



Ricerca di Sistema elettrico

Studio di un processo fermentativo anaerobico di materiali ad alto contenuto in chitina e acque di vegetazione

G.Lembo, C.Patriarca, P.Barghini, S.Gorrasi e M.Fenice



STUDIO DI UN PROCESSO FERMENTATIVO ANAEROBICO DI MATERIALI AD ALTO CONTENUTO IN CHITINA E ACQUE DI VEGETAZIONE

G. Lembo, C. Patriarca, P. Barghini, S. Gorrasi, M. Fenice (Università della Tuscia)

Settembre 2015

Report Ricerca di Sistema Elettrico

Accordo di Programma Ministero dello Sviluppo Economico - ENEA

Piano Annuale di Realizzazione 2014

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

Il presente documento descrive le attività di ricerca svolte all'interno dell'Accordo di collaborazione "*Studio e sviluppo di un processo fermentativo anaerobico di materiali ad alto contenuto in chitina e di acque di vegetazione*"

Responsabile scientifico ENEA: Antonella Signorini

Responsabile scientifico Università della Tuscia: Massimiliano Fenice

Indice

SOMMARIO.....	4
1 INTRODUZIONE.....	5
2 DESCRIZIONE DELL'ATTIVITÀ SVOLTA E RISULTATI.....	7
2.1 PROCESSO DI DIGESTIONE ANAEROBICA DA CHITINA GREZZA.....	7
2.1.1 <i>Descrizione della sperimentazione</i>	7
2.1.2 <i>Risultati</i>	8
2.2 PROCESSO DI DIGESTIONE ANAEROBICA DALLE ACQUE DI VEGETAZIONE.....	13
2.2.1 <i>Descrizione della sperimentazione</i>	14
2.2.2 <i>Caratterizzazione del substrato</i>	15
2.2.3 <i>Risultati</i>	16
3 CONCLUSIONI.....	22
4 BIBLIOGRAFIA.....	23
5 ABBREVIAZIONI ED ACRONIMI.....	24

Sommario

La scelta di introdurre l'acqua di vegetazione come nuovo substrato per lo studio e lo sviluppo di un processo fermentativo anaerobico è stata motivata da contatti avuti sia con frantoi sia con aziende agro-zootecniche dove sono presenti impianti a biogas. Inoltre la curiosità scientifica era stata stimolata dalla informazione che l'acqua di vegetazione lasciata depositata in contenitori chiusi produceva un biogas di cui non si conosceva la composizione (auto fermentazione). In bibliografia risultava scarsamente indagato sia il processo di produzione di idrogeno, sia il processo combinato di idrogeno e metano. Non erano presenti dati sull'autofermentazione.

L'acqua di vegetazione (AV), è ottenuta dal processo di estrazione dell'olio extravergine di oliva. Le caratteristiche chimico-fisiche e biologiche delle AV dipendono dal processo di estrazione, dal cultivar e dalla regione di origine delle olive e dalle condizioni climatiche.

Le particolari caratteristiche chimico-fisiche lo rendono un rifiuto potenzialmente molto inquinante, considerando inoltre che lo sversamento diretto delle acque di vegetazione nelle acque superficiali e/o lo spandimento sul terreno agricolo rimane al momento la via preferenziale per procedere al loro smaltimento. Tuttavia, sono conosciuti da tempo gli impatti negativi che le acque di vegetazione hanno sull'ambiente: inibizione della germinazione dei semi, alterazione delle caratteristiche del suolo, e modificazione della struttura della comunità microbica del suolo.

Diversi trattamenti chimico-fisici e biologici sono stati da tempo sperimentati per cercare di ridurre il carico inquinante di questo refluo. Tra i trattamenti biologici l'utilizzo della digestione anaerobica sembra essere quella più promettente non solo per l'abbattimento degli inquinanti presenti, ma anche per la contemporanea valorizzazione economica del rifiuto stesso. Tuttavia il suo utilizzo richiede una diluizione con altri substrati o un'acclimatazione a concentrazioni crescenti superiore ai 7 mesi. Inoltre il suo utilizzo in codigestione con altri substrati richiede la conoscenza a monte della concentrazione alla quale la AV non inibisce il processo stesso.

Attualmente gli impianti di digestione anaerobica alimentati con AV in co-digestione utilizzano una percentuale non superiore al 20% a causa della tossicità dei composti fenolici presenti che inibiscono l'attività della comunità metanigena.

Lo scopo della presente ricerca è stato quello di valutare l'impatto di due differenti processi biologici sulla produzione finale di metano: un processo di autofermentazione delle acque di vegetazione in quanto i residui agricoli non sono mai sterili e contengono quindi una microflora autoctona e un processo di fermentazione indotto tramite l'utilizzo di una comunità selezionata di batteri idrogeno produttori.

La sperimentazione ha consentito di verificare la fattibilità e l'efficacia del processo di produzione di idrogeno e di idrogeno e metano in bifase con acqua di vegetazione diluita al 50 e al 25%, il processo di autofermentazione è risultato essere un pretrattamento efficace per la produzione di metano anche con acqua di vegetazione tal quali.

1 Introduzione

La produzione di biogas mediante digestione anaerobica delle biomasse di scarto è tra i processi più promettenti per la produzione sostenibile di bioenergia sotto forma di bioidrogeno e biometano.

L'attività sperimentale è stata finalizzata ad indagare e ottimizzare i processi biologici di produzione di metano da due scarti reali:

- a) la chitina proveniente dalla lavorazione dei gamberi
- b) l'acqua di vegetazione, effluente proveniente dalla lavorazione delle olive per la produzione di olio d'oliva.

Per entrambi gli scarti non ci sono, fino ad ora, soluzioni tecnologiche per la loro valorizzazione energetica.

La chitina, un polimero della N-acetilglucosamina, è il principale componente dell'esoscheletro degli invertebrati e della parete cellulare dei funghi costituendo il più abbondante biopolimero naturale dopo la cellulosa. La biodegradabilità di questo polisaccaride è piuttosto bassa e così, mentre il suo smaltimento da parte dell'industria della pesca è divenuto un problema piuttosto rilevante, è aumentato l'interesse verso la sua trasformazione in prodotti di valore aggiunto nonché verso la valorizzazione energetica.

Negli ambienti naturali la degradazione microbica della chitina contribuisce in modo sostanzioso alla ciclizzazione del carbonio negli ecosistemi. La sua idrolisi procede attraverso la deacetilazione a chitosano oppure può essere idrolizzata a N,N'-diacetylchitobiosio e oligomeri di N-acetilglucosamine, ad opera sia di microrganismi anaerobici che aerobici. La prima via sembra prevalere negli ambienti di estuario anche se si ritiene sia la meno comune.

È inoltre dimostrato che l'aggiunta di chitina in suoli umidi e fanghi carenti di ossigeno stimola l'attività microbica con produzione di metano (Manucharova et al., 2006). Prove condotte sulla degradazione della chitina in condizioni di anaerobiosi (Wieczorek et al., 2014) hanno messo in evidenza la presenza dei prodotti della fermentazione nel mezzo di coltura – acetato, butirrato, propionato, idrogeno, CO₂ suggerendo la presenza di una fermentazione acido mista (butirrica e propionica).

L'Italia è il secondo paese produttore al mondo, dopo la Spagna, di olio di oliva (450.000 ton). L'acqua di vegetazione (AV), è ottenuta dal processo di estrazione dell'olio extravergine di oliva. Le caratteristiche chimico-fisiche e biologiche delle AV dipendono dal processo di estrazione, dal cultivar e dalla regione di origine delle olive e dalle condizioni climatiche. Queste acque sono caratterizzate da colore scuro (dal violetto-rosso fino al nero), odore sgradevole, pH acido (4,5 – 5,9), elevata salinità, elevati valori di COD (45-220 g COD/L), di polifenoli (0,2- 8 g/L) e un alto contenuto di composti antimicrobici e fitotossici.

Le particolari caratteristiche chimico-fisiche lo rendono un rifiuto potenzialmente molto inquinante, considerando inoltre che lo sversamento diretto delle acque di vegetazione nelle acque superficiali e/o lo spandimento sul terreno agricolo rimane al momento la via preferenziale per procedere al loro smaltimento (La Cara F. et al., 2012). Tuttavia, sono conosciuti da tempo gli impatti negativi che le acque di vegetazione hanno sull'ambiente: inibizione della germinazione dei semi, (Saez L. et al., 1992), alterazione delle caratteristiche del suolo, (Ben Sassi A. et al., 2006) e modificazione della struttura della comunità microbica del suolo, (Karpouzas D.G. et al., 2010).

Diversi trattamenti chimico-fisici e biologici sono stati da tempo sperimentati per cercare di ridurre il carico inquinante di questo refluo. Tra i trattamenti biologici l'utilizzo della digestione anaerobica sembra essere quella più promettente non solo per l'abbattimento degli inquinanti presenti, ma anche per la contemporanea valorizzazione economica del rifiuto stesso (Marques I.P. 2000; Marques I.P. 2001; Sampaio M.A. et al., 2011; Goncalves M.R. et al., 2012). Tuttavia il suo utilizzo richiede una diluizione con altri substrati o un'acclimatazione a concentrazioni crescenti superiore ai 7 mesi (Sampaio et al. 2011), Attualmente gli impianti di digestione anaerobica alimentati con AV in co-digestione utilizzano una percentuale non superiore al 20% a causa della tossicità dei composti fenolici presenti che inibiscono l'attività della comunità metanigena, (Goncalves M.R. et al., 2014).

In recenti studi (Pontoni et al., 2015) si è visto come la riduzione degli anelli aromatici dei fenoli richieda la presenza di idrogeno molecolare nel mezzo. In questo lavoro si ipotizza che tale processo avvenga in simbiosi con i batteri idrogeno produttori presenti nell'inoculo. La riduzione dei fenoli, inibenti per la comunità di

Archaea metanigeni, favorirebbe la produzione di metano. Inoltre le acque di vegetazione come ogni biomassa di scarto possiedono una propria microflora batterica e fungina ma tuttavia non esistono dati in letteratura sull' autofermentazione di questi substrati.

2 DESCRIZIONE DELL'ATTIVITÀ SVOLTA E RISULTATI

2.1 Processo di digestione anaerobica da chitina grezza

I risultati degli studi precedentemente condotti nell'ambito della collaborazione ENEA – Università della Tuscia avevano mostrato che l'inoculo F210 possedeva un capacità chitinolitica anche su chitina grezza, scarto reale della lavorazione di gamberi, promuovendo il processo di produzione di idrogeno.

In questa annualità sono presentati i risultati di due serie sperimentali finalizzate allo studio della produzione di metano da chitina grezza. Le prove sono state condotte integrando la comunità microbica metanigena con:

- inoculo del pool batterico fermentante F210 al fine di potenziare la fase di idrolisi e di acidogenesi. Gli esperimenti sono stati condotti sia in bifase rilevando la produzione di H₂ prodotta nella prima fase, sia in monofase (Tab.1). Le prove sperimentali sono state pianificate sulla base della metodologia RMS (Response Surface Methodology), già impiegata nella precedente annualità dell'AdP per la produzione di idrogeno, ma riducendo la fase di produzione di idrogeno da 30 giorni a 48 ore per il bifase. Il monofase è stato avviato inoculando i batch contenenti chitina, simultaneamente con F210 e comunità metanigena al fine di mettere in risalto la fermentazione primaria, composta da idrolisi e acidogenesi, e la relativa produzione di idrogeno, un interessante *bioproduct*, intermedio della produzione di biometano.
- inoculo integrato di Funghi Anaerobi Ruminanti (AFR) più F210, al fine di potenziare ulteriormente la fase di idrolisi. Questa serie sperimentale è stata pianificata sulla base dei risultati ottenuti in a)

2.1.1 Descrizione della sperimentazione

a) Esperimento con inoculo del pool batterico fermentante F210

Il disegno sperimentale, realizzato sia con configurazione di processo monofase che bifase, è presentato in Tabella 1.

Tabella 1. Piano sperimentale fattoriale disegnato sulla base della metodologia RMS (Response Surface Methodology) ed utilizzato con configurazione di processo sia monofase che bifase: i substrati colturali erano composti come da tabella

Exp Name	Run Order	Incl/Excl	Chitina (g/l)	Corn Steep Liquor (g/l)
N1	13	Incl	5	0
N2	2	Incl	20	0
N3	10	Incl	5	1
N4	3	Incl	20	1
N5	1	Incl	5	0,5
N6	12	Incl	20	0,5
N7	8	Incl	12,5	0
N8	22	Incl	12,5	1
N9	5	Incl	12,5	0,5
N10	16	Incl	12,5	0,5
N11	19	Incl	12,5	0,5
N12	6	Incl	5	0
N13	15	Incl	20	0
N14	14	Incl	5	1
N15	11	Incl	20	1
N16	17	Incl	5	0,5
N17	7	Incl	20	0,5
N18	4	Incl	12,5	0
N19	21	Incl	12,5	1
N20	18	Incl	12,5	0,5
N21	9	Incl	12,5	0,5
N22	20	Incl	12,5	0,5

Per questo esperimento è stato utilizzato uno scarto reale, costituito da scarti della lavorazione dei gamberi: i carapaci lavati ed essiccati sono stati utilizzati in 3 concentrazioni, rispettivamente 20, 12,5 e 5 g/L (corrispondenti a 10,8 – 6,75 e 2,7 gVS/L) utilizzando in alcuni casi Corn Steep Liquor (CSL) quale starter per l'attività batterica (concentrazione di 1 o 0,5 g/L) (Juarez-Jimenez et al., 2010).

Gli esperimenti sono stati condotti in batch da 120 mL con un working volume di 50 mL, in mesofilia (37°C) e in agitazione. I substrati, chitina grezza costituita da carapaci di gamberi derivanti da lavorazione industriale e Corn Steep Liquor, sono stati caratterizzati attraverso la determinazione dei solidi totali (TS), volatili (VS), (APHA, 2005). Il substrato era diluito in tampone fosfato 0,1 M. La concentrazione della sostanza organica dei substrati è presentata in tabella 2.

Tabella 2. Caratterizzazione dei substrati: Corn Steep Liquor (CSL) e Chitina

substrati	TS %	VS %
CSL	42,92±0,24	33,30±0,24
CHITINA	87,49±0,06	54,18±0,15

L'inoculo F210 è stato attivato per 24 ore, come descritto in Marone et al., 2010. Per l'inoculo a metano è stato utilizzato il digestato ottenuto da un impianto ENEA (Configurazione di processo CSTR), alimentato unicamente a scotta. Il volume di entrambi gli inoculi (F210 e CSTR) era pari al 20%v. Nella serie sperimentale con configurazione di processo bifase, l'inoculo con la comunità metanigena è stato effettuato dopo 48 ore. Relativamente all'inoculo di metanigeni, poiché è stato utilizzato un inoculo fresco proveniente da un fermentatore in continuo, è stata misurata e monitorata la densità cellulare e la vitalità attraverso conte al microscopio ad epifluorescenza (Fig. 1). Il microscopio ad epifluorescenza (AXIOSKOP 40, Zeiss, Germania) equipaggiato con lampada a mercurio (HBO 50/AC) ha permesso di evidenziare e quantificare i microrganismi utilizzando tre coloranti molto efficaci, il Syto 9 e Propidium iodide per l'analisi LIVE/DEAD e il DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindole) per le conte batteriche. La percentuale di microrganismi vivi sui morti era del 35%. L'analisi al microscopio ha permesso di distinguere bene all'interno della guild di metanogeni prevalentemente il genere Methanosaeta caratteristici per la loro forma filamentosa (Patel et al., 1990).

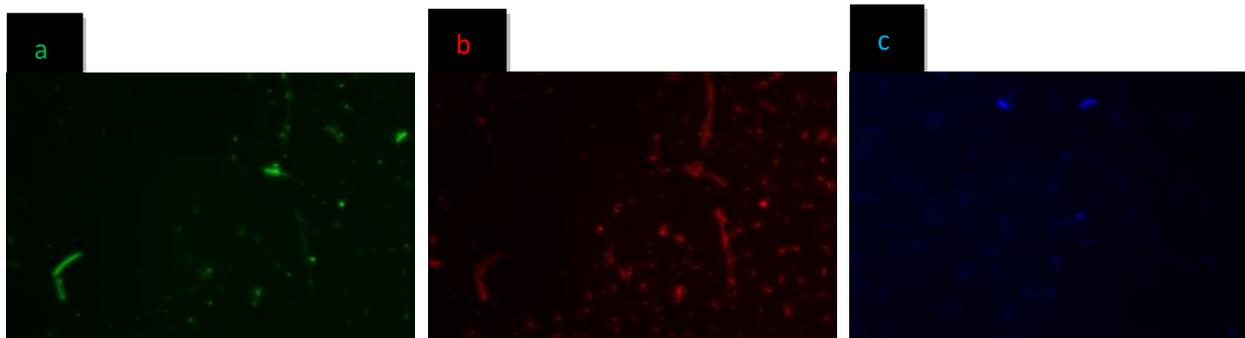


Figura 1. Colorazione a) LIVE (verde) b) DEAD (rosso) e c) DAPI dell'inoculo CSTR

2.1.2 Risultati

Produzione di idrogeno

I batch sono stati monitorati alle 24 e 48 ore e poi una volta a settimana. Con configurazioni di processo bifase le produzioni più elevate di H₂ si ottengono nelle prime 24 ore alle massime concentrazioni di Corn Steep Liquor e alle più basse di chitina (1:5) per entrambe le repliche (208 e 199 mL H₂/L) (Fig. 2). Anche negli esperimenti in monofase le produzioni più elevate si ottengono alle più basse concentrazioni di chitina (52,8 e 50,2 mL H₂/L). Nell'esperimento con inoculi separati temporalmente – bifase - la produzione di idrogeno a 48 ore è maggiore dell'82% rispetto all'esperimento realizzato in monofase. D'altra parte è noto che la produzione di idrogeno anche se presente è immediatamente consumata (da batteri idrogenotrofi o omoacetogeni).

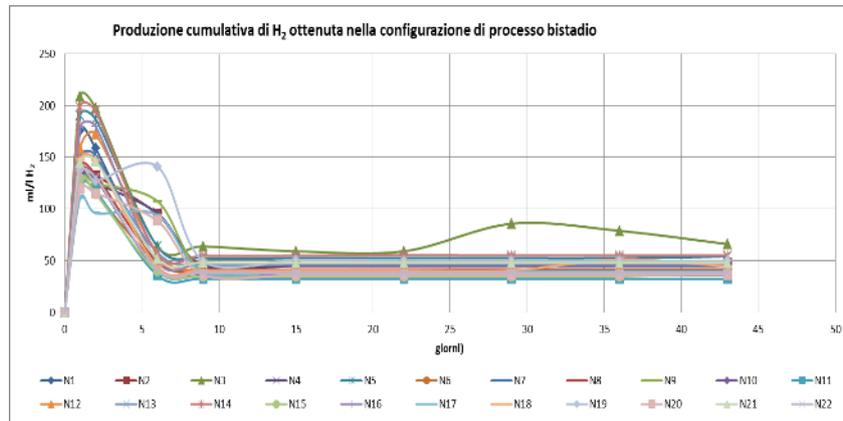


Figura 2. Produzione di H₂ in bifase

In tabella 3 sono riportate le percentuali massime di H₂ contenute nel gas rispettivamente in bifase e in monofase ed i mL/L prodotti alle diverse concentrazioni di substrato per entrambi gli esperimenti. Il pH rimaneva costante per tutta la durata della I fase.

**Tabella 3. [a] Produzione di H₂ nell'esperimento configurato in bifase;
[b] Produzione di H₂ nell'esperimento configurato in monofase**

Exp No	Chitina	Corn Steep Liquor	Tempo produzione max (h)	H ₂ (%)	H ₂ (ml/l)	pH
1	5	0	24	9,52	175	6,5
2	20	0	24	7,07	137	6,5
3	5	1	24	10,5	209	6,5
4	20	1	24	6,84	134	6,5
5	5	0,5	24	9,72	190	6,5
6	20	0,5	24	6,65	129	6,5
7	12,5	0	24	7,79	149	6,5
8	12,5	1	24	7,19	141	6,5
9	12,5	0,5	24	6,82	131	6,5
10	12,5	0,5	24	6,65	129	6,5
11	12,5	0,5	24	6,44	124	6,5
12	5	0	24	8,36	159	6,5
13	20	0	24	7,33	146	6,5
14	5	1	24	10,1	199	6,5
15	20	1	24	6,64	129	6,5
16	5	0,5	24	9,20	179	6,5
17	20	0,5	24	5,76	111	6,5
18	12,5	0	24	7,62	148	6,5
19	12,5	1	24	7,08	137	6,5
20	12,5	0,5	24	6,16	120	6,5
21	12,5	0,5	24	7,10	145	6,5
22	12,5	0,5	24	6,94	135	6,5

[a]

Exp No	Chitin	Corn steep Liquor	Tempo produzione (h)	H ₂ (%)	H ₂ (ml/l)	pH
1	5	0	24	2,95	48,4	6,5
2	20	0	24	0,32	6,00	6,5
3	5	1	24	1,50	25,5	6,5
4	20	1	24	1,18	21,7	6,5
5	5	0,5	24	2,96	49,1	6,5
6	20	0,5	24	1,90	34,6	6,5
7	12,5	0	24	2,94	52,8	6,5
8	12,5	1	24	1,67	30,3	6,5
9	12,5	0,5	24	1,66	29,8	6,5
10	12,5	0,5	24	1,94	34,9	6,5
11	12,5	0,5	24	1,55	27,9	6,5
12	5	0	24	2,95	50,2	6,5
13	20	0	24	1,84	33,8	6,5
14	5	1	24	2,66	45,3	6,5
15	20	1	24	1,74	32,0	6,5
16	5	0,5	24	2,84	48,2	6,5
17	20	0,5	24	1,60	29,5	6,5
18	12,5	0	24	2,69	47,3	6,5
19	12,5	1	24	1,89	33,7	6,5
20	12,5	0,5	24	1,55	27,2	6,5
21	12,5	0,5	24	1,88	33,1	6,5
22	12,5	0,5	24	1,37	24,4	6,5

[b]

Produzione di metano

Negli esperimenti in bifase la comunità metanigena (CSTR) è stata inoculata dopo 48 ore. Il pH ad inizio esperimento, per entrambe le serie, era di 6,5 e si è mantenuto costante durante il processo di produzione di metano. Dai grafici in figura 3 è possibile rilevare come le produzioni cumulative di CH₄ si protraggono almeno fino al 78° giorno anche se per parte delle prove si osserva un calo di produzione intorno al 35° giorno di esperimento.

Di seguito sono riportati i grafici relativi alle produzioni cumulative di CH₄ in configurazione monofase e bifase (Fig. 3a, b). Relativamente alla produzione cumulativa di CH₄ negli esperimenti in monofase dopo 22 giorni la produzione è più elevata (+24%) rispetto a quelli in bifase. Per entrambe le serie sperimentali le produzioni cumulative di biometano (Figg. 3a e 3b) mostrano come a fine esperimento i migliori risultati si ottengono

per entrambi i processi alle stesse condizioni sperimentali, cioè alla più elevata concentrazione di substrato (10,8 g VS/L) con i valori di concentrazione del metano nel biogas fino al 67%. La produzione di metano in monofase alle concentrazioni di chitina grezza di 12,5 e di 20 g/L, risulta incrementata rispetto al bifase del 15,6% e del 9%, rispettivamente.

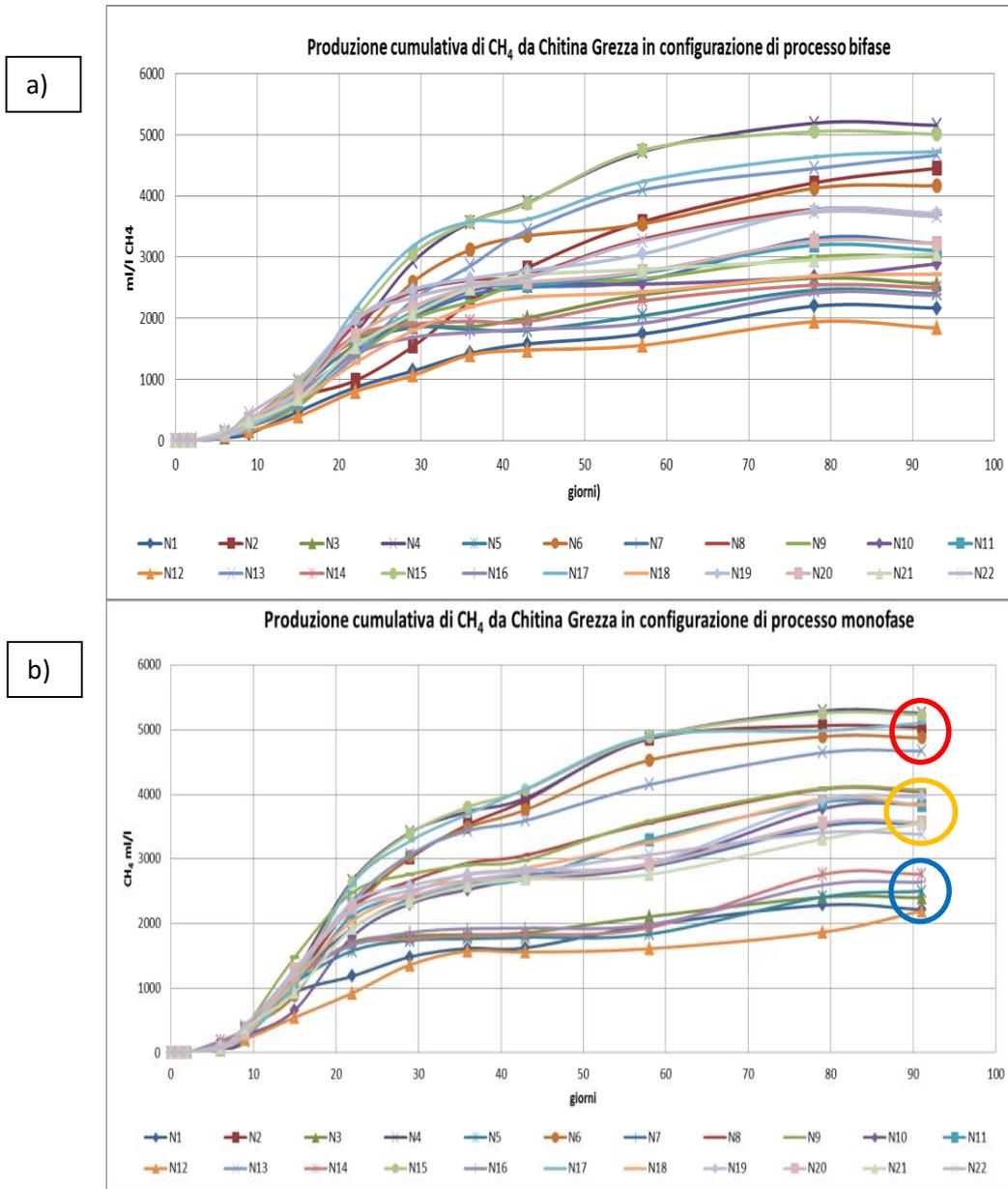


Figura 3. Curve di produzione relative all'esperienza disegnata tramite metodologia RMS (Response Surface Methodology): sono riportate le produzioni cumulative di H₂ e CH₄ ottenute in configurazione di processo a) bifase e b) monofase

Nella tabelle 4a e 4b sono riportate le relative produzioni di metano (al 35° giorno) per entrambe le configurazioni di processo.

Tabella 4. Produzione di CH₄ nell'esperimento configurato in [a] bifase e [b] in monofase

Exp No	Chitin	Corn steep Liquor	Tempo produzione (g)	CH ₄ (%)	CH ₄ (ml/l)	pH
1	5	0	35	57,0	1425	6,5
2	20	0	35	63,5	2269	6,5
3	5	1	35	56,9	1865	6,5
4	20	1	35	72,7	3569	6,5
5	5	0,5	35	57,0	1817	6,5
6	20	0,5	35	64,0	3121	6,5
7	12,5	0	35	63,2	2377	6,5
8	12,5	1	35	63,5	2622	6,5
9	12,5	0,5	35	59,1	2270	6,5
10	12,5	0,5	35	63,7	2447	6,5
11	12,5	0,5	35	63,7	2494	6,5
12	5	0	35	54,4	1399	6,5
13	20	0	35	64,5	2857	6,5
14	5	1	35	57,7	1950	6,5
15	20	1	35	69,5	3580	6,5
16	5	0,5	35	58,0	1767	6,5
17	20	0,5	35	67,5	3581	6,5
18	12,5	0	35	64,0	2184	6,5
19	12,5	1	35	63,2	2649	6,5
20	12,5	0,5	35	62,6	2503	6,5
21	12,5	0,5	35	63,0	2489	6,5
22	12,5	0,5	35	62,2	2546	6,5

[a]

Exp No	Chitin	Corn steep Liquor	Tempo produzione (g)	CH ₄ (%)	CH ₄ (ml/l)	pH
1	5	0	37	56,0	1617	6,5
2	20	0	37	67,3	3532	6,5
3	5	1	37	53,6	1831	6,5
4	20	1	37	64,8	3732	6,5
5	5	0,5	37	55,6	1766	6,5
6	20	0,5	37	66,7	3489	6,5
7	12,5	0	37	62,5	2620	6,5
8	12,5	1	37	64,1	2936	6,5
9	12,5	0,5	37	61,3	2905	6,5
10	12,5	0,5	37	59,9	2524	6,5
11	12,5	0,5	37	62,6	2591	6,5
12	5	0	37	56,9	1574	6,5
13	20	0	37	65,5	3435	6,5
14	5	1	37	55,9	1812	6,5
15	20	1	37	67,4	3802	6,5
16	5	0,5	37	56,6	1920	6,5
17	20	0,5	37	66,7	3692	6,5
18	12,5	0	37	63,3	2765	6,5
19	12,5	1	37	60,7	2756	6,5
20	12,5	0,5	37	59,8	2647	6,5
21	12,5	0,5	37	60,1	2580	6,5
22	12,5	0,5	37	60,99	2673	6,5

[b]

D'altra parte solo nell'esperimento in monofase le maggiori produzioni di biogas già al 58° giorno corrispondono significativamente con le maggiori concentrazioni iniziali di chitina grezza, indipendentemente dalle concentrazione dello starter CSL, ordinando i risultati in 3 gruppi principali (Fig.4). In tabella 5 sono presentati i risultati del test ANOVA.

Tabella 5. ANOVA test

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	755631,3	1	755631,3	0,755668	0,389629	4,072654
Within Groups	41997988	42	999952,1			
Total	42753619	43				

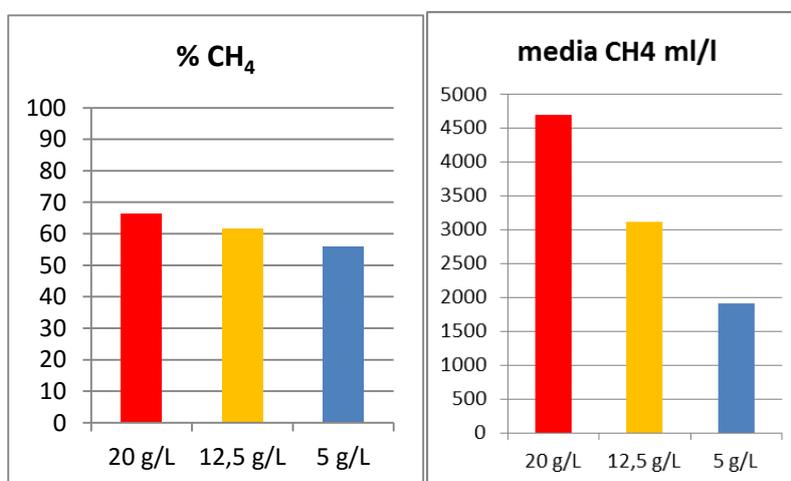


Figura 4. Valori medi di concentrazione del CH₄ (%) nel biogas prodotto nel corso dell'esperimento condotto con configurazione di processo monofase nonché le produzioni medie relativamente alla concentrazione della chitina grezza, riportata in g/L a 35 giorni dall'inizio dell'esperimento

Sempre per la configurazione monofase, se si prendono in considerazione i valori delle rese, in termini di mL di CH₄ prodotto per grammo di VS, i migliori risultati si ottengono per le più basse concentrazioni di substrato, rispettivamente di 884 mL/g VS, 554 mL/g VS e 465 mL/g VS, per le prove con 2,7 g VS/L, 6,75 g VS/L e 10,8 g VS/L di chitina grezza, rispettivamente facendo presumere una inibizione da substrato là dove la sua concentrazione è maggiore.

b) Esperimento con inoculo integrato di Funghi Anaerobi Ruminali più F210

Sulla base dei risultati ottenuti è stata pianificata la successiva serie sperimentale, tutta condotta in monofase, mirata a incrementare le produzioni di CH₄, e ad al contempo ridurre i tempi della DA. A tal fine alla fase idrolitica-acidogenica (fermentazione primaria) della chitina grezza, è stata aggiunta, oltre al consorzio F₂₁₀, una mix di ceppi ruminali, ARF ma non è stato utilizzato Corn Steep Liquor. Ad oggi non ci sono noti studi sulla chitina grezza relativamente alla sua idrolisi e/o alla produzione di biogas condotti integrando la comunità microbica con ARF. Nella tabella 6 è riportato lo schema del piano sperimentale.

Tabella 6. Schema del piano sperimentale realizzato in configurazione di processo monofase con differenti combinazioni di inoculo e a diverse concentrazioni di chitina grezza

PROVA	INOCULO	CONC. CHITINA g VS/L
A	ARF+F210+MS	6,5 g/L
B	F210+MS	
C	MS	
D	ARF+F210+MS	9,75 g/L
E	ARF+F210+MS	13 g/L
F	MS	/
H	ARF+MS	6,5 g/L

I principali e parziali risultati ottenuti sono evidenziati nel grafico in figura 5 ma, gli esperimenti sono ancora in corso poiché dopo 105 giorni di esperimento si registrano ancora produzioni di metano (analisi settimanali).

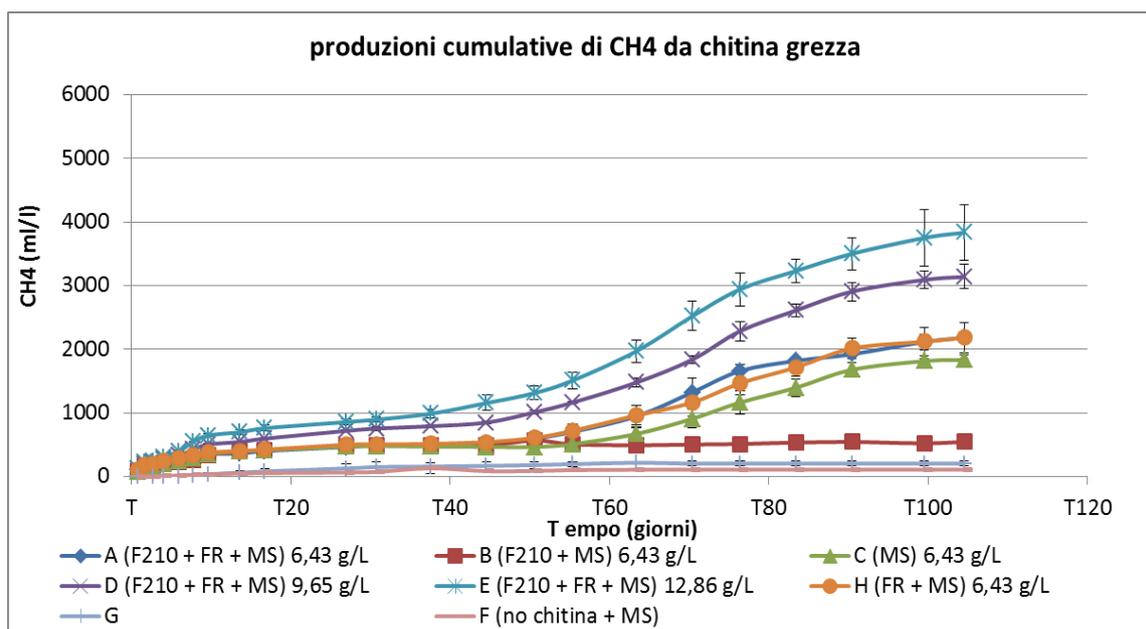


Figura 5. Produzione cumulativa di CH₄ ottenuta in configurazione di processo monofase, per tre differenti concentrazioni di substrato e in differenti combinazioni potenziamento della comunità metanigena

I principali risultati relativi alle produzioni di biometano da chitina grezza possono venir così riassunti: con il potenziamento combinato della comunità metanigena con ARF e F210 si ottengono concentrazioni di CH₄ nel biogas veramente interessanti: nelle prove C, D, E, H viene superato il 70% mentre per la prova D il valor medio è del 78% (con punte anche dell'82%). D'altra parte, come si può osservare dal grafico, l'avvio delle produzioni è lento: dopo una iniziale fase di produzione si assiste ad una fase lag che si protrae nel tempo per almeno 20 giorni, successivamente alla quale le produzioni di CH₄ si riavviano raggiungendo, nel migliore dei casi quasi 4000 mL/L (valori registrati al settembre 2015). A partire dal 40 giorno di sperimentazione, si registra per quasi tutte le prove una seconda e più marcata fase esponenziale di produzione.

I risultati ottenuti mettono in luce il ruolo del Corn Step Liquor come attivatore della comunità di batteri fermentanti, la cui attività è propedeutica alla produzione di metano. Infatti per entrambe le serie sperimentali i tempi di produzione si protraggono a lungo ma nel caso del primo esperimento appaiono più veloci: dal confronto tra il primo esperimento (condotto in monofase sulla base del disegno fattoriale, potenziando la comunità metanigena M solo con F210 ed il suo attivatore CSL), rispetto al secondo esperimento (realizzato integrando M sia con F210 che con ARF), si rileva che per quest'ultimo le quantità di mL di CH₄ finora prodotti sono minori rispetto a quelle ottenute per il precedente esperimento per lo stesso periodo di tempo, ed anzi nel precedente esperimento le produzioni al 60° giorno erano praticamente concluse. Questi risultati fanno dunque ipotizzare un ruolo di rilievo del CSL quale attivatore del pool fermentante F210 senza l'attività del quale, il "collo di bottiglia" creato dalla lenta idrolisi al primo step della DA potrebbe venir traslocato al secondo step, quello dell'acidogenesi, rallentando comunque la produzione di biometano. Ulteriori prove sperimentali sono necessarie per chiarire questi aspetti, ma lo sforzo sperimentale sarà comunque giustificato dalle elevate concentrazioni di CH₄ nel biogas.

Un risultato di rilievo ottenuto con questa serie sperimentale è la concordanza tra incremento di concentrazione del substrato con incremento percentuale della produzione cumulativa di CH₄ sempre però che la comunità metanigena sia integrata con ARF ed F210: all'aumentare del 50% della concentrazione di chitina grezza la produzione di CH₄ incrementa del 51%; raddoppiando la concentrazione di substrato l'incremento è dell'82%. Meno chiara è invece la relazione tra tipologie di condizioni sperimentali, cioè differenti combinazioni delle integrazioni della comunità metanigena con ARF ed F210 e considerate per la stessa concentrazione di substrato. I risultati ottenuti richiedono ulteriori indagini.

I valori di resa ottenuti per le condizioni che mostrano ad oggi le migliori produzioni - A, E, D, H - sono rispettivamente di 271, 301, 314 e 299 mL CH₄/g VS mostrando una certa costanza di rapporto, indipendentemente dalla concentrazione iniziale di chitina grezza.

Restano, ancora, da migliorare i tempi della DA e da indagare come il rapporto C:N del substrato chitina incida sull'efficienza dell'attività microbica della DA: la chitina infatti ha una struttura molecolare analoga a quella della cellulosa ma differisce per la presenza di un gruppo di acetilammina che sostituisce un gruppo di idrossile al C2 su ogni monomero.

2.2 *Processo di digestione anaerobica dalle acque di vegetazione*

Lo scopo della presente ricerca è stato quello di valutare l'impatto di due differenti processi biologici sulla produzione finale di metano: un processo di autofermentazione delle acque di vegetazione in quanto i residui agricoli non sono mai sterili e contengono quindi una microflora autoctona e un processo di fermentazione indotto tramite l'utilizzo di una comunità selezionata di batteri idrogeno produttori.

Si sono quindi sviluppate due diverse linee sperimentali al fine di:

- 1) testare se la microflora autoctona presente nelle AV sia in grado di attuare una autofermentazione delle stesse, e in caso positivo se questo possa essere un pre-trattamento biologico efficace all'utilizzo delle AV tal quali in impianti di digestione anaerobica per la produzione di biogas. Tali impianti potrebbero essere presenti negli stessi frantoi in modo da abbattere i costi che questi devono sostenere per lo smaltimento, ed al contempo produrre energia elettrica, con un indubbio vantaggio economico.
- 2) Testare se un processo di fermentazione indotto con un inoculo selezionato di microorganismi idrogeno produttori produce idrogeno dalle acque di vegetazione e se questo processo incrementi la produzione finale di metano.

2.2.1 Descrizione della sperimentazione

Per sviluppare la prima linea sperimentale, si è proceduto allestendo 3 batch da 125 mL in duplicato con AV a diverse concentrazioni decrescenti, (TQ, 50%, 25%) per un volume di lavoro pari a 50 mL, mantenuti a temperatura ambiente e analizzati per il biogas prodotto durante tutto il periodo della sperimentazione. I metaboliti solubili prodotti (zuccheri, acidi organici e alcoli) sono stati analizzati all’inizio e alla fine del processo di autofermentazione.

Successivamente, riscontrata la fattibilità del processo autofermentativo, gli stessi batch sono stati inoculati con un pool di microorganismi metanigeni mesofili provenienti da liquame bovino.

La seconda parte della sperimentazione, come detto prima, era tesa a indagare se il processo in bistadio con produzione separata di idrogeno e di metano poteva aumentare l’efficienza del processo, sia in termini energetici che come resa finale in metano (mLCH₄/g VS). Nella I fase batch da 125 mL (tre repliche) con AV a diverse concentrazioni decrescenti, (TQ, 50%, 25%.) per un volume di lavoro pari a 50 mL, sono stati inoculati con una comunità selezionata di batteri idrogeno-produttori (F210). Nella II fase i batch sono stati inoculati con lo stesso pool di microrganismi metanigeni mesofili utilizzato per la sperimentazione precedente. Entrambe i processi sono stati testati a 37°C.

Entrambe le sperimentazioni sono state messe a confronto, con un processo di produzione di metano, alle stesse condizioni sperimentali, da acque di vegetazione non trattate (due repliche)

Di seguito sono riportati i piani sperimentali delle diverse sperimentazioni (Tab.7), dove:

- a) AV AUTO: Acque di vegetazione poste in auto fermentazione.
- b) AVM AUTO: Acque di vegetazione inoculate con metani geni dopo pre-trattamento di auto fermentazione.
- c) AVM: Acque di vegetazione incolate con metani geni senza pre-trattamento.
- d) AVF: Acque di vegetazione incolate prima con un pool di idrogeno produttori e successivamente con metani geni.

Tabella 7. Schema dei piani sperimentali delle diverse serie sperimentali

AV AUTO (Autofermentazione)

REPLICHE	CAMPIONE	TEMP., °C	SUBSTRATO
2	AV Tq	37	AV 100%
2	AV 50%		AV 50%
2	AV 25%		AV 25%

(a)

AVM AUTO (Metanazione con pretrattamento autofermentazione)

REPLICHE	CAMPIONE	TEMP., °C	SUBSTRATO	INOCULO
2	AV-Auto Tq	37	AV 100%	20%MS
2	AV-Auto 50%		AV 50%	
2	AV-Auto 25%		AV 25%	

(b)

AVM (Metanazione senza pre-trattamento)

REPLICHE	CAMPIONE	TEMP., °C	SUBSTRATO	INOCULO
3	AVM Tq	37	AV 100%	20%MS
2	AVM 50		AV 50%	
2	AVM 25		AV 25%	
2	Biometanazione Pot.		0	

(c)

AVF (Metanazione con inoculo H₂ produttori)

REPLICHE	CAMPIONE	TEMP., °C	SUBSTRATO	INOCULO I FASE	Dopo 13 giorni	INOCULO II FASE
3	AV-F Tq	37	AV 100%	20% F210		
3	AV-F 50%		AV 50%			
3	AV-F 25%		AV 25%			

(d)

2.2.2 Caratterizzazione del substrato

Le acque di vegetazione sono state fornite dalla Cooperativa Agricola Sant'Antonio, Località Boschetto, Rocca Massima (LT) che utilizza, per la produzione di olio extravergine, il processo a tre fasi. Le sue caratteristiche chimico fisiche sono elencate in tabella 8:

Tabella 8. Caratterizzazione acque di vegetazione

Parametro	AV
pH	4,7-5
CODs (g O ₂ /L)	55,5 ± 4,93
Fenoli totali (mg Acido Gallico /L)	2620 ± 198
TS (g/L)	44,1 ± 0,87
VS (g/L)	36,7 ± 1,91
Glucosio (g/L)	5,70 ± 0,30
Galattosio (g/L)	4,90 ± 0,13

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. I TVS sono la sostanza organica biodisponibile. La differenza tra TS e TVS rappresenta la frazione di inerte costituita per lo più da composti inorganici.

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 (K₂Cr₂O₇) a caldo, in ambiente acido (H₂SO₄) ed in presenza di un catalizzatore di ossidazione (Ag₂SO₄). Le sostanze organiche presenti nel campione sono ossidate a CO₂ e H₂O: il Cr³⁺, proveniente dalla riduzione del Cr₂O₇²⁻, 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÷2,5 mg), sono posti nella provetta di digestione, dove sono addizionati 2 mL di H₂O e 2 mL di soluzione di reazione.

La provetta tappata è posta nel termoreattore per 2 ore a 150 °C. Dopo 10' dalla rimozione dal termoreattore si agita la provetta e si lascia, quindi, raffreddare a temperatura ambiente (circa 30'). 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 6,1290 g di K₂Cr₂O₇ (0,25 N), dopo essiccazione a 105 °C per 2 ore, in 60 mL di H₂O deionizzata e portando a volume, in un pallone tarato da 500 mL, con H₂SO₄ concentrato, contenete 10 g/L di Ag₂SO₄. Per campioni contenenti Cl⁻ (≤ 2500 mg/L) alla soluzione ossidante è aggiunto del HgSO₄ (25 g/L).

Metaboliti solubili

I prodotti metabolici della fermentazione (Acidi Grassi Volatili, Acido Lattico, Etanolo) ed alcuni zuccheri (glucosio, cellobiosio, xilosio, lattosio) sono stati analizzati mediante HPLC (high performance liquid chromatograph) Thermo Spectrasystem P4000, equipaggiato con rilevatore UV ($\lambda = 210$ nm) e 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 μ m, precolonna con cartucce Carbo-H (Phenomenex); fase mobile H₂SO₄ 5 mN (flusso: 0,6 mL/min). Il campione tal quale è stato prima centrifugato a 13000 rpm per 10 minuti e dopo essere stato diluito in H₂SO₄ 5 mN (1:20) ricentrifugato a 13000 rpm per 10 minuti prima dell'iniezione in HPLC.

Analisi quantitativa e qualitativa del Biogas

Il volume del biogas è stato misurato attraverso un water displacement system (Kalia et al., 1994).

La percentuale di H₂, CH₄ e CO₂ presenti nel biogas prodotto nei batch è stata misurata tramite l'utilizzo di un gascromatografo (GC) Thermo con colonna "Stainless Steel" con riempimento Hayesep Q 800/100 mesh e rilevatore a conducibilità termica (TCD). Tale colonna consente la rilevazione di H₂, CH₄ e CO₂ in un'unica corsa. Il gas carrier utilizzato è stato l'azoto ad un flusso di 30-35 mL/min. Le temperature di esercizio della colonna e dell'iniettore erano di 120°C, quella del rilevatore TCD era di 200°C.

Composti fenolici

I composti fenolici totali espressi come mg di Acido Gallico equivalenti per litro (mg AGE/L) erano determinati seguendo il metodo di Folin-Ciocalteu modificato, (Singleton V.L. et al 1999), in cui un volume di 0,02 mL di ogni campione non trattato era messo in soluzione con 0,1 mL reagente di Folin e 0,8 mL di Na₂CO₃ 7,5%, portato a volume finale di 2 mL con acqua distillata e messo a reagire per 40 minuti a 40°C. La soluzione lasciata raffreddare a temperatura ambiente veniva trasferita in una cuvetta in polistirene e letta l'assorbanza allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di $\lambda = 750-765$ nm.

Inoculi

Il pool di idrogeno produttori responsabili del processo fermentativo all'interno del primo reattore è stato selezionato all'interno di questo laboratorio, stoccato a -20°C e riattivato per 24 ore prima di essere inoculato per la sperimentazione come descritto in Marone et al. 2010.

L'inoculo di metanigeni proviene da liquame bovino messo a 37°C e utilizzato quando l'analisi all'HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) ha evidenziato l'assenza di substrati disponibili per la metanazione.

2.2.3 Risultati

Autofermentazione

I risultati mostrano come la comunità batterica autoctona presente nelle acque di vegetazione sia capace di iniziare spontaneamente un processo fermentativo producendo già alle 24 ore un biogas con presenza di H₂ e CO₂ (Figure 6a-6b). Le produzioni massime di idrogeno si hanno dopo 11 giorni, 31 mL/L per il campione non diluito, 103 mL/L per la diluizione al 50% e 95 mL/L per quello diluito al 25%. Per tutto il periodo dell'esperimento il pH dei campioni si è mantenuto stabile con valori intorno a pH 4,7-5.

In tabella 9 sono riassunte le percentuali di H₂ presente nel biogas prodotto, i mL/L prodotti e le rese.

Tabella 9. Riassunto della performance della produzione di H₂ per la serie AV AUTO

campione	Tempo produzione max (giorni)	H ₂ Max (%)	Produzioni (mLH ₂ /L)	RESA (mLH ₂ /gVS)
AV AutoTq	11	1,32 ± 0,21	30,9 ± 3,95	0,84 ± 0,11
AV Auto 50%	11	5,85 ± 0,10	103 ± 1,00	5,62 ± 0,10
AV Auto 25%	11	6,31 ± 0,36	95,0 ± 4,94	10,4 ± 0,54

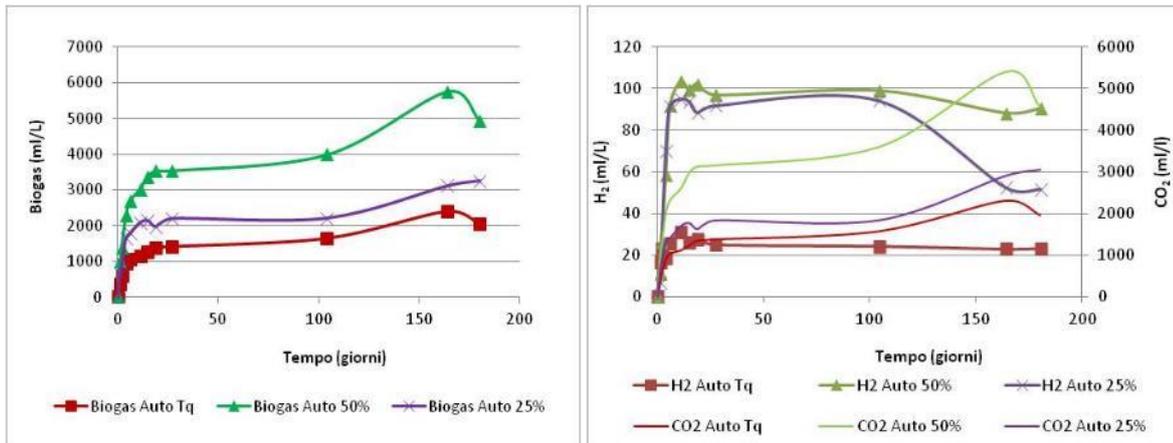


Figura 6. a) Produzione cumulativa di biogas; b) produzione cumulativa di H₂ e CO₂ nel tempo a diverse concentrazioni di substrato in AV Auto

La sperimentazione è proseguita avviando il processo di metanazione. Come controllo sono state allestite prove in batch con AV non trattata alle stesse concentrazioni utilizzate per la sperimentazione in autofermentazione.

I risultati evidenziano come la comunità fermentante presente nel liquame utilizzato come inoculo di metanigeni abbia innescato il processo di produzione di idrogeno in entrambe le serie sperimentali (Figg. 7a e 7b). Infatti nella comunità sono presenti tutti i microorganismi che effettuano sintroficamente le diverse fasi del processo di digestione anaerobica (idrolisi, acido genesi con produzione di idrogeno, acetogenesi e metanogenesi). Le prove AVM Auto, raggiungono il loro massimo di produzione alle 40 ore per l'AVM Auto Tq e AVM Auto 50% e alle 20 ore per la diluizione al 25% con una produzione di idrogeno di $195 \pm 5,80$ mL/L , di $193 \pm 0,90$ mL/L e di $38,3 \pm 0,10$ mL/L , rispettivamente. Le prove senza pre-trattamento raggiungono il loro massimo di produzioni in 7 giorni per i campioni Tq e diluiti al 50 % con un volume prodotto rispettivamente di $1461,6 \pm 402,4$ mL/L e $791,7 \pm 33,4$ mL/L, ed in soli 2 giorni per i campioni più diluiti (25%) con un volume prodotto di $393,7 \pm 62,0$ mL/L (Figg. 7c e 7d).

E' importante rilevare che in entrambe le serie sperimentali l'idrogeno viene consumato velocemente prima dell'inoculo dei metanigeni.

Per quanto riguarda la fase a metano, bisogna tenere presente alcune difficoltà operative incontrate durante la sperimentazione: tutte le repliche di entrambe le serie sperimentali al momento dell'inoculo con i metanigeni sono state portate al pH =7,1 (con NaOH 6 N), valore all'interno del range ottimale (6,8-7,5) per l'attività dei microrganismi metanigeni . Tuttavia dopo il processo di produzione di idrogeno, nella serie AVM e nel campione AVM Auto Tq, il pH è sceso ad un valore di 5,5 rendendo necessario dopo 12 giorni una ulteriore aggiunta di NaOH 6 N per riportare il pH a 7,1. Tuttavia il processo di produzione di metano per campione AVM tq non è partito nonostante il pH si attesti, durante tutto il periodo di monitoraggio, intorno a valori di 6,1-6,4, non ottimali per la produzione di metano ma non inibente. Per gli altri campioni si è determinato un allungamento della lag fase. La serie sperimentale AVM ha iniziato a produrre metano dopo 27 giorni per la diluizione al 50% contro i 5 giorni in AVM Auto e 19 giorni quello al 25% contro le 24 ore di AVM Auto. La serie sperimentale AVM auto ha iniziato a produrre metano dopo 27 giorni dall'avvio della sperimentazione

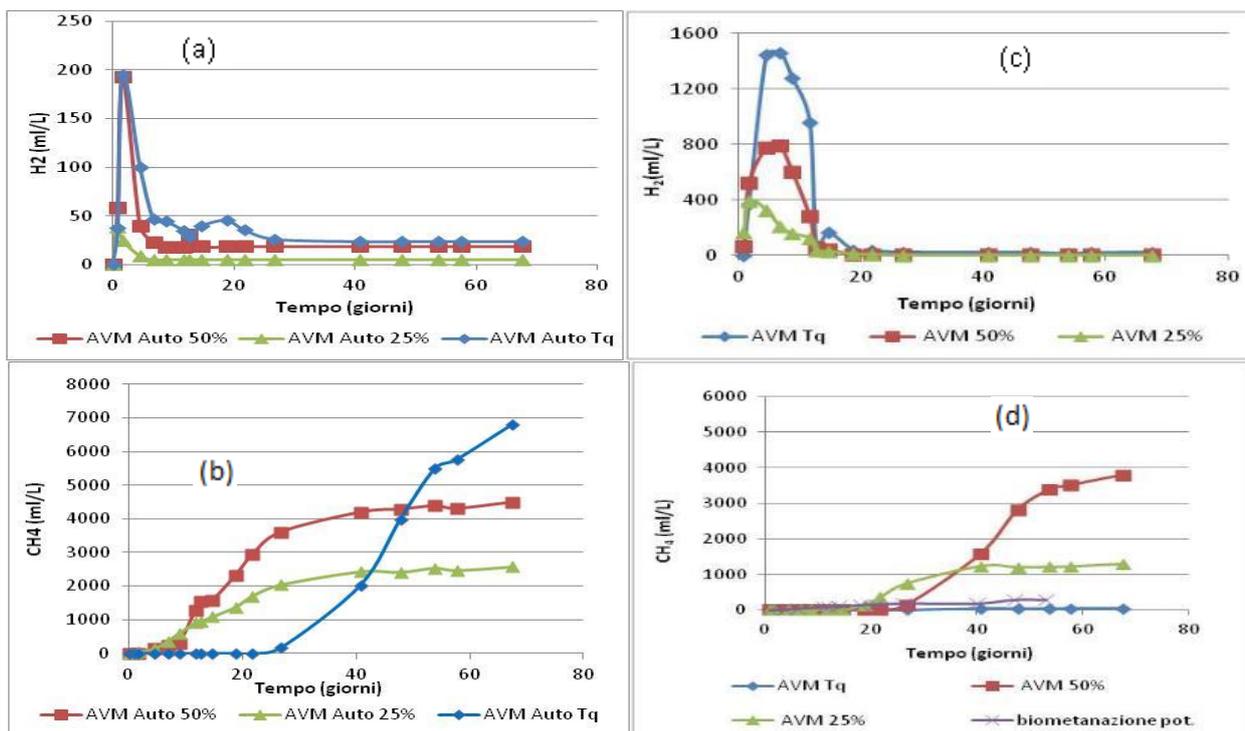


Figura 7. Produzione cumulativa di H₂ e CH₄ nelle diverse serie sperimentali:
 (a) Produzione di idrogeno in AVM Auto. (b) Produzione di metano in AVM Auto.
 (c) Produzione di Idrogeno in AVM. (d) Produzione di metano in AVM

Nelle tabelle 10 e 11 sono riassunti i dati relativi alle percentuali di H₂ e di CH₄ presenti nel biogas con i rispettivi volumi prodotti espressi in mL/L e le rese in entrambe le condizioni sperimentali, con e senza pre-trattamento. Sono anche presentati i dati di produzione di metano dall'inoculo utilizzato (BMP inoculo).

Tabella 10. Riassunto della performance della produzione di H₂ delle serie sperimentali AVM Auto e AVM

campione	Tempo produzione max (giorni)	H ₂ Max (%)	Produzioni (mLH ₂ /L)	Resa (mLH ₂ /gVS)
AVM Auto Tq	2	4,60 ± 0,13	195 ± 5,8	6,66 ± 0,20
AVM Auto 50%	2	4,60 ± 0,08	193 ± 1,0	13,0 ± 0,10
AVM Auto 25%	1	0,88 ± 0,11	38,3 ± 0,08	5,32 ± 0,11
AVM Tq	7	21,2 ± 4,5	1462 ± 402	50,1 ± 13,7
AVM 50%	7	14,3 ± 0,3	792 ± 33,4	53,5 ± 2,25
AVM 25%	2	8,6 ± 1,0	394 ± 62,0	54,7 ± 8,72

Tabella 11. Riassunto della performance della produzione di CH₄ delle serie sperimentali AVM Auto e AVM

campione	Tempo produzione max (giorni)	CH ₄ Max (%)	Produzioni (mLCH ₄ /L)	Resa (mLCH ₄ /gVS)
AVM Auto Tq	68+	65,6 ± 0,5	6825 ± 140	233 ± 5,0
AVM Auto 50%	68+	60,1 ± 0,6	4497 ± 49,4	304 ± 3,34
AVM Auto 25%	68+	48,2 ± 2,8	2579 ± 188	358 ± 26,1
AVM Tq	54	1,15 ± 0,71	37,3 ± 25,2	1,51 ± 1,00
AVM 50%	68+	52,6 ± 2,6	3789 ± 69,3	256 ± 4,68
AVM 25%	41	46,8 ± 04	1231 ± 106	179 ± 2,45
BMP inoculo	47	7,47 ± 0,56	292 ± 23,0	///

Confrontando le rese di produzione per il processo di produzione di idrogeno la serie AVF presenta valori più elevati della serie AVF Auto. Inoltre per entrambe le serie sperimentale si evidenzia un andamento non correlato alla concentrazione del substrato.

Per quanto riguarda la produzione di metano e tenendo in considerazione che l'esperimento è ancora in corso per tutti i campioni di AVF Auto e per AVF 50%, possiamo affermare che per tutte le diluizioni testate le prove che hanno subito il pretrattamento di autofermentazione hanno avuto una performance migliore rispetto ai campioni non pretrattati, sia come produzione cumulativa di metano (mL/L di CH₄) che in termini di resa, ottenendo con la diluizione al 50% un incremento del 19% e con la diluizione al 25% un incremento del 50%.

Fermentazione indotta: aggiunta di un inoculo di H₂ produttori (F210)

La seconda parte della sperimentazione era tesa a testare se l'acqua di vegetazione, con l'aggiunta di un inoculo selezionato di idrogeno produttori, fosse un substrato idoneo alla produzione di idrogeno e se questo processo determinasse un incremento della produzione finale di metano (digestione anaerobica bistadio). Di seguito (Figg. 8a e b)) sono riportati gli andamenti delle produzioni di idrogeno (mL H₂/L) e di metano (mL CH₄/L) a diverse concentrazioni di substrato (%AV).

Gli andamenti delle produzioni di idrogeno sono simili alle prove AVF e AVF Auto: per tutte e tre le diluizioni testate, dopo pochi giorni dal massimo di produzione di H₂, si assiste ad un suo immediato consumo fino a valori prossimi allo zero. Inoltre similmente alla sperimentazione AVF, la produzione di H₂ diminuisce all'aumentare della diluizione dell'acqua di vegetazione con valori di 844 ± 67 mL H₂/L nel campione AVF Tq, 498 ± 67 mL H₂/L al 50% e 224 ± 7 mL H₂/L e 13,0 ± 0,4% nel campione diluito al 25%.

Per quanto riguarda la produzione di metano, con la serie AVF, la fase lag risulta molto più breve rispetto alla serie AVF. Infatti l'acqua di vegetazione è stata diluita con tampone fosfato 0,1 M e questo ha permesso di mantenere il pH più stabile per l'intero periodo sperimentale con un valore di circa 6,8. Difatti già alle 24 ore dall'inoculo di metanigeni, nei campioni diluiti si è subito registrata una produzione di metano, che ha raggiunto la massima produzione di 5397 ± 5 mL CH₄/L per il campione diluito al 50% e 2466 ± 183 mL CH₄/L per il campione al 25%. Per il campione non diluito, AVF Tq, si è registrata una minima produzione di metano (84,8 mL CH₄/L) confrontabile con AVF Tq ed entrambe ben al di sotto del valore di produzione di metano raggiunto nella biometanazione potenziale dell'inoculo (291,7 mL CH₄/L).

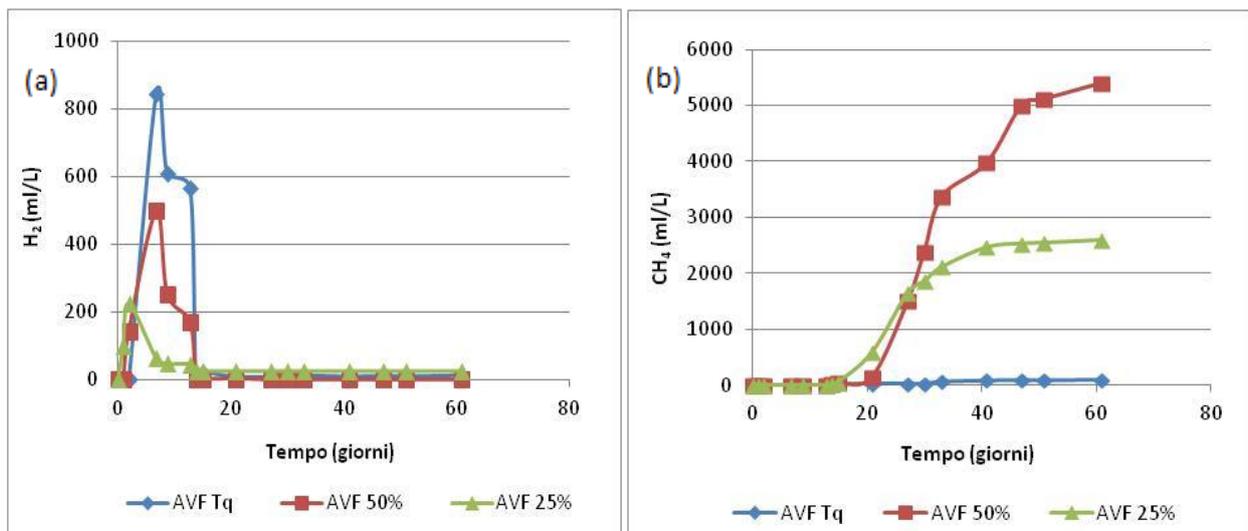


Figura 8. Produzione di H₂(a) e CH₄ (b) nella serie sperimentale AVF a diverse concentrazioni di substrato (AV)

In tabella 12 e 13 sono riassunti i dati relativi alle percentuali di H₂ e di CH₄ presenti nel biogas con i rispettivi volumi prodotti (mL/L) e le rese (mL/g VS).

Tabella 12. Riassunto della performance della produzione di H₂ per la serie AVF

campione	Tempo produzione max (giorni)	H ₂ Max (%)	Produzioni (mLH ₂ /L)	Resa (mLH ₂ /gVS)
AVF Tq	7	19,4 ± 1,7	844 ± 66,5	28,7 ± 2,26
AVF 50%	7	18,0 ± 1,5	498 ± 67,0	34,1 ± 4,59
AVF 25%	2	13,0 ± 0,4	224 ± 6,5	30,3 ± 0,38

Tabella 13. Riassunto della performance della produzione di CH₄ per la serie AVF

campione	Tempo produzione max (giorni)	CH ₄ Max (%)	Produzioni (mLCH ₄ /L)	Resa (mLCH ₄ /gVS)
AVF Tq	47	4,26 ± 2,7	84,8 ± 38,8	3,39 ± 1,83
AVF 50%	68+	61,6 ± 2,6	5397 ± 5,2	370 ± 0,36
AVF 25%	41	61,2 ± 0,4	2466 ± 183	350 ± 14,7

E' interessante effettuare un confronto tra l'efficienza del processo di produzione di idrogeno e di metano tra le serie sperimentali AVM e AVF in cui entrambi gli inoculi hanno determinato una produzione di idrogeno dall'acqua di vegetazione. L'inoculo F210 è una comunità selezionata di idrogeno produttori (serie AVF) mentre l'inoculo M (serie AVM) è una comunità presente nel liquame.

In tabella 14 sono riassunti i dati relativi alle rese di idrogeno e metano nelle due diverse linee sperimentali

Tabella 14. Confronto delle rese di produzione di H₂ e CH₄ in AVF e AVM

campione	AVF (mLH ₂ /gVS)	AVM (mLH ₂ /gVS)	AVF (mLCH ₄ /gVS)	AVF (mLCH ₄ /gVS)
Tq	28,7 ± 2,26	50,1 ± 13,7	3,39 ± 1,83	1,51 ± 1,00
50%	34,1 ± 4,59	53,5 ± 2,25	370 ± 0,36	256 ± 4,68
25%	30,3 ± 0,38	54,7 ± 8,72	350 ± 14,7	179 ± 2,45

Dai risultati a confronto emerge che per tutte e tre le diluizioni i campioni inoculati con il pool di idrogeni produttori selezionati (F210) hanno prodotto meno idrogeno a parità di substrato rispetto alla comunità di idrogeno produttori presente nel liquame: un incremento del 43% per il Tq, del 36% per quelli diluiti al 50% ed infine del 45% per i campioni diluiti al 25%. E' possibile ipotizzare che l'inoculo utilizzato nella serie AVM abbia al suo interno una comunità di idrogeno produttori più acclimatata su un substrato complesso. Nell'acqua di vegetazione oltre ai carboidrati sono presenti acidi organici e composti lignocellulosici. Situazione inversa invece si osserva per le rese di metano: le rese per le serie sperimentale AVF 25% (350 ± 14,7 mL H₂/g VS) e AVF 50% (370 ± 0,36 mL H₂/g VS) mostrano valori incrementati del 30% e del 49% rispetto alla serie AVM alle stesse diluizioni. In entrambi gli AV Tq la produzione di metano è trascurabile.

Analisi dei fenoli

Per valutare se la produzione e il consumo di idrogeno fossero correlati con la riduzione dei composti fenolici e con le differenze osservate nell'efficienza del processo di produzione di metano, sono state effettuate analisi dei fenoli solubili, per tutte le serie sperimentali, a diversi tempi: T0, T12 (alla fine del processo di consumo di H₂) e T68 (alla fine della sperimentazione) per le serie sperimentali AV Auto e AVM. Per la serie AVF, oltre al T0, i tempi di campionamento sono T9 e T61.

In tabella 15 vengono presentati i dati riassuntivi di performance della produzione di idrogeno e metano e l'analisi dei fenoli ai tempi indicati e i relativi abbattimenti (%) con il processo di produzione di idrogeno e con la fase finale di produzione di metano.

I risultati sembrerebbero indicare un abbattimento dei fenoli durante il corso dell'intera sperimentazione con valori molto simili per le diverse serie sperimentali. Non si evidenzia una correlazione tra i valori di produzione

di idrogeno e i valori di abbattimento dei fenoli ma si deve considerare che l'idrogeno è prodotto e consumato in differenti processi biologici: l'idrogeno è l'elemento chiave nei processi ossido riduttivi. Non sorprende, inoltre, che una riduzione dei fenoli avvenga anche o solamente (AVF 50% e AVF 25%) durante la fase di produzione di metano: nel processo di digestione anaerobica durante l'acetogenesi viene prodotto idrogeno, acido acetico e anidride carbonica dall'ossidazione degli acidi organici e degli alcoli prodotti dalla fase precedente (idrolisi/acidogenesi). Tuttavia anche per la metanogenesi non esiste una correlazione significativa tra i valori di produzione e le percentuali di abbattimento dei fenoli. Per i campioni AVM Tq e AVF Tq dove vengono raggiunti abbattimenti del 18,1% e del 21,6%, rispettivamente, l'assenza di produzione di metano è ragionevolmente legata al pH o ad una fase lag, inspiegabilmente molto lunga.

Tabella 15. Riassunto della performance della produzione di H₂ e CH₄ e della concentrazione dei Fenoli totali (FT= g di acido gallico eq/L) in tutte le serie sperimentali. E' inoltre presentato il dato di riduzione dei FT (%)

Campione	FT T0	Produzioni di H ₂ (mlH ₂ /L)	FT T12	PRODUZIONI (mlCH ₄ /L) ²	FT T68	Riduzione H ₂ (%)	Riduzione CH ₄ (%)	Riduzione Finale (%)
AVM Auto Tq	2184 ± 158	195 ± 5,80	1944 ± 20	6825 ± 140	1790 ± 39	11,0	8,0	19,0
AVM Auto 50%	1136 ± 79	193 ± 0,90	1086 ± 11	4497 ± 49,4	895 ± 21	4,40	17,6	22,0
AVM Auto 25%	612 ± 40	38,3 ± 0,10	575 ± 85	2579 ± 188	488 ± 71	6,05	15,1	21,2

Campione	FT T0	Produzioni di H ₂ (mlH ₂ /L)	FT T12	PRODUZIONI (mlCH ₄ /L)	FT T68	Riduzione H ₂ (%)	Riduzione CH ₄ (%)	Riduzione Finale (%)
AVMTq	2184 ± 158	1462 ± 402	1789 ± 216	37,3 ± 25,2	1737 ± 290	18,1	0	18,1
AVM 50%	1136 ± 79	792 ± 33,4	1046 ± 62	3789 ± 69,3	891 ± 37	7,92	14,8	22,7
AVM 25%	612 ± 40	394 ± 62,0	618 ± 7	1231 ± 106	485 ± 54	0	21,5	21,5

Campione	FT T0	Produzioni di H ₂ (mlH ₂ /L)	FT T9	PRODUZIONI (mlCH ₄ /L)	FT T9 dopo CH ₄ inoculo	TF T61	Riduzione H ₂ (%)	Riduzione CH ₄ (%)	Riduzione Finale (%)
AVF Tq	2096 ± 158	844 ± 66,5	1894 ± 105	84,8 ± 38,8	1982 ± 105	1745 ± 141	9,6	12,0	21,6
AVF 50%	1048 ± 79	498 ± 67,0	1162 ± 14	5397 ± 5,20	1250 ± 14	945 ± 64	0	24,4	24,4
AVF 25%	524 ± 40	224 ± 6,50	626 ± 82	2466 ± 183	714 ± 82	540 ± 31	0	24,4	€ 24,4

3 Conclusioni

La scelta di avviare un nuovo studio sull'utilizzo delle acque di vegetazione per la produzione di bioenergia, è stata motivata da contatti avuti sia con i frantoi sia con i gestori di impianti a biogas. Infatti, l'elevato contenuto in polifenoli (0,2-8 g/L) e in sostanza organica (COD 40-220 g/L) le rendono un rifiuto potenzialmente molto inquinante, considerando che lo sversamento diretto nelle acque superficiali e/o lo spandimento sul terreno agricolo rimane al momento la via preferenziale per procedere al loro smaltimento. L'acqua di vegetazione, inoltre, rappresenta un residuo dalle alte potenzialità energetiche ma le sue caratteristiche chimico-fisiche ne rendono difficile il suo utilizzo, a concentrazioni elevate, negli impianti a biogas. Da dati bibliografici risultava scarsamente indagato sia il processo di produzione di idrogeno, sia il processo combinato di idrogeno e metano. Non erano, inoltre, presenti dati sull'autofermentazione, nonostante tale processo avvenisse spontaneamente all'interno dei contenitori di stoccaggio del refluo: la composizione del biogas era sconosciuta.

I risultati di questa sperimentazione sono sorprendenti, nel senso che oltre ad aver verificato la fattibilità e l'efficacia del processo di produzione di idrogeno e di idrogeno e metano in bifase con acqua di vegetazione diluita al 50 e al 25%, il processo di autofermentazione è risultato essere un pretrattamento efficace per la produzione di metano anche con acqua di vegetazione non diluita (Tq). Tale processo si è protratto per 6 mesi, un tempo sufficiente per i frantoi per poter stoccare l'acqua di vegetazione, trasferirla ad impianti di biogas e poter quindi riutilizzare lo stesso contenitore ogni anno.

4 Bibliografia

- APHA 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 21th ed. Washington, DC: American Public Health Association.
- Ben Sassi A., Boularbah A., Jaouad A., Walker G., Boussaid A., 2006. "A comparison of Olive oil Mill Wastewaters (OMW) from three different processes in Morocco". *Process Biochemistry*, 41: 74-78.
- Crognale S., D'Annibale A., Federici F., Fenice M., Quarantino D., Petruccioli M., 2006. "Olive oil mill wastewater valorisation by fungi". *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 81: 1547-1555.
- Goncalves M.R., Costa J.C., Pereira M.A., Abreu A.A., Alves M.M., 2014. " On the independence of hydrogen production from methanogenic suppressor in olive mill wastewater. *International Journal of hydrogen energy*, 39: 6402-6406.
- Goncalves M.R., Freitas P., Merques I.P., 2012. " Bioenergy recovery from olive mill effluent in a Hybrid reactor 39: 253-260.
- Gorrasi S., Izzo G., Massini G., Signorini A., Barghini P., Fenice M., 2014. "From Polluting Seafood Wastes to Energy. Production of Hydrogen and Methane from Raw Chitin Material by a Two-phase Process." *Journal of Environmental Protection and Ecology* ,15: 526-536.
- Izzo G., Rosa S., Massini G., Patriarca C., Fenice M., Fiocchetti F., Marone A., Varrone V., Signorini A., 2014. "From Hypertrophic Lagoons to Bioenergy Production". *Journal of Environmental Protection and Ecology*, 15 (2):537-546.
- Juarez-Jimenez B., Rodelas B., Martinez_Toledo M.V., Gonzalez-Lopez J., Crognale S., Gallo A.M., Pesciaroli C., and Fenice M. 2008. "Production of chitinolytic enzymes by a strain (BM17) of *Paenibacillus pabuli* isolated from crab shells samples collected in the East Sector of Central Tyrrhenian." *Journal of Microbiology Research*, 43, pp. 27-31.
- Karpouzas D.M.; Ntougias S., Iskidou E., Rousidou C., Papadopoulou K., Zervakis G., Ehaliotis C., 2010. "Olive mill wastewater affects the structure of soil bacterial communities". *Applied soil ecology*, 45 (2): 101-111.
- Kiran E. U., Trzicinski A. P., Ng W. J., Liu Y., 2014. Bioconversion of food waste to energy: A review. *Fuel*, 134:389-399.
- La Cara F., Ionata E., Del Monaco G., Marcolongo L., Goncalves M:R., Merques I:P., 2012. " Olive mill wastewater anaerobically digested: phenolic compounds with antiradical activity". *Chemical Engineering Transactions*, 27:325-330.
- Manucharova N. A., Yaroslavtsev A. M., Senchenko D. V., Stepanov A. L., Zvyagintsev D. G., 2006. Microbial transformation of chitin in soil under anaerobic conditions. *Biological Bulletin*, 33: 191-194.
- Marone A, Rosa S, Signorini A, Massini G, Patriarca C, Varrone C, Izzo G, 2010. Screening Microbial Diversity from Vegetal Wastes in Aid of Bio-Hydrogen Production. *Eurac Book*. Trento: Eurac Research, 57: 137-146.
- Marques, I.P., 2001. "Anaerobic digestion treatment of olive mill wastewater for effluent re-use in irrigation". *Desalination* 137: 233–239.
- Marques, I.P., 2000,. "Valorisation of polluters resources by anaerobic digestion. Olive mill wastewater and piggery effluent". PhD (Technical University, Instituto Superior Tecnico, Lisbon).
- Patel G. B., Sprott G. D., 1990. *Methanosaeta concilii* gen. Nov., sp. nov. ("Methanothrix concilii") and *Methanosaeta thermoacetophila* nom. Rev., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 79-82.
- Patriarca C., Massini G., Mentuccia L., Pannicelli A., Signorini A., 2012. Produzione biologica di idrogeno da scarti agro-alimentari e zootecnici: ruolo della codigestione. *Rivista di studi di Sostenibilità*, n° speciale. DOI 10.3280/RISS2012-SU2004.

- Pontoni L., d'Antonio G., Esposito G., Fabbricino M., Frunzo L., Pirozzi F., 2015. "Thermal pretreatment of olive mill wastewater for efficient methane production: control of aromatic substances degradation by monitoring cyclohexane carboxylic acid". *Environmental Technology*, 36:13-16.
- Romero-Garcia J.M., Nino L., Martinez-Patino C., Alvarez C., Castro E., Negro M.J., 2014. "Biorefinery based on olive biomass. State of the art and future trends". *Bioresource Technology*, 159: 421-432.
- Saez, L., J. Perez and J. Martinez, 1992."Low molecular weight phenolics attenuation during simulated treatment of wastewaters from olive oil mills in evaporation ponds". *Water Research*, 26: 1261-1266.
- Sampaio M. A., Goncalves M.R., Marques I.P., 2011." Anaerobic digestion challenge of raw olive mill wastewater". *Bioresource Technology*,102: 1810-1818

5 Abbreviazioni ed acronimi

AD	– Digestione Anaerobica
ARF	– Funghi Anaerobi Ruminali
AVS	– Acidi Grassi Volatili
CSL	– Corn Steep Liquor
FISH	- Fluorescence In Situ Hybridization