

Monitoraggio e Valorizzazione di consorzi microalghe/batteri coltivati su reflui agrozootecnici

Dr.ssa Katia Parati

ISTITUTO SPERIMENTALE ITALIANO SPALLANZANI
Settore Acquacoltura

Aquafarm – Pordenone, 15-16 febbraio 2018



**fondazione
cariplo**



**Regione
Lombardia**



Progetto: “IL POLO DELLE MICROALGHE”

| Istituto Sperimentale Italiano “Lazzaro Spallanzani” (IS) | (Capofila) |
|--|------------|
| Politecnico di Milano (POLIMI), Polo Territoriale di Cremona | (Partner) |
| Università degli Studi di Milano Bicocca – DISAT (UNIMIB) | (Partner) |
| Centro di Ricerca per le Produz. Foraggere e Lattiero Casearie (CREA-FLC) | (Partner) |
| Provincia di Cremona | (Partner) |
| Ente Regionale per i Servizi all'Agricoltura e alle Foreste (ERSAF) | (Partner) |

A supporto del progetto:

- Camera di Commercio Industria Artigianato e Agricoltura di Cremona (**CCIAA**) (cofinanziatore)
- Polo Tecnologico della Cosmesi
- Coldiretti

Durata del progetto: **36 mesi**

Totale contributo al progetto: **1.500.000 Euro** (1.050.000 Euro da Fondazione Cariplo, 450.000 da Regione Lombardia).



fondazione
cariplo



Regione
Lombardia

OBIETTIVO GENERALE

Realizzazione di un centro di sperimentazione (IL POLO DELLE MICROALGHE) per:

- lo sviluppo di tecnologie innovative basate sull'impiego di microalghe e di progetti imprenditoriali finalizzati alla mitigazione dell'impatto dei reflui e sottoprodotti di origine zootecnica e agro-alimentare sul territorio
- trasformazione degli scarti in nuovi prodotti (biomassa microalgale) da valorizzare in differenti settori già consolidati (cosmetico, mangimistico, energetico, agricolo) in un'ottica di economia circolare.



Focus

- 1) Sviluppo di metodi metagenomici per un efficace e completo monitoraggio dell'ecosistema alghe/batteri

- 2) Valorizzazione della biomassa microalgale utilizzata per la depurazione di reflui agricoli-zootecnici:
 - a. **Produzione di biogas** tramite digestione anaerobica
 - b. **Produzione di bioplastiche** tramite fermentazione a Acidi Grassi Volatili e successivo accumulo da parte di batteri PHA-accumulanti (PAO).

Sviluppo di metodi metagenomici per Monitoraggio microbiologico

E' stato provato che:

- Esistono interazioni fra batteri e alghe e diversi studi hanno dimostrato che alghe e batteri sinergicamente e reciprocamente influenzano il metabolismo e la fisiologia (Amin et al., 2015, Landa et al., 2015)
- Recenti studi hanno dimostrato che alcuni batteri non solo possono influenzare positivamente la crescita delle alghe ma possono aiutarne anche la flocculazione, processi essenziali della biotecnologia algale (Cho et al., 2015a; Kim et al., 2014b)



Studi dei meccanismi interattivi fra batteri e potrebbero pertanto contribuire a un miglioramento della produzione consentendo una selezione delle combinazioni ottimali di batteri e alghe per le differenti applicazioni

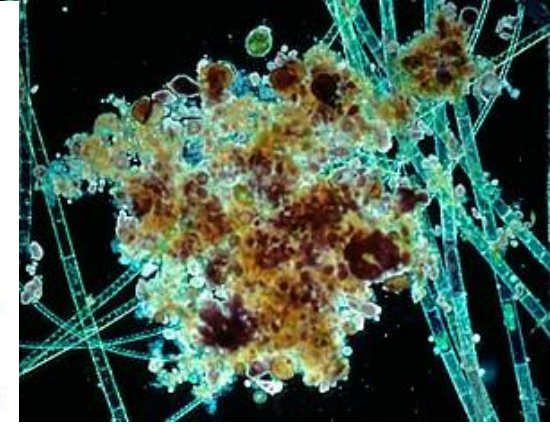
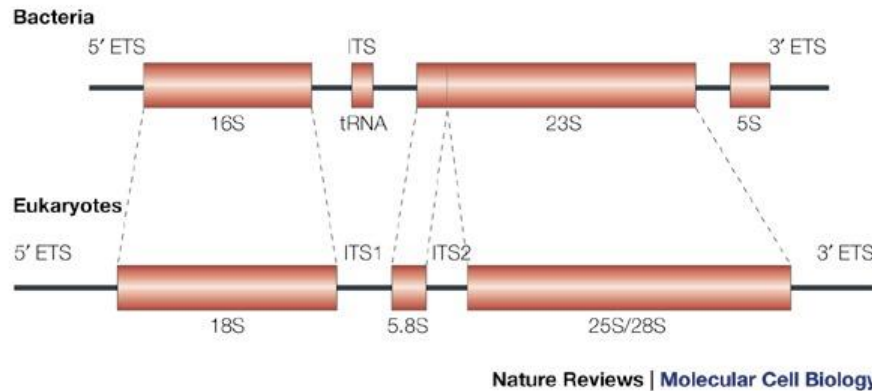
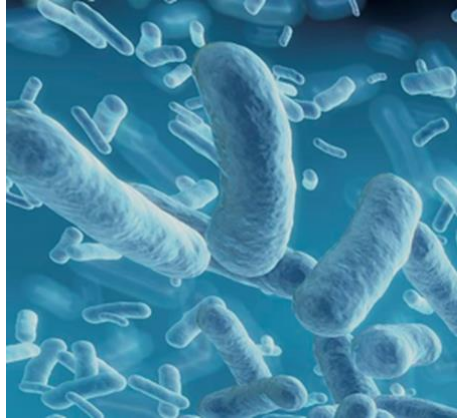
Shotgun Metagenomics

Basata su tecnologia di Next Generation Sequencing (NGS) per lo studio del genoma di comunità microbologiche (batteri, alghe, funghi, virus) in un determinato ambiente.

L'approccio metagenomico permette di:

- Risolvere tassonomie complesse
- Analizzare l'abbondanza relativa di specie microbologiche in differenti condizioni ambientali
- Identificare e studiare specie non coltivabili con metodi tradizionali

DNA barcoding di Batteri/Alghe/funghi



PCR, amplificazione usando primers specifici per il locus 16S locus: (regioni variabili V3 e V4 del gene 16S rRNA)

- 1) **16S-341F** 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3' and
- 2) **16S-805R** 5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'

PCR, amplificazione usando primer specifici per il DNA ribosomiale (regioni comprese tra il 18S and 28S (ITS1 and ITS2))

- ITS1** 5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
- ITS4** 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

(White *et al.*, 1990)

Obiettivo

Monitorare andamento microbiologico (microalghe e batteri) di una coltura microalgale cresciuta su refluo suino in bioreattore Raceway open pond, per un lasso di tempo di circa 6 mesi (da Maggio a Ottobre 2017)



Studio preliminare

Confrontare la comunità microalgale e batterica di 4 differenti colture cresciute in condizioni diverse (differenti fotobioreattori e differenti medium di coltivazione)



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA



GRUPPO RICICLA



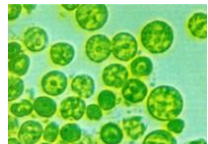
ISTITUTO SPALLANZANI

Colture microalgali

| | | |
|---|----|--|
| 1 | T | Sistema chiuso, fotobioreattore tubulare, alimentato in modo continuo con Medium sintetico |
| 2 | RW | Sistema aperto, Raceway open pond, alimentato in modo continuo con medium sintetico |
| 3 | RH | Sistema aperto, Raceway open pond, alimentato in modo continuo con frazione liquida refluo suino (100%) |
| 4 | RI | Sistema aperto, Thin-Layer (0.02 m water depth) alimentato in modo continuo con refluo suino (10%) |



DNA sequencing workflow



Campione di Microalgahe

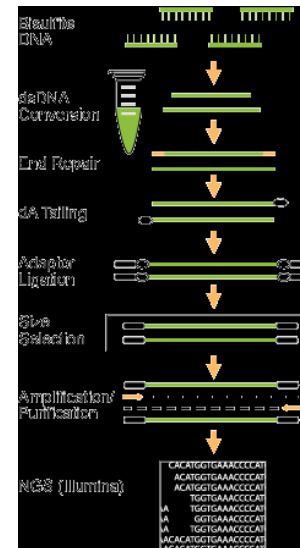
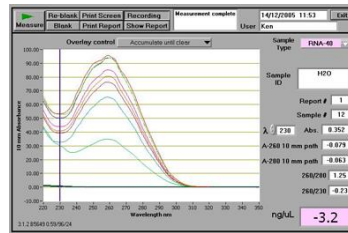


Estrazione DNA

Biosprint 96
One-For-All
Vet Kit
(QIAGEN)



Quantificazione DNA
Mediante Nanodrop
(Thermo Scientific)

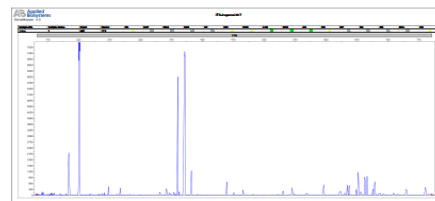


Preparazione libreria



DNA sequencing

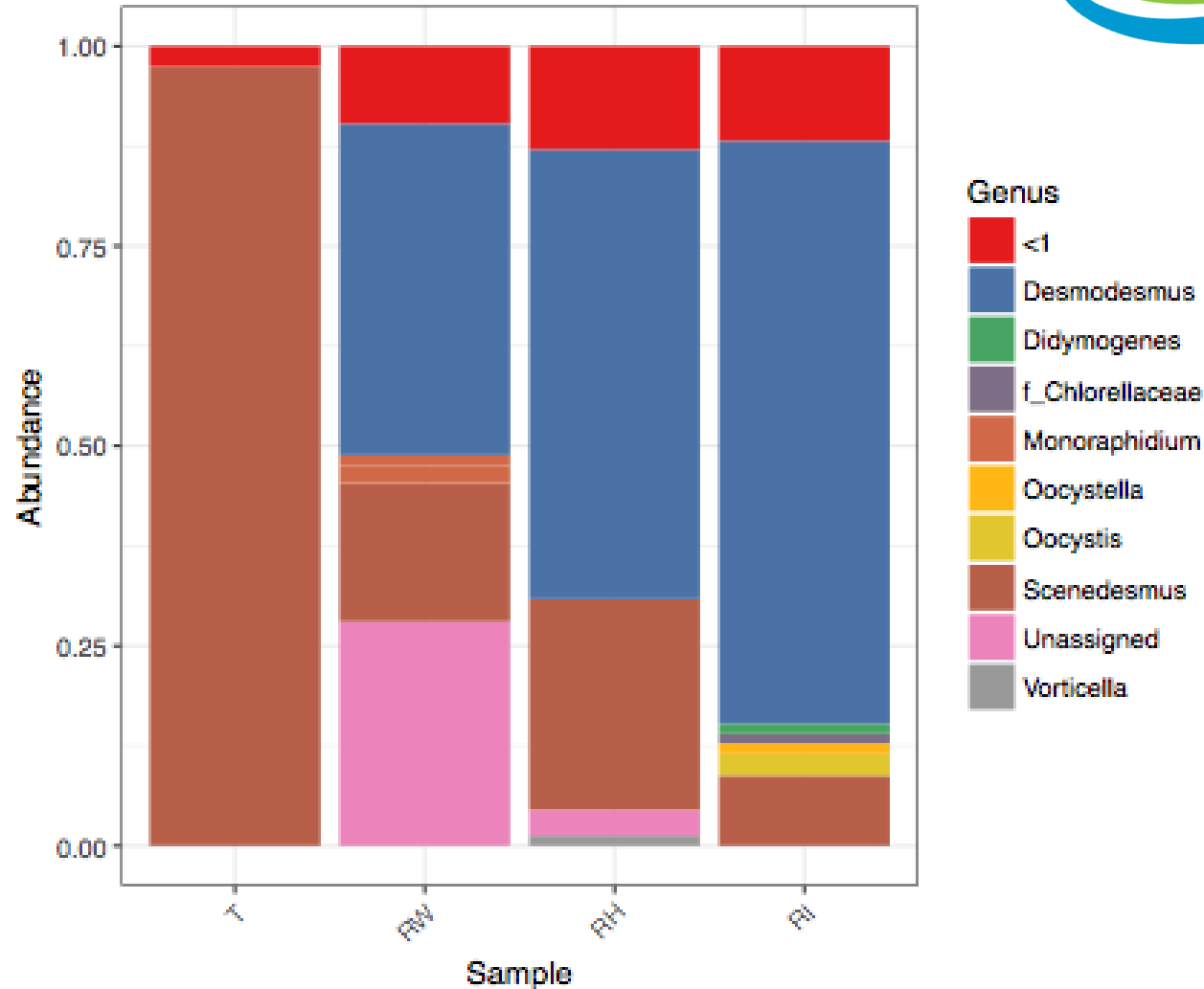
Mediante MiSeq run
(Illumina) in paired
end, con 300-bp read
length e profondità di
lettura pari a 200.000
frammenti/campione



Analisi Qualitativa DNA
(ARISA assay)

(NexteraXT Index Kit,
FC-131-1001/FC-131-1002).

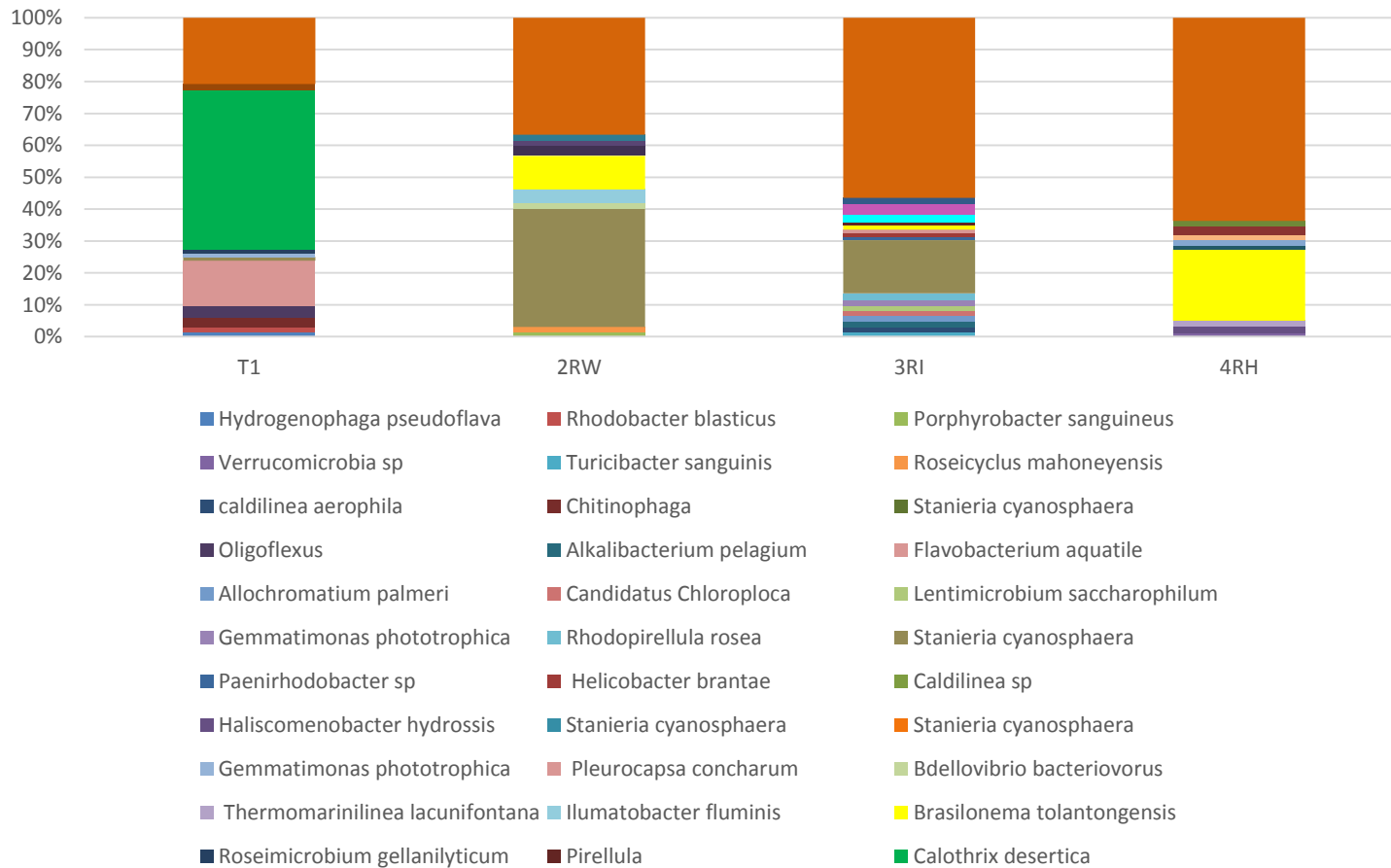
Composizione algale



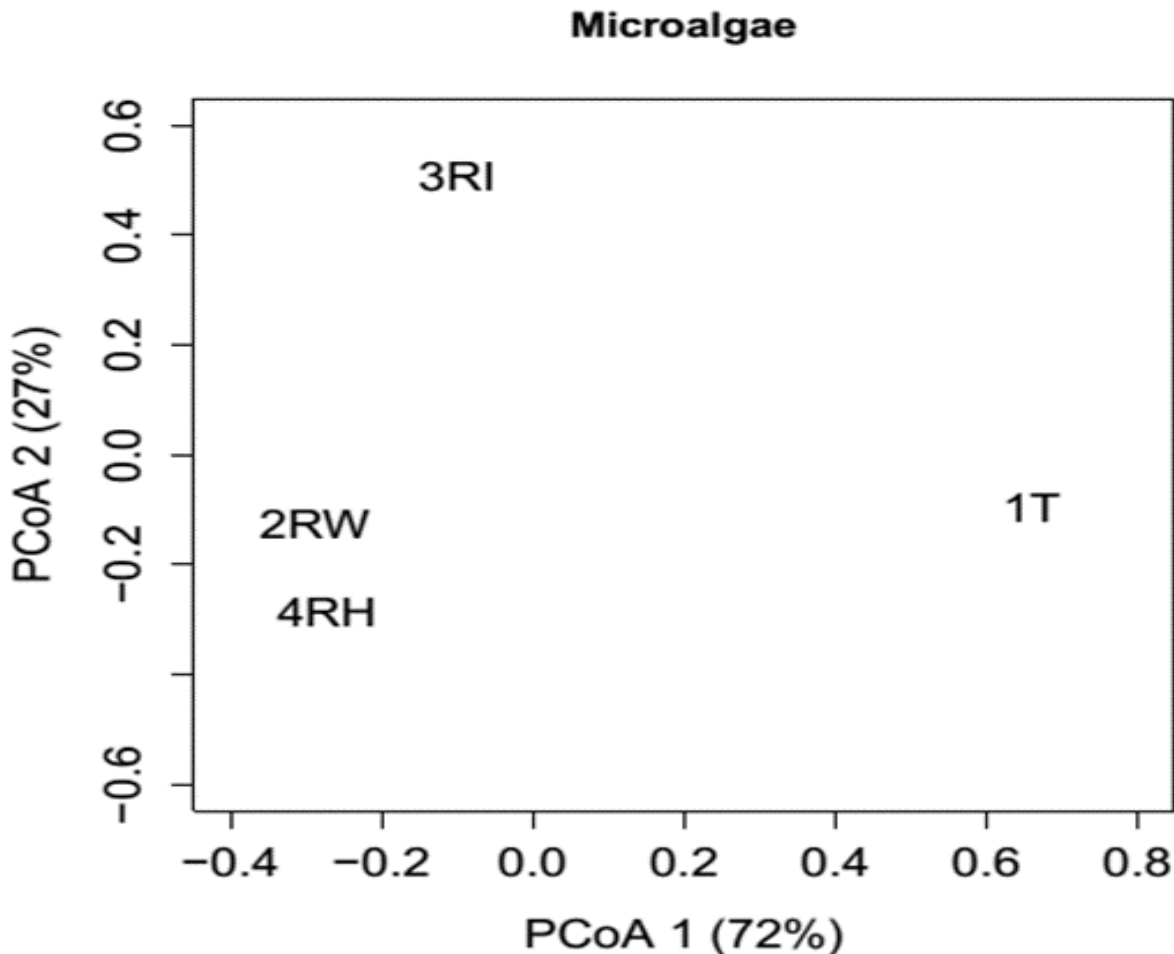
Composizione batterica



Bacterial Community



Microalgae PCoA plot

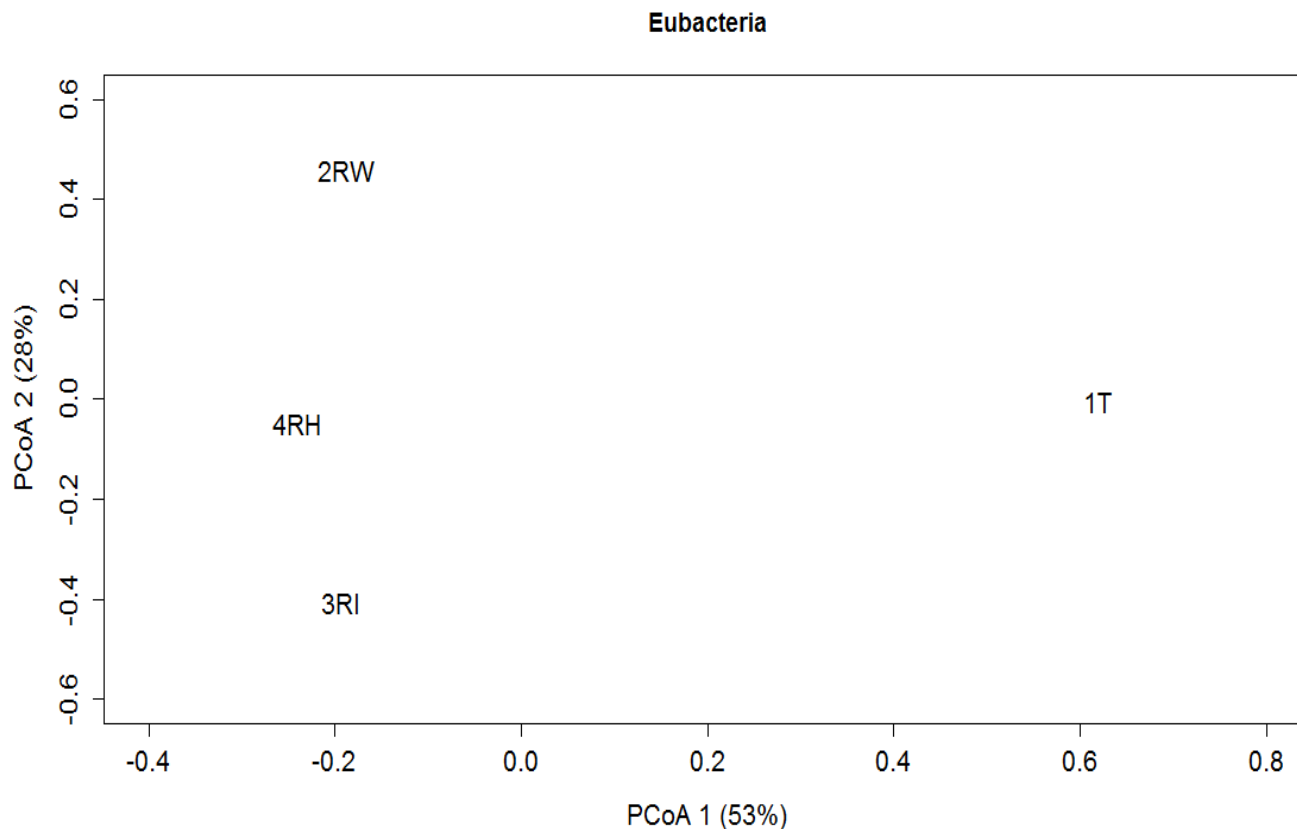


2RW and 4RH are strictly closed one to each other



microalgae community would be influenced by the configuration system used to cultivate algae

Bacteria PCoA plot



relative abundance of bacteria community in T1 was very dissimilar respect to 2RW, 3RI and 4RH samples



bacteria community would be strongly influenced by the configuration system of the cultures (open system vs closed system)

Progetto: Il Polo delle Microalghe



Individuare soluzioni per valorizzare la biomassa microalgale utilizzata per la depurazione di reflui agricoli-zootecnici:

- **Produzione di biogas** tramite digestione anaerobica
- **Produzione di bioplastiche** tramite fermentazione a Acidi Grassi Volatili e successivo accumulo da parte di batteri PHA-accumulanti (PAO).



Biomassa microalgale: Origine e raccolta

Colonna
(V= 74,5 L; HRT = 8,5 - 20,6 d)
Alimentazione: FRAZIONE
LIQUIDA DIGESTATO



Raceway
(V= 880 L; HRT = 10 - 20,6 d)
Alimentazione: CHIARITO
REFLUI SUINICOLI



Centrifuga in
semicontinuo (3000 rpm),
c/o impianto pilota

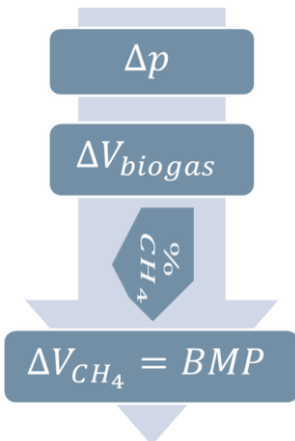


Centrifuga da laboratorio
(3000 rpm), presso il
laboratorio Rozzi (Cr)



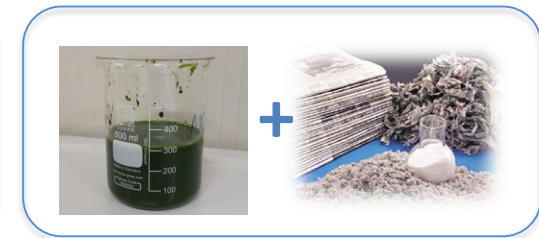
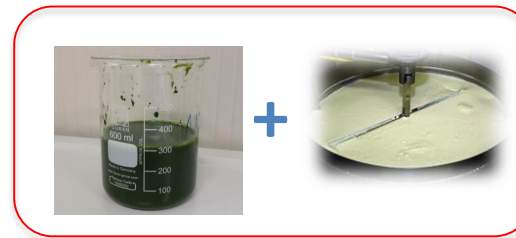
Prove di degradazione anaerobica (BMP)

Prove condotte applicando il **metodo manometrico**:



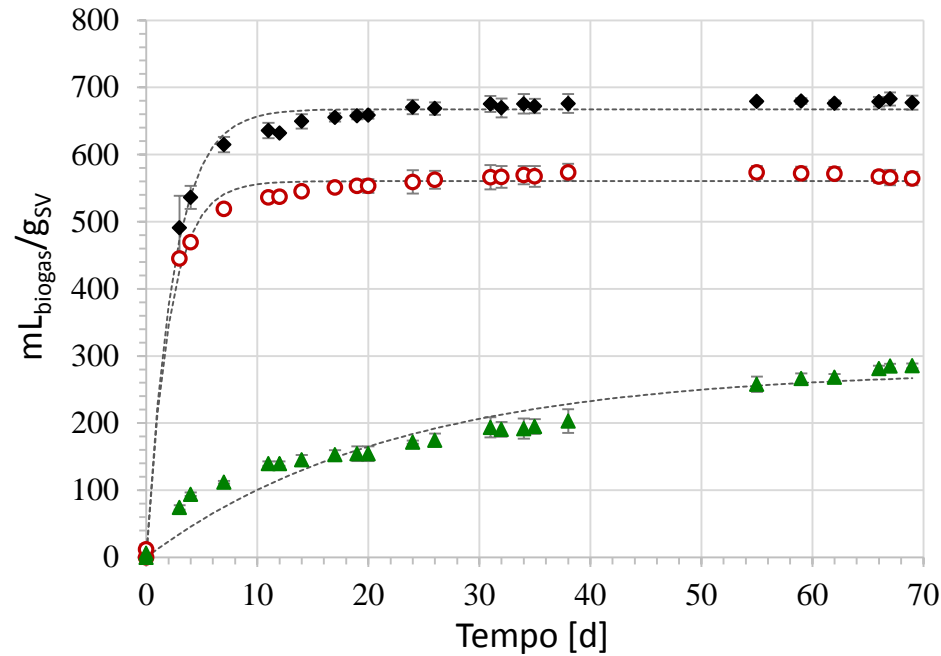
Substrati analizzati

- **biomassa algale** (*Chlorella sp.* e *Scenedesmus sp.*)
- siero di latte deproteinato (SL-DP)
- **MIX1: microalghe (al 20% di COD alimentato) e siero deproteinato, C/N \cong 23,5.**
- Cellulosa
- MIX2: microalghe (al 20% di COD alimentato) e cellulosa C/N \cong 28.

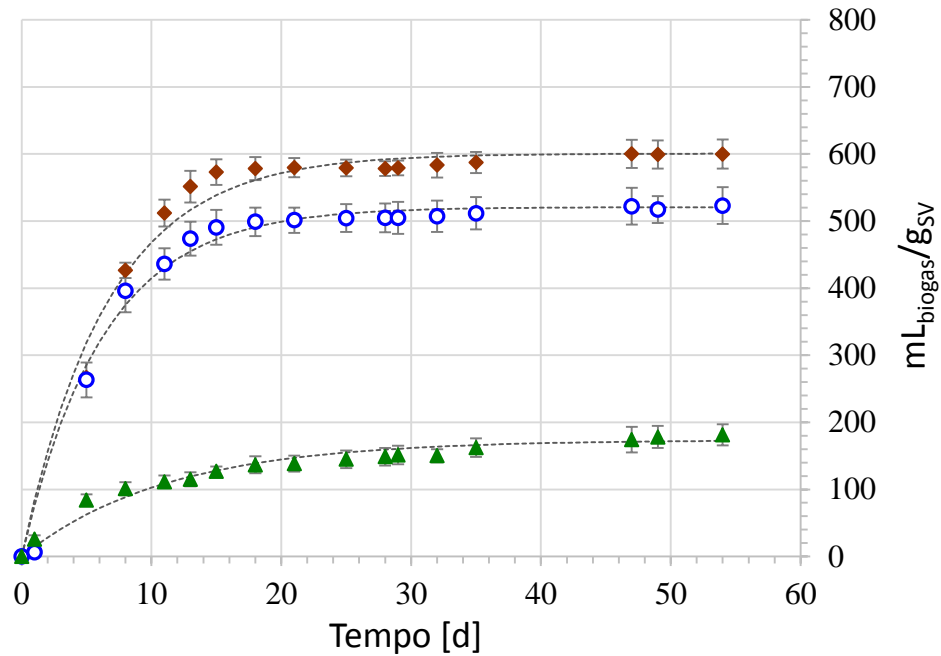


Obiettivo: Ottimizzare rapporto C/N della miscela

Risultati BMP: Effetti CO-DIGESTIONE



◆ SL-DP ○ Biomassa algale + SL-DP ▲ Biomassa algale



◆ Cellulosa ○ Biomassa algale + Cellulosa ▲ Biomassa algale

Risultati BMP: Effetti CO-DIGESTIONE

| Substrato | Resa specifica di metano mL/g _{SV} | Resa specifica di metano mL/g _{COD} | % di CH ₄ nel biogas | Costante cinetica (d ⁻¹) |
|--|--|---|------------------------------------|---|
| Biomassa algale (BMP-1) | 174 ± 4 | 119 ± 1 | 61,0 % | 0,04 |
| SL-DP | 364 ± 3 | 294 ± 3 | 53,4 % | 0,41 |
| Biomassa algale (20%) + SL-DP (80%) | 302 ± 7 | 237 ± 6 | 53,4 % | 0,48 |

BMP atteso **co-digestione**: $119 \cdot 0,2 + 294 \cdot 0,8 = 259 \text{ mL/g}_{\text{COD}}$

$237 < 259 \longrightarrow \text{X NO effetti sinergici}$

\checkmark miglioramento della cinetica

Risultati BMP: Effetti CO-DIGESTIONE

| Substrato | Resa specifica di metano mL/g _{SV} | Resa specifica di metano mL/g _{COD} | % di CH ₄ nel biogas | Costante cinetica (d ⁻¹) |
|--|--|---|------------------------------------|---|
| Biomassa algale (BMP-2) | 127 ± 11 | 84 ± 8 | 70,0 % | 0,09 |
| Cellulosa | 324 ± 11 | 273 ± 10 | 54,0% | 0,15 |
| Biomassa algale (20%) + Cellulosa (80%) | 275 ± 14 | 222 ± 12 | 52,6% | 0,16 |

BMP atteso **co-digestione**: $84 \cdot 0,2 + 273 \cdot 0,8 = 235 \text{ mL/g}_{\text{COD}}$

222 < 235

✗ NO effetti sinergici

✓ miglioramento della cinetica

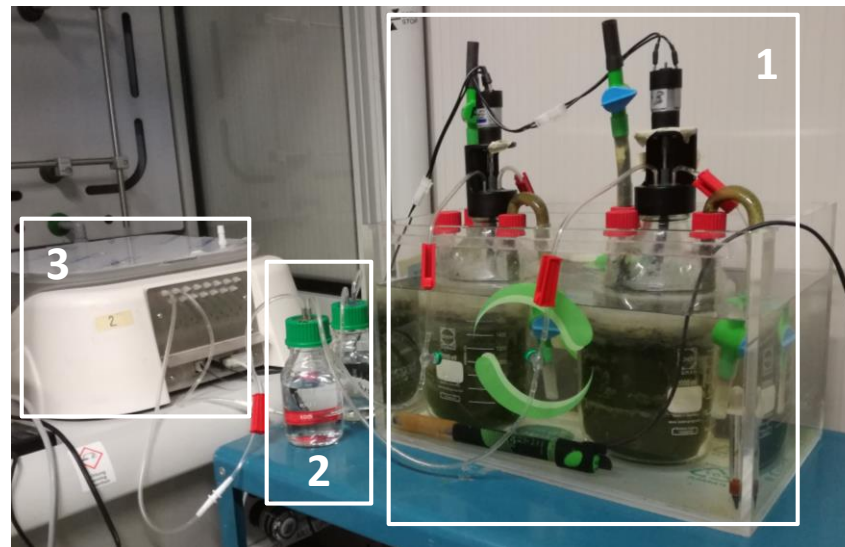


Prove di DIGESTIONE IN CONTINUO

Prova **1**: co-digestione in entrambi i reattori di **biomassa algale** (al 20% di COD alimentato) e **siero deproteinato**

Prova **2**:

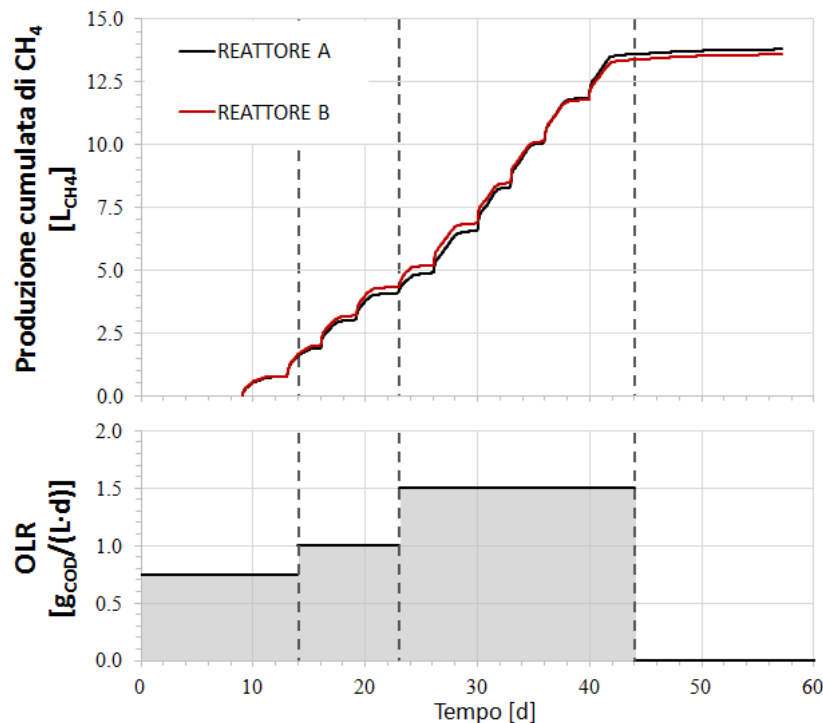
- reattore MD: mono-digestione di **biomassa algale**
- reattore CD: co-digestione di **biomassa algale** (al 20% di COD alimentato) e **cellulosa**.



1. Reattori alla temperatura di 34 °C, miscelati meccanicamente
2. Trappole di soda
3. Misuratore volumetrico gas

Risultati BMP: Effetti CO-DIGESTIONE

Prova 1: **biomassa algale** e siero deproteinato



Produzione specifica di metano a regime (giorni 27 – 42):

A) 222 $\text{mL}_{\text{CH}_4}/\text{g}_{\text{COD}}$
(\rightarrow 94% BMP)

B) 210 $\text{mL}_{\text{CH}_4}/\text{g}_{\text{COD}}$
(\rightarrow 89% BMP)

Percentuale media di metano nel biogas:

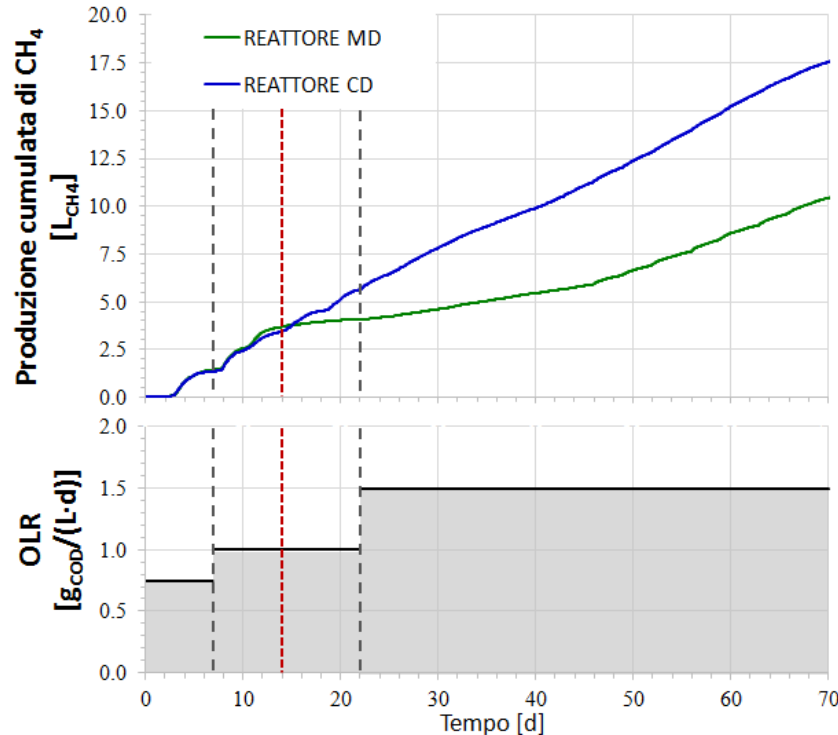
A) 66 %

B) 66 %

Risultati BMP: Effetti CO-DIGESTIONE

Prova 2:

mono-digestione (MD) di **biomassa algale**,
 co-digestione (CD) di **biomassa algale** e **cellulosa**



Produzione specifica di metano a regime:

- giorni 28 – 42:
 - MD) 36 mL_{CH₄}/g_{COD}
 - CD) 97 mL_{CH₄}/g_{COD}
- giorni 49 – 63:
 - MD) 83 mL_{CH₄}/g_{COD}
 - CD) 124 mL_{CH₄}/g_{COD}

Percentuale media di metano nel biogas:

- MD) 67 %
- CD) 51 %

Risultati BMP: Effetti CO-DIGESTIONE

X Scarsa degradabilità di *Scenedesmus sp.* e *Chlorella sp.*

X Biodisponibilità dell'azoto algale

Co-digestione:

✓ SI incremento produttività assoluta di CH₄

X NO effetti sinergici

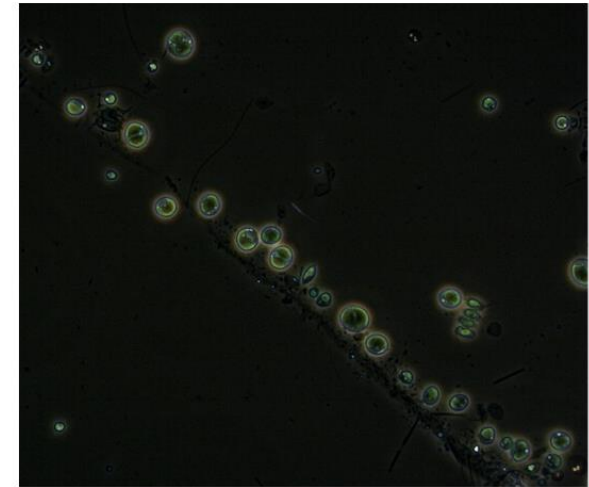
Miglioramento della cinetica:

✓ SI in batch

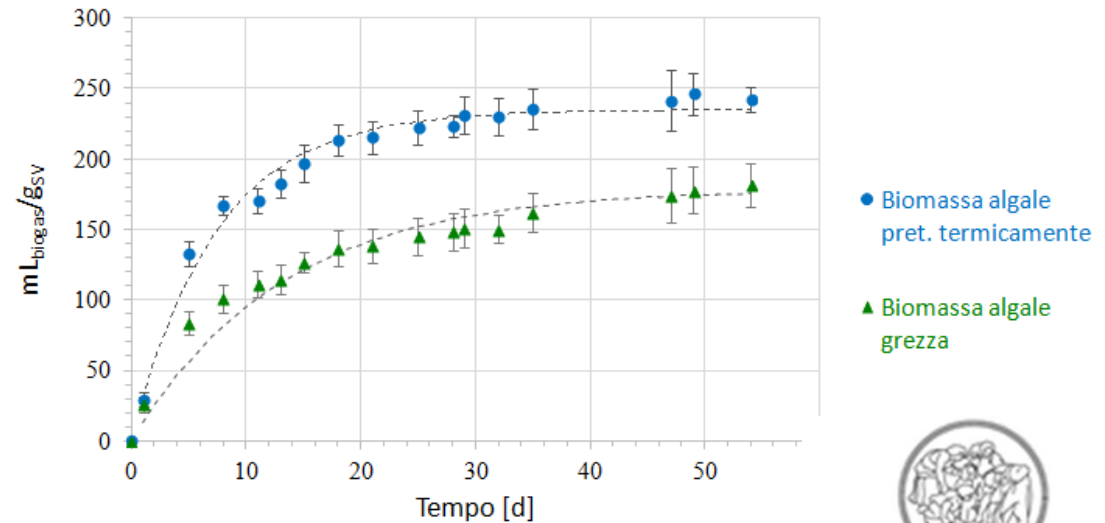
X NO in continuo

Pretrattamenti

Es: termico
BMP: + 38%



Produzione specifica di Biogas



Risultati BMP: Effetti CO-DIGESTIONE

Prove di **fermentazione** in batch in diverse condizioni operative (pH, tempo di prova, F/M, COD₀)



Obiettivo: identificare le condizioni ottimali di produzione di VFA, necessari per la sintesi di bioplastiche.



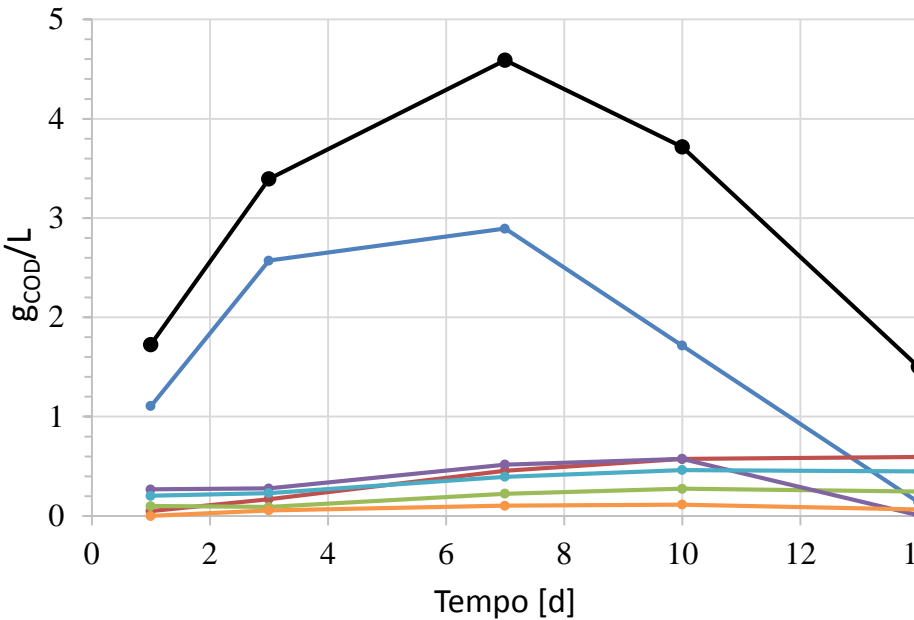
volatile fatty acid (VFA)

Poliidrossialcanoati (PHA)

Struvite: Mg, ammonio, fosfato



Concentrazione di VFA: esempi

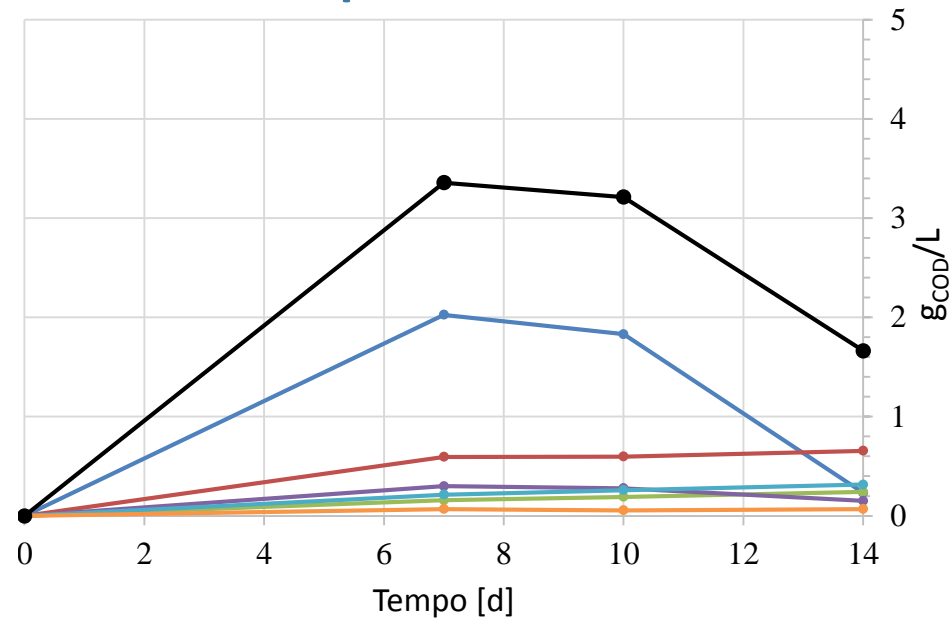


Chlamydomonas sp.

pH iniziale invariato

F/M = 3

$COD_{alge_IN} = 10 \text{ g}_{COD}/L$



Scenedesmus sp. e Chlorella sp.

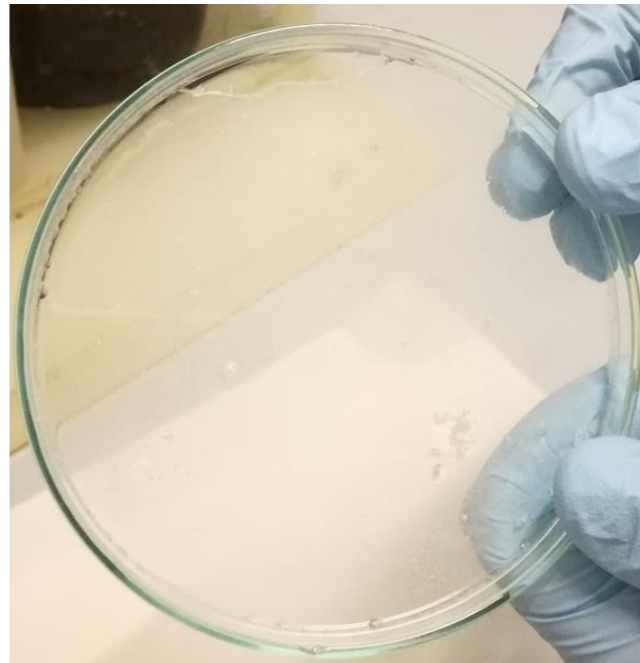
pH iniziale = 11

F/M = 3

$COD_{alge_IN} = 10 \text{ g}_{COD}/L$

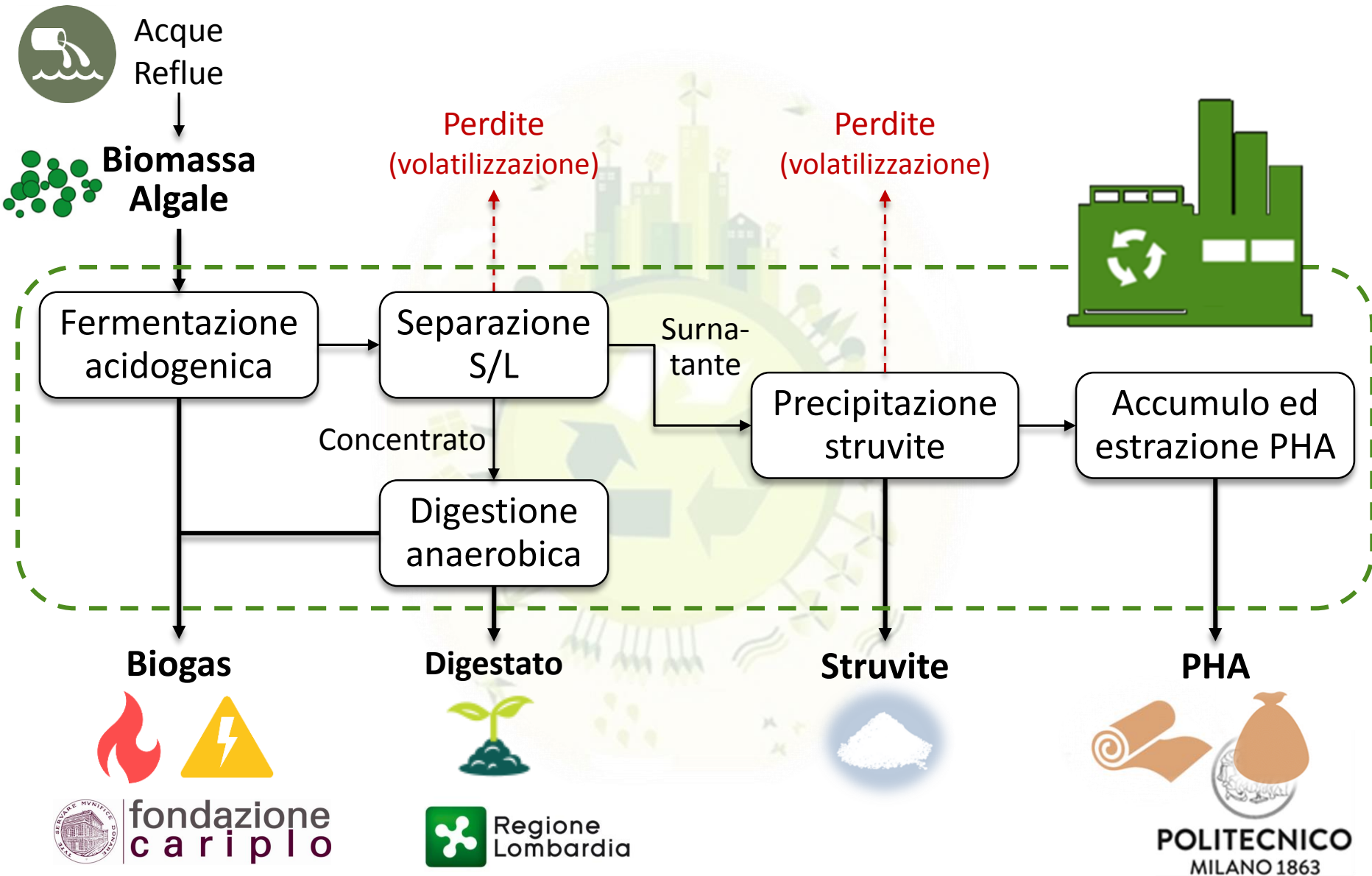
**Accumulo
PHA
Batteri PAO**

**Estrazione
PHA**



Risultati principali:

- **Contenuto di PHA:**
 $0,12 \text{ g}_{\text{PHA}}/\text{g}_{\text{ST}}$
- **Resa di conversione:**
 $0,10 \text{ g}_{\text{PHA}}/\text{g}_{\text{COD-VFA}}$





Grazie per l'attenzione

