



Ente per le Nuove tecnologie,
l'Energia e l'Ambiente



Ministero dello Sviluppo Economico

RICERCA SISTEMA ELETTRICO

Sviluppo di sistemi alimentati con gas derivante da scarti e residui agricoli e zootecnici

**R. Ciccoli, E. Massi, C. Matano, A. Sprocati, C. Alisi, F. Tasso, C. Ubaldi,
S. Chiavarini, P. Marconi**





Ente per le Nuove tecnologie,
l'Energia e l'Ambiente



Ministero dello Sviluppo Economico

RICERCA SISTEMA ELETTRICO

Sviluppo di sistemi alimentati con gas derivante da scarti e residui
agricoli e zootecnici

*R. Ciccoli, E. Massi, C. Matano, A. Sprocati, C. Alisi, F. Tasso, C. Ubaldi,
S. Chiavarini, P. Marconi*

SVILUPPO DI SISTEMI ALIMENTATI CON GAS DERIVANTE DA SCARTI E RESIDUI AGRICOLI E ZOOTECNICI

R. Ciccoli, E. Massi, C. Matano, A. Sprocati, C. Alisi, F. Tasso, C. Ubaldi, S. Chiavarini, P. Marconi (ENEA)

Marzo 2009

Report Ricerca Sistema Elettrico

Accordo di Programma Ministero dello Sviluppo Economico - ENEA

Area: Produzione e fonti energetiche

Tema: Celle a combustibile per applicazioni stazionarie cogenerative

Responsabile Tema: Angelo Moreno, ENEA

Parte A

Sviluppo di sistemi alimentati con gas derivante da scarti e residui agricoli e zootecnici

INTRODUZIONE

Il processo di digestione anaerobica dei rifiuti organici delle attività civili, zootecniche ed agro-industriali è ormai ampiamente dimostrato essere energeticamente conveniente e, se ben controllato, ambientalmente sostenibile.

Sebbene molte nazioni europee come la Germania, l'Austria, la Danimarca e la Spagna abbiano realizzato già da anni numerosi impianti anaerobici, non si è ancora sviluppata una letteratura completa in grado di descrivere le leggi che regolano questo complesso processo biologico, determinarne univocamente le rese energetiche o suggerire interventi repentini da effettuare quando i principali parametri operativi fuoriescono dagli intervalli di valori individuati come ottimali.

L'aspetto innovativo di tale ricerca è rappresentato dall'accoppiamento del trattamento di digestione anaerobica con un sistema cogenerativo ad elevata efficienza come le celle a combustibile a carbonati fusi. In questo modo si vuole, in primo luogo, ottimizzare il recupero energetico da rifiuti e scarti delle attività agricole con l'obiettivo di rendere tali impianti appetibili anche per le piccole imprese ed, inoltre, valutare la fattibilità e la convenienza economica, oltre quella chiaramente ambientale, di un eventuale impianto di trigenerazione che preveda la produzione di idrogeno.

Per ottimizzare il processo è necessaria l'integrazione tra competenze che coinvolgono diverse discipline afferenti il campo ingegneristico, chimico e biomolecolare presenti all'interno dell'ENEA (il presente tema di ricerca ha coinvolto sia il dipartimento TER che ACS) e nel mondo accademico, all'interno del quale è stata avviata una collaborazione con il Dipartimento di Idraulica Trasporti e Strade della Facoltà di Ingegneria per l'Ambiente ed il Territorio dell'università Sapienza di Roma.

Il primo obiettivo di questa fase del progetto è, per l'appunto, massimizzare le rese energetiche del processo di digestione anaerobica convenzionale applicato agli effluenti zootecnici, ai reflui civili, alla frazione organica dei rifiuti solidi urbani ed ai residui organici dell'agro-industria presenti nel territorio laziale. Per contestualizzare la ricerca e poter offrire, sia agli imprenditori che alle Pubbliche Amministrazioni, importanti strumenti per la valutazione di future decisioni strategiche per lo sviluppo delle fonti di energia rinnovabile, le biomasse da avviare a trattamento anaerobico sono state individuate nei dintorni del Centro di Ricerca ENEA di Casaccia.

Durante il processo di digestione anaerobica sono state poi apportate significative modifiche dei parametri operativi, al fine di variare la qualità del biogas prodotto in funzione delle specifiche richieste per un miglior funzionamento della cella a combustibile a carbonati fusi; in particolare, si stanno studiando metodi per aumentare la produzione di idrogeno (DITS) e

metano (ENEA) e diminuire le concentrazioni di impurità che influenzano negativamente le prestazioni della cella (e delle altre tecnologie cogenerative), come l'idrogeno solforato ed i composti della silice. I parametri operativi su cui si è intervenuti, e di cui si sta approfondendo la conoscenza, sono stati principalmente la temperatura, il pH e gli equilibri tra solfuri ed idrogeno solforato in soluzione. Sono state inoltre messe a punto le tecniche che permettono di monitorare gli effetti che tali variazioni hanno causato sulle comunità microbiche per ricostruire la dinamica delle popolazioni e scegliere le condizioni che favoriscano i ceppi microbici utili per gli scopi prefissati.

Per conseguire gli obiettivi desiderati, di cui sotto si riportano quelli fissati per il primo anno ripresi dall'Accordo di Programma, è stata necessaria un'approfondita ricerca bibliografica e l'allestimento di due laboratori, uno presso il suddetto centro ENEA l'altro presso l'università Sapienza di Roma (già esistente), appositamente dedicati ai test anaerobici ed alla strumentazione analitica di supporto.

Obiettivi previsti per il primo anno dall'Accordo di Programma MSE-ENEA:

A.2.1 Produzione biogas: saranno seguite due vie in parallelo a differente livello di sviluppo:

A.2.1.1 Ottimizzazione del processo di digestione anaerobica convenzionale, al fine di aumentare la resa energetica e diminuire la presenza di impurità quali zolfo e siloxani inibendone la formazione già in fase di digestione;

A.2.1.2 Studi preliminari di processi di digestione anaerobica non convenzionale, applicati a reflui zootecnici, civili e residui delle attività agro-industriali, con individuazione dei principali parametri di esercizio;

1. ATTIVITA' SVOLTA

Durante i primi nove mesi di attività è stata condotta un'approfondita ricerca bibliografica, sono stati scelti, prelevati e caratterizzati i substrati e gli inoculi da avviare a digestione anaerobica, è stata definita la configurazione reattoristica da utilizzare, sono stati fissati i fondamentali parametri operativi (chimici, biomolecolari ed ingegneristici) di cui seguire lo sviluppo durante il trattamento, e sono state messe a punto le relative metodiche analitiche necessarie per la loro determinazione.

Tutte le suddette operazioni sono state intraprese in collaborazione con l'Università “Sapienza” di Roma, co-beneficiaria del progetto, con l'obiettivo di “standardizzare” le procedure di analisi e la reattoristica per poter effettuare prove in parallelo e poter così confrontare meglio i risultati ottenuti. Nello specifico, date le competenze precedentemente acquisite, presso il

Dipartimento di Idraulica Trasporti e Strade sono state avviate subito prove di digestione anaerobica non convenzionale (ottimizzazione della produzione di idrogeno durante il primo stadio di fermentazione), mentre, presso l'ENEA, si è scelto di cominciare ad investigare il processo convenzionale, in modo da utilizzare le rese energetiche raggiunte come riferimento per una successiva analisi comparativa dei trattamenti studiati.

2.1 SCELTA ED APPROVVIGIONAMENTO BIOMASSE

Al fine di contestualizzare lo studio nel territorio limitrofo al Centro di Ricerca sito in località Casaccia (Anguillara Sabazia), sono stati presi in considerazione, oltre ai dati APAT riguardo la produzione di rifiuti, le tabelle ISTAT riguardanti la consistenza degli allevamenti, le produzioni delle principali colture e le macellazioni nella provincia di Roma e di Viterbo, di seguito riassunti:

Consistenza allevamenti Regione Lazio :

Suini	91.356	capi
Bovini e bufalini	287.111	capi
Equini	30.733	capi
Ovini	784.112	capi
Caprini	38.341	capi

Macellazione nella Regione Lazio:

Avicoli	201.793	capi
Ovini e Caprini	1.596.608	capi
Bovini e bufalini	77.254	capi
Suini	495.269	capi

Principali colture nella Provincia di Roma :

Produzioni > 1.000.000 q/a:	uva
500.000 < produzioni < 1.000.000 q/a:	frutti, pomodoro, carota
100.000 < produzioni < 500.000 q/a:	orzo, mais, pesco, kiwi, oliva, erba, cavolfiore, carciofo, cocomero, frumento tenero
50.000 < produzioni < 100.000 q/a:	patata, lattuga

Principali colture nella Provincia di Viterbo :

Produzioni > 1.000.000 q/a:	frumento duro
500.000 < produzioni < 1.000.000 q/a:	pomodoro, patata
100.000 < produzioni < 500.000 q/a:	uva, oliva, orzo, mais, nocciole
50.000 < produzioni < 100.000 q/a:	zucchine, pesco

Il passo successivo, attualmente non ancora concluso, per circoscrivere l'area interessata, è stato quello di coinvolgere i soggetti locali potenzialmente coinvolti nel progetto (allevatori, coltivatori, funzionari di Amministrazioni Pubbliche che si occupano della gestione dei rifiuti e della raccolta differenziata della Frazione Organica dei Rifiuti Solidi Urbani,..), contattando direttamente i singoli imprenditori o le Associazioni di Categoria, per chiederne la disponibilità a fornire informazioni riguardo la produzione di reflui, rifiuti e scarti dell'agroindustria, la localizzazione di tali biomasse, al fine di effettuare uno studio su un raggio di 70 km per richiamare il concetto di "filiera corta", e la possibilità di prelevarne alcuni quantitativi per poterli caratterizzare dal punto di vista chimico-fisico ed avviarli a prove di biometanazione per determinarne il potenziale energetico.

Da questa prima raccolta di informazioni si è stabilito di iniziare le prime prove con reflui zootecnici, come riferimento per le successive, FORSU, ed aggiungergli le biomasse disponibili a seconda della stagione di produzione (vinacce a settembre-ottobre, acque di vegetazione a novembre-dicembre, ecc...).

Gli effluenti zootecnici infatti, così come la FORSU, presentano flussi di massa costanti durante l'intero corso dell'anno, rappresentando una componente fissa dell'alimentazione del digestore, mentre gli scarti agroindustriali, essendo prodotti periodicamente, necessitano di strutture di stoccaggio dedicate e richiedono un'attenta cura nella gestione del digestore quando, introducendole nell'alimentazione, se ne altera la "razione giornaliera".

2.2 ALLESTIMENTO DEL LABORATORIO

In accordo con esperienze pregresse, si è deciso di ordinare, per le prime fasi dello studio del processo anaerobico, reattori batch da 1 l termostatati e dotati di sistema di agitazione magnetica; le bottiglie sono dotate di sistema per il campionamento del digestato, del biogas prodotto e di alloggiamenti per l'inserimento di sonde per il monitoraggio dei parametri operativi principali.

La scelta del sistema batch è dovuta al fatto che, in tali condizioni operative, è più semplice sia studiare l'influenza dei singoli parametri chimico-fisici che caratterizzano il processo e loro interazioni, sia fare bilanci di massa.

La termostatazione, garantita da rivestimenti coibentanti e piastre riscaldanti o dal bagno termostatico, si rende necessaria in quanto il trattamento biologico, per raggiungere buone efficienze ed abbreviare i tempi di ritenzione, richiede il mantenimento della temperatura costante in campo mesofilo (35°C - 40°C) o termofilo (50°C - 55°C).

Al variare della temperatura operativa, si opera una vera e propria selezione dei microrganismi presenti nella miscela e, quindi, cambiano le cinetiche di reazione e si variano gli equilibri tra le forme dissociate e non di composti potenzialmente inibenti, ma anche i metaboliti prodotti, gli equilibri tra composti in fase gassosa e disciolta, ecc...

La miscelazione favorisce la digestione anaerobica intervenendo in tre diversi aspetti: in primo luogo, aumenta le interazioni tra microrganismi e substrato, in secondo luogo, facilita lo stripping del biogas e l'allontanamento dei prodotti metabolici inibenti dalle cellule ed, infine, rompe le schiume.

Negli impianti reali, l'agitazione è solitamente fornita mediante pale meccaniche e, raramente, mediante ricircolo del biogas o del digestato.

Nel nostro sistema, dati i piccoli volumi in gioco e la probabilità di perdite attraverso la calettatura dell'albero di un eventuale agitatore meccanico, considerata la volatilità dell'idrogeno ed il basso contenuto in solidi con cui si pensa di operare, si è preferito scegliere un'agitazione magnetica.

Tuttavia, nei reattori di maggiori dimensioni, sia di tipo batch che con alimentazione continua, sarà prevista un'agitazione meccanica in modo da favorire il trattamento di substrati particolarmente viscosi o con contenuto in solidi maggiore di quello dei liquami (digestione anaerobica a "semi secco"), realizzando così in laboratorio condizioni quanto più simili a quelle reali.

2.2.1 POSTAZIONE SPERIMENTALE

La sperimentazione è stata eseguita in dieci reattori miscelati costituiti da bottiglie in vetro pyrex del volume di 1 L, dotate di un alloggiamento per il termometro e di un alloggiamento per un rubinetto di tipo rota-flow, attraverso il quale è possibile campionare il biogas prodotto. Sul fondo di ciascuna bottiglia è presente un'apertura per il campionamento del materiale in digestione. Per garantire la tenuta, il termometro ed il rubinetto rota-flow sono inseriti nelle apposite aperture dei reattori attraverso dei setti in silicone autosigillanti.

Ciascun reattore, coibentato con una camicia in poliuretano dello spessore di 1 cm, viene riscaldato dalla base, mediante piastra agitante e riscaldante ARE (VELP scientifica). L'agitazione della miscela all'interno di ciascun reattore è effettuata tramite un'ancoretta magnetica controllata dalla suddetta piastra.

Per le connessioni della linea biogas sono stati usati rubinetti tubi in tygon (diametro interno di 4,8 mm), impermeabile ai gas nelle condizioni operative testate, mentre per il sistema di campionamento del digestato sono stati utilizzati tubi in pvc chiusi con pinze di Hoffman.



Fig. 2: Reattore batch coibentato, con sistema per il campionamento del digestato in basso e del biogas in alto.

Il volume di biogas prodotto viene misurato tramite un sistema a spostamento di liquido, l'eudiometro, costituito da un cilindro graduato ed un imbuto separatore aperto, idraulicamente connessi, riempiti con un liquido barriera. Il liquido barriera è costituito da una soluzione satura di NaCl a pH 2 (per aggiunta di HCl), che impedisce il passaggio in soluzione dell'anidride carbonica presente nel biogas. Cilindro ed imbuto sono posizionati in modo tale che il livello del liquido al loro interno combaci con lo zero della scala graduata del primo e la parte più bassa del secondo, sfruttando il principio dei vasi comunicanti; in questo modo sul liquido agisce la sola pressione atmosferica. Durante il processo, il gas prodotto nel reattore di digestione si accumula nel cilindro graduato, spostando il liquido barriera verso il cilindro

separatore, innalzando il livello del liquido al suo interno. Tale innalzamento definisce la pressione interna al reattore.

Prima del caricamento di ogni reattore sono state eseguite delle prove di tenuta, riempiendo i batch con 700 ml di acqua e flussando il sistema con N_2 alla pressione di 0,8 atm per qualche minuto, controllando che i livelli raggiunti dal liquido all'interno dei cilindri rimanessero costanti per almeno un'ora.

Dopo il caricamento di ciascun digestore, per poter assicurare l'instaurarsi delle condizioni anaerobiche, si è flussato azoto a pressione ridotta (0,2 atm) per circa dieci minuti.



Fig. 3: Batteria di digestori ed eudiometri.

2.2.2 PARAMETRI MONITORATI

La definizione della strumentazione analitica necessaria per la caratterizzazione delle materie prime da avviare a digestione, degli inoculi e dei digestati, nonché per il monitoraggio e lo studio del processo, è scaturita da un'approfondita analisi bibliografica, da studi precedenti e dalle nuove proposte tecnologiche presenti sul mercato

Ogni due giorni sono stati prelevati dal reattore circa 10 ml di digestato per effettuare la misura del pH e per condurre le analisi sul contenuto di solidi, COD, azoto totale, azoto ammoniacale, fosforo, solfati, alcalinità totale e VFA con le cadenze di seguito riportate:

Parametro monitorato	Frequenza analisi
Temperatura	più volte al giorno
pH	ogni due giorni/all'occorrenza
Produzione biogas	più volte al giorno
Composizione biogas	ogni due giorni/all'occorrenza
Solidi Totali e Volatili	all'inizio ed alla fine
Domanda Chimica di Ossigeno	ogni due giorni/all'occorrenza
Solfati	all'inizio ed alla fine/all'occorrenza
Azoto totale ed ammoniacale	all'inizio ed alla fine/all'occorrenza
Fosforo e Potassio	all'inizio ed alla fine/all'occorrenza
Acidi Grassi Volatili	ogni due giorni/all'occorrenza
Alcalinità Totale	ogni due giorni/all'occorrenza
Biomolecole (carboidrati, proteine e lipidi)	all'inizio ed alla fine/all'occorrenza
Riconoscimento comunità batteriche	ogni due giorni

Per la determinazione del COD e degli altri parametri tipicamente usati per le analisi delle acque reflue (come Fosforo, Potassio, Alcalinità, Solfati, Azoto totale ed ammoniacale) si è preferito, per ottimizzare i tempi ed operare a favore di sicurezza evitando di maneggiare sostanze cancerogene come il dicromato di potassio, ordinare i kit da utilizzare con il relativo fotometro (modello Multidirect, Aqualytic). I metodi di prova alla base dei reagenti sono noti a livello internazionale, ed in parte rappresentano una componente di norme nazionali ed internazionali; le metodiche cui si fa riferimento vengono riportate nel seguente schema riassuntivo.

Per tarare il sistema, le prime caratterizzazioni sono state condotte in doppio sia secondo i "Metodi analitici per le acque" dell' IRSA-CNR (2003) di seguito riportati che mediante tecniche fotometriche.

PARAMETRO	METODICA USATA	METODO DI CONTROLLO
Produzione biogas	Spostamento di liquido	-
Composizione bioags	Micro GC CP-4900	-
Solidi totali e volatili	Incenerimento ⁽³⁾	-
COD	Bicromato/H ₂ SO ₄ ⁽¹⁾	Bicromato/H ₂ SO ₄ ⁽³⁾
Azoto totale	Estrazione persolfato	Reattivo di Nessler ⁽³⁾
Azoto ammoniacale	Salicilato ⁽²⁾	Reattivo di Nessler ⁽³⁾
Alcalinità totale	Acido/Indicatore ^(1,2,5)	-
Fosfato Totale	Acido per solfato/ascorbico ⁽²⁾	-
Potassio	Tetrafenilborato/torbidità ⁽⁴⁾	-
Solfato	Solfato di bario/torbidità ⁽²⁾	-
VFA	GC-MS/SPME	-

rocedimento unitario tedesco per l'analisi delle acque, delle acque di scarico e della melma;

⁽²⁾ Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 18th Edition, 1992;

⁽³⁾ “Metodi analitici per le acque” dell’APAT/ IRSA-CNR n. 29 (2003);

⁽⁴⁾ Photometrische Analyse, Lange/Vejdelek, Verlag Chemie 1980;

⁽⁵⁾ Colorimetric Chemical Analytical Methods, 9th Edition, London.

Il campionamento del materiale in digestione è stato effettuato attraverso l’apertura alla base di ciascun reattore, in modo da operare sempre sotto battente idrico, con un tubo in pvc chiuso con delle pinze di Hoffman. L’apertura per il campionamento ha un diametro interno di 1 cm, per evitare intasamenti da parte di materiale particolato.

Quando non è stato possibile effettuare le analisi lo stesso giorno del prelievo, i campioni sono stati conservati in freezer ad una temperatura pari a – 20°C.

Quotidianamente sono stati inoltre prelevati circa 1,5 ml di digestato e conservati in congelatore a -20°C per poter successivamente effettuare le analisi microbiologiche.

2.2.3 TEMPERATURA

La temperatura è stata misurata ad intervalli di circa un’ora lungo tutto il periodo della campagna di digestione (escluse ovviamente le ore notturne ed i fine settimana) tramite il termometro in dotazione a ciascuna bottiglia e controllata intervenendo sulla manopola della piastra riscaldante agitante.

2.2.4 pH

Il pH è stato misurato mediante pHmetro Cyberscan pH1100 (Eutech instruments) dotato di sonda Hamilton. Il pH-metro viene tarato una volta ogni 15 giorni mediante soluzioni standard a pH 4 e 7.

2.2.5 VOLUME E COMPOSIZIONE BIOGAS

La produzione di biogas è stata monitorata più volte al giorno, come già spiegato, misurando il livello di liquido all'interno dell'eudiometro. Ciascun eudiometro è stato sfiatato e riportato a livello zero alla fine di ogni giornata, dopo averne campionato ed analizzato il contenuto.

Il campionamento del gas è stato effettuato tramite sacche tedlar complete di valvole di sicurezza, collegate ai rubinetti rota-flow attraverso opportune connessioni in tygon. Le sacche, prima di ogni campionamento, sono state flussate con azoto e svuotate utilizzando una pompa per il vuoto per un paio di volte. I volumi di biogas prelevati variavano dai 20 ai 400 ml a seconda della produzione giornaliera.

Il contenuto delle gas-bags è stato analizzato mediante un gascromatografo modello VARIAN CP-4900 microGC dotato di 2 moduli operanti in parallelo. Ogni modulo è composto da sistema di iniezione, colonna cromatografica e rivelatore TCD. La colonna del primo modulo è una capillare di 10 m di lunghezza a setacci molecolari per l'analisi dei gas permanenti (H_2 ; O_2 ; N_2 ; CH_4 ; CO). La colonna del secondo modulo è una capillare PPU per l'analisi di CO_2 e H_2S .

L'apparecchiatura usa l'elio come gas carrier ad una pressione in testa alla colonna pari a 100 kPa, per entrambi i moduli.

La temperatura di iniezione e di lavoro per le colonne è stata fissata a 50° e 80° C rispettivamente. L'analisi di ciascun campione ha richiesto circa 3 minuti; nel primo modulo sono stati rilevati i seguenti gas: H_2 , O_2 , N_2 , CH_4 i cui tempi di ritenzione picco sono rispettivamente: 0,67 min; 0,92 min; 1,26 min; 1,71 min. Nel secondo modulo sono stati rilevati i contenuti di CO_2 , che presenta un tempo di ritenzione picco pari a 0,91 min e l' H_2S il cui picco esce a 1,5 min.

Quando le percentuali attese di H_2S contenute nel biogas erano inferiori ai 50 ppm, si utilizzava un secondo metodo a pressioni più elevate (...)

2.2.6 ACIDI GRASSI VOLATILI (VFA)

Il metodo si basa sulla tecnica SPME (Solid Phase Micro Extraction) accoppiata a gascromatografia- spettrometria di massa (GC-MS).

Nella SPME una fase adsorbente, connessa ad un ago per iniezioni gascromatografiche, viene esposta nello spazio di testa di una fiala contenente VFA per un tempo adeguato. La fase adsorbente viene quindi inserita nel sistema di iniezione del GC, tenuto a temperature superiori

ai 200°C, e tutti i composti vengono desorbiti e iniettati in colonna GC per la separazione ed il dosaggio.

2.2.7 OLIDI TOTALI E VOLATILI

I solidi rappresentano il materiale disciolto o in sospensione in un liquame.

La determinazione dei solidi fissi e volatili fornisce una stima molto grossolana della sostanza organica contenuta nella frazione solida di un'acqua di scarico o di un fango attivo; per questo motivo viene spesso utilizzata per controllare il funzionamento degli impianti di trattamento delle acque.

Tale relazione risulta ancor meno stretta nel liquame esaminato a causa della presenza di molto materiale particolato in sospensione, sia organico che inorganico.

Si prendono circa 5 grammi di ciascun campione dalla bottiglia, dopo una violenta agitazione manuale, e si versano direttamente in un contenitore in ceramica resistente al calore, preventivamente pesato, per essere prima pesati sulla bilancia analitica con risoluzione di 0,1 mg e poi messi in una stufa a 105°C sotto cappa. Dopo 24 ore, si tira fuori il campione e lo si mette in un essiccatore (con sali di silice che assorbono l'umidità) per 30 minuti per raffreddarlo e poi ripesarlo. Il contenuto in solidi totali e l'umidità sono ricavabili come percentuali in peso dalle seguenti formule:

$$ST(\%) = \frac{P^{105^\circ}}{P^{umido}} * 100 \qquad U(\%) = 100 - ST(\%)$$

Dopo aver determinato il contenuto in solidi totali, si mette il campione in muffola a 550°C per 2 ore, dopodichè lo si fa raffreddare di nuovo nell'essiccatore e se ne pesano le ceneri (o solidi fissi) rimanenti, ottenendo per differenza i solidi volatili espressi in percentuale rispetto al peso dei solidi totali dalla seguente formula:

$$SV(\%) = \frac{P^{105^\circ} - P^{550^\circ}}{P^{105^\circ}} * 100$$

Il tempo di incenerimento va scelto in base a quando il peso del campione rimane costante.

2.2.8 DOMANDA CHIMICA DI OSSIGENO (COD)

Il COD rappresenta la misura dell'ossigeno necessario ad ossidare chimicamente le sostanze presenti in un campione, per mezzo di un ossidante forte in ambiente acido a caldo.

Il COD viene preferito al BOD, per il minor tempo richiesto dall'analisi, nel controllo di routine di liquami grezzi e depurati.

Tale parametro è stato determinato mediante fotometro MultiDirect ed i risultati ottenuti sono stati inizialmente confrontati con quelli derivanti dall'applicazione della metodica prevista dall'IRSA per campioni acquosi contenenti concentrazioni di cloruri ≤ 1000 mg/L, di seguito riportata.

Il metodo prevede l'ossidazione delle sostanze organiche ed inorganiche, presenti in un campione d'acqua, mediante una soluzione di dicromato di potassio in presenza di acido solforico concentrato e di solfato di argento, come catalizzatore dell'ossidazione. L'eccesso di dicromato viene titolato con una soluzione di solfato di ammonio e ferro (II).

La concentrazione delle sostanze organiche ed inorganiche ossidabili, nelle condizioni del metodo, è proporzionale alla quantità di dicromato di potassio consumato.

L'impiego del solfato di argento, come catalizzatore, consente di rendere più alta la resa della reazione di ossidazione.

Un errore in difetto nella determinazione del COD potrebbe essere causato dalla volatilizzazione di alcune sostanze organiche. Tali perdite possono essere comunque ridotte.

I cloruri interferiscono positivamente in quanto vengono ossidati dal dicromato (1 mg di Cl corrisponde a 0,226 mg di COD). Tale interferenza, a concentrazioni di cloruri inferiori a 1000 mg/L e comunque in presenza di un rapporto in peso COD/cloruro $> 0,1$, viene praticamente eliminata addizionando solfato di mercurio (II) nel rapporto in peso $\text{HgSO}_4/\text{Cl} = 10$.

Dal campione posto in agitazione con ancoretta magnetica, si prelevano 2 ml con una pipetta a doppia tacca e si versano in un matraccio da 100 ml, portando a volume con acqua distillata.

Dopo aver miscelato la soluzione per 10 minuti sull'agitatore magnetico, se ne prendono 10 ml e si mettono nell'apposito pallone da 200 ml con collo smerigliato, aggiungendovi 10 ml di acqua distillata, una puntina di solfato di mercurio (HgSO_4), una quantità leggermente maggiore di solfato d'argento (AgSO_4), 4-5 sfere di vetro da ebollizione e 10 ml di dicromato di potassio (K_2CrO_7) 0,25 N.

Si collega il pallone alla colonna refrigerante e si apre la circolazione dell'acqua per evitare eventuali perdite di sostanze volatili. Si versano quindi, molto lentamente, 30 ml di acido solforico (H_2SO_4) concentrato, si porta ad ebollizione e dopo 2 ore si spegne l'apparecchiatura.

Si aspettano 25 minuti, poi si versano 40 ml di acqua distillata, si tappa il pallone e lo si lascia raffreddare.

Parallelamente si prepara il bianco freddo, costituito da soli 60 ml di acqua distillata, 10 ml di K_2CrO_7 e 30 ml di H_2SO_4 , ed il bianco caldo, costituito da 20 ml di acqua distillata, 10 ml di K_2CrO_7 , 30 ml di H_2SO_4 , stesse quantità di sali utilizzate per i campioni. Quest'ultimo va inserito nell'apparecchiatura per l'ebollizione insieme ai campioni.

Il bianco freddo serve per controllare la normalità del titolante poiché molto volatile.

Quando il campione è freddo, vi si versano 4 gocce di ferroina e si titola l'eccesso di dicromato con la soluzione di solfato di ammonio e ferro (II) 0,25 N fino a viraggio del colore da verde-blu a bruno-rosso.

Possiamo quindi calcolarci la Normalità del titolante ed il COD dalle formule:

$$N = \frac{0,25 * 10}{V_{bf}} \qquad mgCOD/L = \frac{(V_{bc} - V_{tit}) * N * 8000}{V_{camp}}$$

Essendo :

Vbf = ml titolante usati per il bianco freddo;

Vbc = ml titolante usati per il bianco caldo;

Vcamp = ml di campione prelevati.

La procedura descritta è stata modificata dall'originale, che prevedeva il prelievo di 20 ml di campione da inserire direttamente nel pallone da 200 ml, perché la titolazione con i reagenti usati è idonea per concentrazioni inferiori ai 500 mg COD/L. Quando si prevedono concentrazioni superiori a tale limite, si procede con opportune diluizioni, di cui poi viene tenuto conto nella formula finale.

2.2.9 AZOTO TOTALE

Tale parametro viene regolarmente determinato mediante fotometro MultiDirect con le metodiche sopra citate ed i risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli derivanti dall'applicazione del metodo al reattivo di Nessler descritto dall'IRSA di seguito riportato.

Si pesano circa 2 g di campione, lo si mette nel provettone apposito con un po' d'acqua distillata, si aggiungono 25 ml di acido solforico concentrato e 0,5 g di catalizzatore. Si inseriscono i provettoni nel digestore per 3 ore; questo esegue 2 rampe di lavoro della durata di un' ora e mezza ciascuna, alla temperatura di 290°C e 370°C, dopodiché si lascia raffreddare il campione.

Nel digestore va inserito anche un bianco preparato con un po' d'acqua distillata e 25 ml di acido (se nel campione se ne mettono di meno, anche nel bianco dovrà esserci la stessa quantità) in modo da ottenere un volume di liquido nel provettone, pari a quello dei campioni precedentemente descritti.

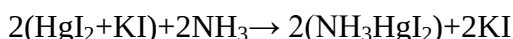
La sostanza organica mineralizzata viene trasformata in ammoniaca, presente in soluzione sottoforma di ione ammonio (NH_4^+) per la forte acidificazione causata dalla soluzione digerente.

Quando il campione è freddo, si aggiunge un po' d' acqua distillata e lo si mette nel distillatore insieme ad un matraccio (o una beuta) da 200 ml contenente 50 ml di acido borico (H_2BO_3) a concentrazione 20 g/L.

Prima di avviare la distillazione, si aggiungono 13 ml di soda (NaOH) al 60% nel provettone in modo che, una volta fornito calore, l'ammoniaca evapori facilmente per la forte alcalinità creata e venga intrappolata nella soluzione di acido borico.

Quando il distillato raggiunge un volume di circa 200 ml, fermiamo la distillazione. Dal distillato raccolto, vengono prelevati 5 o 10 ml di campione, versati in un matraccio da 25 ml e si porta a volume con acqua distillata; la quantità presa dipende dalla concentrazione attesa e si calcola in modo da rientrare nel range di validità della retta di taratura. Si aggiungono 1 ml di reattivo di Nessler e 1 goccia di Sali di Seignette, si miscela bene e si lascia riposare per un quarto d'ora.

L' ammoniaca presente, reagisce con la soluzione alcalina di iodo-mercurato di potassio (reattivo di Nessler) per formare un complesso colorato secondo la reazione:



L'assorbanza del complesso colorato viene misurata alla lunghezza d'onda di 420 nm.

Il Sale di Seignette è una soluzione stabilizzante che serve ad evitare la precipitazione di eventuali ioni calcio e magnesio presenti nel liquame.

Il tempo di attesa di 15 minuti, prima della lettura allo spettrofotometro, risulta sufficiente a garantire lo sviluppo completo del colore prima che inizi la flocculazione del complesso colorato $\text{NH}_2\text{Hg}_2\text{I}_3$.

Dal valore dell'assorbanza, corretto del valore del bianco, risalire alla concentrazione di azoto totale utilizzando la curva di taratura.

Nel caso sia stata eseguita una diluizione del campione, moltiplicare il risultato per il fattore di diluizione.

2.2.10 AZOTO AMMONIACALE

Anche la determinazione dell' azoto ammoniacale viene eseguita mediante fotometro MultiDirect e, parallelamente, è stato seguito il metodo al reattivo di Nessler (per una concentrazione attesa compresa tra 0,5 e 4 mg NH_4^+/L).

Per il metodo al reattivo di Nessler, si filtrano sotto vuoto i campioni (già diluiti per il COD) utilizzando un filtro a porosità pari a 0,45 μm , se ne prelevano 5 ml e si versano in un matraccio da 25 ml; si porta a volume con acqua distillata, si aggiunge 1 ml di reattivo di Nessler, una goccia di Sali di Seignette, si miscela bene, si lascia riposare per 15 minuti e si legge l'assorbanza allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda pari a 410 nm.

2.2.11 BIOMOLECOLE

Le tecniche di rilevazione di lipidi, azoto proteico e carboidrati, eseguite secondo i metodi, rispettivamente, per estrazione e gravimetria, per proporzionalità con la differenza tra azoto totale ed ammoniacale e per via spettrofotometrica (Dubois), sono state messe a punto nei laboratori dell'università Sapienza di Roma.

Per la descrizione delle metodologie utilizzate si rimanda all'allegato tecnico dell'università Sapienza di Roma.

2.2.12 RICONOSCIMENTO COMUNITA' BATTERICHE

A completamento delle investigazioni, è previsto il riconoscimento delle comunità batteriche dominanti nelle diverse condizioni operative e nelle diverse fasi della digestione anaerobica mediante tecnologia DGGE, ampiamente spiegata nel rispettivo allegato tecnico.

2.2.13 AVVIAMENTO DELLE PROVE

I substrati utilizzati in questa fase della sperimentazione sono stati:

- deiezioni suine prelevate allo sbocco del collettore fognario nel pozzetto di raccolta, prima della separazione solido/liquido, presso l'azienda suinicola "Benini & Baldassarri" di Anguillara Sabazia;
- fango anaerobico dell'impianto di trattamento delle acque reflue di Roma Nord, prelevato dal circuito di pompaggio per il ricircolo.

Sia la biomassa che l'inoculo sono stati conservati in freezer ad una temperatura di -20°C.

Ogni batch è stato riempito con una miscela costituita da 350 ml di liquame suinicolo e 350 ml di fango anaerobico, per un volume totale di 700 ml; il rapporto 1:1 tra substrato ed inoculo è stato scelto per garantire il giusto apporto di comunità microbica per la sostanza organica presente, secondo dati ottenuti da sperimentazioni precedenti.

I dati della caratterizzazione della biomassa e dell'inoculo utilizzati sono riportati nel seguente schema:

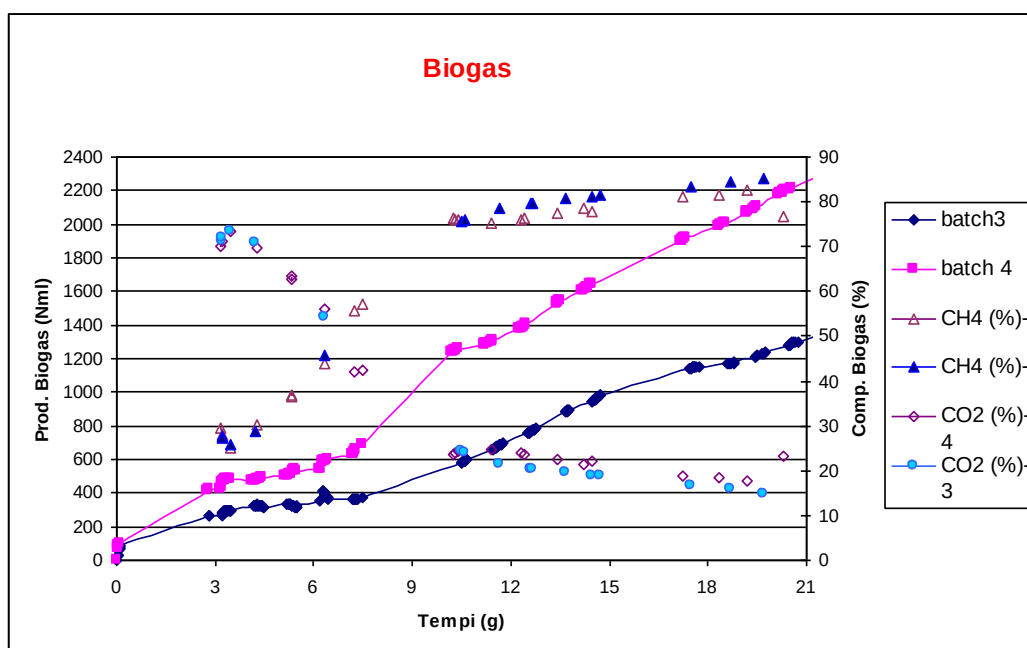
	pH	mg COD/l	mg TKN/l	C/N	mg N-NH ₄ /l	N-NH ₄ (% TKN)	ST (% tq)	SV (% ST)
Refluo suino	6,5	78800	1983,6	14,9	716	36,1	3,6	85,4
Inoculo	7,6	13600	1491,8	3,42	417	27,9	0,6	50,4

Tab.1: caratterizzazione del liquame suinicolo e dell'inoculo

SUBSTRATO	CARBOIDRATI (mg/l)	PROTEINE (mg/l)	LIPIDI (mg/l)
Liquame suino	4009	2392	868
Inoculo anaerobico	4703	13258	344

Tab.2: contenuto in biomolecole della biomassa e dell'inoculo.

Le prime prove (di seguito indicate come batch 3 e batch 4) sono state avviate solo in due batch, a pH 7 e temperatura di 35°C (condizioni comunemente adottate negli impianti reali), con lo scopo di testare la tenuta del sistema e mettere a punto le metodiche precedentemente descritte. I risultati ottenuti si sono comunque rivelati del tutto simili, sia in termini di qualità e quantità di biogas prodotto che per i valori assunti dai principali parametri biochimici monitorati, alle prove successivamente avviate con le medesime condizioni operative, a testimonianza della validità della configurazione reattoristica adottata, dell'idoneità delle metodiche utilizzate e della ripetibilità dei campioni e delle prove stesse.



2.2.14 PRIMO SET DI PROVE

Dati gli importanti e a volte contrastanti effetti che la temperatura causa sulle velocità di crescita, sulle cinetiche di reazione, sulla selezione di microrganismi e sulla stabilità del processo anaerobico, si è deciso di iniziare la sperimentazione con lo studio dell'influenza che tale parametro esercita sulla produzione quantitativa e qualitativa di biogas. I risultati ottenuti permetteranno inoltre, di valutare la convenienza di adottare un processo termofilo piuttosto che mesofilo, alla luce dei bilanci energetici dell'intero sistema (integrazione tra digestione anaerobica, clean up e reforming del biogas, e applicazione nelle celle a combustibile a carbonati fusi), tenuto conto del fatto che in uscita dalla cella, la cui temperatura di lavoro è di 650°C, si ha una gran quantità di calore ad elevata temperatura.

Un digestore anaerobico può operare in diversi intervalli di temperatura: in campo psicrofilo ($T < 20^{\circ}\text{C}$), mesofilo ($20^{\circ}\text{C} < T < 40^{\circ}\text{C}$) o termofilo ($T > 40^{\circ}\text{C}$).

A seconda della temperatura imposta al processo, si selezionano, più o meno velocemente a seconda del valore assunti da altri parametri come pH ed HRT, le specie microbiche più idonee a svilupparsi in quelle determinate condizioni operative.

Numerosi studi hanno già dimostrato che i batteri anaerobi svolgono una migliore attività in regime mesofilo e termofilo piuttosto che in quello psicrofilo (Mital, 1996; Umetsu et al., 1992; Maurya et al., 1994; Takizawa et al., 1994; Desai and Madamwar, 1994; Zennaki et al., 1996), anche se, in tali condizioni operative, sembrano essere più sensibili alle variazioni ambientali (Zinder, 1993; Garba, 1996; Ahn and Forster, 2002; El-Mashad et al., 2003; Kim et al., 2002).

Da un punto di vista pratico, far avvenire la digestione anaerobica a temperature più elevate significa avere cinetiche più veloci, maggiori produzioni di biogas, maggior tasso di distruzione dei patogeni, tempi di ritenzione idraulica minori a parità di sostanza organica degradata, e quindi, volumi più piccoli dei reattori, o, equivalentemente, raggiungere migliori efficienze di rimozione del substrato con i medesimi tempi di residenza; d'altra parte, però, in tali condizioni operative, che richiedono un maggior quantitativo di calore per mantenere il digestore ad una temperatura di circa 55°C , è stata osservata in letteratura una minore stabilità del processo.

Tenuto conto di tali considerazioni, il primo set di prove è stato allestito come di seguito riportato:

Batch n°	P tot g	P Ino g	P subst g	T dig °C	pH i
M35-7;1	700	350	350	35	7,0
M35-7;2	700	350	350	35	7,0
T55-7;1	700	350	350	55	7,0
T55-7;2	700	350	350	55	7,0
T75-7;1	700	350	350	75	7,0
T75-7;2	700	350	350	75	7,0
M35-6;1	700	350	350	35	6,0
M35-6;2	700	350	350	35	6,0
T55-6;1	700	350	350	55	6,0
T55-6;2	700	350	350	55	6,0

Tab.3: schema di avviamento del primo set di prove.

Nelle prove evidenziate si sono verificati degli imprevisti: l'eudiometro corrispondente al batch M35-6;1 si è rotto improvvisamente ed il test M55-6;1 è stato condotto in assenza di agitazione; quest'ultimo si arrestato dopo l'idrolisi, evidenziando l'importanza di un adeguato grado di miscelazione.

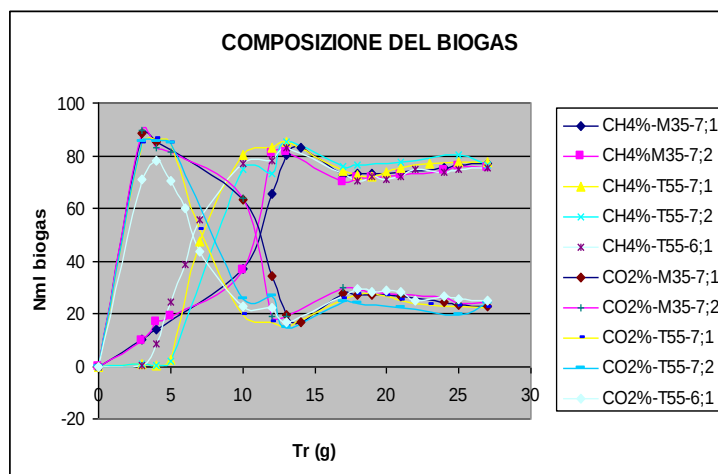
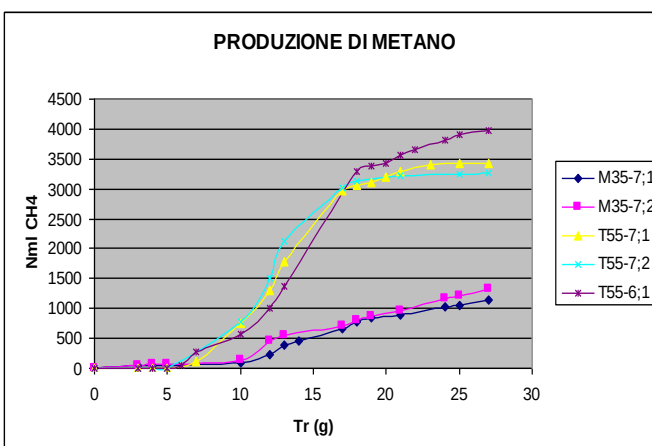
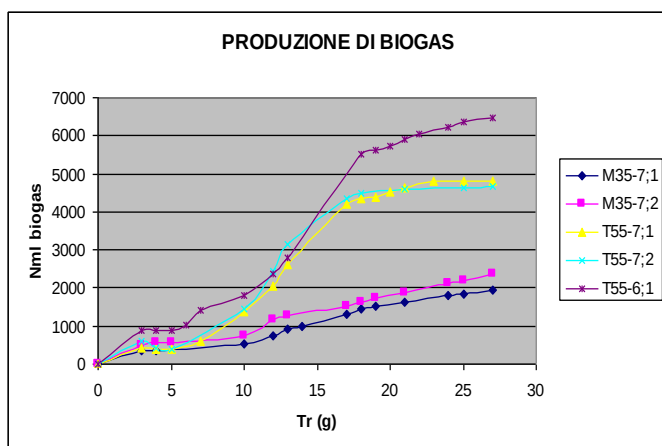
I valori iniziali di pH sono stati corretti aggiungendo pochi cc di HCl concentrato al 37% in volume.

2.2.15 PRODUZIONE DI BIOGAS

Come ci si aspettava, la temperatura ha accelerato la cinetica di alcune reazioni ed ha favorito lo sviluppo dei metanogeni diminuendone il tempo di acclimatazione, come si può notare dal fatto che la produzione di metano, a parità di tempo di digestione, è più che raddoppiata ed è cominciata prima. Infatti, mentre nelle prove mesofile la produzione di metano è iniziata intorno al decimo giorno, in quelle termofile a 55°C la metanogenesi inizia a manifestarsi già al sesto giorno di ritenzione idraulica.

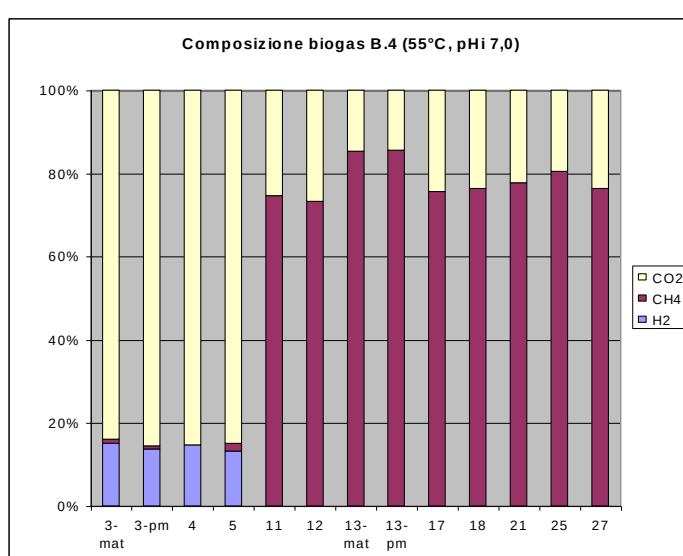
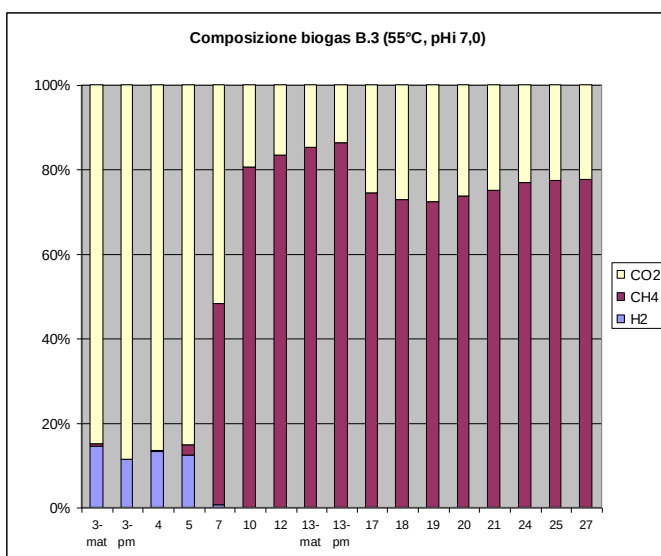
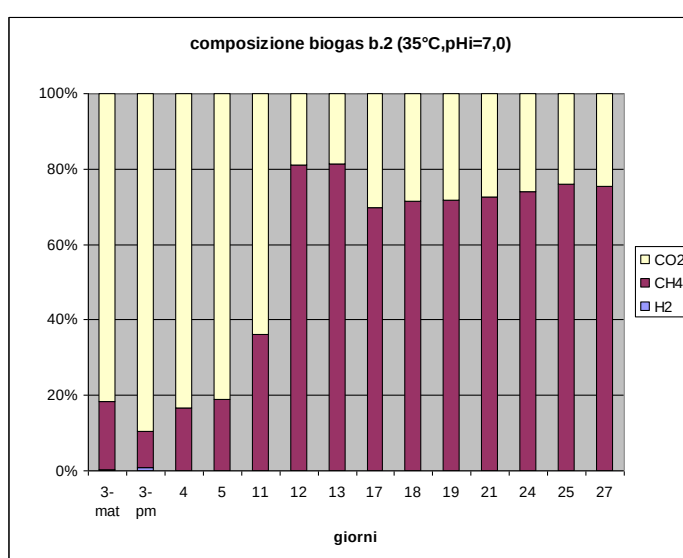
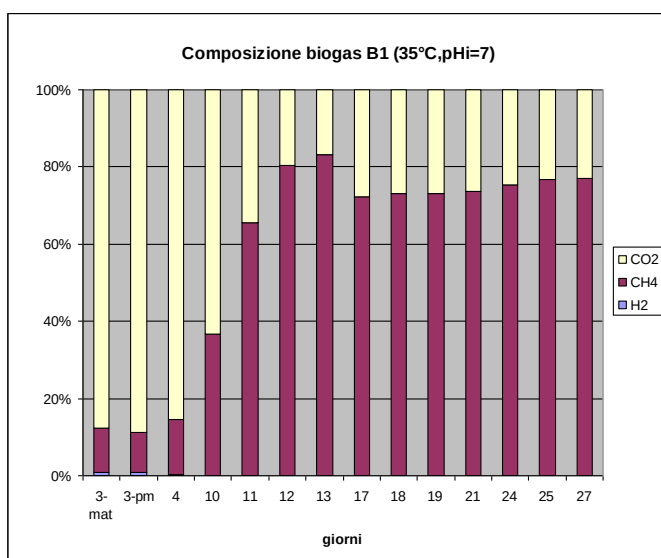
Le prove avviate a 75°C sembrano aver avuto un'idrolisi analoga a quella delle altre prove termofile, ma la fase metanigena è risultata inibita. Ulteriori analisi sono in corso per capire quale sia stata la causa dell'arresto del processo.

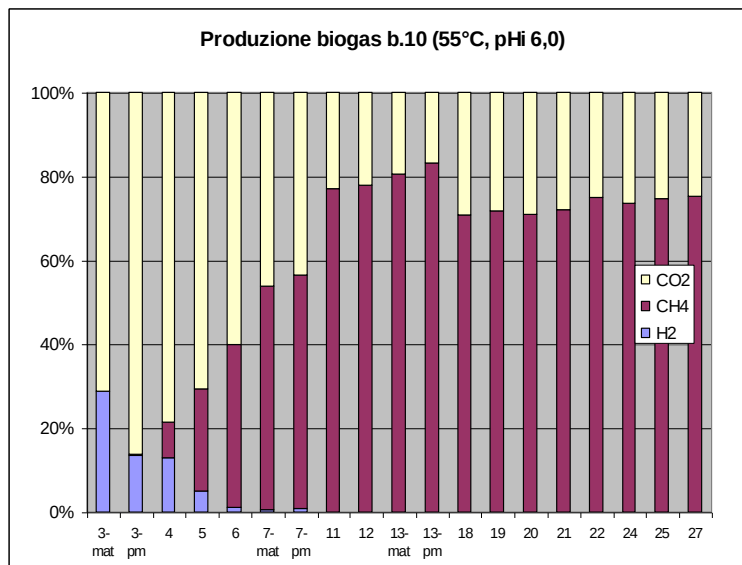
Il più rapido sviluppo dei metanogeni nei test mantenuti a 55°C porta ad anticipare la produzione di metano ed il momento in cui esso diviene il costituente principale del biogas, come mostrato dal grafico in basso; tuttavia, prolungando il tempo del trattamento, le percentuali di metano ed anidride carbonica dei test mesofili e di quelli termofili tendono a coincidere.



Tale fatto suggerisce che la temperatura abbia solo accelerato i tempi di degradazione ma non abbia modificato i pathway metabolici seguiti dai microrganismi, per cui non dovremmo aspettarci differenze sostanziali negli andamenti dei parametri biochimici.

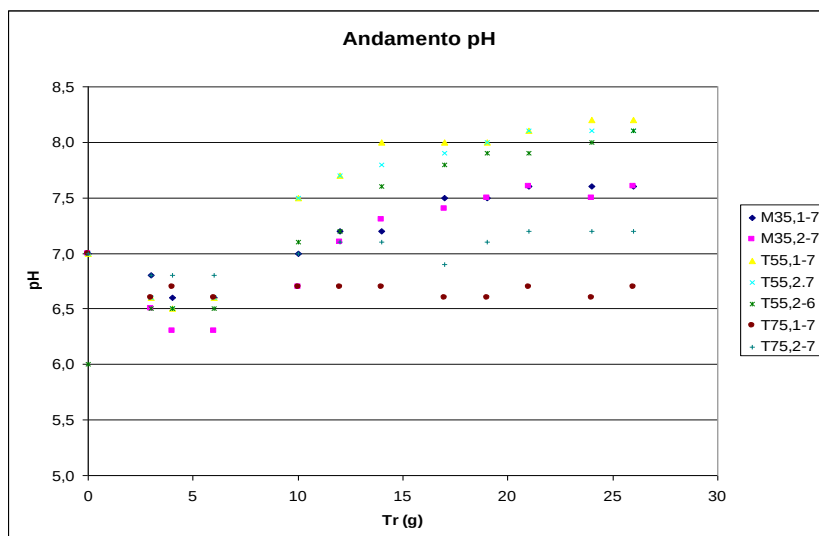
Le migliori rese in metano sono precedute, nelle prove condotte a 55°C, da una maggiore produzione di idrogeno che, nel caso in cui il pH iniziale era stato portato al valore 7, si mantiene costante per circa 5 giorni, suggerendo il raggiungimento di un equilibrio dinamico tra idrogenoproduttori e idrogenotrofici; nelle prove avviate a pH 6, invece, produzione e consumo di idrogeno appaiono molto più repentini denunciando una probabile situazione di squilibrio o rapido cambiamento delle popolazioni dominanti.





2.2.17 ANDAMENTO DEL pH

E' risaputo che il pH ottimale per una fermentazione anaerobica a singolo stadio è compreso nell'intervallo 6,8-7,2. Scendendo a valori di pH inferiori a 6,2, il metabolismo dei metanogeni è fortemente rallentato (si determinano condizioni di tossicità), mentre gli acidogeni sono in grado di continuare la loro attività fino a pH pari a 4,5; in queste condizioni la produzione di acidi grassi è molto più veloce della loro rimozione, si consuma alcalinità e potrebbe diminuire ulteriormente il valore del pH, circostanza non verificatasi nel corso della sperimentazione. Al contrario, per le prove avviate a pH 6, l'idrolisi è stata accompagnata da un innalzamento e non dall'abbassamento del pH; probabilmente ciò è dovuto ad un'idrolisi più spinta per aggiunta di piccole quantità di acido, che ha favorito lo sviluppo dei metanogeni.



Il pH si conferma essere un importante indicatore di stabilità del sistema: le prove inibite, infatti, hanno mostrato forti anomalie nell'andamento del pH. Tali anomalie, però, denunciano una situazione di crisi già in atto, quindi tale parametro non può essere preso in considerazione, da solo, come parametro di monitoraggio per prevenire situazioni indesiderate.

Il pH, durante la digestione anaerobica, influenza fortemente la crescita dei microrganismi ed i metaboliti da essi prodotti, così come la temperatura, la concentrazione di sostanze nutritive, l'umidità e le condizioni chimico-fisiche dell'ambiente in cui si sviluppano.

Lo studio dell'influenza del pH sul processo anaerobico merita senz'altro ulteriori approfondimenti, tuttavia si ritiene più significativo un controllo in continuo di tale parametro.

2.2.18 ANDAMENTO DEI VFA

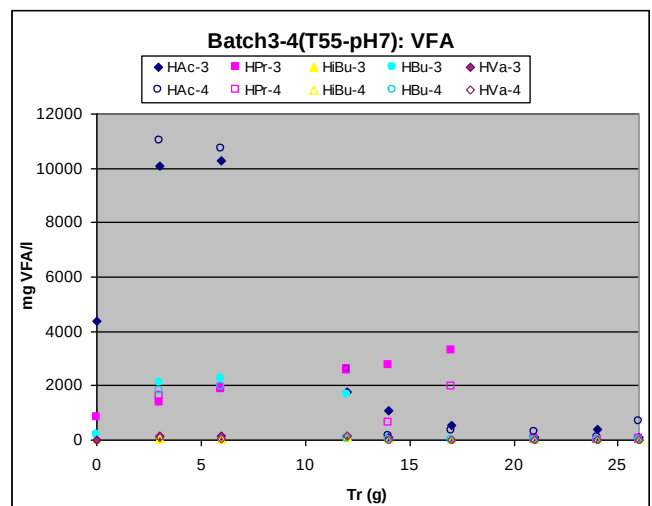
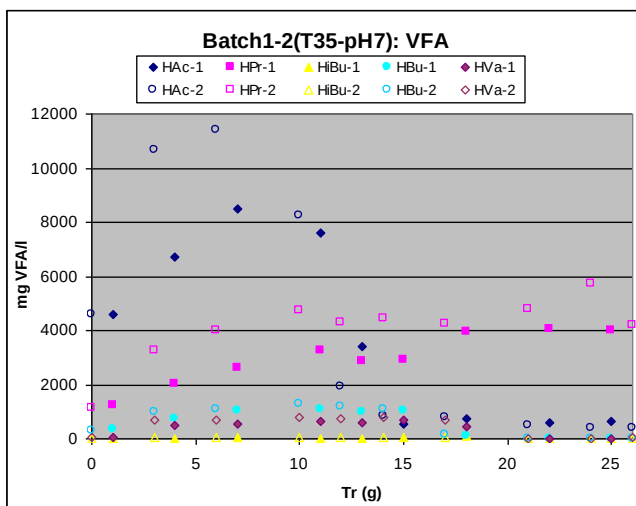
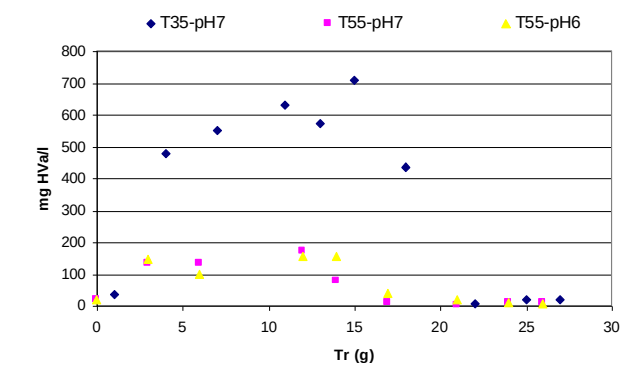
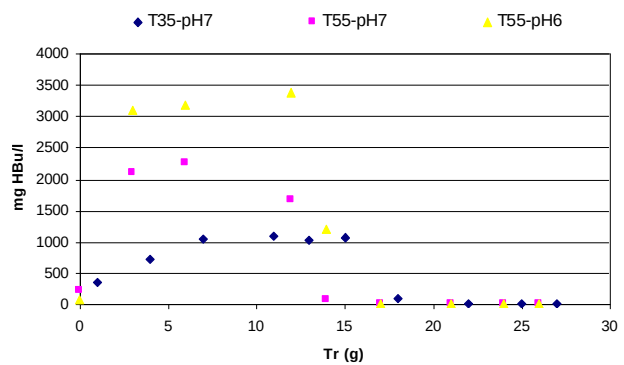
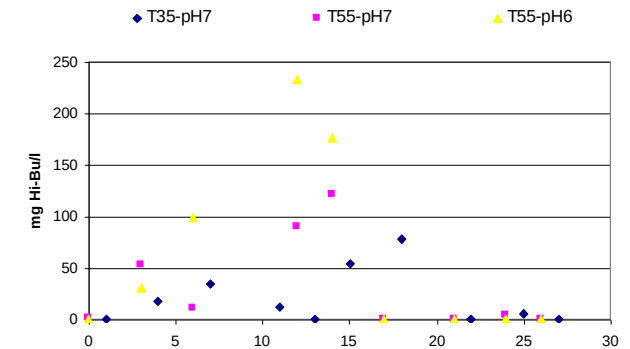
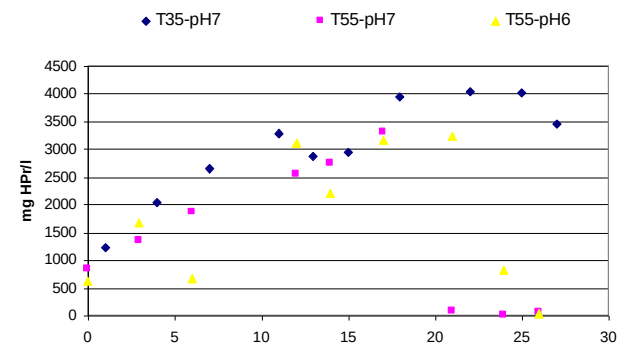
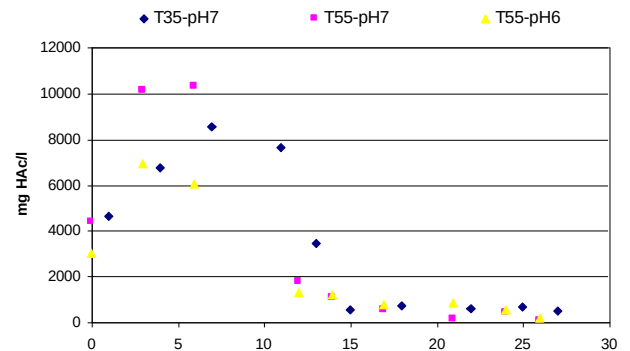
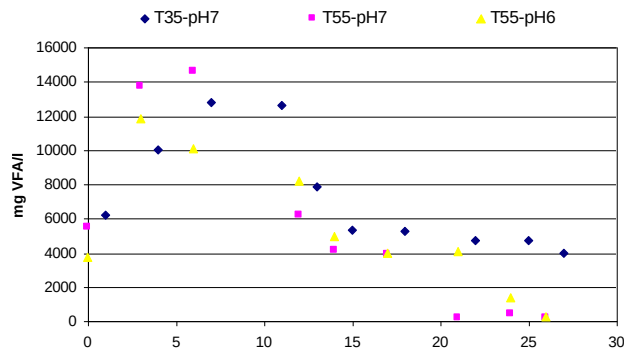
Gli acidi grassi volatili, essendo prodotti di degradazione, variano a seconda delle condizioni ambientali e delle famiglie batteriche predominanti.

La loro determinazione, fatta mediante GC-MS, permette di capire i pathway metabolici intrapresi dai microrganismi al variare dei parametri operativi e consente di fare bilanci di massa.

I principali acidi grassi volatili studiati sono l'acetico, il propionico, il valerico, il butirrico e l'iso-butirrico.; tra questi, i primi due sono i più importanti.

Nelle prove avviate non sembrano esserci differenze nette riconducibili alle diverse condizioni operative testate; bensì, in tutti i test si verifica un accumulo di propionico verso la fine della digestione, anche se le quantità accumulate diminuiscono all'aumentare della temperatura; alternativamente, potremmo pensare che ci sia stato uno shift nei pathway metabolici in quanto, durante l'idrolisi e l'avvio della metanogenesi, il principale prodotto di degradazione era acido acetico, mentre dopo 15 giorni di ritenzione, prevale il propionico come mostrato di seguito.

Come si può notare dagli ultimi due grafici, anche in questo caso i test avviati nelle medesime condizioni operative hanno dato risultati molto simili.



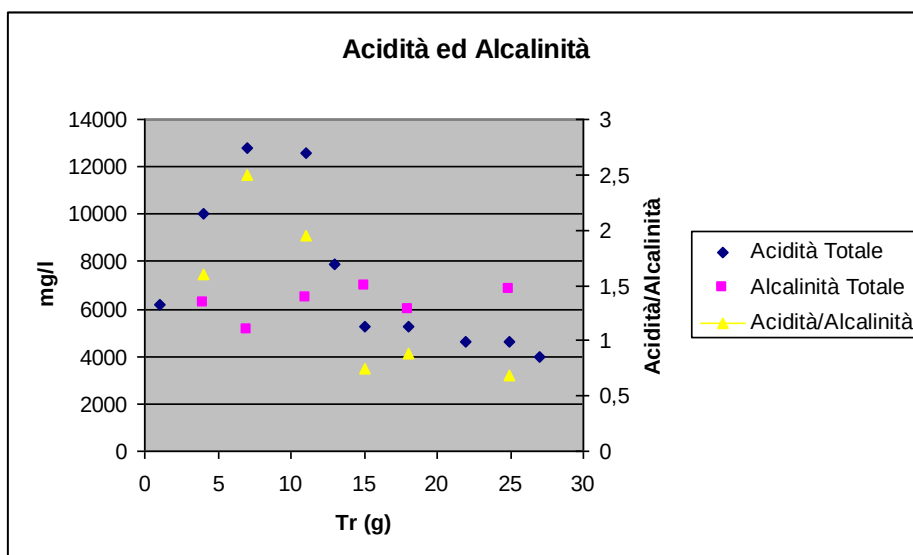
2.2.19 ACIDITA' TOTALE/ALCALINITA' TOTALE

Il rapporto tra acidità ed alcalinità totale (in tedesco chiamato FOS/TAC: FOS sta per «Flüchtige Organische Säuren» ovvero Acidi Organici Volatili, ed è misurato in mg HAc eq/l; TAC sta per «Totales Anorganisches Carbonat» o Capacità di Tamponamento Alcalina, espressa in mg CaCO₃/l) rappresenta un parametro di monitoraggio fondamentale per lo stato del processo.

In realtà il FOS/TAC descrive, se seguito nel tempo, come variano i rapporti tra la velocità con cui vengono prodotti gli acidi grassi volatili e la velocità con cui gli stessi vengono rimossi in rapporto all'alcalinità presente; pertanto, un valore basso (0,1 - 0,2) indica una scarsa produzione di VFA, quindi una probabile sottoalimentazione del digestore, mentre un valore elevato (0,7 - 0,8) è testimonianza di un'eccessiva acidificazione; in pratica tale parametro può essere utilizzato come indicatore della variazione degli equilibri che si instaurano tra le comunità microbiche o di eventuali inibizioni.

Nel caso del processo di tipo batch, questo parametro aiuta a comprendere quando la digestione può ritenersi conclusa.

Dopo 26 giorni di trattamento anaerobico, il rapporto Acidità/Alcalinità, nel caso delle prove a 35°C, è di poco inferiore allo 0.7 (vedi grafico sotto), indice di attività metanigeni ancora in piena evoluzione; nelle prove termofila, invece, esso assume un valore intorno allo 0.1, tipico di un materiale che ha raggiunto un buon grado di stabilizzazione.



2.2.20 DEGRADAZIONE MACROMOLECOLE

I materiali avviabili a digestione anaerobica, tipicamente residui agricoli, acque reflue civili e dell'agroindustria, frazione organica dei rifiuti solidi urbani e reflui zootecnici, sono composti principalmente da carboidrati, proteine, lipidi e lignina. In generale, la biodegradabilità delle

sostanze di cui è composto l'ingestato ed il giusto equilibrio tra i suoi costituenti, sono direttamente correlati alla produzione potenziale di metano ed alla stabilità del processo.

La lignina, formata principalmente da catene non lineari di composti fenolici, oltre a non essere praticamente degradabile nelle condizioni in cui avviene la digestione anaerobica, ostacola anche la disponibilità di altre sostanze, soprattutto la cellulosa e l'emicellulosa; pertanto, possiamo dire che, a parità di altri fattori, la produzione di biogas sarà inversamente proporzionale al contenuto in lignina del substrato da digerire.

I carboidrati comprendono gli zuccheri a basso peso molecolare, che ne rappresentano la frazione prontamente biodegradabile (in qualche ora), l'emicellulosa, che necessita di un tempo di ritenzione nel digestore dell'ordine dei giorni come avviene per grassi e proteine, la cellulosa, che richiede tempi di degradazione di circa una settimana; essi rappresentano la principale fonte di energia per i microrganismi..

Le proteine, dopo essere state idrolizzate ad amminoacidi e polipeptidi, sono soggette alle stesse vie metaboliche dei carboidrati; l'importanza di questi composti durante la digestione anaerobica sta nel loro apporto di azoto, liberato come azoto ammoniacale (figura 1). Tale composto costituisce uno dei più importanti parametri da monitorare perché, da un lato, fornisce capacità tampone al substrato, necessaria durante la produzione dei VFA per evitare una drastica diminuzione del pH, dall'altro diventa inibente se si superano concentrazioni limite pari a 3.5 - 4 g/L (De Baere et al., 1984). Co-prodotti indesiderati della degradazione della proteine, sebbene in quantità minime, sono composti maleodoranti come l'indolo, lo skatolo, i mercaptani e l'idrogeno solforato.

I lipidi, vengono degradati in acidi grassi a catena lunga (Long Chain Fatty Acids) e glicerolo mediante la β -ossidazione; dato l'elevato peso molecolare, rappresentano la frazione di substrato con miglior resa in metano, sebbene anch'essi presentino alcune sostanze recalcitranti come la cutina ed un loro eccessivo contenuto nell'alimentazione potrebbe causare inibizione per accumulo di acidi grassi a causa della lenta degradazione cui sono sottoposti.

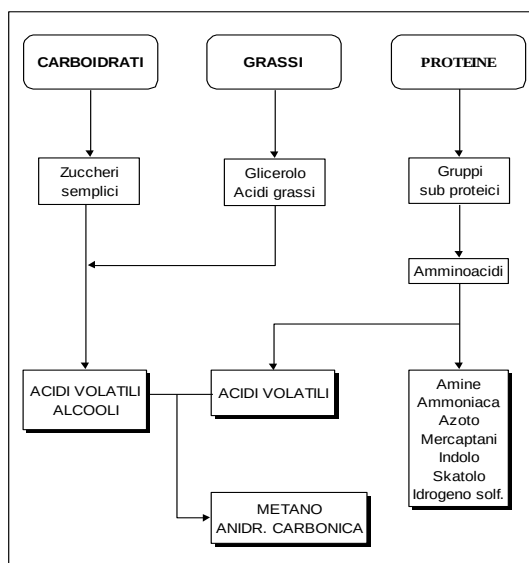
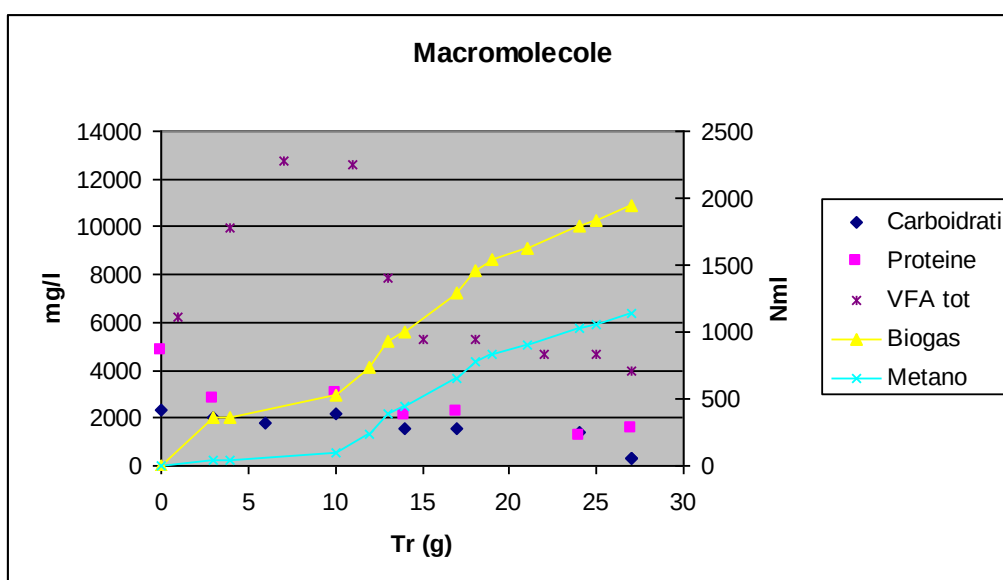


Fig. 1: Schema riassuntivo della degradazione anaerobica delle sostanze organiche

Ad oggi solo del campione M35-7;1 è stato analizzato il contenuto ed il grado di degradazione delle biomolecole, che viene rappresentato nel grafico sottostante.

	CARBOIDRATI	PROTEINE	LIPIDI
	mg/l	mg/l	mg/l
Concentrazione iniziale	2331	4842	606
Concentrazione finale	331	1570	186
Riduzioni %	85,8	67,6	69,3



Come si può osservare, dopo 26 giorni di trattamento anaerobico mesofilo, si sono raggiunte elevate efficienze di abbattimento delle macromolecole contenute nella miscela alimentata, anche se rimane ancora un'elevata concentrazione di VFA, la cui degradazione appare ancora incompleta.

Come da aspettative, la produzione di idrogeno solforato, che raggiunge il massimo tasso durante l'idrolisi (vedi grafico nelle conclusioni), corrisponde alla fase di degradazione delle proteine.

2.2.21 CONTENUTO IN NUTRIENTI

Il contenuto ed il rapporto tra nutrienti sembra essere un altro importante parametro che regola il processo fermentativo: i batteri sono composti in gran parte da acqua, carbonio, azoto, idrogeno, ossigeno, fosforo e zolfo, sostanze di cui necessitano sia per la sintesi cellulare (anabolismo) che

per i processi catabolici, attraverso i quali viene prodotta energia libera necessaria per i processi anabolici stessi.

Il rapporto tra carbonio, azoto e fosforo necessario per la crescita microbica è $BOD_5:N:P = 100:5:1$; tale proporzione deriva dal considerare la generica formula di un batterio $C_5H_7O_2NP_{0.06}$ (Speece, 1997), che implica che il 12% ed il 2% dei solidi volatili trasformati in biomasse devono essere rispettivamente azoto e fosforo (considerando solitamente che il 10% dei SV degradati vengono usati per la sintesi cellulare, significa che l'1.2% e lo 0.024% dei SV in ingresso devono essere costituiti da azoto e fosforo).

BATCH	Concentrazione iniziale					
	C*	N	P	K	N-NH3	NNH3
	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	%TKN
T35-7	13875	1235	480	510	373	30
T55-7	13163	1771	416	190	527	30
T55-6	20250	2265	256	590	720	32

* Misura derivata dalla determinazione del COD

Nel nostro caso siamo lontani dalle condizioni ottimali in quanto l'alimentazione risulta scarsa in carbonio; quest'osservazione può servire per migliorare la razione del digestore codigerendo, insieme al liquame suino, substrati ricchi in zuccheri e lipidi.

La caratterizzazione in termini di micro e macro nutrienti diviene importante anche sul digestato, come valutazione del potere fertilizzante del materiale ottenuto.

BATCH	Concentrazione finale					
	C*	N	P	K	NNH3	NNH3
	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	%TKN
T35-7	6356	1029	96	800	945	92
T55-7	6225	1235	135	1170	1075	87
T55-6	9450	1935	62	1200	1135	59

Come si può notare dal confronto del contenuto in nutrienti della miscela prima e dopo il trattamento anaerobico, il fosforo risulta essere l'elemento maggiormente utilizzato (naturalmente dopo il carbonio), mentre aumentano le concentrazioni di potassio ed azoto ammoniacale.

BATCH	Rimozi			BATCH	Aumenti	
	C	N	P		K	NNH3
	%	%	%		%	%
T35-7	54,2	16,7	80,0	T35-7	57	153
T55-7	52,7	30,2	67,5	T55-7	516	104
T55-6	53,3	14,5	75,8	T55-6	103	58

Il trattamento ha reso tali sostanze più disponibili per il nutrimento dei batteri; questo risultato è molto importante se si pensa che l'azoto ammoniacale viene rapidamente assimilato dalle piante se distribuito nei campi nel periodo di massima richiesta di nutrienti, minimizzando il rischio di perdite per lisciviazione. D'altra parte, però, si devono prendere particolari accorgimenti nello spandimento per evitare fastidiose perdite per volatilizzazione, adottando semplici tecniche come l'irrigazione mediante tubi sotterrati.

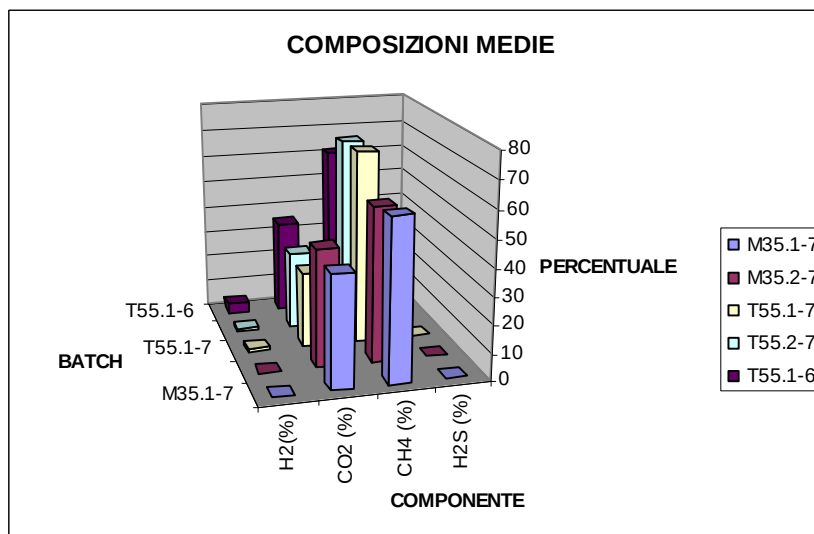
2.2.22 CONCLUSIONI DEL PRIMO SET DI PROVE

Da questo primo set di prove possiamo già dedurre alcune considerazioni importanti, che naturalmente necessitano di una campagna di "conferma":

- l'effetto principale della temperatura sul processo di digestione è quello di catalizzare la degradazione della sostanza organica, ma non siamo ancora in grado di dire se ciò comporta solo una riduzione dei tempi necessari alla produzione di una data quantità di metano o se migliora anche la qualità del biogas prodotto. I dati riguardanti le rese energetiche, di seguito riportati, ed il minor accumulo di acido propionico durante la fase terminale del trattamento, fanno presupporre che ci siano delle differenze sostanziali nelle popolazioni operanti a 35° e a 55°C, o per lo meno che ci siano state delle variazioni nei loro pathway metabolici.

Composizioni medie

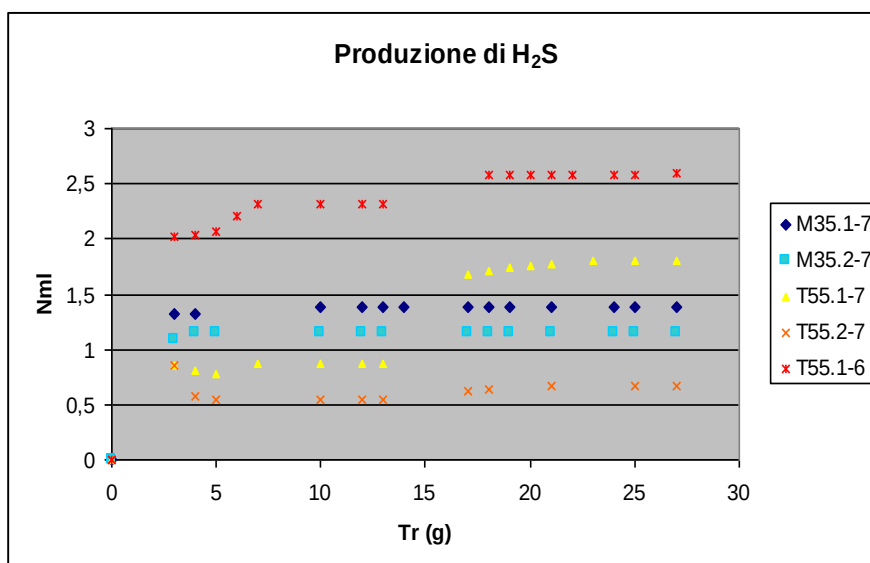
BATCH	T	pH	H ₂ (%)	CO ₂ (%)	CH ₄ (%)	H ₂ S (%)
M35.1-7	35	7	0,18	40,94	58,80	0,071
M35.2-7	35	7	0,16	43,16	56,64	0,049
T55.1-7	55	7	1,15	27,88	70,94	0,037
T55.2-7	55	7	1,13	28,69	70,16	0,014
T55.1-6	55	6	4,02	34,58	61,36	0,041



Rese medie

BATCH	NmICH ₄ /gSTi	NmICH ₄ /gSVi	NmICH ₄ /gCODi	NmICH ₄ /gSTmat	NmICH ₄ /gSVmat	VFA/Alk
M35.1-7	137,02	203,36	51,85	160,62	224,03	0,68
M35.2-7	109,23	162,51	31,87	128,04	179,02	
T55.1-7	273,61	411,31	97,51	320,74	453,11	0,06
T55.2-7	162,80	264,89	87,54	190,84	291,82	
T55.1-6	149,47	250,27	72,41	175,22	275,70	0,16

- se successive prove confermeranno che la temperatura non solo accorcia i tempi di produzione del biogas, ma ne migliora la qualità, sarà interessante valutare la convenienza e la fattibilità tecnico economica di un impianto di digestione anaerobica dei refui suinicoli operante in termofila piuttosto che in mesofila, tenuto conto del calore ad elevata temperatura in uscita dalla cella a combustibile;
- anche il valore di pH, come noto, ha un effetto importante sugli equilibri ionici in soluzione, il ch  si riflette sulla qualit  del biogas prodotto, soprattutto in termini di contenuto di idrogeno. Tale parametro richiede ulteriori approfondimenti.
- La formazione di idrogeno solforato avviene in corrispondenza della degradazione delle proteine durante la fase di idrolisi (come si pu  vedere nel grafico sottostante); ci  suggerisce l'ipotesi di poter spingere la produzione, ed il successivo abbattimento, di tale composto nel primo stadio di digestione, evitando cos  di far entrare in competizione i solfatoriduttori con i metanogeni. L'effetto della temperatura sulla formazione di H₂S risulta ancora poco chiara e necessita di ulteriori studi.



Parte B

Messa a punto di metodi molecolari per la caratterizzazione della popolazione microbica nei reflui zootecnici da utilizzare nella prima fase della sperimentazione a monostadio (batch)

Nel quadro della finalità generale del progetto di ricerca, che si propone di indagare la possibilità di integrare il processo di digestione anaerobica con un sistema di cogenerazione ad alta efficienza, le Celle a Combustibile a Carbonati Fusi (Molten Carbonate Fuel Cell - MCFC), per la trasformazione di alcune tipologie di biomasse in energia elettrica e termica, la linea di attività sulla caratterizzazione della comunità microbica operante durante il processo di digestione anaerobica mira ad individuare le condizioni che favoriscano una successione di popolazioni microbiche tale da ottenere un biogas con caratteristiche di elevata qualità, quali un elevato contenuto percentuale di metano (70-75% v/v) e idrogeno e un basso contenuto in impurità.

Tale esigenza, legata alla necessità di trasformare il biogas in idrogeno (reforming) per l'alimentazione delle MCFC, richiede una rivisitazione dei processi di digestione ed una migliore conoscenza della microbiologia di processo, al fine di indirizzare le reazioni verso i prodotti desiderati.

La caratterizzazione microbiologica sarà condotta mediante l'impiego di tecniche molecolari, in quanto rendono l'indagine indipendente dai metodi di coltivazione e permettono di individuare il DNA specifico anche dei ceppi microbici non coltivabili. In tal modo viene offerta la possibilità di studiare in modo approfondito come varia, nelle diverse condizioni sperimentali, la dinamica fisiologica della comunità microbica durante le fasi della digestione anaerobica.

L'applicazione delle tecniche molecolari a sistemi complessi e non ancora conosciuti a fondo, qual è la digestione anaerobica, richiede una messa a punto delle procedure per ogni singolo passaggio: estrazione del DNA, amplificazione di specifici frammenti (PCR, Nested-PCR), elettroforesi in gradiente denaturante (DGGE) per la risoluzione delle bande di migrazione, elaborazione statistica dei dati mediante idoneo software ed eventuale clonaggio e sequenziamento del DNA estratto dalle bande, per la identificazione delle specie di appartenenza. Le procedure standard vanno infatti adattate in base alla composizione della matrice da trattare, al tipo di inoculo utilizzato ed alle condizioni sperimentali testate. Ciascuno di questi parametri può richiedere aggiustamenti delle procedure solitamente usate, a causa della presenza di elementi che possono inibire o alterare alcuni processi di reazione.

L'analisi della comunità microbica del processo di digestione anaerobica di reflui suini, condotto nelle condizioni descritte in dettaglio nella parte A del presente rapporto ha richiesto di adattare al caso le procedure standard.

Durante il periodo di attività preso in considerazione è stata eseguita una accurata messa a punto delle procedure per l'individuazione dei frammenti di DNA della comunità microbica durante il processo di digestione anaerobica. In particolare sono state studiate le migliori condizioni per ottenere la migliore risoluzione dei frammenti molecolari sia per gli Eubatteri, che per gli Archeobatteri. La comprensione della dinamica di questi due gruppi, che intervengono nelle diverse fasi del processo, ed in particolare una migliore conoscenza del gruppo degli Archea, ai quali appartengono specie non ancora note e che sono responsabili della produzione di metano, aprono la strada per una manipolazione del processo nel suo livello fondamentale, che è il livello microbiologico.

1. Estrazione di DNA dai campioni di refluo prelevati giornalmente dai bioreattori

La messa a punto è stata necessaria per ottenere una quantità e qualità di DNA compatibile con la sensibilità della reazione di PCR ai contaminanti di varia natura che possono inibirne la reazione.

Si sono testate diverse quantità iniziali di refluo (da 2 ml a 200 µl) e diversi metodi di estrazione (Qiagen Stool Kit e Zymogen soil Kit). Nella figura 1 si riporta un esempio delle prove di estrazione condotte su quantità crescenti di un campione di refluo: l'efficienza di estrazione risulta proporzionale al materiale di partenza.

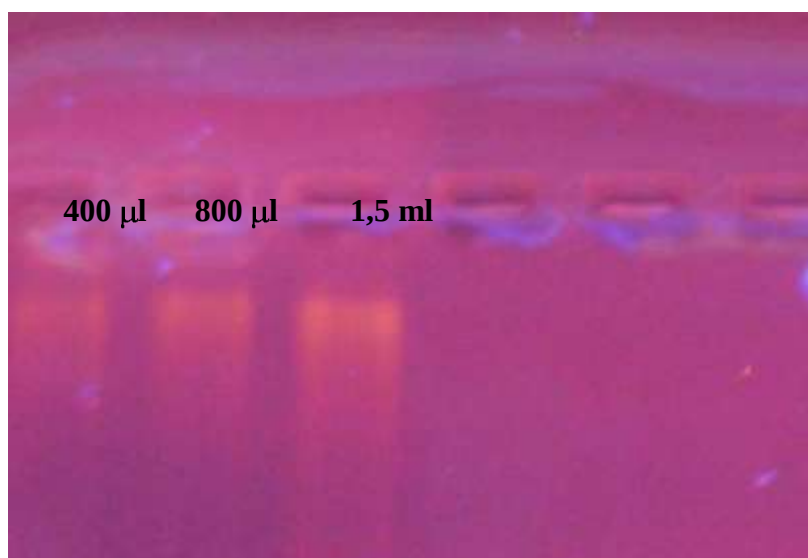


Figura 1. Elettroforesi su gel di agarosio 1% del DNA genomico estratto con *Stool kit* da diverse quantità di refluo.

Questo DNA, amplificato con i *primers* per il gene 16S degli Archeobatteri, ha dato risultati diversi, come mostrato in figura 2: il DNA genomico estratto da quantità maggiori di materiale di partenza (1,5 ml di refluo) non si riesce ad amplificare in PCR, a causa di inibitori che vengono precipitati insieme al DNA. Nella figura 2 sono mostrati anche il controllo positivo ed il controllo negativo.

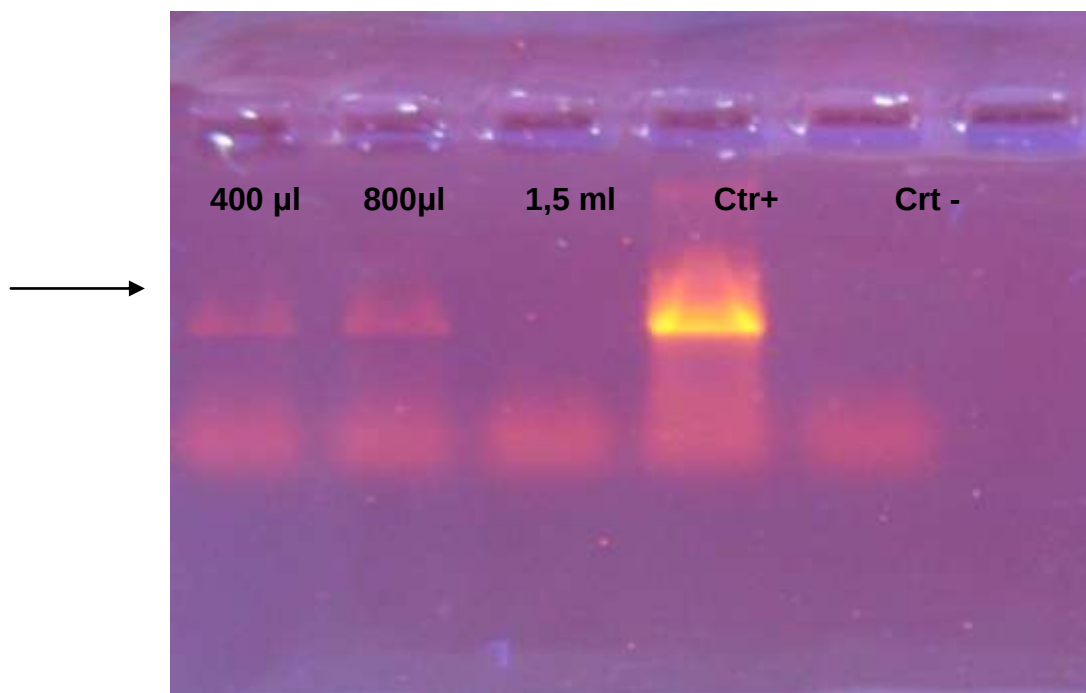


Figura 2. Elettroforesi su gel di agarosio 1.5% dei prodotti di PCR del 16S Archeobatteri ottenuti con la coppia di *primers* 21(F)/958(R).

Sulla base di questi risultati si è deciso di standardizzare l'estrazione del DNA genomico impiegando 400 µl di campione.

2. *Messa a punto della reazione di PCR*

E' stata messa a punto la reazione di PCR per analizzare le comunità microbiche degli Archeobatteri e degli Eubatteri.

Su ogni campione di DNA genomico estratto è stata effettuata una prima reazione di PCR per amplificare una porzione di 1341 nucleotidi del gene 16S degli Eubatteri, utilizzando i *primers* 63(F) e 1389(R). Dagli stessi campioni di DNA genomico è stata amplificata una porzione del gene

16S degli Archeobatteri, corrispondente a 956 nucleotidi, utilizzando i *primers* Arch21(F) e Arch958(R).

In tabella 1 vengono riportate le caratteristiche dei *primers* selezionati per questo studio.

<i>Primers</i> Eubatteri	sequenza	T melting	posizione 16S rRNA
63(F)	5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3'	59,8°C	63-84
1389(R)	5'-ACGGGCGGTGTGTACAAG-3'	58,2°C	1371-1389

<i>Primers</i> Archeobatteri	sequenza	T melting	posizione 16S rRNA
Arch21(F)	5'-TTCCGGTTGATCC(CT)GCCGGA-3'	62,4°C	21-41
Arch958(R)	5'-(CT)CCGGCGTTGA(AC)TCCAATT-3'	56,7°C	939-958

Tabella 1. Caratteristiche dei *Primers* selezionati per la reazione di PCR per Eubatteri ed Archeobatteri

In seguito ad un elevato numero di prove condotte combinando le diverse condizioni di reazione, le condizioni ottimali di PCR per queste amplificazioni risultano essere le seguenti:

▪ Amplificazione 16S Eubatteri

E' stata condotta su 1µl di DNA genomico, utilizzando 100 pm dei *primers* 63(F) e 1389(R) in ciascuna reazione.

denaturazione: 95°C 2min

35 cicli: 95°C 1 min – 55°C 1 min – 72°C 2min

extension: 72°C 10min

▪ Amplificazione 16S Archea

E' stata condotta su 1µl di DNA genomico, utilizzando 100 pm dei *primers* 21(F) e 958(R) per ciascuna reazione.

denaturazione: 95°C 2min

30 cicli: 95° 30 - sec 50° - 30 sec -72°C 1 min

extension: 72°C 10 min

Nelle figure 3 e 4 vengono mostrati due esempi di prodotti di amplificazione del 16S degli Eubatteri e degli Archea.

PCR 16S Eubatteri 63(F)/1389(R)

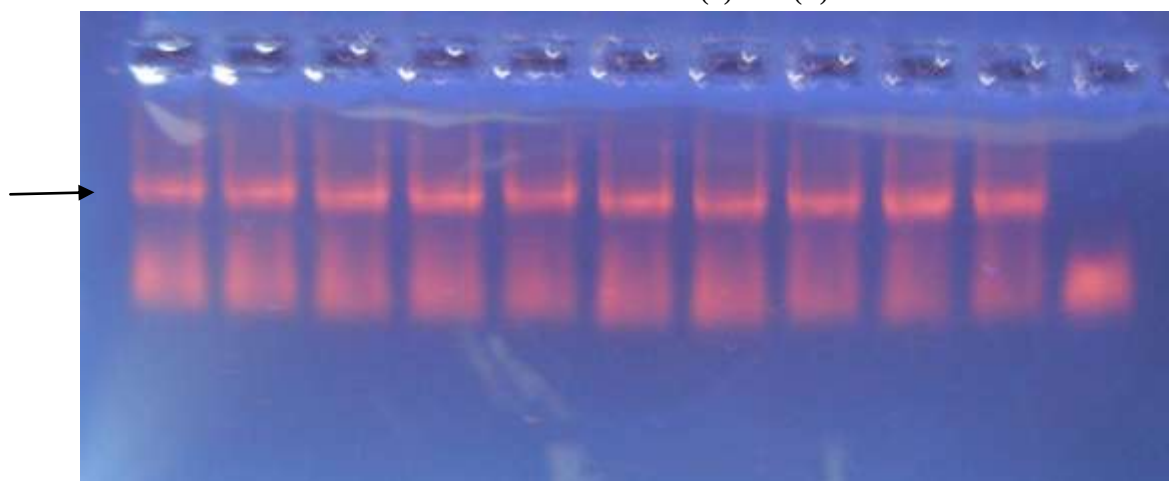


Figura 3. Elettroforesi su gel d'agarosio all'1% dei prodotti di amplificazione del 16S degli Eubatteri su alcuni campioni prelevati a diversi giorni da bioreattori in batch.

PCR 16S Archeobatteri Arch21(F)/Arch958(R)

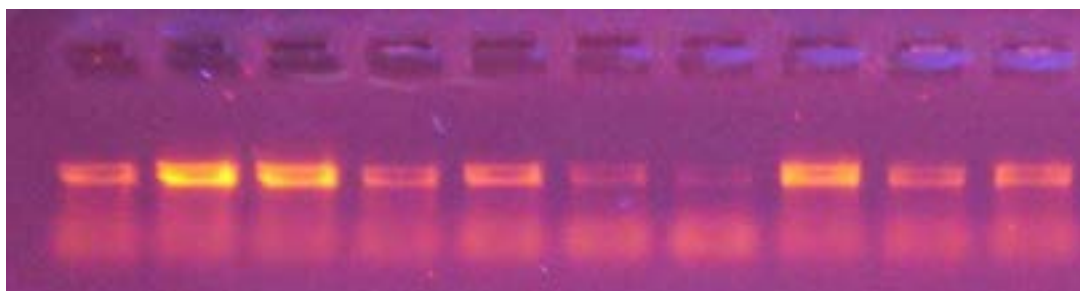


Figura 4. Elettroforesi su gel d'agarosio all'1% dei prodotti di amplificazione del 16S degli Archeobatteri sugli stessi campioni mostrati in fig.3.

3. Nested-PCR

I prodotti ottenuti dalle reazioni descritte sopra sono stati utilizzati come stampo per ulteriori reazioni di amplificazione con coppie di *primers* interni (*Nested PCR*) al fine di ottenere dei frammenti da 200 e 600 paia di basi.

In tabella 2 vengono riportate le caratteristiche dei *primers* impiegati nella nested-PCR.

<i>Primers</i> Eubatteri	sequenza	T melting	posizione 16S rRNA
*341(F)	5'-CCTACGGGAGGCAGCAG -3'	60°C	341-357
534(R)	5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'	56°C	518-534
926 (R)	5'-CCGTCAATTC(AC)TTTGAGTTT-3'	52,2°C	906-926

<i>Primers</i> Archeobatteri	sequenza	T melting	posizione 16S rRNA
*Arch340(F)	5'-CCCTACGGGGYGCASCA-3'	61°C	340-356
Arch519(R)	5'-TTACCGCGGCKGCTG -3'	53°C	505-519
Arch958(R)	5'-(CT)CC GGC GTT GA(AC) TCC AATT-3'	56,7°C	939-958
* coda GC	5'-CGCCCGCCGCGCGGGCGGGCGGG GCGGGGGCACGGGGGG-3'		

Tabella 2. Caratteristiche dei *primers* impiegati nella nested-PCR

Per gli Eubatteri, il primer 341(F) è stato appaiato con il 534(R) per ottenere i frammenti da 200bp, e con il 926(R) per i frammenti da 600bp. Per gli Archea, la coppia Arc340(F)/Arch519(R) dà origine a frammenti da 200 bp, e la coppia Arch340(F)/Arch958(R) frammenti da 600 bp.

Viene utilizzato un primer forward con coda GC per amplificare i frammenti da separare mediante DGGE.

Le condizioni ottimali di PCR individuate per queste amplificazioni sono le seguenti:

- nested-PCR Eubatteri

E' stata condotta su 1µl di amplificato della precedente reazione, utilizzando 50 pm di ciascun primer.

Coppia *338(F)/534 (R)

denaturazione: 95°C 2 min

12 cicli 95° 30 sec - 62° C 30sec - 72°C 45 sec (con *touch down* da 62°C a 56°C, , scendendo di 0,5°c per ciclo).

15 cicli 95°C 30 sec 56°C 30 sec – 72° 45 sec

extension 72°C 7 min

Coppia *338(F)/926 (R)

denaturazione: 95°C 2 min

10 cicli 95° 30 sec - 62° C 30sec - 72°C 45 sec (con *touch down* da 56°C a 51°C, , scendendo di 0,5°c per ciclo).

25 cicli 95°C 30 sec 51°C 30 sec – 72° 45 sec

extension 72°C 7 min

- nested-PCR Archeobatteri

E' stata condotta su 1µl di amplificato della precedente reazione, utilizzando 50 pm di ciascun primer

Coppia *338(F)/534 (R) e *338(F)/958(R)

denaturazione 95°C 2min

30 cicli 95°C 30sec – 55°C 30 sec – 72°C 1 min

extension 72°C 10 min

In figura 5 viene mostrato un esempio dell’amplificazione ottenuta con nested-PCR utilizzando una delle coppie di *primers* riportate in tabella 2.

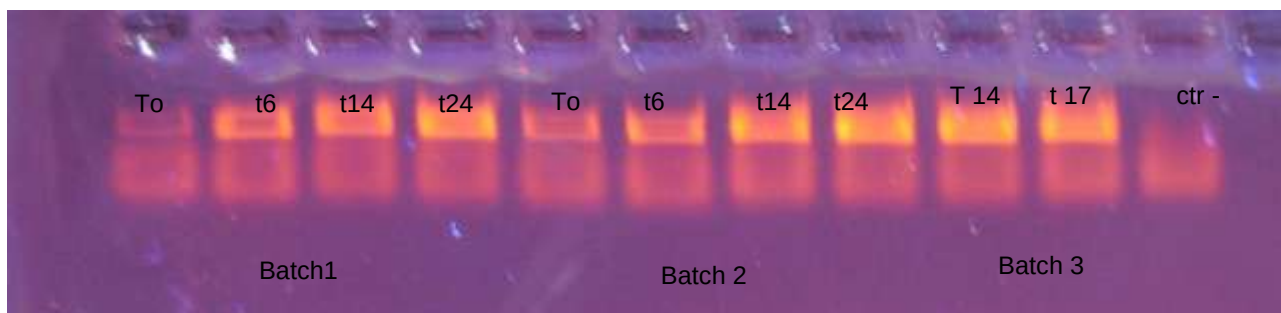


Figura 5. Elettroforesi su gel d’agarosio all’1,5% dei prodotti di amplificazione del frammento da 600bp ottenuto con la coppia di *primers* Arch340(F)/Arch958(R) da campioni di digestione prelevati a diversi tempi.

4. *Elettroforesi in gradiente di gel denaturante (DGGE)*

La *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE) si basa sul principio che ogni frammento amplificato, corrispondente ad una unità tassonomica, ha un suo punto specifico di denaturazione. Ad ogni banda che compare nel gel corrisponde pertanto una diversa unità funzionale. Il gel denaturante ha un gradiente che può essere molto variabile a seconda dei microrganismi in

questione ed è costituito da diverse concentrazioni di formammide e urea.

Si preparano due soluzioni a diversa concentrazione di urea-formammide, contenenti acrilammide-bisacrilammide. Le due soluzioni vengono miscelate con un apposito apparato che consente la creazione del gradiente desiderato.

L’elettroforesi viene effettuata a 60°C ad un voltaggio costante di 100V.

La quantità di campione caricato nel gel per ottenere un segnale consistente dovrebbe variare tra 5 e 10 ng/μl. L’apparato in cui avviene l’elettroforesi è una camera verticale D-Code (BioRad) a stretto controllo di temperatura.

Alla fine della corsa elettroforetica il gel è colorato con Gel-Red (0.5 mgml⁻¹), per circa 30 minuti e poi visualizzato ai raggi UV mediante l’apparato GelDoc (BioRad).

In relazione alle caratteristiche dei frammenti da separare devono essere messi a punto diversi parametri: la concentrazione di acrilammide, il gradiente denaturante all'interno del gel e il tempo di corsa.

Per separare i frammenti da 200 bp si sono individuate le seguenti condizioni ottimali:

acrilammide 8%

gradiente denaturante 35-60%

tempo di corsa 16 ore

In figura 6, a titolo di esempio, si riporta il risultato ottenuto per la separazione dei frammenti da 200 bp amplificati da campioni prelevati da una prova di digestione anaerobica di reflui suini condotta in batch a 55°C.

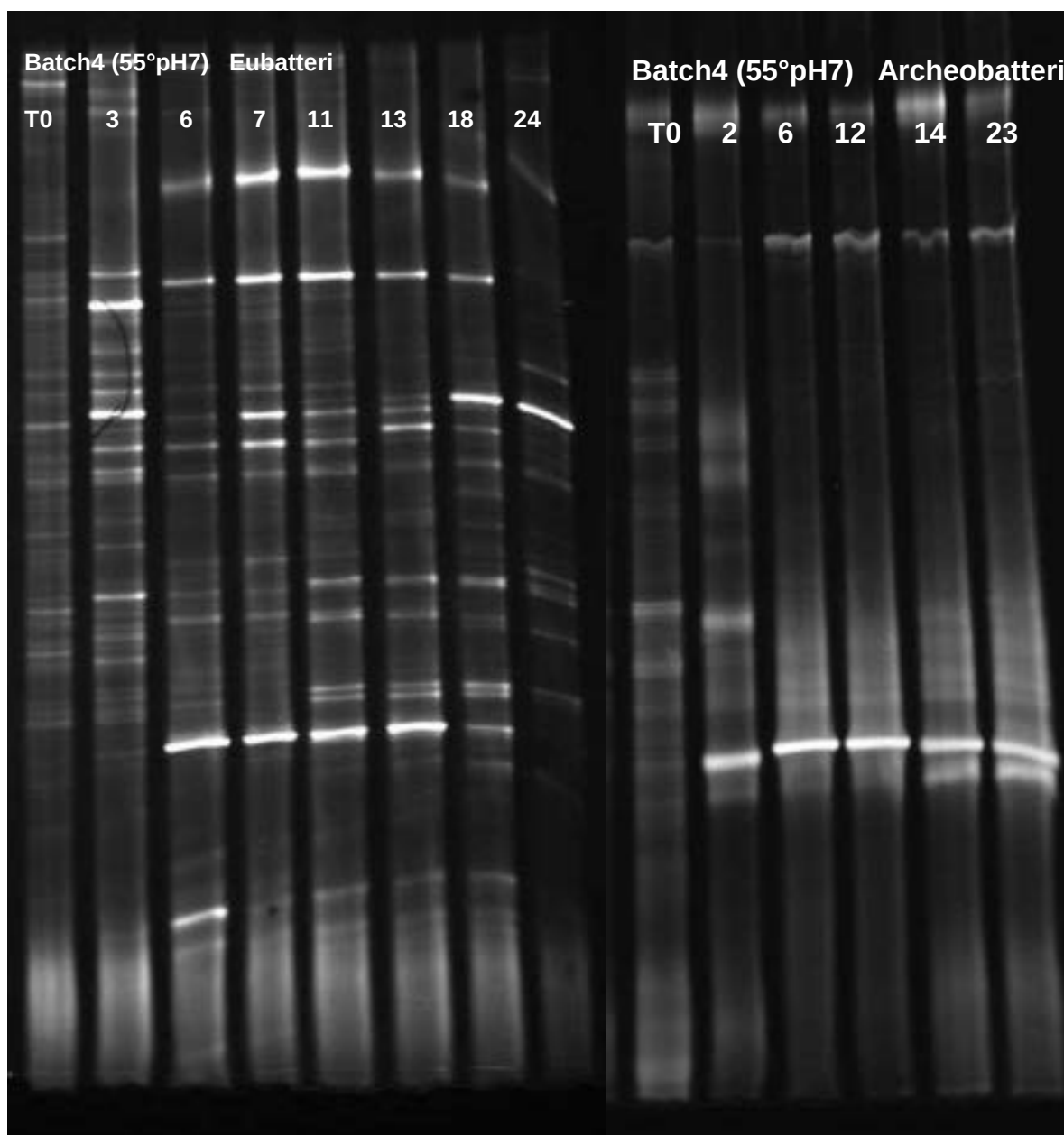


Fig.6 DGGE dei frammenti da 200 bp su gel con gradiente denaturante 35-60%. Per Eubatteri ed Archea prelevati a diversi giorni durante il processo di digestione anaerobica

Gli Eubatteri mostrano un numero elevato di bande che indica una maggiore diversità in specie rispetto agli Archeobatteri. Già all'inizio del processo di digestione (tempo zero) gli Eubatteri presentano un numero di bande superiore agli Archea e questa differenza si fa più marcata con il procedere dell'esperimento, perchè dopo 6 giorni tra gli Archea si osserva una sola specie (banda)

dominante, mentre si osserva che nella popolazione degli Eubatteri, nonostante l’instaurarsi di specie dominanti, viene mantenuto un discreto livello di biodiversità.

L’elaborazione statistica della distribuzione dei frammenti ottenuti sarà condotta, al termine degli esperimenti, mediante un software specifico, che permette di risolvere al meglio le diverse bande, consentendo di studiare la dinamica dei gruppi funzionali durante il processo di digestione.

Inoltre il successivo sequenziamento del DNA estratto dalle bande relativamente alle prove più significative permetterà la identificazione delle specie microbiche dominanti le varie fasi del processo di digestione anaerobica.

Il lavoro metodologico descritto renderà possibile eseguire in modo affidabile le analisi molecolari relative alle prove di digestione anaerobica che verranno condotte nelle diverse condizioni sperimentali e che daranno i migliori risultati rispetto ai prodotti desiderati.