

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Ingegneria Civile, Chimica, Ambientale e dei Materiali

Ciclo XXXI

Settore Concorsuale: 03/D1

Settore Scientifico Disciplinare: CHIM/11

**STRATEGIE PER LA DIGESTIONE ANAEROBICA DEGLI OLI ALIMENTARI
ESAUSTI: MESSA A PUNTO DI UN REATTORE GAS-LIFT**

Presentata da: Francesca Fiume

Coordinatore Dottorato

Prof. Luca VITTUARI

Supervisore

Prof. Lorenzo BERTIN

Co-supervisore

Dr. Rosa MARCHETTI

Esame finale anno 2019

Non ho particolari talenti, sono soltanto appassionatamente curioso.

“Albert Einstein”

INDICE

1.	INTRODUZIONE.....	5
1.1	CARATTERISTICHE GENERALI DEI LIPIDI, DIFFERENZE TRA GRASSI E OLI	6
1.2	CARATTERISTICHE CHIMICO FISICHE DEI LIPIDI.....	7
1.3	Digestione anaerobica dei lipidi: OLI VS scarti GRASSI.....	7
1.4	OLIO ALIMENTARE ESAUSTO	9
1.4.1	QUANTITA' PRODOTTE	12
1.4.2	IMPATTO AMBIENTALE.....	14
1.4.3	SMALTIMENTO	14
1.4.4	UTILIZZI AD OGGI	16
1.4.5	POSSIBILI SBOCCHI FUTURI.....	18
1.4.6	BIODIESEL VS METANO, il biodiesel è davvero la soluzione?.....	19
1.4.7	PRODUZIONE DI METANO MEDIANTE DIGESTIONE ANAEROBICA DI LIPIDI. VANTAGGI E SVANTAGGI.....	21
1.5	DIGESTIONE ANAEROBICA DEI LIPIDI	23
1.5.1	REATTORI UTILIZZATI PER LA DIGESTIONE DEI LIPIDI	25
1.5.2	DALL'AIR-LIFT AL GAS-LIFT PER LA DIGESTIONE DEI LIPIDI.....	27
2.	OBIETTIVO DELLA RICERCA.....	30
3.	MATERIALI E METODI	32
3.1	SUBSTRATI	32
3.2	CONDIZIONI SPERIMENTALI	33
3.3	DISEGNI SPERIMENTALI	35
3.3.1	ESPERIMENTO "A": variazione del volume di idratazione.....	35
3.3.2	ESPERIMENTO "B": variazione dall'interfaccia a parità del rapporto OtoW.....	38
3.3.3	ESPERIMENTO "C": prova di emulsione con KOH	40
3.3.4	DISEGNO SPERIMENTALE "D": emulsione & variazione del volume di idratazione.....	41
3.3.5	ESPERIMENTO "E": prova SEPIOLITE, LIQUAME SUINO, pH.....	43
3.3.6	ESPERIMENTO "F": prova con oli alimentari esausti di diversa origine	45
3.3.7	ESPERIMENTO AIR-LIFT.....	46
3.3.8	ESPERIMENTO GAS-LIFT	50
3.4	PREPARAZIONE DELL'INOCULO	56
3.5	METODI D'ANALISI.....	57

3.6	ANALISI DEI DATI	59
4.	RISULTATI.....	61
4.1	ESPERIMENTO "A": variazione del volume di idratazione.....	61
4.2	ESPERIMENTO "B": variazione dell'interfaccia a parità del rapporto OtoW	64
4.3	ESPERIMENTO "C": prova di emulsione con KOH	66
4.4	ESPERIMENTO "D": Emulsione & Variazione del volume di idratazione.....	70
4.5	ESPERIMENTO "E": prova con sepiolite, liquame suino e pH.....	71
4.6	ESPERIMENTO "F": prova con oli alimentari esausti di diversa origine	73
4.7	ESPERIMENTO AIR-LIFT.....	77
4.8	ESPERIMENTO GAS-LIFT	80
5.	DISCUSSIONE	84
5.1	ESPERIMENTO "A": effetto della variazione dell'idratazione sulla DA del WCO.....	84
5.2	ESPERIMENTO "B": effetto dell'interfaccia sulla DA	86
5.3	ESPERIMENTO "C": effetto dell'emulsione/alcalinizzazione sulla DA	88
5.4	ESPERIMENTO "D": effetto emulsione a volumi di idratazione differenti	89
5.5	ESPERIMENTO "E": effetto SEPIOLITE, LIQUAME, PH	90
5.6	ESPERIMENTO "F": effetto della composizione del WCO sulla DA	92
5.7	ESPERIMENTO AIR-LIFT.....	93
5.8	ESPERIMENTO GAS-LIFT	94
	CONCLUSIONI	97
	RINGRAZIAMENTI	98
	BIBLIOGRAFIA	99

ABSTRACT

Waste cooking oils (WCO) can be re-used for biogas production. Fatty materials, in anaerobic digestion, have the highest theoretical yields. However, the anaerobic digestion of fat-containing waste is often prolonged in time and problematic. To date, WCOs are mainly used for biodiesel production. An alternative use could be the anaerobic digestion, both in mono digestion and in codigestion, with for example pig slurry. I evaluated the best strategies that can reduce the problems related to the use of this substrate, trying to focus the attention on the biophysical factors involved. The main purpose was to bring microorganisms closer to the substrate, working in a two-phase system represented by the WCO and the hydrating medium. The strategies evaluated included: the reduction of the volume of hydration, to increase the probability of contact between microorganisms and substrate; the emulsion, which favors the stability of the micelles of oil in water, and therefore the maintenance of a greater surface of attack of the lipids by the microorganisms; the codigestion and the use of minerals such as sepiolite, in the hypothesis that they can reduce the latency phase and considerably speed up the digestion of fats. I worked in batch systems generally of 100ml, in strict anaerobiosis, in static conditions. I designed and developed a Gas-lift anaerobic reactor for the digestion of exhausted oils that could bring microorganisms closer to the substrate through a pneumatic stirring, favoring a rapid digestion of the substrate. The idea was born from the use of an Air-lift reactor, for the decontamination of hydrocarbon-rich wastewater, which actually favored the contact between aerobic microorganisms (*Rhodococcus opacus*) and oily substrate. The results obtained encourage a specific approach to fat degradation, compared to the currently used processes such as the Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor (UASB) and the Continuous Stirred-Tank Reactor (CSTR).

Gli oli alimentari esausti (WCO) possono essere utilizzati per la produzione di biogas. I materiali grassi, in digestione anaerobica, hanno le più alte rese teoriche. Tuttavia, la digestione anaerobica dei rifiuti contenenti grassi è spesso prolungata nel tempo e problematica. Ad oggi i WCO vengono utilizzati principalmente per la produzione di biodiesel. Un utilizzo alternativo potrebbe essere la digestione anaerobica, sia in mono digestione che in codigestione, con ad esempio liquame suino. Ho valutato le strategie migliori che possano ridurre le problematiche legate all'utilizzo di tale substrato, cercando di focalizzare l'attenzione sui fattori biofisici coinvolti. Lo scopo principale è

stato quello di avvicinare i microrganismi al substrato, lavorando in un sistema bifasico rappresentato dal WCO e dal terreno d'idratazione. Le strategie valutate hanno riguardato: la riduzione del volume di idratazione, per aumentare la probabilità di incontro tra microrganismi e substrato; l'emulsione, che favorisce la stabilità delle micelle di olio in acqua, e quindi il mantenimento di una maggiore superficie di attacco dei lipidi da parte dei microrganismi; la codigestione e l'uso di minerali quali sepiolite, nell'ipotesi che possano ridurre la fase di latenza e velocizzare notevolmente la digestione dei grassi. Ho lavorato in sistemi batch generalmente da 100ml, in anaerobiosi stretta, in condizioni statiche. Ho progettato e messo a punto un reattore anaerobico Gas-lift per la digestione degli oli esausti, che potesse avvicinare i microrganismi al substrato mediante movimento pneumatico lieve, favorendo una rapida digestione del substrato. L'idea è nata dall'utilizzo di un reattore Air-lift, per la decontaminazione di acque reflue ricche di idrocarburi, che effettivamente favoriva il contatto tra microrganismi aerobici (*Rhodococcus opacus*) e substrato oleoso. I risultati ottenuti incoraggiano un approccio specifico per la degradazione dei grassi, rispetto ai processi correntemente in uso come UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor) e CSTR (Continuous Stirred-Tank Reactor).

1. INTRODUZIONE

La valorizzazione degli scarti alimentari negli ultimi anni ha riscosso grande attenzione, in particolare i rifiuti organici possono essere utilizzati in ottica di bioraffineria o biotecnologia bianca. Per bioraffineria si intende il recupero degli scarti per la produzione di molecole ad elevato valore aggiunto, incluso carrier energetici (fuels: H₂, CH₄). Nel caso dei liquami, per esempio, si può ottenere biogas dal liquame, e digestato come fertilizzante. Ultimamente per il liquame ci si allarga anche ad altre trasformazioni. Nel caso degli oli alimentari esausti (**WCO** = waste cooking oils), vengono tipicamente utilizzati per il biodiesel, ma un altro utilizzo potrebbe essere il biogas. La digestione anaerobica (DA) dei lipidi ed in particolare degli oli vegetali è un settore particolare, data la differente natura chimica del substrato da digerire insolubile in ambiente acquoso. La scelta di utilizzare l'olio alimentare esausto come substrato che rappresentasse la categoria dei lipidi, è dovuta al fatto che per questo tipo di substrato non è ancora prevista, oltre al biodiesel (che non è più visto così sostenibile), una via alternativa di utilizzo. Rappresenta un substrato con elevate potenzialità, le cui vie di recupero sono abbastanza definite, non ha stagionalità, ma è un rifiuto sempre prodotto e il cui smaltimento dà non pochi problemi dal punto di vista ambientale. La DA dei lipidi presenta in generale una serie di problematiche che tendono a prolungare notevolmente i tempi di digestione, nonostante le rese in termini di produzione di metano siano le più alte rispetto agli altri substrati (proteine e carboidrati). Lo scopo del mio lavoro è stato quello di cercare di ridurre i lunghi tempi di digestione, partendo dalla considerazione che i lipidi in ambiente acquoso formano un ambiente bifasico, e i microrganismi si troveranno nella parte acquosa, quindi bisognava ricercare delle strategie per mettere in contatto i due ambienti e facilitare la digestione di tale substrato.

Le strategie prese in esame sono state molteplici, passando dall'emulsione delle goccioline di grasso, all'utilizzo di materiali che portino nella parte acquosa i lipidi, alla riduzione del volume di idratazione per ridurre la distanza microorganismi-olio, fino alla messa a punto di un reattore Gas-lift. Tale reattore sfrutta l'agitazione pneumatica per facilitare la DA dei lipidi, mettendo in contatto i microrganismi con il substrato, che per sua natura tende a galleggiare in superficie. L'idea di mettere a punto questo tipo di reattore, è nata prendendo spunto dalla mia attività in Portogallo, dove ho messo a confronto due tipi di reattori, Air-lift e SBR per la conversione di idrocarburi in trigliceridi, da parte di *Rhodococcus opacus*.

Ho affrontato la questione "digestione anaerobica lipidi" pensando "alternativamente", a differenza di chi si è posto il problema di analizzare le solite problematiche relative alla digestione dei grassi, ormai ben note a chi del settore.

1.1 CARATTERISTICHE GENERALI DEI LIPIDI, DIFFERENZE TRA GRASSI E OLI

I lipidi sono un gruppo eterogeneo di composti chimici che hanno come caratteristica comune l'insolubilità in acqua.

Le molecole lipidiche sono gliceridi (grassi e oli), sfingolipidi, fosfolipidi, cere, steroidi. I grassi e gli oli sono composti derivati dagli acidi grassi, che derivano dagli idrocarburi, quasi completamente ridotti come gli idrocarburi negli oli fossili.

Gli acidi grassi sono acidi carbossilici con una catena idrocarburica composta da 4 a 36 atomi di carbonio, tale catena può essere completamente satura o possono essere presenti doppi legami, per cui si dice insaturo. Le proprietà fisiche degli acidi grassi e dei composti che li contengono sono influenzate sia dalla lunghezza della catena acilica, che dalla presenza e dal numero di doppi legami. Più è lunga la catena e minore è il numero di doppi legami, tanto maggiore è l'insolubilità

in acqua. Gli acidi grassi insaturi, hanno punti di fusione più bassi degli analoghi acidi grassi saturi, aventi medesima lunghezza. In generale composti ricchi di acidi grassi insaturi a temperatura ambiente avranno una consistenza liquida oleosa, al contrario se sono ricchi di saturi, una consistenza cerosa.

[1]

1.2 CARATTERISTICHE CHIMICO FISICHE DEI LIPIDI

La proprietà tipica dei lipidi è appunto l'insolubilità in acqua, per cui in ambiente acquoso tenderanno a formare un **sistema bifasico**, con la porzione lipidica che galleggia sulla parte acquosa. E' proprio questo l'assunto importante da cui ha preso spunto il mio lavoro di tesi, i lipidi sono un substrato per la digestione anaerobica completamente diverso dagli altri substrati solubili in acqua, per cui le strategie da adottare per favorirne la digestione saranno completamente differenti. Bisogna cercare di aumentare la superficie di contatto tra la parte oleosa, che è il nostro substrato energetico, e la parte acquosa che è invece costituita da inoculo, deputato alla digestione del substrato, e il terreno d'idratazione. Se i due sistemi non vengono in contatto non vi sarà alcuna digestione, invece favorendone una maggiore interazione, mediante differenti strategie, si potrà migliorare la digestione.

1.3 DIGESTIONE ANAEROBICA DEI LIPIDI: OLI VS SCARTI GRASSI

Ad oggi possibili impieghi per la digestione anaerobica dei lipidi (nella forma oleosa o grassa) potrebbero essere la digestione di oli esausti vegetali o di grassi solidi da cascami di macello.

Per quanto riguarda la digestione di cascami di macello, Il Regolamento CE 1069/2009 suddivide i sottoprodotti di origine animale in tre categorie (I, II, III), in base alla relativa pericolosità. Esso individua per ciascuna categoria di scarto le tipologie di impiego e trattamento consentite. I sottoprodotti di origine animale avviabili a digestione anaerobica risultano quelli rientranti nelle

categorie II e III. Il contenuto della categoria I (Materiale specifico a rischio MRS) è destinato unicamente all'incenerimento, quello relativo alla categoria II (contenuto del tubo digerente e stallatico) può essere, a determinate condizioni, utilizzato in impianti per la produzione di biogas o per lo spargimento sui terreni agricoli previa maturazione in concimaia. La categoria III (ossa, grasso, sangue e sequestri ispettivi) è destinata ad impianti di incenerimento oppure di trasformazione dove è sottoposta a pastorizzazione a 70 °C per almeno 60 minuti [2].

Un esempio è il progetto europeo **ADAW** (Saponification pre-treatment and biosensors based control system for slaughterhouse waste anaerobic digestion improvement), nel quale trovano impiego tali scarti di categoria II e III. Tale progetto ha avuto l'intento di ottimizzare la produzione di biogas da scarti grassi della lavorazione della carne di macello. Uno scarto ricco di lipidi può influire negativamente sulla crescita microbica e quindi sulla digestione anaerobica. Per ovviare i problemi legati alla digestione, si sono effettuati dei trattamenti preliminari, come un trattamento termo-chimico e dispersione ultrasonica per migliorare il contatto tra substrati e microrganismi. [3]

Per quanto riguarda gli oli, Ci sono 2 consorzi a livello nazionale per il recupero e lo smaltimento, **COOU** e **CONOE**.

Il **COOU** è il consorzio obbligatorio degli oli minerali usati (ente privato iscrizione obbligatoria per aziende che immettono lubrificanti), mentre il **CONOE** è il consorzio nazionale di raccolta e trattamento degli oli e dei grassi vegetali e animali esausti.

Fanno parte del COOU 72 aziende (di cui 3 aziende sono in Emilia), ha un alto rendimento ed in Italia è leader per il recupero degli oli minerali esausti che si aggira intorno al 90%. In generale la maggior parte viene rigenerato per ottenere olio base (gasolio, combustibile, bitume), una

quantità minore viene utilizzata come combustibile per cementifici, oppure va a termodistruzione se inquinato ad esempio da cloro o PCB.

Partecipano al CONOE tutte le associazioni in rappresentanza di produttori di oli esausti e oli alimentari, aziende di raccolta e stoccaggio, e di rigenerazione del rifiuto in materie prime secondarie. E' un ente privato senza scopo di lucro a cui viene attribuita la responsabilità per la gestione di tali rifiuti su tutto il territorio nazionale, al fine di promuovere il recupero per limitare l'inquinamento e i rischi per la salute [4].

Il progetto **Recoil** è uno degli esempi per la sensibilizzazione dei cittadini e lo studio di una raccolta sistemica da tale rifiuto, proveniente per lo più dal consumo casalingo, per una conversione in carburante dell'olio raccolto.

Il discorso degli oli vegetali merita un'analisi più approfondita, in quanto per il mio lavoro di tesi, ho usato principalmente come substrato per la DA l'olio alimentare esausto, proveniente dall'azienda Rimondi Paolo S.r.l. di Bologna, azienda che fa parte del CONOE e si occupa del recupero e stoccaggio degli oli vegetali di risulta da privati cittadini, aziende e attività artigianali locali.

1.4 OLIO ALIMENTARE ESAUSTO

Gli oli alimentari esausti (WCO) sono quelli che residuano dalla frittura degli oli e grassi vegetali ed animali.

Il WCO raccolto viene stoccato in grossi contenitori e lasciato decantare per un certo periodo al fine di far depositare sul fondo la componente idrosolubile, data dai residui di cibo, che successivamente viene separata dalla parte idrofobica, rappresentata dalla componente lipidica dell'olio.

Le caratteristiche standard stabilite dal CONOE prevedono:

- MIU ossia l'indice di umidità, insaponificabilità e prodotti insolubili, con valore massimo accettabile del 3%;
- Acidità massima 5%;
- Assenza corpi estranei.

Gli oli di risulta utilizzati per i diversi esperimenti, sono una miscela di oli vegetali, la cui composizione chimica può variare molto, sulla base delle modalità di recupero da differenti settori, dal domestico, alla ristorazione, fino all'azienda alimentare (vedi **Fig. 1** e **2**). La caratteristica comune è rappresentata dall'idrofobicità della componente lipidica.



Fig. 1. WCO recuperato dall'azienda RIMONDI, proveniente da azienda di frittura patatine, ricco in girasole.



Fig. 2. WCO recuperato dall'azienda Rimondi, proveniente dalla ristorazione collettiva, ricco in palma, girasole e colza.

L'olio vegetale è una miscela di glicerolo, acidi grassi liberi, mono, di e trigliceridi, principalmente, e in minor quantità di lipoproteine, fosfatiditi, terpeni, glicolipidi, cere e altri composti. Gli oli vegetali non sono tutti uguali, ogni specie oleaginosa produce un olio con caratteristiche specifiche, alcune delle quali ne influenzano le modalità di utilizzo. Ad esempio i più utilizzati nella ristorazione sono quello di girasole, di palma e di oliva. L'olio di girasole è caratterizzato da

un'elevata percentuale di grassi polinsaturi, in particolare l'acido linoleico fino al 75%. L'olio di palma è al contrario ricco in grassi saturi a catena lunga, come il palmitico. l'olio di oliva è caratterizzato da un elevato contenuto in monoinsaturi.

Fatty acids composition of vegetable oils ¹.

FAs [%]	SAF	GRP	SIL	HMP	SFL	WHG	PMS	SES	RB	ALM	RPS	PNT	OL	COC
C6:0	nd	0.52												
C8:0	nd	0.01	nd	7.6										
C10:0	nd	0.01	nd	nd	5.5									
C12:0	nd	0.01	0.01	nd	0.02	0.07	nd	nd	nd	0.09	nd	nd	nd	47.7
C14:0	0.10	0.05	0.09	0.07	0.09	nd	0.17	nd	0.39	0.07	nd	0.04	nd	19.9
C15:0	nd	0.01	0.02	nd	nd	0.04	nd	nd	nd	nd	0.02	nd	nd	nd
C16:0	6.7	6.6	7.9	6.4	6.2	17.4	13.1	9.7	20.0	6.8	4.6	7.5	16.5	nd
C17:0	0.04	0.06	0.06	0.05	0.02	0.03	0.13	nd	nd	0.05	0.04	0.07	nd	nd
C18:0	2.4	3.5	4.5	2.6	2.8	0.7	5.7	6.5	2.1	2.3	1.7	2.1	2.3	2.7
C20:0	nd	0.16	2.6	nd	0.21	nd	0.47	0.63	nd	0.09	nd	1.01	0.43	nd
C22:0	nd	0.14	nd	nd	nd	nd	0.15	nd						
C16:1 (n-7)	0.08	0.08	0.05	0.11	0.12	0.21	0.12	0.11	0.19	0.53	0.21	0.07	1.8	nd
C17:1 (n-7)	nd	nd	0.03	nd										
C18:1cis (n-9)	11.5	14.3	20.4	11.5	28.0	12.7	24.9	41.5	42.7	67.2	63.3	71.1	66.4	6.2
C18:1trans (n-9)	nd	0.14	nd	nd	nd									
C20:1(n-9)	nd	0.40	0.15	16.5	0.18	7.91	1.08	0.32	1.11	0.16	9.1	nd	0.30	nd
C18:2cis (n-6)	79.0	74.7	63.3	59.4	62.2	59.7	54.2	40.9	33.1	22.8	19.6	18.2	16.4	1.6
C18:3 (n-3)	0.15	0.15	0.88	0.36	0.16	1.2	0.12	0.21	0.45	nd	1.2	nd	1.6	nd
C18:3 (n-6)	nd	nd	nd	3.0	nd									

Tabella 1. I dati sono espressi come percentuali di esteri metilici di acidi grassi totali (FAME); nd significa che gli acidi grassi non sono stati determinati. Abbreviazioni dei campioni significano: SAF-cartamo, GRP- uva, SIL-silybum marianum, HMP-canapa, SFL-girasole, WHG-germe di grano, PMS-semi di zucca, SES-sesamo, RB-crusca di riso, ALM-mandorla, RPS -Olio di colza, PNT- arachidi, OL-olio di oliva e COC-olio di cocco. [5]

I WCO, ottenuti da un processo di frittura, dal punto di vista chimico-fisico sono diversi dall'olio vegetale da cui derivano, (imbrunimento, aumento della viscosità, aumento della tendenza a formare schiuma, abbassamento del punto di fumo) però ogni tipo di olio reagisce diversamente alla frittura, sulla base soprattutto del tipo di acidi grassi presenti e del grado di insaturazione, infatti per esempio il più stabile è l'olio di oliva[6].

Dall'olio di girasole, si possono ottenere una serie di metaboliti tossici, che a loro volta possono influire negativamente anche sulla digestione anaerobica. Quest'olio è ricco in linolenico, che tende per effetto delle alte temperature, a formare il 4-idrossinonenale (C₉H₁₆O₂), aldeide prodotta dalla perossidazione lipidica, altamente tossica, e potrebbe essere responsabile di gravi malattie. Dalla disidratazione del glicerolo, reazione che si presenta durante la frittura oltre il punto di fumo dell'olio utilizzato, viene prodotta anche l'acroleina (anche 2-propenale, 2-propen-1-ale, acrilaldeide o semplicemente propenale) è una sostanza tossica per il fegato e irritante per la mucosa gastrica.

L'acroleina e i suoi derivati, si è visto in differenti studi che può ad esempio influire negativamente sulla digestione anaerobica [7].

1.4.1 QUANTITA' PRODOTTE

I paesi maggiori consumatori di oli vegetali, saranno anche i maggiori produttori di oli di risulta. Ci sono tre settori principali che producono WCO: domestico, ristorazione e aziendale.

In Europa il settore domestico e quello della ristorazione sono le principali fonti di oli alimentari esausti e la quantità è in aumento nel corso degli anni [8]. I principali produttori di oli esausti sono la Spagna, la Germania e il Portogallo.

Il consumo di oli alimentari in Italia è di circa 1.400.000 tonnellate di cui circa il 20% (280.000 ton) diventa esausto. Gli oli residui dalla ristorazione sono 60.000 tonnellate annue, di cui 45.000 tonnellate vengono raccolte. Gli oli della utenza domestica sono 150.000 tonnellate. Gli oli derivanti dalla industria alimentare sono all'incirca 50.000 tonnellate. Per cui la produzione di oli esausti nel settore aziendale e della ristorazione si aggira intorno a 100000 tonnellate, il 36% del totale, mentre il restante 64% deriva dalle attività domestiche [4]. È evidente il grosso potenziale del settore domestico, la cui raccolta stenta ancora a decollare poiché implica il coinvolgimento nell'iniziativa dei Comuni Italiani e di 22 milioni di famiglie.



Fig. 3. Andamento della raccolta degli oli vegetali in Italia dal 2010 al 2015 [4]

Date le quantità notevoli prodotte e i problemi legati all'inquinamento dovuto al cattivo smaltimento di tali oli, è importante adottare strategie che possano da un lato, favorire un corretto smaltimento del rifiuto e dall'altro riescano a convertirlo in prodotto per la produzione

energetica (dato l'elevato potere energetico), dal quale ne deriverebbe un doppio guadagno in termini di sostenibilità ed inquinamento.

1.4.2 IMPATTO AMBIENTALE

Gli oli esausti sono rifiuti speciali non pericolosi (codice CER 200125: "oli e grassi commestibili"). Pur non essendo pericoloso, ha una serie di problematiche relative all'inquinamento ambientale, in quanto si stima che un chilo di olio è sufficiente per coprire sotto forma di pellicola una superficie di 1000 metri quadrati. Così facendo ostacola lo scambio dell'ossigeno fra aria e acqua provocando danno all'ecosistema, contaminando i bacini e corsi d'acqua, compromettendo l'esistenza della flora e della fauna e portando al soffocamento degli organismi viventi. Se l'olio vegetale raggiunge le falde acquifere, le rende inutilizzabili in quanto un litro d'olio mescolato a un milione di litri d'acqua non la inquina, ma la rende non potabile, in quanto ne altera il gusto. Gli oli vegetali esausti possono ricoprire le superfici di organismi viventi, analogamente agli oli sintetici e ai prodotti petroliferi versati in ambienti acquatici. In molti casi gli oli vegetali esausti si comportano in modo simile agli oli minerali, ma è più difficile valutarne le conseguenze al momento, in quanto meno studiati. Il costo di questo danno ambientale è globalmente valutabile in oltre 1 milione di euro annui, mentre i danni prodotti dalla cattiva gestione dell'olio vegetale esausto si aggirano intorno ai 16 milioni di euro [9] [10] [11].

1.4.3 SMALTIMENTO

Gli oli vegetali per essere smaltiti vengono recuperati dai diversi settori, utilizzando differenti modalità di recupero, che cambiano in base alle modalità di raccolta e stoccaggio dell'azienda deputata per rivestire tale ruolo in determinata area geografica.



Fig. 4. Contenitori per raccolta e stoccaggio olio esausto Rimondi Paolo Srl, differenti tipi di contenitori utilizzati per il recupero di olio esausto: dal settore domestico OlivBox200 (in giallo), fusto e barili per il settore della ristorazione e quello industriale.

L'olio vegetale una volta **stoccato** subirà un trattamento di **filtrazione** e **decantazione**, ossia la rimozione di eventuali residui di cibo e l'abbassamento del miu entro il 3% attraverso la rimozione dell'acqua, sulla base dei valori accettabili dal consorzio e l'eliminazione di corpi estranei. In base agli usi dell'olio, verrà eseguito un trattamento di winterizzazione o metilazione. La **winterizzazione**, è l'operazione di raffreddamento per abbassare il punto di congelamento dell'olio. Mentre la **metilazione** è una esterificazione, nel caso della produzione di biodisel.



Fig. 5. Materiale residuo dopo trattamento di filtrazione e decantazione del WCO, nell'azienda Rimondi.

1.4.4 UTILIZZI AD OGGI

Gli oli vegetali esausti possono essere recuperati in molteplici processi e applicazioni: tal quali possono essere utilizzati come sorgente di energia rinnovabile in impianti di **co-generazione**; possono essere trasformati in **biolubrificanti** adatti all'utilizzo in macchine agricole o nautiche, nonché a prodotti per la **cosmesi**, saponi industriali, inchiostri, grassi per la concia, cere per auto.

Inoltre, un rifiuto per poter essere utilizzato successivamente alla sua raccolta, deve rientrare in determinate categorie oppure diventare un "non rifiuto". Potrebbe essere utilizzato in **un impianto a biomassa**, ma per questo dovrebbe essere incluso nell'elenco **sottoprodotti** utilizzabili negli impianti a biomasse e **biogas** (DM 06/07/2012); ad oggi l'olio esausto non è presente in questo elenco. Se un rifiuto cessa di essere tale diventa un "non rifiuto", cioè materie prime secondarie o sottoprodotti, che godono di un trattamento normativo più favorevole [12].



Fig. 6. Destinazione e recupero degli oli vegetali esausti raccolti dal CONOE nel 2015

Negli ultimi anni il principale mercato di sbocco per il recupero di questo rifiuto ha riguardato l'utilizzo come materia prima seconda per la produzione di **biodiesel**: un combustibile vegetale non tossico e completamente biodegradabile che può essere utilizzato come carburante per autotrazione in sostituzione o miscelazione di carburanti di origine fossile, riducendo il contributo di emissioni di CO₂ nel settore dei trasporti. Nel sistema CONOE circa l'85% degli oli vegetali esausti viene avviato a produzione di biodiesel [13].

1.4.5 POSSIBILI SBOCCHI FUTURI

L'Eni ha sottoscritto un accordo con il CONOE, per favorire e incrementare la raccolta degli oli vegetali che alimenteranno la bioraffineria Eni di Venezia e, dal 2018, quella di Gela. il CONOE tramite questo protocollo, si impegna ad inviare l'olio esausto recuperato dalle aziende facenti parte del consorzio ad Eni, per essere immesso negli impianti di bioraffineria di Venezia. Questo è il primo esempio al mondo di bioraffineria, dalla conversione di una raffineria convenzionale, per ottenere biocarburante di alta qualità da materie prime di origine biologica. L'accordo si impegna anche ad incrementare i volumi di olio raccolti, soprattutto quelli prodotti a livello domestico, che ad oggi sono quasi interamente dispersi e rappresentano circa il 64% dell'olio esausto, tutto ciò mediante accordi con le Pubbliche Amministrazioni locali e le aziende pubbliche di raccolta rifiuti [14].

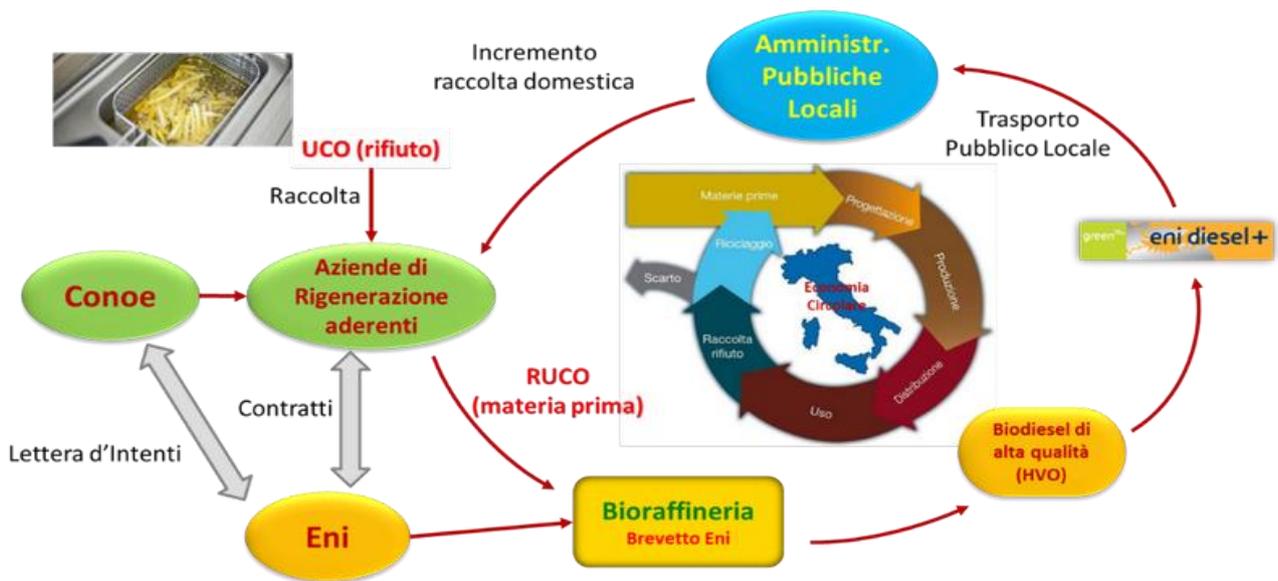


Fig. 7. Esempio di recupero di olio alimentare esausto (Conoe) per bioraffineria (Eni) [15]

Un altro utilizzo degli oli raccolti dal CONOE potrebbe essere la produzione di **metano** in impianti di codigestione con ad esempio rifiuti zootecnici. Il biodiesel è una risorsa, ma bisogna prevedere degli sviluppi energetici alternativi, date le alte rese energetiche nella produzione di metano dell'olio. Pur avendo rese molto alte, al momento la produzione di metano esclusivamente da oli stenta a partire. Questo perché Ci sono una serie di ostacoli legati alle caratteristiche chimico fisiche di tale substrato, che si comporta in maniera completamente differente dagli altri substrati idrofili.

Ostacoli che ho cercato di risolvere grazie al mio lavoro di ricerca, muovendomi a piccoli passi nella comprensione della natura del substrato a disposizione, fino alla ricerca di una serie di strategie semplici ed efficaci, che favorendo il contatto tra microrganismi ed olio, possano ridurre notevolmente il problema maggiore della digestione dei grassi, ossia i lunghi tempi di digestione che oscillano intorno ai tre mesi con rese però dell'ordine di 900ml di metano da 1grammo di olio esausto [16].

1.4.6 BIODIESEL VS METANO, IL BIODIESEL È DAVVERO LA SOLUZIONE?

Il biodiesel è ottenuto per transesterificazione di oli vegetali (in genere colza o girasole) con alcol etilico o alcol metilico. E` un carburante come il gasolio, ma è ottenuto dall'olio vegetale e non dalla distillazione frazionata del petrolio grezzo.

Poiché le proprietà chiave del biodiesel sono paragonabili a quelle del gasolio, possono essere utilizzate in tutti i motori diesel con poche o anche senza modifiche, da solo o in miscela con diesel convenzionale o a basso tenore di zolfo [17]. Gli svantaggi del biodiesel rispetto al diesel sono: il minor contenuto energetico, la sua maggiore viscosità, il più alto punto di intorbidimento e di scorrimento, le maggiori emissioni di ossido di azoto (NOx), velocità e potenza del motore

inferiori, coking dell'iniettore, compatibilità del motore, prezzo elevato e maggiore usura del motore [18].

Biodiesel from Vegetable oil	Kinematic Viscosity mm ² /s	Cetane no:	Heating value MJ/kg	Flash Point °C	Density kg/l
Peanut	4.9	54	33.6	176	0.883
Soybean	4.5	45	33.5	178	0.885
Babassu	3.6	63	31.8	127	0.875
Palm	5.7	62	33.5	164	0.880
Sunflower	4.6	49	33.5	183	0.860
Diesel	3.06	50	43.8	76	0.855
B20 (20%blend)	3.2	51	43.2	128	0.859

Tabella 2. Caratteristiche approssimative del biodiesel, derivante da oli vegetali di diversa natura, correlate all'infiammabilità [18].

Secondo l'Unione Europea, bisogna considerare gli effetti indiretti causati dalla coltura e dall'uso dei biocarburanti. L'utilizzo del biodiesel ha delle conseguenze negative dal punto di vista socio-ambientale, come ad esempio l'uso di terre coltivabili, a fini non alimentari, l'innalzamento del prezzo delle materie prime soprattutto nei paesi più poveri. Se poi si considera anche una riduzione della biodiversità, nel caso di coltivazioni monocolturali, con riduzione della biodiversità. Un'alternativa all'utilizzo dell'olio alimentare esausto, oltre che la produzione di biodiesel, potrebbe essere la digestione anaerobica, con produzione di biogas, con il vantaggio di ottenere energia pulita e utilizzare degli scarti che verrebbero altrimenti considerati un rifiuto problematico da smaltire. Inoltre ciò potrebbe portare ad una riduzione degli impianti a biogas, date le alte rese energetiche dei lipidi.

I benefici del biogas sono generalmente simili a quelli del gas naturale [19], che a sua volta è preferito rispetto al diesel e quindi anche al biodiesel, per quanto detto sopra.

Pollutant	Emission (g/km)		
	Diesel	Natural Gas	Biogas
Particulate matter	0.1	0.022	0.015
NO _x	9.73	1.1	5.44
Carbon monoxide (CO)	0.2	0.4	0.08
Unburned Hydrocarbons (HC)	0.4	0.6	0.35
CO ₂	1053	524	223

Tabella 3. Riduzioni degli inquinamenti dovute al biogas utilizzato come carburante per veicoli, rispetto al diesel e al gas naturale [18].

1.4.7 PRODUZIONE DI METANO MEDIANTE DIGESTIONE ANAEROBICA DI LIPIDI. VANTAGGI E SVANTAGGI

L'utilizzo principale ad oggi dell'WCO è la produzione del biodiesel [20].

In Italia, l'85% viene utilizzato per la produzione di Biodiesel, mentre il 5% per la produzione di lubrificanti e solo il 10% per altri usi inclusi la combustione diretta per la produzione di energia [4].

Un utilizzo alternativo dell'olio alimentare esausto potrebbe essere la digestione anaerobica, un processo che determina la produzione di Biogas, costituito principalmente da metano, anidride carbonica e tracce di altri gas contaminanti. I lipidi sono un substrato ideale per la digestione anaerobica, in quanto hanno le più alte rese teoriche rispetto agli altri substrati idrofili generalmente utilizzati in digestione anaerobica. Infatti la loro degradazione produce 0.99L di CH_4g^{-1} di lipidi [21]. Sono state misurate rese di metano superiori a 650-670 ml CH_4 g solidi volatili (VS) per digestione anaerobica di oli di risulta [22], [23]. La produzione di biodiesel da oli alimentari esausti è più sostenibile rispetto all'utilizzo di coltivazioni dedicate [24], ma la produzione di biogas da oli alimentari esausti è dal punto di vista ambientale più sostenibile rispetto al suo utilizzo per biodiesel, in quanto produce inferiori quantità di CO_2 , NO_x e particolati [19].

Ci sono una serie di problemi legati all'utilizzo dei lipidi per la digestione anaerobica, ben noti agli addetti ai lavori ormai, sulla quale però ci si può lavorare per riuscire a sfruttare al meglio questo substrato con un grande potenziale. I tempi di digestione sono notevolmente più lunghi rispetto ai substrati idrofili. In particolare, la maggior parte del tempo è richiesto nelle fasi iniziali, in quanto l'utilizzo da parte dei microrganismi dei substrati ricchi in lipidi è più complesso. Neves *et al* [25], hanno dimostrato come utilizzando scarti di ristorante ricchi in lipidi, avevano tempi di digestione molto più lunghi rispetto agli altri scarti, soprattutto nella parte iniziale della digestione e una parte del materiale restava non decomposto.

Un altro aspetto importante è legato alla tossicità data dall'accumulo degli acidi grassi a lunga catena (LCFA) [26]. Si pensava che questa tossicità fosse irreversibile, in realtà si è visto che tale tossicità è reversibile ed è più legata ad un problema fisico di assorbimento dei lipidi da parte delle cellule, che metabolico, questo apre nuovi scenari. [27], [28].

Un altro problema è la formazione della schiuma che incide negativamente sulla digestione anaerobica dei lipidi [29], dipende dalla presenza dell'agitazione e di sostanze tensioattive che si formano dalla degradazione dei grassi e tutto ciò influisce negativamente sulla digestione, causando ulteriori problemi operativi.

I problemi legati alla digestione dei lipidi possono essere in parte o completamente risolti se si riescono ad utilizzare delle strategie che possano limitare gli effetti negativi, per poter sfruttare al meglio questo substrato.

1.5 DIGESTIONE ANAEROBICA DEI LIPIDI

La digestione anaerobica in generale è la degradazione della sostanza organica da parte di microrganismi in anaerobiosi, che dà come prodotto finale il biogas, composto prevalentemente da metano e anidride carbonica.

Il processo di digestione anaerobica può suddividersi in 4 fasi di digestione che, comunque, sono contemporaneamente presenti nei reattori: idrolisi, acidogenesi, acetogenesi, metanogenesi. Ogni stadio comprende differenti tappe operate mediante diverse popolazioni batteriche: i batteri idrolitico-fermentativi; i batteri acidogenici; i batteri acetogenici; i batteri solfato-riduttori; i batteri nitrato-riduttori; i batteri metanogeni, come mostrato nella **Fig. 8**.

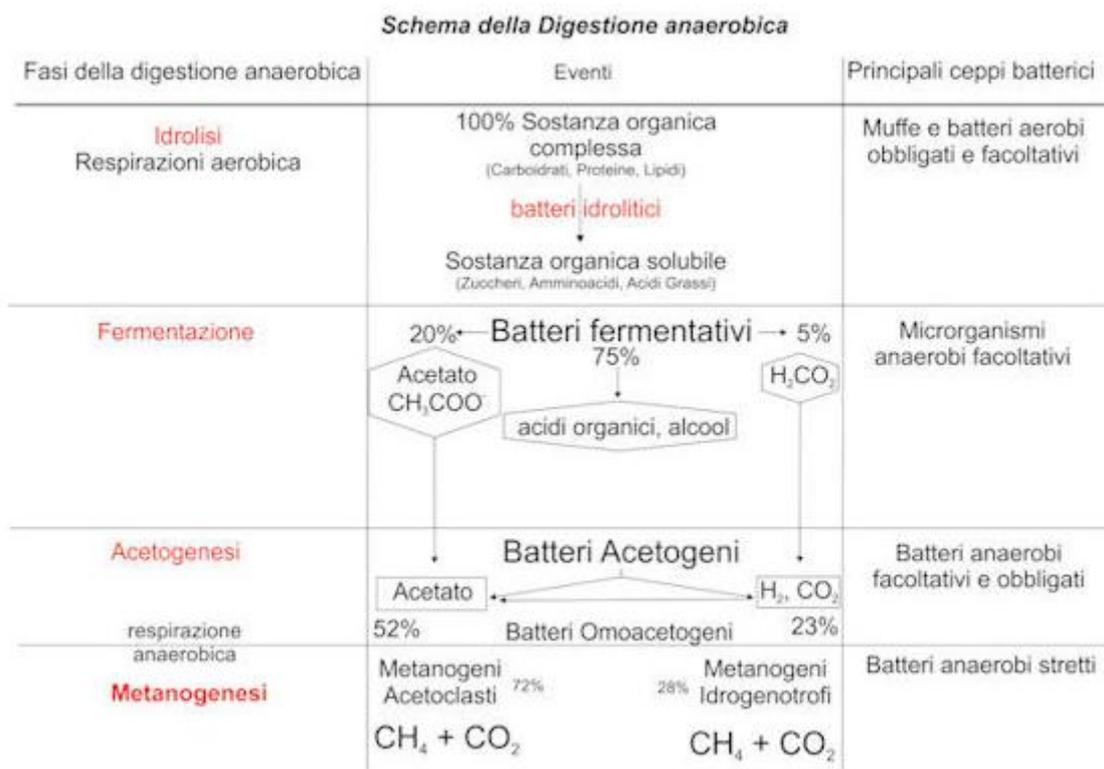


Fig. 8. Schematizzazione della digestione anaerobica

Tali differenti tipologie di microrganismi sono legate tra loro da un'efficiente relazione di simbiosi (cooperazione di organismi che dipendono l'uno dall'altro). Questa cooperazione è giustificata

dalla bassa resa energetica della metanogenesi rispetto per esempio ad una degradazione aerobica. Inizialmente, quando il processo è avviato per la prima volta, i batteri aerobi procedono alle reazioni di idrolisi, fermentazione con consumo dell'ossigeno presente. terminate queste fasi i batteri aerobici muoiono e si inizia la fase anaerobica vera e propria. In un primo tempo si riproducono i batteri acido-formanti che producono soprattutto acido acetico, formico e i loro sali insieme ad ulteriore anidride carbonica e a un certo quantitativo di idrogeno. Man mano che il substrato si riduce, la popolazione dei batteri aceto-produttori si riduce e cominciano ad aumentare i batteri metanogeni che trasformano i prodotti del metabolismo degli acetogeni in Metano, CO₂ e digestato. I batteri acidi producono il nutrimento per i batteri metanogeni, mentre i metanogeni, eliminando i prodotti di scarto degli acidogenici, mantengono il giusto livello di "acidità" altrimenti gli acidogenici morirebbero per eccesso dei propri scarti. Attualmente sono sconosciuti sia la maggior parte dei microbi coinvolti nel processo di digestione che il ruolo da essi ricoperto. Argomenti come: la composizione e le attività delle comunità microbiche in relazione ai substrati utilizzati e ai parametri degli impianti a biogas, sono al centro dell'interesse della ricerca [30], [31].

Nel caso particolare della digestione anaerobica dei lipidi, i trigliceridi vengono idrolizzati a glicerolo e acidi grassi a lunga catena (LCFA), da parte di lipasi extracellulari escrete da batteri acidogenici. Gli LCFA che si vengono a trovare intorno alla superficie cellulare, sono trasportati all'interno dei batteri acetogenici sintrofici, dove sono degradati a livello intracellulare. Il glicerolo è convertito a acetato per acidogenesi, mentre gli LCFA sono convertiti ad acetato (o proprionato nel caso di LCFA ad atomi di C dispari) e idrogeno mediante β -ossidazione [32].

Questo processo dipende dalla abilità dei metanogeni idrogenotrofi di utilizzare l'idrogeno prodotto durante l'ossidazione degli acidi grassi.

Alla fine l'acido acetico e l'idrogeno sono convertiti in metano dai metanogeni Archea. Nonostante Syntrophomonadaceae siano considerate le specie maggiormente coinvolte nella degradazione dei lipidi nei digestori anaerobici, ci sono altri gruppi microbici che sono coinvolti nella degradazione di LCFA [33].

Un aspetto importante è l'importanza dell'interfaccia acqua-lipidi, perché è lì che si trovano le lipasi. Per mettere in contatto le due fasi, quella acquosa rappresentata dall'inoculo, (comunità microbica deputata alla digestione anaerobica del substrato) e la fase oleosa, rappresentata dal substrato che galleggia al disopra della fase acquosa, bisogna studiare delle strategie ad hoc, come ad esempio la riduzione stessa della fase acquosa, l'emulsione o il giusto mixing.

1.5.1 REATTORI UTILIZZATI PER LA DIGESTIONE DEI LIPIDI

La digestione anaerobica delle biomasse è processo che avviene spontaneamente in natura, ma a livello industriale si ottiene mediante l'utilizzo di un reattore detto digestore di biomasse.

I reattori possono lavorare sia in **continuo** (i più comuni) che in **batch**. Nel batch i digestori una volta alimentati con materiale organico vengono chiusi e non vi si effettuano ulteriori modifiche nel corso della reazione. In continuo il digestore viene alimentato con una certa frequenza e vengono eliminati gli eccessi di materiale organico per mantenere un volume costante.

Nel caso particolare della digestione dei lipidi, ci sono una serie di esempi di reattori utilizzati per favorire la digestione di tale substrato.

Il lavoro di Rinzema utilizza una configurazione **UASB** (che è l'acronimo inglese di Up-flow anaerobic sludge blanket) in **Fig. 10** e **EGSB** (expanded granular sludge bed), per la digestione degli acidi grassi a lunga catena. Quando il substrato da digerire è ricco in LCFA, è importante l'agitazione e il contatto tra biomassa e substrato. I reattori UASB non possono soddisfare queste richieste, in quanto è richiesta una produzione di biogas tale, necessaria al miscelamento e al

contatto, che non può essere ottenuta se il contributo dei lipidi è superiore al 50% e si va incontro ad un wash-out della biomassa. Mentre con UASB, vengono in parte soddisfatte queste richieste e si ha una efficienza di rimozione della componente organica del 83-91%. Però si ha una riduzione della biomassa e la formazione di uno strato superficiale galleggiante di acidi grassi non digeriti [34].

L'utilizzo di reattori EGSB è molto diffuso nel caso di substrati ricchi in lipidi [35], in quanto ritenuti promettenti per questo tipo di matrici [36].

Un altro esempio di reattore è un **IASB** (inverted anaerobic sludge blanket) [37], studiato per il trattamento anaerobico di effluenti industriali ad alto contenuto lipidico. Deriva da un UASB ma invertito (**Fig.10**), in quanto l'influente viene fatto convogliare dall'alto, mentre l'effluente dal basso, che viene ricircolato, per aumentare il contatto tra influente e LCFA che tendono a galleggiare in superficie.

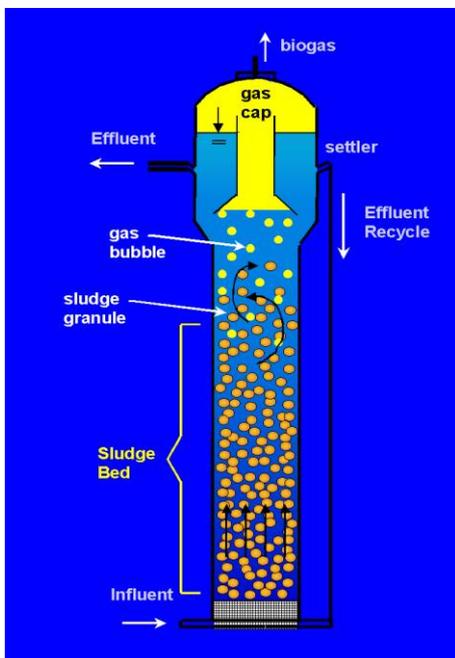


Fig. 9. Schema UASB

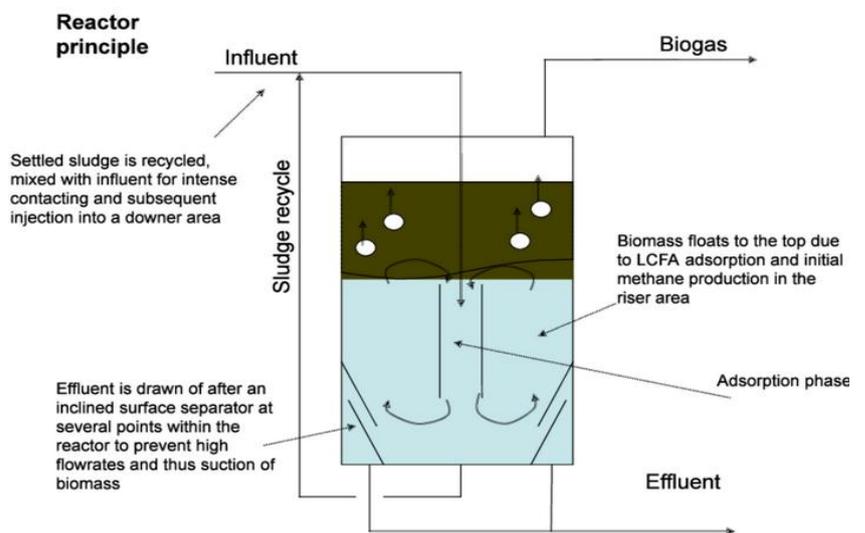


Fig. 10. Schema IASB [38]

Un sistema gas-lift, viene in generale maggiormente utilizzato per la crescita delle microalghe con produzione di lipidi per biodiesel, [39] in questo caso è un sistema aperto ed illuminato che utilizza un sistema gas-lift.

Il ricircolo del biogas viene solitamente sfruttato per migliorare le prestazioni della digestione o della composizione del biogas stesso, o garantire un adeguato mixing, [40] più che per favorire la spinta dell'inoculo verso il substrato da digerire.

1.5.2 DALL'AIR-LIFT AL GAS-LIFT PER LA DIGESTIONE DEI LIPIDI

La nostra scelta, di utilizzare un Gas-lift opportunamente disegnato per la digestione del WCO è dovuta al passaggio fondamentale della mia esperienza in Portogallo, presso il CEB (Centre of Biologiocal Engineering) di Braga, dove ho avuto modo di lavorare con un AIR-LIFT e contemporaneamente con un SBR, per la valorizzazione di acque reflue contenenti idrocarburi mediante digestione aerobica con *Rhodococcus opacus*, deputati alla conversione degli idrocarburi in lipidi neutri immagazzinati all'interno delle cellule.

L'**Air-lift (Fig. 11)** è classificato come reattore pneumatico senza alcuna disposizione meccanica di agitazione per la miscelazione, che mediante un diffusore di aria posizionato nella parte bassa, permette un'agitazione pneumatica del fluido all'interno, meno intensa rispetto ad una agitazione di tipo meccanico. All'interno del reattore è posto un cilindro di minori dimensioni, aperto al fondo, che garantisce la giusta spinta del liquido veicolato dall'aria. Inoltre la parte superiore è aperta. Tra i vantaggi vi è una eliminazione dell'attrito presente, rispetto ai reattori agitati meccanicamente. C'è un maggiore trasferimento di ossigeno, quindi è indicata nei sistemi aerobici e presenta un basso consumo energetico perché le velocità aria/liquido sono basse [41].

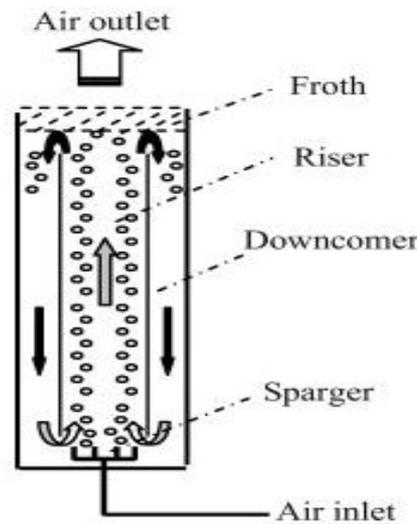


Fig. 11. Schema Air-lift [41]

Un reattore **Gas-lift** anaerobico, presenta le stesse caratteristiche generali di un reattore Air-lift, ma è chiuso, trattandosi di un sistema anaerobico. Il gas introdotto può anche essere ricircolato.

Questi sistemi Air-lift o Gas-lift si possono confrontare con un **CSTR** (completely stirred tank reactor) (**Fig.12**). Il CSTR è il tipo più diffuso di reattore nel settore di produzione di biogas agrozootecnico e consiste in un reattore in cui il substrato viene completamente miscelato mediante pale in acciaio poste al centro del reattore che ne favoriscano la miscelazione, alimentate da un motore all'estremità superiore. In teoria, ogni punto all'interno del reattore sarà caratterizzato dallo stesso valore delle variabili caratteristiche ossia ad esempio: densità, viscosità, concentrazione, temperatura [42].

Un reattore **SBR** (Sequencing Batch Reactor, **Fig. 13**), differisce da un reattore CSTR, in quanto opera in uno stato non stazionario, in fasi che si alternano nel tempo.

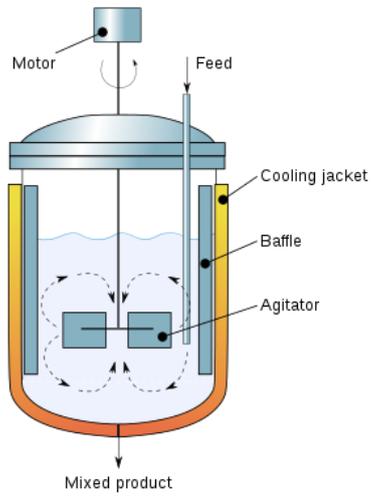


Fig. 12. Schema CSTR [43]



Fig. 13. Immagine SBR (Sequencing Batch Reactor) utilizzato in Portogallo

2. OBIETTIVO DELLA RICERCA

L'attività di dottorato è stata svolta presso il CREA-ZA (Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, Centro Zootecnia e acquacoltura, sito a San Cesario sul Panaro (Mo), un centro di ricerca che si occupa in particolare dell'utilizzazione a fini agricoli ed energetici dei reflui zootecnici. I reflui zootecnici hanno buone produzioni di biogas, per unità di peso di solidi volatili, ma poiché la percentuale di solidi volatili sul volume totale è usualmente bassa, per ottenere rese economiche di metano sono richiesti grandi volumi dei reattori. Obiettivo iniziale è stata la valorizzazione degli effluenti zootecnici per produzione di energia mediante codigestione con scarti che consentissero di aumentare le rese di biogas, a parità di volume. I grassi rientrano in questa categoria. Per questo lo scopo della mia attività è stato quello di valutare la possibilità di DA di olio alimentare esausto con liquame. L'olio alimentare esausto è stato scelto perché costituito quasi esclusivamente da lipidi, con potenziale di biogas elevato; perché disponibile in grandi quantità, e perché potenzialmente utilizzabile in impianti agrozootecnici (compatibilmente coi vincoli imposti dalla normativa). Gli oli minerali, peraltro, hanno già canali preferenziali di utilizzazione. L'uso con liquame suino riflette la realtà corrente, in cui scarti alimentari vengono digeriti insieme a reflui zootecnici. Inoltre, siccome per gli oli esausti la raccolta è accentrata, a livello territoriale, e grandi quantità di oli esausti (oggi destinate alla vendita per biodiesel) sono disponibili nel sito di raccolta, abbiamo voluto verificare la fattibilità di una digestione "dedicata", cioè solo per l'olio.

Il problema dei lipidi è che sono un substrato molto particolare da gestire e differente dagli altri, per cui per prima cosa ho valutato le possibili strategie da adottare, per ridurre i lunghi tempi di digestione e i problemi legati al noto effetto tossico di alcuni metaboliti.

Una volta verificate le condizioni ottimali per la digestione degli oli esausti in sistemi statici in batch, grazie al contributo del DICAM (Dipartimento di Ingegneria Civile, Chimica e dei Materiali) di

Bologna, abbiamo voluto verificare la possibilità di produrre biogas da olio alimentare esausto in sistema agitato e in continuo. Lo studio di fattibilità potrebbe portare ad una migliore specializzazione e standardizzazione del processo, così che ad esempio, le aziende deputate al recupero degli oli esausti, anziché venderlo per ottenere biodiesel, potrebbero venderlo per la produzione di biogas, o produrre biogas in proprio. L'idea del reattore è arrivata grazie alla mia esperienza in Portogallo, presso il CEB (Centre of Biological Engineering - University of Minho), dove lavorando per la valorizzazione di acque contenenti idrocarburi, ho avuto modo di utilizzare un reattore Air-lift, il cui funzionamento può essere utile nel caso di sistemi bifasici, come il nostro. Di qui il passaggio da un Air-lift, che utilizza aria per l'agitazione pneumatica, al Gas-lift, che utilizza invece il ricircolo anaerobico del biogas prodotto, per favorire l'agitazione e l'incontro tra inoculo e substrato.

Per il raggiungimento di questi obiettivi ho realizzato le seguenti attività: lo studio dell'interfaccia in un sistema bifasico olio/acqua, l'uso di emulsionanti, di minerali quali la sepiolite e del liquame suino a disposizione del centro CREA. Inizialmente ho considerato come lipidi sia i grassi che gli oli, successivamente ho preso in considerazione gli oli alimentari esausti in quanto sono più facilmente accessibili, dal momento che esiste una filiera ben tracciata per questi, per cui ho potuto utilizzare campioni reali, presi da aziende presenti sul territorio. Abbiamo disegnato e realizzato un reattore Gas-lift per la digestione degli oli, permettendo mediante un'agitazione pneumatica di avvicinare l'inoculo sul fondo, al substrato che galleggia.

3. MATERIALI E METODI

3.1 SUBSTRATI

I substrati utilizzati durante il progetto di ricerca sono stati il WCO e il liquame suino.

Il WCO è stato fornito dall'azienda Rimondi Paolo S.r.l., con sede a Bologna, che si occupa del recupero trasporto e smaltimento dei rifiuti, in particolare specializzata nella raccolta degli oli esausti, concessionaria CONOU.

I campioni di olio alimentare esausto, prelevati in differenti periodi, sono costituiti prevalentemente da oli di palma e girasole e derivano sia da attività industriali, che dal settore domestico e della ristorazione. I campioni sono stati centrifugati prima dell'uso a 4000g per 10minuti per eliminare un'eventuale presenza di tracce di acqua e materiali sospesi. Le caratteristiche analitiche selezionate erano il contenuto di acqua < 0.05%, VS, 99.98%, acidità totale (come acido oleico), 1.18 g L⁻¹, numero di saponificazione, 192.6 mg KOH.

Per le differenti prove sono stati utilizzati oli aventi differente composizione, sempre però prelevati dall'azienda Rimondi (R3F, R3P, R2), confrontati con olio extravergine di oliva (EVO), o con oli provenienti dall'ambito domestico (CUC). In particolare:

- ✓ olio da cucina privata, indicato con **(CUC)**, accumulato in ambiente domestico, prevalentemente costituito da oli fritti,
- ✓ olio Rimondi 2 **(R2)**, fornito dalla azienda Rimondi costituito da un mix di oli domestici e della ristorazione,
- ✓ olio da frittura di patatine Rimondi 3 **(R3P)**, costituito prevalentemente da olio di girasole fritto, fornito dall'azienda Rimondi,

- ✓ olio misto Rimondi 3 (**R3F**), costituito da soia, palma e girasole, il tipico mix utilizzato in ambiente della ristorazione, fornito da Rimondi,
- ✓ olio extravergine non utilizzato (**EVO**), di una nota catena di supermercati.

Per quanto riguarda il liquame suino è stato raccolto dalla prima vasca di stoccaggio della porcilaia nel centro sperimentale del CREA-ZA, previa omogeneizzazione meccanica ed utilizzato fresco e tal quale. Per la caratterizzazione del liquame si veda la tabella 4.

Tabella 4. Caratterizzazione del liquame S2. *tq* = peso fresco, *ss* = sostanza secca, *CO* = Carbonio organico

ID CAMPIONE	solidi sospesi% (sol tot-sol fondello)	% solidi totali	% ceneri	N totale % tq	N totale % tq	N-NH4 % tq	N-NH4 % tq	pH	Alcalinità (CaCO3 mg/L)	P tot %	CO% <i>ss</i>	CO% <i>tq</i>
Liquame	0,91	4,31	1,30	0,3293	0,3235	0,1757	0,1801	7,92	10763	0,096	38,04	37,70

Il terreno di idratazione utilizzato HM è un terreno a base fosfati per metanogeni (ATCC medium #1043) senza fonti energetiche, contenente 500 mg L⁻¹ NH₄Cl e pH = 6.8.

La sepiolite è stata fornita dall'azienda Italiana zeoliti S.r.l., a Prignano sulla Secchia (MO), ed è stata setacciata prima dell'uso con un setaccio con maglie di 1 mm, per poter eliminare eventuali polveri. si è utilizzata la sepiolite in granuli di 1-3 mm. Successivamente è stata carbonizzata a 550°C per 2 ore, al fine di rimuovere eventuali residui organici presenti.

3.2 CONDIZIONI SPERIMENTALI

Abbiamo lavorato in un sistema bifasico, statico, occasionalmente agitato, formato dal WCO (0,5 g) che galleggia sul terreno d'idratazione (HM), e l'inoculo (5ml). Il WCO è stata l'unica fonte di carbonio, mentre il terreno di idratazione per metanogeni (ATCC medium #1043), rappresenta la fonte di azoto, fosforo, microelementi, sali minerali e vitamine.

Gli esperimenti sono stati condotti in microcosmi da 100ml (volume effettivo 118,5 ml) secondo Owen *et al.* [44], in vetro chiusi da tappi in butile, sigillati con guarnizioni in alluminio, incubati a 35°C per circa 3 mesi. Il tempo di incubazione è variato in base al tipo di prova, ciascun trattamento è stato condotto in triplicato. Lo spazio di testa dei reattori è stato flussato con il 100% di N₂ in tutte le fasi di preparazione prima dell'inoculo. I reattori sono stati agitati manualmente solo durante la misurazione del biogas, avvenuta due giorni dopo l'inoculazione e ogni settimana durante l'intero periodo di incubazione. Successivamente i reattori sono stati distribuiti casualmente sugli scaffali dell'incubatore. Il biogas è stato raccolto per mezzo di siringhe di vetro da 100mL come descritto in [45], il volume totale del gas era la somma del gas raccolto dalla siringa e quello nello spazio di testa dei reattori. Abbiamo terminato il test quando non c'era più produzione di biogas. I controlli erano con il terreno d'idratazione HM e l'inoculo, senza fonte di carbonio, oppure con 6.8 g L⁻¹ di sodio acetato. Di ogni microcosmo è stato misurato il pH finale.

3.3 DISEGNI SPERIMENTALI

3.3.1 ESPERIMENTO "A": VARIAZIONE DEL VOLUME DI IDRATAZIONE

Mediante questo esperimento di laboratorio abbiamo valutato la possibilità di migliorare le prestazioni della digestione anaerobica del WCO, andando ad "accorciare la distanza tra microrganismi e substrato". In questo sistema, i microrganismi tendono a depositarsi nella parte più profonda del reattore, mentre l'olio forma uno strato sottile sulla superficie del terreno d'idratazione. In assenza di agitazione, la possibilità di contatto tra cellule microbiche e il substrato può aumentare solo andando a ridurre il volume di idratazione.

Il WCO, in quantità costante, in base alla quantità utilizzata, non va a coprire l'intera superficie al di sopra del terreno di idratazione, ma forma una sottile lamina. Viene fatto variare solo il volume del terreno di idratazione, da cui ne consegue una variazione del rapporto olio su acqua (oil to water= **OtoW**), quindi a differenti volumi di idratazione corrisponde un differente rapporto OtoW (vedi tabella 5). Il volume di idratazione è cambiato con la seguente progressione: 0, 5, 15, 30 o 50mL. Ogni valore di HM è stato condotto in triplice copia, per un totale di 18 microcosmi, inclusi i controlli, incubati per 105 giorni. La fase acquosa dell'inoculo è rimasta al di sotto della fase oleosa, in assenza di HM; altrimenti, si è mescolata con il terreno. In condizioni statiche, i granuli di inoculo tendevano a sedimentare sul fondo del reattore. Anche se i reattori sono stati mantenuti in condizioni statiche, è stato necessario agitare periodicamente i microcosmi, quando sono state effettuate le misurazioni del volume e della composizione del biogas. Questa agitazione comporta una miscelazione temporanea di substrato e cellule, seguita tuttavia dal deposito dell'inoculo sul fondo dei reattori. L'agitazione implica una formazione micellare, anche se temporanea: più basso è il volume della fase acquosa, maggiore è il numero di micelle per unità di volume della fase acquosa. La formazione di gas durante la degradazione iniziale del WCO contribuisce ad un effetto

di miscelazione, anche limitato, all'interno del reattore. Alcune specie che degradano i lipidi sono mobili [46]. I metaboliti microbici (ad esempio i solventi) possono modificare l'accessibilità del substrato. Seguendo queste considerazioni, non è stato possibile escludere la possibilità per i microrganismi di accedere al substrato anche a una distanza > 0 dal WCO. Abbiamo assunto il rapporto OtoW come indicatore della probabilità che i microrganismi accedano al substrato: maggiore è il suo valore, maggiore è tale probabilità.

La miscela di reazione era la somma del contributo di substrato, inoculo e terreno. Pertanto, i reattori che non contengono il terreno ($HM = 0$), hanno comunque ricevuto un contributo idrico dall'inoculo. Questi reattori ($HM=0$) rappresentano il massimo rapporto OtoW, e riflettono la massima probabilità di incontro tra microrganismi e substrato.

La variazione del volume di idratazione ha modificato diversi parametri. Oltre al rapporto OtoW, varia anche la diluizione dell'inoculo e il rapporto Carbonio azoto (C/N) (**Tabella 5**). Quantità diverse di HM hanno dato luogo ad una riduzione del rapporto C/N nella miscela di reazione, in quanto la quantità di olio rimane costante, mentre la quantità di azoto è aumentata per volumi crescenti di HM. Il rapporto C/N nella miscela di reazione è stato calcolato includendo il contributo di N e di C del substrato, del HM ed anche dell'inoculo. Il rapporto tra inoculo e substrato, espresso come g VS nell'inoculo per grammo di VS nell'olio, è rimasto costante, poiché il contenuto di VS dell'inoculo nei reattori era sempre lo stesso. Il rapporto tra inoculo e substrato è pari a 0,48 g VS dell'inoculo g⁻¹ VS del WCO.

Tabella 5. Dettagli esperimento A

<i>Volume del terreno di idratazione HM (ml)</i>	<i>Rapporto WCO/HM (w/v)</i>	<i>Diluizione inoculo (ml HM ml⁻¹ inoculo)</i>	<i>C/N</i>
0	100	0	24.9
5	50	1	24.2
15	25	3	22.8
30	14	6	21.1
50	9	10	19.1

1) riferiti a tutto il volume di acqua (HM + inoculo), i grammi di WCO e inoculo sono costanti.



Fig.14. Microcosmi da 100ml con diversi livelli di idratazione, dopo una settimana dall'inoculazione.

3.3.2 ESPERIMENTO "B": VARIAZIONE DALL'INTERFACCIA A PARITÀ DEL RAPPORTO OTOW.

Questo esperimento è servito a confermare ulteriormente l'ipotesi del disegno sperimentale A, e per dimostrare che in un sistema bifasico, non si può parlare di concentrazioni ma bensì di maggiore probabilità che i microrganismi possano venire a contatto con il substrato. Per questo abbiamo mantenuto costante il rapporto OtoW e variato solo le dimensioni dei microcosmi. A parità di volumi, in microcosmi di diverse dimensioni, le due fasi, oleosa e acquosa, si distribuiranno occupando una maggiore o minore superficie, in base al volume a disposizione. Le condizioni di reazione sono le stesse, eccetto per il volume dei microcosmi utilizzati. Se la distribuzione reciproca delle due fasi è un fattore importante per la DA del WCO, allora dovremmo apprezzare delle differenze tra microcosmi di differenti volumi nominali, pur contenendo lo stesso volume di reazione. Si sono utilizzati microcosmi aventi volumi nominali crescenti, da 50ml, 100ml e 500ml, che saranno i trattamenti **V50**, **V100**, **V500** si veda **fig. 15**. Il volume del terreno di idratazione in questo caso 15ml, non è stato modificato, così da non alterare la concentrazione dell'olio o dell'inoculo, e il rapporto OtoW in base alla quantità di idratazione. In un sistema bifasico, olio-acqua, è importante ciò che avviene all'interfaccia, per cui se andiamo a considerare uno stesso volume di miscela, di 20ml (HM + Inoculo), in microcosmi, a volume differente, si andrà a disporre differentemente, senza però alterare la quantità della miscela di reazione. I microcosmi sono stati incubati per 112 giorni, per un totale di 18 microcosmi. In questo caso l'analisi del biogas è stata fatta ogni 2 settimane per agitare il meno possibile il sistema.

L'ipotesi era che, in un sistema omogeneo, quindi perfettamente miscelato con substrato idrofilo, tutti i 15 reattori, avrebbero avuto la stessa composizione, per cui sarebbero stati considerati dei replicati. Nel nostro caso, invece, trattandosi di un sistema bifasico non omogeneo, il WCO andrà ad occupare una superficie maggiore, all'aumentare del volume dei microcosmi, lo stesso discorso

vale per la parte acquosa (microrganismi e HM). I batteri tenderanno a precipitare sul fondo del reattore, occupando una maggiore superficie e un'altezza minore.

Di seguito in **tabella 6** sono riportate le differenti altezze e superfici, per ciascun componente della miscela, stimate sulla base dei volumi in gioco, per i diversi microcosmi, sulla base della sezione del microcosmo e del volume, approssimato ad un cilindro.

volume MC ml	raggio MC mm	superficie mm ²	volume WCO mm ³	volume inoculo mm ³	volume HM mm ³	h olio mm	h inoculo mm	h HM mm
50	15	765	800	5000	15000	1,045752	6,535948	19,6078
100	20	1360	800	5000	15000	0,588235	3,676471	11,0294
500	30	3060	800	5000	15000	0,261438	1,633987	4,90196

Tabella 6. Calcolo teorico delle superfici e altezze per microcosmi a volume crescente da 50 a 500ml.

All'aumentare del volume dei reattori, aumenta la superficie a disposizione. Considerando gli stessi volumi di inoculo, WCO e HM, quindi a parità di quantità utilizzate, nei diversi reattori, variandone la distribuzione in superficie, varierà anche l'altezza e quindi la distanza tra i diversi strati (acqua e olio essendo immiscibili si distribuiscono l'uno al disotto dell'altro, i microrganismi tenderanno a precipitare sul fondo).



3.3.3 ESPERIMENTO “C”: PROVA DI EMULSIONE CON KOH

Questa prova è stata effettuata con lo scopo di facilitare ulteriormente la probabilità di contatto tra microrganismi e substrato, favorendo la formazione di un'emulsione dell'olio in acqua, mediante alcalinizzazione del HM. Le emulsioni riducono la tensione interfacciale tra l'olio e le fasi acquose, contrastano la coalescenza e conseguentemente consentono una maggiore stabilità delle gocce di olio, con un corrispondente aumento della superficie totale di olio disponibile per i microrganismi per la crescita. Per permettere l'emulsione è stato utilizzato idrossido di potassio (KOH), in quanto l'alcalinizzazione dei grassi porta alla formazione del sapone, e i saponi sono tipici agenti emulsionanti. In generale vengono utilizzati per la formazione dei saponi sia il KOH che l'NaOH, la scelta dell'idrossido di potassio non è stata casuale, ma voluta, in quanto concentrazioni troppo elevate di sali di sodio potrebbero essere dannose per i microrganismi metanogenici [47].

Il volume di HM è stato mantenuto costante a 14,25 ml, mentre sono state aggiunte quantità crescenti di KOH 1M, in particolare: 0, 0.15, 0.30, 0.45, 0.60 e 0.75 ml KOH 1M, più la quantità di acqua distillata che occorre ad avere in totale 0,75 ml, considerando la quantità di KOH aggiunta, per mantenere costante il volume della miscela di reazione. La miscela di reazione conteneva quindi 0,5 g di WCO, 5ml di inoculo, 14,25ml di HM e 0,75ml di KOH e / o acqua. Le quantità di alcali usati in questo esperimento sono inferiori alle quantità necessarie per saponificare completamente l'olio utilizzato (1,7ml KOH 1M). Queste quantità avrebbero prodotto valori di pH

superiori a 11, un pH troppo alto che abbiamo ritenuto potesse pregiudicare le attività microbiche nei microcosmi. Pertanto, abbiamo scelto di aggiungere quantità di KOH tali da lavorare ad un pH inferiore a 11, ottenendo però una parziale saponificazione dell'olio. Per ciascun livello di KOH si è lavorato in triplicato, per un totale di 20 microcosmi, incubati per 105 giorni.



Fig.16. Diversi livelli di emulsione, becher contenenti HM, WCO, KOH in quantità crescenti, da 0,15ml a 0,75 ml.

3.3.4 DISEGNO SPERIMENTALE "D": EMULSIONE & VARIAZIONE DEL VOLUME DI IDRATAZIONE

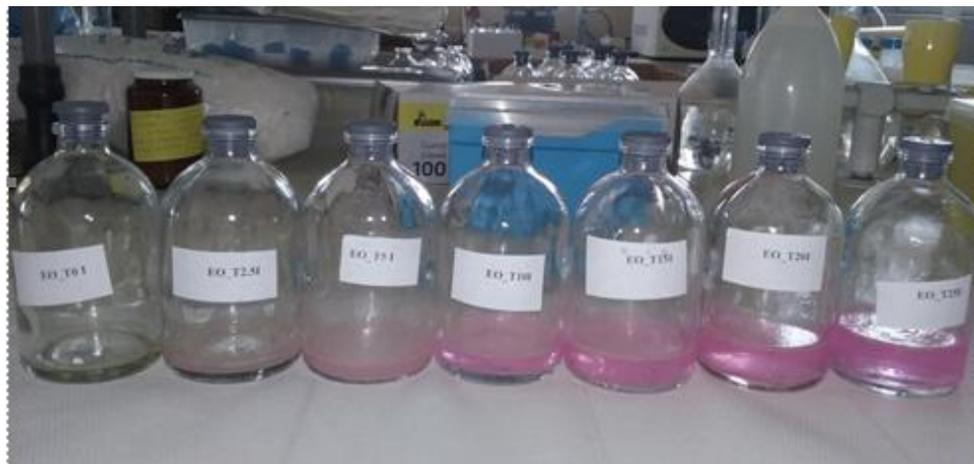
In questo caso abbiamo provato a incrociare l'effetto dell'emulsione con quello della variazione del volume di idratazione, utilizzando la quantità di KOH risultata migliore dall'esperimento C, in termini di giorni per raggiungere la resa massima, dove si ha una riduzione del 51%. La quantità è di 0,15ml di KOH in 15 ml di terreno HM, cui avrò 0,01ml KOH per ml di HM. Di qui la seguente **tabella 7** per misurare le diverse quantità da aggiungere nei microcosmi per mantenere il KOH costante in relazione ad un volume crescente di idratazione. Sono state calcolate: le quantità di KOH da aggiungere (A,B,C,D,E,F dove F indica la quantità massima e zero la minima), il terreno HM (data dal volume di idratazione stabilito a cui si sottrae F, che è la quantità di KOH e acqua distillata in totale), e la quantità di acqua distillata sterile da aggiungere per addizionare lo stesso volume in tutti i reattori (data da F a cui si sottraggono i ml di KOH da aggiungere), tutto ciò per fare in modo che pur variando le quantità di KOH e i volumi di idratazione, il pH, rimanga costante

tra 8 e 8,5, misurato con cartina al tornasole, per valutare se effettivamente l'effetto positivo del KOH, nella riduzione del tempo di digestione, possa essere ulteriormente aumentato andando a variare i volumi di idratazione. Abbiamo messo a confronto anche tre livelli di idratazione (10, 20, 25 ml di HM), senza KOH, rispettivamente O_T10, O_T20, O_T25. Per un totale di 10 trattamenti ciascuno in triplicato, ottenendo quindi 32 reattori, inclusi i due controlli con acetato e senza fonte di carbonio.

Tabella 7. Calcolo della quantità di terreno di idratazione e KOH per mantenere costante l'alcalinizzazione per i diversi trattamenti

ID	Intervalli idratazione ml	ml KOH da aggiungere	Quantità terreno	ml acqua sterile	pH con cartina
EO_T0	0	$X*0=0$	0	F=0.25	8-8.5
EO_T2.5	2.5	$X*2.5=A=0.025$	2.5-F=2.25	F-A=0.225	8-8.5
EO_T5	5	$X*5=B=0.05$	5-F=4.75	F-B=0.2	8-8.5
EO_T10	10	$X*10=C=0.1$	10-F=9.75	F-C=0.15	8-8.5
EO_T15	15	$X*15=D=0.15$	15-F=14.75	F-D=0.1	8-8.5
EO_T20	20	$X*20=E=0.2$	20-F=19.75	F-E=0.05	8-8.5
EO_T25	25	$X*25=F=0.25$	25-F=24.75	F-F=0	8-8.5

Fig. 17. Microcosmi con WCO, HM, KOH, prima di essere inoculati. I microcosmi contengono volumi crescenti di HM, ma stessa alcalinizzazione.



Le modalità dell'esperimento sono le stesse delle prove A e C, in microcosmi da 100ml, con 0,5 g di WCO, terreno HM in quantità variabili, secondo la **tabella 7**. La prova è durata 140 giorni.

3.3.5 ESPERIMENTO "E": PROVA SEPIOLITE, LIQUAME SUINO, pH

Abbiamo valutato l'effetto della **sepiolite (Sep)**, del **liquame suino (Liq)** e del **pH**, sulla digestione anaerobica del WCO. La prova è stata realizzata seguendo le condizioni sperimentali comuni, in batch per 105 giorni.

La **sepiolite** è un minerale, avente formula chimica $Mg_8Si_{12}O_{30}(OH)_4 \cdot 8H_2O$ [48], è un fillosilicato idrato di magnesio, presenta dei canali zeolitici, con una particolare struttura modulata, che rendono la struttura porosa all'interno, che ne conferisce la capacità di assorbimento, [49], in particolare per liquidi, come gli oli. Viene utilizzata per assorbire perdite di liquidi, dal manto stradale così come per lettiera dei gatti (presenta anche proprietà anti odore). Viene inoltre utilizzata a livello sperimentale, come microcarrier per batteri deputati alla digestione anaerobica dei lipidi. [50]

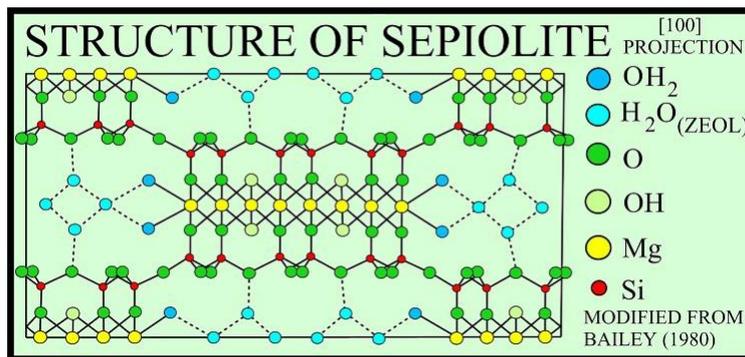


Fig. 18. Struttura della sepiolite. [51]

La sepiolite e l'olio sono stati pesati direttamente all'interno del reattore e si è attesa mezz'ora circa per far assorbire l'olio (0,5g) alla sepiolite (1g per ogni reattore).

Per quanto riguarda il **liquame suino** (S2) è stato prelevato in giornata dalla vasca di raccolta del CREA. Il liquame è stato addizionato al WCO (0,5g) e all'inoculo (5ml) in sostituzione dell'HM, sempre 15 ml. Il liquame è noto per le sue proprietà tamponanti e presentava un pH intorno 8. È stato utilizzato nell'ottica della bioraffineria, al fine di valorizzare uno scarto usandolo come mezzo d'idratazione in sostituzione ai terreni di idratazione sintetici.

Per quanto riguarda il **pH** abbiamo modificato in alcuni campioni il pH tra 8 e 8,5 mediante aggiunta di un volume noto di KOH 1M, per valutare se l'effetto positivo sulla digestione anaerobica mediato da sepiolite e liquame (osservato in prove preliminari) potesse essere dovuto ad un innalzamento del pH intorno ai valori ottimali di digestione. L'aggiunta di KOH è avvenuta non solo con il terreno HM, ma anche per i campioni contenenti liquame e sepiolite, separatamente.

I trattamenti sono stati i seguenti, sempre in triplicato: WCO e terreno d'idratazione (**O_T**); WCO e liquame (**O_liq**); WCO e HM corretto con KOH (**O_T_pH**); WCO sepiolite e HM (**Sep_O_T**); WCO

sepiolite e HM corretto con KOH (**Sep_O_T_pH**); WCO sepiolite e liquame (**Sep_O_liq**); per un totale di 26 reattori inclusi i controlli senza fonte di carbonio, oppure con 6.8 g L⁻¹ di sodio acetato, con solo liquame (**Liq**), con sepiolite e liquame (**Sep_liq**).

L'aver valutato contemporaneamente l'effetto della sepiolite assieme al liquame o al pH, è servito a comprendere se l'effetto dei trattamenti si potesse sommare o meno.



Fig. 19. Microcosmi esperimento E a fine digestione.

3.3.6 ESPERIMENTO "F": PROVA CON OLI ALIMENTARI ESAUSTI DI DIVERSA ORIGINE

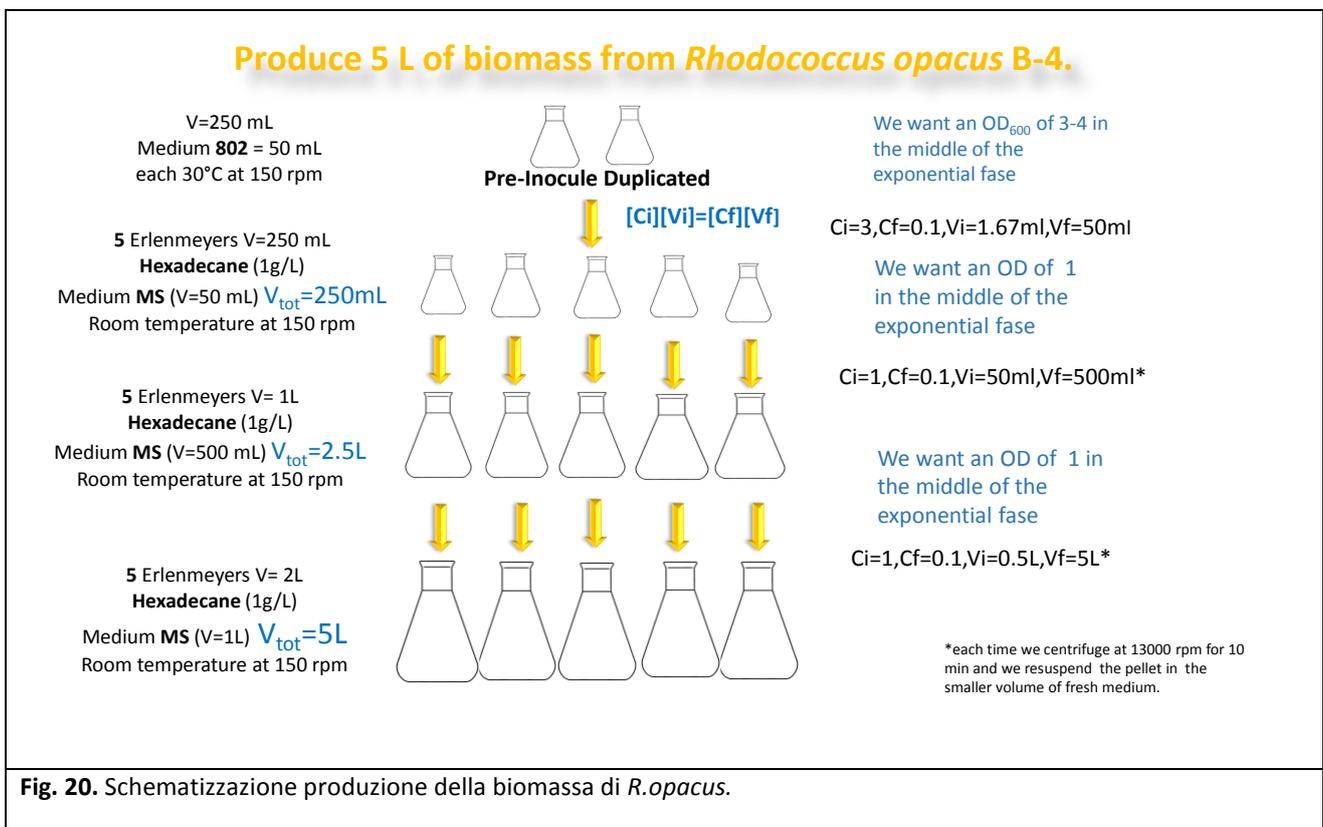
Questa prova è stata messa in coda a tutte le altre, per valutare se la provenienza e le caratteristiche del WCO, potessero influenzare l'andamento e la durata della digestione anaerobica, ed inoltre abbiamo confrontato la digestione di questi oli con olio non fritto (nel caso specifico, extravergine d'oliva) per valutare se la cottura degli oli potesse influenzarne o meno la digeribilità da parte dei microrganismi. Gli oli utilizzati sono descritti nel capitolo 3.1.

Si sono utilizzati in totale 17 microcosmi incubati per 105 giorni.

3.3.7. ESPERIMENTO AIR-LIFT

Introduzione generale

In Portogallo si è partiti dall'idea di valorizzare un'acqua reflua reale, proveniente dal lavaggio di macchine industriali dall'azienda ALSTOM, presente tra l'altro anche in Portogallo, molto concentrata, per cui aveva un aspetto tipicamente oleoso. Si è partito da un lavoro di tesi e da una ricerca sempre del CEB di Braga, in cui si indagava la possibilità di utilizzare queste acque di lavaggio ricche di idrocarburi, al fine di produrre una biomassa grassa, di *Rhodococcus opacus* B4, che poi poteva essere utilizzata a fini energetici, come ad esempio la digestione anaerobica. Per quanto riguarda la crescita della biomassa di *R.opacus*, si è scelto di crescere 5 litri di biomassa, partendo da una coltura pura, utilizzando esadecano come substrato, seguendo lo schema in **Fig. 20**.



Tale biomassa è stata fatta crescere sia in un reattore Air-lift, sia in un reattore SBR (sequencing batch reactor = reattore a ciclo discontinuo), entrambi in condizioni **aerobiche**, per poter valutare quale dei reattori potesse essere preferibile, vedi **Fig. 21 e 22**. Il primo permette l'agitazione pneumatica mediante insufflazione di aria dal fondo del reattore, proveniente dal circuito interno, con flusso mantenuto costante durante il corso dell'esperimento. Il secondo favorisce l'agitazione meccanica mediante pale in acciaio poste all'interno del reattore, mantenute ad un'agitazione costante di 100rpm.



Fig. 21. Air-lift utilizzato per la prova, volume totale 5 L, volume utilizzato 4,5 L.

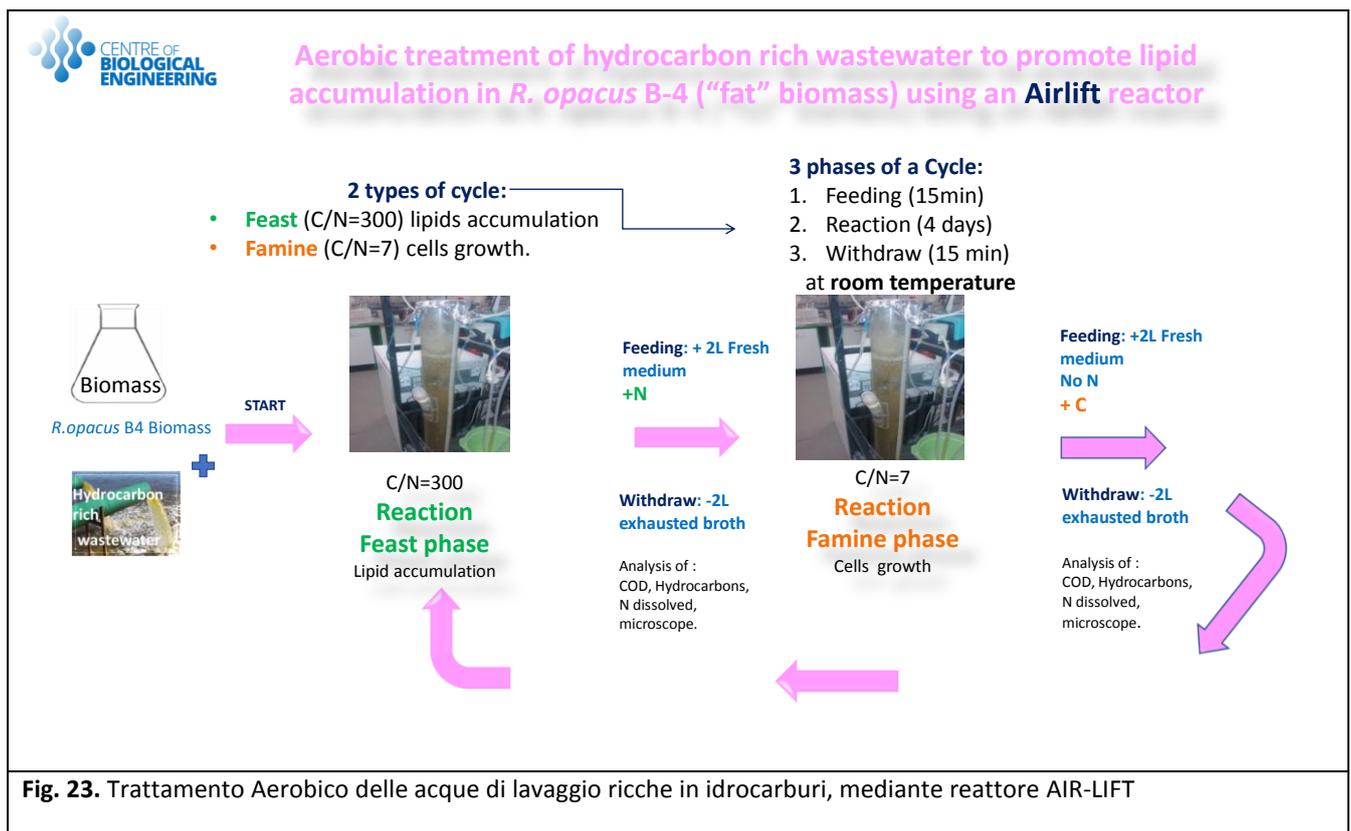


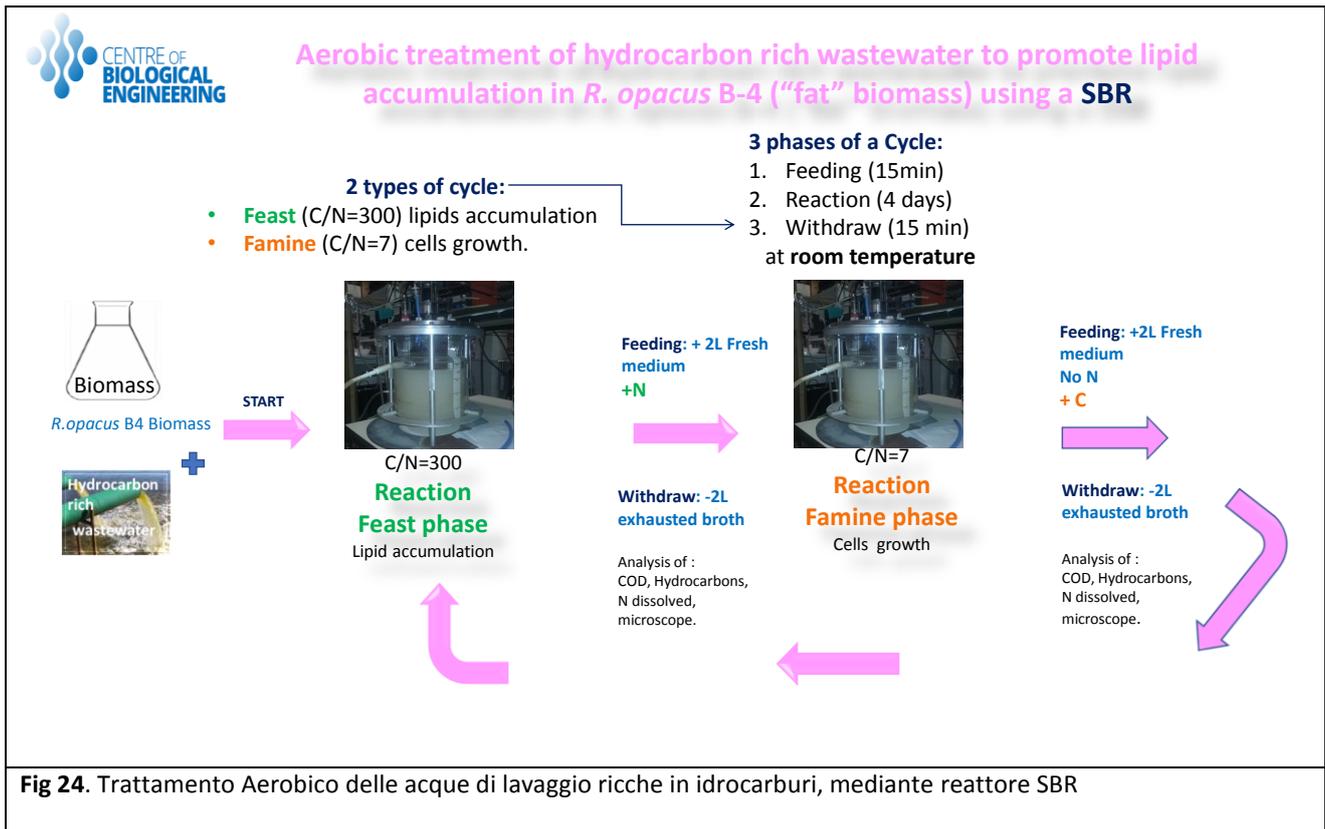
Fig. 22. SBR, utilizzato per la prova, volume totale 4 L, volume utilizzato 3,5 L.

Io mi sono occupata sia della crescita della biomassa per entrambi i reattori, che del loro set-up, lavorando in condizioni semicontinue, ogni settimana veniva addizionato terreno fresco e rimosso terreno esausto. La parte relativa alla digestione anaerobica della biomassa, non è stata affrontata per questioni di tempo.

Il *R.opacus* è un microrganismo in grado di convertire gli idrocarburi in lipidi neutri in particolari condizioni, infatti quando il rapporto C/N è elevato, questi tendono a convertire gli idrocarburi in lipidi neutri e ad accumularli all'interno della cellula, mentre quando il rapporto C/N scende a livelli molto bassi, tende ad utilizzare questi lipidi neutri, che aveva accumulato, per crescere [52]. Quindi dopo aver fatto crescere la biomassa come descritto in precedenza, per all'incirca 1 mese, utilizzando gli stessi materiali e metodi presenti in [52] per rendere i microrganismi pronti alla digestione del nostro campione ricco di idrocarburi, abbiamo fatto partire i due reattori utilizzando come fonte di carbonio l'acqua reflua ALSTOM, concentrata, e il terreno di idratazione MS secondo Schlegel *et al.* [53].

Per entrambi i reattori si è utilizzato lo schema descritto nelle **figure 23 e 24** di seguito.





Ci sono due fasi: la così detta "fase di abbondanza", con elevato rapporto C/N, in cui si ha la trasformazione e l'accumulo dei lipidi neutri, in quanto viene fornita la fonte di carbonio in abbondanza, e il terreno MS, che rappresenta l'unica fonte di azoto. Durante l'altra fase detta: "fase di carestia" viene eliminata parte del terreno esausto, e aggiunto solo un equivalente volume di terreno MS fresco, senza fonte di carbonio, così da avere all'interno del reattore un bassissimo rapporto C/N. L'alternanza di queste due fasi garantisce di selezionare solo quei batteri in grado di convertire gli idrocarburi in lipidi neutri, che riescono quindi a crescere nella fase di carestia.

Il mio lavoro in particolare si è basato sulla individuazione di indicatori analitici utili a comprendere il processo e per capire in che fase del ciclo si trovassero i batteri, e quanto tempo potessero durare le due fasi per garantire allo stesso tempo, la decontaminazione dell'acqua reflua e la selezione e crescita dei batteri in grado di farlo.

Per le analisi di caratterizzazione dei lipidi, come estrazione dei grassi, TLC si vedano i metodi presenti in [52].

3.3.8. ESPERIMENTO GAS-LIFT

Partendo dall'AIR-LIFT utilizzato in Portogallo, in presenza di un sistema bifasico, siamo arrivati, grazie alla collaborazione tra il CREA e il DICAM dell'Università di Bologna, alla progettazione e al set-up di un reattore GAS-LIFT per la digestione anaerobica degli oli di risulta, mediante ricircolo interno del biogas prodotto.

Si è partiti sempre dalla stessa idea di voler avvicinare il più possibile i microrganismi al substrato in un sistema bifasico, in questo caso andando ad agire sull'agitazione del sistema. Mediante un'agitazione più dolce, dovuta alle bolle prodotte dal ricircolo di biogas. Questa agitazione pneumatica permette un movimento dei granuli, che promuovere ed allunga il tempo di contatto tra substrato e microrganismi, così da poter in teoria velocizzare i lunghi tempi di digestione anaerobica dei lipidi. L'agitazione pneumatica è stata confrontata con quella meccanica, mediante l'utilizzo di un reattore CSTR di minori dimensioni rispetto al Gas-lift, fornito di ancorotta metallica e agitatore, tali da garantire il rimescolamento all'interno del reattore, in maniera omogenea.

Si è partiti da uno schema di partenza (**Fig. 25**) attorno al quale si sono assemblate le varie parti, per ottenere la configurazione del nostro Gas-lift, che è stata modificata e semplificata notevolmente nel tempo. Mentre per il CSTR lo schema è rimasto invariato (**Fig. 26**).

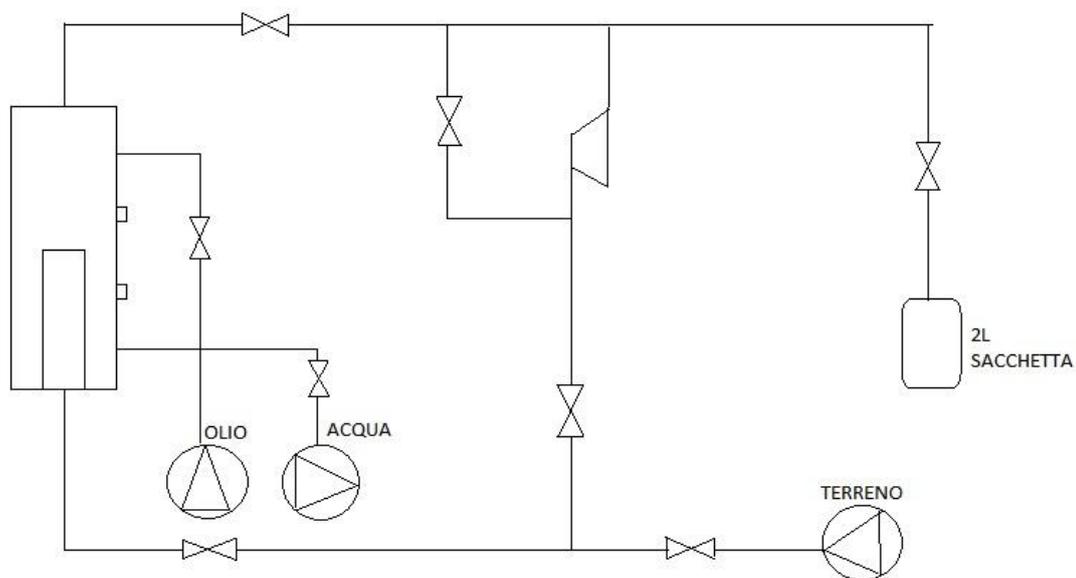


Fig. 25. Schema Gas-lift con compressore.

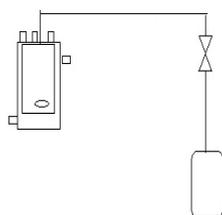


Fig. 26. Rappresentazione schematica CSTR utilizzato per le nostre prove.

Nel progetto iniziale il ricircolo di biogas si otteneva mediante utilizzo di un compressore di piccole dimensioni, ma questo ha comportato una serie di problemi. Tra questi: la manutenzione del compressore stesso e il rischio di danni dovuti ad ingresso di acqua e sostanze corrosive come H_2S provenienti dal biogas, che potevano danneggiare la componente elettrica del compressore, che rimaneva acceso per tutta la durata dell'esperimento, per garantire un rimescolamento continuo. Ciò comportava anche surriscaldamento del compressore. Nonostante avessimo previsto un

ricircolo interno (**Fig. 27**) per modulare la portata del biogas in ingresso nel reattore (dato che non era modulabile dal compressore), non era sufficientemente lieve, e ha comportato anche un eccessivo richiamo di acqua dal reattore stesso.

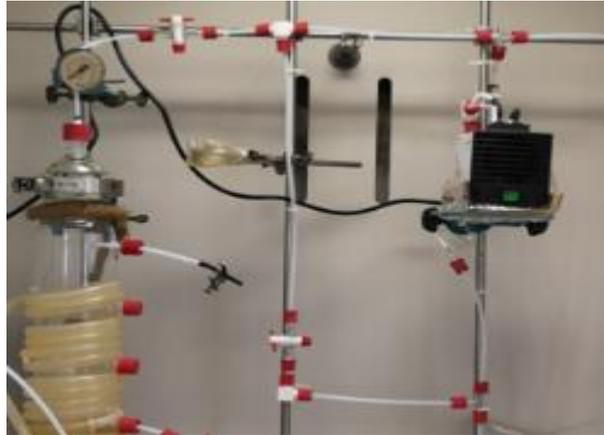


Fig. 27. Particolare ricircolo interno per modulare la portata del biogas dal compressore

Tutto ciò ci ha portato a rivedere lo schema iniziale e sostituire il compressore con una pompa peristaltica (**Fig. 28**). Questo ci ha permesso di regolare il flusso del ricircolo di biogas, ridurre i problemi legati all'eventuale presenza di acqua nel circuito, in quanto per le pompe non sussiste il problema relativo ad eventuali danni dovuti alla presenza di acqua, e non avevamo problemi legati al surriscaldamento.

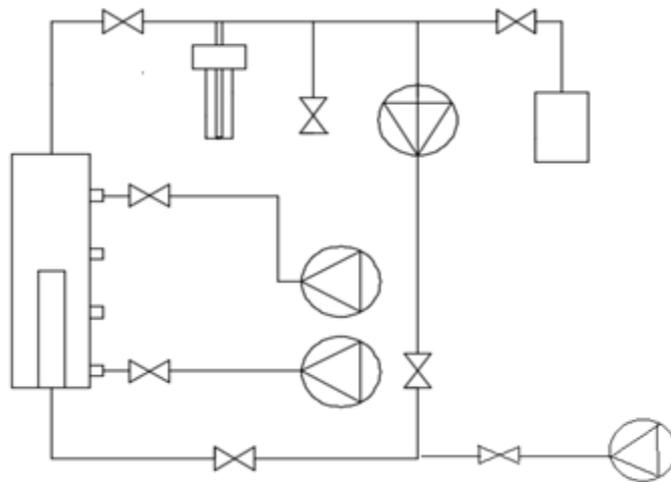


Fig. 28. Schema Gas-lift con ricircolo biogas mediante pompa peristaltica realizzato per le nostre prove.

Dopo aver definito lo schema finale del Gas-lift, sono stati valutati una serie di parametri, tra cui la portata delle pompe, il flusso di ricircolo, lo spazio di testa in entrambi i reattori, le possibili perdite, le prove di tenuta, al fine di mettere a punto al meglio i reattori.

Terminata questa fase progettuale e di set-up per entrambi, Gas-lift e CSTR, è stata ottenuta la configurazione finale (**Fig. 29**). Il Gas-lift presenta all'interno un cilindro di minori dimensioni, in plastica, aperto in basso per permettere di veicolare in maniera ordinata le bolle, prodotte dallo sparger presente al fondo del reattore, che determinano l'agitazione delle due fasi. Il biogas prodotto viene veicolato verso la pompa, una parte viene ricircolato nel reattore, per garantirne il mescolamento, un'altra parte viene stoccata nella sacchetta per il biogas, con capienza massima di 2L. Il gorgogliatore presente dopo il reattore, ha una duplice funzione in questo caso, in quanto permette di intrappolare l'acqua che proviene dal reattore, e non va nella sacchetta. Permette anche di apprezzare visivamente, attraverso la presenza di bolle, se il biogas viene effettivamente

ricircolato o meno nel sistema. Inizialmente era stato utilizzato per prevenire l'ingresso di acqua nel compressore, ma una volta sostituito il compressore, non è stato comunque rimosso, per le ragioni descritte sopra. L'ingresso dell'olio è posto in alto al reattore, nella quarta posizione, questa è una particolarità rispetto agli altri sistemi, mentre l'ingresso del terreno di idratazione si ha dal basso, miscelandolo con il Biogas ricircolato. Si è deciso di prevedere due diversi ingressi per HM e WCO in quanto, nell'ottica di voler lavorare in continuo, non sono matrici perfettamente miscibili tra loro. Il recupero del terreno esausto si ha dall'uscita in posizione centrale, partendo dal basso, la prima uscita, in quanto in tale posizione, si recupera più facilmente la parte di HM esausto, senza raccogliere il WCO non ancora digerito ed evitando il washout della biomassa.



Fig. 29. Configurazione finale: 1-Reattore Gas-lift, 2-gorgogliatore, 3-pompa ricircolo biogas, 4-sacca biogas, 5-bagnetto termostato. 6-CSTR, 7-agitatore magnetico

Siamo passati agli esperimenti in batch, valutando l'andamento della produzione di Biogas, utilizzando come substrato per entrambi, il terreno di idratazione HM, utilizzato nelle precedenti prove e il WCO Rimondi R3P, (vedi capitolo 3.1).

Il reattore inoltre è stato inoculato con l'inoculo CREA, preparato sempre nelle medesime modalità degli altri esperimenti e il terreno d'idratazione HM, secondo le seguenti quantità, riportate in **Tabella 8**, sia per GAS-LIFT che per CSTR. Prima di essere inoculato il reattore è stato flussato con solo azoto per eliminare eventuali tracce di aria. Le quantità del CSTR sono un sesto di quelle nel GAS-LIFT, per motivi di dimensioni, il primo è molto più piccolo del secondo per cui abbiamo mantenuto costanti i rapporti tra i materiali utilizzati, per poter confrontare entrambi i reattori. Inoltre il rapporto olio/inoculo (0.1) è lo stesso dei microcosmi delle prove precedenti contenenti 5ml di inoculo e 0,5 g di WCO, mentre per quanto riguarda il terreno è stato usato in proporzione, ma in quantità superiore rispetto alle prove precedenti, come se avessimo utilizzato 35 ml di terreno nelle prove con i microcosmi. In questo caso, la quantità di terreno è stata aumentata per verificare se effettivamente l'agitazione pneumatica potesse velocizzare la digestione anaerobica, ed anche per motivi logistici. Utilizzando un volume intorno ad 1 litro potevamo raggiungere con la fase idratante l'altezza del reattore, che permettesse un opportuno rimescolamento e rendesse più semplici le successive fasi di rimozione del terreno esausto, nell'ottica di lavorare in continuo.

	GAS-LIFT	CSTR
WCO (R3P)	15 g	2,5g
INOCULO	150 ml	25 ml
HM	1050 ml	175 ml

Tab. 8. Quantità utilizzate per Gas-lift e CSTR.

La prova è durata all'incirca 50 giorni, ad una temperatura costante di 35°C, mantenuta grazie ad un bagnetto termostato utilizzato per entrambi i reattori, per cui la temperatura è stata la stessa per entrambi, in qualsiasi momento.

Le analisi di COD disciolto, azoto ammoniacale e totale disciolto, VFA e LCFA, analisi del biogas e pH, sono stata effettuate all'inizio della prova e periodicamente ogni settimana prelevando un'aliquota di 2ml da entrambi i reattori per effettuare le analisi, per valutare l'andamento della digestione in entrambi i reattori. Il pH, non è stato mai modificato manualmente, ma solo misurato e nel tempo è rimasto costante all'interno di entrambi i reattori, che non erano forniti di pHmetro in linea, per cui veniva misurato settimanalmente sul campione prelevato mediante indicatore di pH, come descritto in precedenza.

Il ricircolo del biogas si è avuto mediante una pompa peristaltica che ha garantito un flusso moderato ma costante nel tempo all'interno del Gas-lift, di circa $0,6\text{ml s}^{-1}$ mentre si è cercato di mantenere l'agitazione tramite ancoretta collegata ad un piccolo agitatore, ad una velocità confrontabile con quella del Gas-lift.

3.4 PREPARAZIONE DELL'INOCULO

L'inoculo è stato preparato utilizzando il liquame suino tal quale [54]. La frazione liquida del liquame suino è stata prelevata all'uscita del separatore solido/liquido. Duecento millilitri di liquame suino sono stati miscelati con 200 ml di terreno d'idratazione sterilizzato (HM), contenente $348\text{ mg L}^{-1}\text{ K}_2\text{HPO}_4$, $227\text{ mg L}^{-1}\text{ KH}_2\text{PO}_4$, $500\text{ mg L}^{-1}\text{ NH}_4\text{Cl}$, $200\text{ mg L}^{-1}\text{ MgCl}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $250\text{ mg L}^{-1}\text{ CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $2.25\text{ g L}^{-1}\text{ NaCl}$, $300\text{ mg L}^{-1}\text{ L-cisteina}$, $300\text{ mg L}^{-1}\text{ Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ e 0.1% resazurina, in bottiglie da 500 ml con un'atmosfera di $\text{N}_2\text{-CO}_2$ (80:20). La miscela liquame suino e HM è stata incubata a 35 °C. L'inoculo è stato considerato pronto quando la produzione di gas si è fermata,

indicando il completo esaurimento delle sostanze nutritive inizialmente presenti nel liquame suino. A questo punto la miscela è stata centrifugata e il pellet è stato risospeso in 40 mL di HM in condizioni anaerobiche. L'inoculo è stato utilizzato così, senza alcun pre-trattamento. La composizione degli inoculi utilizzati nelle varie prove è riportata nella **tabella 9**, con le medie e le deviazioni standard (ds) dei parametri analitici, per 4 record utilizzati nelle nostre prove, selezionati nel database:

	<i>medie</i>	<i>ds</i>
Solidi totali (ST), % tq	9.26	1.61
Solidi volatili, % tq	5.02	0.71
Ceneri, % tq	4.25	1.02
N totale, % tq	0.49	0.07
N-NH ₄ , % tq	0.21	0.02
P totale, %	0.30	0.12
C organico, % ST	27.2	3.62
pH	7.68	0.33
Alcalinità, mg/L CaCO ₃	16186	2645

Tab. 9. Composizione dell'inoculo

3.5 METODI D'ANALISI

La composizione del biogas è stata misurata con un gascromatografo (GC) MicroGC Agilent 3000 (Agilent Technologies, U.S.A.), equipaggiato con 2 colonne: Molsieve e Plot U per la misura della composizione e concentrazione del biogas (H₂, CH₄ e CO₂, H₂S); un detector TCD ed argon come gas carrier. Le misurazioni del biogas sono state fatte in accordo con quanto riportato in [55]. Il biogas è stato raccolto in siringhe di vetro da 100 mL (Poulsen & Graf GmbH, Germania), come descritto in [44]. Le siringhe contenenti il biogas erano provviste di un tubo di lattice (diametro interno, 3 mm, provvisto di morsetti per eventuale chiusura se non utilizzato), per connettersi

all'entrata del MicroGC. Prima di ogni iniezione, parte del gas veniva spinta fuori per ripulire la linea di iniezione.

Il WCO utilizzato nelle differenti prove è stato analizzato secondo il regolamento UE 2016/1227. L'acidità dell'olio è stata determinata mediante titolazione con KOH in etere dietilico e una soluzione di etanolo con fenolftaleina come indicatore. Il numero di saponificazione è stato determinato mediante titolazione del KOH in eccesso con fenolftaleina come indicatore. Il contenuto di olio residuo nei digestati è stato determinato secondo il metodo di Brooksbank *et al.* [56], con una modifica, in quanto dopo l'estrazione lipidica con solvente (è stato usato etere al posto del diclorometano), essiccato con un evaporatore rotante ed è stato misurato il grasso residuo.

Per quanto riguarda l'analisi dei solidi totali (TS), e solidi volatili (VS), N totale e ammoniacale e pH, sono stati determinati come descritto in [57]. I solidi totali sono stati misurati gravimetricamente come la differenza del peso del campione prima e dopo un trattamento termico a 105 °C in stufa (GR-Therm 115, F.lli GALLI G.& P., Italia) fino a peso costante. I solidi volatili sono stati calcolati come la differenza tra TS e le ceneri. Le ceneri sono state determinate con l'incenerimento in una muffola (B180, Nabertherm, Germania) a 550 °C per 10 ore. Il COD è stato determinato attraverso l'ossidazione del dicromato usando un TecatorR Digester (Foss, Danimarca) come fonte di calore e un condensatore a ricadere. L' N totale e ammoniacale sono stati determinati tramite distillazione con un apparato Kjeldhal (Kjeltec™ 2300 Foss, Danimarca), rispettivamente con o senza digestione acida con H₂SO₄ (Sigma-Aldrich, Germania) e Cu (Pellet Kjeltabs™ CM AA50, Thompson Capper, UK) come catalizzatore.

Inoltre COD totale e disciolto, N totale e ammoniacale, sono stati determinati mediante i test in cuvetta LCK (Hach-Lange GmbH, Dusseldorf, Germany) e uno spettrofotometro DR2800 (Hach-Lange GmbH).

Il pH è stato determinato con un pH-metro Crison Titromatic 1S equipaggiato con un elettrodo 5203 (Hach, USA). inoltre il pH iniziale trattandosi di un sistema bifasico è stato determinato anche utilizzando cartine al tornasole (Macherey-Nagel) nell'intervallo 7,2-9,7 (con intervalli di 0,3) o 9-13 (con intervalli di 0,5), a seconda del valore del pH da determinare.

Gli acidi grassi volatili (VFA) sono stati determinati mediante HPLC 1260 Infinity system (Agilent Technologies) equipaggiata di un Refractive Index Detector (HPLC-RID), mediante metodo isotermico e isocratico con portata di 0,6mL / min; temperatura della colonna 65 °C; temperatura del detector 40°C; fase mobile costituita da acqua deionizzata e lo 0,005% (peso / volume) di acido solforico; tempo di analisi di 90 minuti e volume del campione iniettato 20µL.

3.6 ANALISI DEI DATI

I parametri delle curve di produzione cumulative di CH₄ sono stati valutati mediante un'equazione di Gompertz a 3 parametri modificata (Eq.1):

$$(1) M(t) = M_{max} \exp \left\{ -\exp \left[\left(\frac{e R_{max}}{M_{max}} \right) (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$$

Dove: M (t) (mL CH₄ (STP)) è la quantità totale di CH₄ prodotta al tempo di incubazione t (d), in condizioni standard (STP) di temperatura (273°K) e pressione (101 kPa). e è l'exp di 1; Mmax (ml CH₄) è la produzione cumulativa CH₄ massima; R (ml CH₄ d⁻¹) è la frequenza massima giornaliera di accumulo di CH₄; e λ è la durata del tempo di ritardo (d), cioè il tempo

dell'adattamento microbico prima della produzione esponenziale di CH₄. Questa funzione è utile quando si interpolano le curve di crescita, in generale, e le curve di crescita microbica, in particolare [58].

Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando le procedure del pacchetto SAS [59].

L'adattamento del modello Gompertz alle misure è stato eseguito utilizzando PROC NLIN; i valori dei parametri sono stati stimati secondo il metodo di Gauss-Newton. Il tempo (d) necessario per raggiungere Mmax è stato stimato calcolando il rapporto Mmax / R e sommando al quoziente la durata del tempo di latenza. PROC LIN è stato utilizzato per l'analisi di regressione dei valori dei parametri di Gompertz rispetto ai livelli di MD, o rispetto alla concentrazione di KOH.

Quando non è stato usato il modello di Gompertz, sono stati utilizzati come indicatori di forma delle curve di accumulo del metano i seguenti punti di misura:

- produzione di CH₄(STP) cumulata dopo un mese: come indice di tasso di accumulo;
- produzione di CH₄(STP) cumulata finale: come indice di potenziale massimo di accumulo.

Il metodo utilizzato per il calcolo del metano prodotto sia nei microcosmi che nella sacchetta del reattore GAS-LIFT è stato il seguente:

-ml di metano nella siringa/sacchetta (**A**): volume di gas nella siringa/sacchetta x % metano alla misura al tempo t

- ml CH₄ nello spazio di testa (HS) al tempo t (**B**): percentuale di gas alla misura al tempo t * mL HS

-ml CH₄ cumulati al tempo t (**C**): quelli cumulati nella siringa/sacchetta fino alla misura precedente, più quelli nella siringa/sacchetta alla misura (tempo t)

-mL CH₄ totali alla misura (non cumulati): **A+B**

- ml CH₄ cumulati TOTALI, al tempo t: **B+C**

4. RISULTATI

4.1 ESPERIMENTO "A": VARIAZIONE DEL VOLUME DI IDRATAZIONE

La produzione di metano (Fig. 30) si è fermata quasi subito, 15 giorni dopo l'inizio dell'incubazione, nei reattori senza HM (rapporto OtoW=100). Nei reattori in cui OtoW era intermedio (50 e 25), la produzione di CH₄ è aumentata più rapidamente rispetto a quelli in cui OtoW era minore (14 e 9). Alla fine dell'esperimento, tutte le curve avevano raggiunto il plateau, ad eccezione del trattamento con OtoW=100. Il valore medio misurato della produzione di CH₄ accumulato, 3 mesi dopo l'inizio dell'incubazione, è stato di 421 ml CH₄ (STP) (SD: 24.1 ml), corrispondente a 842 ml di CH₄ g⁻¹ WCO.

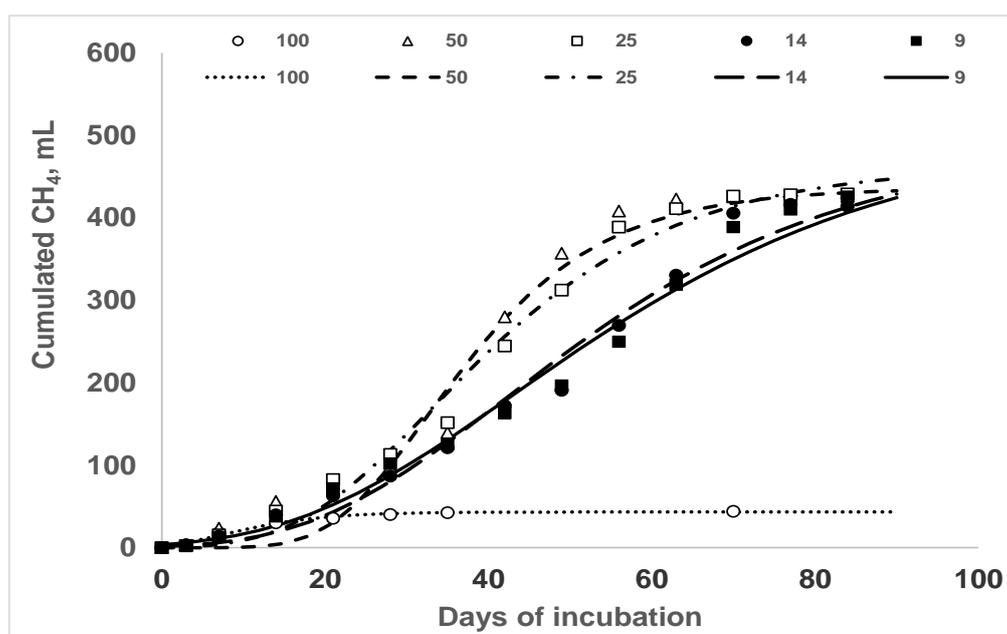


Fig. 30. Accumulo di metano prodotto da olio di risulta durante il periodo di incubazione nei reattori con diversi rapporti OtoW (100, 50, 25, 14, 9) tra microrganismi e substrato. I punti sono i valori medi misurati; le linee sono i valori stimati usando l'equazione di Gompertz

Anche se i modelli erano tutti molto significativi ($P < 0,0001$), il modello ha sovrastimato M_{max} . In effetti, la media M_{max} stimata per gli stessi trattamenti (50, 25, 14 e 9) era di 483 ml (**Fig. 31a**), il 17% in più della media della produzione di CH_4 misurata alla fine del periodo di incubazione. Il motivo di questa sovrastima potrebbe essere attribuito alla tendenza quasi lineare di accumulo di CH_4 , osservata per i rapporti OtoW 14 e 9, nella prima fase di DA, e un recupero della velocità di accumulo di CH_4 , a partire da 50 giorni di incubazione. Questo modello di accumulo di CH_4 ha dato origine a una curva più simile a un tipo segmentato [60], che a un modello di Gompertz.

I parametri di Gompertz sono stati usati per studiare la relazione tra il rapporto OtoW e le performance di DA (**Fig. 31**)

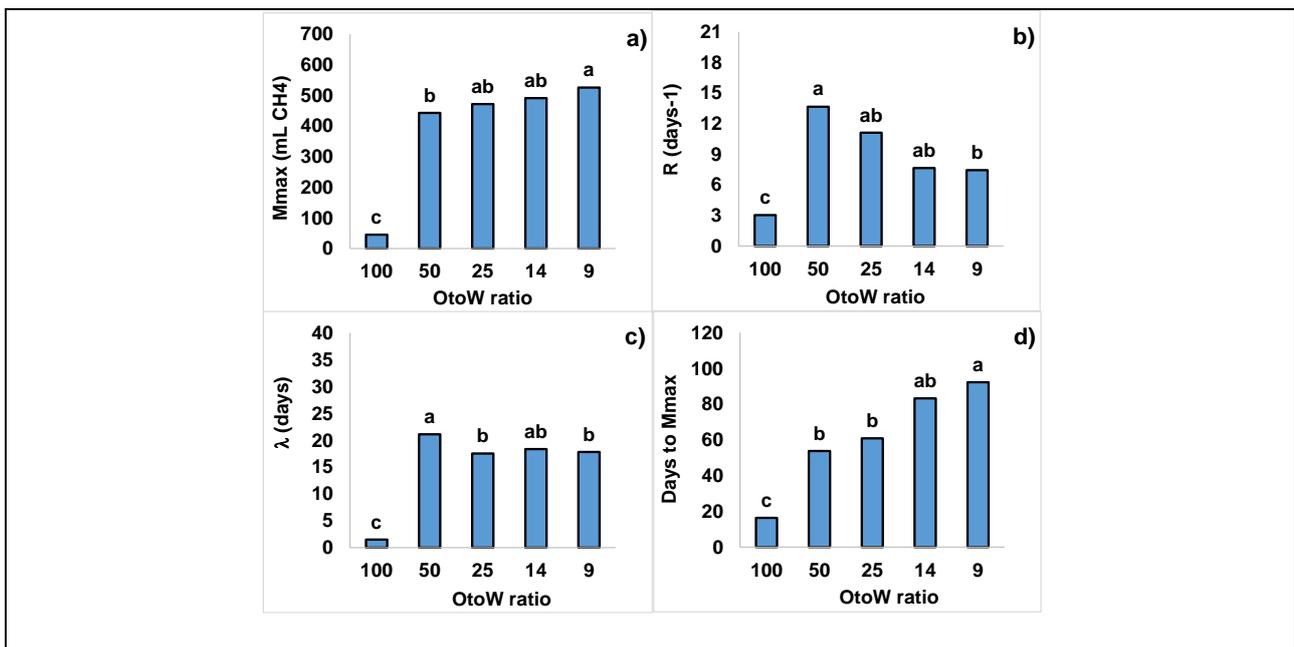


Fig. 31. Influenza del rapporto OtoW sui valori dei parametri derivati da Gompertz che descrivono la produzione di CH_4 dall'olio esausto: **a)** produzione massima di CH_4 , M_{max} (HSD: 67.2 mL CH_4); **b)** velocità massima di produzione di CH_4 , R (HSD: 3.9 days-1); **c)** durata della *fase lag*, λ (HSD: 2.9 days); **d)** tempo per raggiungere la M_{max} (*Days to Mmax*) (HSD: 29.6 days). Le barre verticali sono le deviazioni standard delle medie.

Il trattamento con $OtoW=100$ (nessun HM nella miscela) differiva da tutti gli altri. In quanto, in queste condizioni, sia la durata della fase lag che il tempo per raggiungere il plateau della produzione di CH_4 , erano molto brevi, ma la quantità massima di CH_4 accumulato in questo caso era molto bassa: solo 47 ml di CH_4 , solo per uno dei tre reattori replicati. Il metano non è stato prodotto affatto, negli altri due reattori. I valori di M_{max} erano abbastanza simili per gli altri trattamenti (**Fig. 31a**), nonostante la significativa differenza tra i rapporti $OtoW$ 50 e 9, specialmente considerando la sovrastima di M_{max} in confronto con i valori misurati e la non significatività delle differenze tra i trattamenti per la quantità massima misurata di CH_4 . La velocità di produzione del metano (**Fig. 31b**) diminuiva dal rapporto $OtoW$ 50 a 9. Al rapporto $OtoW = 9$ era il 55% di quella al rapporto $OtoW = 50$. Anche la durata della fase lag era inferiore per $OtoW = 9$, anche se la differenza tra i rapporti $OtoW$ 50 e 9 era di 3,3 giorni, che è un tempo breve in confronto con la durata complessiva dell'incubazione. D'altra parte, il tempo per raggiungere il plateau, sommato all'effetto della fase lag e della velocità di produzione di metano si è ridotta di quasi 40 giorni, all'aumentare del rapporto $OtoW$ da 9 a 50.

4.2 ESPERIMENTO "B": VARIAZIONE DELL'INTERFACCIA A PARITÀ DEL RAPPORTO

OtoW

Per i trattamenti V50, V100 e V500 abbiamo misurato il metano cumulato in 100 giorni, il cui andamento è riportato nella **Fig.32**.

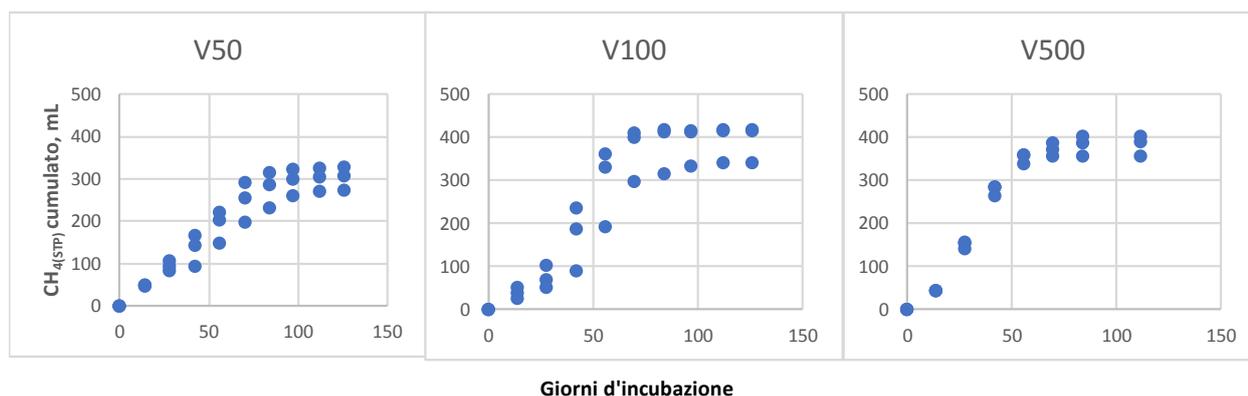
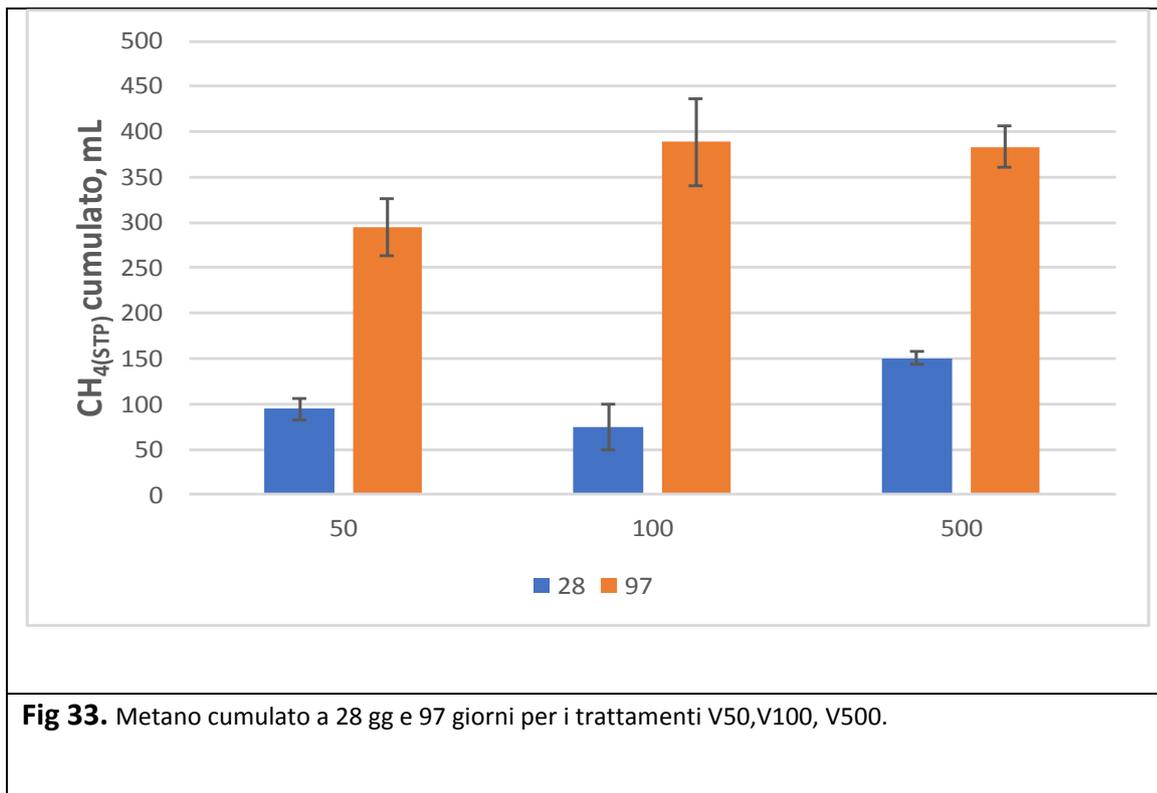


Fig. 32. Confronto del metano cumulato in 100 giorni per V50, V100, V500.

Per ciascun trattamento le tre repliche seguono fra loro lo stesso andamento, anche se i risultati sono maggiormente riproducibili passando da V100, a V50, fino a V500, dove si è avuta la maggiore riproducibilità delle repliche.

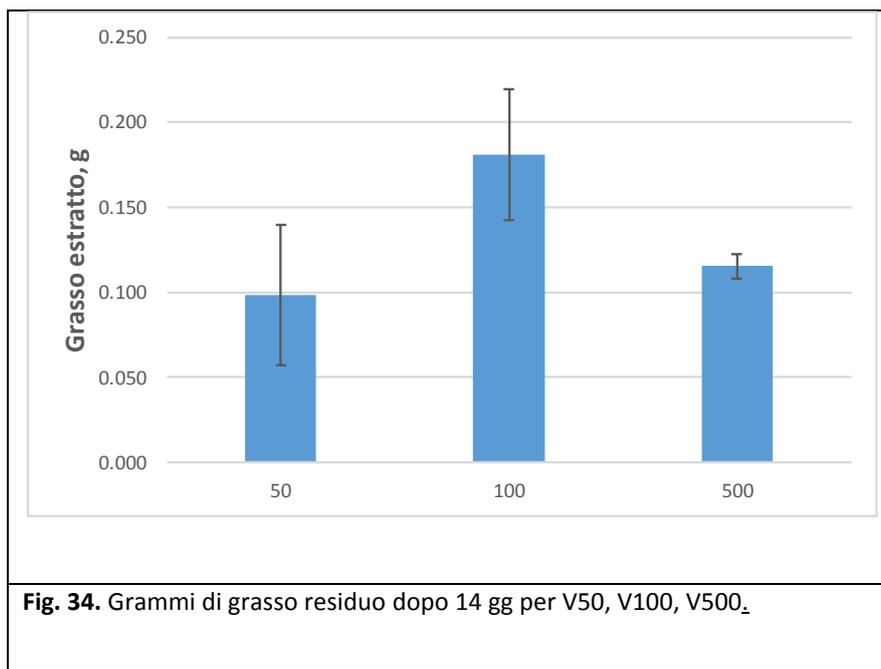
A un mese dall'inoculo tutti i trattamenti avevano terminato la fase di latenza e si trovavano in fase lineare di accumulo di metano. Dopo 100 gg tutti hanno raggiunto il plateau. Per cui, prendendo in considerazione la **Fig. 33** dove abbiamo il volume complessivo di metano prodotto dopo 28 e 97 gg in relazione al volume del microcosmo (50, 100 e 500 ml nominali), consideriamo la produzione a 28 gg come indicatore di velocità e a 97 gg come indicatore di quantità massima di metano prodotto da 0.5 g di olio.



Dalla **Fig. 33** si evince che:

- ✓ il V500 è il più veloce (non ci sono differenze tra V50 e V100 nella velocità);
- ✓ Il V50 produce complessivamente meno (non ci sono differenze fra V100 e V500).

Abbiamo valutato i grammi di grasso residuo per ogni trattamento, dopo 14 giorni, quindi prima dell'inizio della fase lineare di produzione di metano (**Fig. 34**). In questo il V50 e V100 sembrano avere la minore quantità di grasso residua, anche se poi come detto sopra a V50 corrisponderà il minore accumulo di metano. Mentre V100 presenta la maggiore quantità di grasso residua.



4.3 ESPERIMENTO "C": PROVA DI EMULSIONE CON KOH

L'accumulo di metano è iniziato prima per quei reattori contenenti KOH compreso nell'intervallo 0-0,15 ml, ma con una velocità maggiore nei reattori contenenti KOH rispetto al controllo senza KOH (**Fig. 35**). Nei reattori di controllo, la produzione di CH₄ è iniziata prima rispetto ai reattori contenenti KOH. Tuttavia, 50 giorni dopo l'inizio dell'incubazione, ha continuato ad un ritmo più lento rispetto agli altri trattamenti. La produzione media di CH₄ misurata per tutti i trattamenti con KOH alla fine dell'esperimento era 443 ml CH₄ (STP), (SD: 33,8 ml) che è 886 ml di CH₄ g⁻¹ di olio, una resa di CH₄ molto vicina a quella teorica.

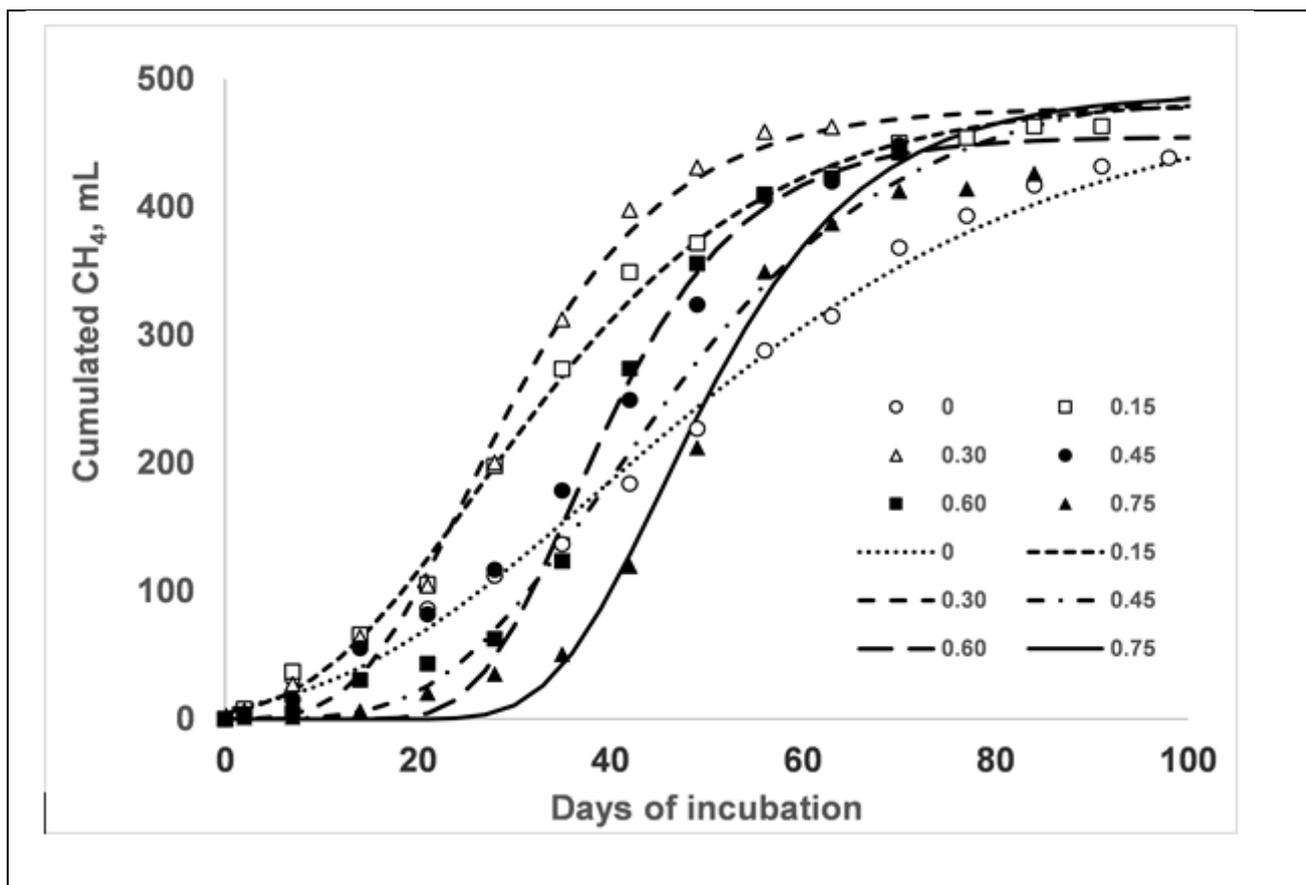


Fig. 35. Accumulo di metano durante il periodo di incubazione dell'olio alimentare esausto in reattori contenenti diverse quantità di KOH 1M (0, 0,15, 0,30, 0,45, 0,60 e 0,75 ml). I punti sono i valori medi misurati; le linee sono i valori stimati usando l'equazione di Gompertz

Dei campioni è stato misurato il pH iniziale e finale e la percentuale di olio residuo rispetto al contenuto di partenza, i valori ottenuti sono riportati in **tabella 10**.

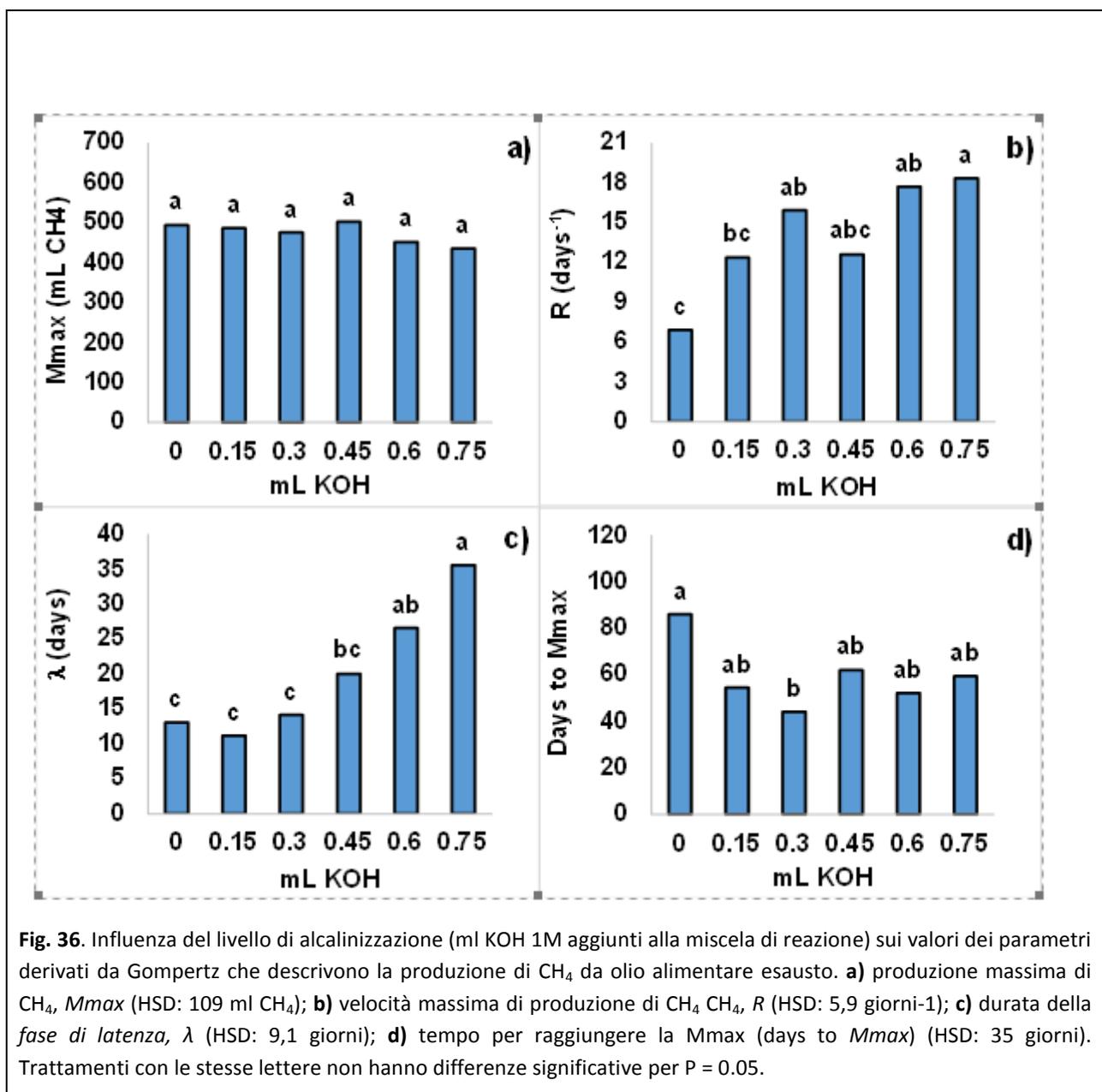
Tabella 10. Valori di pH iniziale e finale e contenuto di WCO residuo, in base alla quantità di KOH aggiunta ai microcosmi. Deviazione standard tra parentesi.

<i>trattamento</i> <i>(mL KOH)</i>	<i>pH iniziale</i>	<i>pH finale</i>	<i>WCO residuo</i> <i>(% dell'iniziale)</i>
0	6.74 (0.05)	8.49 (0.17)	0.30 (0.19)
0.15	8.60 (0.31)	8.54 (0.06)	0.25 (0.02)
0.30	9.22 (0.09)	8.24 (0.01)	0.18 (0.05)
0.45	9.42 (0.10)	8.45 (0.11)	0.29 (0.04)
0.60	9.76 (0.11)	8.47 (0.08)	0.32 (0.20)
0.75	10.10 (0.35)	8.40 (0.13)	1.69 (0.35)

È stata esaminata la relazione tra i valori dei parametri di Gompertz e i livelli di alcalinizzazione (**Fig. 36**). Tra le repliche, per i reattori con KOH, si è osservata una certa variabilità, che ha potuto comportare un aumento della deviazione standard delle medie. Tuttavia, si potrebbero riconoscere le seguenti tendenze: l'aggiunta di KOH non ha influenzato significativamente la Mmax stimata (**Fig. 36a**), che era in media 474 ml CH₄ (+31 ml, rispetto alla quantità media accumulata misurata di CH₄). Il valore di R (**Fig. 36b**) era molto più alto con aggiunta di KOH (15,4 ml CH₄ d⁻¹, in media) che senza aggiunta di KOH (6,9 ml CH₄ d⁻¹). Si è registrata una tendenza ad un aumento di R per livelli crescenti di KOH, anche se solo R per KOH = 0,75 ml era significativamente più alto di R a KOH = 0 e KOH = 0,15 ml. L'aggiunta di KOH ha più che raddoppiato la durata della fase di latenza passando dai 13 giorni, che è la media dei primi 3 livelli di KOH, 0.15-0.45ml, ai 31 giorni, che rappresenta invece la media dei trattamenti da 0,6 e 0,75 ml; (**Fig. 36c**). Poiché i due parametri Mmax e R hanno mostrato tendenze opposte, i loro effetti sono stati bilanciati in Giorni per raggiungere la Mmax (Days to Mmax) (**Fig. 36d**), che è la somma della fase di latenza e del tempo

necessario dall'avvio della produzione di metano per raggiungere il plateau. Come risultato di questa compensazione, le differenze tra i trattamenti in Giorni a M_{max} non erano significative, tranne per il trattamento con 0,3 ml di KOH. In questo caso, c'è stata una riduzione per tale parametro del 51%, rispetto al controllo (da 86 a 44 giorni).

Alla fine della digestione, nei digestati sono state rilevate quantità minime di WCO residuo, con residui di olio leggermente più alti nei reattori contenenti 0,75 ml di KOH (Tabella 10).



4.4 ESPERIMENTO "D": EMULSIONE & VARIAZIONE DEL VOLUME DI IDRATAZIONE

In questo esperimento, mettendo a confronto volumi diversi di HM, e mantenendo costante il pH e il livello di emulsione (Fig. 37), si è visto che dal confronto con i trattamenti a diverso volume di HM, ma senza KOH, per volumi di terreno superiori a 10ml, il metano accumulato è superiore per i trattamenti con emulsione, ad eccezione del trattamento con 10ml di HM (O_T10), che invece mantiene le stesse prestazioni del corrispettivo emulsionato (EO_T10). I differenti volumi emulsionati, presentano prestazioni simili.

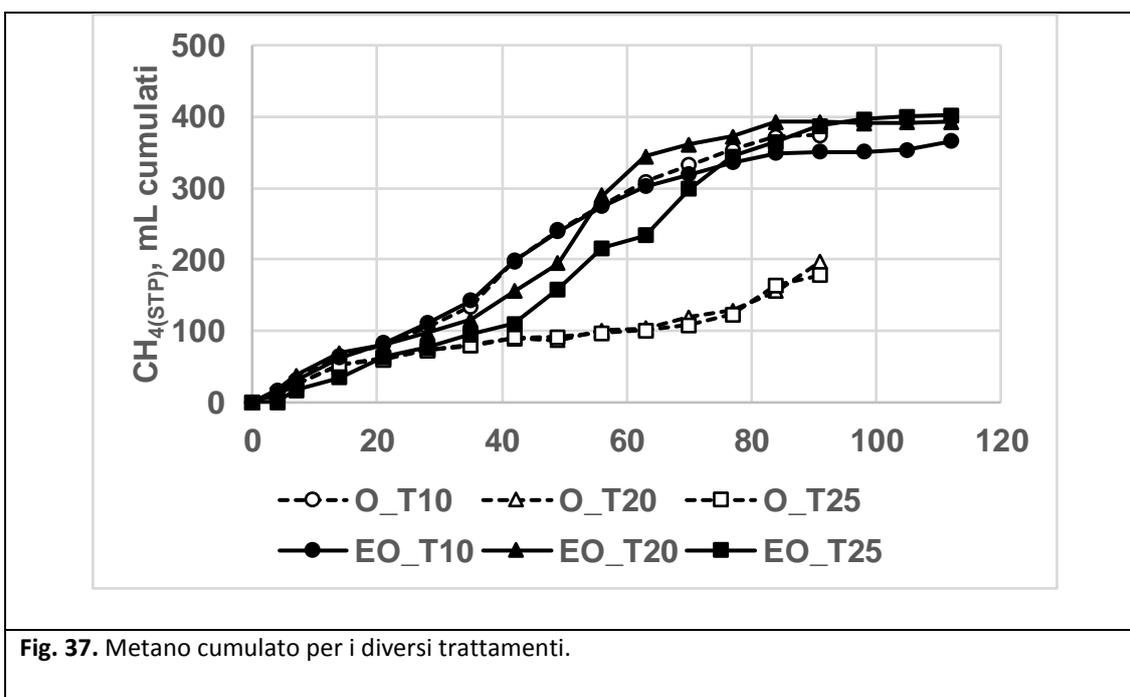
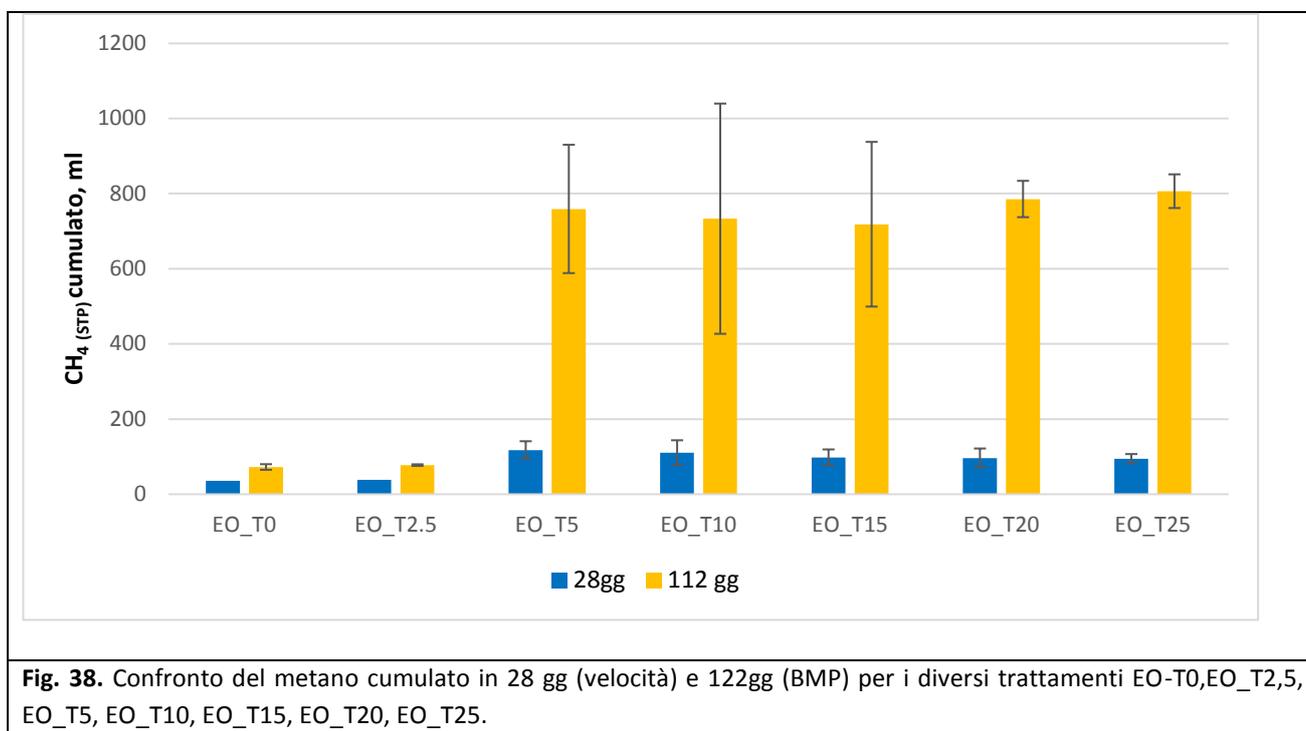


Fig. 37. Metano cumulato per i diversi trattamenti.

Per quanto riguarda invece i diversi livelli di idratazione, con costante emulsione, si è visto che non ci sono differenze sostanziali (se non si considerano le deviazioni standard), tra i trattamenti superiori a 2,5ml HM, che invece presentano valori di gran lunga inferiori di velocità e potenziale di biometanazione (Fig. 38). Però in generale si può notare una maggiore velocità per i trattamenti

EO_T5 e EO_T10, ma una corrispettiva riduzione del BPM, nonostante vi sia però una maggiore variabilità tra le repliche rispetto ai volumi di idratazione maggiori.



4.5 ESPERIMENTO “E”: PROVA CON SEPIOLITE, LIQUAME SUINO E PH

Il metano cumulato in base ai diversi trattamenti descritti precedentemente, è strettamente dipendente dal tipo di trattamento.

Per il trattamento *WCO+PS*, quindi con liquame, sia è avuta la maggiore resa, in termini di metano cumulato e minore durata della fase di latenza, rispetto al controllo *O_T*, (vedi **Fig. 39**) passando dai 50 giorni ai 3 giorni circa, con il raggiungimento della fase di plateau dopo 42 giorni, rispetto al controllo dove dopo 90 giorni la digestione non era terminata. Pur considerando che c'è un piccolo contributo sulla produzione di metano dovuta al liquame *Liq*, la somma di tale contributo al controllo *O_T*, è molto al disotto del trattamento stesso **Fig. 40**.

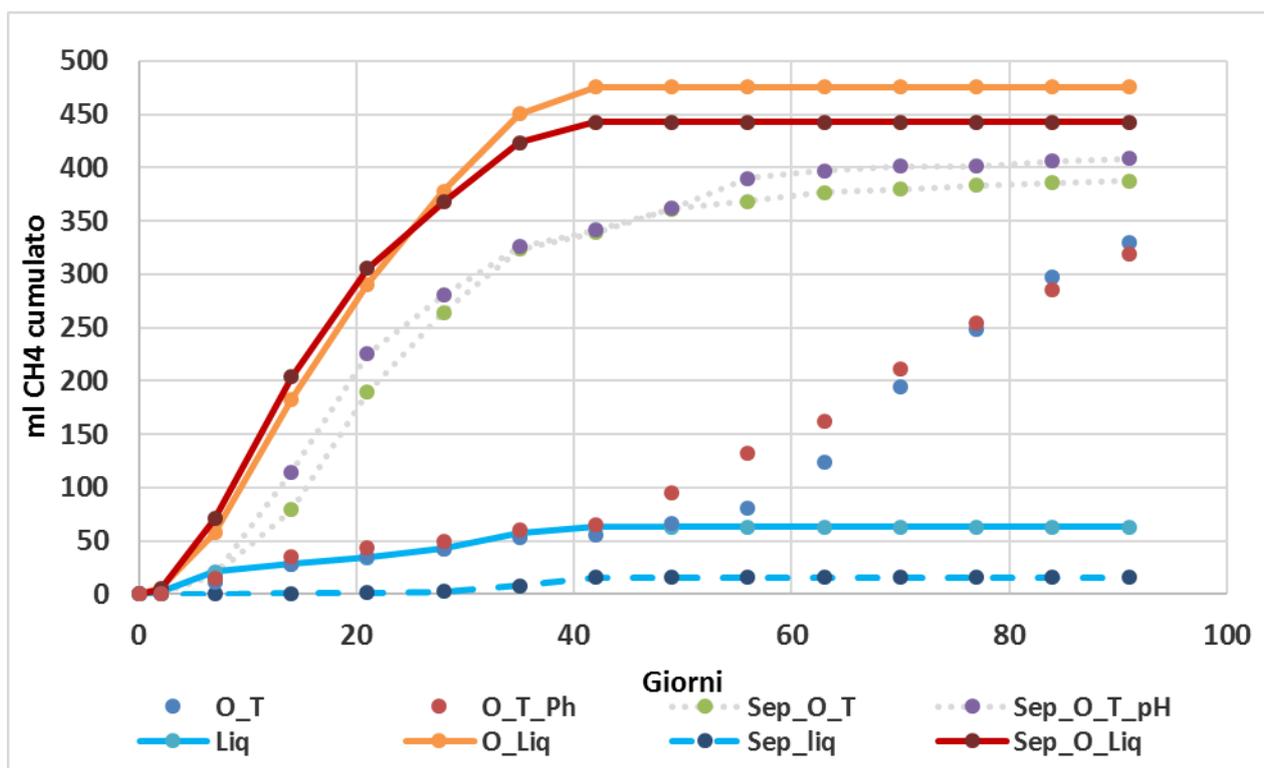


Fig. 39. Metano cumulato per i diversi trattamenti.

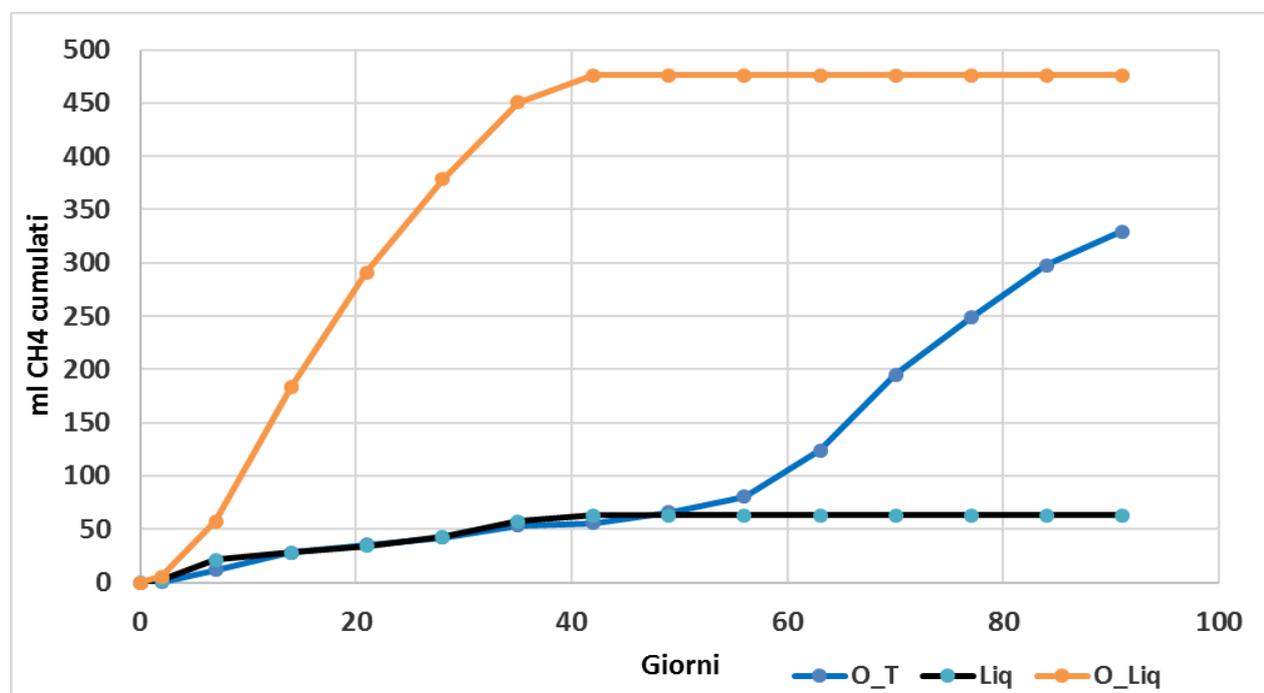


Fig. 40. Metano cumulato per il WCO con e senza liquame

Considerando il trattamento *Sep_O_T*, rispetto al controllo *O_T*, si ha sia un aumento della velocità, una riduzione della fase di latenza da circa 50 giorni per il controllo a 10 giorni per *Sep_O_T* (vedi **Fig. 39**), ed inoltre la digestione si è conclusa dopo 60 giorni circa, mentre per il controllo dopo 90 giorni è stata bloccata. Per il trattamento *Sep_O_Liq*, quindi in presenza sia di sepiolite che liquame, la resa è stata inferiore rispetto al trattamento *O_Liq*, per cui probabilmente l'effetto positivo del liquame viene in parte coperto dalla presenza della sepiolite. L'andamento della digestione per i due trattamenti con sepiolite e terreno o liquame, era simile.

Il controllo *Sep_Liq* comporta un annullamento della produzione di metano data dal solo contributo del liquame.

I trattamenti *Sep_O_T_pH* e *Sep_O_T* sono molto simili, eccetto un leggero aumento della resa e della velocità nel caso del trattamento con modifica del pH, ma lieve, in quanto in certi punti le curve sono sovrapponibili. In questo caso la variazione del pH non dovrebbe aver determinato grossi cambiamenti.

Nel caso del trattamento *O_T_pH*, si è avuta una leggera modifica dell'andamento della curva rispetto al controllo.

4.6 ESPERIMENTO “F”: PROVA CON OLI ALIMENTARI ESAUSTI DI DIVERSA ORIGINE

Dal confronto tra i differenti grafici (**Fig. 41**) relativi ai ml di metano accumulato in funzione del tempo, per mezzo grammo di olio di diversa origine, si vede che le repliche relative ai differenti trattamenti seguono lo stesso andamento, per cui c'è una buona uniformità tra le repliche, anche se per CUC, EVO e R3F le rispettive repliche sono meno uniformi.

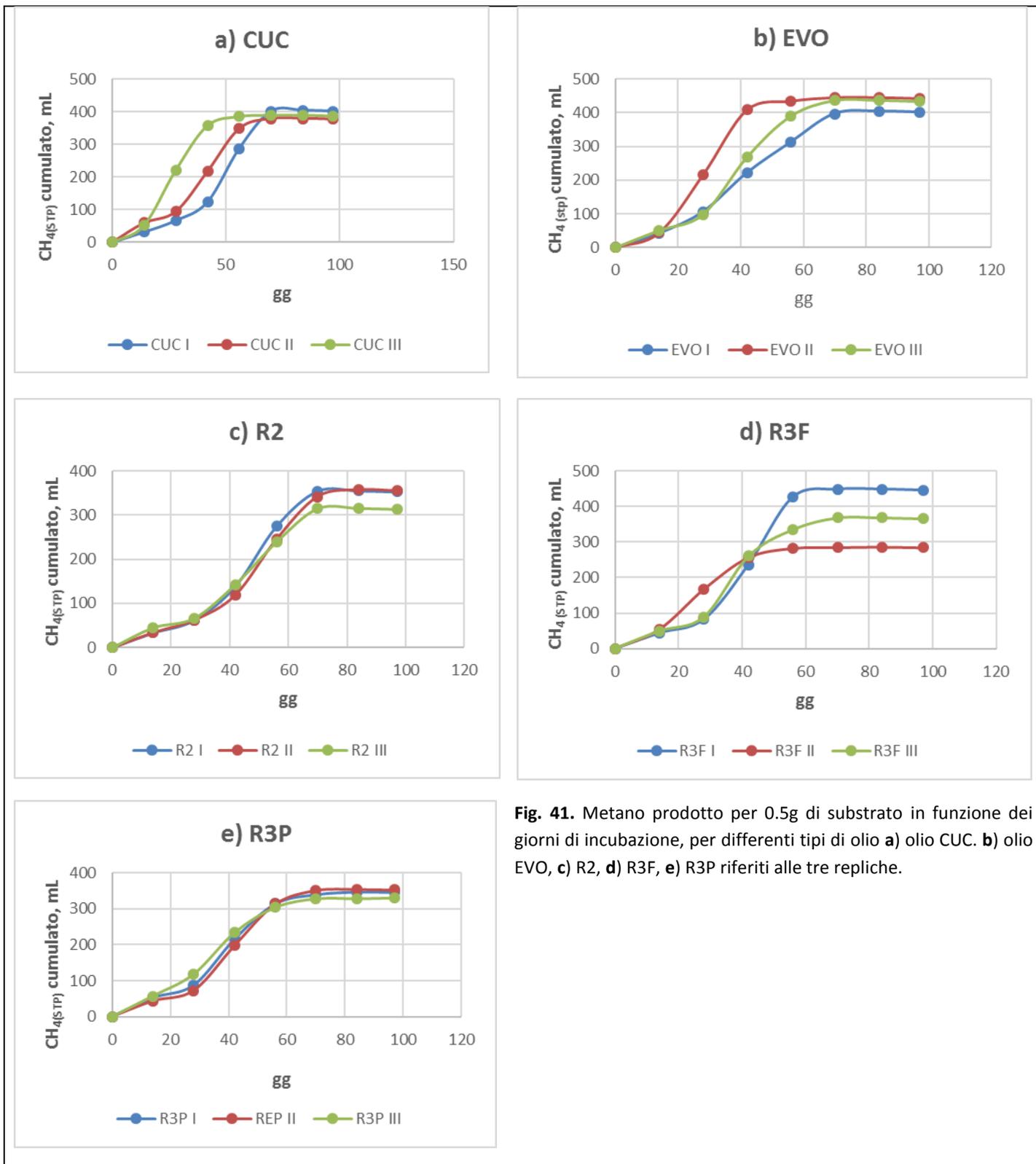


Fig. 41. Metano prodotto per 0.5g di substrato in funzione dei giorni di incubazione, per differenti tipi di olio **a)** olio CUC. **b)** olio EVO, **c)** R2, **d)** R3F, **e)** R3P riferiti alle tre repliche.

La digestione segue lo stesso andamento per tutti i trattamenti. La fase di latenza termina dopo 20 giorni circa per tutti e dopo due mesi entrano in fase stazionaria **Fig. 42.**

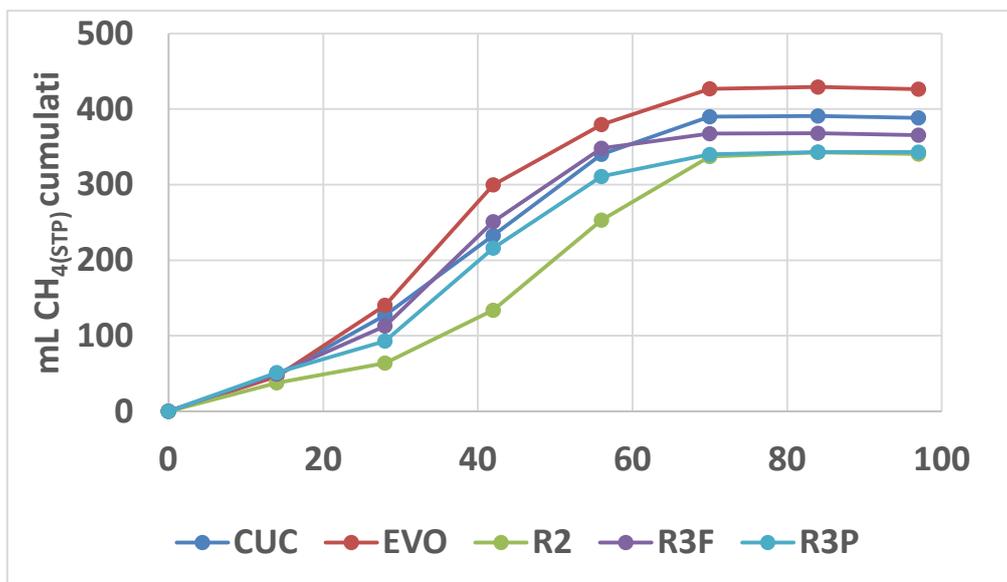


Fig. 42. Confronto dell'andamento del metano cumulato in 105 giorni per i differenti oli.

Per ogni olio è stato considerato il BPM e la velocità (**Tabella 11**). Il BPM è stato calcolato come rapporto tra la media dell'ultimo dato (ml CH₄(STP) a 97 gg) e la quantità di fonte di carbonio nel microcosmo (500 mg), cioè il metano prodotto per grammo di olio. Nonostante l'olio Rimondi R2, abbia una media più bassa, e quello EVO più alta, sia le velocità sia i BMP non sono risultati significativamente diversi, a causa della elevata variabilità tra repliche (vedi scatter dei punti tra 30 e 60 giorni, (**Fig. 41b, c**).

<i>Velocità di accumulo (42 gg)</i>				
<i>CUC</i>	<i>EVO</i>	<i>R2</i>	<i>R3F</i>	<i>R3P</i>
233	300	134	251	216
<i>BMP (97gg)</i>				
<i>CUC</i>	<i>EVO</i>	<i>R2</i>	<i>R3F</i>	<i>R3P</i>
777	853	681	731	686

Tab. 11. Confronto tra velocità di accumulo e BMP calcolati per i differenti oli testati.

Degli oli di diversa origine abbiamo valutato anche la composizione in acidi grassi per capire se le variazioni nell'andamento e accumulo di metano per i diversi oli, potessero essere dovute a differenze nella loro composizione (**Tabella 12**).

	Caprylic acid	Capric acid	Lauric acid	Myristic acid	Palmitic acid	Palmitoleic acid	Stearic acid	Oleic acid	Linoleic acid	Arachidic acid	Linolenic acid	Behenic acid	Erucic acid	Lignoceric acid
ID	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C20:0	C18:3	C22:0	C22:1	C24:0
CUC	0%	0%	0%	0%	20%	0%	6%	70%	0%	1%	1%	1%	0%	0%
R3F	0%	0%	0%	2%	14%	1%	6%	34%	42%	0%	0%	0%	0%	0%
R3P	0%	0%	0%	0%	8%	0%	4%	73%	14%	0%	0%	0%	0%	0%
R2	0%	0%	0%	0%	10%	0%	3%	71%	14%	0%	0%	0%	0%	2%
EVO	0%	0%	0%	0%	15%	1%	3%	71%	9%	0%	1%	0%	0%	0%

Tabella 12. Composizione percentuale in acidi grassi degli oli testati.

EVO ha il minor contenuto tra tutti in acido linoleico, mentre R3F presenta il più alto contenuto in linoleico, ma il più basso in oleico. R3P e R2 presentano la composizione più simile, eccetto per la presenza in R2 dell'acido lignoceric, assente peraltro in tutti gli altri oli testati.

4.7 ESPERIMENTO AIR-LIFT

Premessa:

La parte relativa ai risultati e discussioni di questa esperienza verrà trattata sinteticamente, mettendo in risalto solo gli aspetti principali di tale esperimento, in quanto molto complesso e richiederebbe un discorso molto più ampio, ma che esulerebbe dal discorso generale della mia tesi.

La crescita della biomassa secondo lo schema riportato in **3.3.7**, non è stata semplice, in quanto bisognava ottenere 5 litri di biomassa per ogni reattore, nelle nostre condizioni sperimentali, e fare in modo che la crescita fosse costante per tutte le beute. La maggiore difficoltà è stata l'adattamento iniziale della coltura al tipo di substrato utilizzato, in quanto la velocità di crescita con altri substrati testati in precedenza è stata superiore [52].

Per il set-up del GAS-LIFT è stata necessaria l'alternanza di differenti cicli a maggiore o minore rapporto C/N, in quanto nel nostro caso l'alternanza delle due fasi non era così netta. Il confronto tra le due fasi è stato fatto da [61], dove però non veniva utilizzato un reattore Air-lift, ma un CSTR.

In definitiva si è scelto di seguire l'azoto ammoniacale disciolto, come parametro semplice ed efficace, per comprendere quando ci si poteva trovare nelle condizioni sperimentali giuste per iniziare la fase di accumulo o la fase di crescita:

- ✓ Quando l'N ammoniacale è molto basso, (quasi nullo), si può aggiungere la fonte di C, ovvero l'acqua reflua concentrata ricca in idrocarburi (5 g COD/l) aspettare 4 giorni e al termine al microscopio è possibile verificare che effettivamente le cellule sono rigonfie per l'accumulo di lipidi al proprio interno (biomassa grassa).

- ✓ Successivamente si aggiunge N (NH_4Cl 30mg/L) senza la fonte di carbonio e si attendono 2 giorni per il consumo dei lipidi intracellulari da parte dei batteri, fino a che il livello di N scende nuovamente a zero e si può ripartire con una nuova fase di accumulo di lipidi. Nella **figura 43** sono riportati i valori di N misurati per SBR e Air-lift, prima della freccia in blu, sono variabili per entrambi i reattori, in seguito si è riuscito a garantire le stesse condizioni per entrambi.



Fig. 43. Andamento del consumo dell'Azoto nel tempo, per SBR e AIR-LIFT, durante l'alternanza della fase di crescita o accumulo.

Per entrambi i reattori si sono confrontati i lipidi accumulati a livello intracellulare mediante TLC dell'estratto liofilizzato intracellulare, relativo ai campionamenti effettuati negli ultimi cicli, quando si è riuscito a garantire per entrambi un andamento costante di accumulo e crescita. Dal confronto delle TLC (**Fig. 44 e 45**) si può notare che nell'AIR-LIFT si ha un accumulo maggiore di trigliceridi e acidi grassi liberi, rispetto all'SBR, a parità di biomassa utilizzata per l'estrazione dei grassi.

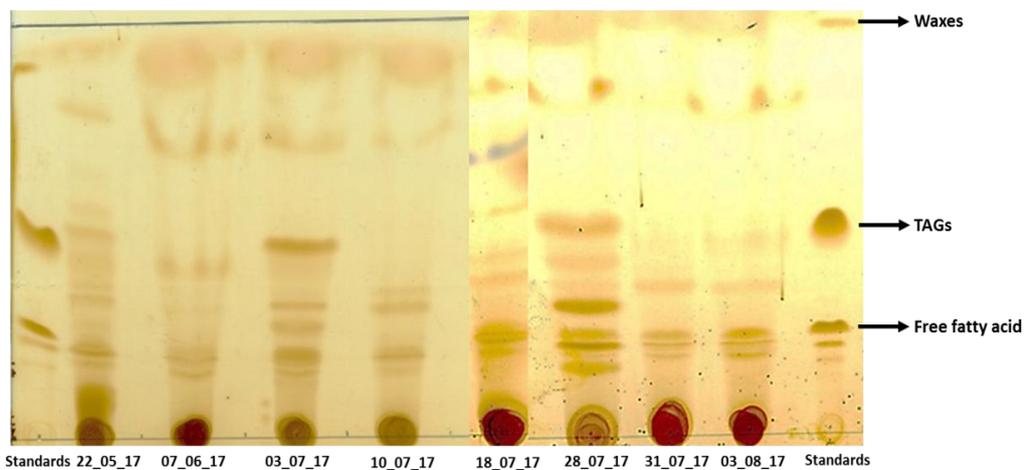


Fig. 44. TLC Air-lift con alternanza di accumulo e consumo dei trigliceridi evidenziati di lato.

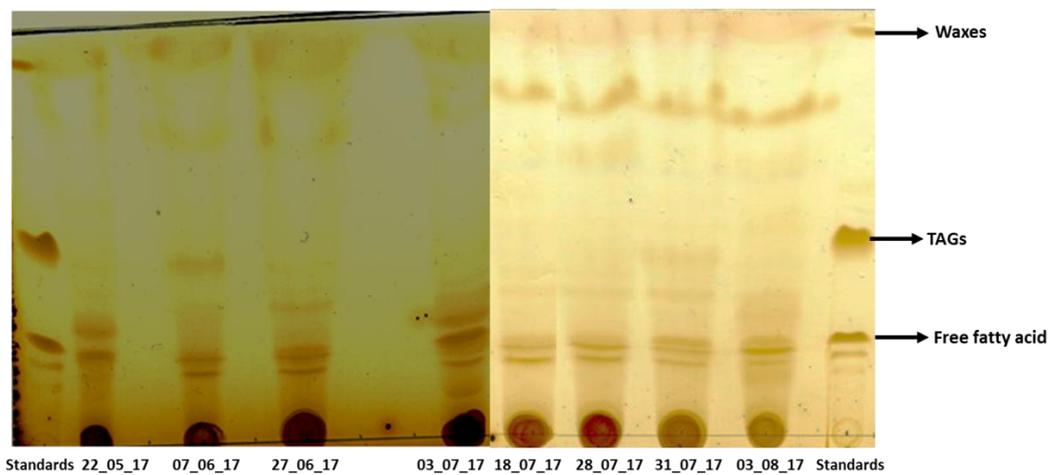


Fig. 45. TLC SBR con alternanza di accumulo e consumo dei trigliceridi evidenziati di lato.

4.8 ESPERIMENTO GAS-LIFT

L'esperimento in batch è durato 51 giorni, in **Fig. 46** è stato riportato l'andamento del metano accumulato, per grammi di WCO utilizzato, sia per il CSTR che per il Gas-lift, calcolato come descritto nel capitolo 3.6. Si può notare che per il Gas-lift l'accumulo del metano si ha già dopo 10 giorni e con una velocità di accumulo maggiore, mentre per il CSTR tende ad aumentare solo dopo 40 giorni dall'inoculo, e solo dopo 50 giorni riesce quasi a raggiungere i livelli di accumulo del Gas-lift.

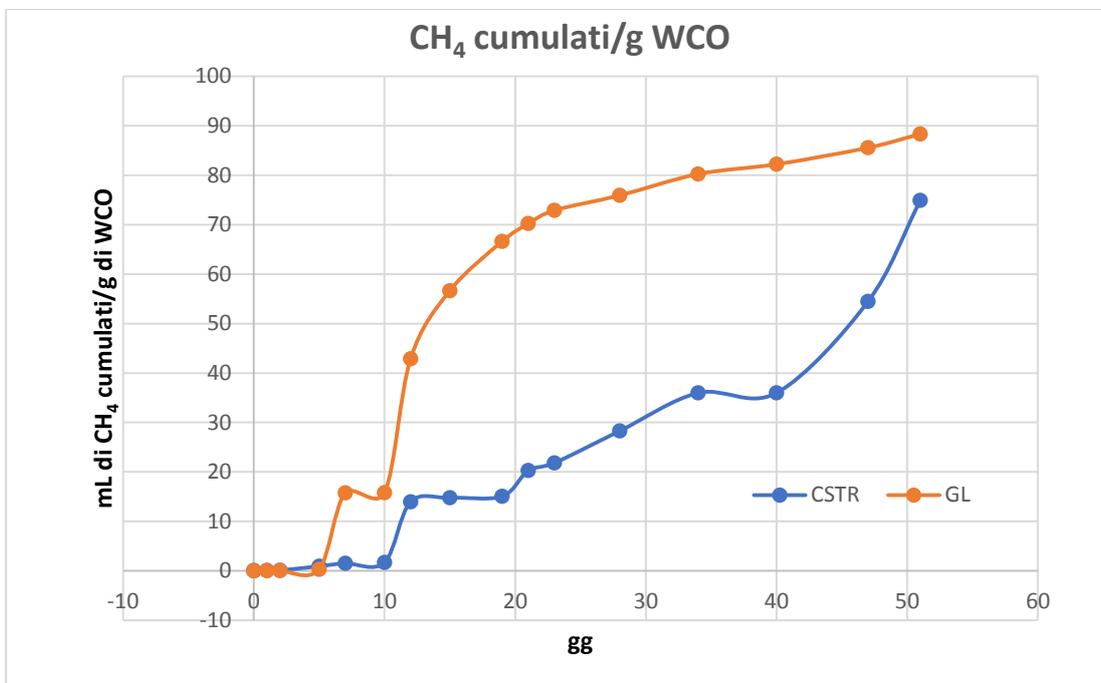
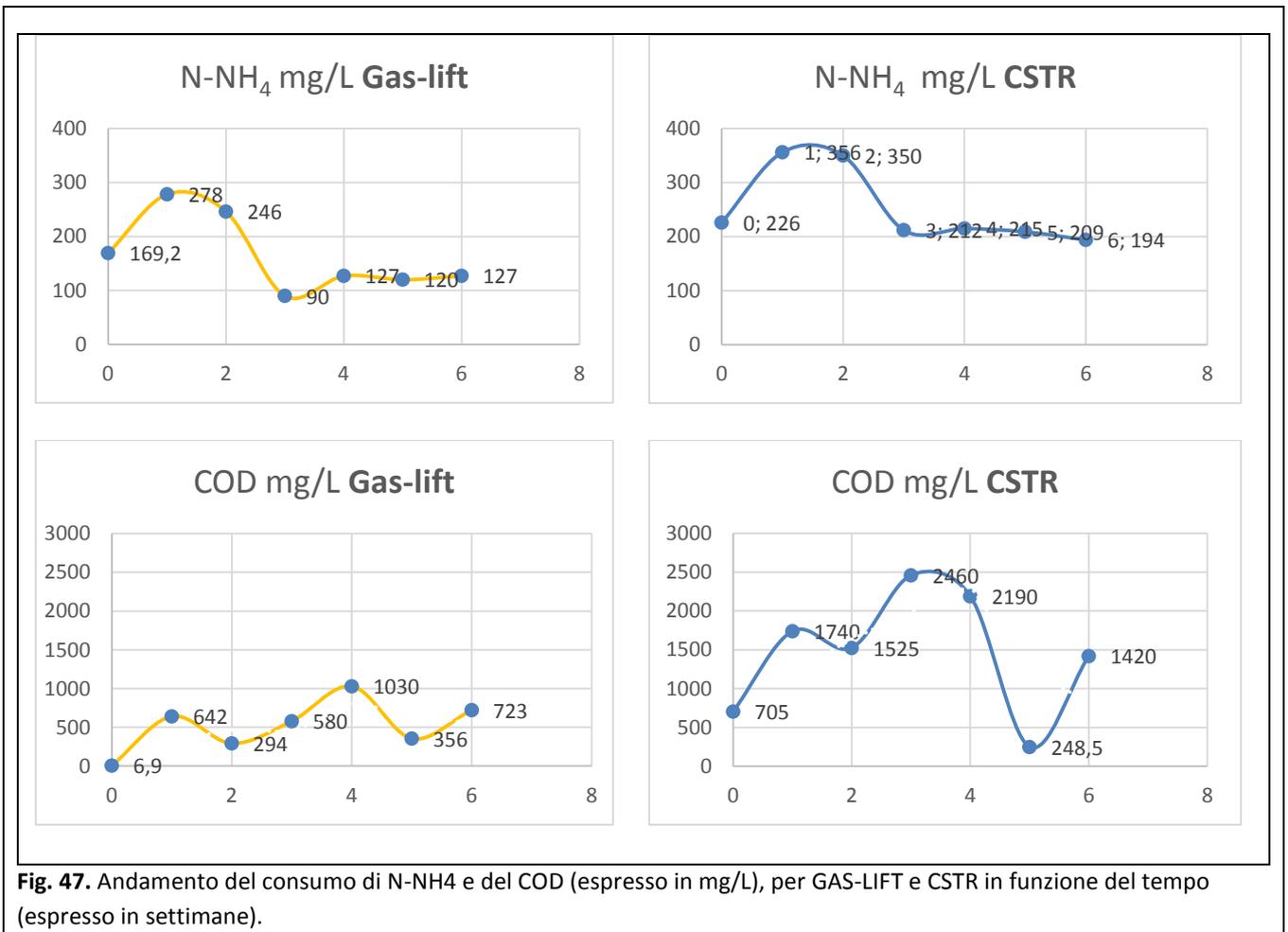


Fig. 46. Confronto del metano accumulato per grammo di WCO, per CSTR e GAS-LIFT

Si è messo a confronto anche l'azoto ammoniacale misurato nei campioni prelevati con cadenza settimanale e il COD disciolto, per entrambi i reattori (**Fig. 47**). Per quanto riguarda l' N-NH_4 , tende ad aumentare la prima settimana, per poi diminuire la seconda settimana, fino a mantenersi a valori costanti, in media più bassi per il Gas-lift e leggermente più alti per il CSTR, comunque compresi tra i 100 e 200mg/L. Per quanto riguarda il COD, segue un andamento, altalenante. Pur

trovandosi inizialmente nelle stesse condizioni, il COD iniziale misurato differisce tra i reattori, molto più basso per il GAS-LIFT che per il CSTR.



Abbiamo misurato anche i VFA presenti nei campioni prelevati settimanalmente. L'esperimento in batch è partito dopo una prima fase di acclimatamento dell'inoculo, valutata come tempo finale, al termine della quale si è ripartiti con le condizioni sperimentali descritte sopra. Si può notare dalla **tabella 13** che per il Gas-lift già dopo la terza settimana non si sono misurate nemmeno quantità irrilevanti di acido acetico e propionico, mentre per il CSTR si può notare un accumulo di propionico e acetico nel tempo, fino anche all'ultima settimana dove compare l'isovalerico e l'eptanoico, seppur in piccolissime concentrazioni.

		tempo finale		tempo zero		1 settimana		2 settimane		3 settimane		4 settimane		5 settimane		6 settimane	
		GAS-LIFT	CSTR	GAS-LIFT	CSTR	GAS-LIFT	CSTR	GAS-LIFT	CSTR	GAS-LIFT	CSTR	GAS-LIFT	CSTR	GAS-LIFT	CSTR	GAS-LIFT	CSTR
VFA mg/L	tempo di ritenzione (min)																
ACETICO	15		28,08			22,18	610,04	23,86	381,54		264,55		139,23		68,501		38,48
propionico	18	406,24	54,18	309,8	216,48	213,08	167,32		286		555,27		270,6		469,99		94,1
isobutirrico	20,8																
butirrico	22,4																
?	23,6	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
isovalerico	26		32,32														24,49
valerico	31																
isocaproico	41		22,92														
caproico	48																
eptanoico	82																12,74

Tab. 13. VFA mg/L misurati ogni settimana per GAS-LIFT e CSTR

E' stato valutato un accumulo nel tempo, per entrambi i reattori di un picco al tempo di ritenzione intorno ai 23 minuti, che non veniva consumato, ma bensì rimaneva come picco costante in entrambi (Fig. 48).

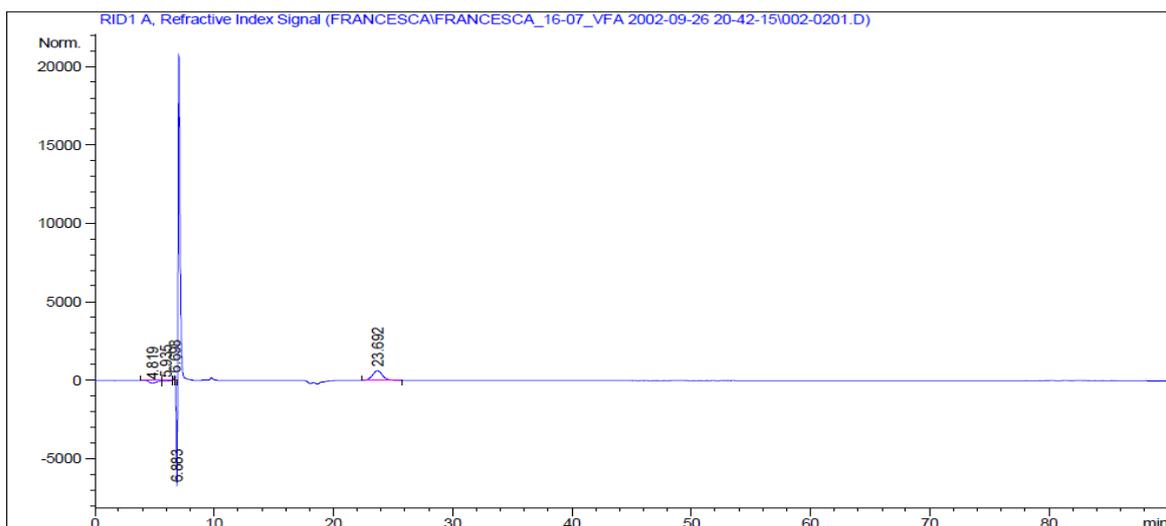


Fig. 48. Cromatogramma del campione prelevato dal Gas-lift con picco visibile al minuto 23.692.

Sono state testate differenti molecole che potessero essere trattenute a tale tempo di ritenzione nelle particolari condizioni della nostra colonna, come:

- 1,3 propandiolo,
- 2,3 butandiolo
- acroleina.

Ma non risulta corrispondenza con il tempo di ritenzione della sostanza incognita. Per quanto riguarda il picco relativo al campione addizionato di acroleina (**Fig. 49**), si è avuto non un unico picco ma tre picchi contigui dal tempo 17 fino al 19. Per cui non sappiamo se tale composto potrebbe essere comunque un derivato sempre dalla frittura degli oli, che però non viene digerito dai microrganismi in quanto tende a rimanere costante nel tempo.

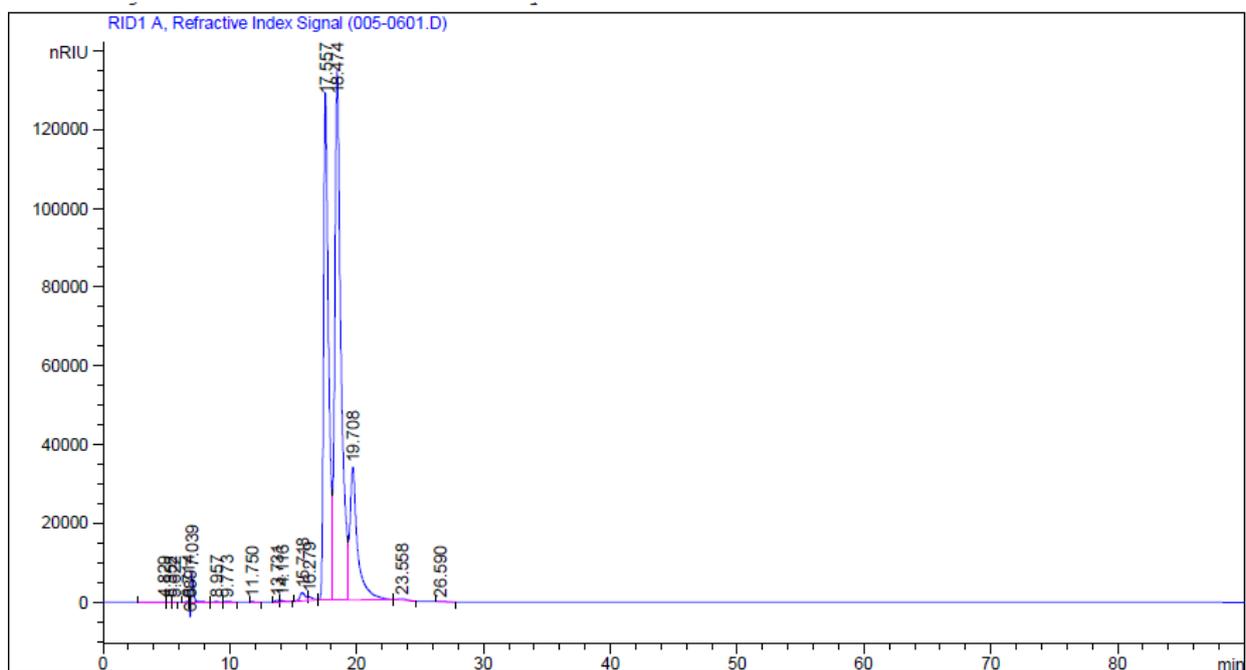


Fig. 49. Cromatogramma del campione prelevato da Gas-lift addizionato di ACROLEINA

5. DISCUSSIONE

5.1 ESPERIMENTO "A": EFFETTO DELLA VARIAZIONE DELL'IDRATAZIONE SULLA DA DEL WCO

In teoria, per il rapporto **OtoW = 100** era prevista la massima M_{max} , a causa della più alta probabilità che l'inoculo raggiungesse il substrato. In realtà, si è avuta la più **bassa produzione** di CH_4 per questo trattamento. Sono possibili diverse motivazioni: per prima cosa, la quantità di fase acquosa potrebbe essere stata insufficiente per diluire gli acidi grassi liberi derivanti dall'idrolisi dei trigliceridi, con un effetto tossico sui consorzi microbici di DA. Infatti, vi è una consolidata conoscenza del fatto che gli LCFA esercitino un effetto tossico sui consorzi metanogenici [62], [63], [64]. Inoltre, nel rapporto $OtoW = 100$, si ha la mancanza di microelementi e vitamine essenziali, dovuti alla mancata presenza di HM. La disponibilità di acqua era insufficiente per l'attività degli enzimi idrolitici.

Da tali osservazioni scaturiscono le seguenti considerazioni:

- ✓ Quantità relativamente basse di fase acquosa sono sufficienti a garantire le stesse rese di CH_4 ottenibili con volumi di idratazione elevati, a parità della quantità di WCO.
- ✓ I volumi eccessivi di fase acquosa in relazione alla quantità di WCO rallentano il processo, poiché diminuisce la probabilità che l'inoculo acceda al substrato. Di conseguenza, il tempo necessario per completare la digestione è più lungo.
- ✓ È possibile che l'agitazione occasionale abbia influenzato in modo diverso su R e Days to M_{max} , a seconda del rapporto $OtoW$. Nei reattori contenenti rapporti $OtoW$ inferiori (14 e 9), la quantità di WCO è la stessa, una quantità relativamente inferiore di micelle può essersi formata mediante agitazione per unità di volume, con una probabilità inferiore per

le cellule di incontrare la superficie della micella, e tempi più lunghi necessari per il completamento della DA.

Inoltre, la quantità di inoculo è la stessa in tutti i trattamenti, però la densità dell'inoculo nella fase acquosa era più bassa a volumi HM più alti (**Tabella 5**): di nuovo, ciò ha portato ad una riduzione della probabilità che i microrganismi incontrassero il substrato, sebbene il rapporto tra inoculo e substrato fosse uguale, in tutti i trattamenti. Tuttavia, poiché la quantità iniziale di WCO era la stessa in tutti i trattamenti, alla fine è stato digerito tutto il substrato (eccetto per il rapporto OtoW = 100). Alla fine dell'esperimento, 175 mg (SD: 7,1 mg) di grasso residuo, cioè il 35% della quantità iniziale di WCO, sono stati misurati nel trattamento senza HM (rapporto OtoW = 100). Negli altri reattori sono state trovate quantità inferiori di grasso residuo (<3% del contenuto iniziale).

La concentrazione di olio nei reattori senza HM era pari al 10% del volume della fase acquosa, corrispondente al 29,0%, in termini di COD. Questa concentrazione potrebbe essere inibitoria, in accordo con i risultati di Cirne *et al.* [26], che ha scoperto che la trioleina inibisce la metanogenesi a concentrazioni superiori al 31%, in termini di COD.

Inoculo e HM hanno avuto un effetto importante sul rapporto C/N: l'olio contiene circa il 77% di C (in base al peso molecolare della trioleina, come trigliceride rappresentativo), mentre sono presenti quantità molto basse di N. Di conseguenza, il rapporto C/N è totalmente sbilanciato e inadatto alla crescita microbica. L'inoculo ha fornito in tutti i trattamenti una quantità costante di N, che ha notevolmente ridotto il valore C / N. Inoltre, l'apporto di volumi crescenti di HM determinava una diminuzione progressiva del rapporto C su N nella miscela di reazione da 25 (con inoculo e senza HM) a 19 (con HM = 50 ml; **Tabella 5**). Il rapporto C/N influenza la produzione di CH₄ in DA, così che la sua modulazione è stata suggerita per migliorare le prestazioni di DA

utilizzando food waste come substrato [65]. Tanimu *et al.* [66] ha variato il rapporto C / N nell'intervallo 17-30 e ha ottenuto 0,352 L g⁻¹ VS, 0,447 g⁻¹ VS e una resa massima di 0,679 L g⁻¹ VS a rapporto C / N di 17, 26 e 30, rispettivamente, utilizzando scarti alimentari come materia prima. Wang *et al* [67], usando letame e paglia, hanno esplorato l'effetto del rapporto C su N tra 15 e 35 sulla produzione di metano e hanno trovato un valore ottimale C / N = 27.2. Nel nostro esperimento, il trattamento senza HM aveva un C / N = 24,9, vicino ai valori riportati come ottimali in letteratura. Questo trattamento, tuttavia, ha prodotto basse quantità di CH₄ a causa della scarsità di acqua disponibile per le attività microbiche e alla possibile concentrazione dei metaboliti della digestione. Se si esclude il trattamento senza HM, che era nettamente diverso dagli altri, negli altri trattamenti i rendimenti di CH₄ erano più alti (Mmax = 500 ml CH₄, **Fig. 31a**) per valori di C / N più bassi (C / N = 19.1). Pertanto, possiamo concludere che i nostri risultati sono stati influenzati più dal rapporto OtoW che dal rapporto C su N.

Le rese di CH₄ ottenute in condizioni non limitanti (rapporto OtoW <100) erano nel complesso molto elevate e vicine ai valori teorici. I nostri risultati sono in accordo con quelli di Pastor *et al.* [68], che ha determinato il potenziale di biometanazione di oli esausti, percolato di discariche urbane e fanghi di depurazione come possibili co-substrati in DA. Per l'olio usato hanno ottenuto una produzione di biogas per kg di materia fresca per un periodo di 47 giorni (non completamente degradati) di 970,6 NL kg⁻¹. I nostri risultati confermano che la WCO è un'eccellente materia prima per la produzione di biogas.

5.2 ESPERIMENTO "B": EFFETTO DELL'INTERFACCIA SULLA DA

Lo scopo di questo esperimento è stato quello di dimostrare che effettivamente l'interfaccia a disposizione può incidere in un sistema bifasico, sull'andamento della digestione anaerobica del WCO, a parità del rapporto OtoW. Se l'ipotesi esposta nel capitolo 5.2 non fosse stata confermata,

avremmo dovuto avere per i tre trattamenti lo stesso andamento, in quanto abbiamo utilizzato lo stesso volume di inoculo, di terreno HM e di inoculo, l'unica variabile è stata la dimensione dei reattori che hanno comportato variazione della superficie e dell'altezza delle diverse componenti, passando dai microcosmi a differente volume, da V50 fino a V500. Nel nostro caso invece abbiamo avuto tre andamenti differenti in base ai trattamenti, e per ogni trattamento le tre repliche erano abbastanza riproducibili. Ciò vuol dire che effettivamente la differente distribuzione delle fasi, ha modificato le condizioni di digestione, determinando nel caso di V500 (la maggiore superficie) sia una maggiore riproducibilità delle repliche, ma anche una maggiore velocità, probabilmente perché i microrganismi hanno avuto un accesso migliore al substrato, che era meglio distribuito in una maggiore superficie e l'altezza del HM era inferiore, così che era più probabile il contatto tra microrganismi e WCO. Mentre nel caso di V50, il WCO era distribuito su una minore superficie, e si è avuta una minore resa finale. Probabilmente il WCO era meno accessibile ai microrganismi, (minore interfaccia a disposizione) o accessibile solo da quelli prossimi all'interfaccia con il WCO, (infatti l'altezza sia dell'inoculo che dell'HM in questo caso è la maggiore, **Tabella 6**) questo ha reso più difficile l'accesso completo al WCO e la sua DA.

Questo valore però è in contrasto con la quantità residua di grasso (**Fig. 34**), in quanto almeno inizialmente per V50 si ha minore quantità di grasso residua, ma maggiore variabilità dei risultati, mentre per V500 c'è maggiore riproducibilità.

Si è visto anche che la vicinanza di batteri sintrofici è importante per la digestione anaerobica soprattutto in un sistema non agitato [69].

La digestione degli LCFA richiede la cooperazione sintrofica di OHPA (obligate hydrogen-producing acetogens) e metanogeni. Queste comunità sintrofiche si comportano in modo ottimale quando

sono organizzate in micro-colonie organizzate a brevi distanze intermicrobiche, tali da aumentare la velocità del trasferimento dell'idrogeno tra le specie [21].

5.3 ESPERIMENTO “C”: EFFETTO DELL’EMULSIONE/ALCALINIZZAZIONE SULLA DA

Sulla base dei risultati ottenuti si è constatato che nel caso della DA di WCO può risultare utile l’aggiunta di KOH per accelerare il processo di digestione, anche se, le rese finali non ne sono influenzate. Inoltre per abbreviare efficacemente il tempo di digestione, la quantità di KOH deve essere opportunamente valutata. Nel nostro esperimento, la quantità ottimale di KOH era quella corrispondente ad un pH iniziale di 9,22 (KOH=0.30ml), che comportava una riduzione del 51% in giorni per raggiungere la Mmax, rispetto al controllo (da 86 a 44 giorni). Per cui l’effetto del KOH oltre ad una emulsione dell’olio è stato quello di alcalinizzare l’ambiente di reazione.

L’importanza dell’alcalinizzazione è stata proposta in DA come pretrattamento dei fanghi attivati, dei materiali lignocellulosici per favorire la degradazione delle molecole recalcitranti e della cellulosa [70], [71]. Quando sono coinvolti substrati ricchi di lipidi, poiché i materiali grassi solidi tendono a intasare i tubi, l’alcalinizzazione è proposta come mezzo per dissolverli e renderli così meno dannosi [72]. L’alcalinizzazione riduce la quantità di grassi ma ha conseguenze negative sulla DA, perché favorisce la formazione di materia galleggiante. Nel nostro esperimento, l’emulsione dell’olio mediante KOH (dai trigliceridi al glicerolo + saponi) e quindi l’alcalinizzazione dell’ambiente di reazione, avrebbe potuto rendere gli acidi grassi più rapidamente disponibili ai microrganismi degradanti, in alternativa alla lipolisi microbica.

Nel nostro esperimento, il primo scopo di alcalinizzare era favorire la formazione di saponi emulsionanti. Mouneimne *et al.* [73] hanno studiato specificamente l’effetto di saponificazione sulla DA di substrati ricchi di lipidi. Anche se non hanno misurato direttamente la produzione di

CH₄, hanno scoperto che l'acidità libera e la degradazione dei grassi erano molto più alti a pH = 8,5 piuttosto che a pH = 6,5. I risultati ottenuti possono quindi essere interpretati anche in considerazione del fatto che l'alcalinizzazione in media ha comportato un innalzamento del pH. Il pH ottimale per i metanogeni è neutro; tuttavia, diversi gruppi microbici, presenti nei reattori anaerobici, sono responsabili delle varie trasformazioni intermedie che alla fine portano alla metanogenesi, per cui il pH ottimale in generale potrebbe essere differente dalla neutralità. Il prolungamento della fase di latenza per quantità crescenti di KOH, potrebbe essere causato da una crescente difficoltà dei consorzi microbici, di adattarsi ai valori di pH via via più elevati. Infatti il pH = 10.1, corrispondente alla quantità massima di KOH aggiunta (**Tabella 10**), era lontano dal pH ottimale per la DA. Un cambiamento nel pH si è verificato durante la degradazione del substrato, infatti, il pH finale dei digestati era in media per tutti intorno a 8,33 (DS: 0.13, n = 18), indipendentemente dal valore del pH misurato all'inizio dell'esperimento. Questo abbassamento del pH potrebbe spiegare il "recupero" in R e il fatto che non sono state rilevate differenze significative nella Mmax, tra i diversi trattamenti.

5.4 ESPERIMENTO "D": EFFETTO EMULSIONE A VOLUMI DI IDRATAZIONE DIFFERENTI

Dal confronto tra i trattamenti a diverso volume di idratazione, emulsionati o non emulsionati (**Fig. 37**), si può dire che l'emulsione sembrerebbe migliorare le prestazioni di digestione, solo nel caso di volumi di idratazione superiori a 10ml (non compreso). Infatti non vi sono differenze fra O_T10 e EO_T10. Probabilmente perché la riduzione del volume di idratazione, apporta già di per sé un miglioramento delle prestazioni di DA, che non vengono ulteriormente ottimizzate dalla presenza dell'emulsione.

Nel caso del confronto tra diversi livelli di HM emulsionati ugualmente (**Fig. 38**), si nota che comunque l'emulsione non sembra influenzare positivamente, la condizione negativa per i microrganismi, di bassi livelli di idratazione, per cui come detto in precedenza, il probabile effetto tossico dovuto all'accumulo di metaboliti e la insufficiente idratazione, nonostante l'emulsione, giocano un ruolo fondamentale per la DA del WCO. Nonostante ciò, per livelli di idratazione comunque bassi (superiori a 2,5ml), l'emulsione permette di migliorare le prestazioni del sistema, unitamente alla riduzione del volume di idratazione, (quando si usano volumi di idratazione intermedi), in quanto per HM=10 ciò non ha comportato miglioramenti, mentre per i livelli superiori si è avuto un miglioramento delle prestazioni.

L'emulsione potrebbe essere un espediente da utilizzare nel caso in cui si vogliano mantenere alte le prestazioni, pur non potendo ridurre troppo i volumi di idratazione.

5.5 ESPERIMENTO "E": EFFETTO SEPIOLITE, LIQUAME, PH

Il trattamento dell'olio con liquame ha presentato il migliore andamento di digestione anaerobica, anche considerando il fatto che il contributo per la produzione di metano da parte del liquame da solo è di gran lunga inferiore ai risultati ottenuti dalla codigestione dell'olio.

Per la sepiolite l'effetto positivo potrebbe essere dovuto non soltanto alla sua capacità di adsorbire il WCO sulla sua superficie, ma anche alla capacità di ospitare la componente microbica deputata alla digestione del WCO, come già visto per Cavaleiro *et al* [74].

E' stato osservato che l'aggiunta di materiali di supporto, come la sepiolite, ai digestori anaerobici a letto fluidizzato migliora la produzione di metano aumentando la colonizzazione del microbiota sintrofico, tuttavia l'efficienza dipende dalla dimensione della sepiolite, la maggiore produzione di metano si ha con sepiolite di dimensioni minori [75].

Sarebbe opportuno approfondire meglio le conoscenze intrinseche di tale minerale, in quanto se opportunamente modificato dal punto di vista strutturale potrebbe essere un materiale ancora più interessante per migliorare la DA dei WCO e non solo, come hanno fatto Yufei Li *et al* [76].

In ambiente zootecnico si fa già largo uso della sepiolite come additivo naturale (E-562), per migliorare il transito intestinale dei bovini ed anche per la preparazione dei mangimi, in quanto costituisce un supporto per preparati vitaminico-minerali. In campo cosmetico invece viene utilizzato come componente nella produzione di saponi, date le sue proprietà intrinseche. Nel nostro caso l'uso del liquame supera le prestazioni del trattamento con sepiolite, per cui è da preferirsi in quanto non comporterebbe l'aggiunta di materiale, ma il recupero a fini energetici sia del WCO che del liquame.

L'effetto positivo del liquame viene mascherato dalla sepiolite, infatti nei trattamenti con sepiolite e liquame si ha una riduzione delle prestazioni, forse perché la sepiolite tenderebbe ad assorbire eventuali colloidali, che potrebbero essere la causa del miglioramento delle prestazioni con liquame.

Il liquame potrebbe essere anche fonte di idratazione, vitamine e minerali, oltre che avere un effetto tamponante, come Angelidaki & B.K. Ahring [77] hanno osservato per il letame.

L'aumento del pH, nei trattamenti, per mimare l'eventuale effetto alcalinizzante del liquame e della sepiolite, non sembra soddisfare le aspettative, in quanto è evidente che visti i risultati ottenuti, l'effetto positivo non è dovuto solo all'aumento del pH ma ad altro.

I risultati ottenuti sono soddisfacenti in quanto sia la sepiolite che il liquame permettono di ridurre notevolmente i tempi di digestione del WCO, riducendo la fase di latenza ed aumentando la velocità di digestione.

5.6 ESPERIMENTO “F”: EFFETTO DELLA COMPOSIZIONE DEL WCO SULLA DA

Il confronto dell'andamento della produzione di metano per i differenti oli, (tutti oli alimentari esausti eccetto EVO), ha permesso di capire che l'origine dell'olio può influenzarne tale andamento. Le cause della variabilità di questo andamento potrebbero essere dovute alla cottura degli oli, infatti si è visto che l'olio EVO non fritto, presenta l'andamento migliore rispetto a tutti gli altri. La cottura degli oli, ne altera la sua composizione, e come si è visto si possono formare composti tossici, come l'acroleina ad esempio, che potrebbero influire negativamente sulla digestione del WCO da parte dei microrganismi [7]. Probabilmente l'EVO non avendo subito il processo di cottura, non presenta tali composti, per cui si osserva un migliore andamento rispetto a tutti gli altri WCO.

Dal confronto con la composizione si può notare che R2 e R3P presentano la stessa composizione ed entrambi sono risultati essere i peggiori substrati utilizzati in questa prova, quindi questo a dimostrazione del fatto che la composizione può influenzarne la digestione. Inoltre solo R2 presenta una piccola percentuale di acido lignocerico, anche se ad oggi non sono riportati effetti sulla DA relativi a tale acido grasso, inoltre la sua percentuale in R2 è minima.

Gli acidi grassi più abbondanti in tutti gli oli testati erano comunque il palmitico, l'oleico e il linoleico, come è stato visto anche in [78], a basse concentrazioni, possono essere inibitori della metanogenesi. Vengono adsorbiti sulla membrana cellulare e ne interferiscono il trasferimento di massa [79]. Tuttavia, questa inibizione può essere reversibile, per adattamenti possibili nei microrganismi [80]. Si è visto per l'acido oleico una inibizione del 50% dell'attività dei metanogeni in presenza di una concentrazione di 50-200mg/L di acido oleico [81].

Gli oli testati contengono tutti simili quantità di acido oleico, circa il 70%, eccetto R3F, che però presenta maggiori quantità di palmitico, e tutti presentano un ritardo nella fase di latenza dovuto

probabilmente ad una elevata quantità di acido oleico (dell'ordine dei g/L). Questo però non ha inibito la metanogenesi ma solo ritardata, infatti poi tutti gli oli raggiungeranno simile rese, vicine a quelle teoriche, non uguali in quanto bisogna considerare la quantità di materia organica utilizzata per la crescita cellulare.

Un aspetto fondamentale è rappresentato quindi dalla fase di adattamento dei microrganismi al substrato utilizzato-

5.7 ESPERIMENTO AIR-LIFT

L'AIR-LIFT sembra promuovere l'accumulo dei trigliceridi, probabilmente, perché trattandosi di un sistema bifasico, i lipidi tendono a galleggiare e i batteri che accumulano lipidi, tendono a galleggiare, spinti dall'aria incanalata all'interno del reattore che ha promosso un movimento pneumatico, dolce, che ha permesso la formazione di grossi aggregati ricchi di lipidi (biomassa grassa durante la fase di accumulo), che tendevano a galleggiare in superficie. Tale sistema ha permesso di semplificare notevolmente le fasi di prelievo del terreno esausto, senza perdita della biomassa microbica in quanto tendeva o a precipitare sul fondo o a galleggiare in superficie. Rappresentava dunque un sistema meno omogeneo visivamente, ma per le nostre condizioni sperimentali era ottimale.

Mentre nel caso dell'SBR, il movimento meccanico garantiva un'agitazione costante ed omogenea all'interno del reattore. Le pale meccaniche tendevano a rompere gli aggregati cellulari che potevano formarsi. Tutto questo ha determinato delle condizioni sperimentali più omogenee e la formazione di una biomassa microbica che era più leggera e difficile da separare velocemente dal terreno esausto. Questo potrebbe determinare nel tempo una maggiore perdita della biomassa assieme al terreno esausto.

L'applicazione delle condizioni sperimentali utilizzando un AIR-LIFT o un SBR, dipende da quello che si vuole ottenere. Nel caso di un substrato lipidico, ed anche di una biomassa che tende ad "ingrassare", la conformazione AIR-LIFT potrebbe essere la scelta ottimale. Nell'ottica di decontaminare biologicamente un'acqua di lavaggio reale, con basso COD, anche inferiore a 5g/L, (la decontaminazione biologica è un sistema alternativo a quella fisica che è più difficile nel caso di acque con basso COD) si possono utilizzare maggiori volumi di componente acquosa, garantendone comunque sempre il contatto tra microrganismi deputati alla decontaminazione dell'acqua e frazione lipidica in essa contenuta. Grazie alla sua particolare conformazione, potrebbe essere una soluzione per tutti i sistemi bifasici di questo tipo, garantendo tramite l'agitazione pneumatica il ricircolo e il contatto tra fasi diverse.

Questo sistema potrebbe essere ulteriormente migliorato, qualora si riuscisse ad ottimizzare il consumo energetico per l'ingresso di aria all'interno del reattore, mediante per esempio ricircolo del gas prodotto all'interno del reattore, come abbiamo cercato di fare con il GAS-LIFT, grazie alle nostre condizioni sperimentali in anaerobiosi.

5.8 ESPERIMENTO GAS-LIFT

Nonostante le perdite di gas nel tempo che ci sono potute essere nel Gas-lift (per via di un problema nella guarnizione, riscontrato solo alla fine dell'esperimento), questo presenta comunque un migliore accumulo di metano/g di WCO e l'andamento permette di capire che comunque la particolare conformazione del reattore e il ricircolo del biogas promuove un andamento migliore nella digestione del WCO. Questo a dimostrazione del fatto che effettivamente, la particolare conformazione del reattore e il tipo di agitazione possono condizionare positivamente l'andamento della digestione del WCO. Inoltre le operazioni di

prelievo dei campioni erano molto più semplici per Gas-lift che per CSTR in quanto i microrganismi tendevano più facilmente a depositarsi sul fondo del reattore, in quanto probabilmente l'agitazione pneumatica, più lieve ha permesso la formazione di granuli di maggiori dimensioni, che quindi sedimentavano più facilmente durante le operazioni di prelievo.

L'andamento del consumo di COD è simile per entrambi i reattori. La cosa particolare è che pur utilizzando le stesse proporzioni in termini di WCO, inoculo e HM, il COD disciolto misurato era molto più alto per CSTR che per GASLIFT, questo probabilmente perché, il campione prelevato dal CSTR era più omogeneo, mentre per la particolare conformazione del Gas-lift la componente grassa tendeva a rimanere più a galla e a dissolversi meno nella parte sottostante. Per altro, dopo qualche settimana, si è venuto a creare uno strato in superficie costituito da grasso e microrganismi, che tendevano a rimanere a galla. Il COD era inferiore anche perché veniva consumato più facilmente dai microrganismi. Considerazioni simili sono state fatte da Siddique *et al* [82], dove per un CSTR che utilizzava come substrato un'acqua di scarto del settore petrolchimico, grazie al ricircolo del biogas si è avuto un migliore miscelamento che ha comportato un aumento nell'efficienza di rimozione del COD, dei VFA e una maggiore efficienza di generazione del bio-metano.

Aumentare il contatto tra substrato e microrganismi, creando una zona deputata a tale contatto, ha permesso nel nostro caso di ridurre i tempi di digestione.

Per quanto riguarda il ricircolo di metano è stato visto che può influire positivamente sulla digestione anaerobica, in svariate condizioni, ad esempio si è visto in [83], che tale ricircolo favorisce l'adesione della biomassa. Viene sottolineata anche l'importanza del ricircolo, per accelerare la metanogenesi e ridurre il contenuto di VFA [84]. Nel nostro caso, già dopo le prime settimane per il GAS-LIFT si è avuto una scomparsa dei VFA, cosa che non si è invece riscontrata

per il CSTR, dove invece sono comparsi nelle ultime settimane VFA a catena più lunga, indice di problemi nella digestione. Durante il processo fermentativo acidogenico, vengono prodotti gli acidi grassi a corta catena, come l'acetico e il propionico, a partire da macromolecole. Questi poi verranno subito utilizzati dagli acetogenici e quindi dai metanogeni, per cui un accumulo di VFA può significare una degradazione e utilizzo più lento da parte di acetogenici e metanogeni, e quindi problemi alla digestione anaerobica.

Del picco al tempo di ritenzione di 23 minuti, non ne è stata chiarita l'identità, ma le analisi fatte confermano che tale sostanza tende ad essere presente già dalle prime fasi iniziali e rimanere in quantità costante nel tempo, per cui è un composto che non viene né digerito, ma nemmeno prodotto. Non è noto se tale composto potrebbe influire negativamente sull'attività microbica, in quanto non riuscendo a digerirlo, potrebbe essere in realtà tossico. Sarebbe interessante riuscire a scoprire di che composto si tratti per eventuali indagini future, per verificare se effettivamente risulta tossico e può essere rimosso opportunamente per migliorarne le prestazioni di digestione. L'idea è che potrebbe derivare da un prodotto ottenuto dalla frittura degli oli o dalla perossidazione lipidica, per esempio dall'acido linoleico (di cui è ricco il WCO utilizzato, R3P vedi **tabella 12**), si possono ottenere la malonildialdeide e il 4 idrossi-nonenale, che è noto esercitino un effetto tossico per le cellule [85]. La sostanza incognita potrebbe essere un derivato di queste molecole.

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti evidenziano l'opportunità di poter usare l'olio alimentare esausto per la produzione di biogas, come alternativa più sostenibile al suo utilizzo per biodiesel. Ad oggi l'utilizzo dei lipidi in digestione anaerobica è visto come co-substrato da aggiungere in minori quantità, per aumentarne la produzione di biogas. Sarebbe opportuno rivalutarne l'importanza come substrato principale, per la produzione di biogas, nonostante i problemi legati alla tossicità per i microrganismi. Problemi a cui si possono però trovare soluzioni alternative per poterne sfruttare l'alto potenziale metanogenico. La soluzione potrebbe essere il modo in cui si cerca di affrontare questo problema, nel mio caso, considerando i fattori biofisici come strategia per superare una serie di ostacoli. La riduzione del volume di idratazione, con conseguente riduzione del rapporto olio acqua e l'aumento dell'interfaccia tra microrganismi e lipidi, può rappresentare una soluzione semplice ad un problema complesso, come i lunghi tempi di digestione dei lipidi. L'alcalinizzazione della fase acquosa ha aumentato il tasso di produzione di metano, ma al costo di un aumento del tempo necessario per i microrganismi per adattarsi ai valori di pH più elevati. Tuttavia, è stato possibile identificare le concentrazioni di KOH, che ha permesso di abbreviare la durata della digestione dell'olio esausto di oltre il 50%. L'utilizzo di minerali quali la sepiolite, potrebbe essere un discorso da approfondire in quanto oltre a migliorare le prestazioni della digestione dei lipidi, avrebbe un effetto positivo sulla rimozione dei cattivi odori, nota dolente degli impianti a biogas. L'uso del liquame in codigestione con i lipidi in ambiente zootecnico, potrebbe comportare una riduzione dei lunghi tempi di digestione ed essere una soluzione per utilizzare due rifiuti contemporaneamente, aumentando la produzione di biogas senza un aumento significativo del volume dei reattori, dato l'elevato potere metanogenico dei lipidi. Inoltre i risultati ottenuti aprono prospettive interessanti all'utilizzo dei lipidi in mono digestione, l'importante è adattare la configurazione del reattore al substrato utilizzato. Nel caso del nostro

Gas-lift, il giusto mixing ottenuto mediante ricircolo del biogas e la configurazione del reattore, con l'ingresso della fase oleosa dall'alto e l'uscita del terreno esausto in posizione intermedia, permette di avvicinare i microorganismi al substrato, ridurre il washout e ridurre i tempi di digestione. Bisognerà ulteriormente perfezionare il sistema progettato e utilizzarlo in continuo, per poter passare da un prototipo di laboratorio, ad uno scale-up di maggiori dimensioni, che si possa adattare meglio alle esigenze del mercato.

RINGRAZIAMENTI

Le attività di ricerca sono state svolte nell'ambito di una collaborazione tra CREA e DICAM, dell'Università di Bologna. Ringrazio entrambe per il supporto e il sostegno offerto in questi anni. L'olio alimentare esausto è stato gentilmente fornito dall'azienda Rimondi Paolo S.r.l., che mi ha permesso di conoscere dal vivo le modalità di recupero e stoccaggio dell'olio di risulta. Ringrazio il CEB di Braga per le conoscenze e competenze trasmesse.

BIBLIOGRAFIA

- [1] David L. Nelson, *I principi di biochimica di Lehninger*, in David L. Nelson, Michael M. Cox, P.L. Ippata, Bologna, Zanichelli, quinta edizione (2010).
- [2] Ministero della salute, *Igiene di sottoprodotti di origine animale*, 10 ottobre 2008, ultimo aggiornamento 19 febbraio 2014, On line su:
http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_6.jsp?lingua=italiano&id=1162&area=sicurezzaAlimentare&menu=igiene
- [3] EU project, ADAW: *Saponification pre-treatment and biosensors based control system for slaughterhouse waste anaerobic digestion improvement*, ultimo aggiornamento il: 2016-01-14, On line su: https://cordis.europa.eu/result/rcn/176072_en.html
- [4] CONOE, 2016, Il contributo del CONOE alla green economy (in Italian). On line at http://www.fondazionevilupposostenibile.org/wp-content/uploads/dlm_uploads/2016/06/Il-contributo-del-Conoe-alla-green-economy-report-2015.pdf.
- [5] Orsavova J., Misurcova L., Ambrozova J.V., Vicha R., and Mlcek J., (2015), Fatty Acids Composition of Vegetable Oils and Its Contribution to Dietary Energy Intake and Dependence of Cardiovascular Mortality on Dietary Intake of Fatty Acids, *Internal Journal of Molecular Sciences*, **16**(6), 12871-12890
- [6] Chiou A., Kalogeropoulos N., (2017), Virgin Olive Oil as Frying Oil, *Comprehensive Reviews*, **16**, 632-646
- [7] Demirer G.N., Speece R.E., (1998), Anaerobic biotransformation of four 3-carbon compounds (acrolein, acrylic acid, allyl alcohol and n-propanol) in UASB reactors, *Elsevier*, **32**, 747-759
- [8] BIODIENET (2009): EL LIBRO - The Handbook for local initiatives for biodiesel from recycled oil. On line at: <http://www.sec.bg/userfiles/file/BioDieNet/EL%20LIBRO.pdf>.
- [9] Han, InHwa and A. Saari Csallany. (2009) Formation of toxic alpha,beta-unsaturated 4-hydroxy aldehydes in thermally oxidized fatty acid methyl esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **86**,253-260;
- [10] Han, InHwa and A. Saari Csallany. (2008) Temperature dependence of HNE formation in vegetable oils and butter oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **85**, 777-782.

- [11] Seppanen, C.M. and A.S. Csallany. (2004) Incorporation of the toxic aldehyde 4-hydroxy-2-trans-nonenal into food fried in thermally oxidized soybean oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **81**(12), 1137-1141.
- [12] Kyoto Club (2014), Progetto Europeo RECOIL, come recuperare l'olio vegetale esausto e trasformarlo in energia elettrica e termica PROPOSTE NORMATIVE. On line su: <http://www.recoveringoil.eu/sites/recoveringoil.eu/files/docs/ACTION%2011-%20Proposte%20normative%20IT.pdf>
- [13] Sito Conoe: Oggetto e finalità. On line su: <http://www.conoe.it/chi-siamo-2/>
- [14] Comunicato stampa Eni, 17/5/17, On line su: https://www.eni.com/it_IT/media/2017/05/eni-conoe-sottoscritto-accordo-per-trasformare-gli-oli-vegetali-esausti-in-biocarburanti-di-alta-qualita
- [15] Biscardi G., Rispoli G (2017), L'accordo Eni-CONOE: da olio esausto a biocarburante di alta qualità, *RIENERGIA Ambiente e risorse punto per punto*, 20/06/17. On line su: <https://rienergia.staffettaonline.com/articolo/32855/L%E2%80%99accordo+Eni-CONOE:+da+olio+esausto+a+biocarburante+di+alta+qualit%C3%A0/Giovanni+Biscardi+e+Gi+acomo+Rispoli+>
- [16] Fiume F., Marchetti R., Vasmara C., (2017), Biophysical factors affecting the anaerobic digestion of waste cooking oil in model systems, *Environmental Engineering and Management Journal*, **16**, 1729-1738.
- [17] Ryan, T.W. (1999). Characterization of vegetable oils for use as fuels in Diesel engines, *ASAE*, 4/99, 1999.
- [18] S. Prasad and M.S. Dhanya (2011). Air Quality and Biofuels, Environmental Impact of Biofuels, Dr. Marco Aurelio Dos Santos Bernardes (Ed.), ISBN: 978-953-307-479-5, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/environmental-impact-of-biofuels/air-quality-and-biofuels>
- [19] Jahangirian, S., Engeda, A. & Wichman, I.S. (2009). Thermal and Chemical Structure of Biogas Counter flow Diffusion Flames. *Energy and Fuels*, **23**, 5312–5321.
- [20] Phan A.N., Phan T.M., (2008), Biodiesel production from waste cooking oils, *Fuel*, **87**, 3490-3496.

- [21] Alves M.M., Pereira M.A., Diana Z., Sousa D.Z., Cavaleiro A.J., Picave M., Smidt H. and Stams A.J.M., (2009), Waste lipids to energy: how to optimize methane production from long chain fatty acids (LCFA), *Microbial Biotechnology*, **2**, 538-550.
- [22] Labatut R.A., Largus T.A., Norman R.S., (2011), Biochemical methane potential and biodegradability of complex organic substrates, *Bioresource Technology*, **102**, 2255-2264.
- [23] Nazaitulshila R., Idris A., Harun R., Wan Azlina W.A.K.G., (2015), The influence of inoculum to substrate ratio on the biochemical methane potential of fat, oil, and grease in batch anaerobic assays, *Energy Sources*, **37**, 590-597
- [24] Bušić A., Kundas S., Morzak G., Belskaya H., Marđetko N., Šantek M.I., Komes D., Novak S. and Šantek B. (2018), Recent Trends in Biodiesel and Biogas Production, *Food Technology & Biotechnology*, review ISSN 1330-9862 doi: 10.17113/ftb.56.02.18.5547.
- [25] Neves L., Gonçalo E., Oliveira R., Alves M.M., (2008), Influence of composition on the biomethanation potential of restaurant waste at mesophilic temperatures, *Waste Management*, **28**, 965-72.
- [26] Cirne D.G., Paloumeta X., Bjornsson L., Alves M.M., Mattiassona B., (2007), Anaerobic digestion of lipid-rich waste-Effects of lipid concentration, *Renewable Energy*, **32**, 965-975.
- [27] Pereira M.A., Sousa D.Z., Mota M., Alves M.M., (2004), Mineralization of LCFA associated to anaerobic sludge: kinetics, transport limitations, enhancement of methanogenic activity and effect of VFA. *Biotechnol Bioeng*, **88**(4), 502–10.
- [28] Pereira M.A., Pires O.C., Mota M., Alves M.M. (2005), Anaerobic biodegradation of oleic and palmitic acids: Evidence of mass transfer limitations caused by long chain fatty acid accumulation onto the anaerobic sludge. *Biotech Bioeng*; **92**(1), 15–23.
- [29] Kougias P.G., Boe K., O-Thong S., Angelidaky I., (2014), Anaerobic digestion foaming in full-scale biogas plants: A survey on causes and solutions, *Water Science & Technology*, **69**, 889-895
- [30] Ács N., Kovács E., Wirth R., Bagi Z., Strang O., Herbel Z., et al. (2012), Changes in the Archaea microbial community when the biogas fermenters are fed with protein-rich substrates. *Bioresour Technol*, **131**, 121–7.
- [31] Neuhaus J., Shehata A.A., Krüger M., (2015), Detection of pathogenic clostridia in biogas plant wastes. *Folia Microbiol*, **60**, 15–19.
- [32] Weng C.N., Jeris J.S., (1976), Biochemical mechanisms in the methane fermentation of glutamic and oleic acids, *Water Resource*, **10**, 9-18.

- [33] Hatamoto M., Imachi H., Yashiro Y., Ohashi A., Harada H., (2007), Diversity of anaerobic microorganisms involved in long-chain fatty acid degradation in methanogenic sludges as revealed by RNA-based stable isotope probing, *Applied and Environmental Microbiology*, **73**, 4119-4127.
- [34] Rinzema A., Alphenaar A., Lettinga G., (1993), Anaerobic digestion of long-chain fatty acids in UASB and expanded granular sludge bed reactors, *Process Biochemistry*, **28**, 527-537.
- [35] Rinzema A., van Veer H., Lettinga G., (1993), Anaerobic digestion of triglyceride emulsions in expanded granular sludge bed reactors with modified sludge separators, *Environmental Technology*, **14**, 423-432.
- [36] Petruy R., (1999) Anaerobic treatment of protein, lipid and carbohydrate containing wastewaters using the EGSB technology, Ph.D. Thesis, Agricultural University of Wageningen, Wageningen, Netherlands.
- [37] Cavaleiro A.J., Picavet M.A., Sousa D.Z., Stams A.J.M., Pereira M.A., Alves M.M. (2015) Anaerobic Digestion of Lipid-Rich Waste. In: McGenity T., Timmis K., Nogales B. (eds) *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols*. Springer Protocols Handbooks. Springer, Berlin, Heidelberg.
- [38] Picavet M.A., Cavaleiro A.J., Alves M.M.,(2008), Development of a Novel reactor for High- rate anaerobic treatment of LCFA containing wastewater, *Bioenergy: Challenges and Opportunities*, International Conference and Exhibition on Bioenergy, April 6th – 9th 2008, Universidade do Minho, Guimarães, Portugal.
- [39] Seyed Hosseini N., Shang H., Ross G.M., Scott J.A., (2015), Microalgae cultivation in a novel top-lit gas-lift open bioreactor, *Bioresource Technol.* **192**,432-40.
- [40] Siddiquea N. I., Munaimb M.S.A., Wahida Z.A., (2015), Role of biogas recirculation in enhancing petrochemical wastewater treatment efficiency of continuous stirred tank reactor, *Journal of Cleaner Production*, **91**, 229-234.
- [41] On line su: <http://biotech4you.com/biotech-notes/bioprocess-engineering/65-bioreactors> Bioreactors, BIOTECH4U.
- [42] On line su: <http://www.dbt.univr.it/documenti/Avviso/all/all434590.pdf>
- [43] Copot, D., Ionescu, C.M., Hernandez, A., Thybaut, J.W., & Keyser, R.D. (2015). Development of a control strategy for efficient operation of a CSTR reactor. 2015 19th International Conference on System Theory, Control and Computing (ICSTCC), 717-722.
- [44] Vasmara C., Marchetti M., (2016), Biogas production from biodegradable bioplastics, *Environmental Engineering and Management*, **5**, 2041-2048.

- [45] Owen W.F., Stuckey D.C., Healy Jr.J.B., Young L.Y., McCarty P.L., (1979), Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity, *Water Research*, **13**, 485-492.
- [46] Ruiz C., Pastor F.I.J., Diaz P., (2005), Isolation of lipid- and polysaccharide-degrading microorganisms from subtropical forest soil and analysis of lipolytic strain *Bacillus* sp. CR-179, *Letters in Applied Microbiology*, **40**, 218-227.
- [47] Rinzema A., van Lier J., Lettinga G., (1988), Sodium inhibition of acetoclastic methanogens in granular sludge from a UASB reactor, *Enzyme and Microbial Technology*, **10**, 24-32.
- [48] Özdemir M., Kipcak I., (2004), Dissolution kinetics of sepiolite in hydrochloric acid and nitric acid. Clays, *Clay Miner.*, **52**, 714–720.
- [49] Franco F., Pozo M., Cecilia J.A., Benitez-Guerrero M., Pozo E., Martin Rubi J.A., (2014), Microwave assisted acid treatment of sepiolite: The role of composition and “crystallinity”. *Appl. Clay Sci.*, **102**, 15–27.
- [50] Fernández-Cegrí V., Raposo F., Borja R., (2013), Performance and kinetic evaluation of the semi-continuous anaerobic digestion of sunflower oil cake pretreated with ultrasound, *Journal of environmental science and health*, **48**, 1548-56.
- [51] On line su:<https://pubs.usgs.gov/of/2001/of01-041/html/docs/clays/seppaly.htm>
- [52] Castro A. R., Rocha I., Alves M. M., & Pereira M. A. (2016). *Rhodococcus opacus* B4: a promising bacterium for production of biofuels and biobased chemicals. *AMB Express*, **6**, 35. <http://doi.org/10.1186/s13568-016-0207-y>
- [53] Schlegel HG, Kaltwasser H & Gottschalk G (1961) Ein submersverfahren zur kultur wasserstoff oxidierender bakterien: wachstumsphysiologische untersuchungen, *Arch Mikrobiol* **28**, 209 – 222.
- [54] Vasmara C., Cianchetta S., Marchetti R., Galletti S., (2015), Biogas production from wheat straw pre-treated with ligninolytic fungi and co-digestion with pig slurry, *Environmental Engineering and Management Journal*, **14**, 1751-1760.
- [55] Owen W.F., Stuckey D.C., Healy J.B., Young L.Y., McCarty P.L., 1979. Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. *Water Res.* **13**, 485–492.
- [56] Brooksbank A.M., Latchford J.W., (2007), Degradation and modification of fats, oils and grease by commercial microbial supplements, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **23**, 977-985.
- [57] APHA, 1992. American Public Health Association (APHA) method 9221: Standard methods for the examination of water and wastewater, Standard Methods.

- [58] Zwietering M.H., Jongenburger I., Rombouts F.M., van 't Riet K., (1990), Modeling of the bacterial growth curve, *Applied and Environmental Microbiology*, **56**, 1875-1881.
- [59] Littell R.C., Milliken G.A., Stroup W.W., Wolfinger R.D., (1996), SAS System for Mixed Models, SAS Inst. Inc., Cary, NC.
- [60] Buchanan R.L., Whiting R.C., Damer W.C., (1997), When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves, *Food Microbiology*, **14**, 313-326.
- [61] Silva P.D.M.P., Lima F., Pereira M.A., Alves M.M., (2016), Valorization of lubricant-based wastewater for bacterial neutral lipids production: Growth-linked biosynthesis, *Water Research*, **101**, 17-24.
- [62] Dasa K.T., Westman S.Y., Millati R., Cahyanto M.N., Taherzadeh M.J., Niklasson C., (2016), Inhibitory effect of long-chain fatty acids on biogas production and the protective effect of membrane bioreactor, Hindawi Publishing Corporation Biomed Research International, 2014, **1-9**, 9 pages.
- [63] Kostner I.W., Cramer A., (1987), Inhibition of methanogenesis from acetate in granular sludge by long-chain fatty acids, *Applied and Environmental Microbiology*, **53**, 403-409
- [64] Sousa D.Z., Salvador A.F., Ramos J., Guedes A.P., Barbosa S., Stams A.J.M., Alves M.M., Pereira M. A., (2013), Activity and viability of methanogens in anaerobic digestion of unsaturated and saturated long-chain fatty acids, *Applied and Environmental Microbiology*, **79**, 4239-4245.
- [65] Kondusamy D., Kalamdhad A.S., (2014), Pre-treatment and anaerobic digestion of food waste for high rate methane production – A review, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, **1**, 1821-1830.
- [66] Tanimu M.I., Mohd Ghazi T.I., Harun M.R., Idris A., (2014), Effect of carbon to nitrogen ratio of food waste on biogas methane production in a batch mesophilic anaerobic digester, *International Journal of Innovation, Management and Technology*, **5**, 1156-119.
- [67] Wang X., Yang G., Yongzhong F., Han X., (2012), Optimizing feeding composition and carbon-nitrogen ratios for improved methane yield during anaerobic co-digestion of dairy, chicken manure and wheat straw, *Bioresource Technology*, **120**, 78-83.
- [68] Pastor L., Ruiz L., Pascual A., Ruiz B., (2013), Co-digestion of used oils and urban landfill leachates with sewage sludge and the effect on the biogas production, *Applied Energy*, **107**, 438-445.

- [69] Kim M., Ahn Y., Speece R.E., (2002), Comparative process stability and efficiency of anaerobic digestion; mesophilic vs. thermophilic, *Water Research*, **36**, 4369-4385.
- [70] Valo A., Carrère H., Delgenès J.P., (2004), Thermal, chemical and thermo-chemical pre-treatment of waste activated sludge for anaerobic digestion, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **79**, 1197-1203.
- [71] Li C., Champagne P., Anderson B. C., (2013), Biogas production performance of mesophilic and thermophilic anaerobic co-digestion with fat, oil, and grease in semi-continuous flow digesters: effects of temperature, hydraulic retention time, and organic loading rate, *Environmental Technology*, **34**, 2125-2133.
- [72] Cammarota M.C., Freire D.M.G., (2006), A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content, *Bioresource Technology*, **97**, 2195-2210.
- [73] Mouneimne A.H., Carrere H.A, Bernet N., Delgen J.P., (2003), Effect of saponification on the anaerobic digestion of solid fatty residues, *Bioresource Technology*, **90**, 89-94
- [74] Cavaleiro A.J., Sousa D.Z., Alves M.M., (2010), Methane production from oleate: Assessing the bioaugmentation potential of *Syntrophomonas zehnderi*, *Water Research*, **44**, 4940-4947.
- [75] Sánchez J.M. , Rodríguez F. , Valle L. , Muñoz M.A. , Moriñigo M.A. , Borrego J.J., (1996) Development of methanogenic consortia in fluidized-bed batches using sepiolite of different particle size, *Microbiologia*, **12**, 425-434.
- [76] Li Y., Wang M., Sun D., Li Y., Wu T., (2018) Effective removal of emulsified oil from oily wastewater using surfactant-modified sepiolite, *Applied Clay Science*, **157**, 227-236.
- [77] Angelidaki, I. & Ahring, B. Biodegradation (1997) 8: 221.
<https://doi.org/10.1023/A:1008284527096>
- [78] Hidalgo, Dolores & Gómez, M & Marroquin, Jesús & Aguado, Alicia & Sastre, E. (2014). Two-phase anaerobic co-digestion of used vegetable oils' wastes and pig manure. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 12. 10.1007/s13762-014-0560-9.
- [79] Pastor L., Ruiz L., Pascual A., Ruiz, B., (2013), Co-digestion of used oils and urbanlandfill leachates with sewage sludge and the effect on the biogas production. *Appl. Energy*, **107**, 438-445.
- [80] Chen Y., Cheng J.J., Creamer, K.S., (2008), Inhibition of anaerobic digestion process: a review, *Bioresour.Technol.*, **99**, 4044-4064.

- [81] Angelidaki, I., Ahring, B.K., Deng, H., Schmidt, J.E., (2002), Anaerobic digestion of olivemill effluents together with swine manure in USAB reactors, *Water Sci. Technol.*, **45**, 213-218.
- [82] Nurul Islam Siddique, Mimi Sakinah Abdul Munaim, Zularisam Abdul Wahid, (2015), Role of biogas recirculation in enhancing petrochemical wastewater treatment efficiency of continuous stirred tank reactor, *Journal of Cleaner Production*, **91**, 229-234.
- [83] Suvajittanont W., Chaiprasert P., (2003), Potential of biogas recirculation to enhance biomass accumulation on supporting media, *Bioresource Technology*, **88**, 157-162.
- [84] He P.J., Li L., Hao L., Shao L.M., (2011), Effect of biogas recirculation and hydrogen removal on the process of thermophilic anaerobic digestion, *Zhongguo Huanjing Kexue/China Environmental Science*, **31**, 245-252.
- [85] Antonio Ayala, Mario F. Muñoz, and Sandro Argüelles, "Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2014, Article ID 360438, 31 pages, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>.