



Ricerca di Sistema elettrico

Processi di digestione anaerobica di matrici non convenzionali e clean up biologico del biogas

Aliboni A., Corsaro N., De Luca E., Felici C., Fiocchetti F., Izzo G.,
Lembo G., Lona L., Massini G., Mazzurco Miritana V., Mentuccia L.,
Patriarca C., Rosa S., Sau S., Signorini A., Tuccini G.

PROCESSI DI DIGESTIONE ANAEROBICA DI MATRICI NON CONVENZIONALI E CLEAN UP BIOLOGICO DEL BIOGAS

Aliboni A., Corsaro N., De Luca E., Felici C., Fiocchetti F., Izzo G., Lembo G., Lona L., Massini G., Mazzurco Miritana V., Mentuccia L., Patriarca C., Rosa S. *, Sau S., Signorini A., Tuccini G.

Settembre 2014

Report Ricerca di Sistema Elettrico

Accordo di Programma Ministero dello Sviluppo Economico – ENEA

Piano Annuale di Realizzazione 2013

Area: Produzione di energia elettrica e protezione dell'ambiente

Progetto: Sviluppo di sistemi per la produzione di energia elettrica da biomasse e l'upgrading dei biocombustibili

Obiettivo: Sviluppo dei sistemi di produzione di biocombustibili

Responsabile del Progetto: Vito Pignatelli, ENEA

Indice

SOMMARIO.....	4
1 INTRODUZIONE	5
2 SPERIMENTAZIONE DELLA DIGESTIONE ANAEROBICA IN IMPIANTO PILOTA DOPPIO STADIO	6
2.1 L'INDUSTRIA CASEARIA E I SUOI EFFLUENTI	6
2.1.1 <i>Caratterizzazione del substrato</i>	8
2.2 DESCRIZIONE DELL'IMPIANTO	8
2.3 DESCRIZIONE DELLA SPERIMENTAZIONE	9
2.4 CRITICITÀ INCONTRATE.....	10
2.5 DETERMINAZIONE DEI TS E DEI TVS	10
2.6 DETERMINAZIONE DEL COD	11
2.7 METABOLITI SOLUBILI	11
2.8 ANALISI DEL BIOGAS	12
2.9 FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION (FISH)	12
2.9.1 <i>Stima dell'abbondanza batterica tramite conta diretta in epifluorescenza</i>	12
2.10 RISULTATI.....	13
2.10.1 <i>Configurazione M1 (monostadio alimentato con feed 5 g/L di VS)</i>	13
2.10.2 <i>Configurazione M2 (monostadio alimentato con feed 10 g/L di VS)</i>	14
2.10.3 <i>Configurazione B1 (bistadio alimentato con feed 5 g/L di VS)</i>	15
2.10.4 <i>Configurazione B2 (bistadio alimentato con feed 5 g/L di VS)</i>	17
2.10.5 <i>Configurazione B3 (bistadio alimentato con feed 10 g/L di VS)</i>	19
2.10.6 <i>Confronto tra i processi di produzione di metano in monostadio</i>	21
2.10.7 <i>Confronto tra i processi di produzione di metano in bistadio</i>	22
2.10.8 <i>Confronto monostadio e bistadio per la produzione di metano (5 g/L di VS)</i>	23
2.10.9 <i>Confronto monostadio e bistadio per la produzione di metano (10 g/L di VS)</i>	26
2.10.10 <i>Confronto dell'efficienza energetica dei processi monostadio e bistadio</i>	28
3 STUDIO DI INOCULI CHE PROMUOVONO LA SINTROFIA BATTERICA NEI PROCESSI DI DIGESTIONE ANAEROBICA. 30	
3.1 SPERIMENTAZIONE	31
3.2 RISULTATI.....	33
3.2.1 <i>Produzione di biogas</i>	33
3.2.2 <i>Analisi delle comunità con tecnica FISH</i>	35
3.2.3 <i>Analisi degli inoculi (t_0)</i>	37
3.2.4 <i>Analisi delle comunità (t_{36})</i>	37
3.3 DISCUSSIONE	38
4 USO DI MICROALGHE PER L'ALIMENTAZIONE DI IMPIANTI A BIOGAS	39
4.1 PROCEDURA SPERIMENTALE	39
4.2 RISULTATI.....	40
4.3 DISCUSSIONE	41
5 STUDIO E SPERIMENTAZIONE DI METODI BIOLOGICI PER LA PURIFICAZIONE DEL BIOGAS	42
5.1 DISCUSSIONE	44
6 CONCLUSIONI.....	45
7 RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	46

Sommario

Il laboratorio UTRINN-Bio ha sviluppato e brevettato (n° 777-21/03/2013) una nuova tecnologia che è idonea a trattare efficacemente gli scarti organici in quanto comprende nel processo di Digestione Anaerobica (DA) un reattore biologico separato, denominato di seguito primo stadio, in cui avviene la fermentazione (idrolisi ed acidogenesi) dei materiali organici di qualsiasi provenienza, evitando così l'uso di insilati che non sono altro che zuccheri prefermentati.

Pertanto, in questo rapporto si presentano i risultati relativi a:

- 1) studi interdisciplinari di ottimizzazione della DA in un impianto pilota alimentato al 100% da scotta, scarto prodotto dalle industrie casearie;
- 2) trattamento di biomasse lignocellulosiche con funghi anaerobi (in collaborazione con l'Università della Tuscia);
- 3) trattamento idrolitico della chitina al fine di renderla idonea ad alimentare impianti di DA (in collaborazione con l'Università della Tuscia);
- 4) studio della convenienza economica dell'uso di microalghe per l'alimentazione di impianti a biogas;
- 5) esperimenti in continuo per il *clean up* del biogas con un filtro biologico costituito da batteri anaerobi fotosintetici.

I risultati ottenuti possono così essere riassunti:

- Si è dimostrata l'efficacia di un impianto bistadio per la digestione anaerobica della scotta riducendo il tempo di ritenzione della fase metanogenica a 7,5 giorni con una prefermentazione di 12-24 ore.
- Le indagini microbiologiche condotte con tecnica FISH (Fluorescence In Situ Hybridization – Microscopia in Fluorescenza) hanno dimostrato la maggiore efficacia quantitativa e qualitativa della produzione di metano in presenza di comunità microbiche strutturate in granuli, per la stretta cooperazione tra Eubatteri ed Archea.
- La produzione di metano da un substrato lignocellulosico (paglia) aumenta circa del 30% in presenza di funghi anaerobi e batteri idrolitici.
- I dati ottenuti trattando la chitina con batteri idrolitici ed uno *starter (corn steep liquor)* delle fermentazioni indicano che da questo scarto dell'industria ittica è possibile produrre biogas con concentrazione di metano anche del 70%.
- Le prove di metanazione svolte con cinque differenti specie di diatomee marine dimostrano un alto potenziale per la produzione di metano che però trova ancora ostacolo pratico nel bilancio economico sfavorevole tra realizzazione e gestione dell'impianto di produzione e resa della biomassa.
- L'abbattimento dell' H_2S in continuo in un fotobioreattore da 3 litri alimentato da biogas prodotto dall'impianto pilota bistadio ha raggiunto un'efficienza del 95%.

Inoltre, sono state ulteriormente sviluppate delle tecniche analitiche e microbiologiche che permettono di espandere la capacità di indagine finalizzate al miglioramento delle tecnologie per la DA.

In particolare, sono stati messi a punto i seguenti protocolli:

1. Isolamento e sviluppo di funghi anaerobi per potenziare l'idrolisi delle biomasse lignocellulosiche.
2. Tecnica FISH per lo studio dei cambiamenti in composizione, struttura e funzione delle comunità batteriche attive nella DA.
3. Determinazione analitica dei diversi composti dello zolfo presenti in soluzione (solfuri, zolfo elementare, solfati).

1 Introduzione

Le attività di ricerca presentate in questo rapporto sono in linea con le strategie europee sul trattamento delle biomasse di scarto (Waste 7-Call Climate) e con la nuova proposta di Direttiva Europea (17/10/2012) che promuove nella produzione di biocombustibili, l'uso di scarti e sottoprodotti agroalimentari.

Questo nuovo indirizzo rende inidonea la più diffusa tecnologia d'impianti a biogas che attualmente hanno necessità di essere alimentati prevalentemente con materiali organici prefermentati, soprattutto polisaccaridi (silomais).

Il laboratorio Utrinn-Bio ha sviluppato e brevettato (n° 777-21/03/2013) una nuova tecnologia di impianto a due fasi, che è idonea a trattare efficacemente gli scarti organici in quanto comprende nel processo di DA un reattore biologico separato, denominato di seguito primo stadio in cui avviene la fermentazione (idrolisi ed acidogenesi) dei materiali organici di qualsiasi provenienza, evitando così l'uso di cereali prefermentati.

Pertanto in questo rapporto si presentano risultati:

- 1) di studi interdisciplinari di ottimizzazione della DA in un impianto pilota bistadio alimentato al 100% da scotta che è un scarto delle industrie casearie;
- 2) del trattamento di biomasse lignocellulosiche con funghi anaerobici (in collaborazione con l'Università della Tuscia) a supporto della fase idrolitica,
- 3) del trattamento idrolitico, mediante batteri, della chitina per trasformarla in una biomassa idonea ad alimentare impianti di DA (in collaborazione con l'Università della Tuscia),
- 4) di uno studio della convenienza economica dell'uso di microalghe per l'alimentazione di impianti a biogas,
- 5) di esperimenti in continuo per il *clean up* del biogas con un filtro biologico di batteri anaerobi fotosintetici.

2 Sperimentazione della digestione anaerobica in impianto pilota doppio stadio

2.1 *L'industria casearia e i suoi effluenti*

L'industria lattiero-casearia trasforma il latte grezzo in latte pastorizzato e sterile, burro, crema, latte fermentati, condensati e concentrati e formaggi.

Circa il 60% del latte prodotto in Italia viene destinato alla trasformazione in prodotti caseari. Questo comparto produttivo è chiaramente differenziato tra media e grande industria da un lato e caseifici cooperativi a dimensione artigianale e residue piccole unità annesse alle aziende agrarie dall'altro.

La maggior parte delle medie e grandi industrie operano nel comparto del latte alimentare e in quello della produzione dei formaggi freschi di largo consumo, mentre le imprese di piccole dimensioni e le aziende cooperative sono prevalentemente dedite alla produzione di formaggi duri o semiduri, tipici e di qualità.

L'industria casearia utilizza una grande quantità di acqua, generando un enorme quantità di reflui, per il rispetto dei requisiti di igiene e pulizia: le acque di scarico sono continuamente prodotte a partire da acque dolci utilizzate per il lavaggio delle apparecchiature e delle linee ai cambi di produzione, nelle fasi di start up e di chiusura durante la pastorizzazione, e per il lavaggio del prodotto finito. Il carico organico di queste acque è molto variabile; i valori di COD possono variare tra 500 e 4000 mg/L.

Un discorso a parte deve essere fatto per quanto concerne gli effluenti generati dal processo di produzione dei formaggi. Per produrre il formaggio, il latte viene versato in una caldaia aperta, dove è riscaldato a 35 – 38 °C (temperatura dello stomaco del vitello); specie se il latte è pastorizzato si aggiungono i batteri lattici ed eventualmente altri tipi di fermenti (e/o le muffe per i formaggi erborinati) sotto forma di "starter", innesto naturale o innesto selezionato, che hanno il compito di acidificare il latte attraverso la fermentazione lattica; di seguito, viene aggiunto il caglio che è in grado di scindere in molti frammenti la caseina presente nel latte, e di far quindi coagulare le particelle della massa grassa non più solubile nell'acqua, che galleggiano formando una massa gelatinosa e fragile detta cagliata o giuncata. Dalla cagliata si ottengono i vari tipi di formaggi: a seconda che la cagliata sia rotta in frammenti grandi, medi o piccoli si producono formaggi freschi, semiduri o duri. Tutto ciò che non è cagliata è denominato siero di latte. Circa il 90% del latte utilizzato per la produzione dei formaggi è convertito in questo refluo.

Quest'ultimo dato dà già un'idea dei quantitativi enormi di siero che vengono prodotti. Una stima quantitativa è stata proposta dall'ANPA (Agenzia Nazionale per la Protezione dell'Ambiente, 2001), per quanto concerne il territorio nazionale, correlando la quantità di questo effluente alla quantità dei prodotti finali realizzati (formaggi). È stato determinato un rapporto siero/formaggi di 5,95 t/t. Il quantitativo totale di siero ottenuto, considerando una quantità di prodotto principale pari a 1.023.811 t per anno, è stato stimato quindi in circa 6.092.000 t per anno. Il carico organico di questo effluente è elevatissimo; il valore di COD è compreso tra 60 e 100 g/L; le concentrazioni di lattosio, proteine e lipidi sono comprese rispettivamente tra 40–60 g/L, 3–8 g/L e 2–9 g/L.

Questi dati fanno comprendere come sia fondamentale, per l'economia dell'industria casearia, considerare il più possibile il siero come un prodotto secondario e non come un refluo da smaltire. L'ANPA nel 2001 stimava che 2 milioni di tonnellate annue di siero fossero destinate alla produzione di lattosio e siero in polvere, 1 milione e 700.000 t annue destinate alla zootecnia come alimento per i suini, altri 2 milioni di t annue destinate allo smaltimento e 362.000 t annue destinate alla produzione di ricotta. La ricotta viene ottenuta attraverso la coagulazione delle proteine presenti nel siero, denominate sieroproteine; questo processo avviene ad un'alta temperatura (80–90 °C): il siero viene quindi letteralmente ri-cotto. Le proteine interessate sono in particolare albumina e globulina. La tecnologia più antica consisteva solamente nel riscaldare il siero aspettandone la denaturazione e il conseguente affioramento della ricotta in superficie. Nei secoli si sono via via sviluppate tecnologie che, sfruttando la reazione di saturazione salina, ottenevano un migliore recupero ed una più alta qualità. Tali tecnologie sono quelle riconducibili all'impiego di acque sorgive e/o marine ieri, ed oggi sali per ricotta. Spesso vengono anche aggiunte soluzioni acide (di acido citrico, tartarico o cloridrico) per catalizzare la coagulazione. Il liquido che rimane dopo la produzione della ricotta è denominato scotta; quest'ultimo può essere considerato a ragion veduta l'effluente finale di un'industria casearia. Sempre l'ANPA, dati un fattore di produzione scotta/ricotta pari a 19,06 t/t e una produzione annua di 18.100 t di ricotta, stima

che la scotta prodotta in Italia annualmente sia di 345.000 t. L'ISTAT (Istituto nazionale di statistica) invece ci fornisce dati più recenti (2011), stimando in 11,7 Mt il quantitativo di latte trattato in un anno dalle industrie lattiero casearie; di queste 3,1 Mt sono utilizzate per produrre latte alimentare, le restanti 8,6 per produrre circa 1,3 Mt di formaggi e burro. Non viene data la stima totale di siero prodotto che però può essere calcolata moltiplicando per 5,95 la quantità di formaggio prodotto (oppure considerando che il 90% di latte utilizzato per la produzione di formaggi diventa siero): il risultato è di 7,74 Mt di siero prodotto all'anno. L'ISTAT ci dà invece una stima precisa del quantitativo di siero di latte che viene utilizzato per la produzione della ricotta: 0,80 Mt all'anno. Considerando che più o meno il 90% di siero nella produzione della ricotta diventa scotta, la produzione annua di quest'ultima sarebbe di 0,72 Mt annue, quasi il doppio rispetto a quello che stimava l'ANPA. Non si può altro che affidarsi ai dati dell'ISTAT che sono di 10 anni successivi a quelli dell'ANPA.



Figura 1. Diagram block del processo dell'industria casearia in Italia

In Figura 1 è rappresentato il "diagram block" del processo dell'industria casearia in Italia, con le portate riferite ai dati ISTAT.

Dal punto di vista chimico, la scotta ha, rispetto al siero, un contenuto più basso di proteine e lipidi, rispettivamente 0,5–1 g/L e 0,3–0,4 g/L. La concentrazione di lattosio è invece praticamente identica a quella del siero (intorno ai 50 g/L). Ne risulta un valore di COD leggermente più basso, compreso tra 50 e 80 g/L, ma comunque elevatissimo.

La gestione della scotta e in generale dei reflui derivanti dalla lavorazione del latte, rappresenta un notevole problema ambientale, considerando le grandi quantità prodotte e l'elevato indice di inquinamento. Attualmente i reflui sono destinati in gran parte al settore zootecnico; questo impiego non risolve certo il problema dello smaltimento, anzi lo acuisce. Infatti, tale uso costituisce semplicemente la traslazione di uno stesso problema, dal reflu caseario alle deiezioni, principalmente suine. È noto che il siero, oltre a produrre patologie intestinali ed emorragie per gli animali, specialmente nei suini, genera una produzione di deiezioni elevata e più difficilmente trattabile sul piano della depurazione. Inoltre, a causa della difficoltà di conservazione e di trasporto dei residui caseari, che deve essere effettuato nell'arco di poche ore dalla produzione per evitarne la fermentazione che ne comprometterebbe l'utilizzo, l'impiego diretto per l'alimentazione zootecnica è conveniente unicamente per quegli allevamenti vicini ai caseifici o parte di una azienda agro-zootecnica.

L'elevato carico organico della scotta associato ad un rapporto BOD5/COD > 0,5 consentono di poter pensare ad una degradazione biologica di questo reflu. Una piccola percentuale di scotta viene smaltita in grandi impianti di biogas di vecchia generazione, nei quali vengono digeriti differenti tipologie di substrato; in questo caso le industrie casearie devono però sostenere un costo di circa 5–10 Euro per m³ di scotta prodotta, legato soprattutto al trasporto del reflu. Per le aziende casearie la possibilità di smaltire autonomamente i reflui prodotti, generando biogas, rappresenterebbe un notevole risparmio associato, inoltre, alla possibilità di utilizzare l'energia elettrica e il calore prodotto all'interno dell'azienda stessa. Questo concetto può essere spiegato in maniera più esaustiva utilizzando il concetto di bioraffineria. Secondo la definizione adottata dall'Agenzia Internazionale dell'Energia (IEA Bioenergy, task 42, 2008) con questo termine si intende la trasformazione sostenibile di biomasse in uno spettro di prodotti per il mercato e l'energia.

Le Bioraffinerie sono state inizialmente suddivise in energy-driven (obiettivo principale: produzione di biocarburanti/energia) e product-driven (obiettivo principale: produzione di alimenti-mangimi-chimica-materiali). Nello sviluppo successivo del concetto di bioraffineria il prodotto finale di un processo non viene

considerato uno scarto, bensì fonte o punto di partenza per un successivo processo che porterà alla trasformazione in ulteriori prodotti a più alto valore aggiunto, in una produzione integrata di biocarburanti, bioenergia, alimenti, mangimi, biomateriali.

In questo contesto le aziende lattiero casearie, come tutte le attività economiche di vecchia concezione, possono essere considerate delle bioraffinerie product-driven. L'utilizzo dei residui della lavorazione del latte per la produzione di bioenergia (biogas) consentirebbe la trasformazione delle aziende in bioraffinerie che sono al contempo *energy* e *product driven*.

2.1.1 Caratterizzazione del substrato

La scotta utilizzata come substrato in questa attività di ricerca è stata fornita dall'azienda Formaggi Boccea s.r.l. Roma. La scotta che arriva dal caseificio è ad una temperatura intorno ai 60 °C; viene quindi lasciata raffreddare fino a raggiungere la temperatura ambiente, travasata in barattoli con una capacità di 2 L e stoccata a -20 °C per evitare la degradazione e l'acidificazione. Il rifornimento di scotta è stato effettuato ogni 20-25 giorni. Per ogni partita in arrivo è stata effettuata la misurazione del pH e sono stati determinati il contenuto in carboidrati ed acidi organici tramite l'HPLC, è stata determinata la concentrazione di Solidi Totali (TS), di quelli Volatili totali (TVS o VS nel testo), il COD (Chemical Oxygen Demand) e la concentrazione delle proteine. In tabella 1 vengono riportati i range delle principali caratteristiche chimico-fisiche del refluo utilizzato. Il pH è compreso tra 5,9 e 6,2. La concentrazione di lattosio è compresa tra 46 e 55 g/L.

Tabella 1. Principali caratteristiche chimico-fisiche della scotta utilizzata

Parametri	Range
pH	5,90-6,20
Lattosio(g/L)	46-55
TVS (g/L)	45-54
COD totale(g/L)	74-85
COD solubile(g/L)	62-74
Proteine (g/L)	0,45-0,90

La concentrazione di VS è compresa tra 45 e 54 g/L. La concentrazione di COD solubile è compresa tra 62 e 74 g/L. I dati di letteratura sul siero di latte ci hanno fatto propendere per utilizzare come substrato scotta diluita. La scotta tale e quale ha gli stessi problemi del siero di latte: è caratterizzata da una bassa alcalinità (circa 50 meq L⁻¹ come bicarbonato) che può comportare, insieme all'elevato contenuto organico, una eccessiva acidificazione. D'altronde pensando ad un impianto in scala industriale adatto per un caseificio la diluizione non è assolutamente un problema, anzi quasi una necessità. Oltre ai reflui con elevato carico organico (siero e scotta), vengono prodotti quantitativi ingenti di acque di scarico di lavaggio degli ambienti e delle apparecchiature (fino a 5 L di acqua per litro di latte trattato), contenenti un carico organico molto più basso, ma che devono essere comunque trattati. La soluzione di diluire la scotta con le acque di scarico è una soluzione su cui vale la pena soffermarsi. Nelle nostre sperimentazioni la scotta è stata diluita con acqua.

2.2 Descrizione dell'impianto

L'intera fase di sperimentazione è avvenuta utilizzando un impianto di digestione anaerobica in scala di laboratorio costituito da:

- Un carrello di acciaio 1,2 x 0,6 x 0,9 metri è stato adattato per ospitare in maniera compatta tutti i componenti necessari per l'impianto.
- Un reattore CSTR, Completely Stirred Tank Reactor, in vetro, di volume di lavoro di 3,4 litri, detto I stadio, in cui avviene il processo di idrolisi/acidogenesi.

Il reattore, nella parte superiore, è dotato di quattro differenti vie di comunicazione con l'esterno: una per l'alimentazione, due, pescanti in fondo, per l'uscita dell'effluente e per eventuali prelievi, la quarta per l'uscita del biogas prodotto. Il reattore è posto sopra una piastra riscaldante, l'agitazione avviene tramite magnete rotante. La temperatura viene mantenuta a 37 °C tramite un controller di temperatura IKATRON RTS-D4 fuzzy. Il reattore è stato mantenuto in leggera depressione tramite una pompa da vuoto.

- Un reattore CSTR tronco conico in acciaio inox con un volume di lavoro di 51 litri detto Il stadio e destinato alla produzione di metano e dotato di un'uscita inferiore utilizzata per l'alimentazione, due uscite superiori utilizzate per l'uscita del biogas prodotto e per eventuali prelievi. La temperatura è controllata con una termocoppia di processo e una termocoppia di sicurezza. È inoltre dotato di un misuratore di pressione a zero centrale, di un livellostato, di una colonna esterna indicatore di livello, di un'elettrovalvola di scarico che garantisce l'uscita del digestato per troppo pieno. Un recipiente di decantazione è posto a monte dell'elettrovalvola per evitare che l'orifizio di quest'ultima venga otturato da residui solidi presenti nel digestato. L'agitazione avviene tramite un ricircolo interno veloce effettuato con una pompa peristaltica controllata ad inverter.
- Un serbatoio in PE (25 L) refrigerato e coibentato per lo stoccaggio del substrato.
- Un termo-criostato per la refrigerazione attraverso una serpentina immersa nell'alimentazione.
- Essiccatori a gel di silice per la disidratazione dei gas prodotti.
- Due flussimetri digitali per il controllo e la misura, in tempo reale, delle portate di biogas prodotte entrambi i reattori.
- Pompe peristaltiche per la movimentazione del substrato, a flusso regolabile.

2.3 Descrizione della sperimentazione

Il piano sperimentale, in questo anno di attività, è stato impostato con la finalità di ridurre i tempi di ritenzione idraulica del II stadio (HRT=7,5 giorni), rispetto alla passata sperimentazione (HRT= circa 15 giorni) tramite l'utilizzo di un ricircolo in discontinuo del digestato stesso, con una portata (L/d) uguale a quella del substrato, la scotta. La possibilità di ridurre i tempi di ritenzione e di dimezzare il carico organico entrante assolverebbe al duplice obiettivo di diminuire il volume del reattore (Il stadio) a parità di energia prodotta, con un conseguente abbassamento dei costi per le piccole aziende del settore lattiero-caseario, e di poter operare a più bassi carichi organici senza una eccessiva diluizione del substrato. Inoltre è bene ricordare che nel ciclo operativo dei caseifici vengono prodotte acque di scarico di lavaggio degli ambienti e delle apparecchiature (fino a 5 L di acqua per litro di latte trattato), contenenti un carico organico molto più basso, ma che devono essere comunque convogliate in impianti di trattamento.

L'intera procedura sperimentale ha previsto la messa in opera di cinque distinte serie sperimentali.

In tutte e cinque le fasi i parametri operativi lasciati invariati sono stati:

- Temperatura di 37 °C
- HRT del reattore a metano 7,5 giorni, sia per la configurazione in monostadio che per il II stadio della configurazione a due fasi.
- pH del primo stadio tra 5,5 e 5,8 e tra 6,5 e 6,8 nel II stadio

La sperimentazione è stata, quindi, effettuata come descritto:

Serie 1 - Reattore CSTR Monostadio, alimentato con scotta ad una concentrazione di 5 g/L di TVS, corrispondente ad un OLR di $0,67 \text{ g}_{\text{VS}}/\text{L}_{\text{reattore}} \text{ d}^{-1}$. La scotta con un carico organico di 10 g/L di VS al momento dell'ingresso nel reattore era miscelato in un rapporto 1:2 con il digestato proveniente dal reattore. Ai fini del calcolo del carico organico il valore di tale digestato reimpresso viene considerato nullo. Questa condizione sperimentale prenderà il nome di M1.

Serie 2 – Reattore CSTR Monostadio alimentato con scotta ad una concentrazione di 10 g/L di VS, corrispondente ad un OLR di $1,33 \text{ g}_{\text{VS}}/\text{L}_{\text{reattore}} \text{ d}^{-1}$. Anche in questa condizione vi era una diluizione della scotta entrante (20 g/L di VS) col digestato come nella serie precedente. Questa condizione sperimentale prenderà il nome di M2.

Serie 3 – Reattore CSTR Bistadio in cui il I stadio veniva alimentato con una concentrazione di scotta di 5 g_{VS}/L di VS, corrispondente ad un OLR di $10 \text{ g}_{\text{VS}}/\text{L}_{\text{reattore}} \text{ d}^{-1}$. In questa serie sperimentale il ricircolo è stato spostato sul primo stadio con l'intento di mantenere il pH stabile evitando l'aggiunta di sistemi tampone. Per mantenere invariato sia il carico organico rispetto al monostadio M1 (5 g/L di VS) che l'HRT del II stadio, l'HRT del primo stadio era impostato a 12 ore. Questa condizione sperimentale prenderà il nome di B1.

Serie 4 – Reattore CSTR Bistadio in cui il primo stadio veniva alimentato con scotta ad una concentrazione di 10 g/L di VS, corrispondente ad un OLR di $10 \text{ g}_{\text{VS}}/\text{L}_{\text{reattore}} \text{ d}^{-1}$. Differentemente dalla serie sperimentale precedente, qui il ricircolo veniva effettuato al II stadio, come descritto nella sperimentazione in monostadio, diluendo l'effluente del primo, pertanto il secondo stadio veniva comunque alimentato con un carico di 5 g/L di VS. L'HRT del primo stadio veniva impostata a 24 ore. In questo caso per mantenere stabile il pH ed evitare l'acidificazione dovuta all'aumento dei VFA nel I stadio, la scotta veniva diluita con tampone fosfato 0,2 M. Questa condizione sperimentale prenderà il nome di B2.

Serie 5 – Reattore CSTR Bistadio in cui il primo stadio veniva alimentato con scotta ad una concentrazione di 20 g/L di VS, corrispondente ad un OLR di $20 \text{ g}_{\text{VS}}/\text{L}_{\text{reattore}} \text{ d}^{-1}$. Con il raddoppio del carico organico utilizzato è stato necessario duplicare il potere tamponante del tampone fosfato utilizzato (0,4 M). Nel II stadio veniva mantenuto il ricircolo come nella serie sperimentale precedente, il carico organico entrante risultava essere di 10 g/L di VS. Questa condizione sperimentale prenderà il nome di B3.

Il monitoraggio temporale, effettuato per diversi parametri di processo, era il seguente:

- I flussi in uscita da entrambi i reattori avveniva in tempo reale tramite l'utilizzo di due flussimetri digitali, con rilevamento del dato ogni 10 minuti. Il sistema era anche dotato di un counter che misurava la quantità di biogas totale prodotta nel tempo.
- Analisi della composizione volumetrica percentuale del biogas nei costituenti principali quali CH_4 , H_2 , CO_2 , O_2 , N_2 . Le misurazioni avvenivano ogni ora tramite un gascromatografo posto in linea e equipaggiato con un sistema di aspirazione dei gas prodotti che consente l'analisi in continuo.
- Le analisi della concentrazione degli acidi organici volatili, dell'acido lattico, alcoli e zuccheri disciolti negli effluenti venivano effettuati giornalmente alla stessa ora, in entrambi i reattori.
- Le analisi dei VS e del COD venivano effettuate 2 volte la settimana.

2.4 Criticità incontrate

Il primo stadio è stato a tutti gli effetti il "collo di bottiglia" della sperimentazione.

La difficoltà principale è stata quella di mantenere le condizioni chimico-fisiche all'interno del reattore stabili e idonee per le comunità di idrogeno produttori, in particolare il pH. Il problema della stabilità del pH è stato parzialmente risolto individuando la concentrazione adatta di tampone.

Un altro problema incontrato che ha causato un forte abbassamento della produzione di idrogeno fino alla completa interruzione del processo, è stata l'elevata pressione parziale del gas stesso che porta alla produzione di acidi più ridotti dell'acido acetico, come per esempio l'acido lattico, bloccando così l'attività dei batteri fermentanti. Questo problema è stato attenuato applicando a valle del I stadio, subito dopo l'uscita del biogas, una pompa da vuoto, grazie alla quale la pressione all'interno del reattore risultava essere circa 0,9 atm il che permetteva un'immediata aspirazione del biogas prodotto e un mantenimento della pressione parziale di idrogeno più bassa. Ulteriori problemi, prevalentemente di natura tecnica, sono stati incontrati durante l'intero periodo di sperimentazione.

I lipidi, contenuti nella scotta, formavano lungo i tubi di scorrimento dell'alimentazione e degli effluenti, dei residui che modificavano i rispettivi flussi e in alcuni casi bloccavano totalmente il funzionamento delle pompe. Ciò è accaduto spesso per il I stadio, con svuotamenti o riempimenti che modificavano il volume di lavoro del reattore. Quindi, due o tre giorni alla settimana veniva effettuata la manutenzione dei tubi e dei raccordi. Giornalmente veniva anche effettuato il controllo della stabilità dei flussi impostati.

Tuttavia la difficoltà del monitoraggio di un processo in continuo è una problematica insita nel tipo di sperimentazione, avvalorato sia da una più ampia letteratura su sperimentazioni in batch sia da quella effettuata in semi-continuo.

2.5 Determinazione dei TS e dei TVS

I TS sono i solidi totali cioè il contenuto in sostanza secca di un campione, determinato per essiccamento in stufa a 105 °C per 48 ore. I TVS sono i solidi volatili totali, cioè la frazione di sostanza secca che risulta

volatilizzata per combustione a 550 °C per 24 ore. La differenza tra TS e TVS rappresenta la frazione di inerte costituita per lo più da composti inorganici.

2.6 Determinazione del COD

Il COD rappresenta la misura dell'ossigeno necessario ad ossidare chimicamente le sostanze sia organiche che inorganiche presenti in un campione, permettendo una valutazione del carbonio organico totale. Il metodo di determinazione del COD prevede l'ossidazione sia delle sostanze organiche biodegradabili, sia delle sostanze refrattarie all'ossidazione biologica. Esistono tuttavia alcune sostanze organiche come benzene, toluene, piridina che non sono ossidate ed altre come certi alcoli, amminoacidi, che sono ossidati solo parzialmente. Il COD non fornisce inoltre alcuna indicazione sulla domanda di ossigeno dovuta all'ammoniaca libera e all'azoto legato alla sostanza organica (azoto organico).

Il COD è determinato mediante il micro-metodo colorimetrico di Henken. Il COD esprime la quantità equivalente di ossigeno, espressa in mg/L o g/g di sostanza in esame, necessaria ad ossidare chimicamente le sostanze organiche ed inorganiche presenti in un campione. L'ossidazione viene condotta mediante un forte ossidante ($K_2Cr_2O_7$) a caldo, in ambiente acido (H_2SO_4) ed in presenza di un catalizzatore di ossidazione (Ag_2SO_4). Le sostanze organiche presenti nel campione sono ossidate a CO_2 e H_2O : il Cr^{3+} , proveniente dalla riduzione del $Cr_2O_7^{2-}$, viene determinato spettrofotometricamente.

Si esegue la retta di taratura utilizzando, come standard primario, una soluzione 2000 mg/L di ftalato acido di potassio, effettuando le letture dell'assorbanza allo spettrofotometro a 623 nm.

I campioni solidi essiccati e macinati, dopo averne pesato una quantità nota ($1,5 \pm 2,5$ mg), sono posti nella provetta di digestione, dove sono addizionati 2 mL di H_2O e 2 mL di soluzione di reazione.

La provetta tappata è posta nel termoreattore per 2 ore a 150 °C. Dopo 10 minuti dalla rimozione dal termoreattore la provetta si agita e si lascia, quindi, raffreddare a temperatura ambiente (circa 30 minuti). Trasferita la soluzione in una cuvetta in polistirene, si legge l'assorbanza allo spettrofotometro.

Per i campioni liquidi, invece, si mette direttamente una quantità di 2 mL nella provetta di digestione, dove sono addizionati di 2 mL di soluzione di reazione. Si segue quindi la procedura come per i campioni solidi.

La soluzione di reazione è preparata disciogliendo 6,129 g di $K_2Cr_2O_7$ (0,25 N), dopo essiccazione a 105 °C per 2 ore, in 60 mL di H_2O deionizzata e portando a volume, in un pallone tarato da 500 mL, con H_2SO_4 concentrato, contenete 10 g/L di Ag_2SO_4 . Per campioni contenenti Cl^- (≤ 2500 mg/L) alla soluzione ossidante è aggiunto del $HgSO_4$ (25 g/L).

2.7 Metaboliti solubili

I prodotti metabolici della digestione, Acidi Grassi Volatili, (Acido acetico, Acido butirrico, Acido propionico, Acido lattico, Acido succinico, Acido citrico, Acido formico, Acido isobutirrico, Acido valerico e Acido isovalerico), Alcoli, (Etanolo, 1,3 Propandiolo,), ed alcuni zuccheri (Glucosio, Galattosio, Lattosio) sono stati analizzati mediante HPLC (high performance liquid chromatograph) Thermo Spectrasystem P4000, equipaggiato con rilevatore UV ($\lambda = 210$ nm) e rilevatore a Indice di Rifrazione, utilizzando il metodo di analisi isocratica a 75 °C con Colonna Rezex ROA Organic Acid H+ (8%) della Phenomenex, 300 x 7,8 mm, con particelle da 8 μm , precolumna con cartucce Carbo-H (Phenomenex); fase mobile H_2SO_4 5 mN (flusso: 0,6 mL/min).

I campioni liquidi sono stati diluiti 1:10 in H_2SO_4 5mN. Il campione tal quale è stato prima centrifugato a 13000 rpm per 10 minuti e dopo essere stato diluito (1:10), viene di nuovo centrifugato a 13000 rpm per 10 minuti prima dell'iniezione in HPLC.

2.8 Analisi del Biogas

La percentuale di CH₄, H₂, CO₂ presente nel biogas prodotto nei reattori è stata analizzata tramite Micro Gas cromatografo della Varian (GC 4900) in linea per il monitoraggio delle composizioni del biogas prodotto. È in grado di rilevare H₂, CH₄, CO₂, ed anche, se presenti, O₂, N₂ e CO. L'argon è utilizzato come gas carrier.

Rispetto ai comuni GC da banco, questo strumento non presenta un sistema di vaporizzazione dei campioni iniettati, per cui può analizzare solo campioni allo stato gassoso. È dotato di due colonne da 10 m, una MS 5A dove la fase stazionaria è costituita da setacci molecolari. In questo modo è possibile separare i gas permanenti a basso peso molecolare, come, nel caso specifico, idrogeno, ossigeno, azoto e metano. La seconda colonna è una poraplot U, dove la fase stazionaria è basata su di un polimero poroso (divinil benzene) che non separa idrogeno, ossigeno ed azoto fra di loro, ma risolve ottimamente la CO₂ dagli altri gas presenti. Il GC è equipaggiato con un sistema di aspirazione dei gas prodotti che consente l'analisi in continuo delle reazioni.

2.9 Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)

In questo contesto si è lavorato alla messa a punto della tecnica FISH (Fluorescence In Situ Hybridization – Microscopia in Fluorescenza), che consente di condurre indagini filogenetiche sulla composizione e struttura delle comunità microbiche sia in termini qualitativi che quantitativi, senza ricorrere a tecniche colturali, particolarmente difficoltose soprattutto per i batteri metanogeni. Infatti utilizzando specifiche sonde oligonucleotidiche a rRNA, marcate con fluorocromi e composte da sequenze di acido nucleico complementari per specifici taxa batterici, è possibile visualizzare selettivamente in microscopia i singoli microorganismi e trarre informazioni sulle dinamiche delle comunità microbiche in risposta ai parametri sperimentali. La FISH costituisce una metodologia particolarmente efficace dal momento che la quantità di rRNA riflette le varie fasi di sviluppo dei microrganismi e le nostre prime prove hanno dimostrato la possibilità di applicare la tecnica per rintracciare all'interno dei reattori taxa di batteri di particolare interesse negli studi di DA.

Rispetto a quanto già disponibile in bibliografia, [1,2,3], la tecnica è stata sviluppata adeguandola a matrici molto eterogenee: le prove sono state infatti condotte su campioni di digestato dell'impianto pilota, precedentemente descritto

Negli esperimenti sono state utilizzate le sonde riportate nella Tabella 2 che hanno permesso di identificare specifici taxa batterici.

2.9.1 Stima dell'abbondanza batterica tramite conta diretta in epifluorescenza

Per misurare l'abbondanza batterica (n° cell/mL) è stato utilizzato il metodo della conta diretta in epifluorescenza [2]. La tecnica sfrutta la capacità della molecola 4'-6'-diamino-2-fenilindolo (DAPI) di formare complessi fluorescenti con il doppio filamento di DNA delle cellule. Questa molecola è in grado di intercalarsi tra le basi che costituiscono il DNA ed in particolare tra i ponti formati da Adenina e Timina (Adenina e Uracile nell'RNA).

I microrganismi così evidenziati possono essere direttamente osservati e contati al microscopio ad epifluorescenza. La specificità del DAPI permette di distinguere visibilmente i batteri, che appaiono di una colorazione luminescente azzurra, dalle particelle non viventi della stessa dimensione, che emettono una luminescenza gialla.

È stato utilizzato un microscopio a epifluorescenza (Axioshop 40, Zeiss, Germany), dotato di una lampada al mercurio (HBO 50_{AC}), ingrandimento 100X e specifici filtri per osservare e contare le cellule colorate con specifici fluorocromi (Tabella 3).

Le immagini sono ottenute con una camera digitale (Zeiss Axiocam MCR, Zeiss, Germany) ed elaborate attraverso il software Axio – Vision (Axio Cam MRm, Zeiss, Germany).

Tabella 2. Sonde utilizzate con i relativi taxa identificati, sequenze nucleotidiche, siti target sull'rRNA corrispondente e la stringenza (in termini di % di formamide necessaria per l'ibridazione)

Sonda	Taxa identificati	Funzione Ecologica	Sequenza (5'-3')	Molecola target	Formamide%
ARCH915	<i>Archea</i>	Metanogeni	GTGCTCCCCGCCAATTCCT	16S(915 – 934)	0-50
EUB338	<i>Eubacteria</i>	Non metanogeni	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	16S(338-355)	0-50
EUB338II	<i>Eubacteria</i>	Non metanogeni	GCAGCCACCCGTAGGTGT	16S(338-355)	0-50
EUB338III	<i>Eubacteria</i>	Non metanogeni	GCTGCCACCCGTAGGTGT	16S(338-355)	0-50
MX825a	Methanosaetacea	Metanogeni acetoclasti (basse conc.di ac.acetico)	TCGCACCGTGGCCGACACCTAGC	16S(825-847)	50
MX825b	Methanosaetacea	Metanogeni acetoclasti (basse conc.di ac.acetico)	TCGCACCGTGGCCGACACCTAGC	16S(825-847)	50
MX825c	Methanosaetacea	Metanogeni acetoclasti (basse conc.di ac.acetico)	TCGCACCGTGGCTGACACCTAGC	16S(825-847)	50
MS821	Methanosarcinaceae	Metanogeni acetoclasti (alte conc.di ac.acetico)	CGCCATGCCTGACACCTAGCGAGC	16S (821-844)	40

Tabella 3. Eccitazione / emissione dei coloranti e corrispondenti filtri del microscopio

Coloranti	Filtri	Eccitazione	Emissione
DAPI	1 (cod.01)	530 – 585 nm	615 nm
LIVE / DEAD	2 (cod.09)	450 – 490 nm	515 nm
Cy3 Indocarbocianina	3 (cod.43)	545/25 nm	605/70 nm
Fluo Fluorescina	4 (cod.38 HE)	470/40 (HE) nm	525/50 (HE) nm

2.10 Risultati

2.10.1 Configurazione M1 (monostadio alimentato con feed 5 g/L di VS)

La configurazione M1 ha impiegato circa 8 giorni (192 ore) per raggiungere uno stato stazionario. La stabilità del processo è raggiunta quando le variazioni nell'andamento dei parametri di processo quali portata del biogas, percentuale di metano prodotto e concentrazione dei metaboliti presenti negli effluenti, si discostano dalla media di un valore non superiore al 10%. Per gli impianti in continuo, i dati di produzione finali si riferiscono a tempi successivi ad un HRT, nel nostro caso 7,5 giorni.

In figura 2 sono riportate, per la durata dell'intero set sperimentale, di 430 ore, le medie calcolate ogni 4 ore, della portata giornaliera di metano (NLCH₄/d) e la sua concentrazione (%) nel biogas prodotto. Raggiunta la fase stazionaria, la produzione di biogas prodotto si attestava su un valore di 17,05±0,96 NL/d con una percentuale di metano nel biogas di 56,28%± 0,64 (v/v). La produzione di metano risultava essere di 9,59±0,52 NL/d.

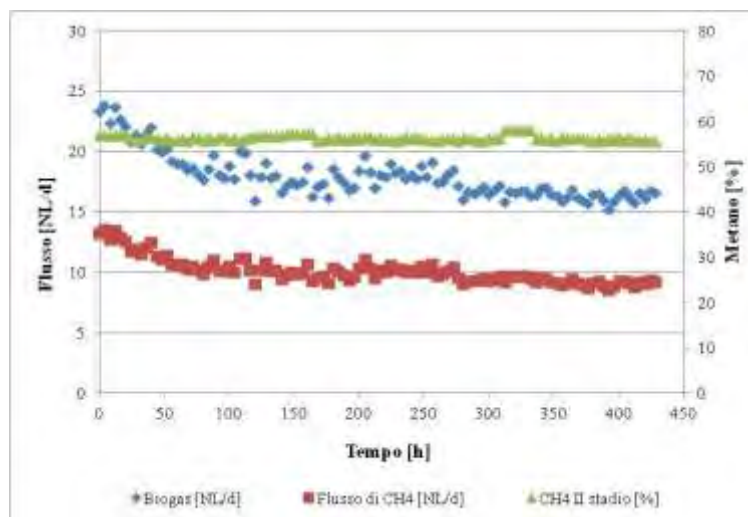


Figura 2. Configurazione M1 - Portata di metano e di biogas (NL/d) e concentrazione (%) di metano nel biogas

In Figura 3 sono riportati gli andamenti delle concentrazioni dei principali VFA e del lattosio residuo, con concentrazioni medie di acido propionico di $3,2 \pm 0,27$ mM; acido butirrico: $0,76 \pm 0,04$ mM; lattosio: $0,90 \pm 0,04$ mM. Le concentrazioni dei VS e del COD nel digestato con le relative percentuali di rimozione sono riportate nella tabella 4.

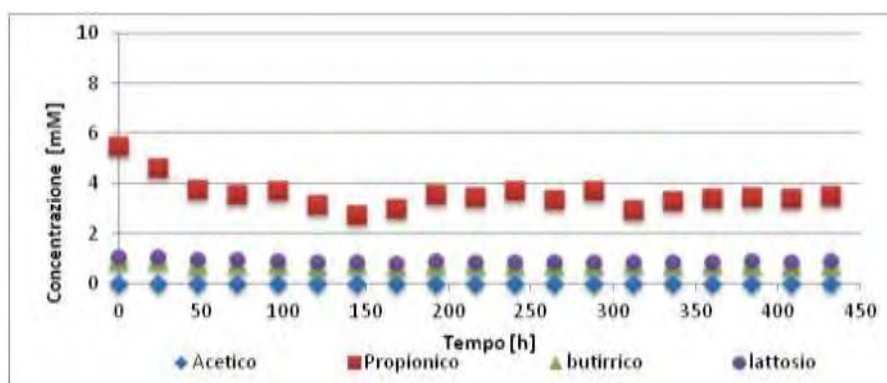


Figura 3. Configurazione M1: Concentrazione (mM) dei metaboliti solubili e del lattosio residuo nel digestato

Tabella 4. Configurazione M1 - Concentrazioni medie di TVS, COD e lattosio nel digestato e rimozione ottenuta (%)

	TVS (g/L)	COD (g/L)	Lattosio (mg/L)
IN	5	6,7	5000
OUT	1.28 ± 0.03	1.36 ± 0.04	308 ± 12
RIMOZIONE(%)	74.4 ± 0.61	79.7 ± 2.63	93.8 ± 2.7

2.10.2 Configurazione M2 (monostadio alimentato con feed 10 g/L di VS)

Data l'elevata percentuale di rimozione del lattosio e la qualità del digestato uscente dal reattore, con concentrazione di VFA molto basse, si è effettuata una nuova sperimentazione raddoppiando la concentrazione del carico organico entrante (10 g/L di VS).

Come si può osservare dal grafico in Figura 4 nella prima parte della sperimentazione il sistema era molto instabile e si è dovuto attendere un tempo superiore (circa 12,5 giorni) ad un HRT (7,5 giorni) prima di raggiungere una stabilità di processo.

La produzione di biogas risultava essere $31,2 \pm 1,19$ NL/d, con una percentuale di metano pari a $51,24\% \pm 0,76$. La produzione di metano era, quindi, di $15,0 \pm 0,61$ NL CH_4 /d (Figura 4).

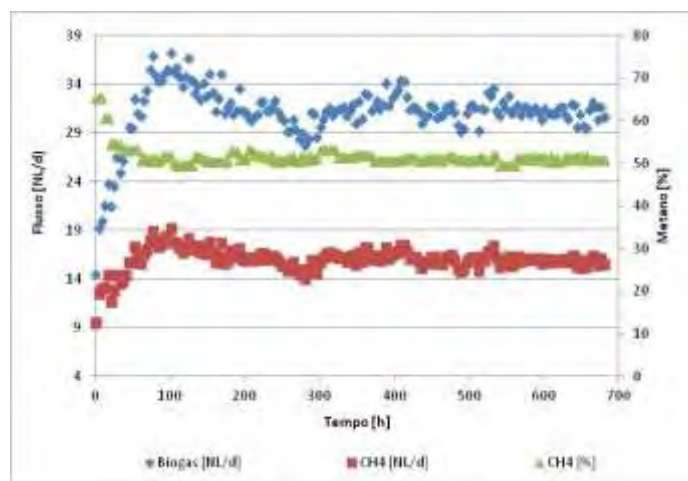


Figura 4. Configurazione M2 - Portata di biogas e di metano (NL/d) e concentrazione (%) del metano nel biogas

Anche nell'andamento dei metaboliti è possibile riscontrare l'instabilità del processo nei primi 12 giorni (Figura 5). Come si può osservare il carico organico di 10 g/L VS scelto è elevato per l'HRT di 7,5 giorni. Infatti il 25% del lattosio non viene degradato e si rileva un accumulo di acido acetico ($18,89 \pm 1,88$ mM), di acido propionico ($2,31 \pm 0,36$ mM) e con una concentrazione media di lattosio residuo pari a $7,20 \pm 0,67$ mM. Le percentuali di rimozione dei TVS ($68,7\% \pm 2,63$) e del COD ($71,3\% \pm 2,04$) confermano tale dato (Tabella 5).

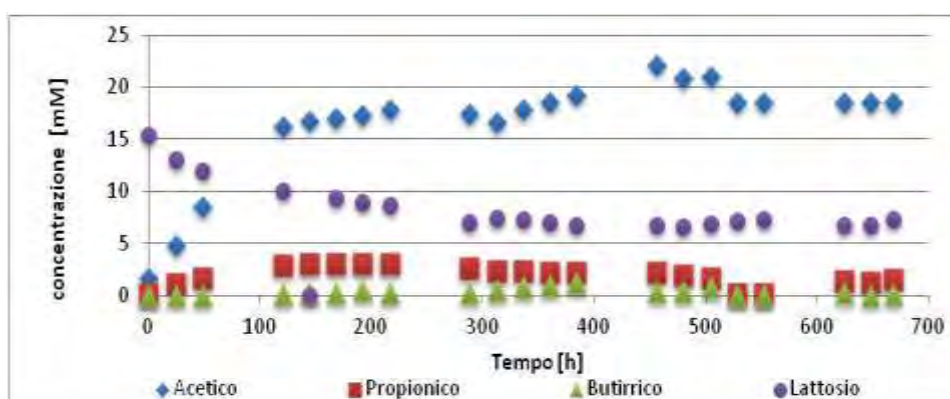


Figura 5. Configurazione M2 - Concentrazione (mM) dei metaboliti solubili e del lattosio residuo nel digestato

Tabella 5. Configurazione M2 - Concentrazioni medie di TVS, COD e lattosio nel digestato e rimozione ottenuta (%)

	TVS (g/L)	COD (g/L)	Lattosio (mg/L)
IN	10	13,4	10'000
OUT	3.13 ± 0.06	3.85 ± 0.01	2464 ± 232
Rimozione(%)	68.7 ± 2.63	71.3 ± 2.04	75.2 ± 2.81

2.10.3 Configurazione B1 (bistadio alimentato con feed 5 g/L di VS)

Nella configurazione B1, il II stadio ha impiegato un tempo inferiore ai 7.5 giorni per raggiungere uno stato di equilibrio stazionario. Nella Figura 6 sono riportate le produzioni di idrogeno ($0,07 \pm 0,002$ NL H_2 /d) del I stadio, di metano ($12,24 \pm 0,67$ NL CH_4 /d) e le rispettive concentrazioni (%) nei biogas ($\text{H}_2 = 1,1 \pm 0,4$; $\text{CH}_4 = 67 \pm 2,8$) (Figura 6).

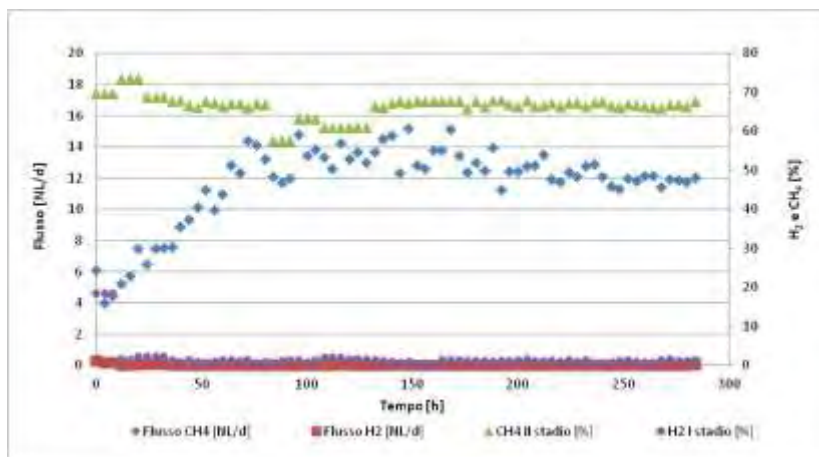


Figura 6. Configurazione B1 - Flusso di metano nel II stadio e di idrogeno nel I stadio (NL/d) e concentrazione (%) del metano e di idrogeno nei rispettivi biogas

La scarsa efficienza del processo di produzione di idrogeno al I stadio, era in apparente contraddizione con l'analisi dei metaboliti solubili nel liquido di fermentazione dove riscontriamo una concentrazione di acido acetico pari a $19,30 \pm 1,38$ mM, acido propionico $3,0 \pm 0,59$, acido butirrico $4,01 \pm 0,71$ mM, lattosio $0,31 \pm 0,03$ mM (Figura 7). L'elevata concentrazione di acido acetico avrebbe fatto supporre una via di fermentazione ottimale ed auspicabile per una elevata produzione H_2 . Infatti la resa teorica di idrogeno per una mole di glucosio è di 4 moli quando l'acido acetico è l'unico prodotto di fermentazione.

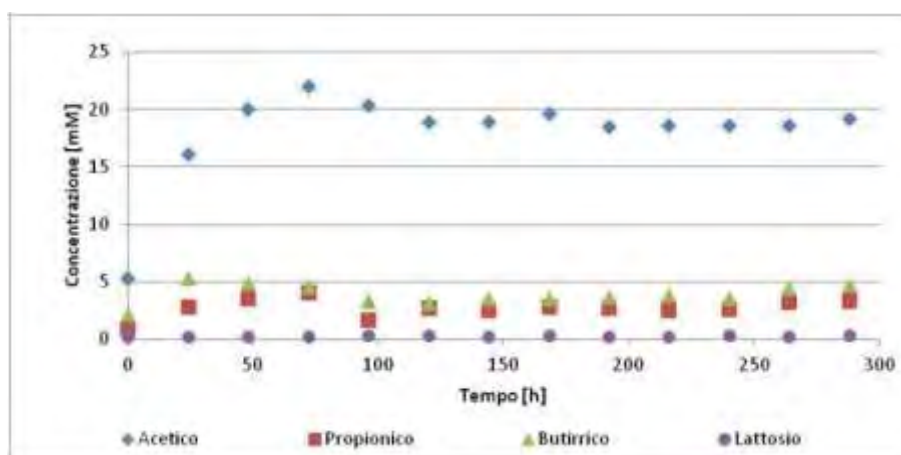


Figura 7. Configurazione B1- Concentrazione (mM) dei metaboliti solubili e del lattosio residuo nell'effluente del I stadio

E' noto, in letteratura, il processo di consumo di idrogeno molecolare in reattori acidogeni, in assenza di produzione di metano [4,5,6]. Questa via metabolica è conosciuta come omoacetogenesi ed è operata da batteri omoacetogeni, una comunità funzionale di microrganismi anaerobi molto versatile che, in determinate condizioni, può passare da un metabolismo eterotrofo, con consumo di acido acetico e produzione di $H_2 + CO_2$, ad un metabolismo autotrofo, con reazioni metaboliche identiche ma con direzione inversa, ovvero consumo di H_2 e CO_2 per produrre acetato.

Generalmente nel processo di produzione di idrogeno le rese (moli H_2 /moli di substrato) che si ottengono dipendono dalla via metabolica intrapresa dalla fermentazione. Quando si produce un eccesso di potere riducente, l' $NADH$, la cellula batterica per mantenere il proprio potenziale redox e continuare a fermentare il substrato, deve ossidare l' $NADH$ a NAD^+ , tramite la formazione di composti più ridotti dell'acido acetico ovvero acido butirrico, acido propionico, acido lattico, acido valerico, acido formico ed etanolo. Le rese vanno da 2 a 4 moli di H_2 /mole di substrato quando la fermentazione produce, rispettivamente, solo acido butirrico o formico oppure acido acetico. Generalmente le fermentazioni con produzione di idrogeno vengono, infatti, definite "fermentazioni acido-miste".

Nel nostro caso, l'assenza di produzione di idrogeno e l'elevata concentrazione di acido acetico consentono di ipotizzare che l'eccesso di potere riducente, sotto forma di H_2 , veniva ridotto tramite l'instaurarsi della via metabolica dell'omoacetogenesi.

Nella Figura 8 possiamo vedere l'andamento dei metaboliti presenti nel digestato del II stadio con concentrazioni medie di acido acetico ($4,74 \pm 0,63$ mM), acido propionico ($2,49 \pm 0,5$ mM), lattosio residuo ($0,13 \pm 0,01$ mM).

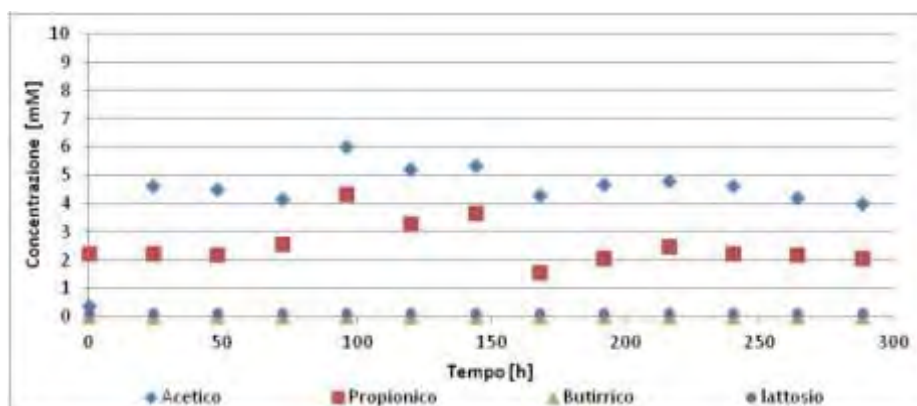


Figura 8. Configurazione B1- Concentrazione (mM) dei metaboliti solubili e del lattosio residuo nel digestato del II stadio

In Tabella 6 sono espressi i contenuti medi dei TVS, del COD e del lattosio relativi ai singoli reattori. E l'efficienza, in termine di rimozione degli stessi, dell'intero processo.

Tabella 6. Configurazione B1 - Concentrazioni medie di TVS, COD e lattosio nel digestato e rimozione ottenuta (%)

	TVS (g/L)	COD (g/L)	Lattosio (mg/L)
IN	5	6,37	5000
OUT I stadio	$4,37 \pm 0,11$	$7,23 \pm 0,01$	$505 \pm 11,4$
OUT II stadio	$1,22 \pm 0,01$	$1,16 \pm 0,02$	$161 \pm 4,74$
Rimozione(%)	$78,20 \pm 2,40$	$84,2 \pm 2,5$	$96,8 \pm 0,09$

2.10.4 Configurazione B2 (bistadio alimentato con feed 5 g/L di VS)

Un nuovo avvio della configurazione bistadio è stata effettuata per valutare l'importanza di una fermentazione acido mista con produzione di idrogeno rispetto sia alla produzione di metano nel II stadio, sia alla resa energetica dell'intero processo, ovvero capire quale effetto abbia avuto l'instaurarsi dell'omoacetogenesi, nella configurazione B1, come alternativa via metabolica al primo stadio.

La probabile origine di questa comunità di omoacetogeni è imputabile alla comunità batterica presente nel digestato del II stadio ed usata come ricircolo in discontinuo. I batteri omoacetogeni interagiscono simbioticamente con i batteri metanogeni in un digestore anaerobico [6].

E' stata, quindi, installata una quarta serie sperimentale (B2) in cui, diversamente dal B1, il ricircolo in discontinuo veniva effettuato al II stadio. Il primo stadio veniva, quindi, alimentato con scotta a 10 g/L VS con un HRT di 24 ore. In questo caso per mantenere stabile il pH, ed evitare l'acidificazione dovuta all'aumento dei VFA nel I stadio, la scotta veniva diluita con tampone fosfato 0,2 M. L'OLR del II stadio rimaneva invariato in quanto l'effluente del I era diluito in rapporto 1:2 con il digestato.

Anche nella configurazione B2, il II stadio, ha impiegato un tempo inferiore ai 7,5 giorni per raggiungere uno stato di equilibrio stazionario. In figura 9 sono riportate le produzioni di idrogeno nel primo stadio ($3,91 \pm 0,50$ NL H_2 /d), di metano ($11,63 \pm 0,44$ NL CH_4 /d) nel II stadio e le rispettive concentrazioni (%) nei biogas ($H_2 = 39,0 \pm 2$; $CH_4 = 58,7 \pm 1,2$).

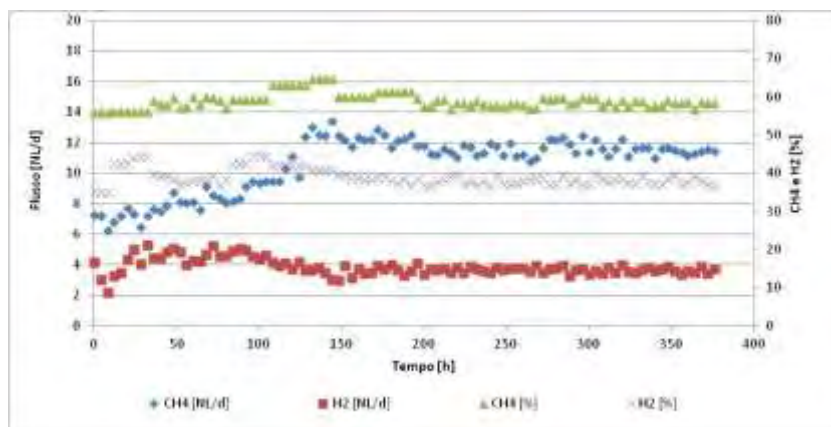


Figura 9. Configurazione B2 - Flusso di metano nel II stadio e di idrogeno nel I stadio (NL/d) e concentrazione (%) del metano e di idrogeno nei rispettivi biogas

In Figura 10 vengono riportati gli andamenti dei prodotti di fermentazione e del lattosio residuo nel I stadio (acido acetico $3,58 \pm 0,27$ mM, acido propionico $4,51 \pm 0,83$ mM, acido butirrico $25,44 \pm 0,59$ mM, acido lattico $44,84 \pm 10,15$, lattosio $0,31 \pm 0,02$).

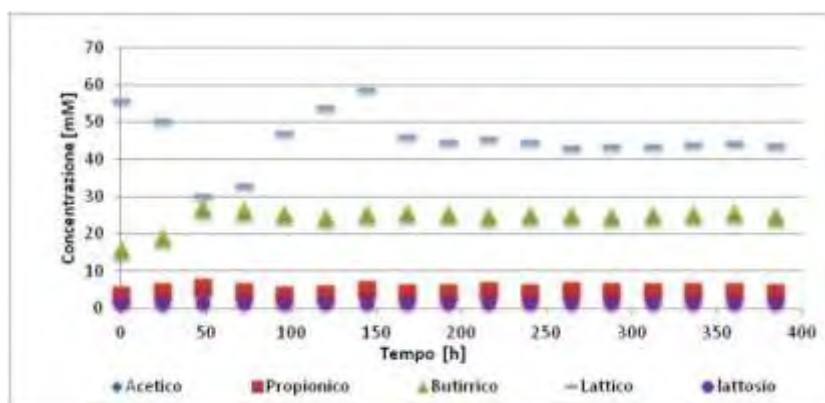


Figura 10. Configurazione B2- Concentrazione (mM) dei metaboliti solubili e del lattosio residuo nell'effluente del I stadio

In Figura 11 vengono riportati gli andamenti dei metaboliti e del lattosio residuo nel II stadio.

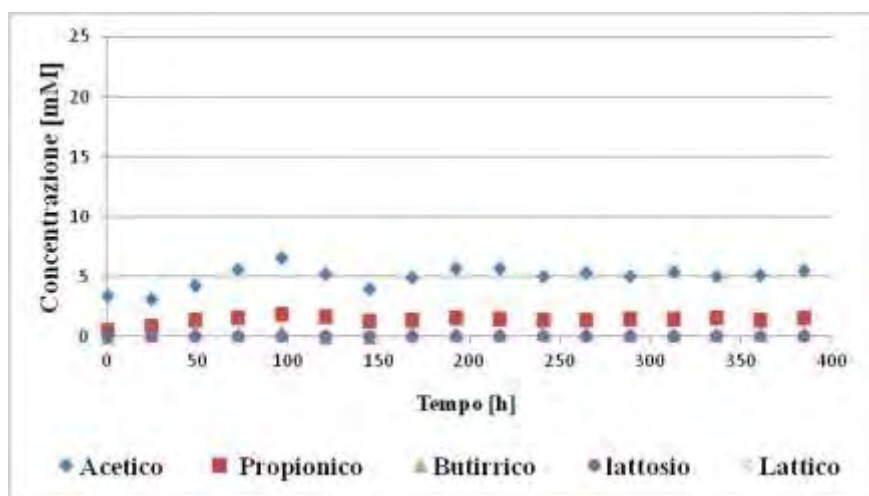


Figura 11. Configurazione B2- Concentrazione (mM) dei metaboliti solubili e del lattosio residuo nel digestato del II stadio

In Tabella 7 sono espressi i contenuti medi dei TVS, del COD e del lattosio relativi ai singoli reattori e l'efficienza in termine di rimozione degli stessi nell'intero processo.

Tabella 7. Configurazione B2 - Concentrazioni medie di TVS, COD e lattosio nel digestato e rimozione ottenuta (%)

	TVS (g/L)	COD (g/L)	Lattosio (mg/L)
IN	5	6,37	5000
OUT I stadio	3,76±0,05	6,45±0,01	105±9
OUT II stadio	1,00±0,01	0,92±0,04	45,0±4,0
Rimozione (%)	80,0±2,6	86,3±2,60	99,0±2,1

2.10.5 Configurazione B3 (bistadio alimentato con feed 10 g/L di VS)

Data l'elevata percentuale di rimozione del lattosio e la qualità del digestato uscente dal reattore, con concentrazione di VFA molto basse, si è effettuata una nuova sperimentazione raddoppiando la concentrazione del carico organico entrante al I stadio (20 g/L di VS).

Di seguito sono riportati i grafici riguardanti le produzioni di idrogeno e metano nei I stadio e nel II stadio e le rispettive concentrazioni (%) nei biogas (Figura 12).

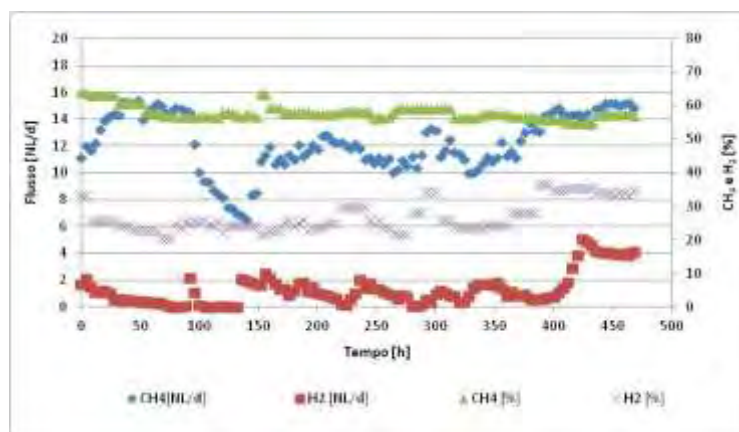


Figura 12. Configurazione B2- Flusso di metano nel II stadio e di idrogeno nel I stadio (NL/d) e concentrazione (%) del metano e di idrogeno nei rispettivi biogas

Si può osservare come, in particolare, gli andamenti dei flussi di idrogeno e di metano siano molto variabili senza mai raggiungere una condizione di stabilità.

In tutti le precedenti serie sperimentali, una simile variabilità, più o meno accentuata, era sempre presente, ma ristretta principalmente al primo ricambio idraulico, circa 180 ore, poiché la comunità microbica doveva acclimatarsi alle nuove condizioni ecologiche, per poi raggiungere una stabilità che veniva mantenuta nel tempo.

Durante questa sperimentazione ci sono stati numerosi problemi legati alla regolarità delle portate delle pompe, con conseguenze sui tempi di HRT e sui carichi organici entranti.

Krupp and Windmann [7] in un lavoro sulle problematiche dei reattori in continuo, legate all'inesatto funzionamento delle pompe, mettono in luce la stretta relazione tra andamenti discontinui di HRT e OLR e minore efficienza di produzione di biogas.

In particolare il livello del volume di fermentazione del I stadio ha avuto variazioni significative, che hanno variato anche da un -73% (un evento) ad un +47% (un evento). Il reattore, per evitare un eccesso di carico organico, veniva riportato a volume aggiungendo tampone fosfato 0,4 M, lo stesso utilizzato per la diluizione della scotta. Il riempimento, spesso causato da un blocco della pompa di uscita dell'effluente, ha comportato il funzionamento in batch del II reattore. Tutto ciò ha comportato una non uniformità di carico organico con conseguenti modifiche nell'OLR e nell'HRT del II stadio, rispetto a quello impostato.

La stabilità veniva raggiunta dopo 400 ore di continuo (circa 16 giorni). Pertanto nella stima dei parametri di performance del si è preso in considerazione solo l'ultimo periodo di attività, dalle 400 alle 468 ore, ipotizzando che quello sarebbe stato l'andamento dopo il raggiungimento della stabilità.

Pertanto, si stimava una produzione di idrogeno di $4,19 \pm 0,09$ NL H₂/d con una concentrazione di H₂ nel biogas $34,4\% \pm 0,5$ e una produzione di metano di $14,7 \pm 0,15$ NL CH₄/d con percentuale di CH₄ di $56,7\% \pm 0,37$.

L'instabilità in entrambi gli stadi trovava riscontro nell'elevata deviazione standard dei metaboliti solubili negli effluenti del I stadio con concentrazioni di acido acetico di $35,8 \pm 22,0$ mM, acido butirrico $22,45 \pm 23,74$ mM, acido propionico $28,36 \pm 21,16$ mM, acido lattico $83,3 \pm 57,3$). La concentrazione del lattosio residuo era di $21,34 \pm 1,31$ mM (Figura 13).

Nel digestato del II stadio si riscontravano concentrazioni di acido acetico $20,28 \pm 2,9$ mM, di acido butirrico $1,55 \pm 0,1$ mM, di acido propionico $6,00 \pm 0,47$ mM e di lattosio residuo $7,69 \pm 0$ (Figura 14).

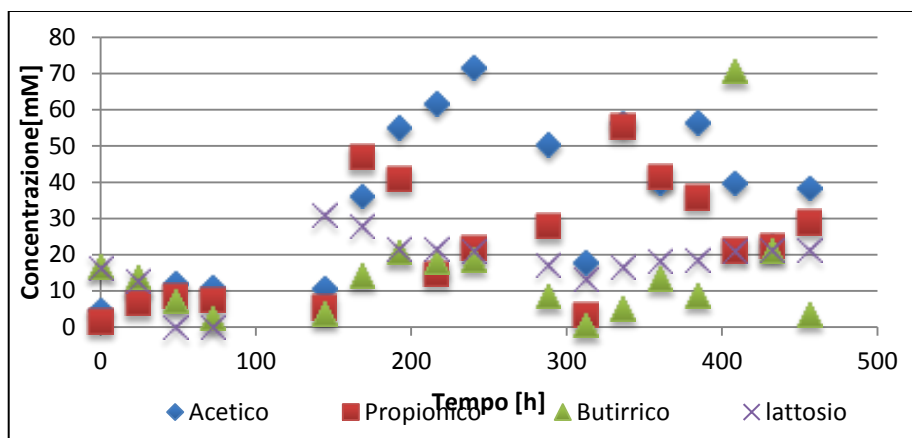


Figura 13. Configurazione B3- Concentrazione (mM) dei metaboliti solubili e del lattosio residuo nell'effluente del I stadio

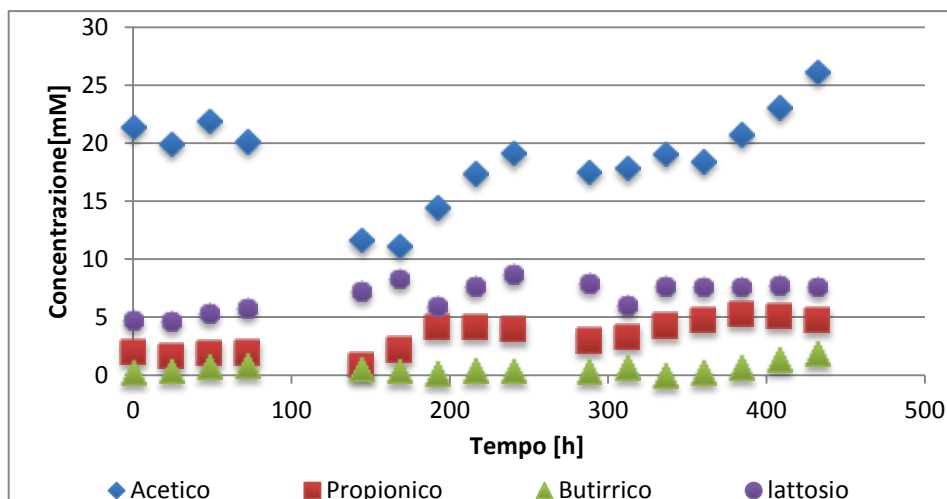


Figura 14 Configurazione B2- Concentrazione (mM) dei metaboliti solubili e del lattosio residuo nel digestato del II stadio

In tabella 8 sono espressi i contenuti medi dei TVS, del COD e del lattosio relativi ai singoli reattori. e l'efficienza in termine di rimozione degli stessi nell'intero processo.

Tabella 8. Configurazione B3 - Concentrazioni medie di TVS, COD e lattosio nel digestato e rimozione ottenuta (%)

	TVS (g/L)	COD (g/L)	Lattosio (mg/L)
IN	10	13,4	10000
OUT (H ₂)	18,1±0,41	12,4±0,30	7302±413
OUT (CH ₄)	3,09±0,52	3,48±0,4	2632±121
Rimozione (%)	69,1±2,63	74,0±4,10	73,68±3,11

Anche in questa serie sperimentale, si può notare come l'intero processo perda in efficienza di rimozione con un abbattimento del COD pari al 74,03%±4,10. Il 27% del lattosio rimane non degradato. Questi dati possono essere spiegati ipotizzando che anche per la configurazione in bistadio un HRT di 7,5 giorni è eccessivamente breve per tali carichi organici.

Nelle tabelle che seguono sono riportati i parametri di performance (velocità del processo o GPR, produzione specifica di metano o SGP) del processo di produzione di metano in monostadio e bistadio nelle diverse serie sperimentali (Tabella 9) e quelle del processo di produzione di idrogeno nelle configurazioni sperimentali B2 e B3 (Tabella 10).

Tabella 9. Riassunto della performance della produzione di metano delle diverse serie sperimentali

	M1	M2	B1	B2	B3
Flusso Biogas (NL/d)	17,1±0,96	31,2±1,2	18,3±0,93	19,8±0,60	25,07±0,14
CH ₄ (%)	56,3±0,65	51,2±0,77	66,8±2,75	58,7±1,2	56,7±0,37
Flusso CH ₄ (NL/d)	9,59±0,54	15,0±0,61	12,2±0,64	11,6±0,44	14,7±0,15
GPR(NL _{CH₄} *L _{reattore} ⁻¹ *d ⁻¹)	0,19±0,01	0,31±0,01	0,24±0,01	0,23±0,01	0,29±0,01
SGP (NL _{CH₄} *g _{VS} ⁻¹)	0,28±0,016	0,23±0,01	0,36±0,02	0,34±0,13	0,22±0,01

Tabella 10. Riassunto della performance della produzione di idrogeno nella configurazione B2 e B3

	B2	B3
Flusso Biogas (NL/d)		
H ₂ (%)	39,0±2	34,4±0,5
Flusso H ₂ (NL/d)	3,91±0,50	4,19±0,09
GPR(NL _{H₂} *L _{reattore} ⁻¹ *d ⁻¹)	1,15±0,15	1,23±0,03
SGP(NmL _{H₂} *g _{VS} ⁻¹)	115±0,02	62,0±0,01

2.10.6 Confronto tra i processi di produzione di metano in monostadio

Il grafico in Figura 15 mostra come la produzione di metano nella configurazione M2 sia circa 1,6 volte superiore a M1, il GPR passando da 0,19 NL_{CH₄}/L_{reattore}*d⁻¹ a 0,31 NL_{CH₄}/L_{reattore}*d⁻¹. Tuttavia alla più elevata efficienza in termini di produzione volumetrica di metano, non corrisponde una maggiore efficienza nella sua produzione specifica. La produzione specifica di metano è, infatti, leggermente inferiore, passando da 0,28 NL_{CH₄}/g_{VS} per M1 a 0,23 NL_{CH₄}/g_{VS} per M2, ossia a parità di carico organico la configurazione M1 produce più metano.

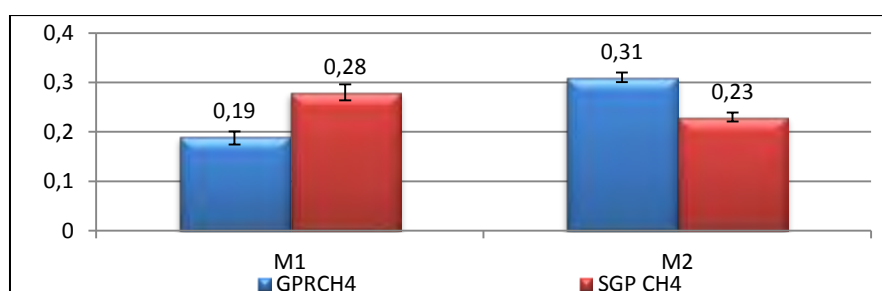


Figura 15. Configurazioni M1 e M2: confronto dei valori di GPR (NL_{CH₄}*L_{reattore}⁻¹*d⁻¹) e SGP (NL_{CH₄}*g_{VS}⁻¹)

I dati di GPS sono confermati da quelli di rimozione del COD. In M1 viene riscontrata una percentuale di rimozione del COD del 79,7% contro quella del 71,3% in M2 (Figura 16).

Possiamo ipotizzare che a concentrazioni di carico organico di 10 g/L di VS, l'HRT di 7,5 giorni non è sufficiente e probabilmente un tempo più lungo avrebbe migliorato la capacità di rimozione del substrato aumentando, quindi, anche la produzione specifica di metano.

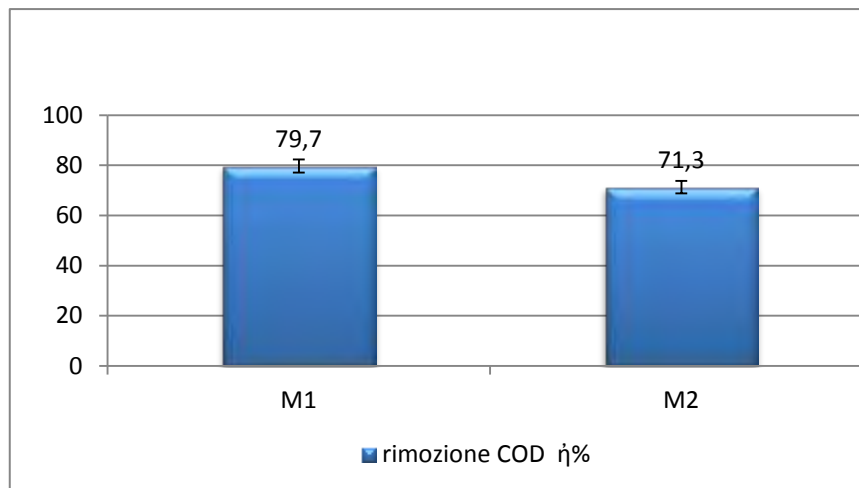


Figura 16. Configurazioni M1 e M2: confronto dell'efficienza di rimozione del COD (%)

2.10.7 Confronto tra i processi di produzione di metano in bistadio

E' interessante a questo punto vedere le differenze riscontrate tra le condizioni B1 e B2, dove nel I stadio, come già detto nel capitolo dei risultati, si sono instaurate due vie metaboliche differenti, di consumo e di produzione di idrogeno, rispettivamente.

Nelle figure 17 e 18 sono riportati i parametri di processo delle tre serie sperimentali (B1, B2, B3) in bistadio e le relative percentuali di rimozione del COD.

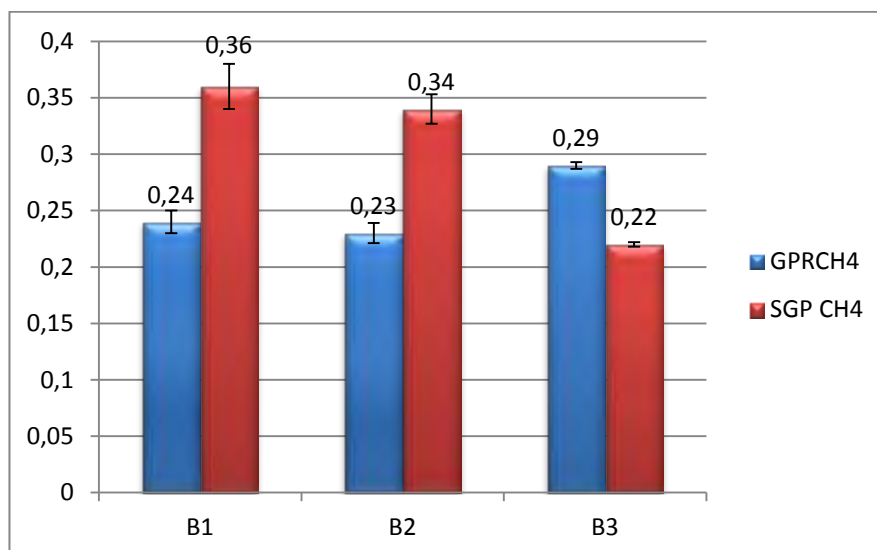


Figura 17. Configurazioni B1, B2, B3: confronto dei valori di GPR ($\text{NL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{L}_{\text{reattore}}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) e SGP ($\text{NL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{g}_{\text{VS}}^{-1}$)

Come si può osservare, ai fini della efficienza energetica relativa alla produzione di metano, la via metabolica attiva nel I stadio ha un effetto trascurabile in quanto le differenze di GPR e di SGP nella configurazione B1 e B2, come anche quelle relative alle percentuali di rimozione di COD, non sono statisticamente significative con un intervallo di confidenza del 95% .

Per le configurazione B2 e B3 i risultati ottenuti sono simili a quanto riscontrato per i reattori in monostadio, ovvero, quella alimentata con una quantità di solidi volatili più elevata (10 g/L), B3, mostra una maggiore produzione di metano ($\text{GPR}_{\text{B3}} = 0,29 \pm 0,002 \text{ NL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{L}_{\text{reattore}}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, contro $\text{GPR}_{\text{B2}} = 0,23 \pm 0,01 \text{ NL}_{\text{CH}_4} \cdot \text{L}_{\text{reattore}}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), ma una

minore efficienza, sia come produzione in rapporto ai VS entranti ($SGP_{B3}=0,22\pm0,01 \text{ NL}_{CH_4} \text{ g}_{VS}^{-1}$, contro $SGP_{B2}=0,34\pm0,01 \text{ NL}_{CH_4} \text{ g}_{VS}^{-1}$), che come rimozione del carico organico ($COD = 74,03\%\pm3,1$ in B3 contro $86,3\pm0,62$ in B2).

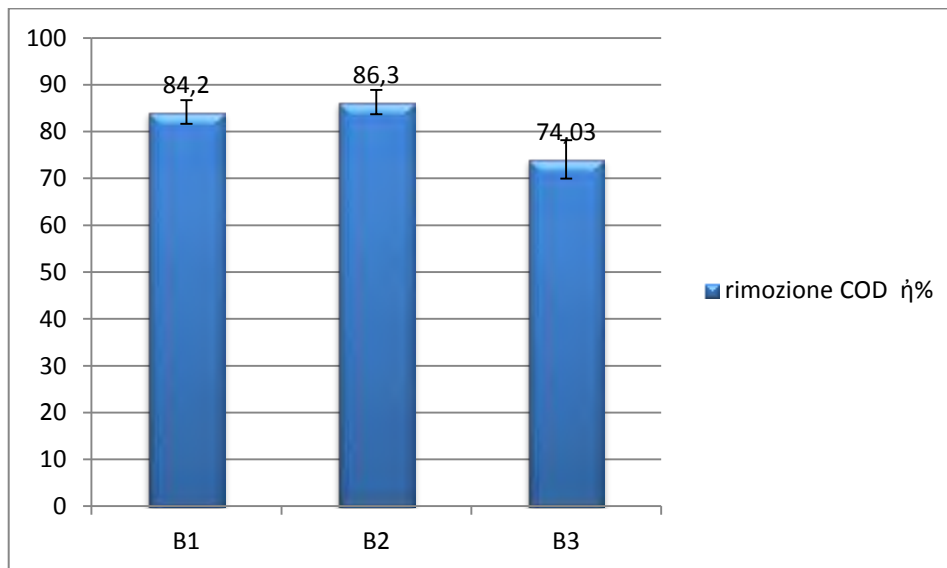


Figura 18. Configurazioni B1, B2, B3: confronto dell'efficienza di rimozione del COD (%)

Anche in questa serie sperimentale, l'aumento del carico organico determina una più bassa produzione specifica di metano e pertanto anche in una configurazione bistadio l'HRT di 7,5 giorni appare limitante.

2.10.8 Confronto monostadio e bistadio per la produzione di metano (5 g/L di VS)

Le configurazioni M1, B1, e B2, sono state alimentate alla stessa concentrazione di VS (5g/L). Il confronto verrà effettuato tra il bistadio B2 ed il monostadio M1, in quanto i dati di produzione di metano in entrambe le configurazioni B1 e B2 erano confrontabili.

Come si può osservare dalle Figura 19, la configurazione in bistadio risulta avere sempre una performance più elevata rispetto all'impianto in monostadio, sia in termini di GPR ($GPR_{M1}=0,19\pm0,01 \text{ NL}_{CH_4} \text{ L}_{reattore}^{-1} \cdot d^{-1}$; $GPR_{B2}=0,23\pm0,01 \text{ NL}_{CH_4} \text{ L}_{reattore}^{-1} \cdot d^{-1}$) che di SGP ($SGP_{M1}=0,28\pm0,02 \text{ NL}_{CH_4} \text{ g}_{VS}^{-1}$; $SGP_{B2}=0,34\pm0,013 \text{ NL}_{CH_4} \text{ g}_{VS}^{-1}$).

In B2 il processo di digestione anaerobica in bistadio ha una più elevata efficienza nel degradare la sostanza organica, con una rimozione del COD del $86,30\%\pm0,62$ rispetto al monostadio ($79,7\%\pm2,63$) (Figura 20).

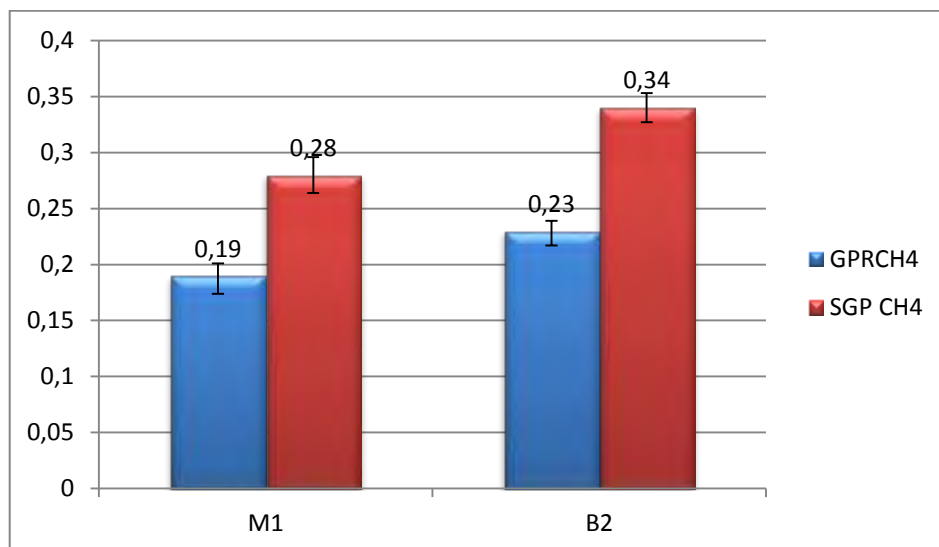


Figura 19. Configurazioni M1, B2: confronto dei valori di GPR ($\text{NL}_{CH_4} \text{ L}_{reattore}^{-1} \cdot d^{-1}$) e SGP ($\text{NL}_{CH_4} \text{ g}_{VS}^{-1}$)

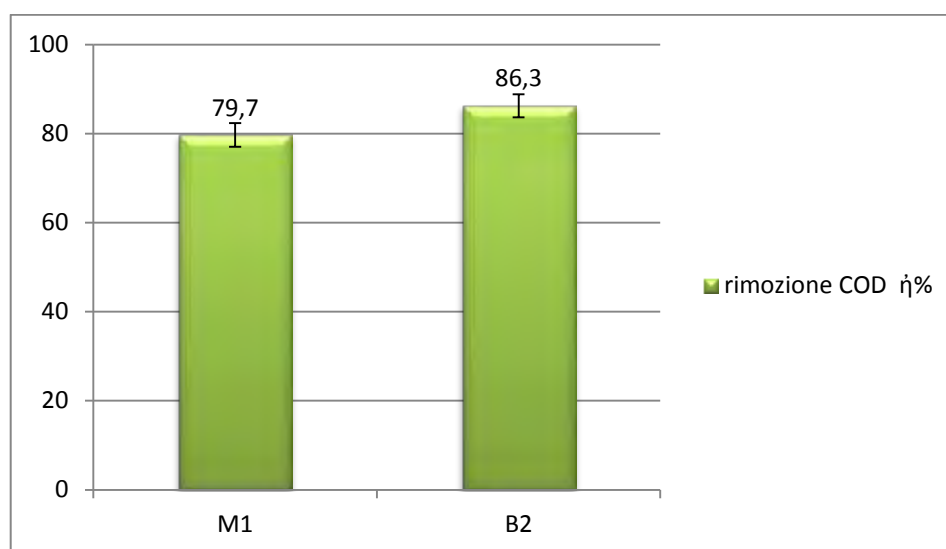


Figura 20. M1, B2: confronto dell'efficienza di rimozione del COD (%)

Nei digestori anaerobici, soprattutto in mesofilia, si stima che circa il 70% del metano prodotto durante il processo di DA deriva dalla trasformazione dell'acetato per opera dei metanogeni acetoclasti, appartenenti alla famiglia delle *Methanosarcinales* [8,9,10]. Tuttavia si conoscono solo due generi che utilizzano l'acetato come substrato per la metanogenesi: i *Methanosarcina* e i *Methanosaeta*. I *Methanosarcina* sono molto versatili dal momento che sono in grado di utilizzare più tipi di substrato e all'acetato preferiscono i composti metilati e le metilammine; inoltre possono passare dal metabolismo acetotrofo a quello idrogenotrofo utilizzando H_2/CO_2 ; i *Methanosaeta* invece sono acetotrofi obbligati e pertanto sono considerati degli specialisti rispetto ai *Methanosarcina*. Smith & Ingram-Smith [11] riportano che la soglia minima di concentrazione dell'acetato richiesta per la crescita dei *Methanosarcina* è di circa 1 mM, mentre per i *Methanosaeta* si stima un range di 5-20 μM .

In questo studio è stata effettuata l'analisi della comunità batterica mediante tecnica non colturale FISH, per lo stadio produttore di metano. All'interno degli *Archea* sono stati indagati i generi *Methanosarcina* e *Methanosaeta*, sia in termini di composizione percentuale, che come numero di cellule batteriche totali; ulteriori determinazioni sono state effettuate per il dominio degli *Eubatteri*, con i quali i metanogeni stabiliscono una relazione di tipo sintrofico [12].

Lo scopo del lavoro è stato quello di indagare se e quali cambiamenti di comunità erano intervenuti nelle diverse configurazioni del processo di produzione del metano, sia in rapporto ai due domini *Eubacteria* e *Archea*, sia relativamente ai due generi di metanogeni.

In Figura 21 sono riportati i grafici relativi alla struttura della comunità batterica e alla *guild* di metanogeni per una concentrazione di carico organico di 10 g/L VS nel monostadio e nel bistadio. Le percentuali sono riferite alle cellule rilevate con la colorazione DAPI.

Nella Figura 21 a sinistra, dall'alto al basso vengono riportati i valori percentuali di Eubatteri e Archea relativamente alle cellule rilevate in DAPI e Composizione percentuale della comunità di Archea per *Methanosarcina* e *Methanosaeta*, mentre a destra dall'alto in basso sono riportati il numero di cellule per mL di Eubatteri e Archea calcolati sulla base della conta in DAPI e numero di cellule per mL per *Methanosarcina* e *Methanosaeta*. Nella barra degli errori sono riportate le deviazioni standard per tre repliche.

E' opinione comune che la separazione del processo di digestione anaerobica in due stadi corrisponda ad una separazione fisica delle comunità che attuano il processo di idrolisi/acidogenesi nel primo stadio e quello di acetogenesi/metanogenesi nel secondo stadio. Nella realtà del processo questo non è mai del tutto vero, in quanto i substrati non fermentati nel primo stadio attivano la comunità degli acidogeni nel secondo. Quindi nel secondo stadio tutti e quattro gli step funzionali in cui è separata la digestione anaerobica (idrolisi, acidogenesi, acetogenesi e metanogenesi), sono attivi.

Tra la configurazione monostadio M1 e le bistadio B1 e B2 non si osservano quantità significativamente diverse di *Archea*, in termini di percentuale rispetto alle cellule rilevate in DAPI mentre una percentuale di Eubatteri

più bassa si rileva nella condizione B2, rispetto alla M1 e alla B1. Nel reattore bifase B2 si rileva una maggiore densità cellulare, sia per quanto riguarda gli *Eubatteri* che per quanto riguarda gli *Archea* (Fig. 21). D'altra parte differenze interessanti si rilevano andando ad indagare all'interno della guild dei metanigeni.

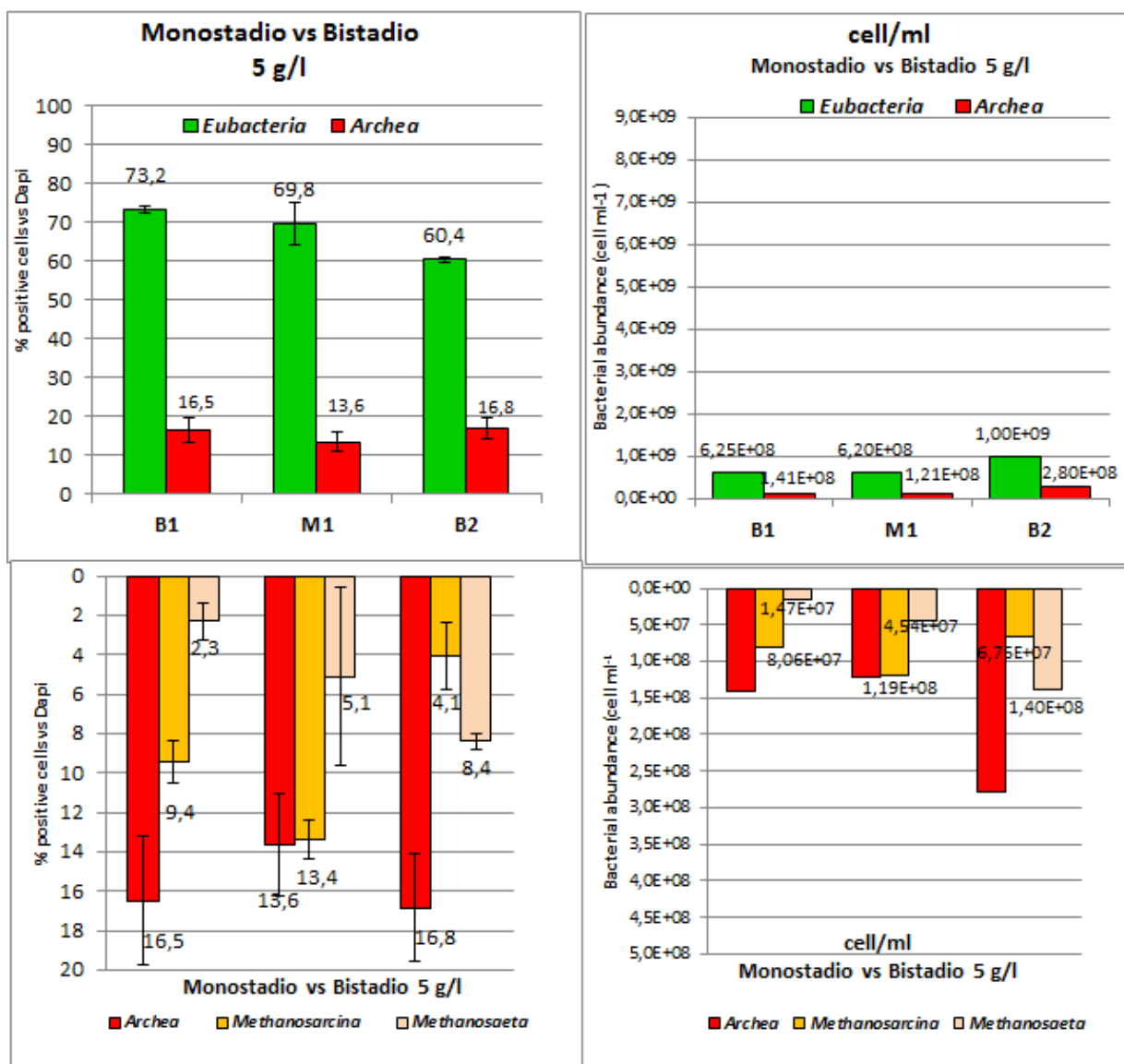


Figura 21. Struttura della comunità microbica all'interno dei reattori M1, B1, B2 alimentati con scotta a concentrazione di 5 g/L di VS

Infatti tra il monostadio M1 e i bistadio B1 e B2 (secondo reattore), si rileva una differente distribuzione dei due generi acetoclasti, *Methanosarcina* e *Methanosaeta*. In M1 e B1 predominano i *Methanosarcina* sui *Methanosaeta*: rispettivamente il 13,4% vs 5,1% e 9,4% vs 2,3%. Nel reattore bistadio B2, al contrario, i *Methanosaeta* rappresentano l'8,4% ed i *Methanosarcina* il 4,1%. Riguardo a questa distribuzione è da tenere presente che i *Methanosarcina*, rispetto ai *Methanosaeta* hanno un metabolismo più robusto nel senso che sono tolleranti verso molte condizioni di stress, e sono in grado di attuare il loro metabolismo in condizioni subottimali [13]. Questa loro capacità viene messa in relazione con la loro dimensione cellulare e la loro morfologia: la forma sferica di *Methanosarcina* conferisce un più elevato rapporto volume/superficie che insieme alla tendenza a formare dei raggruppamenti di cellule, determina un minore contatto con sostanze o condizioni che possono essere tossiche per i batteri. De Vries riporta che il rapporto volume/superficie per *Methanosarcina* è circa 4-7 volte più elevato che per *Methanosaeta*. Calli et al. [14] affermano che la stabilità del reattore può essere perciò ricondotta alla densità di raggruppamenti dei *Methanosarcina*.

Numerosi autori riportano che lo shift della struttura della comunità metanigena verso la dominanza del genere *Methanosarcina* può essere la risposta e l'adattamento a condizioni di stress ambientale o subottimali

[15,16,17]. In queste condizioni il predominio dei *Methanosarcina* è anche attribuito alla loro maggiore velocità di crescita, tale da consentirgli di prendere il sopravvento su *Methanosaeta*, ad elevate concentrazioni di acidi grassi volatili, soprattutto acetato.

D'altra parte, nel monostadio M1, l'acetato non viene rilevato nel digestato. Tuttavia l'accumulo di acido propionico ad una concentrazione di 3,2 mM consente di ipotizzare che la predominanza dei *Methanosarcina* in questo caso sia dovuta alla loro versatilità metabolica rispetto ai *Methanosaeta*. Come detto infatti i *Methanosarcina*, se necessario, sono in grado di svolgere un metabolismo idrogenotrofo.

Nel processo di digestione anaerobica la reazione di acetogenesi dal propionato produce più moli di idrogeno ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 3\text{H}_2 + \text{CO}_2$) rispetto ad altri prodotti metabolici, come il butirrato, il lattato e l'etanolo ed è anche la reazione più endoergonica ($\Delta G_0' = +76,2$ kJ/mole di propionato) [6]. L'accumulo di acido propionico è, infatti, sintomo di una elevata pressione parziale dell'idrogeno [12].

La predominanza di *Methanosarcina* in M1 può essere genericamente associata con il suo metabolismo più generalista in relazione al fatto che in un monostadio è disponibile tutto l'idrogeno prodotto per fermentazione della sostanza organica a differenza del bistadio dove l'acidogenesi del I stadio in B2 e l'omoacetogenesi in B1, ne rimuovono una parte.

Una discussione a parte è invece riservata a B1, per il quale ricordiamo, nel primo stadio acidogenico, si è instaurata l'omoacetogenesi, probabilmente causata dall'immissione nel I stadio del digestato proveniente dal II stadio: il prodotto metabolico solubile di questo processo è solo l'acido acetico.

E' possibile quindi ipotizzare che nel II stadio del B1 le concentrazioni elevate di acido acetico abbiano portato ad una dominanza dei *Methanosarcina*.

2.10.9 Confronto monostadio e bistadio per la produzione di metano (10 g/L di VS)

Le configurazioni M2 e B3 sono state alimentate alla stessa concentrazione di VS (10 g/L).

Come si può osservare dalle Figure 22 e 23, i valori di GPR e di GPS e di rimozione del carico organico di entrambe le configurazioni sono confrontabili, con valori di GPR e SGP di poco superiori in M2. La rimozione del COD (%) è, al contrario, di poco più elevata in B3.

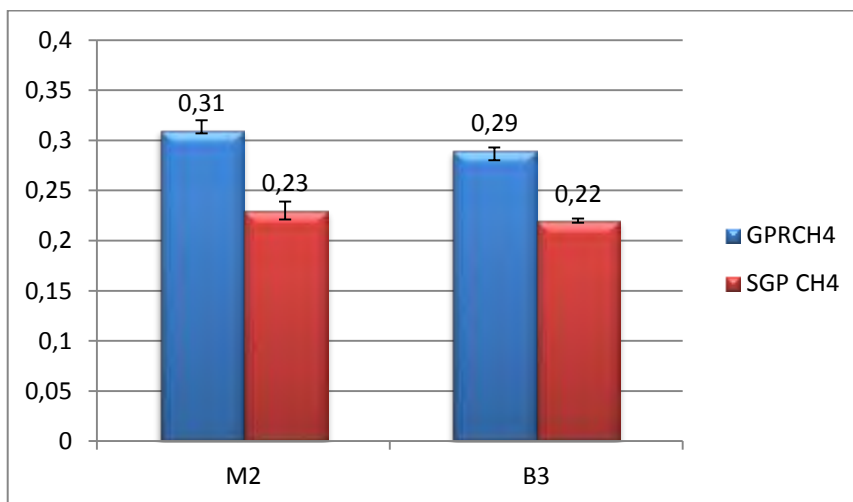


Figura 22. Configurazioni M2, B3: confronto dei valori di GPR (NL_{CH4} * L_{reattore}⁻¹ * d⁻¹) e SGP (NL_{CH4} / g_{VS} * d⁻¹)

Nel monostadio il GPR_{M2} e il SGP_{M2} risultano pari a $0,31 \pm 0,01$ NL_{CH4} L_{reattore}⁻¹ d⁻¹ e a $0,23 \pm 0,01$ NL_{CH4}/g_{VS}, rispettivamente.

Nel bistadio il GPR_{B3} è di $0,29 \pm 0,01$ NL_{CH4} L_{reattore}⁻¹ d⁻¹ con una resa in SGP_{B3} pari $0,22 \pm 0,01$ NL_{CH4}/g_{VS}. In B3, tuttavia, il processo di digestione anaerobica ha una più elevata efficienza nel degradare la sostanza organica, con una rimozione del COD del $74,03\% \pm 4,10$ rispetto al monostadio ($71,3\% \pm 2,04$) (Fig. 24).

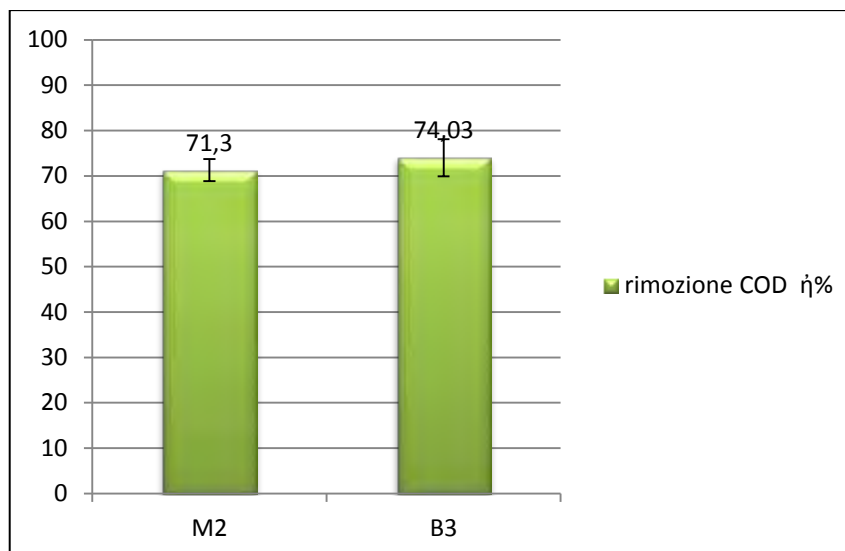


Figura 23. Configurazioni M2, B3: confronto dell'efficienza di rimozione del COD (%)

Sebbene ci si sarebbe aspettata una produzione di metano più elevata nel bistadio, come riscontrato nella serie sperimentale a carico organico inferiore (5 g/L VS), è possibile ipotizzare che le variazioni del volume di fermentazione del I stadio, con la diluizione della scotta in caso di svuotamento e il funzionamento in batch del II stadio con il blocco della pompa di trasferimento del substrato dal primo reattore al secondo, abbiano determinato valori di OLR e di HRT, nel II stadio, rispettivamente inferiori e più elevati di quelli impostati.

In Figura 24 sono riportati i grafici relativi alla struttura della comunità batterica e alla *guild* di metanogeni per una concentrazione di carico organico di 10 g/L VS nel monostadio e nel bistadio

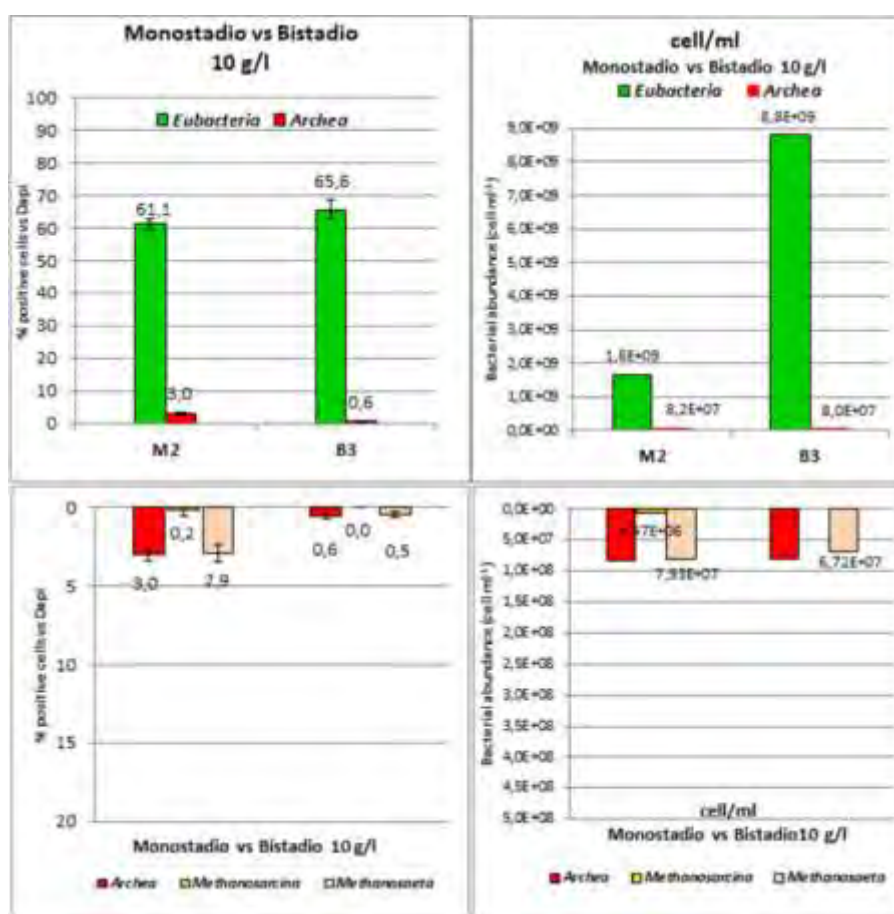


Figura 24. Struttura della comunità microbica all'interno dei reattori M2, B3 alimentati con scotta a concentrazione di 10 g/L di VS

Nella Figura 24, a sinistra, dall'alto al basso sono riportati i valori percentuali di Eubatteri e Archea relativamente alle cellule rilevate in DAPI e Composizione percentuale della comunità di Archea per *Methanosarcina* e *Methanosaeta*, mentre a destra dall'alto in basso vi sono il numero di cellule per mL di Eubatteri e Archea calcolati sulla base della conta in DAPI ed il numero di cellule per mL di *Methanosarcina* e *Methanosaeta*. Nella barra degli errori sono riportate le deviazioni standard per tre repliche.

Come si rileva dai grafici in Figura 24, sebbene per le due configurazioni M2 e B3 le percentuali di Eubatteri non mostrano differenze significative (valori rispettivamente del 61,1% e del 65,6%), nel bistadio la percentuale di Archea è significativamente più bassa (rispettivamente 0,6% verso il 3%).

D'altra parte, se invece si considerano le concentrazioni di batteri (n° cellule/mL) piuttosto che le percentuali, emerge che le concentrazioni di Archea in M2 e B3, rispettivamente di $8,2 \cdot 10^7$ e $8,0 \cdot 10^7$, si differenziano poco tra loro, mentre le differenze all'interno degli Eubatteri sono molto più marcate, con valori rispettivamente di $1,6 \cdot 10^9$ nel monostadio M2, e $8,8 \cdot 10^9$ nel bistadio B3.

Le concentrazioni di Archea sono dunque inferiori a quelle rilevate per i reattori B1, M1 e B2 alimentati a 5 g VS/L, dove erano rispettivamente di $1,41 \cdot 10^8$, $1,21 \cdot 10^8$ e $2,8 \cdot 10^8$ (Figura 21); di contro dal confronto delle concentrazioni di Eubatteri emerge che quest'ultimi aumentano a 10 g VS/L, ed in modo molto marcato nel bistadio (Figura 24), nel quale la produzione di metano risulta sostenuta da una cospicua guild di Eubatteri, metabolizzatori dei substrati per i metanogeni.

Quest'ultimi sono costituiti per la quasi totalità da *Methanosaeta* nel reattore monostadio M2, mentre nel bistadio B3 ne rappresentano la totalità (i *Methanosarcina* non sono stati rilevati) (Figura 25).

Dunque quello che veramente cambia tra i reattori a 5 g VS/L e 10 g VS/L è il rapporto tra Archea e Batteri e ulteriori studi saranno necessari per capire le dinamiche tra queste due componenti relativamente al processo di digestione anaerobica approfondendo le interazioni di simbiosi. D'altra parte la predominanza assoluta del genere *Methanosaeta*, uno specialista acetotrofo obbligato, con velocità di crescita più bassa di quella dei *Methanosarcina* conduce a ritenere che le condizioni ecologiche all'interno dei due reattori, M2 e B3 siano tali da consentire lo sviluppo di una guild di metanogeni molto efficiente, tale da giustificare le produzioni rilevate. Tuttavia a più elevate concentrazioni di carico organico, la produzione di idrogeno è molto più elevata, sia per il processo di fermentazione, per il monostadio M1, che per quello dell'acetogenesi, in M2 e B3. Chi consuma l'idrogeno prodotto? L'elevato numero degli Eubatteri in M2 e B3 consentirebbe di ipotizzare che tale attività venga svolta dagli omoacetogeni che competono con i metanigeni idrogenotrofi a pressioni parziali crescenti dell'idrogeno o, in alternativa, da altri metanigeni idrogenotrofi, non rilevati in questo studio.

La misurazione dell'idrogeno, quindi, completamente assente negli studi sulla produzione di metano, sarebbe auspicabile, anche se il suo monitoraggio nel processo della digestione anaerobica presenta delle difficoltà date dal suo rapido turnover.

A sostegno di ciò si fa presente che le condizioni di pH e temperatura nei reattori si sono mantenute stabili e nella norma, le concentrazioni di substrato erano al di sotto delle soglie oltre la quale esercitano effetto inibente, [18] ed il metabolita più abbondante era l'acido acetico, presente in quantità massime di 20 mM.

L'azoto ammoniacale, derivante dalla degradazione delle proteine e il cui eccesso può diventare un fattore limitante per la crescita dei metanogeni a concentrazioni superiori a 700 mg/L [19], aveva una concentrazione $\approx 100 \pm 10$ mg/L in entrambi i reattori. Questo esclude lo *shift* della *guild* di metanogeni verso la via metabolica di utilizzazione dell'idrogeno.

Questo studio sottolinea l'importanza del monitoraggio microbiologico nei reattori industriali mesofili, con particolare riguardo alla *guild* dei metanogeni: la sua ripartizione tra i generi *Methanosarcina* e *Methanosaeta* fornisce utili informazioni per la gestione dei digestori, principalmente nei confronti della possibilità di aumentare il carico organico, e ridurre i tempi di ritenzione. Ulteriori studi sono auspicabili per verificare la possibilità di utilizzare i batteri appartenenti ai due generi come veri e propri indicatori di funzionalità del processo di digestione anaerobica.

2.10.10 Confronto dell'efficienza energetica dei processi monostadio e bistadio

Nella tabella 11 vengono riportati i dati riassuntivi del SGP utilizzato per calcolare la resa energetica del processo di digestione anaerobica nelle configurazioni monostadio e bistadio.

Sia per il metano che per l'idrogeno le conversioni energetiche sono state effettuate sui rispettivi poteri calorifici inferiori: 31,65 kJ/L per il CH_4 e 11,11 kJ/L per l'idrogeno.

Tabella 11. Riassunto della performance della produzione di idrogeno e di metano in tutte le configurazioni

	M1 (5 g/L VS)	M2 (10 g/L VS)	B1 (5 g/L VS)	B2 (5 g/L VS)	B3 (10 g/L VS)
SGP ($\text{NL}_{\text{H}_2} \text{g}_{\text{VS}}^{-1}$)	-	-	-	0,115±0,02	0,62±0,01
SGP ($\text{NL}_{\text{CH}_4} \text{g}_{\text{VS}}^{-1}$)	0,28±0,016	0,23±0,01	0,36±0,02	0,34±0,13	0,22±0,01

In tabella 12 sono riportati i valori dell'energia estraibile dalla scotta per le diverse configurazioni di impianto e stimati sul parametro SGP ($\text{NL} \cdot \text{g}_{\text{VS}}^{-1}$). Per la sperimentazione a 5 g/L VS, con entrambe le configurazioni bistadio (B1 e B2), si ottiene un incremento dell'efficienza energetica del processo di digestione anaerobica del 28% e del 35%, rispettivamente. L'utilizzo della scotta ad un contenuto energetico superiore (10 g/L VS) determina un aumento dell'efficienza energetica del processo in bistadio (B3) di solo il 5% rispetto al monostadio M2.

Tabella 12. Energia generabile dalla scotta nelle diverse configurazioni sperimentali

	M1	M2	B1	B2	B3
kJ/g VS (da H_2)	-	-	-	1,28	0,69
kJ/g VS (da CH_4)	8,86	7,28	11,4	10,8	6,96
kJ tot/g VS	8,86	7,28	11,4	12,0	7,70

3 Studio di inoculi che promuovono la simbiosi batterica nei processi di digestione anaerobica

Questa parte della ricerca, già avviata nell'anno passato, è finalizzata ad approfondire le conoscenze sulle dinamiche delle comunità microbiche in relazione alle produzioni di biogas mediante DA, con particolare riguardo alla struttura di comunità a alle condizioni che promuovono le relazioni di simbiosi batterica.

Com'è noto il processo di DA è composto da una sequenza di fasi metaboliche operate da una complessa comunità microbica costituita da specifiche *guild*¹ funzionali di microorganismi [20] all'interno delle quali i metanogeni svolgono solo una parte, peraltro conclusiva, dell'intero processo.

Le fasi in genere sono riassunte molto schematicamente in:

- 1) fermentazioni primarie o acidogenesi, in cui i biopolimeri complessi sono convertiti in composti organici più semplici, come acidi grassi volatili (VFA), alcoli, zuccheri semplici e CO₂ da parte di *guild* di batteri fermentanti dotati in genere di enzimi idrolitici;
- 2) fermentazioni secondarie o acetogenesi con conversione degli acidi grassi volatili principalmente ad acetato, ed H₂/CO₂ svolte da batteri che conducono le loro attività metaboliche in simbiosi con i metanogeni; sono compresi in questo livello anche gli omoacetogeni, un gruppo di microorganismi con metabolismo versatile: eterotrofo, con consumo di acetato e produzione di H₂ e CO₂, o viceversa autotrofo, con consumo di H₂ e CO₂ per produrre acetato;
- 3) metanogenesi con produzione di biogas composto principalmente da CH₄ e CO₂ da parte di batteri metanogeni idrogenotrofi e metanogeni acetoclasti.

Le *guild* di microorganismi differiscono tra loro oltre che in ecologici anche in termini tassonomici ed evolutivi: infatti le prime due fasi sono operate da microorganismi appartenenti al dominio degli Eubatteri, l'ultima da microorganismi appartenenti al dominio degli Archea (cfr Relazione precedente annualità, RdS_2013_183 Valorizzazione energetica di scarti agrozootecnici).

Ogni *guild* è composta da dozzine di ceppi batterici che interagiscono tra loro anche se viene fornito una sola tipologia di substrato; la composizione stessa della *guild* cambia in risposta alle condizioni ecologiche del reattore che è, a tutti gli effetti, un ecosistema ingegnerizzato.

Le *guild* sono funzionalmente interconnesse tra di loro nello spazio e nel tempo, e stabilità e performance del processo di DA dipendono dall'equilibrio nella velocità di crescita dei principali gruppi di batteri in risposta ai parametri abiotici, cioè fisici, chimici e meccanici e a quelli biotici, comprendenti le interazioni tra microorganismi, con particolare riguardo a quelle simbiotiche.

Per simbiosi si intende una tipologia di interazione limitata a cooperazioni nelle quali ciascun partner dipende dall'altro per realizzare la propria attività metabolica e nelle quali la mutua dipendenza non può essere sostituita dall'aggiunta di co-substrati o qualsiasi altro tipo di nutrienti [21]: il termine è stato coniato alla fine degli anni '70 proprio per descrivere le cooperazioni obbligate tra batteri, incluso il caso della relazione tra batteri fermentanti che ossidano gli acidi grassi volatili (VFA) (Eubatteri) e i metanogeni idrogeno-ossidanti (Archea).

Sebbene i metanogeni siano evolutivamente molto diversificati, ed infatti è stato riconosciuto un elevato numero di specie, sono fisiologicamente molto specializzati dal momento che utilizzano solo un ristretto range di substrati peraltro semplici, quali H₂/CO₂, formato, alcuni composti metilici e acetato e perciò dipendono da altri microorganismi per degradare i composti organici complessi in substrati più semplici [22]. Dal canto loro eubatteri quali gli acetogeni, ottengono la rimozione dell'H₂ da essi stessi prodotto e ad essi tossico ad opera dei metanogeni idrogenotrofi [23].

Evolutivamente parlando è proprio la piccola quantità di energia ottenibile dalla conversione della sostanza organica in metano che ha costretto la comunità di microorganismi a mantenere una collaborazione altamente efficiente², mentre in termini funzionali si ritiene che la dimensione del pool dei batteri simbiotici, che fungono

¹ La *guild* è definita come un "gruppo di organismi in genere tassonomicamente relati, che svolgono funzioni simili in modo simile

² Si tratta di un processo metabolico molto meno esoergonico della respirazione aerobica o delle respirazioni anaerobiche. La conversione di un esoso a CH₄ rilascia solo il 15% dell'energia ottenibile dalla degradazione aerobica.

da intermediari tra i batteri delle fermentazioni primarie e i metanogeni, deve essere tenuto piccolo per consentire l'efficiente cooperazione di entrambi gli organismi partner [21].

Studi recenti stanno mettendo in luce l'importanza della disposizione spaziale ben strutturata e organizzata di batteri appartenenti alle diverse *guild* faciliti gli scambi metabolici ed il trasferimento di elettroni nei processi di DA tra acetogeni e metanogeni.

In particolare, ricerche condotte con la tecnica di microscopia in epifluorescenza FISH – Fluorescence In Situ Hybridization - con sonde specifiche per Archaea e per Eubatteri, hanno evidenziato come nei granuli compatti di biomassa batterica che si formano nei reattori UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) lo strato più esterno è costituito prevalentemente da acidogeni; la fascia intermedia è per lo più occupata da acetogeni ed idrogenotrofi mentre lo strato più interno di batteri centrale è composto da metanogeni; la parte centrale dei granuli non dà segnale di ibridazione e sembra costituita da residui cellulari e materiale inorganico.

Questa disposizione ben strutturata rende i singoli granuli unità autonome, ed efficienti nella produzione di metano e spiega perché i reattori UASB siano in grado di trattare acque reflue con un elevato carico di solidi sospesi producendo elevate quantità di metano. La struttura in granuli si associa inoltre alla predominanza di metanogeni del genere *Methanosaeta*, noti per essere acetotrofi obbligati [11], ed in conseguenza della loro specializzazione risultano altamente efficienti nella produzione di metano. Ed infatti è stato infatti rilevato che essi predominano durante la metanogenesi acetoclastica quando la produzione di metano è elevata [24].

Da un punto di vista impiantistico, la struttura in granuli fa sì che la comunità batterica sia più resistente al *wash-out* per l'elevata sedimentabilità dei granuli (diam. 0,1-1 cm), e nel complesso conferisce stabilità al processo di DA in continuo, rispetto a comunità a biomassa libera.

In queste ultime invece si ha la presenza e spesso la predominanza di metanogeni appartenenti al genere *Methanosarcina*, acetotrofi facoltativi, che all'acetato preferiscono il metanolo e le metilamine e adottano pertanto una strategia più generalista nello sfruttamento del substrato [23]. La loro predominanza consente alla comunità di produrre metano anche quando le condizioni di esercizio del reattore sono variabili e non costanti [25].

3.1 Sperimentazione

E' stato allestito un esperimento in batch volto a confrontare l'efficienza di produzione di metano utilizzando inoculi costituiti da comunità batteriche a) disaggregate, in cui il contatto fisico e la vicinanza tra cellule è fondamentalmente casuale e b) strutturate in granuli, con una disposizione ordinata dei diversi gruppi funzionali. La composizione quali-quantitativa degli inoculi, con particolare riguardo alla componente metanogena, è stata studiata mediante tecnica molecolare FISH.

La tecnica permette la visualizzazione, l'identificazione, l'enumerazione e la localizzazione di cellule batteriche metabolicamente attive senza dover ricorrere a tecniche colturali (cfr Relazione Accordo di Programma precedente annualità) e pertanto viene ampiamente utilizzata per identificare gruppi funzionali di batteri che sono fisiologicamente attivi nel processo di DA e gli *shift* quali-quantitativi delle comunità microbiche in risposta alle configurazioni di reattore ed ai parametri di esercizio.

L'analisi FISH è stata effettuata all'inizio dell'esperimento e dopo 36 giorni di produzione di metano. Alcuni passaggi della tecnica sono stati perfezionati sia per adeguarla alle caratteristiche degli inoculi sia per quanto riguarda i pretrattamenti enzimatici con Lisozima e Proteinasi-K al fine di aumentare la permeabilizzazione delle cellule Gram+.

L'esperimento è stato allestito in batch da 125 mL (3 repliche per condizione sperimentale) con un working volume di 50 mL; come mezzo è stata usata acqua distillata.

Come substrato è stata utilizzata paglia di grano che per la sua composizione lignocellulosica è un residuo agricolo tra i più resistenti alla digestione anaerobica; inoltre è presente come materiale non digerito anche nel letame degli erbivori, che viene usato per alimentare parte degli impianti di DA. La degradazione e scomposizione molecolare della paglia è resa difficile dalla struttura fisica del materiale: infatti la lignina contenuta nella paglia (contenuto intorno al 10-20%) forma una barriera di accesso agli enzimi idrolitici prolungando l'intero processo di DA.

La caratterizzazione del substrato in termini di solidi volatili, solidi totali e COD è riportata in Tabella 13.

Tabella 13. Solidi Totali, Solidi Volatili e COD della paglia di grano

		Paglia
TS	w/w %	92,64
VS	w/w %	84,38
COD*	gr O ₂ / gr di TS	1,32
COD**	gr O ₂ / gr di t.q.	1,22
COD**	kJ/gr di TS	18,77
COD**	kJ/gr t.q.	17,35

Per poter effettuare confronti tra produzioni di CH₄ ottenute con inoculi differenti, i batch sono stati inoculati o con digestato proveniente dall' impianto pilota ENEA reattore CSTR in cui la comunità è disgregata dalla continua agitazione - di seguito denominato inoculo CSTR – o, in alternativa, con granuli strutturati di biomassa batterica ottenuti da un modulo dello stesso impianto configurato come *Upflow Anaerobic Sludge Blanket*³– inoculo UASB (Figura25).

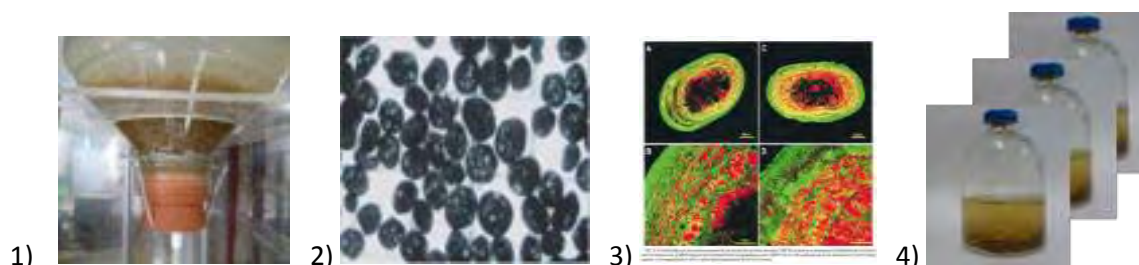


Figura 25. Immagini relative all'inoculo UASB: 1) il modulo dell'impianto pilota configurato come UASB; 2) immagini di repertorio delle comunità microbiche strutturate in granuli; 3) sezioni di granuli colorate mediante tecnica FISH [26]; 4) batch sperimentali allestiti con l'inoculo UASB.

Nella Tabella 14 è riportato lo schema del piano sperimentale.

Tabella 14. Schema del piano sperimentale

Condizioni Sperimentali Batch da 125 mL	Inoculo mL	Paglia di grano VS	Medium H ₂ O dist	Inoculo tipo	campioni per HPLC	pH start	Campioni per analisi FISH
CSTR + Paglia	10	8g/L	40 mL	CSTR	start/36 g	7,5 - 8	start/36 g
CSTR	10		40 mL	CSTR	start/36 g	7	start/36 g
UASB + Paglia	10	8g/L	40 mL	CSTR	start/36 g	7	start/36 g
UASB	10		40 mL	CSTR	start/36 g	7	start/36 g
Paglia		8g/L	40 mL	UASB	start/36 g	7	start/36 g

³ Cfr Gli inoculi sono stati ottenuti da un impianto pilota ENEA: nell'ambito del progetto METISOL (Coordinato dal Centro Ricerche FIAT - WP1 "Produzione di Bio-Metano per l'alimentazione di Impianti di steam reforming") è stato realizzato un digestore anaerobico a due fasi per la produzione di idrometano (miscela di H₂ e CH₄) da utilizzare nella trazione dei veicoli. L'impianto è dunque costituito da un primo reattore mirato alla produzione di H₂, ed un secondo, alimentato dal primo, per la produzione di metano (CSTR) (rapporto volumetrico 1:5 circa). In particolare, il primo reattore produce H₂ utilizzando come substrato la scotta, scarto ultimo delle produzioni lattiero-casearie. Il reattore è stato inizialmente inoculato con F210, una mix microbica di batteri idrogeno-produttori selezionata nei laboratori ENEA. Gli effluenti di questo reattore, nel quale sono realizzate idrolisi e acidogenesi, alimentano il secondo reattore che produce metano ed è stato inizialmente inoculato con liquame bufalino. In questo secondo reattore coesistono tutte le fasi della DA – idrolisi, acidogenesi, acetogenesi e metanogenesi. Inoltre in un recipiente di decantazione in uscita dal secondo reattore, i differenti parametri di processo determinano la granulazione della biomassa batterica (UASB). L'inoculo CSTR è stato prelevato quando il reattore era configurato come in monofase,

Le determinazioni quali-quantitative del biogas prodotto, CH₄, H₂, CO₂, sono state effettuate mediante Gas Cromatografia e uso di Water Displacement per misurare il volume di gas sviluppato; gli acidi organici volatili, l'acido lattico, gli alcoli e gli zuccheri. sono stati rilevati mediante analisi in HPLC. In Tabella 15 sono riportate le sonde oligonucleotidiche utilizzate nello studio delle comunità batteriche.

Tabella 15. Sonde oligonucleotidiche utilizzate nello studio delle comunità batteriche

Principale funzione Ecologica	Taxa	Sonda	Sequenze (5' -> 3')	rRNA Position	Referenze
Methanogenic	Archaea	ARCH915	GTGCTCCCCGCCAATTCCT	16S(915 – 934)	Stahl and Amann, 1991
Hydrogenotrophic Methanogenic	Methanobacteriales	MB1174	ACCTTGTCAGGTTCCATCTCC	16S(311-333)	Raskin et al., 1994
Hydrogenotrophic Methanogenic	Methanomicrobiales	MG1200b	CRGATAATTCGGGGCATGCTG	16S(1200-1220)	Crocetti et al., 2006
Aceticlastic Methanogenic	Methanosarcinales	MSMX860	GGCTCGCTTCACGGCTTCCT	16S (860-880)	Raskin et al., 1994
Aceticlastic Methanogenic (higher acetate concentration)	Methanosarcinaceae	MS821	CGCCATGCCTGACACCTAGCG AGC	16S (821-844)	Raskin et al., 1994
Aceticlastic Methanogenic (lower acetate concentration K strategy)	Methanosaetacea	MX825	TCGCACCGTGGCCGACACCTAG C	16S(825-847)	Raskin L. et al., 1994
Non methanogenic	Bacteria	EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	16S(338-355)	Amman et al., 1990
Non methanogenic	Bacteria	EUB338II	GCAGCCACCCGTAGGTGT	16S(338-355)	Daims et al., 1999
Non methanogenic	Bacteria	EUB338III	GCTGCCACCCGTAGGTGT	16S(338-355)	Daims et al., 1999
Idrolitic and Hydrogen producers	Gram+ - Firmicutes	LGC354a	TGGAAGATTCCCTACTGC		Meier et al., 1999
Idrolitic and Hydrogen producers	Gram+ - Firmicutes	LGC354b	CGGAAGATTCCCTACTGC		Meier et al., 1999
Idrolitic and Hydrogen producers	Gram+ - Firmicutes	LGC354c	CCGAAGATTCCCTACTGC		Meier et al., 1999
Idrolitic and Hydrogen producers	Clostridium	CHIS150	TTATGCGGTATTAATCTYCCTTT	16S(150-172)	Yi et al., 2012
Hydrogen producers	α -Proteobacteria	ALF1b	CGTTCGYTCTGAGCCAG	16S(19-35)	Manz et al., 1992
Hydrogen producers	α -Proteobacteria	ALF968	GGTAAGGTTCTGCGCGTT	16S(968-985)	Neef, 1997
Hydrogen producers	γ -Proteobacteria	GAM42a	GCCTTCCCACATCGTTT	23S(1027-1043)	Manz et al., 1992

3.2 Risultati

3.2.1 Produzione di biogas

Le maggiori produzioni di biometano (mL CH₄/L) si rilevano per paglia + inoculo UASB. A 36 giorni dall'inizio dell'esperimento, la produzione con inoculo UASB aveva raggiunto i 1450 mL/L rispetto a quella con inoculo CSTR che ha raggiunto 908 mL/L (Figura 26).

Le differenze tra le produzioni si sono conservate anche successivamente. Infatti l'esperimento è stato monitorato fino al 50° giorno, come si può vedere nel grafico riportato nella Figura 26, proprio per verificare se successivamente ai 36 giorni la produzione con inoculo CSTR potesse avere realizzato una sorta di "recupero" nella produzione.

A 36 giorni anche le percentuali di metano nel biogas erano maggiori per l'inoculo UASB, con valore medio di 51,7% (St Dev 1,3) rispetto all'inoculo CSTR per il quale la percentuale ha raggiunto il 43,8% (St Dev 0,87).

Anche l'avvio della produzione di metano è stato più rapido nel caso dell'inoculo UASB per il quale già a 13 giorni dall'inizio dell'esperimento la produzione ha raggiunto i 928 mL/L di CH₄ con una percentuale di CH₄ nel biogas di 38,2 contro i 375 mL/L di CH₄ raggiunti con l'inoculo CSTR ed una percentuale di metano del 20,6%. quasi la metà.

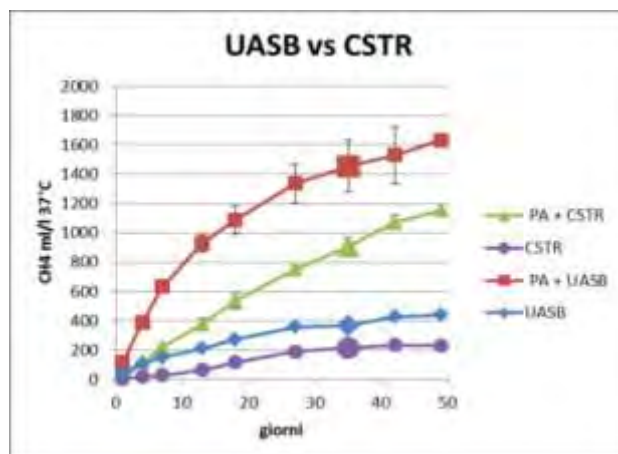


Figura 26. Curve cumulative delle produzioni di CH₄ con inoculo UASB e con inoculo CSTR; l'analisi delle comunità è stata effettuata dopo 36 giorni di sperimentazione, (simboli di dimensione maggiore); nella barra degli errori è riportata la deviazione standard per tre repliche

Mediante l'analisi HPLC degli acidi organici volatili, dell'acido lattico, degli alcoli e degli zuccheri, (Tabella 16) non si rilevano particolari concentrazioni per nessuno di questi componenti né nell'inoculo iniziale che dopo 36 giorni dall'inizio dell'esperimento, ed anzi a tale data alcune concentrazioni si sono ulteriormente ridotte indicando una buona funzionalità del processo di DA.

Tabella 16. Analisi in HPLC degli acidi grassi volatili, degli zuccheri e degli alcoli all'inizio dell'esperimento e dopo 36 giorni, quando sono state condotte le analisi delle rispettive comunità microbiche

START	succinico mg/l		lattico		formico		acetico		propionico		isobutirrico		butirrico		isovalerico		valerico	
t ₀	MEDIA	ST.DEV	MEDIA	ST.DEV	MEDIA	ST.DEV	MEDIA	ST.DEV	MEDIA	ST.DEV	MEDIA	ST.DEV	MEDIA	ST.DEV	MEDIA	ST.DEV	MEDIA	ST.DEV
CSTR PA	0	0,0	123,9	0,0	207,2	107,3	15,0	2,1	207,2	2,9	71,4	1,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
CSTR	0	0,0	0	0,0	0	0,0	9,3	0,9	180,2	0,7	71,0	1,6	0	0,0	0	0,0	0	0,0
UASB PA	10,9	0,8	0	0,0	208,3	1,4	0	0,0	0	0,0	72,8	1,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0
UASB	11,5	0,8	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	71,3	2,2	0	0,0	0	0,0	0	0,0
PA	3,2	0,3	27,3	0,8	218,9	0,7	0,6	1,0	1,0	1,7	64,9	4,4	0	0,0	0	0,0	0	0,0
AFTER 36 days																		
CSTR PA	0	0	4,4	7,7	0	0	68,8	55,1	65,7	25,1	101,4	3,6	0	0	0	0,0	0	0
CSTR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	69,9	2,4	0	0	0	0,0	0	0
UASB PA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	70,2	3,3	0	0	0	0,0	0	0
UASB	0,8	1,3	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	69,3	1,2	0	0	0	0,0	0	0
PA	60,2	3,0	0,2	0,4	14,3	0,3	79,8	0,5	0	0,0	83,2	1,2	0	0	0	0,0	0	0

zuccheri	Lattosio		Glucosio		Galattosio		1.3 Propano		Etanolo	
START	mg/l		mg/l		mg/l		mg/l		mg/l	
t ₀	MEDIA	ST.DEV	MEDIA	ST.DEV	MEDIA	ST.DEV	MEDIA	ST.DEV	MEDIA	ST.DEV
CSTR PA	172,7	1,5	0,0	0,0	18,3	1,1	180,8	1,6	0,0	0,0
CSTR	157,7	1,7	0	0,0	0	0,0	191,0	19,5	0,0	0,0
UASB PA	57,4	1,5	0	0,0	16,9	0,3	0	0,0	0	0,0
UASB	56,6	1,1	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
PA	0,0	0,0	0,0	0,0	24,4	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0
AFTER 36 days										
CSTR PA	170,5	5,5	0,0	0,0	0	0	66,1	114,4	0,0	0,0
CSTR	160,6	3	7,6	7	0	0	0	0	0	0
UASB PA	95,5	2	6,9	12	0	0	0	0	0	0
UASB	69,0	0,2	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
PA	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0	0,0

3.2.2 Analisi delle comunità con tecnica FISH

Le indagini sulle comunità ottenute dall'inoculo UASB e CSTR sono state condotte a 36 giorni dall'inizio dell'esperimento, quando era ancora elevata la produzione di metano e quindi la comunità esprimeva in pieno la sua attività. E' da rilevare che sia al t_0 che a t_{36} , nell'inoculo CSTR il segnale luminoso rilevato per gli Eubatteri (sonde EUB 338,a,b,c) è stato generalmente debole, e come indicato in letteratura, ciò corrisponde ad una attività metabolica debole. La stessa sonda applicata alla comunità UASB ha dato segnali luminosi molto marcati e nitidi, indicando una intensa attività metabolica (Figura 27). I valori percentuali sono riferiti ai batteri positivi per ogni sonda utilizzata rispetto al numero totale di cellule rilevate con la colorazione DAPI (Figura 28).

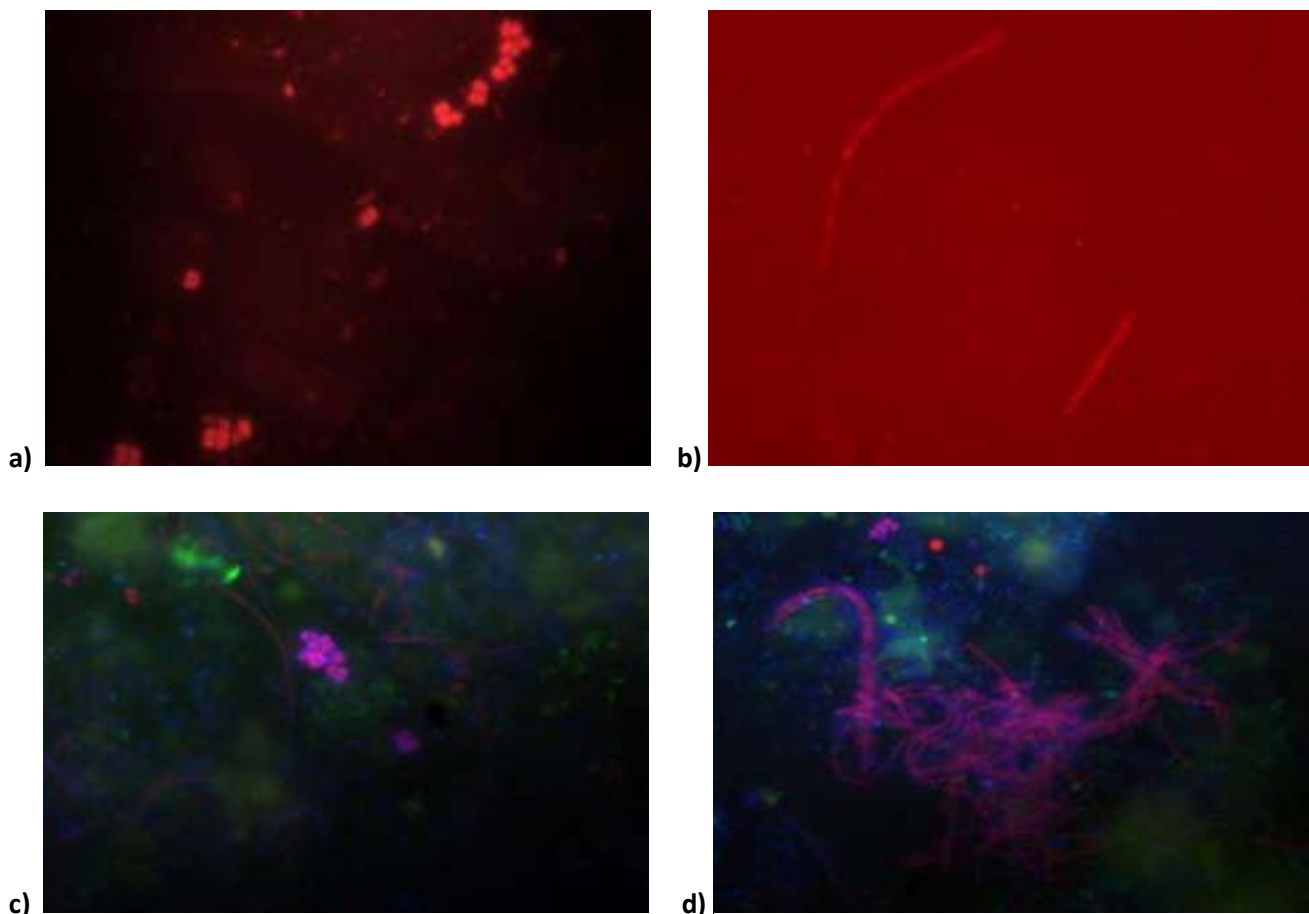


Figura 27. Immagini in microscopia di campioni di comunità analizzati mediante tecnica FISH utilizzando sonde specifiche a) Methanosarcinae in CSTR (MS821 marcato con Indocarbocianina – Cy3) e b) Methanosaeta in UASB (MX825 marcata con Indocarbocianina – Cy3; in c) e d) Eubatteri ed Archea rispettivamente in CSTR e in UASB (Archea sonda Arch 915 marcata Cy3 Eubacteria sonde EUB 338, a,b,c, marcate con Fluoresceina FLUO); in queste ultime immagini è presente anche la colorazione in DAPI

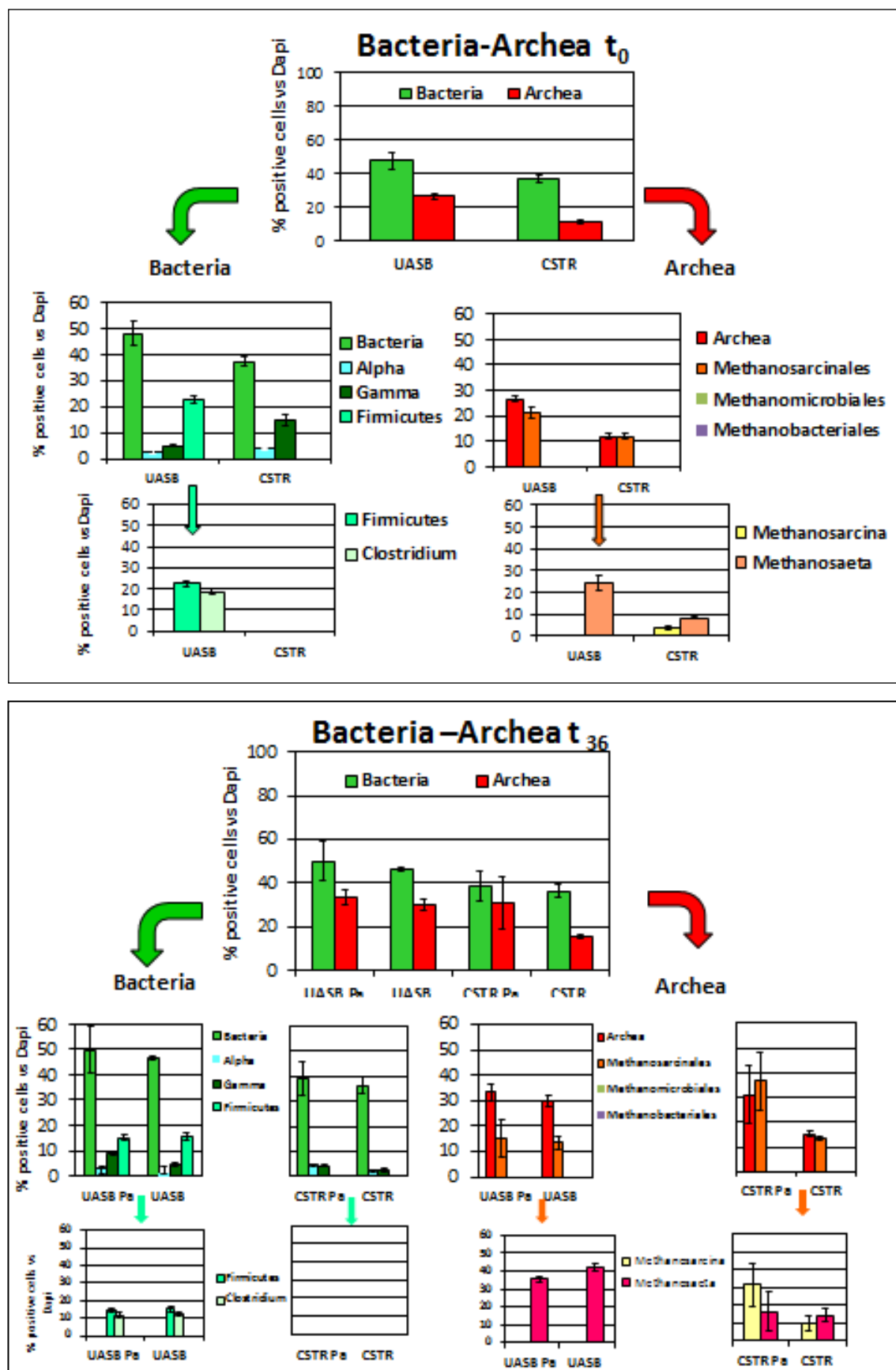


Figura 28. Analisi della comunità batterica per le condizioni paglia+UASB e paglia+CSTR a 36 giorni dall'inizio dell'esperimento (t_{36}) rispetto alle comunità UASB e CSTR, utilizzate come inoculo, t_0 Percentuale di batteri rilevati per ogni specifica sonda utilizzata rispetto al numero totale di cellule rilevate con la colorazione DAPI; nella barra dell'errore è riportata la deviazione standard per tre repliche

3.2.3 Analisi degli inoculi (t_0)

L'analisi FISH ha messo in evidenza come nell'inoculo UASB il 48,0% dei batteri sia positivo al dominio dei Bacteria, mentre il 26,7% è positivo per il dominio degli Archea per un totale di cellule rilevate rispetto al DAPI del 74,7%. Nel CSTR di contro, si rilevano percentuali più basse per entrambi i taxa, rispettivamente 37,3% di Bacteria e 11,3% di Archea. E' evidente che gli Archea pesano maggiormente nella composizione dell'inoculo UASB di cui costituiscono circa 1/3 della comunità, mentre nell'inoculo CSTR gli Archea costituiscono circa 1/4 della comunità. E' ipotizzabile che la scarsa percentuale di EUB rilevata sia da attribuire alla scarsa attività metabolica delle cellule rilevate con DAPI.

Nell'inoculo UASB è stato possibile individuare, all'interno del dominio dei Bacteria, la predominanza di batteri LGC, comprendenti i Firmicutes (22,4%). Altri due taxa di rilievo finora individuati nel dominio dei Bacteria, sono quelli relativi agli Alpha-Proteobacteria (2,6%) e a quello dei Gamma-Proteobacteria (5%). Utilizzando sonde più specifiche è stato possibile rilevare all'interno di questo gruppo batteri appartenenti al genere Clostridium (18,6%) noti per avere notevoli capacità idrolitiche ed essere produttori di H_2 .

Nel CSTR non sono stati rilevati batteri positivi alla sonda LCG; anche la sonda più specifica per i batteri appartenenti al genere Clostridium, appartenenti al gruppo dei LGC, concordemente non ha dato alcun segnale. In questo inoculo predominano invece i Gamma-Proteobacteria (14,6%) e sono anche gli Alpha-Proteobacteria (3,7%). Entrambi i gruppi includono batteri che sono in grado di produrre idrogeno.

All'interno degli Archea si rileva la dominanza dei Methanosarcinales per entrambi gli inoculi ma con percentuali del 21,2 per UASB e 11,9 per CSTR.

Di grande rilievo è che in UASB tutti i Methanosarcinales appartengono al genere Methanosaeta, acetotrofi obbligati, mentre in CSTR i 2/3 degli Archea sono Methanosaeta ed il restante 1/3 circa sono Methanosarcina. Le sonde specifiche per i metanogeni idrogenotrofi appartenenti agli ordini Methanobacteriales e Methanomicrobiales non hanno prodotto nessun segnale positivo per entrambi gli inoculi.

3.2.4 Analisi delle comunità (t_{36})

Per tutte le condizioni sperimentali aumenta la percentuale di Archea nelle comunità:

- per l'inoculo UASB su paglia la percentuale aumenta fino del 33,4% con una percentuale di Bacteria del 49,8%. Per la condizione di controllo UASB (solo inoculo senza paglia) a 36 giorni i rispettivi valori sono del 30,0% e 46,4%;
- per l'inoculo CSTR su paglia la percentuale di Archea aumenta fino del 31,2% con una percentuale di Bacteria del 28,8%. Per la condizione di controllo CSTR a 36 giorni i rispettivi valori sono del 15,3% e 36,5%;

Più nello specifico:

Condizione UASB + paglia: aumentano gli Alpha-Proteobacteria (3,3%) e i Gamma-Proteobacteria (9,1%) mentre diminuiscono i Firmicutes (15%) e, al loro interno, i batteri del genere Clostridium (11,4%). Il controllo, solo UASB senza paglia, mostra invece una riduzione percentuale dei microrganismi attivi, per tutte le sonde testate mettendo in evidenza che la presenza del substrato lignocellulosico (paglia), è una condizione indispensabile per lo sviluppo della comunità attiva. In entrambi le condizioni il rapporto Archea/Eubatteri si mantiene intorno ad 1,5% (1,48; 1,54% rispettivamente). L'analisi FISH nell'ambito degli Archea ha mostrato che per UASB + paglia permane la dominanza assoluta dei Methanosaeta ed anzi i valori percentuali si accrescono ulteriormente rispetto all'inoculo di partenza contro passando da 21,2% a 35,3%. Questa dominanza ben concorda con le maggiori produzioni di metano osservate per questa condizione sperimentale, come si può osservare dal grafico.

Condizione CSTR + paglia: le percentuali mostrano un aumento degli Alpha-Proteobacteria (4,5%) e una riduzione dei Gamma-Proteobacteria (4,2%). Anche per il controllo, solo CSTR, invece si registra una riduzione dei valori percentuali. Nell'ambito degli Archea permane la ripartizione tra i due generi, Methanosarcina e Methanosaeta ma con valori rispettivamente del 31,3% e del 16,5%, mostrando anche in questo caso un

incremento numerico nella guild dei metanogeni. D'altra parte a tale incremento, non molto dissimile da quello osservato per l'inoculo UASB, non corrisponde però un aumento relativo alla produzione di metano. In tutti i campioni osservati con le sonde specifiche per i metanogeni idrogenotrofi non è stato rilevato alcun segnale positivo per gli appartenenti agli ordini Methanobacteriales e Methanomicrobiales.

3.3 *Discussione*

E' ormai confermato che qualsiasi scarto organico ha un contenuto energetico potenziale e può essere convertito in biogas, cioè trova un'opportuna valorizzazione energetica, se si individua la giusta miscela di codigestione e, soprattutto, l'idonea comunità batterica, in termini di struttura e composizione.

Con questo lavoro è stato verificato che la DA di biomasse di scarto procede più velocemente e con una maggiore produzione di metano se la comunità batterica usata come inoculo è organizzata in granuli caratterizzati da biomassa stratificata cioè con una disposizione in cui sono particolarmente facilitati gli scambi trofici tra microorganismi appartenenti alle diverse *guild* funzionali.

D'altra parte ulteriori studi saranno necessari per approfondire le complesse interazioni biochimiche tra *guild* di microorganismi ed all'interno delle stesse *guild*, al fine di raggiungere la stabilità ed il miglioramento delle performance nella produzione di metano.

Inoltre, sarebbe auspicabile che il monitoraggio delle comunità attive nei processi di DA, oggi condotto solo a livello sperimentale, diventi di routine nell'industria della DA, al fine di poter intervenire sulle comunità microbiche coinvolte al fine di modificarne composizione, struttura e caratteristiche per migliorare la produzione di biometano.

4 Uso di microalghe per l'alimentazione di impianti a biogas

Le microalghe sono considerate biomasse di terza generazione per la loro elevata efficienza di fotoconversione in biomassa che, sulla base dell'attuali conoscenze, potrebbe raggiungere il 5% dell'energia solare (5% vs 1% delle piante terrestri). Sebbene non si chiaro quale sia il processo tecnologico più efficiente per la produzione di biocarburanti dalla biomassa microalgale (biodiesel, bioetanolo, biometano), recentemente l'interesse si sta focalizzando sul suo potenziale utilizzo negli impianti di digestione anaerobica per la produzione di biometano in alternativa alle biomasse provenienti da colture energetiche; inoltre l'assenza di lignina le rende substrati più facilmente fermentabili. Tuttavia, sebbene sia opinione comune che la biomassa microalgale possa essere una soluzione alla problematica della competizione tra biocarburanti e cibo nella dieta umana e animale, ciò è parzialmente vero in quanto le microalghe sono già attualmente utilizzate come alimento [27]. Si può indubbiamente parlare di attenuazione della problematica in quanto, a differenza delle coltivazioni energetiche che utilizzano suoli arabili, la coltivazione delle microalghe può essere effettuata su suoli non arabili, in fotobioreattori chiusi, in laghi ed oceani.

Il primo studio di digestione anaerobica di biomasse algali e microalgali è stato effettuato nel 1957 da Golueke et al.[28]. Successivamente a studi sporadici effettuati negli anni '80 e '90, l'interesse per l'utilizzo della biomassa microalgale per la produzione di biometano si è intensificato a partire dalla prima metà degli anni 2000 [29,30,31,32,33,34,35,36,37]. Harun et al. [38] hanno dimostrato che una quantità di energia più elevata viene ottenuta tramite l'utilizzo delle microalghe per la produzione di metano (14.04 MJ/kg TS) rispetto al loro utilizzo per la produzione di biodiesel (6.6 MJ/kg TS) o di etanolo (1.79 MJ/kg TS). Inoltre, fino al 65% dell'energia chimica contenuta nella biomassa microalgale può essere estratta come biometano [39].

In due studi effettuati su diverse specie microalgali, sia marine che di acqua dolce, viene sottolineata l'importanza di effettuare test specifici di digestione anaerobica su singole specie microalgali in quanto il valore potenziale di metano non può essere dedotto dalla loro appartenenza filogenetica [34,36]. Le microalghe, infatti, differiscono per composizione biochimica, struttura della parete cellulare, rilascio diretto ed indiretto di sostanze che possono inibire il processo di digestione anaerobica [33]. Inoltre la composizione biochimica di differenti specie di microalghe, tramite cui è possibile stimare la produzione potenziale teorica di metano, è direttamente influenzata dalle condizioni di crescita [33]. È possibile stimare una resa teorica di metano dalla biomassa microalgale sulla base di una formula elementare mediata $C_{2.11} H_{3.93} O N_{0.26}$ [40]. La resa massima di CH_4 sarebbe allora di $0.55 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4 / \text{kg TVS}$, anche se questo probabilmente può non essere raggiunto, in pratica, a causa di materiale recalcitrante che è sempre presente in qualsiasi sostanza organica. Questo valore stechiometrico generico potrebbe anche sottovalutare la resa di metano ottenibile da microalghe ricche in lipidi. Ad esempio, microalghe contenente 40% di lipidi, 20% di carboidrati e 28% di proteine avrebbero una resa teorica di $0.68 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4 / \text{kg TVS}$. Ciò evidenzia l'importanza di usare dati reali di produzione di metano da biomassa algale piuttosto che stime teoriche.

In questo studio cinque diverse specie microalgali marine, quattro appartenenti alla classe delle *Coccolodiscophyceae* (*Cyclotella triptica*, *Thalassiosira rotula*, *Thalassiosira weissflogii*, *Thalassiosira weissflogii* P09) e una a quella delle *Bacillariophyceae* (*Phaeodactylum tricornutum*) sono state utilizzate come substrato nel processo di digestione anaerobica per determinare la produzione potenziale di metano. I pellet microalgali provengono dal CNR-ICB di Napoli. Le specie microalgali utilizzate sono diatomee che possono, in determinate condizioni, flocculare, facilitando la sedimentazione della biomassa algale. Questa proprietà è molto importante perché, in generale, l'utilizzo delle colture microalgali richiede una concentrazione della biomassa, passaggio molto costoso e che rappresenta uno dei limiti nei processi di produzione dei biocarburanti. Inoltre le diatomee sono costituite da frustuli di silice che permettono la sedimentazione spontanea nel giro di poche ore.

4.1 Procedura sperimentale

a) Caratterizzazione chimica del substrato

E' stato effettuata l'analisi del contenuto di biomassa organica secca (TS) dei pellet microalgali mediante essiccazione a 105 °C per 24 ore. E' stato poi determinato il contenuto in solidi volatili (VS) in muffola a 550 °C per 24 ore.

b) Test di produzione di metano da biomassa microalgale

Sono stati effettuati test in batch a 38°C, in fermentatori da 120 mL nei quali a 50 mL di liquame, veniva aggiunta una quantità di biomassa algale fresca corrispondente a 0,42g TS. Il rapporto inoculo/biomassa utilizzata è stato scelto sulla base del lavoro di Musgnug et al. [34]. Il bianco veniva effettuato con 50 mL di liquame senza aggiunta della biomassa microalgale.

Il liquame, utilizzato come inoculo, proveniva da una fermentatore da un litro lasciato in batch per 30 giorni a 38°C. I fermentatori erano chiusi con tappi di gomma butilica e sigillati con delle ghiere in alluminio deformabili. L'anaerobiosi era assicurata tramite insufflaggio di azoto. I test erano effettuati in triplicato.

c) Analisi qualitativa del biogas

Il biogas prodotto è stata rilevato con il metodo dello spostamento di acqua[41].

La percentuale di H₂, CH₄ e CO₂ nel biogas prodotto è stata quantificata tramite l'utilizzo di un gascromatografo Thermo equipaggiato con colonna impaccata (Hayesep Q 800/100 mesh), rilevatore a conducibilità termica (TCD) e con l'azoto come gas *carrier* (30-35 mL/min). Le temperature di esercizio della colonna, dell'iniettore e del rivelatore erano rispettivamente di 120 °C , 120 °C e 200 °C.

d) Analisi quantitativa del biogas

La produzione cumulativa di CH₄ è stata calcolata utilizzando l'equazione, "Eq. (1)", di bilancio di massa (Logan et al., 2002):

$$VCH_{4,i} = V_{H,i-1} + CH_i (V_{G,i} - V_{G,i-1}) + V_H (CH_i - CH_{i-1}) \quad (1)$$

Dove V_{H,i} e V_{H,i-1} sono i volumi di CH₄ cumulativi agli intervalli di tempo in corso (i) e quelli precedenti (i-1), rispettivamente. V_{G,i} e V_{G,i-1} sono i volumi del biogas totale prodotto e CH_i e CH_{i-1} sono le frazioni di CH₄ agli intervalli di tempo in corso e quello immediatamente precedente, rispettivamente. V_H è il volume totale dello spazio testa nel reattore.

4.2 Risultati

In Tabella 17 è riportato il contenuto di solidi totali e volatili delle microalghe. Nella Figura 29 sono riportare le cinetiche di produzione del metano. Come si può osservare per tutte le specie al 22° giorno viene raggiunto circa l'80-90% della produzione totale. In Tabella 18 sono riportate le rese di metano (mL CH₄/g VS) delle specie microalgali e la concentrazione (%) di metano nel biogas. La resa in metano varia da 340 a 640 mL CH₄/g VS. Il contenuto specifico di metano nel biogas è elevato e varia dal 60 al 64%. Come si può osservare esistono differenze rilevanti non solo tra singole specie algali, come rilevato da altri autori, ma anche all'interno della stessa specie.

Tabella 17. Contenuto in sostanza secca e volatile (%) nelle specie microalgali

Specie algale	TS (%)	VS (%) w/w
<i>C. cryptica</i>	18,1±0,12	12,4±0,13
<i>T. weissflogii</i> P09	15,5±0,63	10,9±0,40
<i>T. rotula</i>	12,5±0,02	7,32±0,04
<i>P. tricornutum</i>	21,2±0,15	14,4±0,18
<i>T. weissflogii</i>	19,1±0,01	8,92±0,07

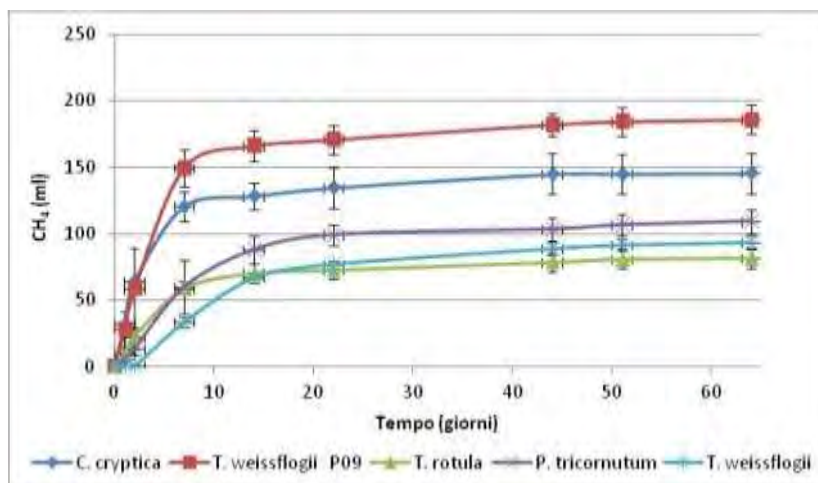


Figura 29. Produzione cumulativa di metano (mL) delle microalghe

Tabella 18. Produzione specifica di metano e concentrazione (%) nel biogas

Specie algale	mL CH ₄ / g VS	CH ₄ (%)
C. cryptica	502±53	64
T. P09	640±38	62
T. rotula	340±33	60
P. tricornutum	390±32	64
T. weissflogii	491±26	63

4.3 Discussione

Questo studio dimostra il buon potenziale di alcune microalghe come biomassa di terza generazione per la produzione di biogas, ma resta ancora da dimostrarne la convenienza economica.

Nel caso della più produttiva (*Thalassiosira weissflogii* P09), l'impianto di produzione in campo ha dimostrato di poter produrre circa 40 t Ha⁻¹ anno⁻¹ di sostanza secca. L'impianto è costato circa 1,5 M€ e per la sua gestione si stimano circa 100.000 €/anno tra materiali e personale (non è compreso il costo del suolo). E' opportuno considerare che per ottenere la stessa resa in metano da silomais (circa 80 t) la spesa si aggirerebbe intorno ai 5000 €/anno. Scartando del tutto le colture energetiche di prima generazione lo stesso risultato si otterrebbe con 80 tonnellate di siero di latte o 160 tonnellate di letame/liquame animale che sono scarti agricoli incentivati.

A questo punto viene naturale chiedersi, perché perseguire la coltivazione delle microalghe a fini energetici?

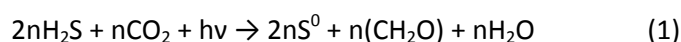
La nostra opinione è che fin quando si sperava di poterne fare biocombustibili liquidi a basso costo per sostituire i derivati petroliferi (nella prospettiva di un loro esaurimento) forse era ragionevole sperimentare, ma come biomasse per alimentare impianti a biogas non se ne vede alcuna utilità e convenienza fin quando la nostra civiltà continuerà a generare rifiuti organici che devono essere necessariamente smaltiti. E' facile dimostrare che la migliore soluzione per smaltire i rifiuti organici è la digestione anaerobica in un impianto, in quanto molti ottimi studi hanno dimostrato che è la soluzione a minor impatto ambientale.

Per le microalghe c'è sicuramente mercato per quei paesi dove c'è carenza di cibo ed alcune coltivazioni come quella della *Spirulina* può far fronte a tale carenza, grazie al suo elevato contenuto proteico e la facilità di coltivazione e raccolta.

5 Studio e sperimentazione di metodi biologici per la purificazione del biogas

L'obiettivo della ricerca è sviluppare un metodo biologico efficace e a basso costo per abbattere il contenuto in idrogeno solforato (H_2S) del biogas. Lo studio è stato avviato nelle due precedenti annualità dell'Accordo di Programma e in questo ultimo anno di ricerca l'obiettivo specifico è quello di dimostrare il processo su scala di laboratorio, ma in continuo, collegando un fotobioreattore ad un impianto pilota di DA in funzione nei nostri laboratori. A tal scopo si è realizzato un fotobioreattore (FBR) (3 litri, di tipo CSTR) contenente una coltura attiva di *Chlorobium limicola*. Sono state effettuate due prove in continuo nelle quali il fabbisogno di zolfo è stato assicurato fornendo rispettivamente biogas proveniente da un impianto pilota di DA e una miscela sintetica di biogas contenente H_2S .

Il fotobioreattore si basa sul processo di fotosintesi anossigenica (Equazione 1), operata dal batterio *C. limicola*, mediante il quale l' H_2S viene convertito in zolfo elementare [42].



Per valutare l'efficienza del processo fotosintetico, sono stati messi a punto i protocolli analitici per la determinazione dei composti dello zolfo coinvolti nell'equazione 1, con particolare riguardo alla determinazione dello zolfo elementare mediante HPLC [43,44].

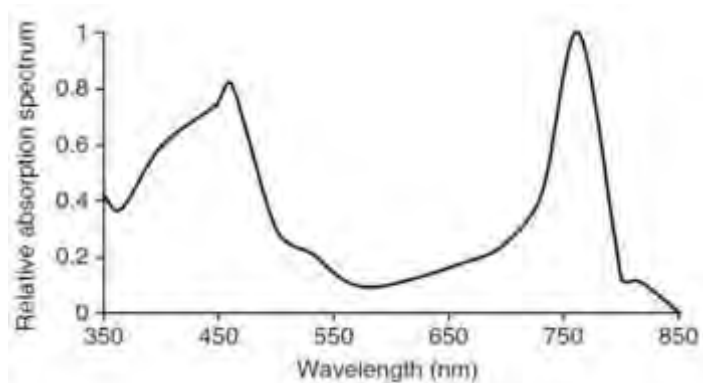


Figura 30. Spettro di assorbimento di *C. Limicola* [45]

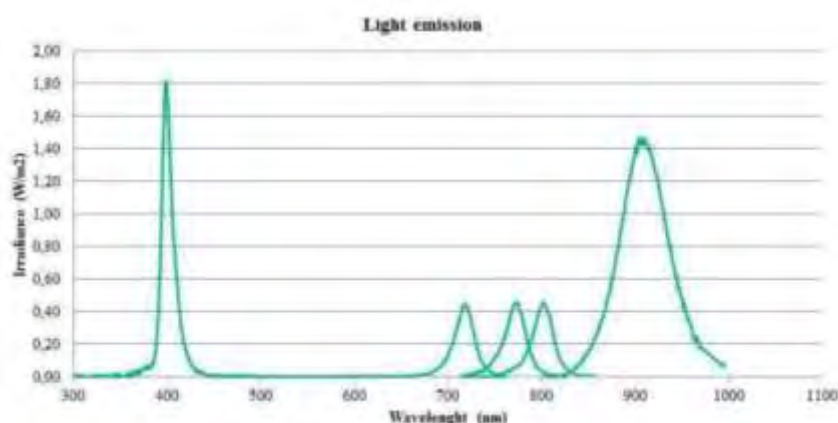


Figura 31. Spettri di emissione dei LED utilizzati nell'esperimento. Lo spettro del LED che emette a 1000 nm non è rappresentato per limite strumentale dello spettroradiometro utilizzato per le misure

Il fotobioreattore è esposto alla luce in un illuminatore multispettrale, progettato sulla base dello spettro di assorbimento di *C. limicola* (Figura 30) dotato di LED monocromatici alle lunghezze d'onda 400, 720, 770, 810, 900, 1000 nm (Figura 31) disposti in tre linee (8 LED per ciascuna lunghezza d'onda) disposte a 120°. I LED di

ciascuna lunghezza d'onda possono essere accesi indipendentemente l'uno dall'altro e regolati in intensità luminosa.

In ciascun esperimento è stato calcolato il bilancio di massa considerando i valori di concentrazione di tutti i composti dello zolfo coinvolti nella reazione (1) per verificare l'assenza di solfati nel brodo di coltura.

Nel primo esperimento il fotobioreattore è stato inserito a valle di un impianto pilota di DA, alimentato a scotta facendo gorgogliare il biogas prodotto nella coltura batterica e monitorando la concentrazione di H_2S in entrata e in uscita dal FBR (Figura 32).

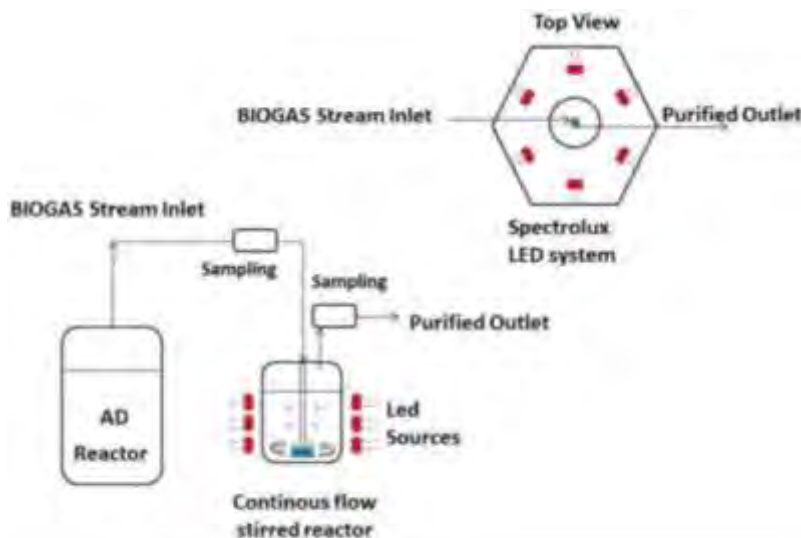


Figura 32. Schema tecnico del fotobioreattore cilindrico inserito a valle di un impianto di DA

Per tutta la durata dell'esperimento, il biogas (composizione %: CH_4 57, CO_2 41, O_2 0,1, H_2 0,02, H_2S 0,06) ha mantenuto un flusso di circa 20 mL min^{-1} e una concentrazione di H_2S intorno a 600 ppm. Al FBR è stata fornita una irradianza di 1 W m^{-2} . La concentrazione di H_2S nel biogas "purificato" in uscita dal FBR si è attestata intorno a 34 ppm (Figura 33).

Il processo ha mostrato un'efficienza intorno al 95% di media durante l'intera durata dell'esperimento. Dal grafico di Figura 33, si osserva che la concentrazione dell' H_2S in uscita è costante, mentre è variabile in entrata. Sono state effettuate anche delle prove di bianco (FBR caricato con il solo terreno di coltura ma senza inoculo batterico) e di buio (FBR non illuminato). In queste due prove la concentrazione di H_2S in uscita dal sistema risulta di circa il 10% inferiore a quella in entrata per effetto della parziale dissoluzione del solfuro nella fase liquida.

Durante tutto l'esperimento non sono stati rilevati solfuri disciolti e non c'è stato accumulo di SO_4^{2-} , inoltre la coltura batterica non si è sviluppata in maniera significativa. Infatti, la concentrazione di batterioclorofilla c (BChl c), indicatore della biomassa batterica, ha subito un incremento da $4,1 \text{ mg L}^{-1}$ a $4,6 \text{ mg L}^{-1}$.

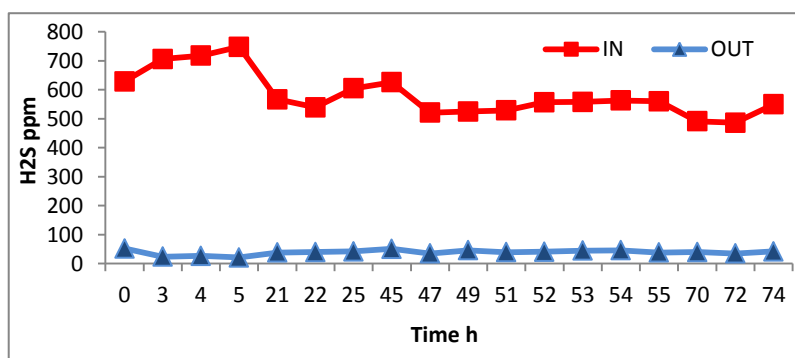


Figura 33. Concentrazione di H_2S nel biogas prodotto da un impianto di DA in entrata ed in uscita dal fotobioreattore nei quattro giorni di durata dell'esperimento

Nel secondo esperimento si è voluto testare il fotobioreattore con una più alta concentrazione di H_2S . L'esperimento è stato condotto alimentando il FBR con biogas sintetico contenente 2000 ppm di H_2S e mantenendo il flusso a 20 mL min^{-1} nelle stesse condizioni di illuminazione dell'esperimento precedente. L'abbattimento dell' H_2S si è attestato intorno a 86% (H_2S 282 ppm) nel primo giorno di attività fino ad arrivare a 80% nel quinto (H_2S 400 ppm) (Figura 34).

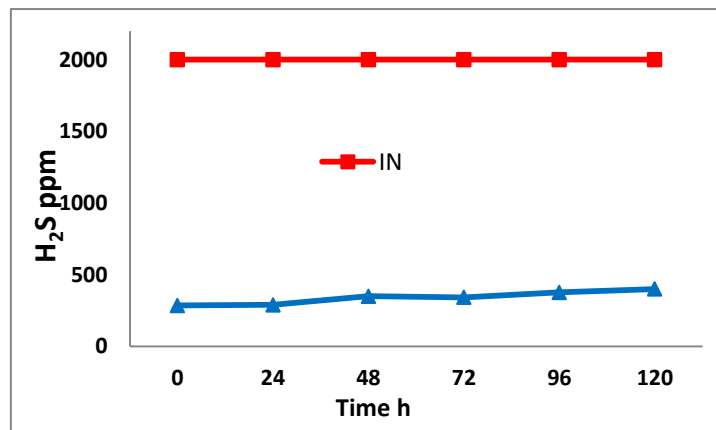


Figura 34. Concentrazione di H_2S nel biogas sintetico in entrata ed in uscita dal FBR

Durante tutta la durata dell'esperimento, le analisi dei solfuri disciolti sono risultate negative, pertanto abbiamo attribuito il parziale (seppur alto) abbattimento alla mancata solubilizzazione del solfuro durante il gorgogliamento del biogas all'interno del FBR. Per effetto della più elevata concentrazione dell'idrogeno solforato in entrata, la biomassa batterica si è sviluppata in misura maggiore del precedente esperimento, infatti il contenuto in BChl *c* è incrementato da $4,5 \text{ mg L}^{-1}$ a $5,6 \text{ mg L}^{-1}$.

5.1 Discussione

I risultati ottenuti sono incoraggianti in quanto dimostrano che l'abbattimento, anche se non totale, avviene anche a concentrazioni elevate di H_2S ed a costi molto bassi. La tecnologia sperimentata presenta le potenzialità per essere utilizzata nei processi di *clean up* del biogas operando delle modifiche che consentano una più efficiente solubilizzazione dell' H_2S dal biogas da trattare. Il processo mostra anche una buona sostenibilità economica se si considera l'esiguo consumo di energia (1 W m^{-2}) che serve a fornire al filtro biologico l'illuminazione specifica con l'impiego dei fotodiodi LED.

6 Conclusioni

- Si è dimostrata l'efficacia di un impianto bistadio per la digestione anaerobica della scotta riducendo il tempo di ritenzione della fase metanogenica a 7,5 giorni con una prefermentazione di 12-24 ore.
- Le indagini microbiologiche con la tecnica FISH hanno dimostrato la maggiore efficacia quantitativa e qualitativa della produzione di metano in presenza di popolazioni microbiche strutturate in granuli, per la stretta cooperazione tra Eubatteri ed Archea.
- La produzione di metano da un substrato lignocellulosico (paglia) aumenta del 30% circa in presenza di funghi anaerobi e batteri idrolitici,
- I risultati ottenuti trattando, la chitina, con batteri idrolitici ed uno starter di acidi organici (corn liquor) indicano che da questo scarto dell'industria ittica è possibile produrre biogas con una concentrazione di metano anche del 70%;
- Le prove di metanazione di 5 differenti specie di diatomee marine dimostra un'alto potenziale per la produzione di metano che però trova ancora ostacolo pratico nel bilancio economico sfavorevole tra realizzazione e gestione dell'impianto di produzione e resa economica della biomassa.
- L'abbattimento dell' H_2S in continuo in un fotobioreattore da 3 litri alimentato da biogas prodotto dall'impianto pilota bistadio ha raggiunto un'efficienza del 95%.

Inoltre, sono state ulteriormente sviluppate tecniche analitiche e microbiologiche che permettono di espandere la capacità di indagine finalizzate al miglioramento delle tecnologie per la Digestione Anaerobica.

In particolare, sono stati messi a punto i seguenti protocolli:

1. Isolamento e sviluppo di colture di funghi anaerobi per potenziare l'idrolisi delle biomasse lignocellulosiche (in collaborazione con l'Università della Tuscia);
2. tecnica FISH (Fluorescence In Situ Hybridization – Microscopia in Fluorescenza) per lo studio dei cambiamenti in composizione, struttura e funzione delle comunità batteriche attive nella DA;
3. determinazione analitica dei diversi composti dello zolfo presenti in soluzione nel fotobioreattore utilizzato per il *clean up* del biogas (solfuri, zolfo elementare, solfati).

7 Riferimenti bibliografici

1. R.I. Amann, "In situ identification of microorganisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes", *Molecular microbial ecology manual*, (1995), pp. 3.3.6/1–3.3.6/15, Kluwer, London.
2. A. Barra Caracciolo, P. Grenni, C. Cupo, S. Rossetti, "In situ analysis of native microbial communities in complex samples with high particulate loads", *FEMS Microbiology Letters*, 253 (2005), pp. 55–58.C.
3. J.F. Pernthaler, O. Glockner, W. Schonhuer, R. Amann, "Fluorescence in situ hybridization (FISH) with r-RNA –targeted oligonucleotide probes", *Methods in Microbiology*, 30 (2001), pp. 207–26.
4. C. Dinamarca, R. Bakke, "Apparent hydrogen consumption in acid reactors: observation and implication", *Water Science Technology*, 59 (7) (2009), pp. 1441–1447.
5. C. Dinamarca, M. Liu J Ganan, R. Bakke, "H₂ consumption by anaerobic non-methanogenic mixed culture", *Water Science Technology*, 63(8-9) (2011), pp. 1583–1589.
6. N. M. C. Saady, "Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge", *Int. J. of Hydrogen Energy*, 38(2013), pp. 13172–13191.
7. M. Krupp and R. Widmann, "Biohydrogen production by dark fermentation: experiences of continuous operation in large lab scale", *Int. J. of Hydrogen Energy*, 34 (2009), 4509–4516.
8. J.S. Jeris, P.L. McCarty, The biochemistry of methane fermentation using 14C tracers. *J. Water Pollution Contr. Fed.* (1965) 37:178–192.
9. C. Wandrey, A. Aivasidis, Continuous anaerobic digestion with *Methanosarcina barkeri*. (1983) *Ann. NY Acad. Sci.* 413:489–500
10. J. Auguet, A. Barberan, E.O. Casamayor, Global ecological patterns in uncultured Archaea. (2010) *ISME J.* 4:182–190
11. K.S. Smith and C. Ingram-Smith, "Methanosaeta, the forgotten methanogen?", *Trends in Microbiology*, 15 (2007), 4, pp. 150–155.
12. S. Kato and K. Watanabe, "Ecological and Evolutionary Interactions in Syntrophic Methanogenic Consortia. *Microbes Environ*", 25 (2010), 3, pp. 145–151.
13. J. De Vrieze, T. Hennebel, N. Boon, W. Verstraete, "Methanosarcina: The rediscovered methanogen for heavy duty biomethanation", *Bioresour. Technol.*, 112(2012), pp. 1–9.
14. B. Calli, B. Mertoglu, B. Inanc, O. Yenigun, "Community changes during start-up in methanogenic bioreactors exposed to increasing levels of ammonia", *Environ. Technol.*, 26 (1) (2005), pp. 85–91.
15. A. Conklin, H.D. Stensel, J. Ferguson, "Growth kinetics and competition between *Methanosarcina* and *Methanosaeta* in mesophilic anaerobic digestion", *Water Environ. Res.*, 78 (5) (2006), pp. 486–496.
16. K.D. McMahon, D.D. Zheng, A.J.M. Stams, R.I. Mackie, L. Raskin, "Microbial population dynamics during start-up and overload conditions of anaerobic digesters treating municipal solid waste and sewage sludge", *Biotechnol. Bioeng.*, 87 (7) (2004), pp. 823–834.
17. S.G. Shin, B. W. Zhou B, S. Lee, W. Kim, S. Hwang, Variations in methanogenic population structure under overloading of pre-acidified high-strength organic wastewaters. *Process Biochem.* (2011) 46 (4), pp. 1035–1038.
18. Y. Chen, J.J. Cheng, K.S. Creamer. Inhibition of anaerobic digestion process: a review. *Bioresource Technology* 99(2008), pp. 4044–4064.
19. I. W. Koster, G. Lettinga, The influence of ammonium-Nitrogen on the specific activity of pelletized methanogenic sludge. *Agricultural Waste* 9 (1984), pp. 205–216.
20. A. Fernandez, A. Syed, S.A. Hashsham, S. L. Dollhopf, L. Raskin, O. Glagoleva, F.B. Dazzo, R.F. Hickey, C.S. Criddle and J. M. Tiedje, "Flexible Community Structure Correlates with Stable Community Function in Methanogenic Bioreactor Communities Perturbed by Glucose", 66 (2000), 9, pp. 4058–4067
21. B. Schink, "Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation", *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61(2) (1997), pp. 262–280.

22. L. Yuchen and W. B. Whitman, "Metabolic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of the Methanogenic Archaea", Ann. N.Y. Acad. Sci., 1125 (2008), pp. 171–189.
23. A.J. Stams and C.M. Plugge "Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea", Nat Rev Microbiol., 7 (8) (2009), pp. 568-77.
24. A. Van Haandel, J. De Vrieze, W. Verstraete, V.S. dos Santos, "Methanosaeta dominate acetoclastic methanogenesis during high-rate methane production in anaerobic reactors treating distillery wastewaters", J. Chem. Technol. Biot. (2013).
25. J.De Vrieze, T. Hennebel, N. Boon, W. Verstraete, " Methanosarcina: The rediscovered methanogen for heavy duty biomethanation", Bioresource Technology, 112 (2012), pp. 1-9.
26. Y. Sekiguchi, H. Takahashi, Y. Kamagata, A. Ohashi and H. Harada, In situ detection, isolation, and physiological properties of a thin filamentous microorganism abundant in methanogenic granular sludges: a novel isolate affiliated with a clone cluster, the green nonsulfur bacteria, subdivision I. Appl. Environ. Microbiol. 67 (2001), pp. 5740-5749.
27. C. Posten ,G. Schaub, "Microalgae and terrestrial biomass as source for fuels-A process view", Journal of biotechnology 142, (2009) pp. 64-64.
28. C. G. Golueke, W. J., H.B. Gotaas, "Anaerobic digestion of algae". Applied Microbiology ", 5 (1957) pp. 47-55.
29. E.P.S. Hernandez, L.T. Cordoba, "Anaerobic digestion of chlorella vulgaris for energy production", Resources Conservation and Recycling 9, (1993) pp. 127-132.
30. A. Legros, C.M.A.D. Marzano, H.P. Naveau, E.J. Nyn, " Fermentation profiles in bioconversions", Biotechnology Letters 5 (1983) pp. 7-12.
31. R. Samson, A. LeDuy, "Detailed study of anaerobic digestion of *Spirulina maxima* algae biomass", Biotechnology Bioengineering 28 (1986) pp. 1014-1023.
32. H.W. Yen, D.E. Brune, "Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane" Bioresource Technology 98, (2007) pp. 130-134.
33. B. Sialve, N Burnet, O. Bernard, "Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable", Biotechnology Advances 27, (2009) pp. 409-416.
34. J. H. Mussgnug , V. Klassen, , A. Schlüter, O. Kruse, " Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. Journal of Biotechnology 150, (2010) pp. 51-56.
35. C. Zamalloa, J.De Vrieze, N. Boon , W. Verstraete, "Anaerobic digestibility of marine microalgae *Phaeodactylum tricornutum* in a lab-scale anaerobic membrane bioreactor" Applied Microbiology Biotechnology" 92 (2) (2012), pp. 859-869.
36. J.-C. Frigon, M.-L. Frédérique, R. H. Abdou, P.J. McGinn, S.O.B. O’Learn, S.R. Guiot, "Screening microalgae strains for their productivity in methane following anaerobic digestion", Applied Energy 108 (2013) pp. 100-107
37. B. Zhao, J. Maa, Q. Zhao, L. Laurens, E. Jarvis, S. Chen, C. Frear, "Efficient anaerobic digestion of whole microalgae and lipid-extracted microalgae residues for methane energy production", Bioresource Technology 161, (2014) pp. 423-430.
38. R. Harun, M. Davidson, M. Doyle, R. Gopiraj, M. Danquah, G. Forde, "Technoeconomic analysis of an integrated microalgae photobioreactor, biodiesel and biogas production facility", Biomass Bioenergy 35, (2011) pp. 741-747.
39. P.J. McGinn, K.E. Dickinson, K.C. Park, C.G. Whitney, S.P. MacQuarrie, F.J. Black, "Assessment of the bioenergy and bioremediation potentials of the microalga *Scenedesmus* sp. AMDD cultivated in municipal wastewater effluent in batch and continuous mode", Algal Research 1, (2012) pp . 155-165.
40. S.Heaven , J. Milledge, Y. Zhang, " Comments on "Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable"", Biotechnology Advances 29 (2011), pp 164–167.
41. V.C Kalia, Jain S.R, Kumar A, Joshi A. P. "Fermentation of biowaste to H₂ by *Bacillus licheniformis*", World J Microbiol Biotechnol 10 (1994) pp 224-7.

42. E. De Luca, C. Felici, N. Corsaro, S. Rosa, A. Signorini, G. Izzo, "Hydrogen sulphide removal from gas stream by green sulphur bacteria under LED illumination", 22nd European Biomass Conference and Exhibition, 23-26 June 2014, Hamburg, Germany
43. A. Aliboni, L. Lona, E. De Luca, C. Felici, G. Izzo, "Analisi HPLC dello zolfo elementare prodotto da *C. limicola* in un bioprocesso mirato alla rimozione di H₂S nel biogas", XXV Meeting of SCI (Italian Chemical Society), Cosenza, September 7-12 2014.
44. A. Aliboni, L. Lona, C. Felici, N. Corsaro, G. Izzo and E. De Luca, "Analytical Protocols for the Determination of Sulphur Compounds Characteristic of the Metabolism of *Chlorobium limicola*", *Chromatographia* (Submitted).
45. M.A. Syed and P.F. Henshaw, "Modelling of a fixed-film tubular photobioreactor for conversion of hydrogen sulphide to elemental sulphur", *Indian journal of chemical technology* 13 (2006), pp. 226-232.