

PROGETTO RICREA

RIFIUTI CEREALICOLI PER IL BIORISANAMENTO

**Sostenere la redditività delle imprese
attraverso l'economia circolare**

Progetto presentato a valere sul bando per il cofinanziamento di progetti di ricerca volti allo sviluppo di tecnologie per la prevenzione, il recupero, il riciclaggio ed il trattamento di rifiuti non rientranti nelle categorie già servite da consorzi di filiera, all'ecodesign dei prodotti e alla corretta gestione dei relativi rifiuti.
Progetto cofinanziato dal Ministero della Transizione Ecologica-Direzione Generale Economia Circolare.



Progetto di ricerca RICREA “Rifiuti cerealicoli per il biorisanamento”

Partner del progetto:

Università degli Studi di Brescia, Dipartimento DICATAM

BioC-CheM Solutions, Milano

Sistemi Ambientali, Calcinato (BG)

Quadrifoglio Cooperativa, Castellucchio (MN)

Promocop Lombardia, Milano

Con il contributo di:

Ministero della Transizione Ecologica

Direzione generale Economia Circolare (DG EC)

E-mail: progetto.ricrea@unibs.it

Sito web del progetto RICREA: <https://www.progetto-ricrea.org/>

Indice

Introduzionepag. 6
Caratterizzazione degli scarti cerealicolipag. 5
Produzione di biosurfattanti e terreni trattatipag. 14
Analisi impatto ambientale ed economicopag. 25

Introduzione

Il **Progetto Ricrea - Rifiuti cerealicoli per il biorisanamento** ha l'obiettivo di sviluppare soluzioni innovative per il recupero e la valorizzazione degli scarti cerealicoli, valutando la fattibilità tecnica ed economica dei processi sviluppati.

Le filiere produttive del settore agricolo, e in particolare del comparto cerealicolo, generano notevoli flussi di materiale di scarto dai processi di raccolta e lavorazione. Le statistiche del settore, tuttavia, valutano questi sottoprodotti solo in modo marginale, e non esistono filiere di gestione adeguate e strutturate per il recupero e il riciclo di queste categorie di scarti, che presentano però notevoli proprietà.

I "rifiuti" generati dalla trasformazione dei cereali, infatti, possiedono caratteristiche tali da consentire la produzione di molecole ad alto valore aggiunto, come i biotensioattivi (detti anche biosurfattanti), particolarmente idonei per le operazioni di biorisanamento, biodegradazione e, in generale, nella bonifica di siti inquinati da idrocarburi.

Sulla base di queste premesse, Ricrea si pone l'obiettivo di ricercare, sviluppare e valutare soluzioni tecnologiche innovative in grado di riciclare e valorizzare gli scarti cerealicoli per la

Un progetto per sostenere la redditività delle imprese attraverso l'economia circolare

produzione di molecole da destinare a operazioni di bonifica di terreni contaminati, in direzione di un nuovo modello di economia circolare a sostegno della redditività delle imprese e della sostenibilità dei processi produttivi.

Il presente manuale presenta le attività svolte nel corso del progetto, i processi sviluppati e i risultati ottenuti:

- Caratterizzazione degli scarti cerealicoli; isolamento e selezione di ceppi microbici in grado di produrre biotensioattivi a partire dai rifiuti cerealicoli; produzione di biotensioattivi;
- Caratterizzazione chimico-fisica di terreni contaminati da idrocarburi; trattamento a scala pilota dei terreni tramite due diversi metodi di risanamento biologico (biopila dinamica e sistema bioelettrochimico BES);
- Valutazione dell'impatto ambientale del processo innovativo mediante analisi LCA (Life Cycle Assessment) e della fattibilità economica dei processi sperimentati tramite metodologia LCC (Life Cycle Costing).



**CARATTERIZZAZIONE
DEGLI SCARTI
CEREALICOLI**

Analisi del valore nutrizionale degli scarti cerealicoli

Gli scarti provenienti dalle filiere agricole sono definite biomasse residuali e sono caratterizzate da abbondanza di materiale ligno-cellulosico (matrice) ricco di macro e micronutrienti ma che risulta generalmente poco biodisponibile perché complessato nella matrice di cui sopra. Questi scarti possono essere utilizzati come nutrimento da numerosi microorganismi dotati di un corredo enzimatico adatto alla degradazione delle componenti ligno-cellulosiche (Shäfer et al., 1995).

La cellulosa (34-62%), le emicellulose (16-36%), che includono diversi eteropolisaccaridi quali galattani, glucani, mannani e xilani, e la lignina (18-39%) sono i maggiori componenti degli scarti cerealicoli. L'emicellulosa più comune è composta da xylani, i quali xylosio, L-arabinosio e acido 3-O-metilglucuronico, la cui completa degradazione richiede un'azione sinergica di diversi enzimi, quali endo- β -1,4-xilanasi, β -xilosidasi, α -glucuronidasi, α -L-arabinofuranosidasi, acetil-esterasi e ferunoi- o p-cumaroil- esterasi (Coughlan and Hazlewood, 1993).

Il valore nutrizionale degli scarti cerealicoli può essere determinato sulla base di dati di letteratura

o su base sperimentale. Si riportano a titolo di esempio, le analisi nutrizionali di alcuni scarti agricoli estrapolati dalla letteratura scientifica (Tabelle 1, 2 e 3).



Tabella 1.

Caratterizzazione degli scarti di farro e avena provenienti da valori estrapolati dalla letteratura

Scarti di filiera cerealicola	Genere	Specie	Caratterizzazione	Reference or source
Farro	Triticum	spelta	Carbonio: 51.8 % Azoto: 2.2 % Idrogeno: 7.5 % Ossigeno: 34.6 % Zolfo: 0.148 % Ceneri: 4.81 %	Wiwart et al. (2017)
Farro	Triticum	dicoccon	Carbonio: 51.79 % Azoto: 0,80 % Idrogeno: 7.5 % Ossigeno: 35.5 % Zolfo: 0.071 % Ceneri: 3.76 %	Wiwart et al. (2017)
Avena	Avena	sativa	Carbonio: 48.8 % Azoto: 2.00-1.37 %	Pinto et al. (2021)



Tabella 2.

Caratterizzazione degli scarti di mais provenienti da valori estrapolati dalla letteratura

Scarti di filiera agricola	Genere	Specie	Caratterizzazione	Reference or source
Mais	Zea	mays	Carbonio: 46.2 % Azoto: 0.92 % Idrogeno: 5.42 % Ossigeno: 47.22 % Zolfo: 0.24 % Ceneri: 5.9 %	(Muhammad Danishac et al., 2015)

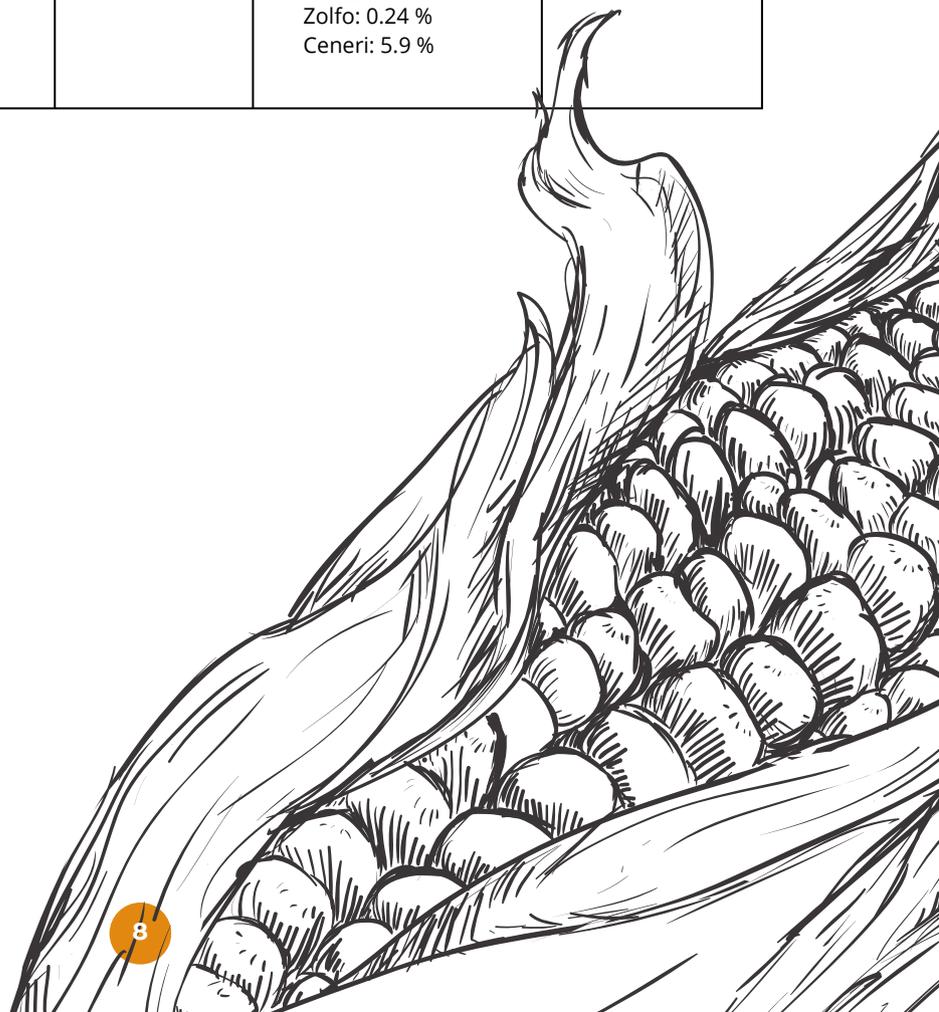


Tabella 3.

Caratterizzazione degli scarti di pisello provenienti da valori estrapolati dalla letteratura

Scarti di filiera	Specie	Caratterizzazione	Reference or source
Pisello	Pisum sativum	<ul style="list-style-type: none">• Fibre 45%• Fenoli totali 1%• Calcio 6.032 mg/g• Fosforo 1.623 mg/g• Amminoacidi: Fenilalanina (14.80%), istidina (14.80%) e tirosina (36.30%)• Saponine 1.068 mg/g• Tannini 0.095 mg/g	(Harinderjeet Kaur Bhullar et al., 2019)

Non esiste purtroppo in letteratura una raccolta sistematica ed un formato universale che possa servire come riferimento all'utilizzo dei rifiuti della filiera cerealicola nel settore della microbiologia industriale. Per questo motivo, è consigliabile procedere ad una caratterizzazione degli

scarti provenienti dai diversi lotti produttivi. A titolo d'esempio si riportano i risultati delle analisi ed i metodi analitici utilizzati in alcune delle prove condotte durante il progetto RICREA (**Tabella 4, 5 e 6**).

Tabella 4.

Caratterizzazione degli scarti di farro e avena (in rosso i valori presumibilmente sovrastimati)

Campione: 10 g di scarti di farro e avena in 100 mL di acqua ultrapura

	Metodo:	Valore	UM	Referenze:	Valori su secco	
pH:		6,5				
Fosfati liberi	Phosphate test	250	mg/L	Colorimetric method with test strips and reagent (Sigma-Aldrich)	0,0025	g/g
Azoto ammoniacale	Ammonium test	30	mg/L	Colorimetric method with test strips and reagent (Sigma-Aldrich)	0,0003	g/g
Zuccheri riducenti	o-DNS	1,27	g/L	Miller, Gail Lorenz. "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar." Analytical chemistry 31.3 (1959): 426-428.	0,0127	g/g
Glucosio	Glucose test	100	mg/L	Colorimetric method with test strips and reagent (Macherey-Nagel)	0,001	g/g
Zuccheri totali	Orcinolo	89	g/L	E. Podgorska " Comparison of methods of determining pentoses and hexoses in lignocellulose raw material hydrolysates" (1990)	0,89	g/g
Proteine	Bradford	5,35	g/L	Jeffrey M. Becker. " Bradford protein assay" (1996)	0,0535	g/g
Ceneri	Residue on ignition	52,4	%		0,524	g/g
Acqua	Perdita in peso	8,8	%		0,088	g/g
Peso specifico		210	g/L		210	g/L
				Totale	1,572	g/g

Tabella 5.

Caratterizzazione degli scarti di mais (in rosso i valori presumibilmente sovrastimati)

Campione: 10 g di scarti di mais in 100 mL di acqua ultrapura

	Metodo:	Valore	UM	Referenze:	Valori su secco	
pH:		5,9				
Fosfati liberi	Phosphate test	50	mg/L	Colorimetric method with test strips and reagent (Sigma-Aldrich)	0,0005	g/g
Azoto ammoniacale	Ammonium test	10	mg/L	Colorimetric method with test strips and reagent (Sigma-Aldrich)	0,0001	g/g
Zuccheri riducenti	o-DNS	3,6	g/L	Miller, Gail Lorenz. "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar." Analytical chemistry 31.3 (1959): 426-428.	0,036	g/g
Glucosio	Glucose test	60	mg/L	Colorimetric method with test strips and reagent (Macherey-Nagel)	0,0006	g/g
Zuccheri totali	Orcinolo	89	g/L	E. Podgorska " Comparison of methods of determining pentoses and hexoses in lignocellulose raw material hydrolysates" (1990)	0,89	g/g
Proteine	Bradford	0,05	g/L	Jeffrey M. Becker. " Bradford protein assay" (1996)	0,0005	g/g
Ceneri	Residue on ignition	35,7	%		0,357	g/g
Acqua	Perdita in peso	7,6	%		0,076	g/g
Peso specifico		322	g/L		322	g/L
				Totale	1,3607	g/g

Tabella 6.

Caratterizzazione degli scarti di pisello (in rosso i valori presumibilmente sovrastimati o che potrebbero influenzare il totale qualora determinabili)

Campione: 10 g di scarti di pisello in 100 mL di acqua ultrapura

	Metodo:	Valore	UM	Referenze:	Valori su secco	
pH:		6,5				
Fosfati liberi	Phosphate test	3	mg/L	Colorimetric method with test strips and reagent (Sigma-Aldrich)	0,00003	g/g
Azoto ammoniacale	Ammonium test	50	mg/L	Colorimetric method with test strips and reagent (Sigma-Aldrich)	0,0005	g/g
Zuccheri riducenti	o-DNS	ND	g/L	Miller, Gail Lorenz. "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar." Analytical chemistry 31.3 (1959): 426-428.	ND	g/g
Glucosio	Glucose test	ND	mg/L	Colorimetric method with test strips and reagent (Macherey-Nagel)	ND	g/g
Zuccheri totali	Orcinolo	ND	g/L	E. Podgorska " Comparison of methods of determining pentoses and hexoses in lignocellulose raw material hydrolysates" (1990)	ND	g/g
Proteine	Bradford	50	g/L	Jeffrey M. Becker. " Bradford protein assay" (1996)	0,3	g/g
Ceneri	Residue on ignition	47,9	%		0,479	g/g
Acqua	Perdita in peso	2,1	%		0,021	g/g
Peso specifico		432	g/L		432	g/L
				Totale	0,80	g/g

Trattamenti preliminari e propedeutici all'utilizzo degli scarti come substrati fermentescibili

Gli scarti cerealicoli possono avere una struttura macroscopica molto eterogenea e spesso, come tali, non sono facilmente utilizzabili da parte dei microorganismi. Sono quindi necessari dei trattamenti preliminari atti a rendere il materiale di scarto uniforme e facilmente utilizzabile.

In letteratura sono descritti svariati trattamenti chimico-fisici utilizzabili per questi scopi. A titolo di esempio riportiamo il trattamento di setacciatura e macinatura che è stato utilizzato nel progetto RICREA.



Questo trattamento offre i vantaggi di poter essere gestito direttamente nei siti di produzione degli scarti e di essere tecnicamente semplice ed efficace. Gli scarti agricoli forniti per il progetto RICREA sono stati sminuzzati attraverso l'utilizzo di un mulino industriale con un setaccio con maglie da 40 mesh (Figure 1 e 2).

Il trattamento degli scarti deve comunque essere effettuato in un'ottica di risparmio energetico e di adattamento ai microorganismi che debbono essere coltivati sugli scarti cerealicoli.



Figura 1. Mulino utilizzato nella sminuzzatura degli scarti cerealicoli



Figura 2. Sminuzzatura e scarti agricoli nelle diverse fasi di trattamento. Da sinistra: materiale originale, sminuzzatura, setacciatura.

Identificazione dei microorganismi adatti all'utilizzo degli scarti fermentescibili

Un corretto utilizzo degli scarti cerealicoli deve partire dal principio che i microorganismi (ed eventualmente i loro prodotti di interesse industriale) devono essere selezionati tra quelli che effettivamente sono in grado di utilizzare lo scarto cerealicolo d'interesse. Per fare un esempio, sarà relativamente semplice crescere sugli scarti cerealicoli (ricchi di ligno-cellulosa) funghi ligninolitici (eventualmente per la produzione di enzimi ossidativi) ma non sarà possibile crescere *Escherichia coli* (batterio tipicamente intestinale).

A titolo di esempio, nel progetto RICREA sono stati selezionati dei ceppi microbici isolati da suolo (e quindi con la capacità di degradare ligno-cellulosa e suoi derivati). Un ulteriore passo nella scelta dei ceppi microbici adatti agli scarti cerealicoli selezionati deve essere fatto andando a focalizzarsi sull'applicazione finale che si vuole perseguire con il prodotto (ceppi microbici cresciuti su scarti cerealicoli).

Ad esempio, se l'applicazione vuole essere quella di produrre biomassa di ceppi microbici degradatori di idrocarburi da applicare a processi di bioremediation, sarà opportuno andare a selezionare ceppi che siano provenienti da siti contaminati da idrocarburi ed eventualmente che siano già stati isolati e caratterizzati per questi scopi.

Nell'ambito del progetto RICREA, tra i ceppi isolati da suolo (e quindi in grado di degradare composti ligno-cellulosici) è stato utilizzato un sotto-insieme noto per la capacità di produrre biosurfattanti. Si riportano di seguito alcuni esempi dei ceppi utilizzati nel progetto RICREA.

Acinetobacter

Il genere *Acinetobacter* comprende una vasta gamma di specie comunemente presenti in natura. Nel corso degli ultimi anni, questo genere microbico è stato riscoperto per diverse applicazioni biotecnologiche e ambientali. Alcuni ceppi di questo genere mostrano attività rilevanti nella biodegradazione di inquinanti, come fenolo, benzoato ed olio esausto (Desouky Abdel-El-Haleem, 2003). Il ceppo utilizzato nel progetto RICREA proviene da un sito contaminato da gasolio.

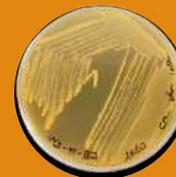


Figura 3. *Acinetobacter* sp.
Crescita su piastra TSB Agar

Bacillus subtilis

Bacillus subtilis è un batterio Gram positivo presente nel suolo; è un aerobio obbligato, di forma bastoncellare e flagellato, in grado di formare una struttura protettiva definita endospora. (Yuxuan Qin et al., 2022). Il ceppo utilizzato nel progetto RICREA è il ceppo VB3, altoproduttore di surfattina, isolato nel contesto del progetto Kill Spill (www.KillSpill.eu).



Figura 4. *B. subtilis*. Crescita su piastra LB-agar

Candida bombicola

Candida bombicola è un lievito riconosciuto per la sua capacità di produrre grandi quantità di biosurfattanti (Sophie L K W Roelants et al., 2013). Il ceppo utilizzato in questo progetto è un altoproduttore di soforolipidi, isolato anch'esso nel contesto del progetto Kill Spill.



Figura 5. *Candida bombicola*.
Crescita su piastra MEA

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa è un batterio patogeno opportunista Gram negativo, aerobio facoltativo, in grado di crescere attraverso la respirazione aerobica ed attraverso la respirazione anaerobica utilizzando il nitrato come accettore finale di elettroni (Stephen P. Diggle and Marvin Whiteley, 2021). Il ceppo utilizzato in questo progetto è un altoproduttore di ramnolipidi, isolato anch'esso nel contesto del progetto Kill Spill.



Figura 6. *P. aeruginosa*.
Crescita su piastra LB-agar

***Rhodococcus* sp.**

Il genere *Rhodococcus* comprende diverse specie, di notevole interesse in ambito biotecnologico. È noto il suo uso per progetti di biorisanamento e accumulo di cesio radioattivo (Dabbs, 1998), nonché biotrasformazione di idrocarburi e sintesi di poliidrossialcanoati (PHA) (Warhust, 1994). Il ceppo utilizzato in questo progetto è stato isolato nel contesto del progetto Kill Spill.



Figura 7. *Rhodococcus* sp.
Crescita su piastra Nutrient agar

Terreni di coltura

I microorganismi possono essere cresciuti in fase liquida oppure su substrati solidi. Per le produzioni industriali (fatto salvo rare eccezioni) si utilizzano principalmente le colture liquide. Gli scarti cerealicoli possono essere utilizzati in entrambe le condizioni (liquido e solido) e la scelta deve essere dettata dal tipo di prodotto che si vuole ottenere. Ad esempio, se si volessero produrre delle spore di funghi da utilizzare come bio-pestidici in agricoltura (*Trichoderma* sp) sarebbe opportuno lavorare utilizzando colture in stato solido. Se invece si vogliono produrre microorganismi per la bioremediation, le colture liquide devono essere preferite.

Nello specifico caso del progetto RICREA, la richiesta di produrre metaboliti di origine microbica (ovvero i biosurfattanti) ha fatto prediligere le colture liquide. Per massimizzare le produzioni, i terreni di coltura, pur essendo basati sugli scarti cerealicoli, devono comunque essere ottimizzati con l'aggiunta di altri macro e/o micro-nutrienti.

Si riportano di seguito alcuni esempi.

Terreni di coltura liquidi - identificazione preliminare degli scarti cerealicoli ottimali per la coltivazione dei microorganismi identificati

Per le prove di crescita, finalizzate a uno screening basato su crescita quantitativa e produzione dei ceppi analizzati, si possono utilizzare i soli scarti cerealicoli secchi forniti come unica fonte nutritiva, sospesi in acqua ultrapura e sterilizzati

Tipologia di scarto agricolo	Formulazione terreno
Scarti di farro e avena	100 g/L
Scarti di mais	100 g/L
Scarti di pisello	100 g/L

Tabella 7. Formulazione terreni con scarti cerealicoli

Possono essere condotte anche delle prove su miscele dei vari scarti cerealicoli allo scopo di migliorare la crescita microbica o la produzione di metaboliti. Lo scopo è quello di ottenere delle miscele di nutrienti differenti.

Formulazione del terreno
50 g/L scarti di farro e avena 50 g/L scarti di mais
50 g/L scarti di farro e avena 50 g/L scarti di pisello
50 g/L scarti di mais 50 g/L scarti di pisello

Tabella 8. Formulazione dei terreni a partire da miscele di scarti agricoli

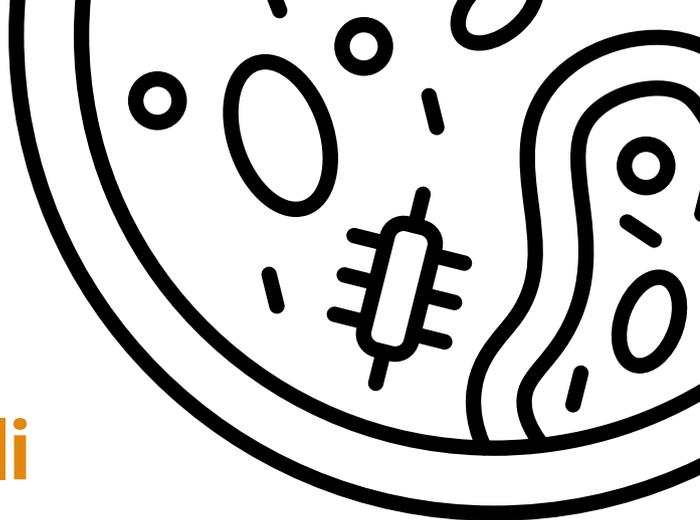
Formulazione dei terreni colturali per un utilizzo industriale

Nel caso in cui si voglia migliorare la crescita microbica o la produzione di metaboliti di interesse, la base del terreno colturale costituita dal solo scarto cerealicolo in acqua, può essere modificata aggiungendo altri nutrienti quali: differenti fonti di carbonio, fonti di azoto, nonché sali. A scopo di esempio, si riporta in Tabella 9 una serie di composizioni di terreni colturali che sono stati utili al progetto RICREA per stimolare la produzione di biosurfattanti nei ceppi microbici selezionati.

Denominazione terreno	Formulazione terreno
A	100 g/L scarti di mais Glicerolo NaNO ₃ KH ₂ PO ₄
B	100 g/L scarti di mais Glicerolo KH ₂ PO ₄
C	100 g/L scarti di mais Glicerolo Olio di soia NaNO ₃ KH ₂ PO ₄
D	100 g/L scarti di mais Glicerolo Olio esausto NaNO ₃ KH ₂ PO ₄
E	100 g/L scarti di mais Glicerolo (concentrazione maggiore rispetto a A) NaNO ₃ KH ₂ PO ₄
F	100 g/L scarti di mais Olio di soia NaNO ₃ KH ₂ PO ₄
H	100 g/L scarti di mais NaNO ₃ KH ₂ PO ₄

Tabella 9. Formulazione dei terreni complessi

Quantificazione di microorganismi e prodotti ottenuti sugli scarti fermentescibili



Per poter valutare il valore di uno scarto agricolo per la crescita dei microorganismi, è necessario poter quantificare la crescita stessa. La conta vitale in piastra permette di valutare la concentrazione delle cellule vitali espressa come unità formanti colonia per unità di volume (CFU/mL) e dà un'indicazione della crescita di un microorganismo sul substrato in analisi. La conta vitale è determinata preparando diluizioni seriali a partire da 1 mL di brodocoltura, con successivo piastramento su terreno agarizzato.

Durante il processo di fermentazione su scarti cerealicoli, le colture sono anche analizzate macroscopicamente (osservazione visiva), per valutarne la crescita (in base alla viscosità e torbidità), la colorazione e la produzione di biosurfattante mediante lo sviluppo di schiuma, sia microscopicamente (osservazione al microscopio ottico) per valutare un'eventuale presenza di contaminazione batterica e/o fungina, la formazione di spore, il consumo e l'emulsificazione di olio e la presenza di biosurfattante prodotto (osservabile sotto forma di micelle).

Valutazione di tossicità di microorganismi e prodotti ottenuti sugli scarti cerealicoli

Per poter procedere all'applicazione dei prodotti ottenuti tramite fermentazioni degli scarti cerealicoli, vanno rispettati i principi regolatori. In particolare, ove i microorganismi utilizzati per la produzione dei biosurfattanti presentino rischi di patogenicità, prima dell'applicazione in campo è necessaria una inattivazione degli stessi (applicabile alla fine del processo fermentativo). Inoltre, il prodotto della fermentazione (nel caso del progetto RICREA il biosurfattante) deve rispettare i principi di non tossicità necessari per il tipo di applicazione prevista. I rischi di cui sopra e le pratiche di mitigazione degli stessi devono essere valutati ed applicati secondo le pratiche correnti.

Quantificazione dei prodotti ottenuti dalla fermentazione degli scarti cerealicoli

Nel caso in cui il prodotto ottenuto dalla crescita microbica sugli scarti cerealicoli non sia il microorganismo stesso (e quindi siano sufficienti i

metodi di quantificazione descritti sopra) sono necessarie analisi specifiche per la quantificazione dei prodotti della fermentazione. I metodi di quantificazione possono essere recuperati dalla letteratura scientifica. A scopo esemplificativo si riportano alcuni esempi dei metodi di quantificazione che sono stati utilizzati nel progetto RICREA per le analisi della produzione di biosurfattanti.

Analisi e quantificazione dei biosurfattanti: test di dispersione del petrolio in acqua

Il test di dispersione del petrolio in acqua, o oil displacement assay, rappresenta un metodo qualitativo rapido ed efficace per poter valutare l'attività tensioattiva della molecola indagata. Offre inoltre il vantaggio di poter verificare molti campioni.

Il saggio viene eseguito in piastre Petri di diametro pari a 5 cm, in cui sono stati aggiunti 30 μL di petrolio, 3 mL di acqua demineralizzata ed infine 3 μL del campione da analizzare. Il diametro dell'alone ottenuto a seguito del gocciolamento del campione in soluzione rappresenta un'indicazione qualitativa del potere surfattante della sostanza in esame (Figura 8).

Questo saggio, messo a punto da Morikawa nel 2000, è in grado di sfruttare la capacità dei biosurfattanti di creare zone circolari in cui il fluido viene spostato una volta aggiunti ad un liquido apolare come l'olio. La grandezza di queste zone è correlabile all'attività del biosurfattante.



Figura 8. Controllo negativo (sinistra) e controllo positivo (destra) per test ODA

I risultati di questo saggio sono espressi come la misura del diametro dell'alone concentrico che si è generato o utilizzando il segno (+) o (-) per indicare lo sviluppo o meno di aloni anche se non concentrici rispetto alla piastra Petri.

Analisi e quantificazione dei biosurfattanti: Indice di emulsificazione (EI24(%))

L'indice di emulsificazione (EI24(%)) rappresenta un parametro per la determinazione del potere emulsificante di una molecola surfattante.

Nel progetto RICREA è stato eseguito il protocollo riportato in letteratura da Cooper D.G. et al. 1987. Nel dettaglio, la misurazione è stata eseguita mediante miscelazione di volumi equivalenti, pari a 2 mL, della soluzione contenente il biosurfattante in analisi e di *n*-esadecano.

La miscela viene posta in agitazione mediante l'ausilio di un vortex per 2 minuti e quindi posta in incubazione a 25 °C per 24 ore. L'indice di emulsificazione viene calcolato come il rapporto tra l'altezza della fase emulsionata e l'altezza totale della colonna di liquido, espresso in percentuale.

Per avere una determinazione più accurata, è possibile utilizzare il petrolio al posto del *n*-esadecano (Figura 9).

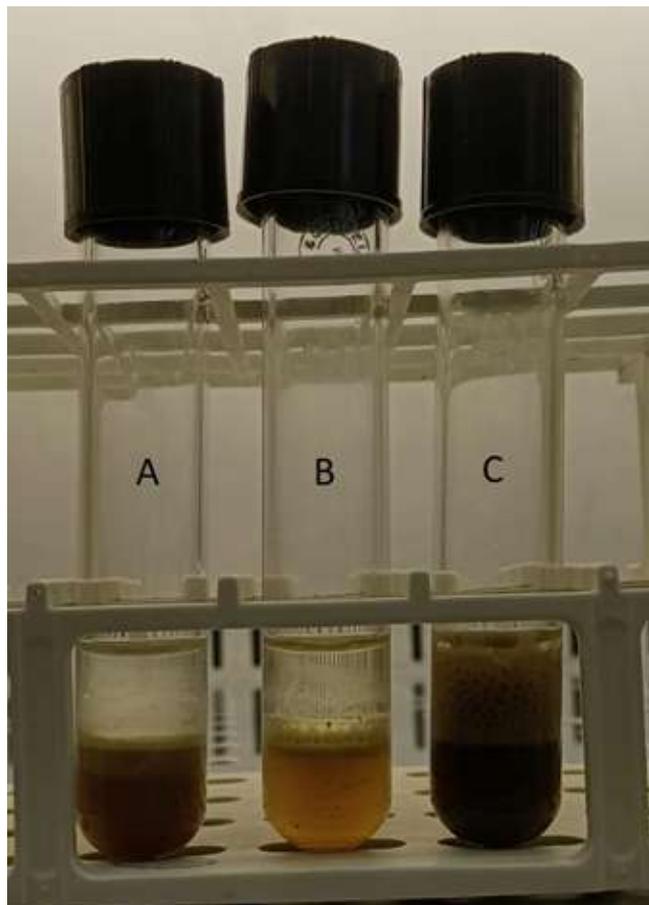
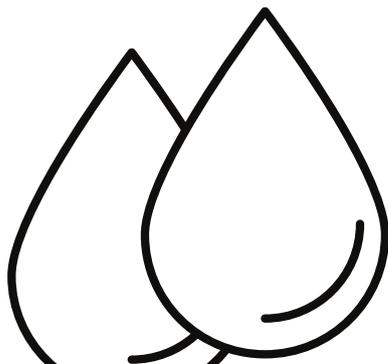


Figura 9. Determinazione dell'indice di emulsificazione in colture di *Bacillus subtilis*. Da sinistra: scarti di farro e avena (A), scarti di mais (B) e scarti di pisello (C). Campione di surnatante del brodo colturale a 144 ore in *n*-esadecano



Analisi e quantificazione dei biosurfattanti: Analisi qualitativa degli estratti tramite TLC

Gli estratti grezzi di biosurfattanti, una volta risospesi in un solvente adeguato, possono essere analizzati qualitativamente tramite metodo TLC. Come fase stazionaria vengono utilizzate lastre di vetro rivestite con gel di silice. In base alla polarità dei composti da analizzare, per la fase mobile

vengono usate diverse miscele di solventi. Dopo aver fatto evaporare il solvente residuo dalla fase mobile della lastra, le TLC vengono immerse in specifici reagenti di sviluppo in grado di rilevare composti organici, quali orcinolo, acqua, vanillina e permanganato e sottoposte ad intenso calore allo scopo di rendere visibili gli spot (Figura 10).

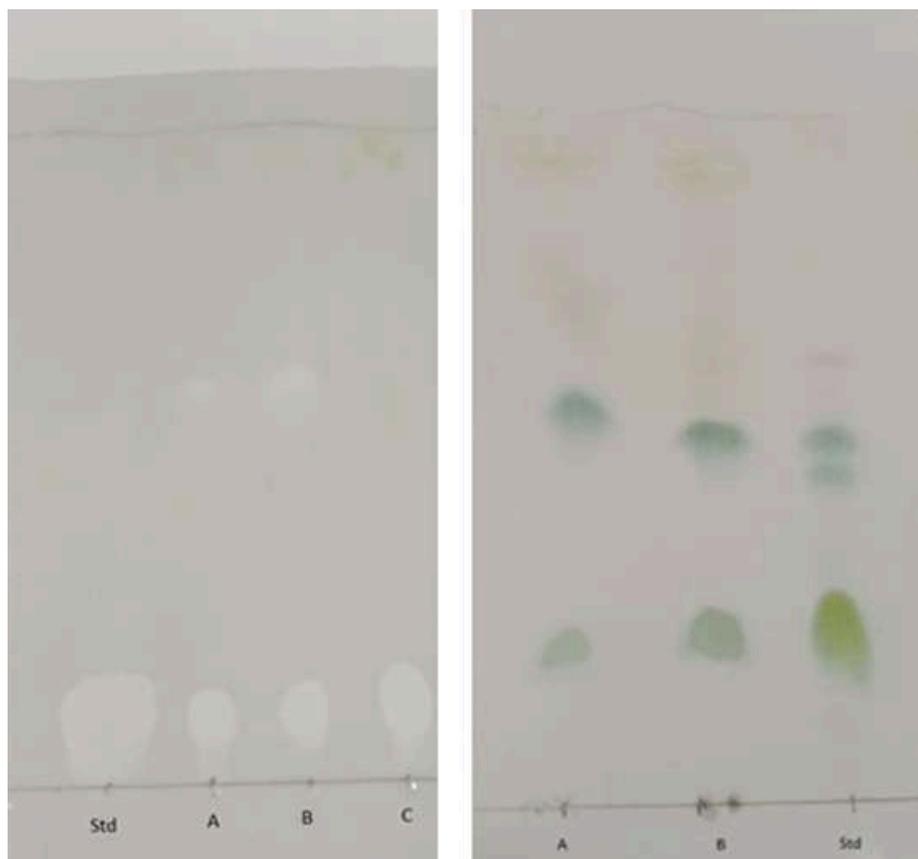


Figura 10. A sinistra TLC *Bacillus subtilis* (surfattina). A destra, TLC *Pseudomonas aeruginosa* (rhamnolipidi)

Analisi e quantificazione dei biosurfattanti:

Analisi HPLC

La cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) è una tecnica analitica che permette la separazione e l'identificazione di composti differenti presenti all'interno di una miscela. I metodi di analisi sono generalmente specifici per i biosurfattanti da analizzare. Si riporta a titolo d'esempio il metodo di analisi per la surfattina prodotta da *Bacillus subtilis*. Analisi HPLC associata ad estrazione con solventi per la surfattina.

I campioni utilizzati per le analisi sono preparati partendo direttamente dalla brodocoltura totale. Viene prelevata un'aliquota di brodocoltura, che viene processato secondo il seguente protocollo:

- Aggiungere 1 volume di metanolo (MeOH)
- Mettere in agitazione per 10 minuti
- Centrifugare a 16.1 rcf per 5 minuti
- Trasferire il surnatante in apposite vials per HPLC.

I campioni così preparati sono analizzati in HPLC secondo il metodo riportato da Sousa *et al.*, 2014 (Tabella 7).

Strumento:	Agilent Technologies 1260 Infinity
Colonna:	LiCrosphere RP18 (150 x 4,6 mm, 5 µm) C18
Fase mobile:	Acqua (H ₂ O): acetonitrile (CH ₃ CN): acido trifluoroacetico (TFA) in rapporto 20:80:0,025%
Flusso:	1 ml/min
Sistema di eluizione:	isocratico
Volume di iniezione:	10 µl
Temperatura fornetto:	25 °C
Rivelatori:	UV (λ=205 nm)
Temperatura dei rivelatori:	25 °C
Tempo dell'analisi:	25 minuti

Tabella 10. Dettaglio del metodo analitico utilizzato per lo studio della surfattina

La concentrazione della surfattina è calcolata per interpolazione di una retta di calibrazione costruita utilizzando uno standard (Sigma-Aldrich) (Figura 11).

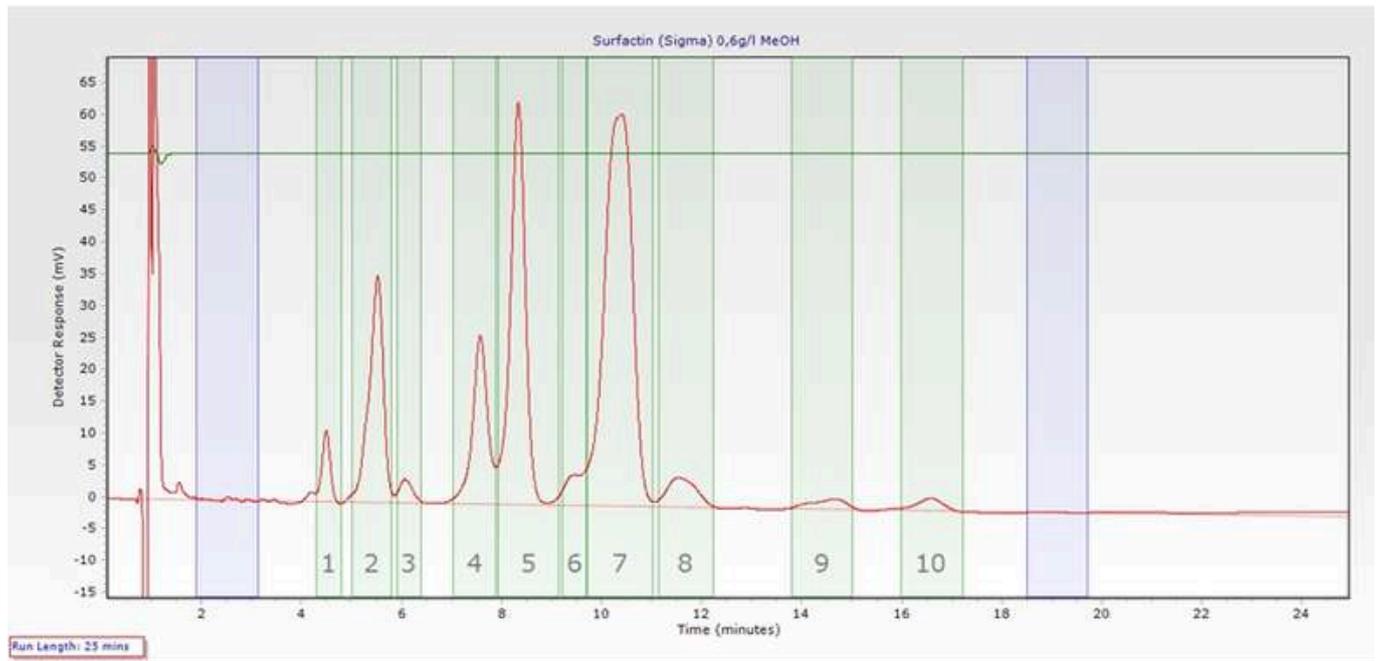


Tabella 10. Dettaglio del metodo analitico utilizzato per lo studio della surfattina



In conclusione gli scarti cerealicoli, ove opportunamente selezionati e pre-trattati, possono essere utilizzati per le produzioni industriali secondo metodiche consolidate.

Infatti, nel progetto RICREA è stato dimostrato che gli scarti cerealicoli possono essere utilizzati alla stregua di qualsiasi nutriente utilizzato nelle fermentazioni microbiche.

Per quanto riguarda la possibilità di utilizzare gli scarti cerealicoli come biostimolanti, non esistono dati diretti di efficacia; tuttavia, gli scarti agricoli vengono abbondantemente utilizzati come ammendanti durante il trattamento dei suoli.

Nell'ambito del progetto RICREA si promuove la valorizzazione degli scarti agricoli attraverso il loro utilizzo come base per la formulazione di terreni colturali, utilizzati come base per la produzione di

Utilizzo	Scarti cerealicoli	Reference or source
Compost	Paglia di avena, orzo, frumento	Progetto Veneto Agricoltura
Compost	Mais stocchi e tutoli	Progetto Veneto Agricoltura
Compost	Granella di leguminose	Progetto Veneto Agricoltura

Tabella 11. Utilizzo degli scarti agricoli per il compostaggio

biosurfattanti microbici. I brodi di fermentazione ottenuti, previa sterilizzazione, potranno essere utilizzati per la bonifica di suoli contaminati unendo la possibilità di bonificare il terreno attraverso l'aggiunta di biosurfattanti alla biostimolazione dei microorganismi autoctoni grazie agli scarti residui dalla fermentazione.

Altre applicazioni

- Produzione di ammendanti per la filiera agricola
- Produzione di biochar per la filiera agricola
- Produzione di molecole a valore aggiunto per i settori nutraceutico, cosmetico, farmaceutico
- Impiego in processi di biorisanamento ambientale



Figura 12. Rappresentazione schematica del progetto RICREA



**PRODUZIONE DI
BIOSURFATTANTI
E TERRENI TRATTATI**

Utilizzo dei prodotti microbici ottenuti tramite fermentazione degli scarti della filiera agricola nel trattamento dei suoli contaminati da idrocarburi

Questa fase del progetto è stata dedicata al **“Trattamento di terreni contaminati” su scala pilota.**

In questo WP **sono state identificate e selezionate 5 matrici terrose contaminate** e caratterizzate dalla presenza significativa di idrocarburi (C>12) conferite presso l'impianto autorizzato di Sistemi Ambientali nel Comune di Calcinato (BG). Ognuno dei suddetti lotti è stato campionato (seguendo le indicazioni della normativa di riferimento UNI 10802) e sottoposto ad analisi chimiche e geotecniche al fine di valutarne le caratteristiche.

Dei suddetti lotti **ne sono stati scelti 2 come campioni** rappresentativi utilizzati per allestire le 2 prove pilota su scala semi-industriale (mesocosmi).

Ciascuna prova verrà condotta impiegando 4 biopile con due diversi metodi di risanamento biologico:
·due biopile dinamiche con e senza aggiunta di biotensioattivo
·due biopile statiche trattate con sistema bioelettrochimico BES (con sistema

integrato di elettrodi in grafite a basso voltaggio, in cassone mobile).

Nello specifico le **due diverse tecnologie di risanamento biologico** si articolano in:

- la prima tecnologia (biopila dinamica) si basa nell'allestimento di cumuli terrosi (definite anche “andane”) che, grazie alla fornitura di ossigeno mediante il rivoltamento periodico con macchine specializzate definite “rivoltacumuli”, si stimola l'attività degradativa dei microorganismi presenti nella matrice terrosa nei confronti dei contaminanti presenti sia di tipo chimico sia microbico. Il rivoltamento viene effettuato 1 o 2 volte alla settimana rifornendo in tal modo l'ossigeno necessario ai batteri aerobi atti alla mineralizzazione delle sostanze idrocarburiche ed organiche putrescibili presenti in H₂O ed CO₂, nonché alla normalizzazione della carica batterica.
- la seconda tecnologia (sistema bioelettrochimico BES) si basa nell'allestimento di una biopila di matrice terrosa statica saturata di acqua (nel nostro caso all'interno di un

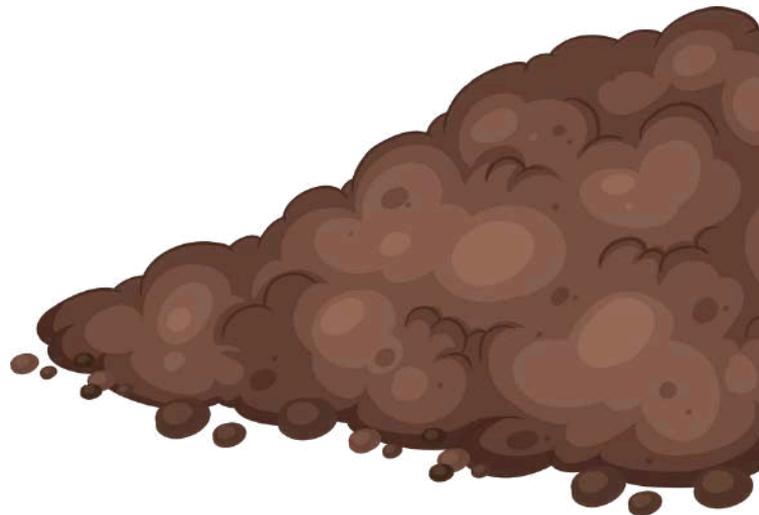
cassone in ferro a tenuta) collegata ad una fonte di energia elettrica mediante l'utilizzo di elettrodi in grafite immersi nel terreno ed organizzati a coppie (anodo e catodo distanti circa 1 metro) a cui vengono applicate piccole differenze di potenziale elettrochimico (0,8 V). Tale differenza di potenziale elettrico crea un piccolo campo elettrico in grado di stimolare i microorganismi presenti nella matrice terrosa a mineralizzare le sostanze idrocarburiche e putrescibili presenti.

Ciascuna biopila impiegherà circa 4-5 m³ di terreno contaminato e saranno soggette al piano di monitoraggio ambientale previsto dall'A.I.A. di Sistemi Ambientali, che prevede controllo delle temperature ed umidità con scadenza settimanale, analisi microbiologiche ogni 14 giorni e caratterizzazione chimica (idrocarburi, N, P, K) e degli idrocarburi ogni 21 giorni.

Al termine delle attività di sperimentazione le biopile in caso di trattamento non efficace (ossia al non raggiungimento dei parametri previsti in A.I.A.) verranno smaltite e/o recuperate in impianti autorizzati invece in caso di raggiungimento degli obiettivi di bonifica le biopile cesseranno la qualifica di rifiuto ai sensi dell'art. 184-ter D.lgs 152/06.

L'obiettivo di questo WP3 è quello di valutare il miglioramento del processo di degradazione degli idrocarburi e la relativa efficacia dei biotensioattivi aggiunti alle biopile nonché di confrontare i due diversi processi sperimentali (biopila dinamica e biopila bioelettrochimica) per comprendere quali dei due processi possa avere una migliore resa a parità di materiale trattato e costo industriale e durata di trattamento.

La prima prova pilota, denominata biopila 26/23, è stata condotta a partire dal 29 giugno 2023 al 02 aprile 2024, presso l'impianto Sistemi Ambientali di Calcinato (BG), alla presenza dei partner del Progetto Ricrea.



Le fasi dell'allestimento

A

Il lotto di matrice terrosa contaminato iniziale viene opportunamente movimentato al fine di avere una adeguata omogeneità, quindi cernito e vagliato per eliminare le frazioni grossolane (oltre i 20 mm) e materiali estranei (plastiche, metalli...)



B

Al lotto viene aggiunto fertilizzante granulare agricolo N/P/K con concentrazioni 19/29/0 al fine di creare un substrato nutritivo ottimale alla successiva fase batterica di risanamento biologico. La biopila viene quindi rivoltata tramite una macchina rivoltacumuli per omogeneizzarne la distribuzione anche all'interno.



C

Nel frattempo viene prodotta una soluzione di acqua e biosensibilizzanti derivanti da scarti cerealicoli appositamente prodotti dalla ditta BioC-CheM Solution per la sperimentazione in atto.



D

a) Il cumulo omogeneo di terreno contaminato è stato quindi suddiviso in quattro parti, due delle quali sono state addizionate con la soluzione di acqua e biotensioattivi precedentemente prodotta.



E

Vengono allestite 2 biopile dinamiche:

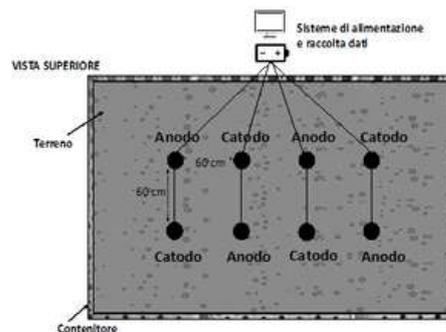
- 1 biopila dinamica a rivoltamento con aggiunta dei soli nutrienti NPK (biopila 26/23 1B);
- 1 biopila dinamica a rivoltamento con aggiunta dei nutrienti NPK e biotensioattivi (biopila 26/23 1A);



F

Vengono allestite 2 biopile elettrochimiche in cassette a tenuta:

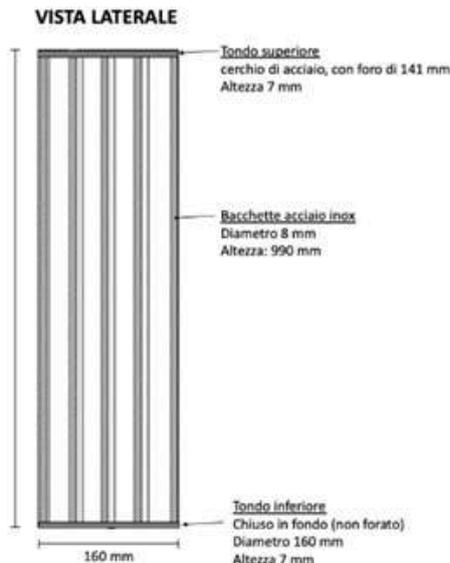
- 1 biopila statica elettrochimica con aggiunta dei soli nutrienti NPK (26/23 2B);
- 1 biopila statica elettrochimica con aggiunta dei nutrienti NPK e biotensioattivi (26/23 2A);





OSSERVAZIONI

- **Tondo inferiore:** 160 mm diametro, altezza 7 mm. Non fresato in piano.
- **Tondo superiore:** diametro 160 mm alto 7 mm non fresato. Con un foro di 141 mm. Il foro del **Tondo superiore** dev'essere 141 mm da 0 a +0,5 mm
- **Bacchette acciaio inox:** diametro 8 mm forate 5 mm (o altra misura di foro in accordo con il materiale commerciale), altezza 990 mm, in modo che la grafite stia 3 mm sotto il tappo superiore
- Le 8 **Bacchette acciaio inox** forate su un diametro di 151 mm ogni 45°. I fori devono essere 2/3 centesimi di mm più scarsi rispetto alle barrette per potercela infilare a forza.



Sezione elettrodi in grafite



Elettrodi in grafite



Alimentatore e monitoraggio degli elettrodi

Al termine dell'allestimento, le 4 biopile sono state campionate per poter redigere le analisi T0.

Le 4 biopile hanno seguito il piano di monitoraggio definito dell'A.I.A. di Sistemi Ambientali ovvero:

Ogni 14 giorni prove microbiologiche monitorando:

a) "microrganismi eterotrofi totali" la cui l'alta concentrazione nella matrice terrosa è indice per la degradazione dei composti organici e degli idrocarburi.

b) "escherichia coli" e "clostridium perfringens" batteri anaerobi di tipo patogeni ed indici di contaminazione antropica. Il biorisanamento porta alla normalizzazione della loro concentrazione nella matrice terrosa.

Ogni 21 giorni prove chimiche monitorando:

a) "ammoniaca, azoto, fosforo" la cui concentrazione nella matrice terrosa è fonte di nutriente perché crea un substrato ottimale per la proliferazione dei microrganismi eterotrofi.

b) "benzene" e "C>12" la cui concentrazione è indice del corretto processo degradativo ad opera dei microrganismi.

Ogni settimana la determinazione della temperatura della biopila.

Il processo di biorisanamento ad opera dei microrganismi è di tipo esotermico quindi sviluppa una leggera quantità di calore che per un buon andamento del processo deve essere superiore (o almeno pari) alla temperatura ambientale.

Ogni settimana la determinazione dell'umidità della biopila.

Essa gioca un ruolo fondamentale in quanto i microrganismi presenti nella matrice terrosa, essendo comuni esseri viventi, necessitano di un

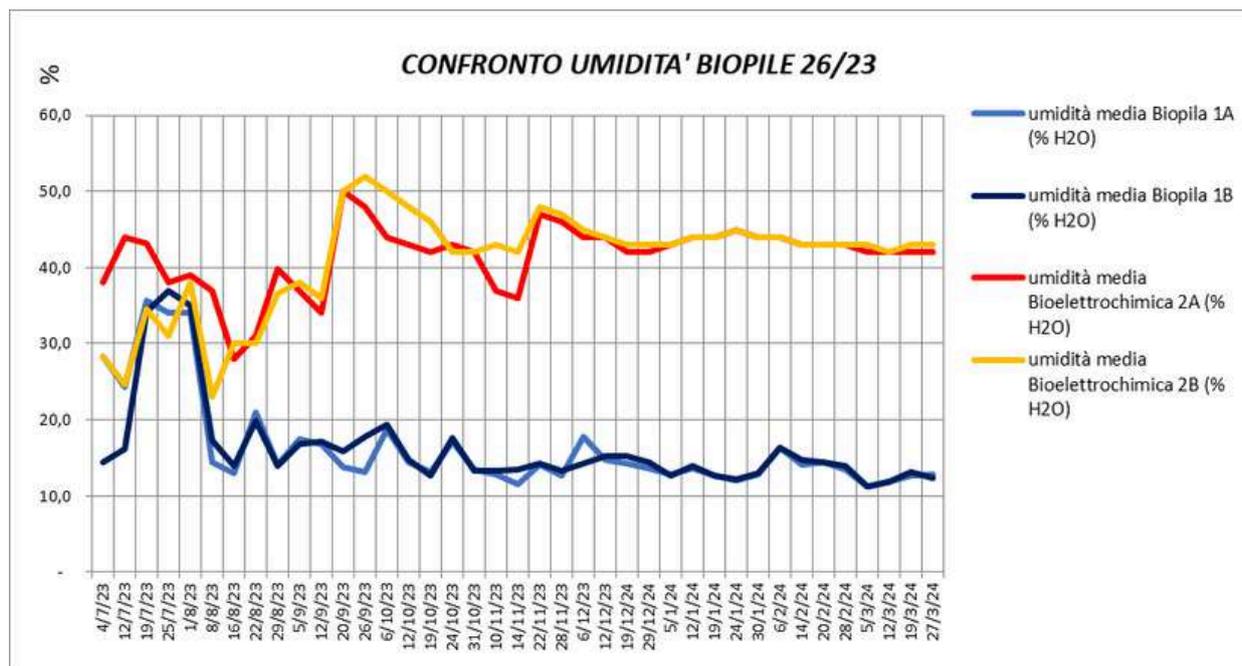
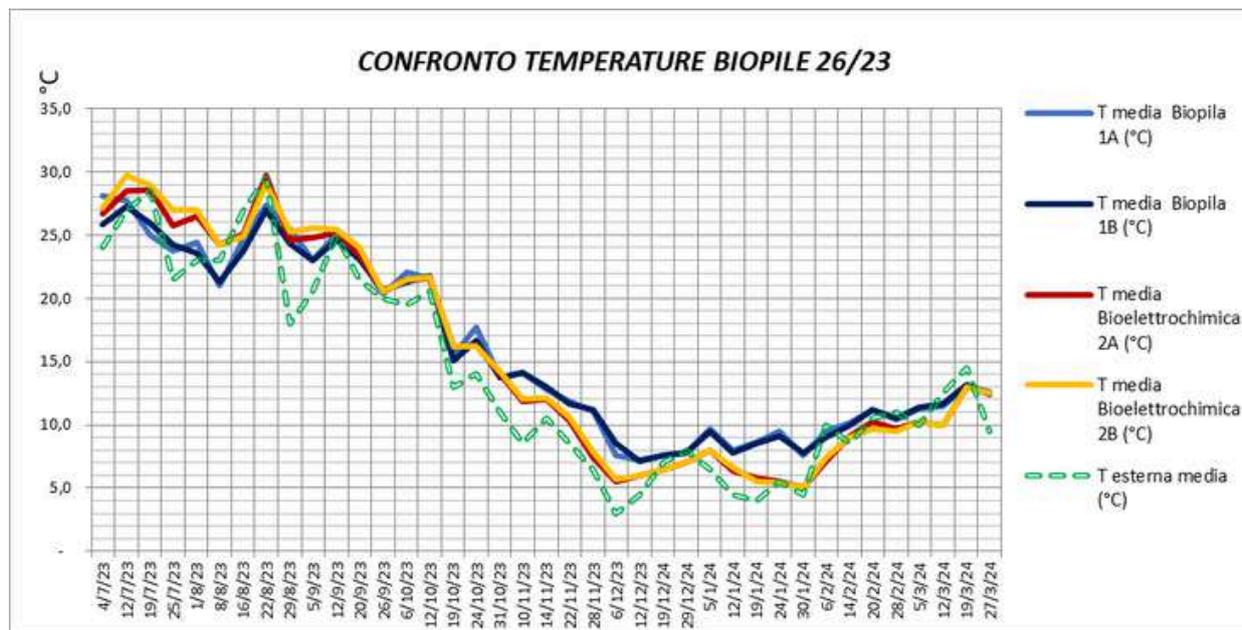
grado d'umidità idoneo per poter vivere e processare la loro attività degradativa. In caso di basso tenore dell'umidità si procede con l'erogazione di acqua durante il rivoltamento delle biopile.

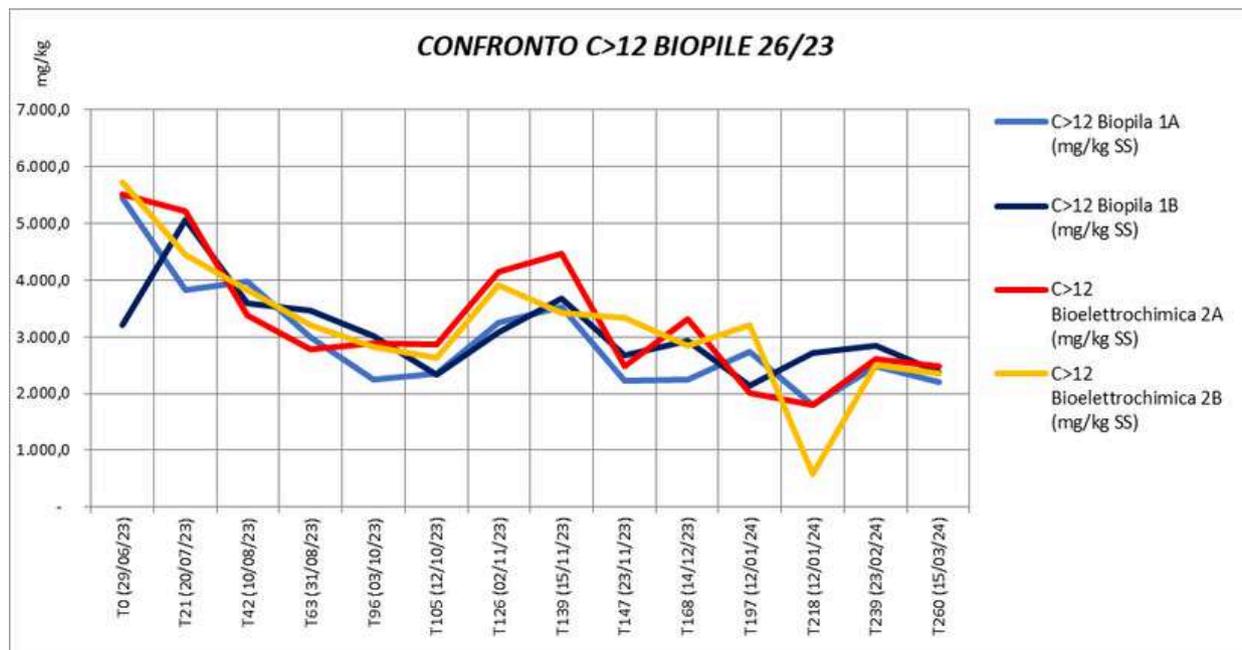
1 o 2 volte alla settimana le biopile dinamiche sono rivoltate tramite macchina rivoltacumuli.

Trattasi di un macchinario, acquistato appositamente per coltivare biopile su scala semi-industriale, dotato di un rotore centrale, che permette roteando velocemente, di ossigenare ed omogenizzare le zolle di terreno anche nel caso di tessiture particolarmente argillose.



Si riportano i grafici relativi agli andamenti delle biopile 26/23 ad inizio e fine trattamento:



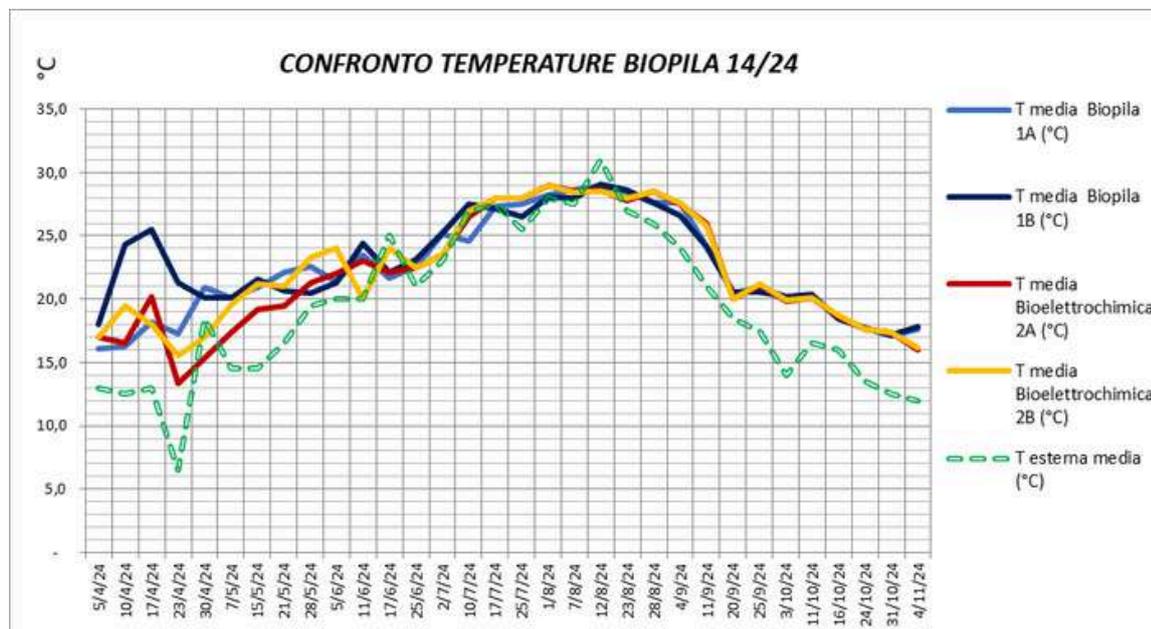


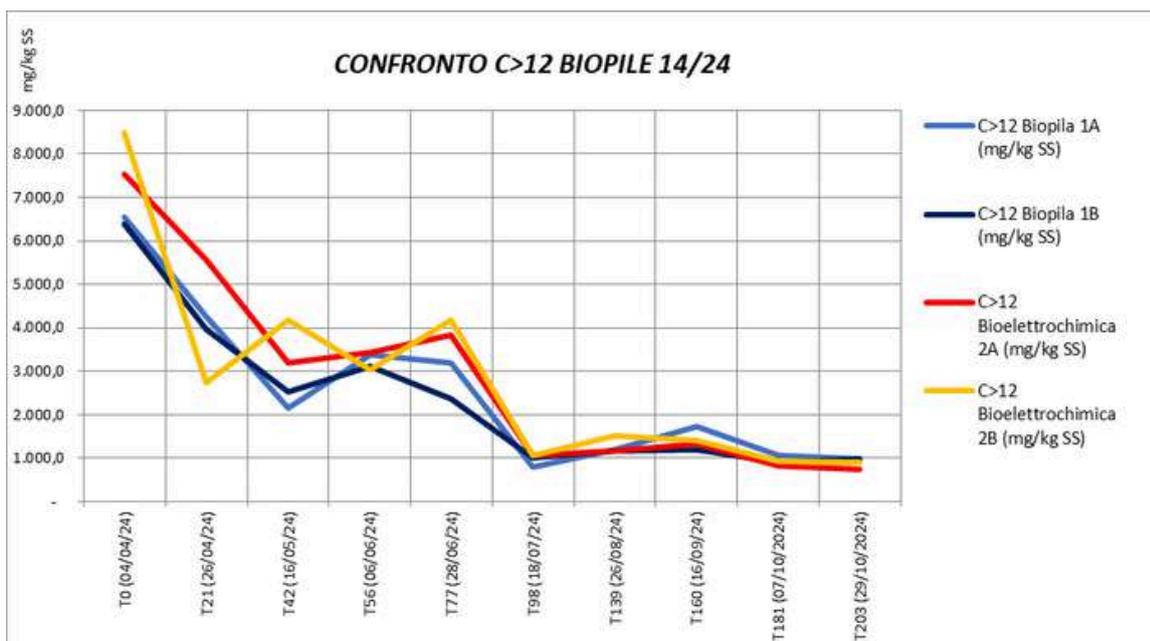
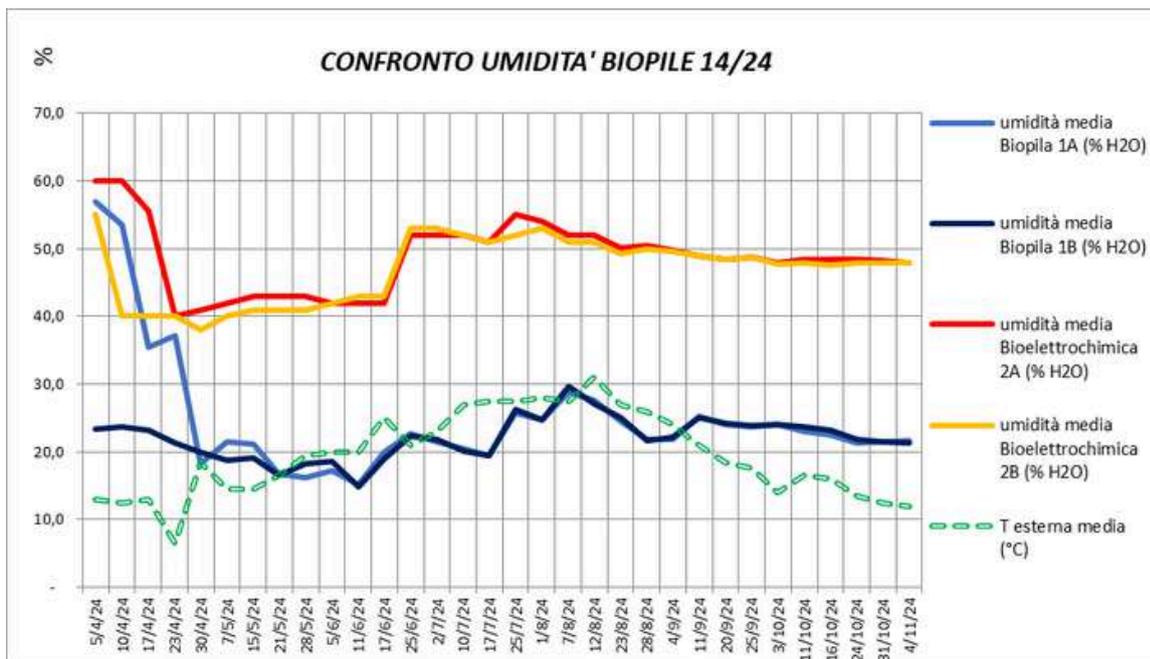
C>12 (mg/kg SS)	INIZIALE	FINALE	RIDUZIONE C>12 (%)
Biopila 1A	5.447	2.206	59%
Biopila 1B	3.208	2.381	26%
Bioelettrochimica 2A	5.523	2.482	55%
Bioelettrochimica 2B	5.722	2.354	59%

A fine trattamento delle biopile il materiale trattato è stato conferito come rifiuto presso impianto terzo autorizzato.

La seconda prova pilota, denominata biopila 14/24, è stata condotta a partire dal 04 aprile 2024 al 05 novembre 2024 sempre presso l'impianto Sistemi Ambientali di Calcinatè (BG), alla presenza dei partner del Progetto Ricrea. L'allestimento ed i monitoraggi della seconda prova si articolano come per la prima effettuata precedentemente.

A conclusione della sperimentazione si riportano i grafici relativi agli andamenti delle biopile 14/24 ad inizio e fine trattamento:





C>12 (mg/kg SS)	INIZIALE	FINALE	RIDUZIONE C>12 (%)
Biopila 1A	6.548	987	85%
Biopila 1B	6.399	985	84%
Bioelettrochimica 2A	7.541	733	90%
Bioelettrochimica 2B	8.500	909	89%

A fine trattamento delle biopile il materiale trattato è stato conferito come rifiuto presso impianto terzo autorizzato.



**ANALISI IMPATTO
AMBIENTALE
ED ECONOMICO**

Analisi impatto ambientale



L'obiettivo di questo studio è condurre un'analisi dell'impatto ambientale relativo alle tecniche impiegate durante il Progetto RICREA per la produzione di ramnolipidi biosurfattanti da scarti cerealicoli tramite *Pseudomonas sp* ed il loro impiego nella decontaminazione dei suoli. L'obiettivo è di colmare la carenza di conoscenze sugli impatti ambientali dei parametri operativi dei processi sviluppati durante il Progetto, inclusi l'aggiunta di prodotti chimici, il consumo di materiali ed energia, le emissioni gassose, la produzione di materiali e rifiuti solidi e i prodotti di trasformazione residui.

È stato considerato un approccio basato sul ciclo di vita (Life Cycle Assessment - LCA) per incorporare tutti gli impatti legati alla produzione di biosurfattanti e al consumo di energia, così come ai prodotti chimici utilizzati nel trattamento, oltre all'efficienza dei processi stessi, per ottenere una valutazione valida dell'impatto del processo di trattamento.

LCA è uno strumento ampiamente utilizzato per la valutazione ambientale, con un focus sulla fattibilità

tecnica e sulla sostenibilità ambientale. Si è dimostrato efficace in varie applicazioni, come le opzioni di trattamento dei rifiuti. LCA si è evoluto negli ultimi tre decenni, diventando più sistematico e robusto per identificare e quantificare i potenziali impatti ambientali associati al ciclo di vita di un prodotto. LCA è di fondamentale importanza nei settori della progettazione, ottimizzazione e selezione di prodotti e processi. Tramite l'analisi è possibile valutare efficacemente le implicazioni ambientali delle proprie decisioni operative integrando LCA con metodologie di simulazione e strumenti di progettazione. LCA è ampiamente riconosciuto come uno strumento estremamente efficace per condurre valutazioni ambientali; migliorare la qualità dei materiali, dei combustibili e delle fonti energetiche; ottimizzare le tecnologie di produzione; valutare scenari di trattamento dei rifiuti; e formulare piani per promuovere pratiche responsabili e sostenibili nella produzione, nel consumo e nella gestione di materiali, sottoprodotti e rifiuti. Inoltre, LCA cerca di individuare potenziali aree di miglioramento per ridurre al minimo l'impatto ambientale.

Inventario del ciclo di vita

L'impatto ambientale dei processi produttivi di biosurfattanti e dei relativi processi di bonifica sono stati valutati utilizzando i dati primari ottenuti dagli studi di laboratorio. L'inventario è stato collegato al database Ecoinvent v3.6 (allocazione, cut-off per

classificazione), che fornisce informazioni di base complete su materiali e fonti energetiche. Gli input e output utilizzati in questo studio sono descritti nelle Tabelle 1 e 2.

Tabella 1.

Inventario del ciclo di vita del processo di degradazione del suolo contaminato da idrocarburi petroliferi utilizzando il Land farming

Input/output SimaPro		1 kg polluted soil	Data procurement method	Source - LCA process
Inputs from Technosphere		g or kWh		
Materials/fuels	Water, deionised (Europe without Switzerland) market for water, deionised Cut-off, S	275 ± 0.1	Measured	Ecoinvent
	Potassium nitrate (GLO) market for Cut-off, S	1.49 ± 0.2	Measured	Ecoinvent
	NH ₄ 2HPO ₄ , unspecified	0.1 ± 0.01	Measured	Ecoinvent
	Inputs from Technosphere (biosurfactants)	mg		
	Biosurfactant	275 ± 0.2	Measured	Ecoinvent
Electricity/heat	Electricity, low voltage (IT) market for Cut-off, S	36 ± 0.05	Measured	Ecoinvent
Outputs to Technosphere		Cm ³		
Waste treatment	Wastewater, average (Europe without Switzerland) market for wastewater, average Cut-off, S	400 ± 0.0	Measured	Ecoinvent

Tabella 2.

Materie prime utilizzate nella produzione di biosurfattanti a scala di laboratorio, con l'unità funzionale come base di misura

Input/output SimaPro		10 mg biosurfactant	Data procurement method	Source - LCA process
Inputs from Technosphere		g or kwh		
Materials/fuels	Water, deionised {Europe without Switzerland} market for water, deionised Cut-off, S	1.0 ± 0.01	Measured	Ecoinvent
	Base oil {GLO} market for base oil Cut-off, S	45.0 ± 0.01	Measured	Ecoinvent
	Magnesium sulfate {GLO} market for Cut-off, S	0.0977 ± 0.01	Measured	Ecoinvent
	Sodium chloride, powder {GLO} market for Cut-off, S	0.1 ± 0.012	Measured	Ecoinvent
	Ammonium sulfate, as N {GLO} market for Cut-off, S	0.0212 ± 0.014	Measured	Ecoinvent
	Iron (II) chloride {GLO} market for Cut-off, S	0.02 ± 0.016	Measured	Ecoinvent
	Ethyl acetate {GLO} market for Cut-off, S	113 ± 0.01	Measured	Ecoinvent
	Methanol {GLO} market for Cut-off, S	261 ± 0.05	Measured	Ecoinvent
	Benzoic acid {RER} market for benzoic acid Cut-off, S	0.847 ± 0.001	Measured	Ecoinvent
	Sodium hydroxide, without water, in 50% solution state {GLO} market for Cut-off, S	0.555 ± 0.001	Measured	Ecoinvent
	KH ₂ PO ₄ , unspecified	0.391 ± 0.012	Measured	Ecoinvent
	Potassium hydroxide {GLO} market for Cut-off, S	0.161 ± 0.014	Measured	Ecoinvent
	Glucose {GLO} market for glucose Cut-off, S	0.5 ± 0.016	Measured	Ecoinvent
	Ethanol, without water, in 99.7% solution state, from fermentation {GLO} market for Cut-off, S	0.789 ± 0.018	Measured	Ecoinvent
Electricity/heat	Electricity low voltage {IT} market for Cut-off, S kilojoules (KJ)	75.3 ± 0.05	Measured	Ecoinvent

Inoltre, è stata effettuata una analisi di comparazione tra la produzione di 1 kg di biosurfattante su scala industriale secondo i processi attualmente utilizzati (scenario base) e

secondo i processi sviluppati durante il progetto RICREA (best scenario). In Tabella 3 vengono riportati gli input e gli output utilizzati nello studio.

Tabella 3.

Materie prime utilizzate nella produzione di biosurfattanti a scala industriale, con l'unità funzionale di 1 kg e confronto tra scenario base e best scenario

Input/output SimaPro		1 kg biosurfactant (Base scenario)	1 kg biosurfactant (Best scenario)	Data procurement method	Source - LCA process	
Inputs from Technosphere (Upstream)		Kg or kJ	Kg or kJ			
Materials/fuels	Water, deionised [Europe without Switzerland] market for water, deionised Cut-off, 5	220.8.0 ± 0.01	380.6 ± 0.01	Secondary data	Ecolvent	
	Wheat seed, organic, for sowing [GLO] market for Cut-off, 5	45.0 ± 0.01	84.2 ± 0.01	Secondary data	Ecolvent	
	Sulfuric acid [REER] market for sulfuric acid Cut-off, 5	2.62 ± 0.01	nu	Secondary data	Ecolvent	
	Sodium hydroxide, without water, in 50% solution state [GLO] market for Cut-off, 5	2.32 ± 0.012	nu	Secondary data	Ecolvent	
	Phosphoric acid, industrial grade, without water, in 85% solution state [GLO] market for Cut-off, 5	1.94 ± 0.014	nu	Secondary data	Ecolvent	
	Ammonia, liquid [REER] market for Cut-off, 5	nu	0.26 ± 0.016	Secondary data	Ecolvent	
	Activated carbon [GLO] market for Cut-off, 5	0.00014 ± 0.016	nu	Secondary data	Ecolvent	
	Inputs from Technosphere (Fermentation)					
	Ammonia, liquid [REER] market for Cut-off, 5 un specified	0.015 ± 0.012	0.035 ± 0.013	Secondary data	Ecolvent	
	Vinasse, from fermentation of sweet sorghum [GLO] market for Cut-off, 5	0.26 ± 0.016	0.99 ± 0.016	Secondary data	Ecolvent	
	Inputs from Technosphere (Downstream)					
	Ethyl acetate [GLO] market for Cut-off, 5	2.00 ± 0.01		Secondary data	Ecolvent	
	Methanol [GLO] market for Cut-off, 5	nu	0.09 ± 0.05	Secondary data	Ecolvent	
Hydrochloric acid, without water, in 30% solution state [REER] market for Cut-off, 5	0.82 ± 0.012	nu	Secondary data	Ecolvent		
Water, deionised [Europe without Switzerland] market for water, deionised Cut-off, 5	0.131 ± 0.014	nu	Secondary data	Ecolvent		
Electricity/heat	Electricity, low voltage [IT] market for Cut-off, 5 kilojoules (KJ)	91875 ± 0.05	5213 ± 0.03	Secondary data	Ecolvent	

Analisi degli impatti del ciclo di vita

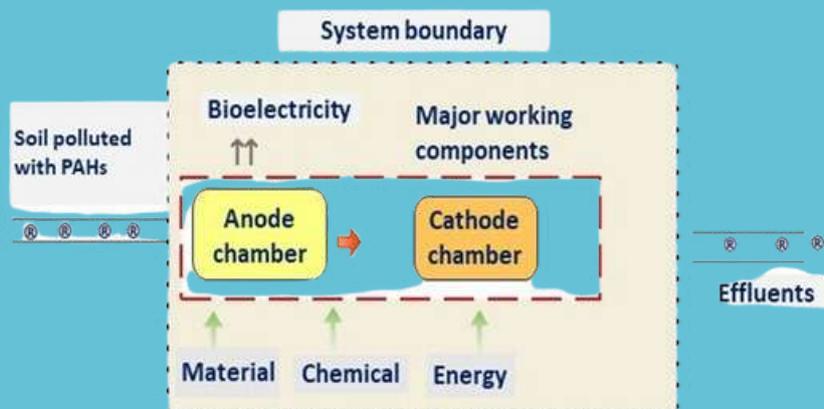
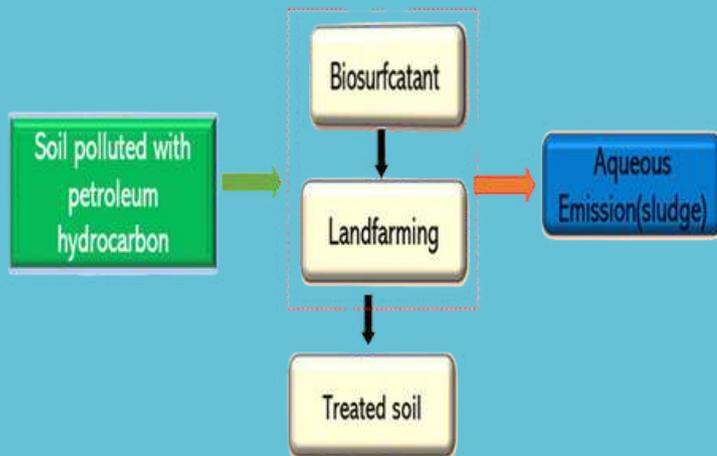
Le implicazioni ambientali dei processi sono state calcolate utilizzando SimaPro 9.5, il modello LCIA e la versione Hierarchist di ReCiPe 2016 v1.1 midpoint. SimaPro 9.5 valuta gli impatti ambientali del processo produttivo e dei processi di biorisanamento del suolo in un'ampia gamma di 18 categorie. Queste categorie includono ecotossicità terrestre, consumo idrico, tossicità non cancerogena per l'uomo, tossicità cancerogena per l'uomo, scarsità di risorse fossili e minerali, eutrofizzazione marina, potenziale di riscaldamento globale, formazione di particolato fine, uso del suolo, eutrofizzazione marina, impoverimento dell'ozono stratosferico, tossicità non cancerogena per l'uomo, radiazioni ionizzanti, ecotossicità marina, salute umana, ecotossicità delle acque dolci, formazione di particolato fine, formazione di ozono, ecotossicità terrestre e i loro impatti sugli ecosistemi terrestri. La valutazione ha incluso vari processi e materiali, e gli impatti sono stati standardizzati per rappresentare la loro entità e rilevanza relative. I fattori di normalizzazione sono stati selezionati in base alle conseguenze ambientali di Ecoinvent.



La Fig. 1 illustra i confini del sistema dell'analisi attuale, comprendendo i processi di produzione di biosurfattanti per i processi di decontaminazione dei suoli del Land Farming (Fig. 1A) e del sistema Bio-elettro Chimico (BES) analizzato durante il Progetto (Fig. 1B).

La figura include anche i dati di input rilevanti, come il consumo di energia, e i dati di output, come i rifiuti di fanghi. La fase operativa di recupero e trattamento del suolo non è influenzata dalla fase di fine vita e, pertanto, non è considerata nell'analisi.

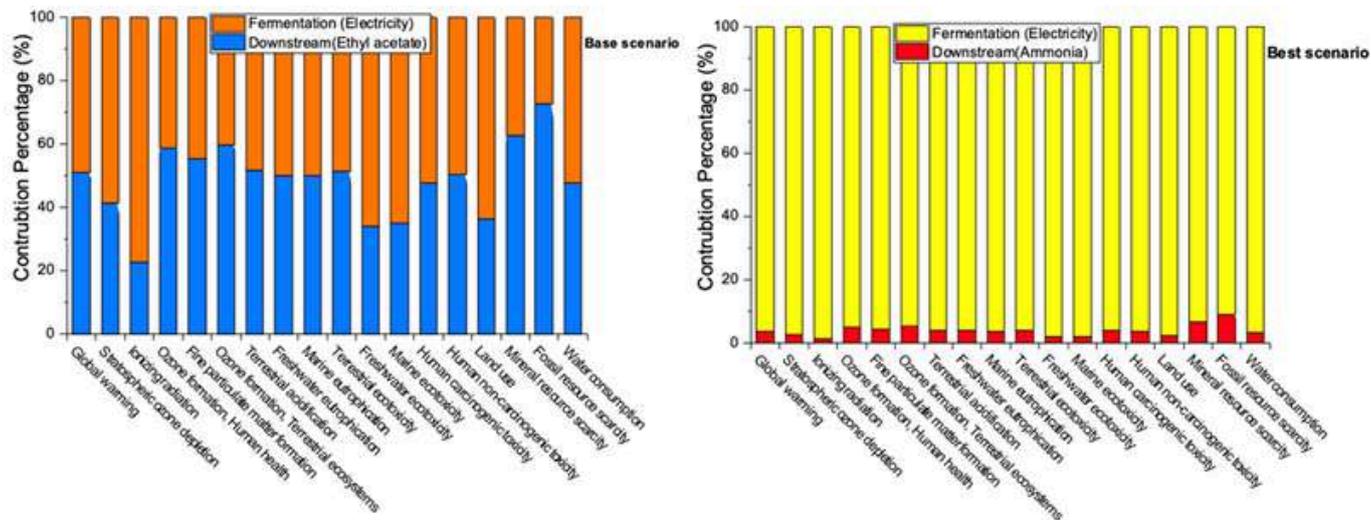
Figura 1A e 1B. Confini dei sistemi di trattamento dei suoli contaminati tramite Land Farming (A) e BES (B)



Risultati. I principali fattori che contribuiscono alle implicazioni ambientali del processo di produzione di ramnolipidi biosurfattanti sono il consumo di elettricità e l'utilizzo di additivi chimici per entrambi gli scenari, come illustrato nella Fig. 2.

effetti, tra cui radiazioni ionizzanti, riduzione dello strato di ozono, ecotossicità terrestre, riscaldamento globale e degrado delle risorse abiotiche. È importante riconoscere che l'inclusione di acetato di etile riciclato modifica gli effetti

Figura 2. LCA per la produzione di ramnolipidi biosurfattanti nello scenario base e nel best scenario (hot spot analysis)



Il consumo di energia ha un impatto relativamente elevato su alcune categorie di impatto a livello intermedio, tra la scarsità delle risorse fossili, delle risorse minerali e la formazione dell'ozono a danno della salute umana e degli ecosistemi terrestri.

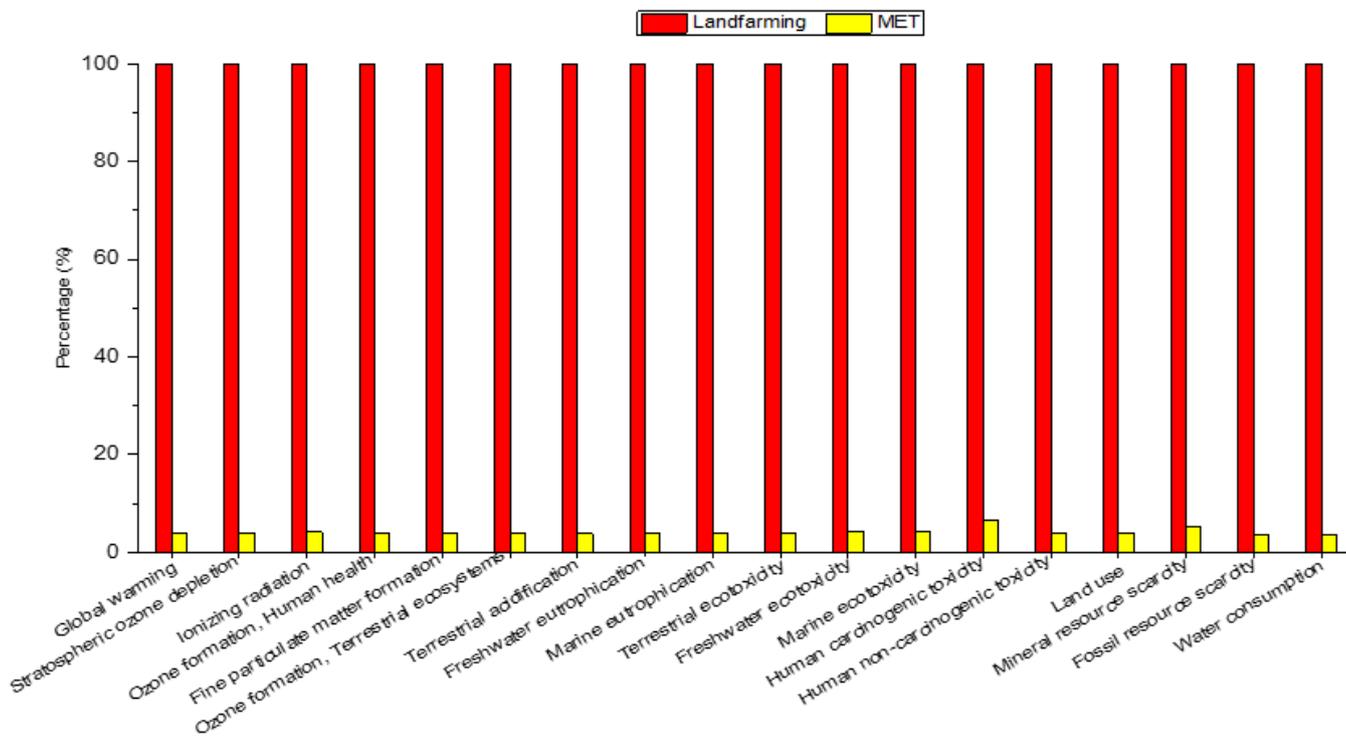
È stata condotta un'analisi distinta dei diversi processi coinvolti per ottenere una visione completa delle implicazioni della produzione di biosurfattanti. La fermentazione contribuisce a un aumento dell'impatto ambientale in particolare per il consumo energetico del processo. L'acetato di etile, utilizzato nel processo dello scenario base, ha un impatto significativo su diverse categorie di

ambientali. È inoltre fondamentale riconoscere che l'energia menzionata nell'inventario è classificata come un mix elettrico a bassa tensione ottenuto dalla rete. Ciò implica che le principali fonti di generazione di energia sono prevalentemente combustibili fossili, come carbone, petrolio e gas naturale, a seconda del mix energetico del paese in questione. Il processo di estrazione e consegna dell'energia proveniente da combustibili fossili comporta il rilascio di notevoli quantità di gas serra, in particolare anidride carbonica, insieme a composti organici volatili non metanici, come il biossido di zolfo. Si raccomanda l'adozione di approcci di generazione di energia rinnovabile,

come i pannelli solari, per i processi elettro-Fenton, al fine di ridurre l'impatto ambientale e migliorare la sostenibilità rispetto ad altre tecnologie di bonifica del suolo.

biosurfattanti. Al contrario, il processo BES dimostra il potenziale più basso in termini di diversi criteri di impatto ambientale. Ciò è dovuto al minor consumo energetico e al bilanciamento degli impatti dovuto

Figura 3. Confronto degli impatti ambientali relativi al Land farming ed all'approccio BES (MET)



La Figura 3 fornisce un'analisi dettagliata degli impatti ambientali dei processi di Land farming e BES, consentendo un confronto comparativo delle rispettive tecnologie. Il processo di Land farming ha mostrato un maggiore potenziale in tutti i parametri di impatto ambientale valutati. I principali fattori che contribuiscono a questi potenziali elevati sono attribuibili al maggiore consumo di energia legato all'agitazione del reattore e alla produzione di

alla produzione di energia. Il principale fattore di contribuzione al riscaldamento globale è la produzione di energia attraverso la combustione di combustibili fossili. Di conseguenza, il significativo potenziale di riscaldamento globale associato al processo Land farming può essere attribuito al notevole consumo di elettricità dalla rete, sia durante la fase di miscelazione sia nella produzione di biosurfattanti durante il processo di

di fermentazione. È stato osservato che il potenziale di riscaldamento globale associato alla bonifica del suolo contaminato da idrocarburi petroliferi è sensibilmente maggiore rispetto ad altri tipi di inquinanti organici.

Conclusioni. Questo studio ha esaminato gli impatti ambientali dei processi di produzione di biosurfattanti e delle tecniche di gestione dei terreni contaminati relative al Land farming ed al BES. I risultati mostrano che il BES è il metodo più ecocompatibile, con impatti inferiori in tutte le categorie del metodo di caratterizzazione ReCiPe 2016. Tuttavia, si può affermare che il processo di Land farming ha esercitato un'influenza significativa in diverse categorie. Gli elementi più rilevanti nell'inventario per entrambe le tecniche sono il consumo di energia e nell'uso di biosurfattanti. La produzione di questi ultimi ha invece mostrato come l'approccio sviluppato dal Progetto abbia un impatto ambientale inferiore rispetto allo scenario base, innescando inoltre un virtuoso meccanismo di circolarità

Lo studio suggerisce l'uso di fonti di energia rinnovabile e lo sviluppo di materiali a basso costo per il trattamento del suolo contaminato da idrocarburi petroliferi. Questo pone l'accento sulla sostenibilità ambientale del processo produttivo di biosurfattanti, e viene evidenziato il potenziale delle applicazioni di produzione sviluppate durante il progetto RICREA.

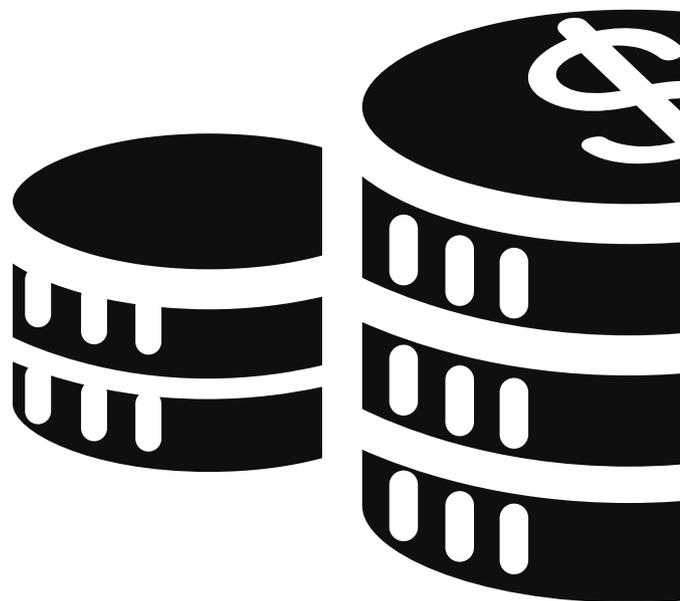
Analisi del ciclo di vita dei costi

L'obiettivo di questo studio è condurre un'analisi dell'impatto economico relativo alle tecniche impiegate durante il Progetto RICREA per la produzione di ramnolipidi biosurfattanti ed il loro impiego nella decontaminazione dei suoli tramite le tecniche del Land farming e del sistema bio-elettrochimico BES. L'analisi tecno-economica, combinata con il Life Cycle Costing (LCC), fornisce un quadro completo che valuta l'impatto economico durante l'intero processo di produzione.

L'utilizzo dei residui agroindustriali, come gli scarti alimentari e i rifiuti cerealicoli, presenta vantaggi significativi, tra cui la riduzione dei costi delle materie prime e una maggiore valorizzazione dei rifiuti, che risolvono le pressanti questioni legate alla gestione dei rifiuti.

Tuttavia, il panorama economico è complesso, poiché i costi di produzione dei ramnolipidi possono essere, in alcuni casi, significativamente più alti di quelli delle alternative sintetiche, spesso a causa di fattori quali la selezione delle materie prime e il consumo di energia durante i processi di fermentazione. L'esplorazione di materie prime di

seconda generazione è dunque fondamentale, in quanto può alleviare le preoccupazioni economico-ambientali associate ai substrati tradizionali di prima generazione, favorendo così un modello di produzione più sostenibile.



Inventario del ciclo di vita dei costi

L'impatto economico della produzione di una unità funzionale (1 kg di biosurfattante) è stato analizzato utilizzando i dati primari ottenuti dagli studi di laboratorio. L'inventario è stato collegato al database Ecoinvent v3.6 (allocazione, cut-off per classificazione), che fornisce informazioni di base

complete su materiali e fonti energetiche. Gli input e output utilizzati in questo studio sono descritti nella Tab. 1 che confronta lo scenario base di produzione con il best scenario ottenute dagli approcci sviluppati durante il progetto RICREA.

Tabella 1.

Inventario del ciclo di vita del processo di degradazione del suolo contaminato da idrocarburi petroliferi utilizzando il Land farming

Input/output SimaPro		1 kg biosurfactant (Base scenario)	1 kg biosurfactant (Best scenario)	Data procurement method	Source - LCA process	
Inputs from Technosphere (Upstream)						
Materials/fuels	Water, demineralised (Europe without Switzerland) market for water, demineralised Cut-off, 5	220.8.0 ± 0.01	380.6 ± 0.01	Secondary data	Ecoinvent	
	Wheat seed, organic, for sowing (GLO) market for Cut-off, 5	45.0 ± 0.01	84.2 ± 0.01	Secondary data	Ecoinvent	
	Sulfuric acid (RER) market for sulfuric acid Cut-off, 5	2.62 ± 0.01	nu	Secondary data	Ecoinvent	
	Sodium hydroxide, without water, in 50% solution state (GLO) market for Cut-off, 5	2.32 ± 0.012	nu	Secondary data	Ecoinvent	
	Phosphoric acid, industrial grade, without water, in 85% solution state (GLO) market for Cut-off, 5	1.94 ± 0.014	nu	Secondary data	Ecoinvent	
	Ammonia, liquid (RER) market for Cut-off, 5	nu	0.26 ± 0.016	Secondary data	Ecoinvent	
	Activated carbon (GLO) market for Cut-off, 5	0.00014 ± 0.016	nu	Secondary data	Ecoinvent	
	Inputs from Technosphere (Fermentation)					
	Ammonia, liquid (RER) market for Cut-off, 5 un specified	0.015 ± 0.012	0.035 ± 0.013	Secondary data	Ecoinvent	
	Vinasse, from fermentation of sweet sorghum (GLO) market for Cut-off, 5	0.26 ± 0.016	0.99 ± 0.016	Secondary data	Ecoinvent	
Inputs from Technosphere (Downstream)						
Ethyl acetate (GLO) market for Cut-off, 5	2.00 ± 0.01		Secondary data	Ecoinvent		
Methanol (GLO) market for Cut-off, 5	nu	0.09 ± 0.05	Secondary data	Ecoinvent		
Hydrochloric acid, without water, in 30% solution state (RER) market for Cut-off, 5	0.82 ± 0.012	nu	Secondary data	Ecoinvent		
Water, demineralised (Europe without Switzerland) market for water, demineralised Cut-off, 5	0.131 ± 0.014	nu	Secondary data	Ecoinvent		
Electricity/heat	Electricity, low voltage (IT) market for Cut-off, 5 kilojoules (KJ)	91875 ± 0.05	5213 ± 0.03	Secondary data	Ecoinvent	

Analisi degli impatti del ciclo di vita dei costi

Figura 1A e 1B. Confini dei sistemi di trattamento dei suoli contaminati tramite Land Farming (A) e BES (B).

La Fig. 1 illustra i confini del sistema dell'analisi attuale, comprendendo i processi di produzione di biosurfattanti per i processi di decontaminazione dei suoli del Land Farming (Fig. 1A) e del sistema Bio-elettro Chimico (BES) analizzato durante il Progetto (Fig. 1B).

La figura include anche i dati di input rilevanti, come il consumo di energia, e i dati di output, come i rifiuti di fanghi. La fase operativa di recupero e trattamento del suolo non è influenzata dalla fase di fine vita e, pertanto, non è considerata nell'analisi.

Figura 1A e 1B. Confini dei sistemi di trattamento dei suoli contaminati tramite Land Farming (A) e BES (B)

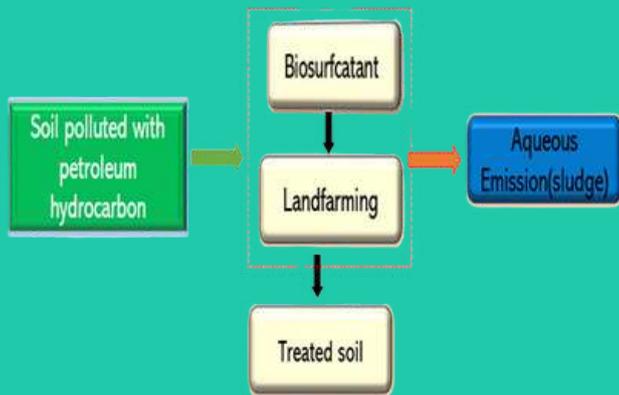


Figura 1A

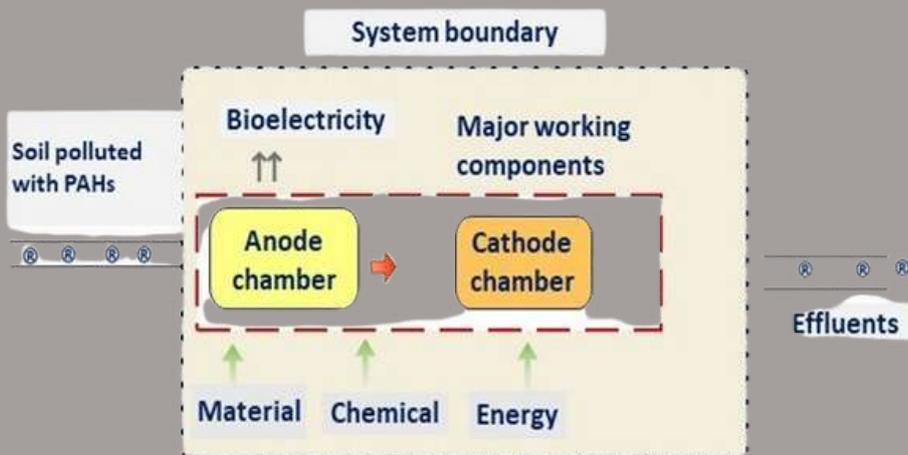


Figura 1B

Figura 1. LCC per la produzione di biosurfattanti nello scenario base (hot spot analysis)

I principali fattori che contribuiscono alle implicazioni economiche del processo di produzione di biosurfattanti sono il consumo di elettricità e l'utilizzo di additivi chimici per entrambi gli scenari. Come illustrato nella Fig. 1., nello scenario base vi è una incidenza del consumo elettrico del 94,2% nell'intero processo, con un costo totale associato alla produzione di 1 kg di ramnolipide di 50€.

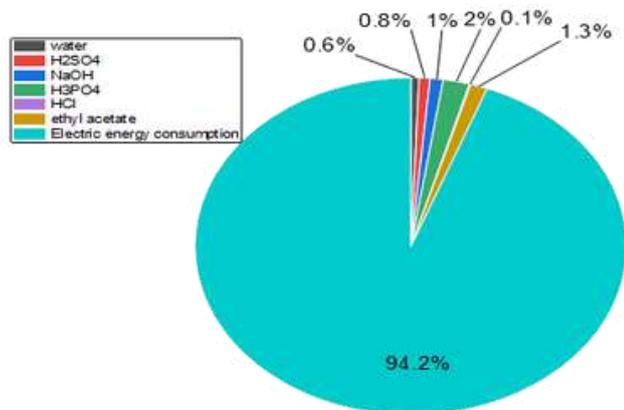


Figura 1. LCC per la produzione di biosurfattanti nello scenario base (hot spot analysis)

Conclusioni. Il mercato globale dei biosurfattanti sta registrando un'impennata della domanda grazie alla sua versatilità e alla sua ecocompatibilità, in sostituzione degli alteranti chimici. I progressi tecnologici hanno reso la produzione e la lavorazione dei biosurfattanti più facile ed economica. Tuttavia, la loro scarsa produzione è dovuta ai costi elevati, alla bassa resa e al tempo, che li rendono più costosi delle alternative chimiche. Ciò evidenzia le difficoltà nella commercializzazione dei biosurfattanti. Per superare queste sfide, i processi sviluppati nel il Progetto RICREA risultano favorevoli dal punto di

Bio-elettro Chimico (BES) analizzato durante il Progetto (Fig. 1B).

La figura include anche i dati di input rilevanti, come il consumo di energia, e i dati di output, come i rifiuti di fanghi. La fase operativa di recupero e trattamento del suolo non è influenzata dalla fase di fine vita e, pertanto, non è considerata nell'analisi.

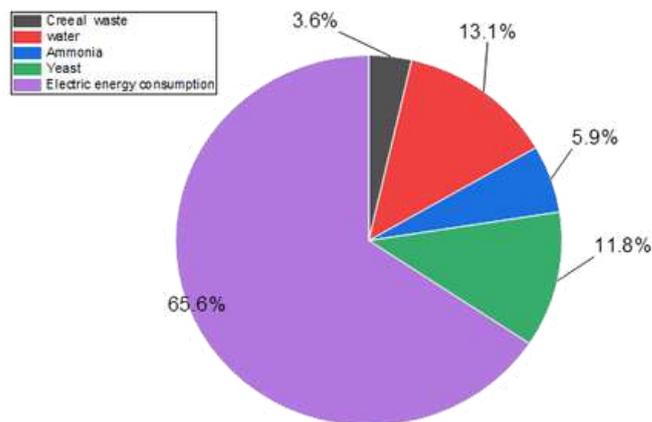


Figura 2. LCC per la produzione di biosurfattanti nello scenario best (hot spot analysis)

vista economico ed ecologico per la produzione di biosurfattanti da rifiuti cerealicoli. Ciò facilita la fermentazione su larga scala di substrati di carboidrati, portando al successo commerciale. Per ridurre i costi di produzione e migliorare la resa in biosurfattanti è necessaria anche un'adeguata ottimizzazione del mezzo attraverso metodi statistici e processi a valle. Stabilire metodologie standard universalmente riconosciute per il LCC resta un punto essenziale per valutazioni accurate della sostenibilità del ciclo di vper la bonifica del suolo.



Progetto presentato a valere sul bando per il cofinanziamento di progetti di ricerca volti allo sviluppo di tecnologie per la prevenzione, il recupero, il riciclaggio ed il trattamento di rifiuti non rientranti nelle categorie già servite da consorzi di filiera, all'ecodesign dei prodotti e alla corretta gestione dei relativi rifiuti. Progetto cofinanziato dal Ministero della Transizione Ecologica-Direzione Generale Economia Circolare.