



Agenzia Nazionale per le Nuove Tecnologie,  
l'Energia e lo Sviluppo Economico Sostenibile



*Ministero dello Sviluppo Economico*

## RICERCA DI SISTEMA ELETTRICO

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

*E. Massi, R. Ciccoli, G. Migliore, L. Pirone, C. Alisi, F. Tasso, P. Marconi,  
S. Chiavarini, C. Ubaldi, C. Cremisini, A. R. Sprocati*

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

R. Ciccoli, G. Migliore, L. Pirone, C. Alisi, F.Tasso, P. Marconi, S. Chiavarini, C. Ubaldi,  
C. Cremisini, A. R. Sprocati (ENEA)  
E. Massi (Università di Roma La Sapienza)

Settembre 2011

Report Ricerca di Sistema Elettrico

Accordo di Programma Ministero dello Sviluppo Economico – ENEA

Area: Produzione di energia elettrica e protezione dell'ambiente

Progetto: Studi sulla produzione elettrica locale da biomasse a scarti

Responsabile Progetto: Angelo Moreno, ENEA

## 1. INTRODUZIONE

Gli scopi e gli obiettivi del tema di ricerca, attraverso studi di laboratorio e attraverso la realizzazione di un sistema sperimentale di piccola taglia, mirano a trovare le condizioni per ottimizzare:

- il processo di digestione anaerobica di rifiuti, sperimentando anche sistemi di processo innovativi;
- il sistema di purificazione del biogas, anche mediante l'impiego di filtri biologici;
- l'accoppiamento del sistema di produzione e purificazione del biogas con la cella a combustibile a carbonati fusi.

Sulla base degli obiettivi e degli scopi del tema di ricerca, vengono di seguito ricapitolate le attività svolte nei tre anni di progetto. Le attività sono condotte secondo due direttrici:

1- Processi di digestione anaerobica di reflui suinicoli, impiegati da soli o in codigestione con altre biomasse (FORSU, reflui bovini), con o senza pretrattamento, in diverse condizioni sperimentali (mesofilia, termofilia, diverso pH iniziale) e con diverse configurazioni di processo (batch, semi-continuo), per la produzione di biogas (metano, idrogeno e metano+idrogeno) con basso contenuto di impurezze ( $H_2S$ ), adatto all'alimentazione di celle MCFC.

2- Studio delle dinamiche della comunità microbiche, operanti nei processi di digestione sperimentati, in relazione ai prodotti ottenuti, al fine di individuare quali siano i gruppi di microrganismi chiave in grado di dirigere il processo verso i prodotti desiderati (alto contenuto di metano o/e idrogeno e bassa presenza di idrogeno solforato nel biogas).

Nel primo anno di attività era stato allestito un laboratorio dedicato alle prove di produzione di idrogeno e metano da biomasse mediante digestione anaerobica e sono state messe a punto tutte le procedure analitiche necessarie per il monitoraggio del processo. Erano stati quindi avviati test anaerobici in batch con reflui suinicoli, sia in condizioni di mesofilia che di termofilia, variando il pH iniziale. Era stata poi replicata la prova che aveva prodotto i migliori risultati in termini di produzione di metano a parità di tempo di ritenzione idraulica, modificandone alcuni parametri operativi ed aggiungendovi sali di ferro con lo scopo di ridurre il contenuto di idrogeno solforato nel biogas prodotto, inducendo la precipitazione chimica di solfato ferrico. Dei test migliori, e nei giorni più significativi del trattamento anaerobico, sono stati prelevati campioni per eseguire lo studio delle dinamiche delle comunità microbiche mediante tecniche molecolari. L'indagine microbiologica aveva riguardato la messa a punto di metodi molecolari per la caratterizzazione della popolazione microbica presente nei reflui zootecnici e della dinamica di popolazione avvenuta nella prima fase della sperimentazione a monostadio (batch), pervenendo alla conclusione di utilizzare, tra i metodi testati, la DGGE (*elettroforesi su gel di acrilammide con un gradiente denaturante*), che permette una buona separazione dei frammenti di DNA (16S- rDNA), correlabili alle diverse specie batteriche presenti. I profili molecolari così ottenuti possono inoltre essere analizzati tramite un software di analisi. Il numero delle bande, il pattern e le intensità

relative possono essere utilizzate per determinare alcuni indici ecologici di biodiversità, che permettono di capire cosa avviene a livello della complessa comunità microbica responsabile del processo di digestione anaerobica .

Nel secondo anno l'attività è stata rivolta ad investigare la possibilità e la potenzialità della produzione di idrogeno e metano da liquami suinicoli e FORSU.

L'indagine microbiologica ha riguardato un'analisi pilota della comunità microbica e della sua dinamica durante il processo in batch di digestione anaerobica di reflui suinicoli:fango anaerobico in rapporto 1:1 nella condizione sperimentale che aveva prodotto i migliori risultati, ossia la condizione di termofilia (55°C ) e pH iniziale 7. In questa fase sono stati individuati i parametri che permettano di correlare struttura e funzione della comunità nelle diverse condizioni e nel tempo. I parametri scelti sono alcuni indici ecologici di biodiversità e di organizzazione funzionale, ottenuti dall'elaborazione del bandeggio della elettroforesi su gel di acrilammide, attraverso i quali si può descrivere la struttura della comunità e i suoi cambiamenti in relazione alle diverse condizioni e nel tempo. La conoscenza dell'ecologia della comunità microbica responsabile del processo di digestione anaerobica assume una notevole importanza per l'ottimizzazione del processo e per una migliore gestione del processo stesso.

Nel terzo anno sono stati avviati test di codigestione anaerobica di miscele composte di FORSU, reflui suinicoli e reflui bovini, in processi in batch e successivamente in semi-continuo.

Sono stati inoltre avviati i primi test in batch per lo studio preliminare della produzione di idrogeno durante la fase acidogenica ed acetogenica della digestione anaerobica di FORSU, inoculata con fango aerobico ed anaerobico.

In seguito all'esito positivo delle prime analisi molecolari eseguite nel secondo anno di attività, l'indagine microbiologica ha riguardato un'analisi dettagliata della dinamica della popolazione microbica avvenuta durante il processo di digestione di reflui suinicoli: fango anaerobico in rapporto 1:1, che aveva prodotto i migliori risultati (55°C e a pH iniziale 7).

## 2. ATTIVITA' SVOLTA E RISULTATI OTTENUTI

### Produzione di idrogeno da liquami suinicoli

Per verificare la produzione di idrogeno da liquami suinicoli sono stati avviati numerosi test volti ad investigare l'efficacia di diversi pretrattamenti dell'inoculo, l'influenza della temperatura, dell'imposizione di un dato valore iniziale di pH e la necessità del controllo di pH durante l'intera idrogeno genesi. (vedi rapporto finale di sintesi 2010-CERSE)

I primi risultati (Fig. 1) hanno evidenziato che a 39°C, imponendo il pH ad un valore pari a 5,5 unità, si ottiene una maggior produzione di idrogeno, probabilmente per due effetti: (i) la maggior solubilizzazione del substrato, (ii) una selezione più spinta nei confronti dei microrganismi idrogeno produttori. Tale ipotesi sarà da verificare mediante analisi microbiologiche.

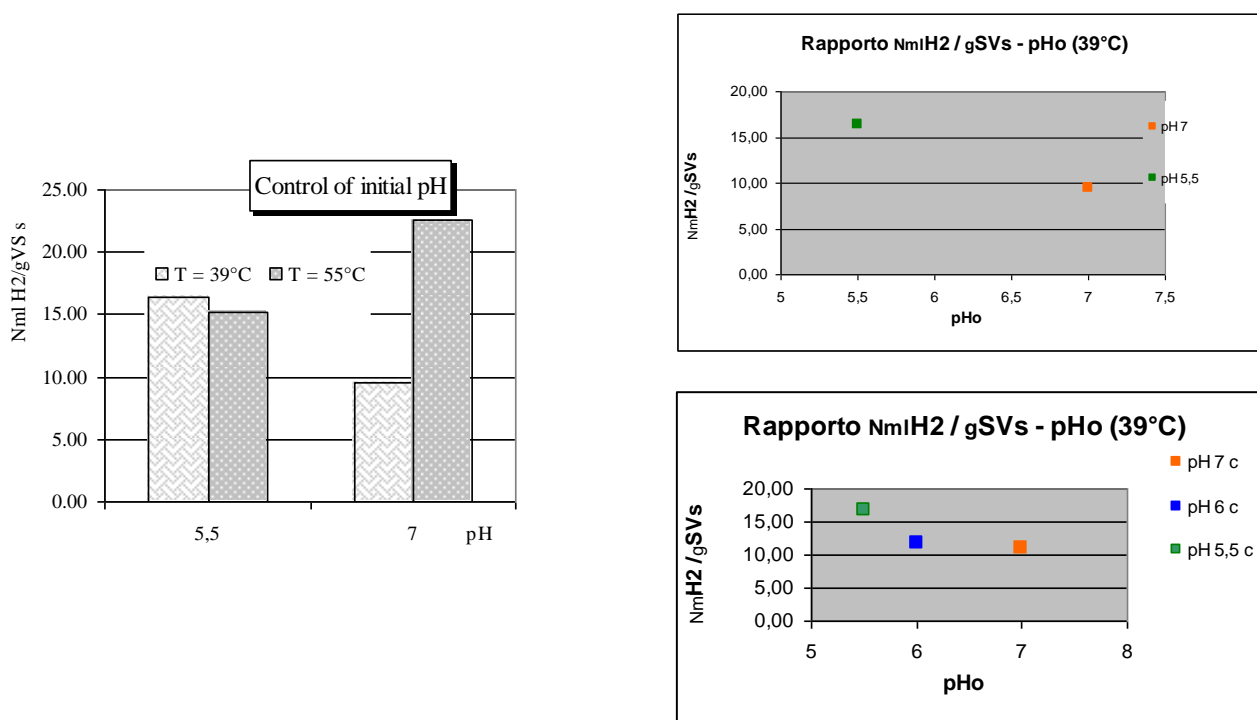


Figura 1 – Effetti del pH e della Temperatura sulla produzione di H<sub>2</sub> da liquame suinicolo

Le prove condotte a 55°C, invece, hanno raggiunto migliori risultati quando avviate con pH iniziale pari a 7. Questo rappresenta un risultato importante in quanto, una volta effettuato il bilancio energetico globale, con particolare attenzione a quello termico, si potrebbe scoprire una convenienza economica nel condurre la digestione in campo termofilo piuttosto che mesofilo, senza la necessità di pretrattare l'inoculo.

L'aggiunta di Sali di ferro (FeCl<sub>2</sub>), in tutte le condizioni testate, ha permesso di ottenere forti riduzioni dell'idrogeno solforato (75-95%), le concentrazioni medie finali si sono mantenute tra i 400 e i 1000 ppm (contro i 3500-12400 ppm delle rispettive prove senza Sali di ferro). I risultati sono mostrati in figura 2.

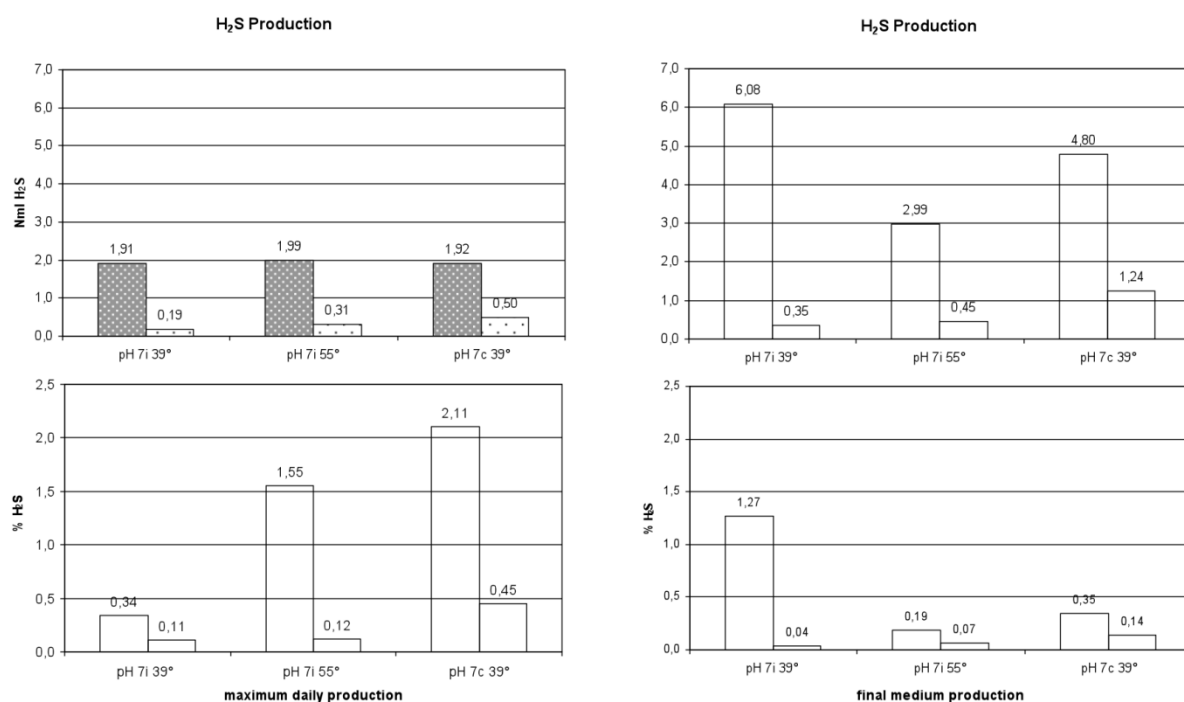


Figura 2 – Produzione di H<sub>2</sub>S: confronto tra prove con e senza Sali di ferro

Data la necessità di aumentare il contenuto di carbonio per migliorare il rendimento della digestione anaerobica dei reflui suinicoli è stata studiata la digestione di FORSU. La FORSU, al contrario dei liquami suinicoli, presenta caratteristiche chimico-analitiche che la rendono un substrato ottimale per la produzione di idrogeno durante la prima fase della digestione anaerobica. Il processo ne risulta però accompagnato da un'elevata produzione di idrogeno solforato. Durante l'idrogenogenesi si registra un brusco crollo di pH che, se non attentamente monitorato, rischia di inibire il processo. Abbiamo quindi provato a codigerire FORSU e liquame suinicolo (Tab1), per verificare se la capacità tampone di quest'ultimo riuscisse ad evitare l'inibizione, operando a pH 7 e a una temperatura di 55°C.

|     | Liquami | FORSU  | Diluizione |       |                                |
|-----|---------|--------|------------|-------|--------------------------------|
|     |         |        | Inoculo    |       | (g                             |
|     |         |        |            |       | water/g <sub>substrate</sub> ) |
|     | % (wt)  | % (wt) | % (wt)     | Tipo  |                                |
| S01 | 10      | 40     | 50         | F.An. | 0,36                           |
| S02 | 25      | 25     | 50         | F.An. | 0,36                           |
| S03 | 40      | 10     | 50         | F.An. | 0,36                           |
| S04 | 50      | ---    | 50         | F.An. | 0,36                           |
| S05 | ---     | 50     | 50         | F.An. | 0,36                           |

Tabella 1– Schema prove di codigestione di liquami suinicoli e FORSU

Le prove effettuate hanno mostrato che la codigestione con liquami suinicoli ha un effetto positivo ma non sufficiente sia sull' idrogenogenesi che sulla metanogenesi della FORSU.

Le prove in cui il processo si era bloccato sono state quindi riavviate, aggiungendo un opportuno inoculo, e si sono raggiunti elevati valori di produzione sia per l'idrogeno (dai 50 agli 80 Nml/g SVs al variare della miscela, con un picco superiore ai 200 Nml/g SVs ) che per il metano (800-1400 Nml/g SVs).

Da questi test preliminari risulta quanto segue:

- Il liquame suinicolo è un substrato idoneo alla sola produzione di metano;
- Durante la codigestione della FORSU con liquame suinicolo si raggiunge una stabilità di processo maggiore rispetto a quella ottenuta dalla semplice digestione della FORSU come unico substrato;
- L'utilizzo di un opportuno inoculo è fondamentale per evitare inibizioni del processo
- Il processo di codigestione, se ben monitorato, permette di ottenere rese energetiche migliori della digestione di un singolo substrato.

#### **PROCESSO IN SEMICONTINUO IN SINGOLO STADIO PER LA PRODUZIONE DI METANO DA LIQUAMI SUINICOLI.**

E' stato messo a punto un sistema di reattori in semicontinuo (alimentazione giornaliera), in diverse condizioni sperimentali , che permette di effettuare sia il processo anaerobico in singolo stadio per la produzione di metano da liquami suinicoli, sia quello in doppio stadio per la contestuale produzione di idrogeno e metano da liquami suinicoli e FORSU.

Si elencano di seguito gli esiti della sperimentazione (tabelle 2 e 3):

- contrariamente a quanto avvenuto nel processo batch, la termofilia (55°C) non sembra migliorare tanto la produzione di metano, per i tempi di ritenzione adottati
- le rese ottenute a 40°C non differiscono molto da quelle ottenute a 55°C, probabilmente perché c'è un limite di temperatura oltre il quale l'aumento della velocità delle cinetiche viene contrastato da un'eccessiva specializzazione (o un impoverimento) della comunità batterica.
- l'ispessimento dell'inoculo non sembra essere determinante per la produzione di metano da liquami suinicoli
- in tutte le prove, le concentrazioni medie di metano ottenute sono buone (65-72%)
- la produzione di H<sub>2</sub>S è direttamente proporzionale al contenuto in solidi del substrato ed inversamente proporzionale ai tempi di ritenzione utilizzati; essa diminuisce all'aumentare della temperatura operativa (vedi Tabella sotto) e con l'ispessimento del fango

- l'utilizzo di Sali di ferro ha permesso di mantenere la concentrazione di H<sub>2</sub>S al di sotto dei 50 ppm (tabella 3)

| Nome convenzionale | Condizioni operative           | Valori medi della produzione specifica rispetto ai gSV introdotti $\left[ \frac{NmI CH_4}{d \times g_{SV}} \right]$ |                 |                 |                 |
|--------------------|--------------------------------|---|-----------------|-----------------|-----------------|
|                    |                                | 1° SET DI PROVE   | 2° SET DI PROVE | 3° SET DI PROVE | 4° SET DI PROVE |
| B4                 | Mesofilia 40°C, F.A. ispessito | 274,78  | 215,92          | 255,64          | 382,19          |
| B5                 | Mesofilia 35°C, F.A. ispessito | 130,34  | 169,85          | 179,97          | 236,47          |
| B7-B8              | Mesofilia 35°C                 | 202,52  | 224,95          | 230,97          | 370,48          |
| B9- B10            | Termofilia 55°C                | 240,58  | 256,85          | 262,59          | 340,33          |

Tabella 2-Produzione di biogas in reattori in continuo

| Contenuto medio di H <sub>2</sub> S nel biogas [ppm]       |                                     |                                     |  |   |
|--|-------------------------------------|-------------------------------------|--|---|
|  | Mesofilia 40°C, F.A. ispessito (B4) | Mesofilia 35°C, F.A. ispessito (B5) | Mesofilia 35°C, F.A. tal quale (B7-B8) | Termofilia 55°C, F.A. tal quale (B9- B10) |
| 4° set di prova senza cloruro ferroso (FeCl <sub>2</sub> ) | 113.34                              | 157.62                              | 509.52                                 | 30.80                                     |
| 4° set di prova con cloruro ferroso (FeCl <sub>2</sub> )   | 22.52                               | 39.62                               | 48.10                                  | 17.42                                     |
| % di abbattimento  | <b>80.13</b>                        | <b>74.86</b>                        | <b>90.56</b>                           | <b>43.42</b>                              |

Tabella 3- Effetto dell'aggiunta dei Sali di ferro nel mantenere la concentrazione di H<sub>2</sub>S al di sotto dei 50 ppm



I dati ottenuti sono stati utilizzati, in collaborazione con il gruppo che si occupa del clean up, per stabilire un dimensionamento di massima dell'impianto installabile presso la porcilaia da cui sono stati presi i reflui (7500 capi), adottando diverse ipotesi, di cui la 4<sup>a</sup> ha permesso di ottenere un bilancio termico positivo (OLR: 1,5 kg SV/m<sup>3</sup>\*g; HRT: 35 g; T: 40°C; V digestore: 1575 m<sup>3</sup>),

Analogamente, utilizzando i dati sperimentali relativi alla prova migliore, è stato calcolato il quantitativo di deiezioni necessario affinché il biogas da esse prodotto sia in grado di alimentare una cella a combustibile a carbonati fusi da 1 kW.

Il dimensionamento ottenuto in base ai risultati migliori e la produzione di energia elettrica al netto dei consumi del digestore nei diversi casi sono riportati in tabella 4:

|  | Primo set di prova                      | Secondo set di prova            | Terzo set di prova  | Quarto set di prova            |
|--|---|---------------------------------|---|--------------------------------|
| Substrato alimentato al digestore                | Substrato diluito con acque di lavaggio |                                 | Substrato privo delle Acque di lavaggio                         |                                |
| Vd [m3]  | 2500                                    | 1750                            | 900   | 1575                           |
| Processo migliore                                | Mesofilia 40°C, F.A. ispessito          | Termofilia 55°C, F.A. tal quale | Termofilia 55°C, F.A. tal quale/ Mesofilia 40°C, F.A. ispessito | Mesofilia 40°C, F.A. ispessito |
| $E_{el}^{prodotta} \left[ \frac{kWh}{y} \right]$ | 808.263                                 | 638.906                         | 753.880   | 1.118.260                      |
| $P_{el}^{MCFC} [kW]$                             | 102,5                                   | 81                              | 95,6  | 141,9                          |
| $P_{th}^{MCFC} [kW]$                             | 91,1                                    | 72,0                            | 85,0  | 126,1                          |

Tabella 4- Dimensionamento ottenuto in base ai risultati migliori e produzione di energia elettrica al netto dei consumi del digestore nei diversi casi

## CODIGESTIONE ANAEROBICA DI MISCELE COMPOSTE DA FORSU , REFLUI SUINICOLI E BOVINI

Durante l'ultimo anno di attività sono stati avviati test di codigestione anaerobica di miscele composte da FORSU, reflui suinicoli e bovini, prima in condizioni batch e successivamente in semi-continuo.

Sono dapprima stati allestiti 4 set di prove in batch con la seguente composizione:

- 1) Refluo bovino / Refluo suino in proporzione 1:1
- 2) Solo reflu suino
- 3) Solo reflu Bovino
- 4) Controllo con acqua di rete.

Ogni reattore aveva un volume di lavoro di circa 700 mL. La metà del volume indicato era costituita da un inoculo anaerobico, proveniente da un impianto alimentato a deiezioni bovine e scarti agricoli, situato a Sutri (VT) presso l'azienda agricola Bruni.

Tutti i 3 set di prove con reflu hanno prodotto un biogas con contenuto in metano superiore al 65% in volume. La massima resa in biogas è stata ottenuta con le sole deiezioni suine, (0,175

Nm<sup>3</sup>/Kg ST). Per contro, nella stessa condizione si è avuto il massimo sviluppo di acido solfidrico, con picchi di produzione giornaliera superiori ai 3000 parti per milione (ppm).

La digestione con le sole deiezioni bovine ha prodotto la minima quantità di acido solfidrico (valori giornalieri non superiori a 200 ppm), ma la produzione specifica di metano è stata la più bassa (0,068 Nm<sup>3</sup>/Kg ST).

I reattori alimentati con la miscela deiezioni suine e bovine in rapporto 1:1 hanno dato il miglior risultato, buona resa specifica in metano (0,108 Nm<sup>3</sup>/Kg ST) coniugata ad un basso tenore di acido solfidrico nell'effluente gassoso, con un valore massimo giornaliero di circa 250 ppm.

Queste prove portano a stabilire che l'introduzione di un consistente apporto di deiezioni bovine a quelle suine, riduce significativamente la produzione di acido solfidrico, semplificando in modo sensibile il successivo passaggio di *clean-up* e mantenendo comunque la produzione di metano su buoni livelli.

Per quanto concerne la produzione di idrogeno da sola FORSU, sono state avviate prove in batch con fango aerobico ed anaerobico come inoculo, sottoposti a diversi pretrattamenti. Sebbene l'inoculo aerobico si sia dimostrato più idoneo all'idrogenogenesi (si sono ottenute rese pari a 53 Nml H<sub>2</sub>/g SVs con 43% di H<sub>2</sub> ovvero 13 Nm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>/t FORSU tal quale), si è dovuto optare, per motivazioni tecniche, per l'inoculo anaerobico, la cui influenza è stata testata dopo averlo sottoposto a diversi pretrattamenti (ispessimento per gravità e centrifugazione e pretrattamento termico). È stato inoltre valutato l'effetto della temperatura (39°C e 55°C) e del pH iniziale della miscela alimentata (posto pari a 5.5 e 7) sulle rese specifiche in idrogeno. Nelle prove migliori, con inoculo ispessito per gravità e temperatura di processo pari a 55°C e con fango centrifugato e temperatura di 39°C, sono state raggiunte produzioni specifiche di idrogeno pari a 20 e 15 Nm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>/t FORSU tal quale. Superata una prima fase di inibizione, le rese sono migliorate del 30% e 40% rispettivamente.

## **MICROBIOLOGIA del processo di digestione anaerobica**

Scopo dell'attività è di individuare, attraverso lo studio della dinamica della comunità microbica che si sviluppa durante le diverse fasi del processo di digestione, quali condizioni e quali popolazioni siano correlate alla produzione di biogas che presenta le caratteristiche necessarie all'alimentazione di celle a combustibile, ossia alto contenuto di metano e idrogeno e basso contenuto di acido solfidrico (H<sub>2</sub>S). Una maggiore comprensione delle complesse reazioni che regolano la digestione anaerobica può portare al superamento dell'approccio di tipo "classico", che considera le trasformazioni microbiologiche come una *black box* e realizzare una gestione *knowledge-based*, migliorando l'efficienza del processo.

Le attività svolte in ambito microbiologico hanno riguardato i seguenti punti:

- Messa a punto del sistema di analisi molecolare delle comunità microbiche mediante la tecnica della DGGE (*gel di acrilammide con un gradiente denaturante*) e l'elaborazione delle immagini della distribuzione delle bande di DNA nei gel di DGGE ottenuti, tramite il software di analisi 1-D Quantity One (BioRad), al fine di ricavare una serie di indici ecologici utili alla comprensione delle dinamiche microbiche all'interno del processo: *Simpson's diversity index* (1-D), *Simpson's evenness index* (Ed), *Range-weighted richness* (Rr), tasso di cambiamento ( $\Delta t$ ) ed organizzazione funzionale (Fo).

- Analisi molecolare delle comunità microbiche operanti nel processo di digestione anaerobica di reflui suinicoli : fango anaerobico, in rapporto 1:1, nella condizione sperimentale che ha prodotto i migliori risultati , ossia la condizione in termofilia , 55°C e pH iniziale 7.

In tali condizioni il processo aveva prodotto i seguenti risultati:

- Migliore produttività nel tempo
- Maggiore efficienza di conversione del COD in metano
- Biogas con metano in concentrazioni superiori al 75% e H<sub>2</sub>S in concentrazioni <50 ppm (molto più basse di quelle usualmente riscontrate in tali processi)

La condizione descritta, ritenuta la più promettente ai fini degli obiettivi della ricerca è stata pertanto scelta per un'analisi microbiologica approfondita, tesa a determinare i profili molecolari della comunità microbica e la dinamica di popolazioni nel tempo, per la durata del processo di digestione.

La piena comprensione delle dinamiche che avvengono a livello dei differenti gruppi trofici nel corso del processo potrà permettere di individuare i gruppi microbici chiave, che dirigono il processo verso i prodotti desiderati e, attraverso una successiva attività di clonaggio, consentirà di tentare di isolare i ceppi chiave per procedere con inoculi mirati nelle diverse fasi del processo (*bioaugmentation*).

In base alla produzione di biogas ottenuta durante il processo in batch a 55°C e pH iniziale 7 sono stati scelti, a titolo esplorativo, alcuni campioni corrispondenti ad alcuni significativi tempi di ritenzione, su cui è stata condotta un'analisi pilota della comunità microbica. In figura 3 sono riportati i risultati per la produzione di metano, il bandeggio ottenuto nella DGGE per Eubatteri ed Archaea e gli indici di diversità ricavati dall'elaborazione dei dati. In particolare l'indice di Pareto-Lorenz mostra come l'organizzazione funzionale della comunità microbica degli Archaea accresca dal tempo 3 al tempo 6, in cui inizia la produzione di metano, indicando una forte specializzazione che porta alla fase di metanogenesi. Alti valori di diversità (1-D), evenness (Ed) e ricchezza in specie (Rr) sia per eubatteri, che per archeobatteri e alta organizzazione funzionale (Fo) degli archeobatteri in corrispondenza della fase metanogenica sono i risultati salienti dell'analisi. L'indice di diversità di Simpson, indicato come 1-D, rappresenta la probabilità che due individui selezionati a caso in un campione appartengano a specie differenti. L'indice di uniformità (evenness index) di Simpson (Ed) è una misura dell'abbondanza relativa degli individui delle specie in un determinato ambiente: è massimo quando tutte le specie sono presenti con lo stesso numero di individui, ha invece valori bassi quando è presente una specie con numerosi individui e numerose specie con pochi individui. L'indice Range-weighted richness (Rr), descrivere la diversità totale del campione analizzato Il tasso di cambiamento  $\Delta t$  corrisponde al valore medio del tasso di cambiamento tra tempi successivi nell'intervallo di tempo considerato per le diverse prove L'organizzazione funzionale (Fo) è stata rappresentata tramite la curva di evenness di Pareto-Lorenz, più elevato è il valore in ordinata, più elevata è l'organizzazione funzionale. Il confronto dei valori degli indici nelle diverse condizioni sperimentali e nel tempo permette così di ottenere informazioni correlate tra struttura e funzione della comunità microbica.

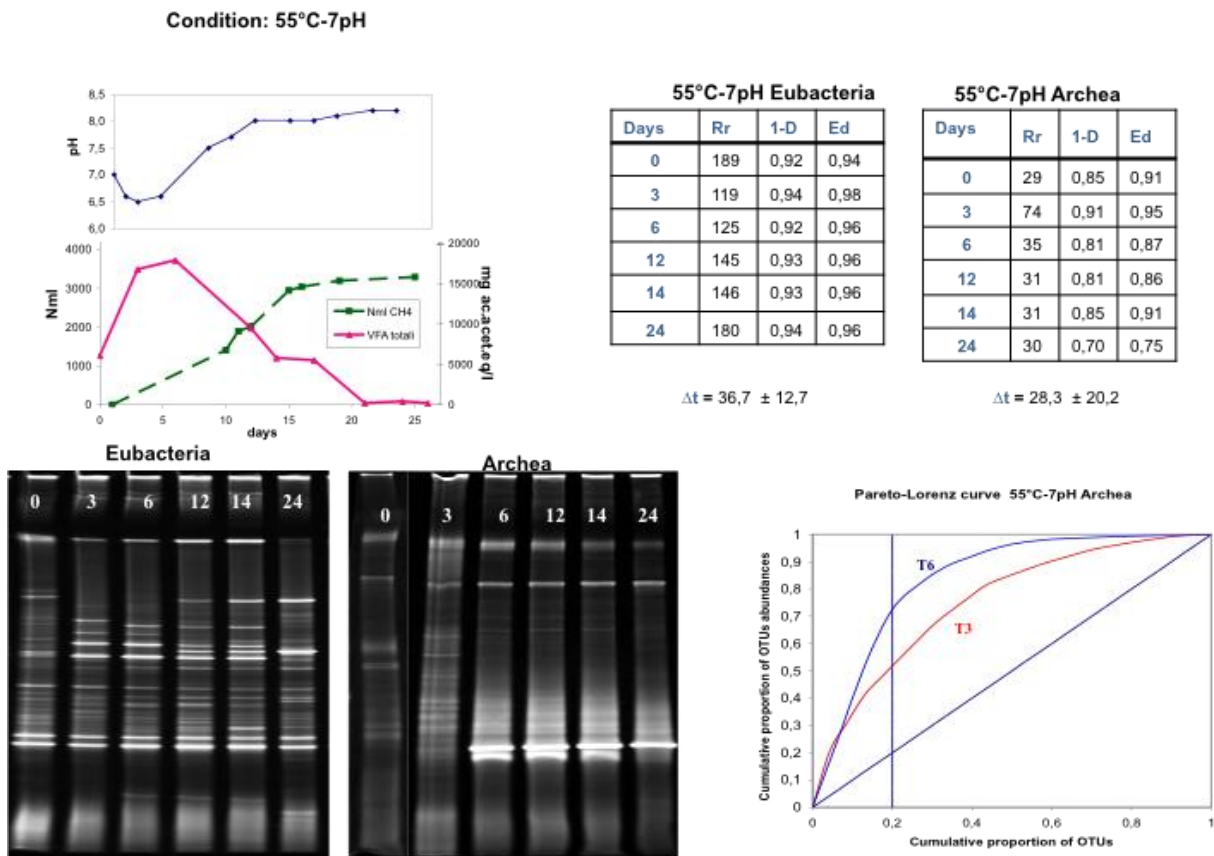


Figura 3. Evoluzione della comunità microbica durante il processo di digestione anaerobica, condotto a 55°C e a pH iniziale 7. L'evoluzione della comunità è stata valutata in relazione a pH, metano e acidi volatili totali sia per Eubatteri che per Archaea, mediante indici di biodiversità.

Le prime analisi molecolari, eseguite al fine di verificare l'adeguatezza per gli scopi del lavoro, hanno dunque permesso di ricavare una serie di indici ecologici descrittivi della comunità microbica e delle sue variazioni nel tempo.

In seguito all'esito positivo delle prime analisi sono stati successivamente scelti 8 campioni, tra tutti quelli prelevati durante il processo di digestione e opportunamente conservati, corrispondenti a tempi significativi del processo e ai prodotti ottenuti. Sui campioni T0-T3-T6-T11-T15-T18-T24 sono stati eseguiti i profili molecolari, attraverso la DGGE, da cui sono stati successivamente ricavati, per elaborazione, gli indici ecologici di biodiversità.

Nell'analisi sono stati presi in considerazione, per ogni tempo indagato, sia gli Eubatteri, che gli Archaea, sebbene i ceppi metanigeni conosciuti al presente appartengano agli Archaea.

I profili molecolari ottenuti sono stati analizzati tramite il software di analisi 1-D Quantity one. Il numero delle bande, il *pattern* e le intensità relative sono stati utilizzati per determinare gli indici ecologici, che descrivono la comunità microbica ai vari tempi del processo di digestione, in termini strutturali [ricchezza e abbondanza: Simpson's diversity index (1-D), Simpson's evenness index (Ed), Range-weighted richness (Rr),] funzionali [organizzazione funzionale (Fo)] e dinamici [tasso di cambiamento (Dt)]. Tali indici sono stati finora usati per paragonare comunità microbiche provenienti da diversi campioni ambientali (Marzorati et al. Environmental Microbiology (2008) 10(6), 1571–1581), ma non sono ancora stati applicati allo studio di comunità in sistemi chiusi, come nel caso in esame. Nel campo delle bioenergie questa applicazione risulta pertanto originale. Le dinamiche della popolazione di Eubatteri e di Archaea durante le fasi del processo di digestione a 55°C e pH iniziale 7, espresse attraverso l'indice di diversità Rr (*range-weighted richness*) sono

riportate in figura 4. L'andamento dei valori di Rr per i due gruppi di batteri è simile, con una riduzione dal tempo T0 al tempo T7, che corrisponde alla fase di idrogeno-produzione, per poi crescere di nuovo bruscamente al tempo T11, in corrispondenza con l'inizio della metanogenesi. Nei tempi successivi, si assiste ad una graduale riduzione dei valori di Rr per entrambi i gruppi batterici.

Come atteso, durante la fase di metanogenesi si osserva un netto sviluppo delle popolazioni di Archaea (in rosso), che sono invece quasi assenti nelle fasi iniziali, ma qui è interessante osservare il comportamento degli Eubatteri, che, contrariamente a quanto atteso, presentano un nuovo picco durante la fase metanogenica.

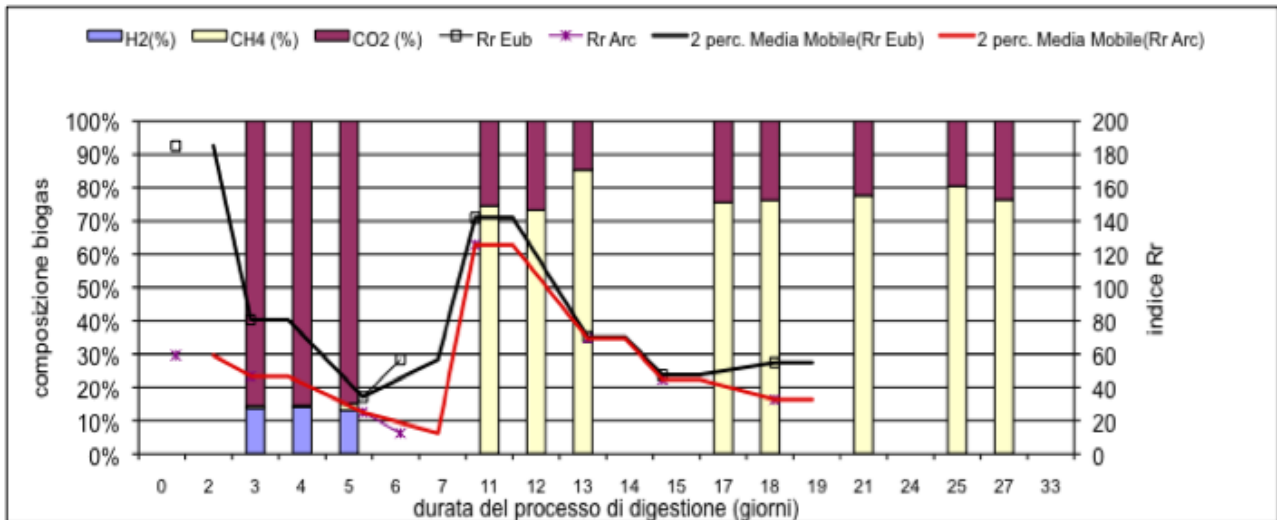


Figura 4- Variazione degli indici di biodiversità range-weighted richness (Rr) degli eubatteri (linea nera) e degli archaea (linea rossa), in relazione alla composizione del biogas prodotto a 55°C e pH iniziale 7.

Un altro parametro interpretativo, utile ai fini di una migliore comprensione del processo di digestione anaerobica, è l'indice di Pareto-Lorenz, che fornisce informazioni sull'organizzazione funzionale della comunità. Il valore di Rr degli Eubatteri a T0 (185,13) indica una popolazione composta da un elevato numero di specie e trova conferma nell'analisi Pareto-Lorenz che allo stesso tempo indica, in termini di organizzazione funzionale, una popolazione meno specializzata (42%) rispetto ai tempi successivi, quando la specializzazione aumenta ed è massima nei tempi 3-6-7 (58%) (Fig.5a), ossia nella fase di idrogeno-produzione.

Anche la comunità degli Archaea presenta un'organizzazione funzionale media, ma la maggior organizzazione funzionale si raggiunge al tempo T11, in corrispondenza della metanogenesi (57%) (Fig.5 b).

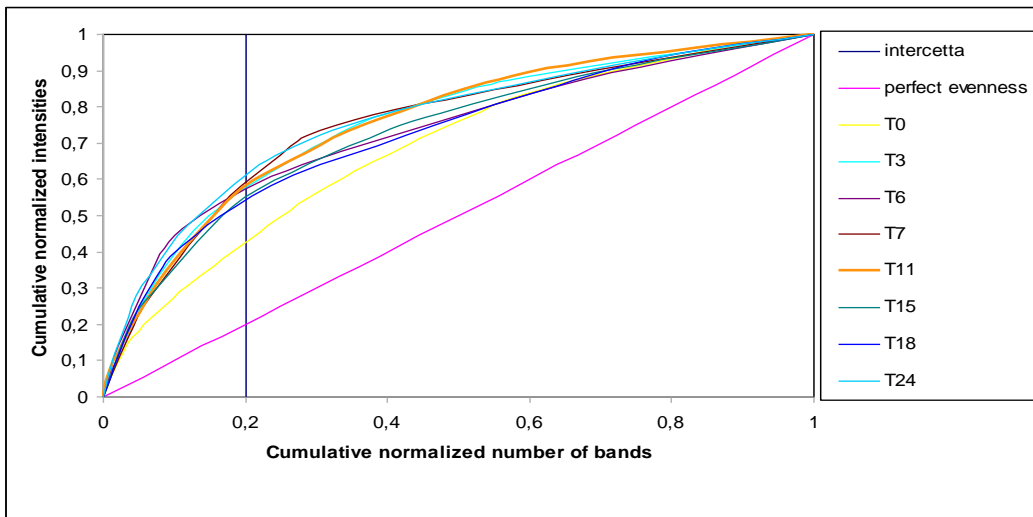


Fig.5 a Curva Pareto-Lorenz determinata sulla base delle intensità delle bande dei frammenti 16S eubatteri

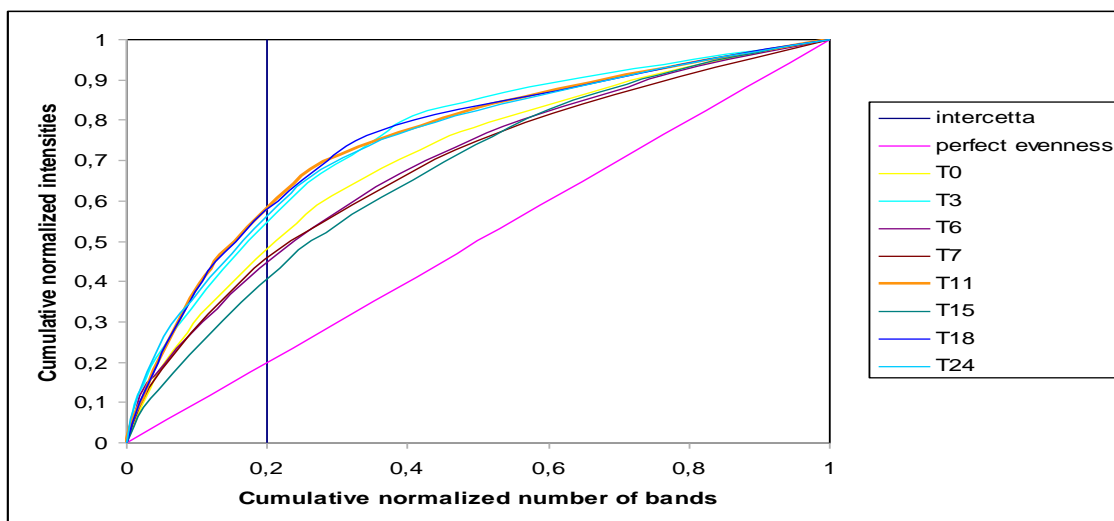


Fig.5b Curva Pareto-Lorenz determinata sulla base delle intensità delle bande dei frammenti 16S Archaea

Allo stato attuale di progressione delle attività possiamo trarre le seguenti conclusioni parziali:

- Gli Eubatteri risultano determinanti nella fase di idrogeno-produzione, durante la quale raggiungono la massima organizzazione funzionale, ma essi risultano giocare un ruolo anche durante la fase di metanogenesi, come dimostra il nuovo picco dell'indice di biodiversità (Rr) che insorge dal 5° giorno
- Gli Archaea subentrano nel processo in fase metanogenica, durante la quale presentano sia la maggiore biodiversità, sia la maggiore organizzazione funzionale.
- Nell'intervallo tra la fine della produzione di idrogeno e l'inizio della produzione di metano (5-11 giorni ) i due gruppi di Archaea e Eubatteri presentano un andamento simile, mentre si diversificano sia nelle fasi iniziali, che finali del processo.

In base a queste risultanze sperimentali è stato deciso, per il prossimo periodo di attività, di estendere l'analisi ad alcuni sottogruppi, all'interno delle due grandi suddivisioni di Eubatteri e Archaea, al fine di scomporre i relativi picchi già rilevati ( fig.4). Tale approccio ha lo scopo di individuare quali sottogruppi siano specificamente responsabili della produzione di biogas

ottenuta, per poi procedere alla loro identificazione e coltivazione per poter intervenire, con inoculi mirati (*bioaugmentation*) a guidare il processo verso la qualità desiderata dei prodotti (alto contenuto in metano e basso contenuto in H<sub>2</sub>S). La possibilità di individuare quali gruppi di eubatteri siano attivi nella fase metanogenica e con quale ruolo siano presenti è di particolare interesse, non solo per le potenzialità applicative, ma anche per le nuove conoscenze scientifiche che ne possono derivare.

Per poter caratterizzare ulteriormente la struttura e le dinamiche della comunità microbica, nel prossimo periodo di attività verranno quindi analizzati i profili DGGE ottenuti amplificando il gene 16S dei seguenti sottogruppi: alfa-proteobatteri, beta-proteobatteri, gamma-proteobatteri e firmicutes per gli Eubatteri e metanigeni, per gli Archaea.