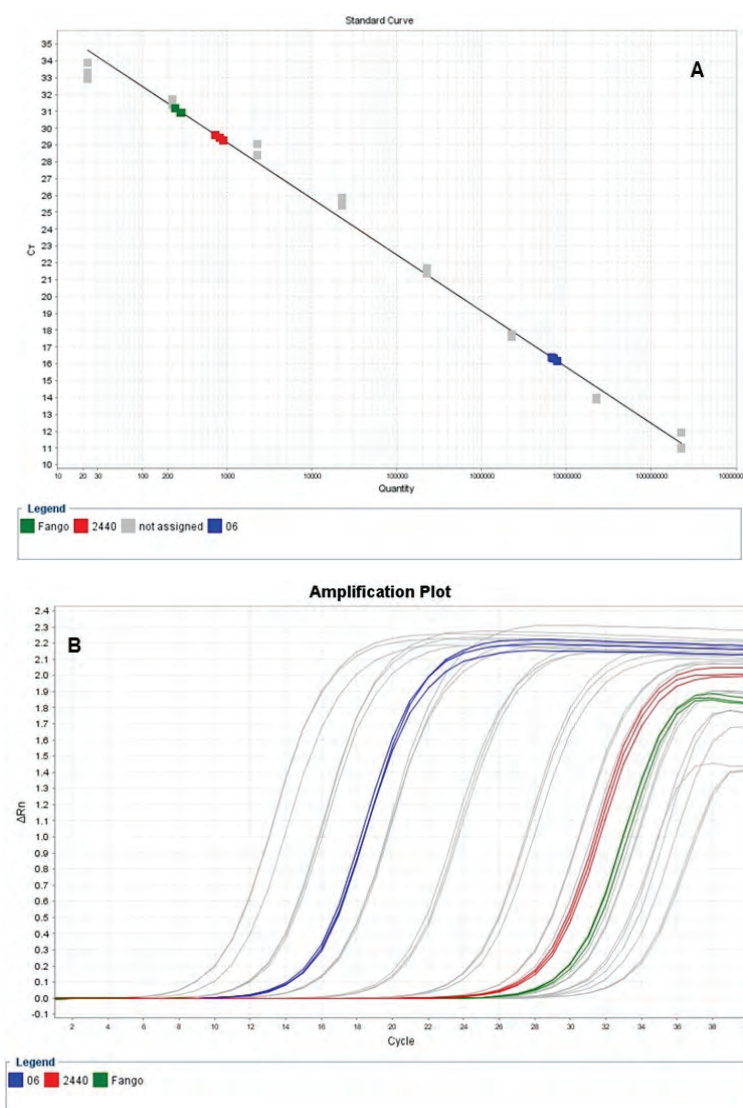
Per il monitoraggio del MOGM nell'impianto a fanghi attivi si è scelto di rilevare e quantificare il suo tratto genico modificato ($\Delta fadB \Delta fadA$). Pur non consentendo di ottenere informazioni sulla sua vitalità, tale approccio consente di quantificare e valutare il possibile destino del suo materiale genetico nell'impianto. Poiché il tratto genico modificato ($\Delta fadB \Delta fadA$) è posseduto unicamente dal MOGM, tale approccio consente in teoria di ridurre al minimo possibili interferenze da parte di altri microrganismi presenti nel campione, che potrebbero causare sovrastime del MOGM. L'approccio di monitoraggio selezionato è basato sull'amplificazione selettiva del tratto genico target mediante PCR quantitativa (qPCR) con chimica SYBR green. Tale tecnica si basa sull'utilizzo di sonde molecolari (*primers*) che riconoscono specificamente il tratto genico target. Si è quindi proceduto inizialmente con l'identificazione dell'intera sequenza genica modificata presente nel MOGM, sia mediante analisi e digestione *in silico* della sequenza nucleotidica del ceppo *wild type* da cui è stato derivato, sia tramite amplificazione del tratto genico modificato, suo clonaggio e sequenziamento utilizzando i *primers* FadBA_F (5'-GAGCAGATGATGGCCTTC-3') e FadBA_R (5'-CTTTGTAATGCCGGTATAC-3') riportati in letteratura [Ouyang et al., 2007]. All'interno di essa è stata quindi individuata la posizione e la sequenza di "giunzione" dei geni *fadB* e *fadA* deleti nel mutante, selezionata come target per il posizionamento di uno dei due *primers*, in quanto presente unicamente nel MOGM. Il disegno dei *primers*, eseguito con il software Primer3 v 4.0 (<http://primer3.ut.ee>), ha portato all'identificazione di una coppia di *primers* caratterizzata da elevata specificità, ovvero capacità di riconoscere esclusivamente il MOGM di interesse, sia in base a verifiche *in silico* (eseguite con l'applicativo NCBI/Primer BLAST) che *in vitro* (eseguite mediante reazione di PCR sul DNA genomico estratto dal ceppo KTOY06 e dal ceppo wild type KT2440). In particolare, il *primer forward* (KTOY06-484F, 5'-GATTTCCGCAATGTGACCC-3') si posiziona in corrispondenza della "giunzione" di *fadB* e *fadA* deleti, comprendendo una porzione complementare alla sequenza di *fadB* all'estremità 5' e una porzione complementare alla sequenza di *fadA* all'estremità 3'. Il *primer reverse* (KTOY06-681R) cade invece in *fadA*, portando all'amplificazione di un frammento di 158 bp.

È quindi stato messo a punto un saggio qPCR in cui il gene target del MOGM presente in un campione viene rilevato e quantificato per interpolazione su una curva di calibrazione ottenuta da diluizioni seriali di un plasmide contenente la sequenza target (Tabella 21). Tale protocollo consente di rilevare fino a 22.5 copie del gene target, con efficienze del 99-107% e correlazioni superiori al 97% (Figura 29).

Tabella 21 - Protocollo finale ottimizzato per la rilevazione specifica del gene deleto $\Delta\text{fadB}\Delta\text{fadA}$ di KTOY06

Coppia di <i>primers</i> usata	484f – 681r	Denaturazione Iniziale	95 °C x 15 min
Concentrazione <i>primers</i>	150 nM	Denaturazione (ciclo)	95 °C x 30 sec
Lunghezza amplicone	158 bp	Annealing/extension (ciclo)	62 °C x 20 sec
Tm amplicone	89.5 °C	Numero di cicli	40
Q.tà template	10 ng	Melt curve	60-95 °C (step 0,3 °C)

Figura 29 - A: Calibrazione (linee e simboli grigi) e B: curve di amplificazione qPCR del gene target (ΔfadB ΔfadA) di *P. putida* KTOY06 da campioni di DNA del MOGM (*P. putida* KTOY06, linee e simboli blu), del microrganismo *wild type* (*P. putida* KY2440, linee e simboli rossi) e estratti dal fango di un impianto di depurazione acque municipali (linee e simboli verdi).



Il protocollo produce tuttavia un segnale di amplificazione aspecifico in presenza di DNA del microrganismo *wild type* (*P. putida* KT2440) o estratto dal fango di un impianto di depurazione acque municipali, seppure di quattro ordini di grandezza inferiore rispetto al segnale prodotto dal DNA del MOGM. Tale segnale riduce la quantità rilevabile del gene target nel fango a circa $3E+04$ copie, corrispondenti ad un rapporto di circa 1g di MOGM: $1E+08$ g di fango.

3.4.3. Allestimento e verifica delle performances di un impianto di trattamento acque reflue su scala laboratorio

Al fine di valutare la persistenza del MOGM a valle di un processo di trattamento acque, è stato allestito un impianto su scala da laboratorio mediante “scale-down” dell’impianto per il trattamento di acque reflue in funzione a Trebbo di Reno (BO), dal quale provenivano i fanghi biologici attivi utilizzati per simulare la funzionalità dell’impianto. Il processo ha una configurazione convenzionale ed è suddivisibile in 3 fasi per garantire anche la rimozione dell’azoto: un primo trattamento in reattore anossico, un secondo stadio in vasca aerobica ed un’ultima fase di sedimentazione (*settler*) che consente la separazione fra il fango e l’acqua trattata, che viene recuperata come effluente. Il sistema operava in continuo, con un ricircolo del fango fra il sedimentatore ed il reattore anossico ed un ricircolo interno fra il reattore aerobico e quello anossico, in modo da permettere la denitrificazione dei nitrati generati dalla reazione di nitrificazione in vasca aerobica (Figura 30).

L’impianto è stato alimentato con un acqua sintetica che simulasse le caratteristiche tipiche delle acque reflue che vengono trattate negli impianti municipali, che aveva la composizione riportata nella seguente Tabella 22:

Tabella 22 - Composizione dell'acqua sintetica utilizzata per alimentare l'impianto a fanghi attivi

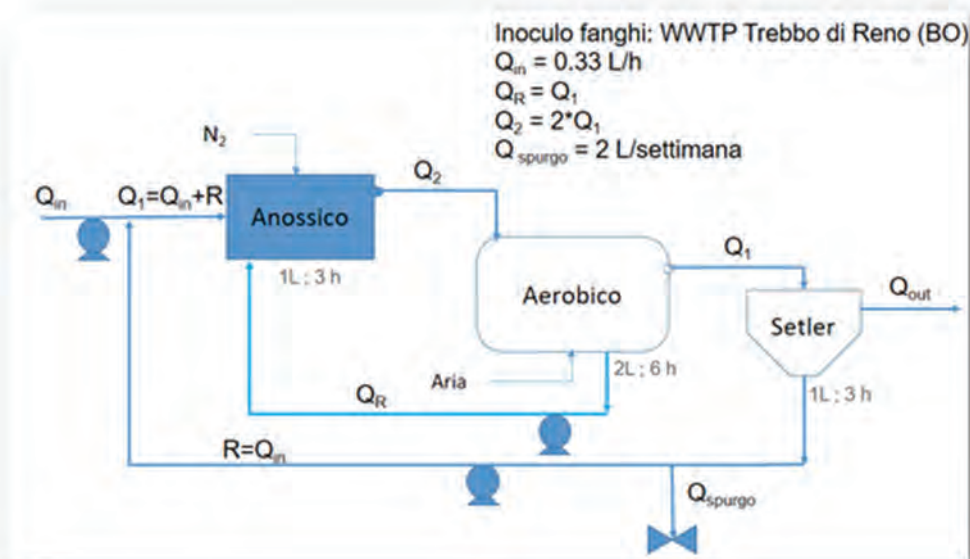
Composto	g/L
CH ₃ COONa	0,210
Estratto di lievito	0,237
Glucosio	0,217
NH ₄ Cl	0,278
Na ₂ CO ₃	0,100
MgSO ₄ * 7H ₂ O	0,060
CaCl ₂ * 2H ₂ O	0,009
K ₂ HPO ₄	0,004
Micro-nutrienti	0,400 (mL)

Il processo è stato monitorato mediante analisi dei seguenti parametri chimici: i) COD (*Chemical Oxygen Demand*), determinato utilizzando un Kit commerciale colorimetrico (AQUALYTIC Vario MR), calibrato con glucosio; ii) Azoto e Fosforo totali, determinati mediante un metodo spettrofotometrico descritto in APHA [APHA, 1999]; iii) Azoto ammoniacale, valutato per mezzo di un elettrodo selettivo per lo ione ammonio NH₄⁺ (Crison 9663 C); iv) nitriti e nitrati, analizzati mediante cromatografia a scambio ionico (Dionex DX-120; colonna IonPac® AS14A).

Si è operato con un flusso in ingresso Q_{in} pari a 0.33L/h. Il ricircolo fanghi è stato ottenuto mediante una pompa che operava in continuo con portata pari a quella in ingresso (Q_{in}). Il flusso risultante Q₁ era quindi pari a 2*Q_{in}. Il ricircolo interno, Q_R, aveva una portata doppia rispetto al flusso in ingresso (Q_{in}). Le condizioni di anossia sono state mantenute insufflando azoto all’interno del reattore, mantenuto in costante agitazione per mezzo di un agitatore magnetico. Nel reattore aerobico veniva invece fornita aria per mezzo di uno *sparger* posto sul fondo in modo da avere una distribuzione omogenea al suo interno. Dal fondo del *settler*, la biomassa sedimentata era in parte ricircolata verso la vasca di denitrificazione e in parte estratta periodicamente come fango di spurgo, tramite una valvola nella tubazione per il ricircolo, per regolare l’età del fango e mantenere costante la quantità di biomassa. L’età del fango viene calcolata come il rapporto tra il volume del reattore aerobico e la

portata di fanghi spurgati. Il tempo di permanenza nelle fasi anossica ed aerobica era rispettivamente di 3 e 6 h, mentre l'età biologica del fango di circa 7 giorni.

Figura 30 - Schema del processo biologico a fanghi attivi per il trattamento di acque reflue allestito su scala di laboratorio



In condizioni stazionarie è stata ottenuta una riduzione di circa il 50% di azoto e del 60% di COD.

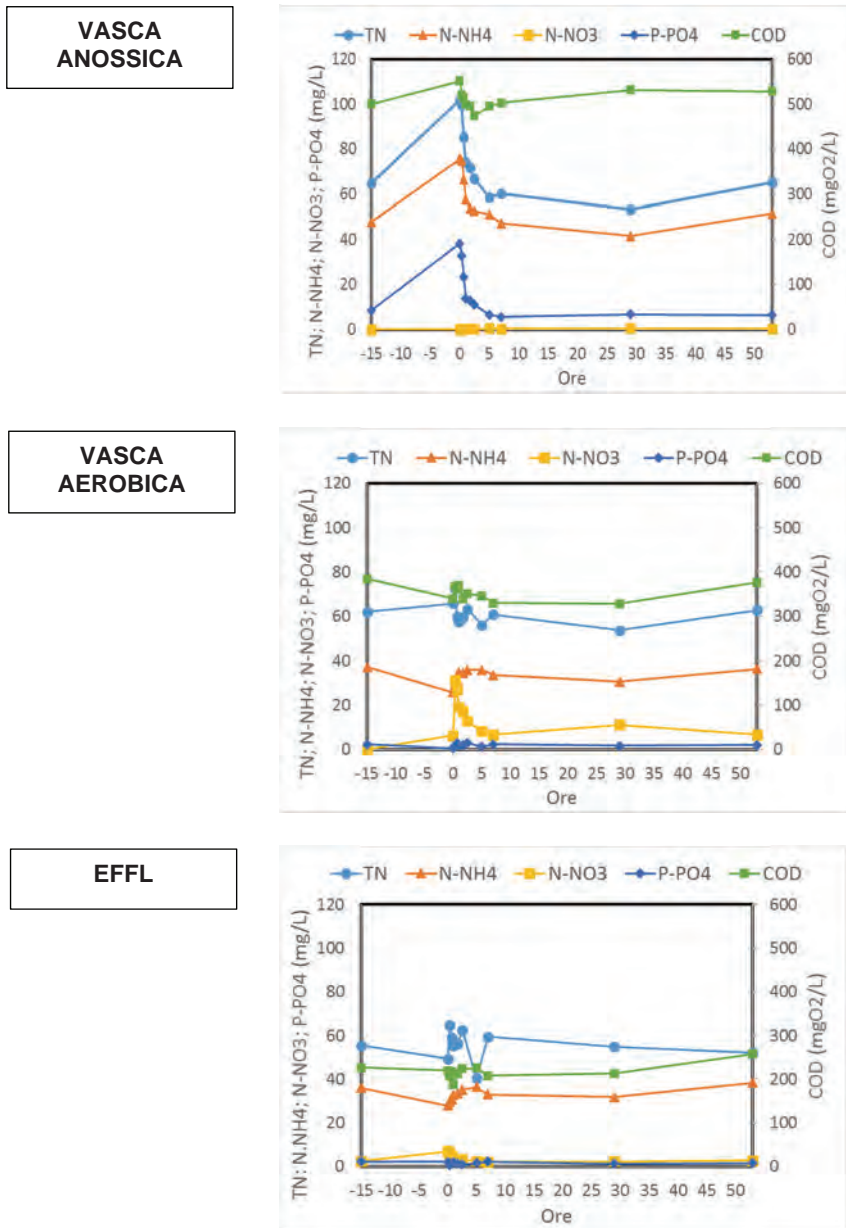
3.4.4 Destino del MOGM in un impianto di trattamento acque reflue su scala laboratorio

Per simulare il rilascio del MOGM in un impianto di trattamento acque reflue, sono stati presi in considerazione l'impianto di Trebbo di Reno (BO) ed un ipotetico impianto per la produzione industriale di PHA con una capacità di produzione di 3000 tonnellate all'anno. Un impianto di questo tipo potrebbe utilizzare dei bioreattori con un volume stimato di 222 m^3 . La concentrazione cellulare utilizzata per questi processi a livello industriale è dell'ordine di 100 g/L , quindi si avrebbe una massa cellulare di $2,22 \times 10^7 \text{ g}$. Tali impianti posseggono normalmente una vasca di raccolta che consente il recupero del brodo fermentativo in caso di sversamento o problemi nel corso della fermentazione. Nell'ipotesi di lavoro progettuale è stato simulato l'accidentale rilascio del brodo fermentativo in un impianto di trattamento acque reflue.

L'impianto modello considerato presenta una vasca aerobica con volume di 10.000 m^3 . La concentrazione cellulare rilevata risulta essere di 6 g/L , quindi la massa cellulare è di $6 \times 10^7 \text{ g}$. Per riprodurre tale situazione in scala da laboratorio, è stato preso come riferimento il rapporto tra le cellule di fanghi attivi presenti nell'impianto di trattamento acque e le cellule del MOGM, risultato pari a $2,5 \text{ g fango/g di } P. putida$.

L'impianto è quindi stato inoculato con il MOGM secondo questo rapporto; il MOGM è stato direttamente aggiunto alla vasca aerobica come segue: $2,4 \text{ g di pellet}$ di biomassa con PHA è stata risospesa in terreno minerale, in modo da ottenere una concentrazione di 100 g/L . La biomassa risospesa è stata inoculata nella camera anossica ad impianto fermo e vasca isolata dal resto dell'impianto. La vasca è stata miscelata per 10 min prima di far ripartire il processo, in modo da omogenizzare al meglio l'inoculo con i fanghi residenti. L'andamento nel tempo dei principali parametri chimici di processo nelle diverse sezioni d'impianto è mostrato in Figura 31.

Figura 31 - Profili di concentrazione nel tempo (ore) di TN; N-NH₄⁺; N-NO₃⁻; P-PO₄³⁻ (mg/L); COD (mgO₂/L) nelle diverse sezioni dell'impianto



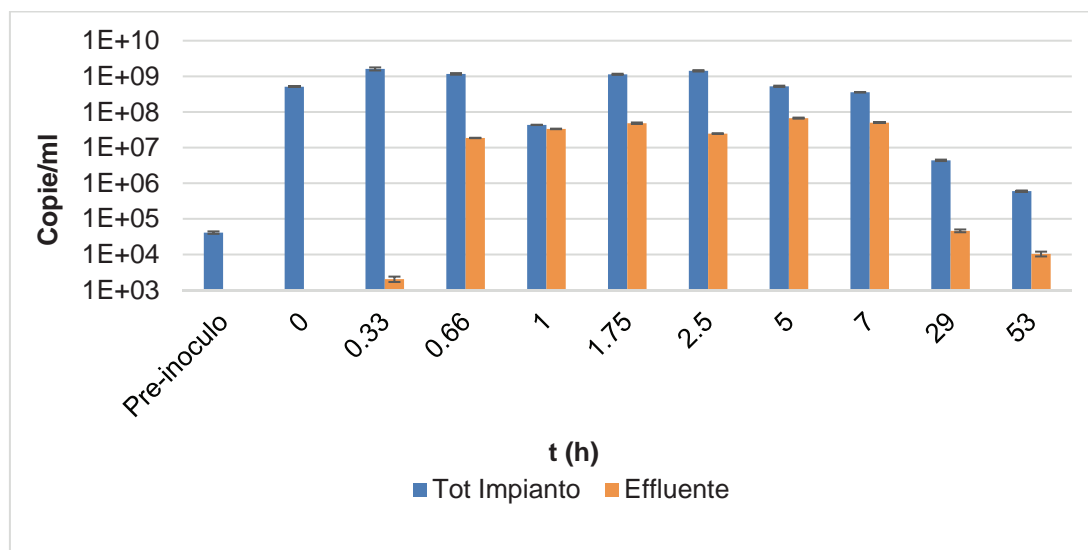
Al momento dell'inoculo, nel reattore anossico è stato osservato un incremento nella concentrazione dei fosfati e dell'azoto ammoniacale. Questo è dovuto alla presenza ad alte concentrazioni di ammonio e fosfati nel terreno utilizzato per la crescita del MOGM. Nel reattore aerobico, invece, è stato rilevato un netto incremento nella concentrazione dei nitrati e una diminuzione di azoto ammoniacale. Ciò è dovuto al fatto che, al momento dell'inoculo, l'impianto è stato fermato, e non arrivando nuova alimentazione si sono accumulati i nitrati generati dalla reazione di nitrificazione. Nell'outlet sono state riscontrate alterazioni meno significative.

In ogni caso, dopo 7h dal momento dell'inoculo, il sistema è tornato stabile.

Per quanto concerne il destino del materiale genetico del MGOM inoculato, le analisi qPCR mostrano che il numero di copie del gene deleto $\Delta fadB\Delta fadA$ nell'impianto rimane compreso nell'intervallo 10^7 - 10^9 copie/ml dal momento dell'inoculo alla settima ora di esercizio. Diversamente, il gene target diventa rilevabile nell'effluente acquoso dopo 20min di marcia. Dopo 40min di esercizio la sua concentrazione nell'effluente aumenta a circa 10^7 copie/ml e rimane successivamente

compresa nell'intervallo 10^7 - 10^8 copie/ml fino alla settima ora di marcia (Figura 32). Tuttavia, a partire dal giorno successivo di esercizio (29h), la concentrazione di gene target nell'impianto e nell'effluente si riduce drasticamente, raggiungendo nel primo concentrazioni di circa un ordine di grandezza maggiori del segnale di fondo misurato nell'impianto prima dell'inoculo, ma comunque di quattro ordini di grandezza minori di quella iniziale, e nel secondo concentrazioni di solo 10^4 copie/ml dopo 53h di marcia.

Figura 32 - Concentrazione (numero di copie/ml) di gene deleto $\Delta fadB\Delta fadA$ di KTOY06 nell'impianto e nel suo effluente durante la marcia.



Considerando la quantità di gene target cumulativamente uscita dall'impianto con l'effluente durante le prime 7h di esercizio ($3.35E+10$ copie totali), risulta che circa il 7% dell'inoculo viene rilasciato con l'effluente dall'impianto. Questo implica un limitato ma significativo *wash-out* della biomassa inoculata durante le prime ore di esercizio. Poiché la quantificazione del gene target con saggi di tipo molecolare non distingue fra materiale genetico proveniente da cellule morte e da cellule vive che possono proliferare nell'ambiente (queste ultime, eventualmente quantificabili con metodi microbiologici classici), detta frazione rilevata nell'effluente potrebbe comunque non essere vitale o essere completamente inattivata mediante un successivo stadio di disinfezione che tipicamente si trova a valle dell'impianto. Questi dati suggeriscono pertanto che l'eventualità che un MOGM possa essere rilasciato nell'ambiente in forma vitale da questi sistemi sia limitata.

BIBLIOGRAFIA

- Apha, Water Environment Federation, & American Water Works Association. 1999. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater Part 4000 INORGANIC NONMETALLIC CONSTITUENTS Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 733.
- Gholami A, Mohkam M, Rasoul-Amini S, Ghasemi Y. 2016. Industrial production of polyhydroxyalkanoates by bacteria: opportunities and challenges. *Minerva Biotecnologica*, 28: 59-74.
- Gujer W, Henze M. 1991. Activated sludge modeling and simulation. *Water Science Technology*, 23: 1011-1023.

- Koller M, Gasser I, Schmid F, Berg G. 2011. Linking ecology with economy: Insights into polyhydroxyalkanoate-producing microorganisms. *Engine Life Science*, 11: 222-237.
- Laycock B, Halley P, Pratt S, Werker A, Lant P. 2013. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. *Progress in Polymer Science*, 38: 536-583.
- Liu W, Chen GQ. 2007. Production and characterization of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate with high 3-hydroxytetradecanoate monomer content by *fadB* and *fadA* knockout mutant of *Pseudomonas putida* KT2442. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(5): 1153-1159.
- Majone M, Dircks K, Beun JJ. 1999. Aerobic storage under dynamic conditions in activated sludge processes. The state of the art. *Water Science Technology*, 39: 61-73.
- Micolucci F, Gottardo M, Bolzonella D, Pavan P. 2014. Automatic process control for stable biohythane production in two-phase thermophilic anaerobic digestion of food waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39: 17563-17572.
- Ouyang S-P, Luo RC, Chen S-S, Liu Q, Chung A, Wu Q, Chen G-Q. 2007. Production of Polyhydroxyalkanoates with High 3-Hydroxydodecanoate Monomer Content by *fadB* and *fadA* Knockout Mutant of *Pseudomonas putida* KT2442. *Biomacromolecules*, 8(8): 2504-2511.
- Talon O, Berezina N. 2011. Method for rapid control of bacterial PHA production through thermogravimetric analysis. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 86(9): 1195-1197.
- Valentino F, Beccari M, Fraraccio S, Zanaroli G, Majone M. 2014. Feed frequency in a Sequencing Batch Reactor strongly affects the production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from volatile fatty acids. *New Biotechnology*, 31: 264-275.
- Valentino F, Morgan-Sagastume M, Campanari S, Villano M, Werker A, Majone M. 2016. Carbon recovery from wastewater through bioconversion into biodegradable polymers. *New Biotechnology*, 37: 9-23.
- Villano M, Valentino F, Barbeta A, Martino L, Scandola M, Majone M. 2014. Polyhydroxyalkanoates production with mixed microbial cultures: from culture selection to polymer recovery in a high-rate continuous process. *New Biotechnology*, 31: 289-296.

CAPITOLO 4 - Downstream del bioprocesso a coltura mista per la produzione di polimeri biodegradabili

Roberto Andreozzi*, **Concetta Di Giovanni***, **Ilaria Di Somma***, **Raffaele Marotta***, **Laura Lorini***, **Emma Incocciati***** e **Francesco Valentino****

* Dipartimento di Ingegneria chimica, dei Materiali e della Produzione Industriale, Università di Napoli (Unina), Napoli

** Dipartimento di Chimica, Università di Roma "La Sapienza" (Unirm), Roma

*** Inail Consulenza Tecnica Accertamento Rischi e Prevenzione (Contarp), Roma

Attività 4.1: Processo innovativo di estrazione/purificazione

A cura di **Roberto Andreozzi**, **Concetta Di Giovanni**, **Ilaria Di Somma**, **Raffaele Marotta**, **Laura Lorini** e **Francesco Valentino**

4.1.1 Introduzione

I PHA rappresentano dei materiali intracellulari che costituiscono per il microrganismo una riserva energetica e di carbonio. La produzione industriale di tali materiali richiede pertanto la disponibilità di un trattamento di downstream capace di consentirne l'estrazione dalle cellule microbiche ed una adeguata purificazione. Nella maggior parte dei casi, l'estrazione dei PHA viene effettuata mediante l'impiego di solventi organici in cui il polimero è solubile. Tra questi i più citati in letteratura quali particolarmente efficienti per il recupero, ad esempio, del PHB da biomasse batteriche, sono il cloruro di metilene, l'1,2 - dicloroetano e il cloroformio. Tuttavia, occorre ricordare che tali solventi, e in particolare il cloroformio, sono tossici e possono causare problemi all'ambiente e alla salute dell'uomo.

Pertanto l'individuazione di solventi che possano costituire una valida alternativa all'impiego di sostanze clorurate, è una problematica alquanto attuale anche dal punto di vista della salute e sicurezza degli operatori e del potenziale impatto ambientale.

In questi anni, è stata proposta un'ampia gamma di solventi per estrarre i PHA dalla biomassa in cui vengono accumulati, prestando attenzione essenzialmente al fatto che essi fossero meno tossici di sostanze clorurate quali cloroformio o diclorometano. La Tabella 23 riporta le principali proprietà chimico-fisiche di alcuni dei solventi che sono stati recentemente proposti per recuperare i PHA.

Tabella 23 - Proprietà dei solventi utilizzati per il recupero del PHA dalle cellule
[Aramvash A. et al., 2015]

Solvent	Density (g/cm ³)	Boiling point (°C)	Viscosity (cP)	Water solubility (g/100 ml)	Safety
Water	1	100	1	-	Safe
Ethyl acetate	0.89	77	0.42	8.3	Low toxicity
Butyl acetate	0.88	126	0.68	6.8	Medium toxicity
Ethanol	0.78	78	0.001	Infinite	Low toxicity
Chloroform	1.48	61	0.54	0.8	Toxic
Methanol	0.79	64	0.5	Infinite	Low toxicity
Propanol	0.80	98	1.9	Infinite	Low toxicity

Tuttavia, per una scelta oculata del solvente, occorre che il confronto tra le specie candidate venga effettuato considerando i pericoli associati alle specifiche sostanze. Un supporto per tale scelta può essere rappresentato dall'approccio proposto da Heikkilä [Heikkilä, 1999] che ha sviluppato un indice di sicurezza intrinseca utile per il confronto tra diverse alternative processistiche. Esso è calcolabile mediante l'equazione:

$$ITI = ICI + IPI \quad (\text{eq. 1})$$

dove ITI (*Total Inherent Safety Index*) è la somma degli indici ICI (*Chemical Inherent Safety Index*) e IPI (*Process Inherent Safety Index*). Il parametro ICI contiene i fattori chimici che determinano gli aspetti di sicurezza, mentre il parametro IPI include gli aspetti di processo. Tali parametri possono essere valutati in accordo alle seguenti equazioni:

$$ICI = I_{RM, \max} + I_{RS, \max} + I_{INT, \max} + (I_{FL} + I_{EX} + I_{TOX})_{\max} + I_{COR, \max} \quad (\text{eq. 2})$$

$$IPI = I_l + I_{T, \max} + I_{p, \max} + I_{EQ, \max} + I_{ST, \max} \quad (\text{eq. 3})$$

Di seguito viene esplicitato il significato dei sottoindici:

I_{RM} : calore prodotto dalla reazione principale; I_{RS} : calore prodotto dalle reazioni secondarie; I_{INT} : reazioni indesiderate tra sostanze chimiche; I_{FL} : infiammabilità; I_{EX} : esplosività; I_{TOX} : tossicità; I_{COR} : corrosività; I_l : quantità; I_T : temperatura del processo; I_p : pressione del processo; I_{EQ} : sicurezza sull'apparecchiatura; I_{ST} : struttura del processo (considera le operazioni attraverso cui si realizza un processo e come esse sono collegate tra loro).

Mediante l'uso di tabelle riportate nel lavoro citato di Heikkilä, è possibile assegnare dei valori numerici ai diversi sottoindici per ogni solvente scelto e così effettuare un confronto delle diverse alternative di processo.

Pertanto, affinché un processo risulti sicuro è necessario non solo porre l'attenzione sugli aspetti di tossicità ma considerare anche altre proprietà delle sostanze usate quali ad esempio l'infiammabilità e l'esplosività. Tornando al caso del PHA, numerosi autori hanno valutato che il recupero con acetato di etile del PHB dalla biomassa in cui esso si è formato potrebbe rappresentare una valida alternativa all'impiego del cloroformio. La Tabella 24 mostra le proprietà rilevanti per la sicurezza per i due solventi in esame.

Tabella 24 - Proprietà del cloroformio e dell'acetato di etile

SPECIE	TLV-TWA (ppm)	LFL (% vol)	UFL (%vol)	Flashpoint (°C)	Boiling point, (°C)
cloroformio	10	-	-	-	61
acetato di etile	400	2	12	-4	77

Dal confronto dei dati si evince che la scelta del solvente non è così semplice in quanto, nel caso specifico, ad una diminuzione della tossicità, passando dal cloroformio all'acetato di etile, si associa un incremento dell'infiammabilità ed esplosività che non può essere sottovalutato. Con l'impiego del metodo proposto da Heikkilä è possibile dimostrare che l'uso di acetato di etile risulta meno intrinsecamente sicuro di quello del cloroformio (Tabella 25).

Tabella 25 - Indici di sicurezza intrinseca del cloroformio e dell'acetato di etile

SPECIE	I _{TOX}	I _{EX}	I _{FL}	I _{TOX} + I _{EX} + I _{FL}
cloroformio	4	0	0	4
acetato di etile	2	1	3	6

Va tuttavia sottolineato che il metodo proposto da Heikkilä non è esente da limitazioni, in particolare, nell'utilizzo dei soli valori di TLV (Threshold Limit Value) per tenere conto degli effetti sulla salute della sostanza in esame. In genere, tali effetti sono descrivibili con il ricorso a una o più classi di pericolo (regolamento CLP).

Pertanto, è evidente che lo sviluppo di un indice in grado di tenere in conto le diverse classi di pericolo per effetti sulla salute agevolerebbe notevolmente l'uso del metodo esaminato.

Due differenti approcci sono stati seguiti nel presente progetto per individuare una possibile alternativa al recupero di PHB che non prevedesse l'impiego di solventi clorurati:

- estrazione mediante l'impiego di reagenti inorganici;
- estrazione mediante l'impiego di CO₂ in condizioni supercritiche

4.1.2 Estrazione del PHA mediante reagenti inorganici

Sono state recentemente proposte in letteratura metodologie di estrazione/purificazione del PHB sia in ambiente basico [Jiang et al., 2015] sia acido che, sulla base delle valutazioni riportate sopra, rappresentano un approccio intrinsecamente più sicuro.

In particolare, interessante appare l'articolo di López-Abelairas [López-Abelairas et al., 2015] in cui sono stati valutati e confrontati diversi trattamenti, acido (acido solforico) e basico (idrossido di sodio, ipoclorito di sodio e una combinazione di quest'ultimo con diclorometano), per il recupero del PHB, valutandone la purezza, la percentuale di recupero e le proprietà del polimero dopo ogni trattamento. L'utilizzo di ipoclorito di sodio [Jacquel et al., 2008] si rende necessario quando si richiede un elevato grado di purezza (~ 99%), tuttavia il suo impiego è di uso limitato, in quanto la sua natura di ossidante causa una parziale degradazione del polimero estratto con riduzione del peso molecolare medio ponderale. Dall'esame dei lavori reperiti in letteratura si deduce che il trattamento acido di una biomassa ottenuta da una coltura pura sembra fornire buoni risultati a 80°C per concentrazioni di H₂SO₄ di circa 0.6 M e per una durata di 6 ore cui va aggiunto un trattamento di 1 ora con ipoclorito di sodio al 3 % (purezza ~ 98 %), mentre l'impiego di soluzioni alcaline consente di ottenere buoni risultati in termini di recupero (~ 95%) e purezza (~ 96%) del PHB, a partire da biomassa proveniente da colture miste, in condizioni meno "aggressive" (concentrazione di NaOH 0.2-0.5M, temperatura 30-37°C, durata 1 ora) ma con l'ottenimento di un polimero di peso molecolare più basso e di minore stabilità termica. Quindi, sebbene le condizioni operative in ambiente alcalino appaiano più interessanti, occorre investigare come si possa migliorare la stabilità termica del polimero recuperato. Quest'ultimo punto è di particolare importanza in quanto, essendo i PHA polimeri termoplastici, la loro lavorazione a caldo potrebbe portare a una significativa degradazione qualora fossero caratterizzati da una cattiva stabilità termica.

Nell'ambito del presente progetto si è deciso di verificare la validità di questi ultimi approcci, basati sull'impiego di soluzioni basiche o acide, modificandoli rispetto alle condizioni riportate in letteratura, e introducendo uno stadio finale di bleaching mediante trattamento con perossido di idrogeno, con lo scopo di pervenire a una eliminazione totale di solventi/reagenti clorurati.

Per lo stadio di bleaching è stato considerato il perossido di idrogeno in quanto, essendo un forte agente ossidante, soprattutto se utilizzato a caldo, si è pensato potesse contribuire ad ossidare le impurezze presenti.

Preliminarmente, si è proceduto alla messa a punto di opportuni metodi di analisi per una valutazione del grado di recupero del polimero e della sua purezza.

Materiali e metodi

I reagenti utilizzati sono stati acquistati dalla Sigma Aldrich e da Carlo Erba.

Apparecchiature utilizzate:

- centrifuga MiniSpin Eppendorf (RCF max. 12.100 × g; velocità max. 13.400 rpm);
- gas cromatografo Agilent Technologies 7820A equipaggiato con detector FID e una colonna DB-WAXETR (lunghezza 30 m, diametro 0.32 mm, film 0.5 µm);
- spettrometro NMR Bruker 400 MHz;
- spettrometro Thermo-Fisher Nicolet iS10, acquisizione spettri con cristallo ZnSe;
- Differential Scanning Calorimeter (DSC) NETZSCH 409 C/CD.

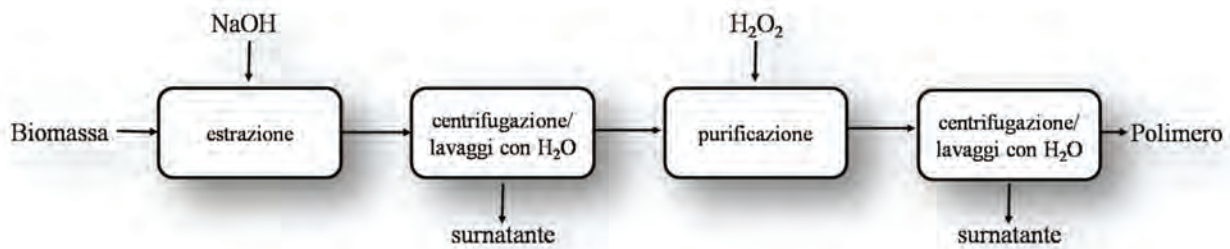
Estrazione mediante cloroformio

L'estrazione del polimero tramite cloroformio [Valentino et al., 2015] è un processo standardizzato ben noto che è stato qui usato solo come riferimento per valutare la bontà degli altri metodi (acido e basico). Di seguito viene descritta la procedura di estrazione.

Una quantità (60mg) di biomassa essiccata è stata solubilizzata in 2mL di CHCl_3 [3% w/v] a 60 °C per 24h. Al termine delle 24h, la miscela è stata sottoposta a filtrazione (filtro in cellulosa rigenerata 0.2µm). A questo punto sono state considerate due alternative, ossia l'evaporazione diretta del solvente o l'aggiunta di metanolo freddo in un rapporto 10:1 v/v al fine di agevolare la precipitazione del polimero dalla soluzione. In quest'ultimo caso è seguita una operazione di centrifugazione a 5000 giri/min per 10min e rimozione del surnatante. Il precipitato è stato infine seccato a 60°C per una notte.

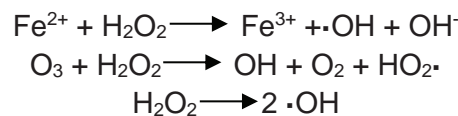
Estrazione e recupero in ambiente basico

Una quantità pesata (20mg) di biomassa essiccata è stata sospesa in 1mL di NaOH (0.1-1M) e riscaldata per 1h alla temperatura di 30°C. La sospensione è stata quindi poi sottoposta a centrifugazione per 10min, al termine dei quali il surnatante è stato rimosso dal solido. Quest'ultimo è stato lavato con acqua (1mL per lavaggio) e nuovamente centrifugato per 10min. Al fine di migliorare la purezza in alcune prove è stato aggiunto H_2O_2 al precipitato (0.5 o 1mL a seconda della biomassa di partenza) riscaldato per 1h a 70°C, a cui è seguita una centrifugazione per 10min a 10000 giri/min. Il surnatante è stato rimosso e il precipitato nuovamente lavato e lasciato ad essiccare a 60 °C per una notte. Va precisato che, al termine dei lavaggi con acqua, è stato regolato il pH a valori prossimi alla neutralità sia per evitare contaminazioni basiche residue (nocive per la stabilità del polimero) sia per non permettere alla base di neutralizzare (anche in parte) l'acido solforico usato come catalizzatore acido nella fase successiva di trans-esterificazione inficiando in tal modo le rese in estere metilico. Lo schema seguito è riportato in Figura 33.

Figura 33 - Schema di estrazione in ambiente basico

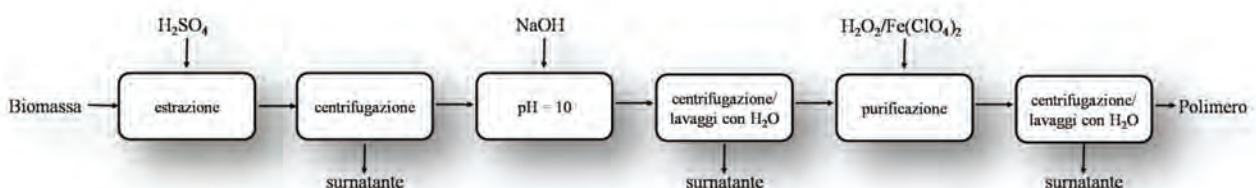
Estrazione e recupero in ambiente acido

Una quantità pesata (50 mg) di biomassa essiccata è stata sospesa in 1 mL di H₂SO₄ (0.64 M) [5% w/v] per la durata di 6 ore e ad una temperatura di 80 °C. La sospensione è poi centrifugata a 10000 giri/min per 10min e il surnatante è stato rimosso. Dopo il trattamento acido, il pH è stato regolato al valore di 10 utilizzando una soluzione di NaOH 0.5M. La sospensione è stata quindi nuovamente centrifugata, il precipitato lavato con acqua e seccato a 60°C per una notte. Allo scopo di sviluppare un metodo che assicurasse una purezza più elevata sono stati proposti nuovi percorsi sperimentali che prevedono l'aggiunta di H₂O₂ (come descritto nel trattamento alcalino) o del reattivo di Fenton in quanto è diffuso lo sviluppo di tecniche che attivano il perossido di idrogeno favorendo la sua decomposizione in radicali idrossilici, quest'ultimi noti per la capacità ossidativa più alta. La decomposizione può essere promossa in vari modi; si possono impiegare alcuni sali di metalli di transizione, l'ozono o i raggi UV:



Si è scelto il perclorato di ferro II esaidrato Fe(ClO₄)₂·6H₂O come fonte di ioni ferrosi.

La prima fase del metodo ha previsto lo stesso procedimento usato per l'estrazione in ambiente acido. Al precipitato così ottenuto sono stati aggiunti 500µL di H₂O₂ 1M (prove preliminari hanno mostrato che l'aggiunta di un volume superiore provocava effervescenza, difficilmente gestibile, con perdita parziale del campione) sotto agitazione per 10min a temperatura ambiente. Quindi sono stati aggiunti 100µL di una soluzione di HClO₄ (pH ~1.0 ÷ 2.0) e Fe(ClO₄)₂·6H₂O (rapporto Fe²⁺:H₂O₂ = 1:1). La miscela è stata agitata per ulteriori 10min a temperatura ambiente e poi centrifugata a 10000 giri/min per 10min. Il surnatante è stato rimosso e infine, dopo i lavaggi con acqua per ripristinare condizioni di neutralità, il precipitato è stato seccato per una notte alla temperatura di 60°C (Figura 34).

Figura 34 - Schema di estrazione in ambiente acido

Reazione di trans-esterificazione

Il campione secco ottenuto dai vari metodi di recupero è stato pesato e il valore ottenuto confrontato con il massimo atteso (valutato sottoponendo a trans-esterificazione con metanolo la biomassa secca) e, inoltre, lo stesso è stato sottoposto alla reazione di trans-esterificazione per valutarne la purezza, secondo la seguente procedura.

Una quantità (4mg) di polimero estratto è stata sottoposta a una reazione di metanolisi [López-Abelairas et al., 2015] con 1mL di CHCl_3 , 0.85mL di metanolo e 0.15mL di H_2SO_4 . La soluzione è stata riscaldata per 4h a 100°C . Dopo raffreddamento, è stata aggiunta acqua bidistillata e il tutto è agitato manualmente per permettere la separazione delle due fasi. La fase organica è stata estratta e il benzoato di metile è stato aggiunto come standard interno. Gli esteri ottenuti sono stati analizzati al GC-FID individuando il picco del metil-3-idrossibutirrato (nel caso dell'omopolimero) e anche del metil-3-idrossivalerato (nel caso del copolimero).

Il grado di recupero del polimero e la sua purezza sono stati calcolati usando le seguenti equazioni:

$$\text{Purezza}(\%) = \frac{B2}{B1} \times 100$$

$$\text{Recupero}(\%) = \frac{Wf \times Pf}{Wi \times C}$$

dove B2 e B1 sono rispettivamente l'area dei metil-esteri e dello standard ottenuti al GC-FID; Wf è il peso del polimero recuperato dopo l'estrazione; Wi è il peso della biomassa introdotta nella fase di estrazione; Pf rappresenta la purezza % del polimero estratto e C il contenuto % di polimero nelle biomasse.

Il contenuto percentuale di polimero nella biomassa (C) è stato inoltre determinato sottoponendo una medesima quantità M_0 (mg) di standard di PHB/PHBV e di biomassa essiccata alla reazione di trans-esterificazione, confrontando le aree ottenute al GC-FID (aree corrette per lo standard):

M_0 standard \rightarrow trans-esterificazione \rightarrow A1

M_0 biomassa essiccata \rightarrow trans-esterificazione \rightarrow A2

$$C (\%) = \frac{A2}{A1} \times 100$$

Risultati

L'attività di ricerca è stata condotta utilizzando nella sperimentazione i seguenti quattro campioni di biomassa di cui si specifica il tipo di polimero presente e il contenuto percentuale (Tabella 26):

Tabella 26 - Campioni provenienti dall'impianto pilota utilizzati per i test estrattivi

N campione	Sorgente	Stato biomassa	% PHB	% PHBV
4	acetato di sodio	essiccata	38,7	/
12	FORSU	fresca	/	30
20	FORSU	essiccata	/	23
17	FORSU	essiccata	/	30,6

Prove in cloroformio

In Tabella 27, vengono mostrati i risultati ottenuti sottoponendo a un trattamento con solo cloroformio i quattro campioni di biomassa prima elencati. Si distingue nettamente il comportamento del campione "Acc 4" che si caratterizza per il recupero e la purezza più elevati osservati durante tali prove. Tale campione, infatti, che proviene da un reattore alimentato con acetato di sodio, sembra essere caratterizzato da una maggiore trattabilità che garantisce risultati migliori in termini di recupero e purezza.

I risultati ottenuti in questo set di prove sono stati considerati un riferimento per valutare le prestazioni dei sistemi alternativi impiegati nel corso dello studio per il recupero dei PHA.

Tabella 27 - Purezza e recupero (%) del polimero estratto sottoponendo i campioni elencati in Tabella 26 ad una estrazione mediante cloroformio

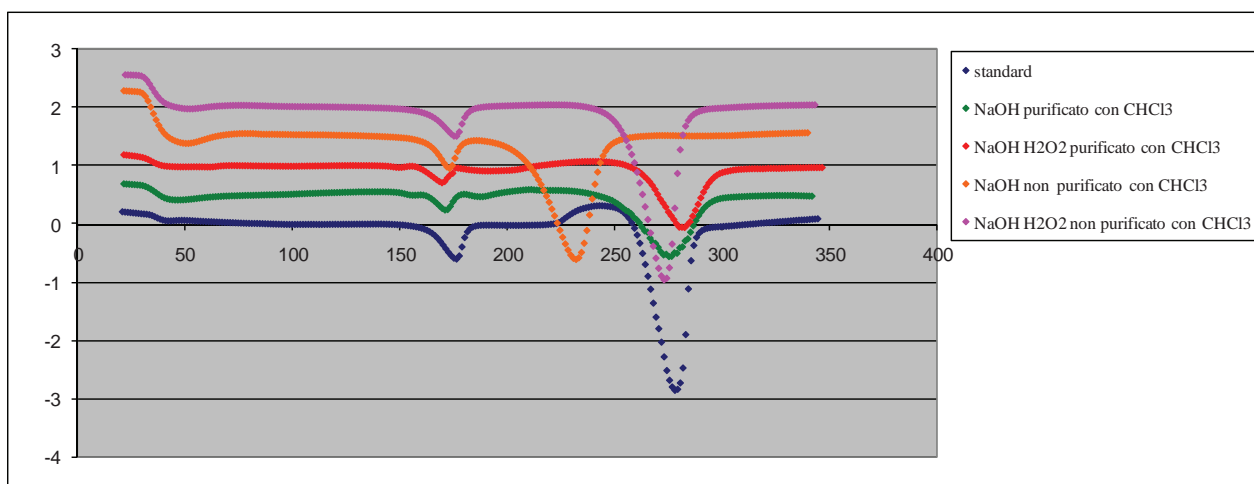
	Trattamento	Purezza %	Recupero %
Acc 4	CHCl ₃ con CH ₃ OH	77,7	56,6
	CHCl ₃ senza CH ₃ OH	78,6	64,7
Acc 12	CHCl ₃ con CH ₃ OH	/ ^a	/ ^a
	CHCl ₃ senza CH ₃ OH	46,1	28,4
Acc 20	CHCl ₃ con CH ₃ OH	/ ^a	/ ^a
	CHCl ₃ senza CH ₃ OH	37,3	15,4
Acc 17	CHCl ₃ con CH ₃ OH	/ ^a	/ ^a
	CHCl ₃ senza CH ₃ OH	52,8	31,1

a: risultato non ancora spiegato.

Prove in ambiente basico

Successivamente sono state effettuate prove di recupero di PHB in ambiente basico sottoponendo il campione “Acc 4” ai trattamenti indicati nella Tabella 28. Dai dati riportati è possibile affermare che il trattamento in condizioni alcaline è in grado di assicurare risultati migliori in termini di recupero e purezza di quelli ottenibili con il solo cloroformio (si vedano a tal proposito i risultati registrati con un trattamento con una soluzione 0.5M di NaOH e con successivi 3 lavaggi con acqua). Risultati ancora migliori sono stati osservati aggiungendo a tale trattamento un post trattamento in acqua ossigenata 1.0M, a 70°C, per 1h, con successivi 3 lavaggi finali con acqua. Partendo dai dati di letteratura che prevedono il trattamento con NaOH per 1h, è stata investigata anche la variabile tempo (2h), ma essendo risultata quest’ultima praticamente ininfluyente (purezza 82.6% rispetto a 85.5% a parità di concentrazione di NaOH), si è optato per l’adozione nelle prove successive di un tempo di trattamento minore (1h). La stabilità termica dei campioni di polimero recuperati dall’ “Acc 4” è stata testata mediante prove DSC i cui risultati sono mostrati nella Figura 35.

Figura 35 - Termogrammi DSC ottenuti per trattamento di campioni dell'Acc 4



Dai termogrammi registrati, si evince che nel caso del trattamento con NaOH (senza purificazione con cloroformio - curva arancione) il picco di degradazione si manifesta a temperature più basse rispetto a quelle dello standard (curva blu). Una ulteriore purificazione (rispetto alla semplice estrazione e lavaggi) con cloroformio (curva verde) o con H₂O₂ (curva rossa e fucsia) consente di ottenere campioni con comportamento termico molto simile a quello dello standard.

I trattamenti in ambiente alcalino impiegati per il campione "Acc 4" sono stati estesi ai campioni "Acc 12", "Acc 17" e "Acc 20" i cui risultati sono mostrati sempre in Tabella 28. Come si evince facilmente dai dati, il trattamento proposto non consente di ottenere buoni risultati dal trattamento delle biomasse raccolte alimentando il reattore con una spremitura della FORSU. In particolare, i valori medi di purezza e recupero registrati sono sempre inferiori a quelli ottenuti trattando le stesse biomasse con cloroformio. Sono stati inoltre necessari, in assenza di perossido di idrogeno, 3 lavaggi con acqua per l'"Acc 4" e 4 per gli altri accumuli, per portare il valore di pH alla neutralità.

Tabella 28 - Prestazioni relative ai test estrattivi in condizioni alcaline

	Trattamento	N giri al minuto	N lavaggi con H ₂ O	Purezza %	Recupero %
Acc 4	NaOH 0.2M	3000	2	/	/
	NaOH 0.2M	5000	2	/	/
	NaOH 0.2M	10000	2	57.7	70.8
	NaOH 0.2M	10000	3	73.7	83.8
	NaOH 0.5M	10000	2	73.5	76.6
	NaOH 0.5M	10000	3	85.5	78.8
	NaOH 1M	10000	3	70.1	60.4
	NaOH 0.1M	10000	3	61.5	72.3
	NaOH 0.8M	10000	3	80.2	73.5
	NaOH 0.5M 2h	10000	3	82.6	78.5
	NaOH 0.5M 2h	10000	4	82.3	74.5
	NaOH 0.5M + H ₂ O ₂ ^a 1M	10000	3+3*	92.8	78.8
	NaOH 0.5M + H ₂ O ₂ ^a 2M	10000	3+3*	75.9	71.1
Acc 12	NaOH 0.2M	10000	3	10.9	17.6
	NaOH 0.2M	10000	4	11.9	19.3
	NaOH 0.5M	10000	3	9.4	15.3
	NaOH 0.5M	10000	4	11.6	19.3
	NaOH 0.5M + H ₂ O ₂ ^b 1M	10000	4+3*	14.9	17.5
Acc 20	NaOH 0.5M	10000	3	7.9	11.7
	NaOH 0.5M	10000	4	9.3	10.6
	NaOH 0.5M + H ₂ O ₂ ^b 1M	10000	4+3*	10.4	13.5
Acc 17	NaOH 0.5M	10000	3	16.9	29
	NaOH 0.5M	10000	4	19.5	33
	NaOH 0.5M + H ₂ O ₂ ^b 1M	10000	4+3*	21.4	27.9

a: 1mL.

b: 0.5mL (non 1mL perché genera effervescenze).

*Gli ulteriori 3 lavaggi con acqua avevano lo scopo di rimuovere le tracce di acqua ossigenata.

Prove preliminari hanno mostrato che la semplice aggiunta di ulteriori lavaggi con acqua, in assenza di trattamento con perossido di idrogeno, non consentono miglioramenti sui risultati.

Prove in ambiente acido

In Tabella 29 sono mostrati i risultati ottenuti sottoponendo a trattamento acido, eventualmente seguito da riscaldamento in presenza di perossido di idrogeno, sia il campione “Acc 4” sia l’“Acc 17”. Per il primo campione, in modo particolare quando il trattamento acido era seguito da un riscaldamento in presenza di perossido di idrogeno, sono stati osservati risultati relativi alla purezza (97.9%) e al recupero (85.1%), di particolare interesse in quanto superiori a quelli registrati estraendo con cloroformio. Per quanto concerne l’“Acc 17”, sebbene i risultati di purezza e recupero siano significativamente più bassi di quelli osservati per l’“Acc 4”, si può affermare che, in particolare dopo trattamento con H₂O₂ 1M, essi sono molto simili a quelli registrati sottoponendo lo stesso campione a estrazione con il solo cloroformio. È evidente invece che né l’aggiunta del reattivo di Fenton né l’incremento della concentrazione (2M) di perossido di idrogeno e della temperatura (90°C anziché 70°C) hanno mostrato di influenzare i risultati.

Tabella 29 - Prestazioni relative ai test estrattivi effettuati in condizioni acide

	Trattamento	N giri al minuto	N lavaggi con H ₂ O	Purezza %	Recupero %
Acc 4	H ₂ SO ₄	10000	4	83.4	69.2
	H ₂ SO ₄ + H ₂ O ₂ 1M	10000	4+3	97.9	85.1
Acc 17	H ₂ SO ₄	10000	4	36.6	32.5
	H ₂ SO ₄ + H ₂ O ₂ 1M	10000	4+3	53.7	42.6
	H ₂ SO ₄ + H ₂ O ₂ 1M + Fe(ClO ₄) ₂	10000	4+5	45.6	/
	H ₂ SO ₄ + H ₂ O ₂ 2M	10000	4+3	48.5	37.5
	H ₂ SO ₄ + H ₂ O ₂ 2M (1h, 90°)	10000	4+3	45.2	30.4

Test paralleli di estrazione e caratterizzazione del PHA estratto (scala di laboratorio)

In parallelo con lo studio in scala pilota, è stato effettuato uno studio in scala di laboratorio dedicato allo sviluppo di un protocollo innovativo per l’estrazione di PHA da MMC, utilizzando CO₂ supercritica (sCO₂); su tali campioni è stato poi determinato il peso molecolare medio viscosimetrico (M_v).

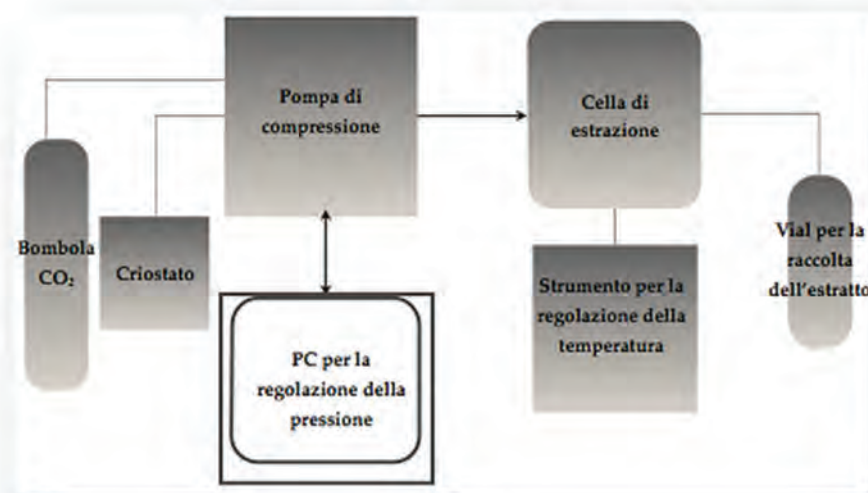
Infatti era risultato molto difficile trasportare campioni di biomassa ricca in PHA dall’impianto pilota al laboratorio senza loro deterioramento, se non preventivamente estratti; pertanto si è preferito coltivare la biomassa mista in reattore SBR in scala di laboratorio, alimentando il reattore con substrato sintetico, e così produrre su piccola scala campioni di PHA-biomassa su cui testare il metodo estrattivo suddetto. Al termine dello stadio di accumulo, la biomassa ricca in PHA veniva acidificata (pH 4.0) tramite aggiunta di H₂SO₄, allo scopo di inibire l’attività microbica, preservando allo stesso tempo il PHA prodotto. Successivamente, si procedeva ad una centrifugazione e alla successiva liofilizzazione. Il prodotto secco finale, da cui venivano prese diverse aliquote di campione per i test estrattivi con sCO₂, era caratterizzato da un contenuto di PHA intracellulare pari al 55% w/w.

Tali campioni sono quindi necessariamente distinti e differenti dai campioni prodotti alla scala pilota e un confronto diretto risulta pertanto poco significativo.

Trattamento con CO₂ supercritica (sCO₂)

Il trattamento dedicato su cellule liofilizzate si sviluppava in due step: estrazione e separazione della sostanza estratta nella fase supercritica attraverso una variazione del potere solvente della stessa. Le cellule liofilizzate (aliquote di circa 60mg) venivano caricate nella cella di estrazione, la CO₂ gassosa era compressa ad una pressione superiore della P critica (P_c) tramite una pompa a siringa provvista di una camicia esterna refrigerata e poi inviata all'interno della cella di estrazione termostata ad una temperatura superiore alla temperatura critica della CO₂ (Figura 36). Dopo trattamento, il potere solvente veniva ridotto tramite decompressione, e la sCO₂ allontanata dal materiale, recuperato quantitativamente dalla cella a fine trattamento (o trasferito in una *vial* di raccolta).

Figura 36 - Schema di un impianto di estrazione in fluidi supercritici



Tutte le estrazioni erano condotte ad una pressione di 20 MPa, temperatura 50°C, con un tempo di contatto pari a 2h; in alcuni casi veniva aggiunto al campione un “condizionante” polare che incrementava il potere solvente della sCO₂: 150µL tampone fosfato (pH 7.2) o 40µL metanolo. Una volta terminato il processo, il contenuto della cella veniva quantitativamente recuperato in una provetta, utilizzando 5.0mL di acqua distillata. Questa sospensione veniva tenuta in agitazione per 1h a temperatura ambiente, e successivamente centrifugata (8500rpm, 20min).

Il residuo solido veniva sottoposto a 2 lavaggi, utilizzando solventi di diversa natura e/o polarità: acqua distillata, miscela acqua distillata/etanolo (1:1 v/v). Al termine del secondo lavaggio, il residuo solido era portato a secco in stufa (100°C overnight). I lavaggi sopradescritti avevano lo scopo di solubilizzare e/o allontanare il più possibile i residui cellulari di elevato peso molecolare.

Determinazione del peso molecolare medio viscosimetrico

L'equazione di Mark-Houwink fornisce una relazione tra la viscosità intrinseca $[\eta]$ ed il peso molecolare medio viscosimetrico.

$$M_v: [\eta] = k M_v^\alpha$$

Con questa equazione si determina il peso molecolare di un polimero a partire dai dati della viscosità intrinseca, ottenuti da misure viscosimetriche. Queste misure si basavano sulla determinazione del tempo di scorrimento, all'interno di un capillare, di un volume di una soluzione a titolo noto preparata per ogni campione di PHA solubilizzato in cloroformio. I valori dei tempi di scorrimento misurati

vengono utilizzati per ricavare η_{red} (viscosità ridotta) e η_{inh} (viscosità inerente), che vengono successivamente riportate in grafico in funzione della concentrazione della soluzione del campione. In questo modo è possibile ricavare la viscosità intrinseca $[\eta]$ dall'intersezione delle rette ottenute dall'interpolazione dei dati. I valori dei parametri di Mark-Houwink, k e α , dipendono dallo specifico sistema polimero-solvente. Per il sistema PHA-cloroformio le costanti assumono i seguenti valori: $k = 7.7 \times 10^{-5}$ e $\alpha = 0.82$.

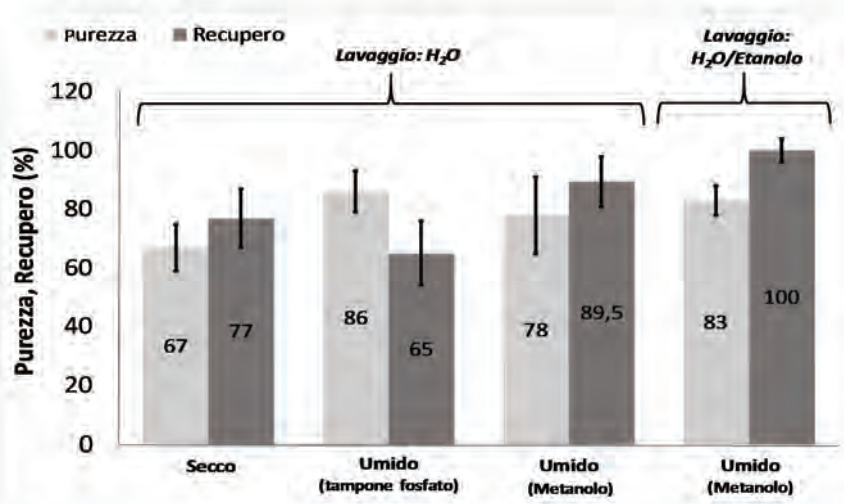
La strumentazione utilizzata per le misure viscosimetriche comprendeva: viscosimetro SCHOTT AVS 350 dotato di sensore AVS/SHT; un bagno termostatico LAUDA CD15 impostato a 30°C; un viscosimetro capillare Ubbelohde SCHOTT GERÄTE (diametro 0.46 mm) modificato con serbatoio.

Test di estrazione e caratterizzazione del PHA estratto in scala di laboratorio

Trattamento con CO₂ supercritica (sCO₂), misure viscosimetriche e determinazione del peso molecolare medio viscosimetrico (M_v)

In Figura 37 sono riportati i dati medi delle prestazioni estrattive (purezza e recupero) ottenute a seguito del trattamento con sCO₂, condotto sia su campioni secchi che su campioni umidi per addizione di agenti condizionanti. A seguito delle prove condotte, emerge chiaramente che la presenza di agenti condizionanti aveva un chiaro effetto sulle prestazioni: da un lato la purezza del PHA estratto risultava superiore fino al 15% rispetto al campione secco, ma d'altra parte il recupero appariva inferiore di circa il 10%. Utilizzando il metanolo come condizionante, il PHA recuperato aveva una purezza intorno all'80% (paragonabile all'utilizzo del tampone fosfato), con un recupero quantitativo in seguito al lavaggio con acqua/etanolo, ad oggi rappresentando la migliore prestazione. In termini di purezza e recupero del prodotto finale, tali prestazioni, seppur promettenti, sono tuttavia inferiori se paragonate ai test di estrazione di riferimento effettuati con NaClO: i campioni di biomassa liofilizzata trattati con una soluzione di NaClO al 7% Cl₂, erano infatti caratterizzati da una purezza pari al 96 ± 0.2% ed un recupero del 98.8 ± 0.1%.

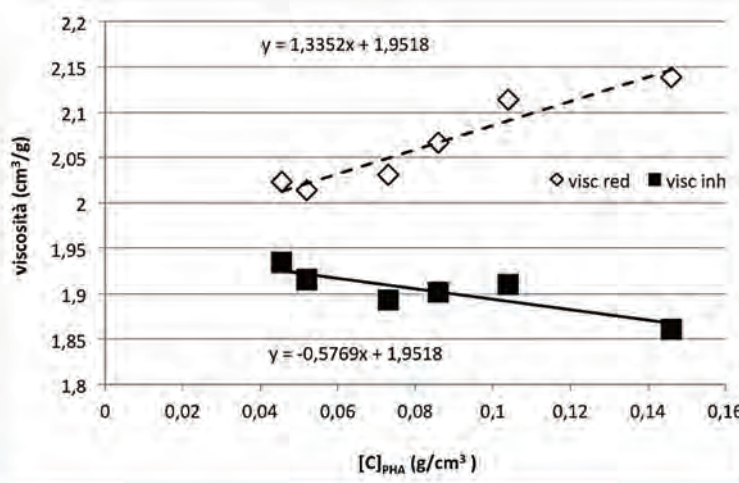
Figura 37 - Percentuale di purezza e recupero nei test effettuati con sCO₂



Inoltre, le misure di viscosità relativa hanno evidenziato che il trattamento in umido con metanolo risulta essere il più promettente anche in termini di qualità del polimero e di purezza. A titolo d'esempio, in Figura 38 sono riportati gli andamenti delle viscosità ridotta ed inerente relativi al campione trattato con metanolo e lavato con acqua/etanolo. Tale campione era inoltre caratterizzato dal peso molecolare medio viscosimetrico superiore ($M_v = 2.35 \times 10^5$) rispetto agli altri campioni

sottoposti a diversa procedura estrattiva, compreso il trattamento ossidativo con NaClO, migliore in termini di resa e purezza del PHA estratto ma non in termini di qualità.

Figura 38 - Andamento dei dati di viscosità ridotta ed inerente, ottenuti per il campione estratto con sCO₂ in umido con metanolo, lavato successivamente con H₂O ed EtOH



Considerazioni conclusive

Per quanto riguarda i test in parallelo effettuati su campioni provenienti da reattore in scala di laboratorio, i risultati ottenuti hanno evidenziato le potenzialità di processi di estrazione alternativi ai metodi tradizionali (nello specifico il trattamento con CO₂ supercritica). Ad oggi, non esistono studi di letteratura che riportano il trattamento di sCO₂ su MMC per l'estrazione di PHA. Anche alla luce di questo, le performance ottenute costituiscono sicuramente un buon punto di partenza. L'efficienza del trattamento estrattivo è migliore in condizioni umide e in presenza di coadiuvanti, punto chiave che potrebbe essere considerato nell'ottica di evitare lo step intermedio di liofilizzazione della biomassa. L'utilizzo di condizionanti, sia tampone fosfato che metanolo, migliorava infatti sia la purezza (fino all'86%), che il recupero (fino al 100%) rispetto al trattamento su cellule secche. Inoltre, anche la qualità del polimero ottenuto risulta superiore (da misure viscosimetriche): il PHA caratterizzato dal peso molecolare medio viscosimetrico più alto derivava da trattamenti ad umido con metanolo. Sarà necessario approfondire questo tipo di processi estrattivi, presumibilmente adottando condizioni di temperatura e pressione più drastiche (oltre 50°C e 35MPa rispettivamente) che potrebbero incrementare la distruzione del materiale cellulare non polimerico (NPCM), e di conseguenza la purezza del PHA estratto.

Resta tuttavia doveroso sottolineare che nonostante l'utilizzo di sCO₂ implichi l'assenza di solventi clorurati e/o agenti chimici aggressivi per l'estrazione di PHA dalle cellule, le elevate pressioni di esercizio necessarie sono un parametro da considerare dal punto di vista della sicurezza del processo.

Attività 4.2: Aspetti di salute e sicurezza dei processi di estrazione

A cura di Roberto Andreozzi e Emma Incocciati

4.2.1 Soluzioni acide (H₂SO₄)

Un breve esame degli indici proposti da Heikkilä [Heikkilä, 1999] porta ad aspettarci un valore diverso da zero per queste soluzioni sia per l'indice di tossicità che per quello di corrosione.

Per quanto concerne l'indice di tossicità, sulla base del valore del TLV-TWA dell'acido solforico, si arriva a ricavare un valore di 5, che lascerebbe prevedere un valore dell'indice totale (ITI) superiore a quello calcolato per il cloroformio (ITI=4). Nell'approccio di Heikkilä [Heikkilä, 1999], infatti, a più bassi valori di TLV corrispondono maggiori livelli di tossicità. Si perverrebbe a un analogo risultato, nel caso in cui, si facesse ricorso all'impiego, nelle operazioni di finitura, di soluzioni contenenti perossido di idrogeno (TLV-TWA =1ppm).

Occorre rimarcare che, come già detto in precedenza, l'impiego del solo TLV nella valutazione dell'indice di tossicità può risultare fuorviante nella misura in cui altri effetti sulla salute verrebbero trascurati. Ad esempio, proprio nel caso del confronto tra cloroformio e acido solforico, non verrebbe tenuto nel dovuto conto il fatto che il primo dei due composti a differenza del secondo è classificato secondo il regolamento CLP come cancerogeno (H 351, Carc 2).

4.2.2 Estrazione mediante CO₂ in condizioni supercritiche

Per le condizioni adottate nel corso delle presenti indagini, T= 50°C e P= 200atm, dal citato lavoro di Heikkilä si desume un *Process Inherent Safety Index* pari a 3 e quindi: *Total Inherent Safety Index* = *Process Inherent Safety Index* = 3.

Quest'ultimo dato è da confrontarsi con i valori superiori che sono stati ottenuti nel caso di impiego del cloroformio (*Total Inherent Safety Index* = 4) o anche di acetato di etile (*Total Inherent Safety Index* = 6).

Pertanto per le condizioni di temperatura e pressione adottate, si può ritenere che tale processo di estrazione risulti più sicuro di quello basato sull'impiego del solo cloroformio.

Si precisa che negli ultimi due esempi citati il *Total Inherent Safety Index* è dovuto al contributo del *Chemical Inherent Safety Index* risultante dalle caratteristiche di infiammabilità/esplosività/tossicità del solvente considerato.

4.2.3 Considerazioni conclusive

Ai fini di un miglioramento degli aspetti di sicurezza connessi con l'estrazione e il recupero dei PHA da biomassa microbica mista, in genere realizzata mediante solventi clorurati, è stata valutata la possibilità di sostituire questi ultimi impiegando soluzioni estraenti basiche o acide ed eventualmente una purificazione con soluzioni 1.0M di perossido di idrogeno a 70°C oppure un'estrazione mediante CO₂ in condizioni supercritiche.

Nel caso di biomasse ottenute alimentando al reattore acetato di sodio, i risultati registrati in termini di recupero del polimero e sua purificazione, nel caso di impiego di tali soluzioni, sono decisamente migliori di quelli ottenibili con l'uso del solo cloroformio. Nel caso in cui si è proceduto ad alimentare il reattore con una spremitura della FORSU, i risultati ottenuti utilizzando soluzioni basiche sono di scarso interesse mentre con l'impiego di soluzioni acide essi sono paragonabili a quelli osservati con cloroformio. Va comunque sottolineato che i valori osservati in questo ultimo caso, sia per quanto concerne il recupero sia la purezza del polimero, sono piuttosto modesti (recupero 42.6%, purezza 53.7%) per eventuali successive applicazioni, probabilmente a causa del ridotto contenuto di polimero totale iniziale presente nella biomassa sottoposta al trattamento. Tale ridotto contenuto è presumibilmente anche dovuto alla difficoltà di conservare e trasferire i campioni di biomassa.

Dal punto di vista della sicurezza, la pedissequa applicazione degli indici di Heikkilä porterebbe a concludere che la sostituzione del cloroformio con soluzioni contenenti acido solforico e/o perossido di idrogeno non risulterebbe vantaggiosa, presentando questi ultimi degli indici di tossicità superiori a quelli del cloroformio stesso. D'altra parte occorre rimarcare che per quanto riguarda la tossicità, la classificazione di Heikkilä fa uso soltanto dei TLV, che non tengono in conto tutti gli effetti sulla salute che la sostanza può esercitare. In attesa dello sviluppo di un indice di tossicità maggiormente rappresentativo delle classi di pericolo per effetti sulla salute di una specie, in considerazione del fatto che almeno una classe associata al cloroformio desta particolari preoccupazioni (cancerogenicità), si può ritenere che l'uso di acido solforico e/o perossido di idrogeno sia comunque da preferirsi rispetto al cloroformio.

Per quanto riguarda i test in parallelo effettuati su campioni provenienti da reattore in scala di laboratorio, i risultati ottenuti hanno evidenziato le potenzialità di processi di estrazione alternativi ai metodi tradizionali (nello specifico il trattamento con CO₂ supercritica). Anche sul piano della sicurezza, è possibile ricavare un indice I_T pari a zero e un indice I_P pari a 3, che portano a concludere che l'adozione di tale processo per il recupero del PHB dalla biomassa è più vantaggioso del recupero mediante l'impiego di cloroformio.

Si rimarca comunque che tali aspetti sono stati studiati in via preliminare e saranno soggetti ad approfondimento, anche alla luce delle più recenti disposizioni regolamentari in tema di agenti chimici (regolamento CLP). Tali disposizioni propongono specifici percorsi metodologici da applicare a sostanze e miscele per stabilire quali siano i rischi potenziali per la salute e la sicurezza umane e per l'ambiente ad esse associati.

BIBLIOGRAFIA

- Aramvash A, Gholami-Banadkuki N, Moazzeni-Zavareh F, Hajizadeh-Turchi S. 2015. An Environmentally Friendly and Efficient Method for Extraction of PHB Biopolymer with Non-Halogenated Solvents. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(11): 1936-1943.
- Heikkilä AM. 1999. Inherent safety in process plant design An index-based approach. VTT PUBLICATIONS 384.
- Jacquel N, Lo C-W, Wei Y-H, Wu H-S, Wang SS. 2008. Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). *Biochemical Engineering Journal*, 39: 15-27.
- Jiang Y, Mikova G, Kleerebezem R, van der Wielen LAM, Cuellar MC. 2015. Feasibility study of an alkaline-based chemical treatment for the purification of polyhydroxybutyrate produced by a mixed enriched culture. *AMB Express*.
- López-Abelairas M, García-Torreiro M, Lú-Chan T, Lema JM, Steinbüchel A. 2015. Comparison of several methods for the separation of poly(3-hydroxybutyrate) from *Cupriavidus necator* H16 cultures. *Biochemical Engineering Journal*, 93: 250-259.
- Regolamento (CE) N. 1272/2008 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 16 dicembre 2008 relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele che modifica e abroga le direttive 67/548/CEE e 1999/45/CE e che reca modifica al Regolamento (CE) n. 1907/2006. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* del 31 Dicembre 2008, n. L.353.
- Valentino F, Riccardi C, Campanari S, Pomata D, Majone M. 2015. Fate of β -hexachlorocyclohexane in the mixed microbial cultures (MMCs) three-stage polyhydroxyalkanoates (PHA) production process from cheese whey. *Bioresource Technology*, 192: 304-311.

CAPITOLO 5 - Analisi di mercato

Lorenzo Bellicini*, Mercedes Tascetta*, Francesco Toso*, Sara Toso*, Franca Widmar*, Paolo D'Alessandris* e Gianni Stifani*

* *Centro Ricerche Economiche Sociali di Mercato per l'Edilizia e il Territorio (Cresme), Roma*

Con riferimento all'obiettivo specifico 5 "Analisi di mercato", si riporta il contributo elaborato dalla UO del CRESME volto ad analizzare il ruolo che le bioenergie svolgono nell'ambito delle fonti energetiche rinnovabili nonché il loro utilizzo nei vari settori di impiego. Sono inoltre trattati gli aspetti ambientali più rilevanti e i sistemi di sicurezza adottati in fase di costruzione e di gestione degli impianti.

Il contributo della UO CRESME si articola in 5 parti di cui la prima dedicata alla definizione e contestualizzazione del settore degli impianti di energie rinnovabili da biomasse nell'ambito delle politiche del risparmio energetico, nonché ad altri temi quali: l'approvvigionamento delle biomasse rinnovabili; i rischi ambientali e i sistemi di sicurezza in fase di costruzione e gestione degli impianti; il dissenso del territorio per gli impianti a biomassa e le procedure adottate per la costruzione del consenso. Nella seconda parte si fa il punto sul mercato delle energie rinnovabili, con particolare attenzione ai consumi finali, agli impianti realizzati, alla potenza installata e all'energia prodotta per settori di mercato e fonte rinnovabile, con un approfondimento dedicato agli impianti a biogas. La terza parte è dedicata all'analisi della produzione di rifiuti solidi urbani e delle relative strategie di gestione, ivi inclusa la trasformazione della frazione organica in biogas. La quarta parte è dedicata all'analisi delle forme di partenariato pubblico e privato adottate in Italia per la realizzazione e gestione di impianti a biogas accompagnata dall'esposizione di tre casi concreti. Infine nella quinta ed ultima parte sono presentati l'analisi *SWOT* e gli scenari previsionali di mercato per lo sviluppo delle biomasse nell'industria e nell'agro-industria in Italia.

Di seguito sono rappresentati i principali elementi di sintesi, descritti attraverso il lavoro del CRESME, organizzati per punti tematici.

5.1. Obiettivi, regole e costruzione del consenso

Obiettivi - L'Unione europea, con la Direttiva 2009/28/CE "Promozione dell'uso dell'energia da fonti rinnovabili", ha definito tre obiettivi al 2020 prioritari per la sostenibilità energetica:

1. l'abbattimento del 20% delle emissioni di gas serra;
2. la copertura attraverso le fonti rinnovabili del 20% dei consumi energetici;
3. la riduzione del 20% dei consumi energetici previsti per il 2020.

La quota complessiva di energia da fonti rinnovabili sul Consumo Finale Lordo di energia da conseguire nel 2020 è per l'Italia pari a 17%.

Gli orientamenti dell'Italia per il raggiungimento degli obiettivi stabiliti a livello comunitario sono illustrati in una serie di documenti, predisposti in questi ultimi anni, che contengono misure e programmi finalizzati a costruire una strategia nazionale concreta per la promozione dell'efficienza energetica, dei servizi energetici, e per la produzione di energia da fonti rinnovabili. Tra i principali documenti pianificatori e programmatori nazionali vi sono il Piano d'Azione Nazionale per le energie rinnovabili (PAN), il Piano d'Azione per l'Efficienza Energetica (PAEE), il Piano di Azione per

l'Energia Sostenibile (PAES) nonché la nuova Strategia Energetica Nazionale (SEN) per un'energia più competitiva e sostenibile.

Regole - Il quadro normativo di riferimento per lo sviluppo del settore degli impianti a biomasse, biogas e bioliquidi è ampio e complesso e negli ultimi anni ha registrato una forte accelerazione.

Nel corso degli ultimi anni sono state emanate nuove regole per lo sviluppo sostenibile del settore e tra i provvedimenti più recenti si indicano: il DM del MATTM 118/2016 “Regolamento recante aggiornamento dei valori limite di emissione in atmosfera per le emissioni di carbonio organico totale degli impianti alimentati da biogas, ai sensi dell'articolo 281, comma 5, del decreto legislativo n. 152 del 2006”; il DM del MiPAAF del 25 febbraio 2016 “Criteri e norme tecniche generali per la disciplina regionale dell'utilizzazione agronomica degli effluenti di allevamento e delle acque reflue, nonché per la produzione e l'utilizzazione agronomica del digestato”; il decreto interministeriale del 3 febbraio 2016 “Approvazione della regola tecnica di prevenzione incendi per la progettazione, la costruzione e l'esercizio dei depositi di gas naturale con densità non superiore a 0,8 e dei depositi di biogas, anche se di densità superiore a 0,8”.

Per promuovere l'uso delle biomasse sono stati introdotti anche degli incentivi e tra i meccanismi incentivanti attivi al 30 giugno 2016 vi sono, tra gli altri, quelli previsti dal DM “Incentivazione dell'energia elettrica prodotta da fonti rinnovabili diverse dal fotovoltaico”, emanato dal MISE il 23 giugno 2016, dalla Legge di Stabilità 2016 (Legge n. 208 del 28 dicembre 2015) relativamente agli impianti per la produzione di energia elettrica alimentati da biomasse, biogas e bioliquidi, dal Decreto Biometano, emanato dal MISE il 5 dicembre 2013, dal Decreto legislativo n. 28 del 3 marzo 2011 “Attuazione della Direttiva 2009/28/CE sulla promozione dell'uso dell'energia da fonti rinnovabili, recante modifica e successiva abrogazione delle direttive 2001/77/CE e 2003/30/CE”.

Costruzione del consenso - Condizione necessaria per lo sviluppo del settore delle bioenergie, oltre alla corretta progettazione, costruzione e gestione degli impianti, è la diffusione di informazioni sui rischi per l'ambiente e la salute e sicurezza occupazionale. A tal fine risulta infatti fondamentale un percorso partecipato con i comitati dei cittadini, le istituzioni e tutti gli stakeholder del territorio per intraprendere le opportune azioni d'informazione basate su trasparenza e dialogo, al fine di creare un clima di reciproca fiducia tra l'impresa/ente e i cittadini. A tal proposito, è stato di recente introdotto nell'ordinamento italiano il “dibattito pubblico”, che, in attuazione del nuovo codice degli appalti e delle concessioni (il d.lgs. 50/2016 e smi), regola il ruolo di cittadini e territori nelle procedure di “informazione, partecipazione e confronto pubblico sull'opportunità, le finalità e le soluzioni progettuali di opere, progetti o interventi pubblici”.

L'esigenza di promuovere una importante azione di comunicazione, seria e scientifica, sui diversi livelli di pericolo che caratterizzano il settore degli impianti a biomasse, biogas e bioliquidi è aumentata con il diffondersi della raccolta differenziata e con la conseguente crescita dell'opposizione alla realizzazione di impianti per il trattamento dei rifiuti urbani.

Per gestire in maniera efficiente e sostenibile il ciclo dei rifiuti, puntando all'obiettivo fondamentale di ridurre sempre di più quelli conferiti in discarica, servono impianti adeguati per ogni fase del processo con una adeguata diffusione sul territorio. In Italia, però, non sono molte le Regioni che si sono, negli anni, strutturate per rispondere in maniera coerente a questa esigenza, garantendo un servizio di qualità ai cittadini. All'interno del complesso sistema di gestione integrata dei rifiuti, uno degli anelli più deboli della catena è molto spesso la gestione della FORSU. Fino a qualche tempo fa, questa parte significativa dei rifiuti solidi urbani poteva essere valorizzata esclusivamente nella produzione di compost o di energia elettrica, ma con la recente evoluzione del quadro normativo nazionale e comunitario in tema di immissione del biometano nella rete nazionale, si sta registrando un incremento del numero di istanze di PAS (Procedure Abilitative Semplificate) per la realizzazione di nuovi impianti di DA, che sta però generando conflitti tra le popolazioni coinvolte, le società che gestiscono gli impianti e la Pubblica Amministrazione riguardo alle possibili criticità ambientali ed igienico-sanitarie connesse alla presenza di tali impianti e al loro funzionamento.

Le principali criticità potenzialmente riscontrabili nell'esercizio degli impianti di DA riguardano le seguenti fasi:

- la ricezione e lo stoccaggio delle matrici organiche in attesa di caricamento all'impianto;
- il trattamento e lo stoccaggio del digestato (la DA ed il successivo spandimento del digestato sui suoli possono favorire lo sviluppo di microrganismi dannosi per le produzioni alimentari, per la salute umana e animale);
- la fase di conversione energetica del biogas.

I potenziali impatti ambientali che coinvolgono le collettività interessate sono le emissioni in atmosfera (gli impianti a biomasse per DA sono caratterizzati da emissioni atmosferiche di tipo diffuso, generate in modo differenziato dalle fasi del processo di generazione del biogas, e di tipo convogliato essenzialmente generate dal processo di conversione del biogas in energia), le emissioni odorigene (una delle fasi per la possibile emissione di odori, è la gestione degli stoccaggi delle biomasse in ingresso), le emissioni sonore (l'impianto può dare origine ad elevati livelli di emissione acustica, in funzione delle apparecchiature che lo compongono) e il traffico (l'impianto può generare un aumento del traffico veicolare sulla viabilità generale a causa della movimentazione del materiale in ingresso e/o in uscita dall'impianto).

L'Osservatorio Nimby Forum¹, attraverso il monitoraggio dei media, effettua il censimento delle opere di pubblica utilità e degli insediamenti industriali oggetto di opposizione, e le procedure previste per la costruzione del consenso. In base ai dati dell'edizione 2016 dell'Osservatorio, nel corso del 2015 le infrastrutture contestate sono state 342 (erano 355 nel 2014) delle quali 308 (oltre il 90% delle infrastrutture contestate) rientrano nei settori energetico e rifiuti, due settori di riferimento per la produzione e valorizzazione del biogas e per la produzione di polimeri biodegradabili. Le infrastrutture del settore energetico contestate sono state 185 (il 54% del totale) tra impianti per la produzione di energia elettrica, elettrodotti, gasdotti, impianti per lo stoccaggio del gas e rigassificatori. Le infrastrutture contestate nel settore dei rifiuti sono state invece 123 (il 36% del totale) tra impianti per il trattamento di rifiuti speciali e urbani, termovalorizzatori e discariche per rifiuti urbani. Rispetto al precedente rapporto relativo al 2014 si osserva da un lato la significativa riduzione delle contestazioni relative alle centrali a biomasse, gli impianti contestati scendono da 101 a 58, dall'altro il forte incremento delle contestazioni per gli impianti di compostaggio dell'organico, passati da 4 a 23.

Per quanto riguarda le motivazioni che animano gli oppositori, principalmente Comitati, soggetti politici locali e i Comuni, la prima motivazione di contrarietà individuata dall'Osservatorio Nimby Forum è la preoccupazione per gli effetti negativi degli impianti sull'ambiente con una percentuale del 32,8%. Seguono le carenze procedurali e lo scarso coinvolgimento dei soggetti (18,6%), gli effetti sulla salute (14,8%), l'inquinamento (12,0%) e gli effetti legati alla qualità della vita (11,8%). Riguardo alle motivazioni espresse contro gli impianti di compostaggio, nel rapporto 2016, sono attribuite agli effetti sulla qualità della vita e alle emissioni odorigene. Riguardo a quest'ultima motivazione si riporta che la causa è dovuta al fatto che gli impianti di compostaggio più diffusi sul territorio italiano sono quelli aerobici, caratterizzati da vasche in cui la fermentazione del rifiuto avviene all'aria aperta e senza una preventiva fase di igienizzazione, a differenza di quanto avviene con la DA.

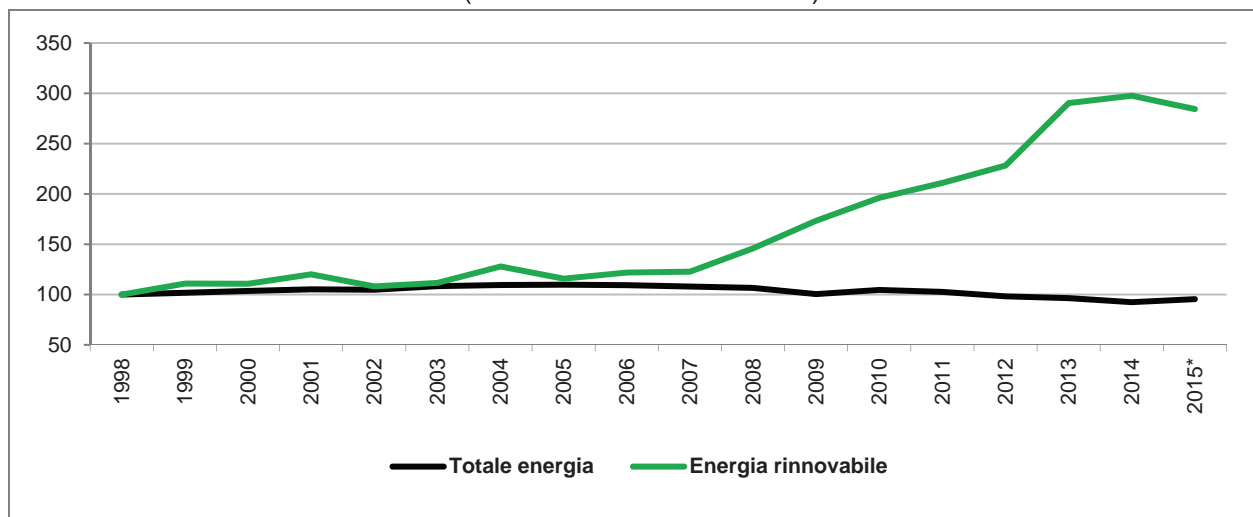
¹ *Nimby Forum, promosso dall'associazione no profit Aris, Agenzia di Ricerche Informazione e Società, attivo dal 2004, è un progetto di ricerca e di divulgazione che analizza l'evoluzione della cosiddetta sindrome Nimby sul territorio nazionale.*

5.2. Consumi e produzione di energia da fonti rinnovabili

5.2.1. Consumi di energia rinnovabile e obiettivi per il 2020 in Italia

In Italia negli ultimi 8 anni si è assistito alla forte espansione delle fonti energetiche rinnovabili con il +142% tra il 2007 e il 2014. Tuttavia, nel 2015, in base ai dati provvisori comunicati dal MISE nel mese di settembre 2016, la quantità di energia rinnovabile consumata sul territorio nazionale si sarebbe ridotta del -4,5% rispetto al 2014 (Figura 39).

Figura 39 - Bilancio Energetico Nazionale: Consumo di energia - 1998-2015
(numero indice 1998 = 100)



Fonte: elaborazione CRESME su dati Ministero dello Sviluppo Economico, Bilancio Energetico Nazionale (2015 dati provvisori)

Nel bilancio energetico provvisorio si rileva che il consumo di energia da FER (Fonti Energetiche Rinnovabili) è pari a circa 33,1 milioni di tonnellate equivalenti di petrolio (Tep) ed ha garantito il 19,3% dei consumi energetici interni complessivi. Otto anni fa, nel 2007, non raggiungeva l'8% dei consumi. Si è passati da un consumo medio annuo del 7%, nel decennio 1998-2007, al 15% del periodo 2008-2015.

Secondo i dati del Rapporto 'Comuni Rinnovabili 2016' di Legambiente, gli impianti di produzione di energia rinnovabile sono ormai diffusi nel 100% dei comuni (ognuno degli 8.047 comuni ha almeno un impianto FER installato), dalle aree interne ai grandi centri, e compongono un sistema di generazione sempre più distribuita.

Nel Rapporto si osserva che in Italia il solare fotovoltaico è diffuso in tutti i comuni ed in 1.420 comuni la produzione da fotovoltaico supera la domanda interna dei comuni stessi. Il solare termico è installato in ben 6.882 comuni con una diffusione pari all'85,5%. I comuni dell'eolico sono 850 dei quali 323 si possono considerare autonomi dal punto di vista elettrico grazie all'eolico, poiché si produce più energia di quanta se ne consuma. I comuni del mini idroelettrico (fino a 3 MW) sono 1.275 e quelli della geotermia sono 535.

I Comuni delle bioenergie sono 3.137 e questo tipo di impianti si sta sempre più diffondendo e articolando tra quelli che utilizzano biomasse solide, gassose e liquide. In particolare, quelli a biogas sono in forte crescita. In crescita sono anche gli impianti a biomasse e biogas collegati a reti di teleriscaldamento. Sono 305 i Comuni in cui gli impianti di teleriscaldamento utilizzano fonti rinnovabili, come biomasse "vere" (ossia materiali di origine organica animale o vegetale provenienti da filiere territoriali), attraverso cui riescono a soddisfare larga parte del fabbisogno di riscaldamento e acqua calda sanitaria.

In base ai dati del Sistema informativo del GSE denominato SIMERI, Sistema Italiano per il Monitoraggio delle Energie Rinnovabili, realizzato per il monitoraggio del raggiungimento dell'obiettivo comunitario, fissato dalla Direttiva 2009/28/CE, sulla quota del 20% di energia da fonti rinnovabili a copertura dei consumi totali di energia, nel 2014 i dati a consuntivo relativi ai consumi di energie rinnovabili sono risultati superiori agli obiettivi del Piano di Azione Nazionale (PAN) per l'anno 2020. Questo risultato conferma la fase espansiva delle rinnovabili, che crescono con ritmi superiori a quelli preventivati. Tale fase espansiva però non coinvolge tutti i settori.

Nel settore elettricità, che nel 2014 rappresenta il 24% dei consumi finali lordi di energia nazionali, le rinnovabili rappresentano il 33,4% una quota che supera di sette punti percentuali quella prevista dal PAN per il 2020 (26,4%).

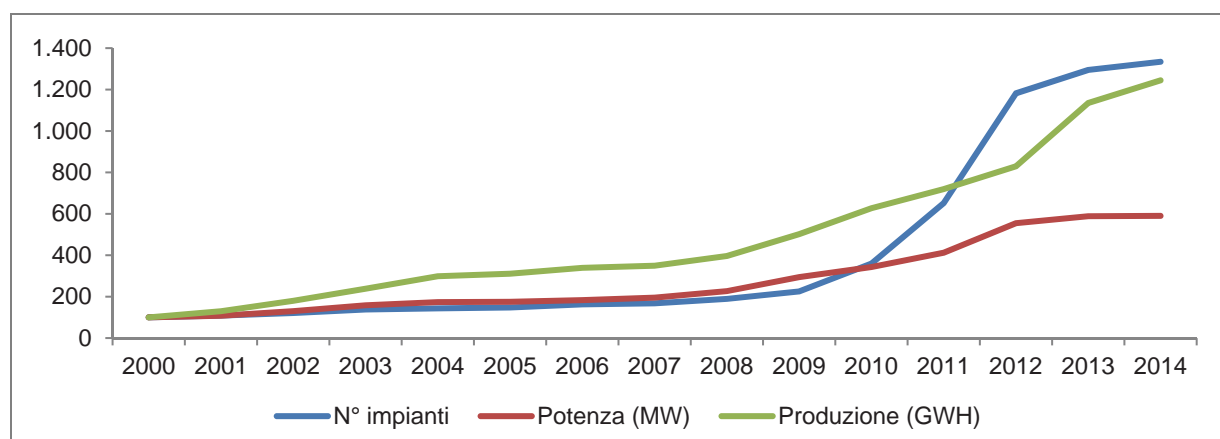
Nel settore riscaldamento e raffreddamento (R&R), che, sempre nel 2014, rappresenta la quota principale dei consumi energetici nazionali (46%), le rinnovabili rappresentano il 18,9%, una percentuale superiore al target 2020 (17,1%) di quasi due punti percentuali.

Nel settore trasporti, che rappresenta il 30% dei consumi energetici nazionali, invece le rinnovabili registrano ritmi di crescita inferiori e la fase espansiva si è interrotta nel 2012 (unico anno in cui si è superata la quota obiettivo). Nel 2014 le rinnovabili rappresentano il 4,5% dei consumi energetici, una percentuale inferiore di 1,5 punti percentuali rispetto all'obiettivo (6,0%) e molto lontana dall'obiettivo 2020 del 10,1%.

5.2.2. Produzione di energia da impianti a bioenergie in Italia

Energia elettrica - In base ai dati GSE, in Italia, tra il 2000 e il 2014 la numerosità degli impianti a bioenergie² è aumentata secondo un tasso medio annuo superiore al 20%, mentre per la potenza si è registrato un aumento medio del 14% e per la produzione un tasso medio annuo di circa il 20% (Figura 40). Si tratta di numeri secondi solo al comparto fotovoltaico e testimoniano che il parco degli impianti alimentati con bioenergie è stato caratterizzato da una crescita continua e sostenuta durante tutto il periodo.

Figura 40 - Le bioenergie per l'elettricità in Italia - Evoluzione del numero, della potenza installata e della produzione degli impianti a bioenergie - 2000-2014 (Numero indice 2000 = 100)



Fonte: elaborazione CRESME Europa Servizi su dati GSE - Rapporti Statistici 2011 - 2014

Particolarmente interessanti gli ultimi anni compresi tra il 2009 e il 2013: in questo periodo si osserva un vero e proprio boom di tutte le grandezze monitorate con un incremento del numero di impianti di 1.990 unità (da 419 a 2.409) pari a ben il +475%; il raddoppio della potenza installata da 2.019

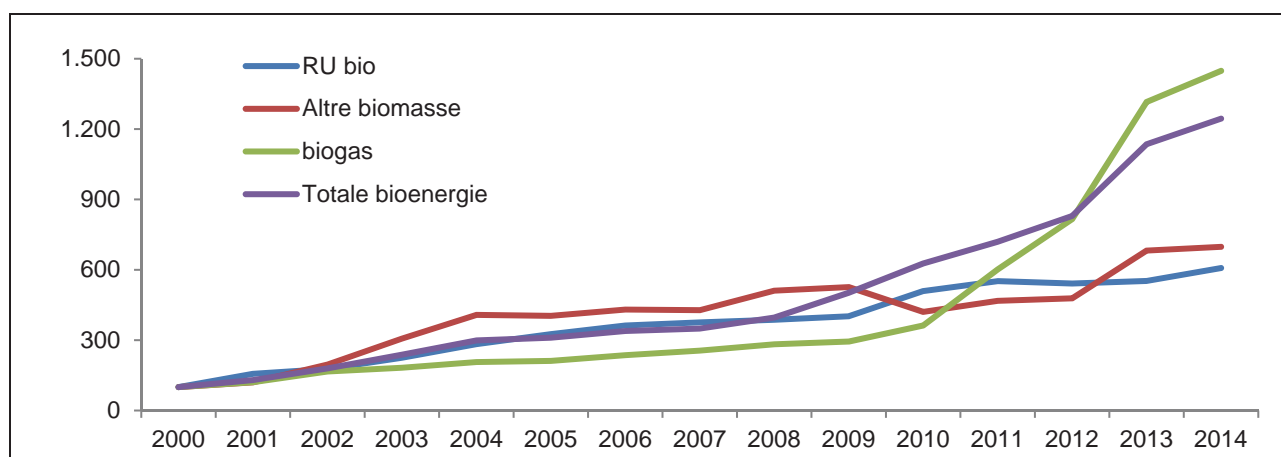
² Non sono inclusi gli impianti ibridi, ossia quelli che producono elettricità principalmente sfruttando combustibili convenzionali: gas, carbone e altro.

MWh a 4.033 MWh pari al +100%; la crescita più che proporzionale della produzione energetica rispetto alla potenza installata con il passaggio da 7.557GWh a 17.090GWh prodotti (+9.533GWh) pari al +126%.

Alla fase espansiva della produzione di elettricità da bioenergie hanno contribuito tutti i combustibili di origine "bio", ovvero le biomasse solide (da rifiuti urbani e non), il biogas e i bioliquidi. Nel 2014 ben il 44% della produzione totale (18.733GWh) di bioenergie ha riguardato il biogas (8.199GWh). Un altro 23% spetta ai bioliquidi (4.341GWh), il 20% alle altre biomasse solide (3.750GWh) e il restante 13% ai rifiuti urbani biodegradabili (2.443GWh). Nel 2000 il biogas rappresentava il 37% della produzione totale (1.505GWh), le biomasse solide il restante 63% (27% da rifiuti urbani e 36% da altre biomasse solide) mentre risultava del tutto assente la produzione di bioliquidi (in base ai dati GSE il primo anno di produzione di bioliquidi risulta il 2008).

Nel grafico di seguito riportato (Figura 41) si può osservare la dinamica delle fonti bioenergetiche tra le quali spiccano indubbiamente i biogas (oltre +1.300% nel periodo 2000 – 2014) che hanno trainato l'intero comparto delle bioenergie (oltre +1.100%). Nel grafico non sono rappresentati i bioliquidi dai quali si inizia a produrre energia elettrica solo a partire dal 2008. Nel corso di soli 7 anni, questa fonte energetica arriva a produrre 4,3TWh ed a rappresentare ben il 23% delle bioenergie

Figura 41 - Le bioenergie per l'elettricità in Italia - Produzione degli impianti a bioenergie per tipo combustibile - 2000-2014 (Numero indice 2000 = 100)



Fonte: elaborazione CRESME Europa Servizi su dati GSE - Rapporti Statistici 2011-2014

Tra il 2001 e il 2014 la potenza installata degli impianti a bioenergie è aumentata ad un tasso medio annuo del 13,9%. Dopo la crescita continua e sostenuta che proseguiva dal 2008, nel 2014 si è verificato un netto rallentamento, con incrementi piuttosto contenuti, rispetto all'anno precedente, sia del numero sia della potenza degli impianti. A partire dal 2009 la taglia media degli impianti è progressivamente diminuita, principalmente a causa dell'entrata in esercizio di impianti alimentati a biogas di piccole dimensioni (potenza installata inferiore a 1 MW), in genere realizzati per beneficiare del sistema incentivante delle tariffe onnicomprensive definite dal Decreto ministeriale 18/12/2008. Dallo sfruttamento dei biogas nel 2014 sono stati generati 8.198GWh, circa il 10,1% in più rispetto al 2013. Il contributo principale durante l'anno 2014 è stato fornito dagli impianti alimentati con biogas da deiezioni animali, per i quali la produzione passa da 816GWh a 989GWh (+21,1%); la produzione da bioliquidi è aumentata del 15,5% rispetto all'anno precedente, principalmente per l'utilizzo di oli vegetali grezzi sostenibili (Tabella 30).

Tabella 30 - Le bioenergie per l'elettricità in Italia - Numero impianti, potenza e produzione lorda degli impianti a bioenergie per tipo di combustibile, anni 2010-2014

	2010			2014			Variazione % 2014/2010		
	N° impianti	Potenza (MW)	Prod. (GWh)	N° impianti	Potenza (MW)	Prod. (GWh)	N° impianti	Potenza (MW)	Prod. (GWh)
Biomasse	142	1.243	4.308	321	1.610	6.193	126,1	29,6	43,8
- da rifiuti urbani	71	798	2.048	70	946	2.443	-1,4	18,6	19,3
- altre biomasse	71	445	2.260	251	664	3.750	253,5	49,3	66,0
Biogas	451	508	2.054	1.796	1.406	8.198	298,2	177,0	299,1
- da rifiuti	228	341	1.415	360	401	1.638	57,9	17,6	15,8
- da fanghi	47	15	28	74	44	121	57,4	201,3	328,7
- da deiezioni animali	95	41	221	421	203	989	343,2	391,4	347,3
- da attività agr. e forest.	81	110	390	941	758	5.451	1.061,7	586,0	1.297,0
Bioliquidi	97	601	3.078	526	1.027	4.341	442,3	70,9	41,0
- oli vegetali grezzi	86	510	2.682	442	886	3.722	414,0	73,8	38,8
- altri bioliquidi	11	91	397	84	141	619	663,6	54,8	56,0
TOTALE BIOENERGIE	690	2.352	9.440	2.482	4.044	18.732	259,7	72,0	98,4

Fonte: elaborazione CRESME Europa Servizi su dati GSE - Rapporti Statistici 2011-2014

* Nella tabella, per ogni tipologia di biomassa, vengono indicati il numero e la potenza degli impianti o, nel caso di impianti costituiti da più sezioni alimentate con diverse tipologie di biomasse, il numero e la potenza delle sezioni di impianto per ogni combustibile. La potenza totale disponibile è data dalla somma per righe delle potenze, mentre la numerosità totale indica comunque il numero totale degli impianti esistenti (essendo dunque inferiore alla somma per righe della numerosità degli impianti/sezioni relative a ogni combustibile).

Energia termica - Le fonti energetiche rinnovabili per uso termico vedono l'ampia prevalenza delle biomasse solide che pesano per il 68% sul totale dei consumi finali di energie rinnovabili (rappresentavano circa il 76% nel 2010 e nel 2005). Un contributo sensibile viene dalle pompe di calore (considerate tra le energie rinnovabili secondo quanto previsto dalla direttiva 2009/28/CE) con il 26% dei consumi finali (rappresentavano circa il 21% nel 2010 e il 19% nel 2005). Benché offra un contributo ancora limitato, il consumo finale energetico soddisfatto attraverso i biogas è aumentato sensibilmente fino a coprire il 2,9% del totale FER termiche. Appare un risultato rilevante poiché i biogas nel 2014 rappresentano la terza fonte energetica e il loro peso è aumentato di 10 volte se si considera che rappresentavano lo 0,5% nel 2005 e lo 0,3% nel 2010 (Tabella 31).

Tabella 31 - Energia rinnovabile - Energia termica per fonte energetica - Consumo finale lordo, anni 2005, 2010-2014 (valori in tcal)

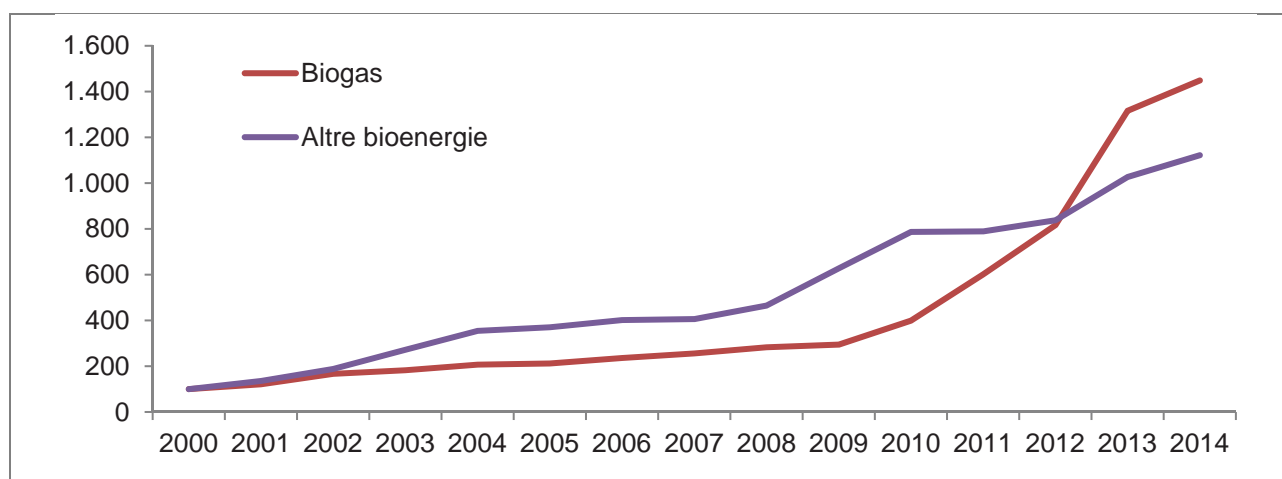
	Consumo finale lordo			Composizione % dei consumi per tipologia di impianto			Variazione % del consumo finale lordo		
	2005	2010	2014	2005	2010	2014	2010/2005	2014/2010	2014/2005
Solare	27	134	180	0.5	1.3	1.8	391	34	557
Geotermica	213	139	130	3.8	1.4	1.3	-35	-7	-39
Biomasse solide e RU bio	4.291	7.602	6.731	76.3	75.9	67.8	77	-11	57
Biogas	26	26	283	0.5	0.3	2.9	0	999	994
Bioliquidi sostenibili	-	25	31	0.0	0.2	0.3	-	24	-
Pompe di calore	1.070	2.092	2.580	19.0	20.9	26.0	96	23	141
TOTALE	5.627	10.018	9.934	100.0	100.0	100.0	78	-1	77

Fonte: Elaborazione CRESME Europa Servizi su dati GSE

5.2.3 Produzione di energia da biogas

Energia elettrica - La produzione di energia elettrica da bioenergie realizzata nel 2014 proviene per il 43,8% dai biogas, per il 33,0% dalle biomasse solide (13,0% dalla frazione biodegradabile dei rifiuti e 20,0% dalle altre biomasse solide) e per il 23,2% dai bioliquidi. Dallo sfruttamento dei biogas nel 2014 sono stati generati 8.199GWh, circa il 10,1% in più rispetto al 2013. Il contributo principale durante l'anno 2014 è stato fornito dagli impianti alimentati con biogas da deiezioni animali, per i quali la produzione passa da 816GWh a 988GWh (+21,1%) (Figura 42).

Figura 42 - Evoluzione della produzione di energia elettrica da biogas e altre bioenergie in Italia - 2000-2014 (Numero indice 2000 = 100)



Fonte: Elaborazione CRESME Europa Servizi su dati GSE

Particolarmente rilevante, negli ultimi anni, è la crescita della produzione da biogas, passata dai 1.665 GWh del 2009 ai 8.198 GWh nel 2014. Se si confronta la dinamica di lungo periodo (2000 – 2014) per i biogas e per le altre bioenergie, si osserva che i biogas hanno avuto sviluppo meno intenso fino al 2009 / 2010. A partire dal 2010 iniziano una crescita molto intensa (+35,7% nel 2010, +50,6% nel 2011, +35,7% nel 2012, +61,2% nel 2013 e +10,4% nel 2014) in particolare nel 2011 e nel 2013, fino a superare le altre fonti in termini di velocità di sviluppo.

Energia termica - Nel 2014 l'energia termica complessiva ottenuta in Italia dallo sfruttamento dei biogas ammonta a 11.862 TJ (corrispondenti a 283 ktep), in aumento del 15% rispetto all'anno precedente. I consumi diretti di biogas, in particolare, stimati invariati rispetto al 2013, risultano pari a 1.865 TJ (45 ktep); l'industria ne assorbe circa il 44% mentre il restante 56% si riferisce al commercio e ai servizi. Non risultano consumi diretti di biogas nel comparto residenziale.

Tabella 32 - La produzione di energia termica da biogas in Italia, anni 2010-2014

	2010	2011	2012	2013	2014
Consumi diretti	51	132	1.861	1.865	1.865
- industria	-	-	828	828	828
- commercio e servizi	50	125	1.032	1.037	1.037
- altro	1	7	1	0	0
Produzione di calore derivato	1.029	13.696	5.812	8.417	9.997
- da impianti cogenerativi	1.019	13.685	5.800	8.406	9.984
- da impianti di sola produzione termica	10	11	12	11	13
Totale	1.080	13.828	7.673	10.282	11.862

Fonte: Elaborazione CRESME Europa Servizi su dati GSE

Ai consumi diretti si aggiungono, nel 2014, 9.984 TJ di calore derivato prodotto da impianti di cogenerazione alimentati da biogas e 13 TJ di calore derivato prodotto da impianti per la sola produzione di calore; il dato complessivo (9.997 TJ, pari a 239 ktep) risulta in aumento rispetto all'anno precedente (+19% circa) (Tabella 32).

Ricadute economiche e occupazionali - Secondo quanto si rileva negli ultimi Rapporti Attività del GSE, gli investimenti complessivi in impianti per le fonti energetiche rinnovabili sono stati di 5,8 miliardi di euro nel 2014, oltre 1,7 miliardi in meno (-22,8%) rispetto ai 7,5 miliardi del 2013. Gli investimenti totali in impianti a biogas sarebbero pari a 943 milioni di euro nel 2014 con una leggera contrazione (-1,3%) rispetto ai 955 milioni del 2013 (Tabella 33).

Tabella 33 - Stime delle ricadute economiche ed occupazionali delle FER, anni 2013-2014 (valori in milioni di euro e unità lavorative)

	Investimenti totali		ULA totali	
	2013	2014	2013	2014
Fotovoltaico	3.137	1.779	34.315	26.171
Eolico	925	538	13.612	9.334
Idroelettrico	1.099	782	19.471	14.515
Biogas	955	943	20.463	12.018
Biomasse solide	493	600	9.983	6.888
Bioliquidi	799	884	7.064	3.251
Geotermica	104	273	1.911	3.139
TOTALE	7.512	5.799	106.819	75.316

Fonte: Elaborazione CRESME Europa Servizi su dati GSE

Le unità di lavoro complessivamente create nell'anno sarebbero pari a 75.300 nel 2014 con un calo del 29,5% rispetto alle quasi 107.000 del 2013. Diversamente dal risultato ottenuto in termini economici, l'occupazione per il settore del biogas risulta meno positiva poiché si passerebbe dalle quasi 20.500 unità di lavoro create nel 2013 alle 12.000 del 2014 con un calo pari al -41,3%.

La composizione degli investimenti e della ricaduta occupazionale evidenzia un forte spostamento dalla costruzione di nuovi impianti alla gestione e manutenzione delle strutture esistenti. Infatti, se nel 2013 gli investimenti in nuovi impianti pesavano per quasi il 50% rispetto al totale, tale quota è scesa al 28% nel 2014; tale riduzione è fortemente dipendente dal comparto fotovoltaico e da quello eolico in cui la nuova realizzazione pesava per oltre il 70% sul totale investimenti.

Nel comparto dei biogas si rileva che la composizione degli investimenti, già dal 2013, vede la prevalenza della gestione e manutenzione (76% nel 2013 e 85% nel 2014) rispetto alle nuove realizzazioni (24% nel 2013 e 15% nel 2014) (Tabella 34).

Tabella 34 - Stime delle ricadute economiche ed occupazionali delle FER per ambito di riferimento, anni 2013-2014 (valori in milioni di euro e unità lavorative)

	2013				2014			
	Investimenti in nuovi impianti	O&M	ULA permanenti	ULA temporanee	Investimenti in nuovi impianti	O&M	ULA permanenti	ULA temporanee
Fotovoltaico	2.463	674	11.645	22.670	720	1.059	19.033	7.138
Eolico	654	271	5.143	8.469	279	259	5.146	4.188
Idroelettrico	299	800	15.117	4.354	196	586	11.534	2.981
Biogas	233	722	17.077	3.386	144	799	9.837	2.181
Biomasse solide	46	447	9.279	704	124	476	5.033	1.855
Bioliquidi	19	780	6.816	248	4	880	3.203	48
Geotermica	4	100	1.861	50	166	107	1.115	2.024
TOTALE	3.718	3.794	66.938	39.881	1.633	4.166	54.901	20.415

Fonte: Elaborazione CRESME Europa Servizi su dati GSE

5.3. Produzione e trasformazione dei rifiuti organici urbani in Italia

5.3.1. Produzione di rifiuti urbani e raccolta differenziata

In base ai dati dell'edizione 2016 del Rapporto sui Rifiuti Urbani, elaborato dal Servizio Rifiuti, dell'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), in Italia, nel 2015, la produzione di rifiuti urbani è stata di circa 29,5 milioni di tonnellate, una quantità in calo dello 0,4% rispetto al 2014 e del 9,3% rispetto al 2007, l'anno di maggiore produzione di rifiuti in Italia dal 2002. Il 47,5% della produzione nazionale del 2015 riguarda rifiuti da raccolta differenziata (circa 14 milioni di tonnellate su una produzione totale di 29,5 milioni di tonnellate). Tale percentuale supera, con sei anni di ritardo l'obiettivo fissato dalla normativa per il 2008 (45%), ma risulta ancora lontana dall'obiettivo del 65% fissato per il 2012 (Tabella 35).

Tabella 35 - Produzione di rifiuti urbani in Italia - La crescita della raccolta differenziata nel periodo 2010-2015 (1.000*t)

	Produzione totale - A	Di cui da raccolta differenziata - B	B/A%
2010	32.479	11.453	35,3
2011	31.386	11.848	37,7
2012	29.994	11.992	40,0
2013	29.573	12.509	42,3
2014	29.652	13.401	45,2
2015	29.524	14.021	47,5

Fonte: elaborazione CRESME su dati Ispra Rapporto Rifiuti Urbani - Edizione 2016

L'analisi dei dati sulla ripartizione della raccolta differenziata per singole frazioni merceologiche di rifiuti (frazione organica, carta e cartone, vetro, plastica, metallo, legno, etc), nel periodo 2010-2015, evidenzia il peso rilevante e ininterrottamente in crescita della frazione organica (umido più verde). Si passa dai 4.2 milioni di tonnellate del 2010 (il 36,6% della differenziata totale dell'anno) a circa 6.1 milioni di tonnellate nel 2015 (il 43,3% della differenziata totale). Rispetto al 2010 si registra un incremento del 45%, pari a circa 1.9 milioni di tonnellate in più. L'anno di maggiore crescita è stato il 2014 con un incremento del +9,7% sul 2013 a fronte di una crescita media annua dell'intero periodo 2010-2015 del 7,7% (Tabella 36).

Tabella 36 - Raccolta differenziata delle principali frazioni merceologiche su scala nazionale, anni 2010-2015

	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Frazione organica (umido + verde)	4.187	4.501	4.813	5.217	5.720	6.072
Totale RD	11.453	11.848	11.992	12.509	13.401	14.021
Incidenza frazione organica su totale RD	36,6	38,0	40,1	41,7	42,7	43,3

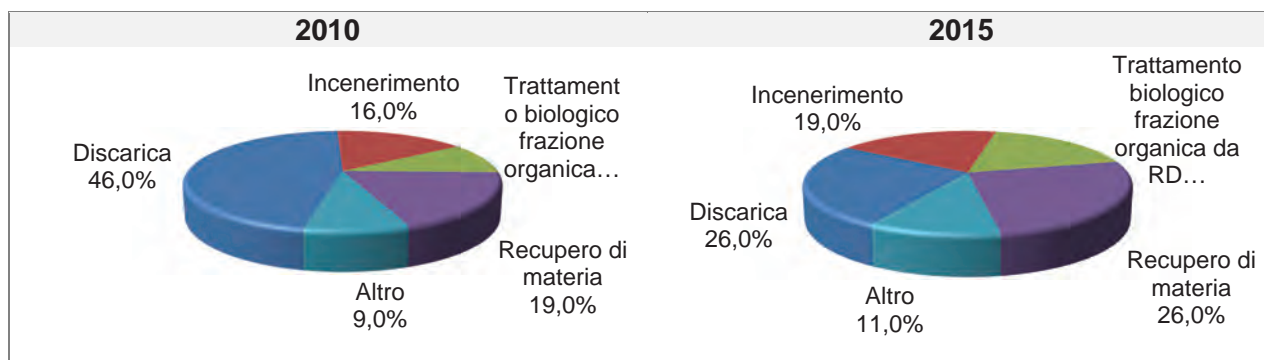
Fonte: elaborazione CRESME su dati Ispra Rapporto Rifiuti Urbani - Edizione 2016

5.3.2. Gestione dei rifiuti urbani

Nel 2015 il riciclaggio delle diverse frazioni provenienti dalla raccolta differenziata o dagli impianti di trattamento meccanico biologico dei rifiuti urbani raggiunge, nel suo insieme il 44% della produzione (cinque anni prima, nel 2010, non raggiungeva il 30%), di cui il 18% (il 10% nel 2010) è costituito dal recupero di materia della frazione organica da RD (umido+verde) e oltre il 26% (19% nel 2010) dal recupero delle altre frazioni merceologiche. Lo smaltimento in discarica interessa ancora il 26% (il 46% nel 2010) dei rifiuti urbani prodotti, il 19% è incenerito, mentre il restante 10% è destinato a usi

diversi (fonte di energia, copertura discariche, biostabilizzazione, etc.), all'esportazione o a rifiuti che rimangono in giacenza (Figura 43).

Figura 43 - Ripartizione percentuale della gestione dei rifiuti urbani, anni 2010 e 2015



Fonte: elaborazione CRESME su dati Ispra Rapporto Rifiuti Urbani - Edizioni 2016 e 2012

Trattamento biologico dei rifiuti organici

Nell'edizione 2016 del Rapporto sui Rifiuti Urbani di Ispra si riporta che *“i processi biologici dedicati al recupero di materia dei rifiuti urbani sono caratterizzati, negli ultimi anni, da un'evoluzione delle tecnologie di trattamento. Alcuni impianti di compostaggio si sono, infatti, dotati di linee di DA. Tali impianti sono costituiti da linee di trattamento integrate e sequenziali, che consentono, con il trattamento anaerobico, di recuperare energia rinnovabile sotto forma di biogas, controllare le emissioni osmogene e stabilizzare le biomasse prima del loro utilizzo agronomico e, con il successivo trattamento aerobico, di trasformare il digestato in ammendante da utilizzare in campo agricolo”*.

L'analisi dei dati relativi al sistema complessivo del trattamento biologico dei rifiuti organici mostra, nel corso degli anni, un aumento costante delle quantità di rifiuti raccolti in maniera differenziata trattati. Tra il 2006 e il 2015 si registra una quantità di rifiuti trattati con questa modalità quasi doppia (da 3.4 a 6.6 milioni di tonnellate, +91,4%). L'anno di maggiore crescita è stato il 2010 con un incremento del +17,1% sul 2009 a fronte di una crescita media annua dell'intero periodo 2006-2015 del 7,6% (Tabella 37).

Tabella 37 - Quantitativi dei rifiuti sottoposti al trattamento biologico, anni 2006-2015 (1.000*t)

	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
	<i>Valori assoluti</i>									
Input totale	3.434	3.680	4.118	4.330	5.072	5.116	5.664	5.717	6.172	6.572
Quota RU	2.433	2.559	3.106	3.486	3.943	3.981	4.339	4.319	4.865	5.203
	<i>Variazioni % rispetto all'anno precedente</i>									
Input totale		7,2	11,9	5,1	17,1	0,9	10,7	0,9	8,0	6,5
Quota RU		6,8	19,5	12,2	13,1	1,0	9,0	-0,5	12,6	6,9

Fonte: elaborazione CRESME su dati Ispra Rapporto Rifiuti Urbani - Edizione 2016

Per quanto riguarda l'ultimo anno di riferimento, la quantità totale dei rifiuti recuperati attraverso i processi di trattamento biologico (circa 6.6 milioni di tonnellate), indica, nel confronto con il 2014 (circa 6.2 milioni di tonnellate), una differenza di 400 mila tonnellate, corrispondente ad un aumento

del 6,5%. Anche la quota dei rifiuti urbani, che passa da circa 4.9 milioni di tonnellate a 5.2 milioni di tonnellate (pari al 79,2% del totale trattato), evidenzia una crescita di 338 mila tonnellate (+6,9%). Alla luce della recente evoluzione impiantistica, nell'edizione 2016 gli impianti di trattamento biologico dei rifiuti organici sono classificati in tre distinte tipologie impiantistiche: impianti dedicati al solo trattamento aerobico (compostaggio); impianti di trattamento integrato anaerobico/aerobico; impianti di DA.

Compostaggio dei rifiuti - In Italia, nel 2015, il numero di impianti di compostaggio operativi, incluse le linee di impianti di trattamento meccanico biologico aerobico dedicate al trattamento delle frazioni organiche provenienti dalla raccolta differenziata, per la produzione di compost, è pari a 263;162 sono localizzati al Nord (62%), 43 al Centro (16%) e 58 nelle regioni del mezzogiorno (22%). Il quantitativo dei rifiuti avviati a compostaggio è pari a circa 4.1 milioni di tonnellate, una quantità in calo rispetto al 2014 (anno di maggiore crescita dal 2010) di circa 1.2 milioni di tonnellate (-22%). Riguardo alle diverse frazioni merceologiche avviate a compostaggio, nel periodo dal 2010 al 2015, si osserva il peso rilevante e ininterrottamente in crescita fino al 2014 della frazione umida: si passa da meno di 2 milioni di tonnellate del 2010 (il 45,6% del totale rifiuti trattati in impianti compostaggio nell'anno) a oltre 2.8 milioni nel 2014 (oltre il 53%), con un incremento di 885mila tonnellate (+45,7%), per poi ridursi a 1.9 milioni di tonnellate (il 46%) nell'ultimo anno. Il verde, pari a circa 1.5 milioni di tonnellate, rappresenta il 36% del totale trattato, in calo di circa 112 mila tonnellate, pari a un -7%, rispetto al 2014. Anche il quantitativo dei fanghi (circa 421 mila tonnellate, pari al 10% del totale gestito) si presenta ridotto di circa 115 mila tonnellate (-21%). Gli altri rifiuti provenienti dal comparto dell'agro industria, circa 331 mila tonnellate, pari all'8% del totale avviato a compostaggio, mostrano, invece, tra il 2013 ed il 2014, una contrazione di circa 19 mila tonnellate (-5%) (Tabella 38).

Tabella 38 - Tipologie dei rifiuti trattati in impianti di compostaggio, anni 2010-2015 (t)

	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Frazione umida	1.936.314	2.124.330	2.306.852	2.350.216	2.821.418	1.899.621
Verde	1.442.689	1.408.922	1.459.691	1.442.241	1.589.912	1.477.622
Fanghi	500.441	468.982	475.606	487.612	535.289	420.820
Altro	342.258	390.931	387.982	393.986	349.212	330.576
TOTALE	4.221.702	4.393.165	4.630.131	4.674.055	5.295.831	4.128.639

Fonte: elaborazione CRESME su dati Ispra Rapporto Rifiuti Urbani - Edizione 2016

Trattamento integrato anaerobico/aerobico dei rifiuti - Gli impianti per il trattamento integrato anaerobico/aerobico dei rifiuti, operativi in Italia nel 2015, sono 26, di cui 22 localizzati nelle regioni del Nord, 1 al Centro e 3 al Sud, con una quantità autorizzata complessiva pari a 2 milioni di tonnellate.

Riguardo alle diverse matrici avviate a trattamento integrato anaerobico/aerobico, la frazione umida, con un quantitativo di oltre 1.4 milioni di tonnellate, rappresenta l'81,7% del totale trattato, mentre il verde, che ammonta a circa 200 mila tonnellate, rappresenta una percentuale dell'11,6%. I fanghi (circa 71 mila tonnellate) e gli altri rifiuti provenienti, prevalentemente, dall'industria agroalimentare (44 mila tonnellate), sono presenti in quote percentuali pari, rispettivamente, al 4,1% e al 2,6% (Tabella 39).

Tabella 39 - Rifiuti avviati a trattamento integrato anaerobico/aerobico, anni 2014-2015 (t)

	Tipologie di rifiuti	
	2014	2015
Frazione umida	263.966	1.405.708
Verde	0	199.745
Fanghi	22.008	70.676
Altro	20.376	44.228
TOTALE	306.350	1.720.357

Fonte: elaborazione CRESME su dati Ispra Rapporto Rifiuti Urbani - Edizione 2016

Digestione anaerobica - Gli impianti di DA in esercizio nel corso dell'anno 2015 in Italia sono 20, di cui 18 localizzati nelle regioni del nord e 2 nelle regioni del mezzogiorno, con una quantità autorizzata complessiva pari ad 847 mila tonnellate. Nessun impianto risulta operativo nelle regioni del centro. Il quantitativo dei rifiuti complessivamente trattati nei 20 impianti operativi è pari a circa 723 mila tonnellate, una quantità in crescita del 27% rispetto all'anno 2014 (circa 154 mila tonnellate in più) (Tabella 40).

Tabella 40 - Tipologie dei rifiuti trattati in impianti di DA, anni 2014-2015 (t)

	2014	2015
Frazione umida	189.983	220.453
Fanghi	216.875	307.397
Altro	162.350	195.489
TOTALE	569.208	723.339

Fonte: elaborazione CRESME su dati Ispra Rapporto Rifiuti Urbani - Edizione 2016

La DA rappresenta una tipologia di trattamento rilevante nella gestione delle frazioni organiche selezionate. La frazione organica da raccolta differenziata, con oltre 220 mila tonnellate, rappresenta il 30,5% del totale avviato a trattamento. Si tratta di una quantità in aumento di oltre 30 mila tonnellate, corrispondente a un +16%, rispetto al 2014. I fanghi, con oltre 307 mila tonnellate, rappresentano il 42,5% del totale complessivo, e, rispetto all'anno precedente, registrano un trend di crescita del 41,7% (oltre 90 mila tonnellate in più). La restante parte dei rifiuti sottoposti al processo di DA è costituita, prevalentemente, da rifiuti provenienti dall'industria agroalimentare; il quantitativo trattato nel 2015 (oltre 195 mila tonnellate), costituisce il 95,27% del totale trattato e registra, rispetto al 2014, un incremento di 33 mila tonnellate, pari al 20,4%.

5.4. Realizzazione e gestione di impianti di produzione e valorizzazione del biogas in Partenariato Pubblico-Privato (PPP)

L'Osservatorio Nazionale del PPP³, tra gennaio 2002 e novembre 2016, al netto delle procedure con esito negativo e dei contratti rescissi, ha censito, sull'intero territorio nazionale, 31 iniziative, circa 2 iniziative l'anno, riconducibili a operazioni di PPP per la costruzione e gestione di impianti per la captazione e valorizzazione energetica del biogas.

Il valore complessivo in gara ammonta a circa 1 miliardo di euro dei quali il 63%, pari a circa 683 milioni di euro, è relativo al valore della concessione di servizi con finanza di progetto, indetta da Acam Spa di La Spezia ad aprile 2016, e finalizzata all'acquisizione di una partecipazione di maggioranza nella costituenda società NewCo Impianti per l'affidamento in gestione e manutenzione dell'impianto di produzione di CDR sito in Saliceti nel comune di Vezzano Ligure

³ L'Osservatorio nazionale del PPP è promosso dal Dipartimento per la Programmazione e il Coordinamento della Politica Economica (DIPE), dall'Istituto per la Finanza e l'Economia Locale (IFEL), dal CNAPPC (Consiglio Nazionale Architetti, Pianificatori, Paesaggisti e Conservatori) e realizzato e gestito dal CRESME.

(SP), con esecuzione di opere di *revamping*, nonché per l'affidamento in gestione e manutenzione dell'impianto di compostaggio sito in Boscalino, nel comune di Arcola (SP).

Delle 31 operazioni di PPP censite dall'Osservatorio, tre sono state mandate in gara nel 2016. La più grande è la concessione di servizi con finanza di progetto, indetta da Acam Spa ad aprile 2016, di cui si è detto sopra. La seconda per importo (l'investimento complessivo previsto ammonta a circa 33 milioni di euro) è la concessione di lavori con finanza di progetto, mandata in gara ad aprile 2016 da NET Spa, una società a capitale interamente pubblico, che si occupa dell'intera filiera della gestione dei rifiuti urbani ed assimilati per circa 90 comuni della provincia di Udine, per la costruzione e gestione di un complesso impiantistico per il trattamento della FORSU e della FOP (Frazione Organica Putrescibile), per la produzione di compost di qualità, biogas e biometano, come proposto dal promotore il raggruppamento temporaneo di imprese formato dalle imprese Bioener (Ingegneria Ambientale ed Energie Rinnovabili) SpA e Green Project Srl (per approfondimenti su questa specifica iniziativa si rimanda al capitolo 4.2.1.). Anche la terza e ultima iniziativa dell'anno è una concessione di lavori con finanza di progetto ed è stata indetta ad agosto 2016 dall'Unione di Comuni ARO 2 Barletta Andria Trani, un Ente, costituito dai Comuni di Andria, Canosa di Puglia, Minervino Murge e Spinazzola, tutti della Provincia di Barletta Andria Trani, nato nell'ottobre 2013 per poter esercitare in forma associata servizi e funzioni di competenza dei Comuni, ed in particolare, le funzioni ed i servizi del ciclo integrato dei rifiuti urbani ed assimilati relativi alle fasi dello spazzamento, raccolta, trasporto e servizi annessi. La concessione è finalizzata alla costruzione e gestione di un complesso impiantistico per il trattamento della FORSU ad Andria, formato da una unità di ricezione, pretrattamento, DA, successivo compostaggio e upgrading dotato di distributore del metano per autotrazione. Il promotore anche in questo caso è il raggruppamento temporaneo di imprese formato dalle imprese Bioener (Ingegneria Ambientale ed Energie Rinnovabili) SpA e Green Project Srl e l'ammontare dell'investimento è pari a circa 30 milioni di euro.

Nel 2016, alle tre operazioni di PPP di cui si è detto sopra, si aggiunge l'appalto integrato, dell'importo complessivo a base di gara di 67,5 milioni di euro interamente finanziato con risorse pubbliche. Si tratta di un appalto indetto dalla Regione Calabria ad aprile 2016 e relativo alla progettazione, definitiva ed esecutiva, la realizzazione e la gestione di un polo tecnologico costituito da un impianto per la valorizzazione e recupero spinto di Materia Prima Secondaria (MPS), da Raccolta Differenziata (RD) e Rifiuti Urbani (RU) residui, da avviare alla filiera del riciclaggio, con annessa piattaforma di valorizzazione della FORSU, da realizzare in località "Alli", nel comune di Catanzaro, per una durata complessiva di 972 giorni naturali e consecutivi.

Rispetto allo stato di avanzamento delle 31 operazioni di PPP monitorate, alla fine di novembre del 2016, oltre il 60% degli impianti risulta in esercizio (19 iniziative su 31 totali). In 7 casi si è giunti al contratto e si è in attesa delle autorizzazioni per l'avvio dei cantieri. In un caso sono in corso i lavori, in due casi si è giunti all'aggiudicazione e nei restanti due casi risulta in corso la gara (Tabella 41).

Tabella 41 - Il mercato degli impianti di produzione e valorizzazione del biogas in PPP nel periodo 2002-2016 - Stato di avanzamento al 30 novembre 2016 (importi in milioni di euro)

	Numero	Importo complessivo a base di gara	Importo medio
Gara in corso	2	63	31,5
Gara aggiudicata	2	687	343,3
Gara con contratto	7	87	12,5
Lavori in corso di esecuzione	1	4	4,2
Impianto in esercizio	19	237	12,5
TOTALE	31	1.078	34,8

Fonte: elaborazioni CRESME Europa Servizi su dati www.infopp.it realizzato e gestito dal CRESME (Dati al 30 novembre 2016 al netto delle procedure con esito negativo e dei contratti rescissi).

5.4.1. Casi studio

Nel documento sono ampiamente descritti tre casi studio scelti tra le iniziative censite dall'Osservatorio Nazionale del PPP nel periodo gennaio 2002-novembre 2016, in modo tale da fornire una panoramica generale di come vengono realizzati e gestiti impianti per la produzione di energia rinnovabile da biogas in Italia. L'analisi dei casi studio descrive, attraverso esempi concreti e sulla base dei documenti di gara e dei successivi elaborati progettuali resi disponibili dai responsabili dei procedimenti, il processo realizzativo (progettazione, autorizzazione, finanziamento, esecuzione dei lavori, messa in esercizio) e gestionale di tali impianti, evidenziando le caratteristiche tecniche e le modalità di approvvigionamento delle biomasse, nonché gli aspetti più sensibili connessi ai rischi ambientali, al consenso della popolazione coinvolta e ai sistemi di sicurezza previsti ed adottati in fase di costruzione e gestione degli stessi.

Il primo caso studio riguarda la concessione di lavori mediante Finanza di Progetto per la realizzazione e gestione del complesso impiantistico per il trattamento della FORSU e della FOP (Frazione Organica Putrescibile) di Udine, comprese le opere accessorie e complementari. Il complesso impiantistico, attraverso un processo di DA e successivo compostaggio aerobico, sarà capace di produrre biogas, biometano e compost di qualità. La proposta del promotore, mandata in gara ad aprile 2016, che prevede investimenti per un importo di circa 33 milioni di euro, risulta estremamente dettagliata e risponde a molti dei quesiti che oggi ci si pone in merito ai rischi ambientali, alla modalità di approvvigionamento e ai criteri di sicurezza adottati sia in fase di realizzazione che di gestione di questa tipologia di impianti, nonché agli aspetti tecnici, autorizzativi, economico-finanziari e gestionali.

Il secondo caso studio riguarda la concessione di lavori mediante Finanza di Progetto per la realizzazione e gestione di un impianto di biogas su un'area confiscata alla camorra sita a S. Maria La Fossa, in provincia di Caserta. La proposta del promotore, mandata in gara nel 2013, che prevede investimenti per un importo di 9 milioni di euro, pone una particolare attenzione alla filiera di approvvigionamento e, data la presenza di circa 75 aziende bufaline sul territorio e la problematica dell'inquinamento da nitrati, prevede che l'impianto venga alimentato da liquami zootecnici. Una volta individuato il concessionario, conclusa la fase progettuale e ottenuta l'A.U. (Autorizzazione Unica) all'installazione e all'esercizio dell'impianto, l'Amministrazione si concentra sulla divulgazione dell'iniziativa mediante incontri informali tra i rappresentanti pubblici, il privato, gli allevatori e i cittadini. Ad oggi l'impianto di DA è in esercizio. Alimentato da biomasse a basso contenuto di lignina, residui da produzioni agroindustriali e reflui zootecnici, produce biogas da cui si ricava una potenza elettrica pari a 999kWe che viene immessa in rete.

Il terzo caso studio riguarda invece una concessione di lavori per la realizzazione e successiva gestione di un impianto di DA da FORSU con produzione di energia e ammendante compostato nel Comune di Cupello, in provincia di Chieti. Il Consorzio pubblico intercomunale per risolvere le

problematiche ambientali e di trattamento dei rifiuti urbani, in accordo con la Regione Abruzzo, decide di implementare la piattaforma ecologica esistente con il nuovo impianto per il trattamento della FORSU ai fini della produzione del “compost di qualità”. Il progetto preliminare predisposto dal Consorzio viene mandato in gara nel luglio del 2013, prevede un impianto capace di trattare circa 40.000 t/anno (di cui 10.000 di frazione verde) mediante un sistema di DA a secco e pone particolare attenzione al trattamento delle emissioni odorose e all’ottenimento di condizioni di lavoro assolutamente salubri. L’importo a base di gara è di circa 15 milioni di euro. La gara viene aggiudicata e il concessionario predispose il progetto definitivo e lo trasmette alla Regione Abruzzo al fine di ottenere le prescritte autorizzazioni propedeutiche alla realizzazione e successiva gestione dell’opera. Attualmente è in corso la procedura di V.I.A. (Valutazione di Impatto Ambientale).

Considerazioni conclusive

Lo studio condotto dal CRESME ha consentito, sulla base dell’analisi di mercato svolta e dello studio di *case studies*, di sintetizzare nell’articolazione *SWOT* opportunità e criticità funzionali allo sviluppo della DA di scarti nel mercato italiano (Tabella 42).

Tabella 42 - Schema analisi SWOT impianti di DA

PUNTI DI FORZA	PUNTI DI DEBOLEZZA
<ul style="list-style-type: none"> • Tecnologia consolidata e versatile con possibilità di ottenere, insieme al biogas, al biometano e al compost nuovi bioprodotto (es. bioplastiche); • Economia circolare ciclo rifiuti e agricoltura; • Riduzione delle emissioni climalteranti; • Ridotti costi di approvvigionamento; • Ridotti costi di gestione dell’impianto; • Processo partecipativo nella fase realizzativa dell’impianto; • Impianto inserito in un complesso impiantistico esistente; • Gestione integrata delle acque reflue e dei rifiuti organici urbani. 	<ul style="list-style-type: none"> • Impatti ambientali (emissioni in atmosfera, odorigene e acustiche e traffico veicolare); • Movimentazione e stoccaggio; • Pericolo biologico; • Tempi procedurali; • Scarsa conoscenza del settore; • Limitata comunicazione.
OPPORTUNITÀ	MINACCE
<ul style="list-style-type: none"> • Innovazione tecnologica; • Migliore gestione dei rifiuti; • Riduzione degli apporti di azoto nel terreno (direttiva nitrati); • Incentivi; • Produzione di biocarburanti, calore e elettricità da fonti rinnovabili; • Produzione di compost di qualità. 	<ul style="list-style-type: none"> • Riduzione/eliminazione incentivi; • Cambiamenti economici e volatilità dei prezzi dei combustibili fossili; • Cambiamenti nelle politiche governative; • Difficoltà a mantenere costante l’approvvigionamento; • Resistenze della popolazione (effetto NIMBY); • Diffondersi di criticità e rischi legati ad altre tipologie di bioenergie che minano l’immagine del settore (oggi in particolare la produzione di riscaldamento degli ambienti civili dovuto a combustione di legna, in particolare il successo delle stufe a <i>pellet</i>, che presenta ormai dimostrati rischi di polveri sottili e idrocarburi policiclici aromatici come benzo(a)pirene, e altri) e contribuiscono ad alimentare il timore di rischi per la salute da parte degli abitanti.

Fonte: CRESME

Nel 2016 il settore delle bioenergie, in base all'analisi svolta, sembrerebbe vivere una fase di transizione dopo la fase di crescita del periodo 2005-2013, trainata soprattutto dagli incentivi per la produzione di energie rinnovabili da biomasse da attività agricole e forestali, cui ha fatto seguito una fase di forte contrazione nel biennio 2014-2015. Il motore trainante della ripresa del settore per i prossimi anni potrebbe essere quello legato alla produzione di biometano da impianti di DA, spinti in primo luogo dagli incentivi di cui al DM del MISE del 5 dicembre 2013 (decreto biometano).

Le difficoltà del settore degli ultimi anni sono riscontrabili anche dai dati del GSE sugli investimenti in impianti a biogas. Nel 2014 gli investimenti totali nel comparto del biogas sarebbero pari a 943 milioni di euro con una leggera contrazione (-1,3%) rispetto ai 955 milioni del 2013, le unità di lavoro complessivamente create nell'anno sarebbero però pari a 12.018 nel 2014 con un calo del 41,3% rispetto alle 20.463 del 2013.

Ancora più pesante risulta la differenza nel campo delle biomasse solide e in quello dei bioliquidi: secondo GSE gli investimenti crescono rispettivamente del 21,7 e del 10,6 per cento; mentre l'occupazione diminuisce del 31% e del 54%. Emerge una sostanziale dinamica diversificata tra occupazione e investimenti, spiegabile con un forte spostamento nel mercato dalla costruzione di nuovi impianti alla gestione e manutenzione delle strutture esistenti.

Nel comparto del biogas si rileva che la composizione degli investimenti, già dal 2013, vede la prevalenza della gestione e manutenzione (76%) aumentata nel 2014 (85%) rispetto alle nuove realizzazioni (24% nel 2013 e 15% nel 2014). Si nota la riduzione degli investimenti in nuovi impianti, passati, secondo GSE, da 233 a 144 milioni di euro, con un calo del 38,1%. Sul totale di biogas, biomasse solide e bioliquidi, gli investimenti in nuovi impianti passano da 298 milioni di euro a 272, con un calo dell'8,7%; la minor caduta è dovuta alla crescita degli investimenti in biomasse solide e in bioliquidi.

CRESME ha sviluppato nel suo Rapporto Congiunturale e Previsionale sul settore delle costruzioni una stima ancora più negativa di quella presentata da GSE: partendo dal numero dei nuovi impianti di bioenergie (biogas, bioliquidi e biomasse) e dalla potenza produttiva dei nuovi impianti (stimata da GSE), ipotizzando un costo di investimento medio ponderato. Dalla stima, descritta nella tabella riportata di seguito (Tabella 43), emerge il crollo degli investimenti in bioenergie nel 2014 per poi riprendere a crescere nel biennio 2015-2016 ma attestandosi su livelli annui decisamente inferiori a quelli registrati tra il 2006 e il 2013.

Tabella 43 - Investimenti in fonti energetiche rinnovabili (FER), anni 2003-2016 (milioni di euro correnti)⁽¹⁾

	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016 ⁽²⁾
FER	937	779	694	661	1.890	4.141	7.758	32.127	26.467	16.027	5.533	1.307	1.537	1.623
Fotovoltaico	-	-	-	76	502	2.154	4.042	29.538	23.020	10.387	3.874	1.022	727	858
Eolico	122	334	660	350	1.048	1.071	1.768	1.191	1.459	1.538	662	242	757	706
Bioenergie	815	445	34	235	340	916	1.949	1.399	1.988	4.102	997	44	53	59
<i>Variazioni % a prezzi costanti</i>														
FER	14,7	-20,7	-14,5	-7,5	190,0	143,0	101,5	462,6	-4,5	-32,4	-54,9	-73,7	-15,0	15,5
Fotovoltaico					642,4	382,7	112,5	743,5	-6,0	-38,1	-52,4	-72,8	-27,4	20,4
Eolico	-21,7	160,9	89,9	-48,8	189,0	-1,4	62,9	-34,1	17,1	1,9	-57,9	-63,0	216,6	-6,1
Bioenergie	23,3	-47,9	-92,8	576,8	39,5	159,6	110,1	-29,8	35,9	100,0	-75,6	-95,6	21,6	12,9

Fonte: elaborazioni CRESME da fonti varie (GSE, Terna, CCIA Milano, Anev.)

⁽¹⁾ Nuove installazioni, inclusa posa in opera

⁽²⁾ Proiezioni

Sul crollo degli investimenti in bioenergie valgono forse gli allerta in termini di inquinamento ambientale da più parti emerse, citate nella analisi SWOT.

Quello che emerge dalla letteratura generica e tecnica, in particolare diffusa su internet, è che: “in realtà le biomasse sono ben poco green”, in primo luogo da un punto di vista sanitario; in secondo luogo va detto che “dalla loro combustione si libera il Black Carbon, la frazione carboniosa del particolato, che contribuisce al riscaldamento climatico”.

A titolo indicativo si ricorda che nel 2015 l'ISPRA (Istituto Superiore per la Prevenzione e Ricerca Ambientale) ha verificato che i livelli di benzo(a)pirene in atmosfera sono fortemente aumentati. La causa individuata è precisa: l'incremento del consumo delle biomasse, in primis la legna, che è stato spinto dalle incentivazioni previste per le fonti di energia rinnovabile. La combustione delle biomasse nel settore civile contribuisce ormai per i due terzi delle emissioni di IPA. Peraltro l'ISTAT ha certificato che nel 2014 il consumo di biomasse per riscaldamento in Italia è stato il doppio di quanto fosse prima stimato. Oltre il 12% della popolazione italiana è esposta a livelli di idrocarburi policiclici aromatici superiori ai limiti di legge.

Tali dati e informazioni non hanno praticamente nessuna rilevanza nel caso della produzione di biogas da DA; tuttavia è presumibile che possano avere comunque un effetto negativo sulla percezione sociale per l'intero comparto delle bioenergia (incluso il biogas), se non vengono poste in evidenza le ovvie e ampie differenze tra un sistema di produzione e l'altro. La scarsa conoscenza tecnico-scientifica da parte delle persone e delle amministrazioni, genera quindi dinamiche negative che si allargano ai diversi tipi di bio-energia e apre un grande spazio per una importante azione di comunicazione, seria e scientifica, sui diversi livelli di pericolo che caratterizzano le diverse tecnologie.

CAPITOLO 6 - CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

A cura di tutto il gruppo di lavoro

Nel complesso, le attività del progetto INAIL BRIC si sono svolte come da programma e hanno consentito di acquisire informazioni utili per lo sviluppo di biotecnologie industriali innovative, volte alla valorizzazione della FORSU.

Caratteristica peculiare dell'attività è stata l'attenzione posta agli aspetti della salute e sicurezza del lavoro, che sono stati investigati in parallelo con lo sviluppo del processo.

Infine, lo studio è stato completato da un'analisi di mercato sulle prospettive di investimento e sviluppo della DA in Italia.

A seguire, un breve sommario dei risultati conseguiti per le tre tipologie di obiettivi.

A) OBIETTIVI CONNESSI ALLA RICERCA E SVILUPPO DEI PROCESSI INNOVATIVI

Il progetto si è mosso in un'ottica di "bioraffineria", puntando alla diversificazione dei prodotti ottenibili dalla FORSU nonché all'incremento del loro valore economico. Il progetto ha infatti investigato una modifica sostanziale della DA convenzionale (che è usualmente condotta in condizioni mesofile ed in una singola fase di reazione), adottando un processo termofilo a due fasi, per arrivare alla produzione di bioidrometano da una parte e/o di polimeri biodegradabili per bioplastiche dall'altra.

Digestione anaerobica

Attività 1.1: processo termofilo a due fasi (scala pilota)

Il processo è stato investigato alla scala pilota e utilizzando la matrice reale (FORSU), che è stata alimentata prima previa triturazione manuale (condotta direttamente in loco) e poi spremitura su scala industriale (per conferimento da altra sede). In entrambi i casi, il processo è risultato stabile e robusto e ha presentato buone rese di conversione. In maggior dettaglio:

- La produzione specifica di VFA nella fase di fermentazione è stata di ca. 0.23 KgCOD/KgCOD_{fed}, costituita dal 25% da acido acetico, 19% da acido propionico, 33% da acido butirrico e dal restante 23% dai rimanenti acidi organici monitorati (acido valerico, caproico ed eptanoico). Tali caratteristiche sono pienamente adeguate ad un utilizzo del fermentato acido quale alimentazione per la produzione di biopolimeri (attività 3).
- La produzione specifica di gas (SGP) ottenuta dai due reattori è stata mediamente di 0.17 Nm³/KgTVS per la prima fase e 0.75 Nm³/KgTVS per la seconda fase. Tale conversione complessiva si colloca ai livelli più elevati dell'intervallo di resa della DA. Inoltre, la produzione di idrogeno della fase fermentativa è risultata sufficiente a permettere di avere un prodotto gassoso complessivo che incontra le caratteristiche del BioHythane, con valore aggiunto decisamente più elevato del semplice biogas.

L'operatività della piattaforma pilota in vari periodi lungo l'arco dell'anno ha consentito di effettuare i campionamenti ambientali (obiettivo 2) e di fornire le matrici di partenza per tutti gli altri obiettivi (obiettivi 3 e 4).

Attività 1.2: processo con pretrattamento termico (scala di laboratorio)

Si è osservato che il pretrattamento termico aumenta la frazione di sostanza organica biodisponibile, per lo più costituita da carboidrati (almeno nel caso in esame, in cui i campioni di scarto alimentare erano ottenuti direttamente da mensa aziendale).

Ciò incide prevalentemente sulla produzione di idrogeno, con un guadagno di circa l'80% rispetto al substrato non pretrattato. Un incremento si osserva anche per quanto riguarda la produzione di metano, anche se in misura molto più contenuta (tra il 4% e il 10%).

Inoltre, al di là delle rese finali, il pretrattamento termico incrementa notevolmente la cinetica di produzione di idrogeno e ciò può tradursi in un notevole vantaggio economico e gestionale, dal momento che minori tempi di permanenza del substrato nel reattore consentono di trattare maggiori quantità di rifiuti e/o di adoperare reattori dai volumi minori.

Bioprocesso per la produzione di polimeri biodegradabili

Attività 3.1: Verifica sperimentale delle prestazioni del bioprocesso a colture microbiche miste

I risultati hanno mostrato l'effettiva realizzabilità del processo in scala pilota per la produzione di polimeri biodegradabili (PHA), evidenziando come da un'alimentazione reale fermentata sia possibile selezionare un consorzio misto con una buona risposta di stoccaggio di PHA. Infatti, considerando un periodo di funzionamento stabile del reattore SBR (ovvero non soggetto a forti variazioni di temperatura), il tipico ciclo operativo del reattore SBR presentava una fase "feast" compresa tra il 6.4 e 17% della durata del ciclo, ovvero ben al di sotto del 20% che è riportato in letteratura come valore limite oltre il quale si perdono le proprietà di stoccaggio.

Buone prestazioni si sono ottenute anche nella successiva fase di accumulo del PHA all'interno delle cellule dove, dopo numerosi esperimenti in condizioni differenti, si è ottenuto un contenuto di PHA nella biomassa al termine delle prove batch pari al 40% (w/w); tale contenuto cresce poi fino al 60% dopo estrazione con ipoclorito sodico. Tali valori appaiono più che promettenti se si considera che si è partiti direttamente da FORSU e con minimi pretrattamenti; d'altra parte, un valore di purezza del polimero al 60% non è ancora sufficiente per un utilizzo diretto nella formulazione di bioplastiche. Occorre quindi un approfondimento volto a rimuovere la presenza di solidi estranei nel polimero finale, approfondimento che dovrà essere condotto sia sui singoli stadi che sulla loro concatenazione (condizioni operative dello stadio di fermentazione e/o adozione di separazioni solido/liquide più spinte tra fermentazione e stadi aerobici e/o condizioni di estrazione).

Attività 3.3: Verifica sperimentale delle prestazioni del bioprocesso a coltura pura

Quest'attività è stata necessariamente condotta alla scala di laboratorio ed è stata propedeutica alla valutazione di possibili rilasci da processi di produzione del PHA che utilizzino MOGM. Esiste già qualche applicazione a livello industriale, anche se da substrati differenti.

A tal fine, è stato selezionato il MOGM *P. putida* ceppo KTOY06 per il quale è stata verificata la capacità di accumulare PHA convertendo VFA a catena media.

È stata quindi disegnata una coppia di *primer* specifici per l'amplificazione del tratto genico *fadB* e *fadA* parzialmente deleto e ottimizzato un protocollo qPCR per la quantificazione dello stesso; tale protocollo è stato poi utilizzato per il monitoraggio del MOGM inoculato in un impianto su scala di laboratorio per il trattamento biologico di acque reflue precedentemente disegnato, allestito e messo in marcia (attività 3.4).

Downstream del bioprocesso per la produzione di polimeri biodegradabili

Attività 4.1: Processo innovativo di estrazione/purificazione

Ai fini di un miglioramento degli aspetti di salute e sicurezza connessi con il tipico utilizzo di solventi clorurati per l'estrazione e/o la purificazione di PHB dalla biomassa è stata valutata la possibilità di sostituire questi ultimi impiegando:

- soluzioni estraenti basiche o acide e una purificazione con soluzioni 1.0 M di perossido di idrogeno a 70 °C (operando su campioni ottenuti in scala pilota, sia a partire da alimentazione sintetica che da FORSU).
- CO₂ supercritica con o senza agenti coadiuvanti (campioni ottenuti in scala di laboratorio e solo da alimentazione sintetica).

Nel caso delle soluzioni basiche applicate su biomasse arricchite in PHA mediante aggiunta di acetato di sodio, i risultati ottenuti in termini di resa di recupero del polimero e di sua purezza sono decisamente migliori di quelli ottenibili con l'uso del solo cloroformio. Invece, nel caso in cui il PHA è stato ottenuto alimentando il reattore con una spremitura della FORSU, le soluzioni basiche non presentano buone rese. Viceversa, in questo secondo caso, l'impiego di soluzioni acide mostra rese e purezze paragonabili a quanto osservato con cloroformio. Va comunque sottolineato che i valori osservati sono comunque piuttosto modesti (recupero 42.6 %, purezza 53.7 %), a causa del ridotto contenuto di polimero presente nella biomassa sottoposta al trattamento. Tale ridotto contenuto è probabilmente anche dovuto alla difficoltà di conservare e trasferire campioni di biomassa da una sede all'altra senza deteriorare il contenuto interno di polimero.

Per quanto riguarda i test con CO₂ supercritica, i risultati ottenuti hanno evidenziato le potenzialità di tale processo estrattivo, almeno per campioni provenienti da reattore in scala di laboratorio e substrato sintetico (miscela VFA). L'efficienza del trattamento estrattivo è risultata migliore in condizioni umide e in presenza di condizionanti. L'utilizzo di condizionanti, sia tampone fosfato che metanolo, migliorava infatti sia la purezza (fino all'86%), che il recupero (fino al 100%) rispetto al trattamento su cellule secche. Inoltre, da misure viscosimetriche, anche la qualità del polimero ottenuto è risultata superiore: il PHA caratterizzato dal peso molecolare medio viscosimetrico più alto derivava da trattamenti in umido con metanolo.

B) OBIETTIVI CONNESSI ALLO STUDIO DELLA SALUTE E SICUREZZA DEI PROCESSI INNOVATIVI STUDIATI

Dal punto di vista della salute e sicurezza del lavoro e della sostenibilità ambientale, le innovazioni proposte presentano molte delle caratteristiche salienti della DA, e ciò conferisce valenza anche più generale allo studio. In questa filiera sono individuabili rischi occupazionali di diversa natura, in relazione alle caratteristiche della biomassa di partenza, ai pretrattamenti applicati ed alle diverse configurazioni di processo. Il *feedstock* di partenza è ricco di microrganismi, tra i quali anche patogeni e patogeni opportunisti, ed i processi anaerobici possono produrre una selezione della flora microbica tale da promuovere la presenza di microrganismi, quali per esempio i clostridi. In tali processi sono individuabili due aree di rischio biologico prevalente. La prima riguarda l'esposizione umana per inalazione, in ambienti confinati e non, in cui ci sia stoccaggio e movimentazione di biomassa da avviare o in uscita al/dal processo anaerobico e si connota quindi come un rischio prevalentemente occupazionale. La seconda riguarda la valorizzazione del fango di digestione ed il *biohazard* connesso al riuso di scarti della digestione che può costituire un veicolo di contaminazione microbiologica soprattutto se utilizzati come fertilizzanti.

A tali problematiche tipiche della DA, si sono studiati aspetti peculiari della produzione del biopolimero. In particolare, nel progetto, si è data specifica attenzione a:

- Il *biohazard* connesso alla presenza di agenti biologici e polveri nelle diverse fasi dei bioprocessi sviluppati a partire da colture microbiche miste e da colture pure, inclusi MOGM, sia in ambienti aerobici che anaerobici.
- I potenziali impatti in termini di sostenibilità ambientale e sicurezza sul lavoro degli stadi di estrazione e purificazione dei prodotti (*downstream* del processo) di tipo chimico/fisico.

Valutazione dei rischi igienico-sanitari connessi alla digestione anaerobica da FORSU

Attività 2.1: Aspetti di igiene e sicurezza del lavoro nei bioprocessi innovativi proposti

Attività 2.2: Valutazioni igienico-sanitarie connesse al riuso del digestato come fertilizzante

I risultati precedentemente discussi si riferiscono ai campionamenti ed alle analisi condotte e occorre evidenziare che ci sono fattori limitanti quali:

- la stagionalità che produce sia mutevoli condizioni meteo-climatiche che una differente composizione della FORSU;
- la non costanza delle condizioni operative durante i campionamenti, in considerazione delle modifiche apportate per migliorare il processo dal punto di vista tecnologico.

È bene infatti ricordare che tutti i rilevamenti fatti sono da mettersi in relazione con una struttura su scala pilota, che ovviamente comporta soluzioni tecniche sostanzialmente diverse e meno consolidate per gli aspetti di igiene e sicurezza rispetto ad una struttura operante in piena scala.

Ciò premesso, sulla base delle evidenze riscontrate, è necessario rilevare che il ricevimento e la manipolazione della FORSU rappresentano senza dubbio una fonte di *biohazard*, potenzialmente elevato nel caso in cui avvenga una triturazione manuale della FORSU. Operazione questa non proponibile in un impianto reale. Occorre anche precisare che il *biohazard* associato a ricevimento e manipolazione della FORSU non è specifico della filiera del processo investigato, ma piuttosto connesso ad ogni processo di trasformazione che utilizzi FORSU come materiale di partenza.

Pur tenendo conto di un numero di campioni limitato, i dati sperimentali suggeriscono che il pretrattamento termico riduce a livelli prossimi allo zero il *biohazard* riconducibile alla matrice, mentre la spremitura/pressatura della FORSU non garantisce un abbattimento delle cariche microbiche rispetto alla triturazione. Nei campioni di FORSU da spremitura si evidenzia una maggiore concentrazione microbica sia per i patogeni che per gli indicatori misurati. Va ovviamente considerato che, in impianti industriali, un rifiuto spremuto sarebbe alimentato con modalità proprie di un flusso liquido e quindi all'interno di tubazioni e strutture sostanzialmente chiuse, riducendo in modo importante le possibilità di aerodispersione microbica.

Tale aspetto è rilevante anche in considerazione dell'auspicabile maggiore diffusione di cicli integrati di trattamento dei rifiuti urbani in cui la FORSU spremuta venga ad essere conferita in impianti di depurazione della acque reflue per la co-digestione di fanghi e FORSU.

La conduzione del processo in termofilia comporta una riduzione considerevole delle cariche microbiche rilevate, anche se permane una contaminazione da sporigeni, testimoniata dalla presenza dei generi *Clostridium* e *Bacillus* evidenziata durante il campionamento del bioaerosol nell'impianto oggetto dello studio.

I risultati ottenuti alla scala pilota hanno quindi importanza sostanziale nel definire il primo passaggio della valutazione del rischio (*hazard identification*) in termini di individuazione di contaminanti emessi che costituiscono un potenziale pericolo sia per la salute dei lavoratori che per la potenziale dispersione nell'ambiente. In particolare, dai risultati conseguiti, il genere *Bacillus* potrebbe essere rappresentativo quale indicatore della contaminazione connessa alle lavorazioni con FORSU.

Ai fini dello sviluppo di un processo industriale di valorizzazione della FORSU sono fondamentali le evidenze sperimentali emerse ed utilmente impiegabili nella definizione delle adeguate misure di contenimento e controllo del rischio biologico.

Alla luce delle evidenze emerse, nella piattaforma pilota sede della sperimentazione, sono state apportate modifiche sostanziali alla gestione della FORSU spremuta:

- è stato messo in funzione un nuovo sistema in cui sono incrementati i trasferimenti che avvengono con pompe e condotti chiusi (invece che manualmente);
- è stato inoltre implementato un nuovo fermentatore acido (di volume maggiore del precedente), il cui scarico è direttamente connesso, mediante tubazione, ad un filtro centrifugo da cui la fase liquida viene allontanata, sempre in connessione chiusa, verso un serbatoio intermedio da cui la

stessa viene poi prelevata, tramite pompa, e trasferita agli stadi successivi (attualmente il sistema aerobico per l'accumulo di PHA).

Infine, non potendo eliminare completamente il ricorso ad alcune operazioni di trasferimento manuale (per la natura stessa della scala pilota e la conseguente necessaria flessibilità), è in corso di valutazione la possibilità tecnica di introdurre sistemi protezione collettiva attraverso aspiratori localizzati. Ove ciò non risultasse possibile sarà comunque garantita la protezione degli operatori mediante messa a disposizione dei dispositivi di protezione individuali (DPI).

Attività 3.2: Verifica della stabilità della biocenosi del bioprocesso a colture miste e della potenziale selezione di agenti patogeni

Tale attività ha consentito di monitorare la composizione della biocenosi che viene selezionata nel processo innovativo di produzione di PHA. Non risultano studi su tale aspetto, né su scala di laboratorio e tanto meno su scala pilota.

Dalle indagini effettuate, i *Proteobacteria* rappresentano la componenti principale (80-90% delle OTU, *Operational Taxonomic Units*, totali). La biocenosi si modifica nel tempo con una prevalenza di specie appartenenti ai *Betaproteobacteria* (quali *Thauera*, *Acidovorax*, *Comamonas*, *Hydrogenophaga*, *Parapusillimonas*) e *Alphaproteobacteri* (*Amaricoccus*, *Brevundimonas* e *Meganema*).

Molte delle specie riscontrate sono state in precedenza descritte come microrganismi in grado di accumulare PHA in sistemi sequenziali quali quello adottato nell'ambito della sperimentazione o in sistemi in piena scala per il trattamento di acque di rifiuto. D'altra parte, l'alimentazione con FORSU pressata influenza notevolmente la composizione microbica della biomassa che risulta essere costituita da una grande varietà di specie PHA accumulanti note e, diversamente dalla fase di alimentazione con acetato, anche da specie solo parzialmente descritte in letteratura in quanto prodotte da precedenti analisi clonali o di piro-sequenziamento e senza alcun rappresentante isolato in coltura pura.

I risultati sono pertanto di interesse in quanto tutta la biomassa è risultata in grado di accumulare PHA e ciò conferma la presenza di nuovi ceppi PHA accumulanti che meritano un approfondimento ulteriore.

Infine, appare molto rilevante come l'analisi dei dati di piro-sequenziamento non abbia evidenziato la presenza nel fango biologico di specie patogene note o indicatori di contaminazione fecale.

Attività 3.4: Verifica sperimentale del confinamento del ceppo MOGM e del possibile rilascio ambientale di materiale genetico.

Questa attività sperimentale ha consentito di studiare il destino del MOGM simulando un rilascio accidentale dello stesso in un sistema di trattamento acque e andando a monitorare la sua persistenza nelle diverse sezioni d'impianto. Nello scenario peggiore, corrispondente ad un rilascio in impianto di piccole dimensioni, si è osservato un abbattimento significativo del MOGM e un rilascio pari al 7% del ceppo durante le prime sette ore di esercizio. Poiché il monitoraggio effettuato con saggi molecolari non permette di distinguere tra materiale genetico e cellule vive del MOGM, la frazione rilevata nell'effluente potrebbe comunque non esser vitale. Un ulteriore abbattimento fino a completa inattivazione, verosimilmente si avrebbe nello stadio di disinfezione a valle dell'impianto.

I dati sperimentali dimostrano una persistenza limitata del ceppo MOGM a seguito di rilascio accidentale in un impianto di trattamento acque reflue e nel contempo evidenziano la necessità di ulteriori indagini che permettano la distinzione tra materiale genetico e cellule vive, la cui quantificazione necessita di metodi microbiologici classici.

Attività 4.2: Aspetti di salute e sicurezza dei processi di estrazione

Nello studio delle alternative all'impiego di solventi clorurati i metodi estrattivi investigati su scala di laboratorio hanno permesso di trarre le seguenti conclusioni:

1) Utilizzo di soluzioni acide o basiche: tale approccio consente l'eliminazione completa di solventi tossici/infiammabili/esplosivi. Tuttavia esso comporta un aumento del *Chemical Inherently Safety Index* proposto da Heikkilä, anche se occorre rimarcare che tale indice si basa unicamente sui TLV che non tengono in considerazione tutti gli effetti sulla salute che la sostanza può esercitare. In attesa dello sviluppo di un indice di tossicità maggiormente rappresentativo delle classi di pericolo per gli effetti sulla salute, considerando che almeno una classe associata al cloroformio, la cancerogenicità, desta particolari preoccupazioni, si può comunque ritenere che l'uso di acido solforico e/o perossido di idrogeno sia da preferirsi rispetto al cloroformio. Ciò vale soprattutto avendo cura di utilizzare, per la costruzione delle apparecchiature, materiali che non presentino problemi di corrosione.

2) Estrazione mediante CO₂ in condizioni supercritiche: per le condizioni adottate nel corso delle presenti indagini, T= 50 °C e P= 200 atm, dal citato lavoro di Heikkilä si desume un *Process Inherent Safety Index* pari a 3 e quindi:

$$\text{Total Inherent Safety Index} = \text{Process Inherent Safety Index} = 3$$

Questo ultimo dato è da confrontarsi con i valori superiori che sono ottenuti nel caso di impiego del cloroformio (*Total Inherent Safety Index* = 4) o acetato di etile (*Total Inherent Safety Index* = 6)

Si precisa che negli ultimi due esempi citati il *Total Inherent Safety Index* è dovuto al contributo del *Chemical Inherent Safety Index* risultante dalle caratteristiche di infiammabilità/esplosività/tossicità del solvente considerato.

In conclusione va tenuto presente che tali aspetti sono stati studiati in via preliminare e saranno oggetto di approfondimento, anche alla luce delle più recenti disposizioni regolamentari in tema di agenti chimici (Regolamento (EC) No 1272/2008 su Classificazione, Etichettatura e Imballaggio di sostanze e miscele - Regolamento CLP). Tali disposizioni propongono specifici percorsi metodologici da applicare a sostanze e miscele per stabilire quale siano i rischi potenziali per la salute e la sicurezza umane e per l'ambiente ad esse associati.

C) ANALISI DI MERCATO

Lo studio condotto dal CRESME ha consentito, sulla base dell'analisi di mercato svolta e dello studio di *case studies*, di sintetizzare nell'articolazione *swot* opportunità e criticità funzionali allo sviluppo della DA di scarti nel mercato italiano (vedasi Tabella 42 nella sezione Obiettivo 5).

Nel 2016 il settore delle bioenergie, in base all'analisi svolta, sembrerebbe vivere una fase di transizione dopo la fase di crescita del periodo 2005-2013, trainata soprattutto dagli incentivi per la produzione di energie rinnovabili da biomasse da attività agricole e forestali, cui ha fatto seguito una fase di forte contrazione nel biennio 2014-2015. Il motore trainante della ripresa del settore per i prossimi anni potrebbe essere quello legato alla produzione di biometano da impianti di DA, spinti in primo luogo dagli incentivi di cui al DM del MISE del 5 dicembre 2013 (decreto biometano).

Le difficoltà del settore degli ultimi anni sono riscontrabili anche dai dati del GSE sugli investimenti in impianti a biogas. Nel 2014 gli investimenti totali nel comparto del biogas sarebbero pari a 943 milioni di euro con una leggera contrazione (-1,3%) rispetto ai 955 milioni del 2013, le unità di lavoro complessivamente create nell'anno sarebbero pari a 12.018 nel 2014 con un calo del 41,3% rispetto alle 20.463 del 2013. Nel comparto del biogas si rileva che la composizione degli investimenti, già dal 2013, vede la prevalenza della gestione e manutenzione (76%) aumentata nel 2014 (85%) rispetto alle nuove realizzazioni (24% nel 2013 e 15% nel 2014). Si nota la riduzione degli investimenti in nuovi impianti, passati, secondo GSE, da 233 a 144 milioni di euro, con un calo del 38,1%. CRESME ha sviluppato una stima ancora più negativa di quella presentata da GSE: partendo dal numero dei nuovi impianti di bioenergie (biogas, bioliquidi e biomasse) e dalla potenza produttiva

dei nuovi impianti (stimata da GSE), ipotizzando un costo di investimento medio ponderato. Dalla stima, emerge il crollo degli investimenti in bioenergie nel 2014 per poi riprendere a crescere nel biennio 2015-2016 ma attestandosi su livelli annui decisamente inferiori a quelli registrati tra il 2006 e il 2013.

Il crollo degli investimenti nel settore delle bioenergie è connesso alle criticità, dettagliate nell'analisi *swot* del CRESME, che presentano altre tipologie di bioenergie che minano l'immagine del settore e che portano alla diffusione di informazioni, in particolare attraverso internet, che "in realtà le biomasse sarebbero ben poco green". La produzione di riscaldamento degli ambienti civili da combustione di legna, riconducibile al successo delle stufe a pellet, presenta dimostrati rischi sanitari connessi alla produzione di polveri sottili ed idrocarburi policiclici aromatici (IPA), come il benzo(a)pirene, e contribuiscono ad alimentare il timore dei cittadini. A titolo indicativo si evidenzia che nel 2015 l'Istituto Superiore per la Prevenzione e Ricerca Ambientale (ISPRA) ha verificato che i livelli di benzo(a)pirene in atmosfera sono fortemente aumentati. La causa individuata è precisa: l'incremento del consumo delle biomasse, *in primis* la legna, che è stato spinto dalle incentivazioni previste per le fonti di energia rinnovabile. La combustione delle biomasse nel settore civile contribuisce ormai per i due terzi alle emissioni di IPA. Peraltro l'ISTAT ha certificato che nel 2014 il consumo di biomasse per riscaldamento in Italia è stato il doppio di quanto fosse stato stimato. Oltre il 12% della popolazione italiana è esposta a livelli di IPA superiori ai limiti di legge.

Tali dati ed informazioni non hanno praticamente nessuna rilevanza nel caso della produzione di biogas da DA; tuttavia è presumibile che possano avere comunque un effetto negativo sulla percezione sociale dell'intero comparto delle bioenergie (incluso il biogas), se non vengono poste in evidenza le ovvie e ampie differenze tra un sistema di produzione e l'altro.

La scarsa conoscenza tecnico-scientifica da parte dei cittadini e delle amministrazioni, può infatti generare dinamiche negative che interessano i diversi tipi di bioenergia ed apre un grande spazio per una importante azione di comunicazione, seria e scientifica, sui diversi livelli di pericolosità che caratterizzano le diverse tecnologie di produzione di energia da biomasse.