



Ricerca di Sistema elettrico

Sviluppo di processi di digestione anaerobica di matrici non convenzionali

Massini G., Dottorini G., Felici C., Gaetani A., Lembo G.,
Liberatore R., Mazzurco Miritana V., Mehariya S., Signorini A.

SVILUPPO DI PROCESSI DI DIGESTIONE ANAEROBICA DI MATRICI NON CONVENZIONALI

Massini G., Felici C., Liberatore R., Mehariya S., Signorini A. (ENEA)

Lembo G., Mazzurco Miritana V. (Università della Tuscia)

Dottorini G., Gaetani A. (Università di Roma "La Sapienza")

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

Indice

SOMMARIO.....	4
1 INTRODUZIONE.....	5
2 DESCRIZIONE DELLE ATTIVITÀ SVOLTE E RISULTATI.....	6
2.1 SCALING UP E ANALISI DI REDDITIVITÀ ECONOMICA DEGLI IMPIANTI A BIOGAS IN AZIENDE LATTIERO CASEARI.....	6
2.1.1 <i>Definizioni e criteri di redditività</i>	6
2.1.2 <i>Incentivi per la produzione di energia elettrica da biogas</i>	7
2.1.3 <i>Impianti di biogas per industrie casearie di piccola taglia</i>	8
2.1.4 <i>Sperimentazione della digestione anaerobica in impianto pilota doppio stadio</i>	10
2.1.5 <i>Risultati</i>	12
2.2 PROCESSO PER LA VALORIZZAZIONE ENERGETICA DI SUBSTRATI DI SCARTO LIGNOCELLULOSICI.....	14
2.2.1 <i>Descrizione della sperimentazione</i>	15
2.2.2 <i>Substrati</i>	16
2.2.3 <i>Inoculi</i>	17
2.2.4 <i>Risultati</i>	18
2.3 MICROBIOLOGIA FUNZIONALE.....	20
3 CONCLUSIONI.....	24
4 RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.....	25

SOMMARIO

Si è proceduto ad effettuare sia uno scaling up di tutte configurazioni sperimentate nella scorsa annualità dell'Accordo di Programma, sia una analisi di redditività economica per valutare se i dati sperimentali prodotti consentissero di realizzare un impianto industriale di Digestione Anaerobica (AD) efficiente ed economicamente vantaggioso per le industrie lattiero-casearie. Sulla base dei risultati è stata avviata una nuova sperimentazione nell'impianto bistadio alimentato con scotta (scarto delle aziende lattiero-casearie). Sono state prese in considerazione diverse configurazioni impiantistiche, basate su processi mono o bistadio e sono state analizzate e confrontate sia dal punto di vista delle efficienze di trasformazione sia per i costi necessari alla realizzazione ed alla gestione delle due tipologie di impianto.

Dal confronto si può osservare che il costo dell'investimento è più redditivo per l'impianto monostadio, con un tempo di abbattimento dei costi di 7 anni. E', inoltre, confermato anche da questa ultima sperimentazione che per gli impianti bistadio incide molto il costo di investimento iniziale per la parte relativa al primo stadio. Infatti nonostante i risultati delle sperimentazione indichino che in un impianto bistadio il biogas del 2° reattore sia di qualità più elevata (CH₄ circa il 70% nel bistadio contro il 53% nel monostadio), la resa energetica, in particolare del 1° stadio, deve essere incrementata per poter abbattere il più elevato costo di investimento iniziale.

Per quanto riguarda la sperimentazione sui materiali lignocellulosici, la loro resistenza alla biodegradabilità ha fatto finora prendere in considerazione costosi pretrattamenti termici e chimici che si traducono però in inevitabili modifiche agli impianti, complicando il layout del processo senza peraltro tradursi quasi mai in una maggiore convenienza economica della produzione del biogas. Per trovare una valida alternativa, molti autori hanno condotto studi e pubblicato ricerche mirate a potenziare la fase di idrolisi della componente lignocellulosica utilizzando funghi aerobi, puntando a sostituire il pretrattamento chimico-fisico con uno di tipo biologico.

Con le ricerche effettuate nel corso della presente annualità la produzione di CH₄ dalla paglia di fungaia (PF), residuo della produzione industriale di funghi commestibili (*Pleurotus* sp), è stata confrontata con quella ottenuta dalla paglia di grano (PG) per verificare se l'attacco preventivo con ife di ceppi fungini aerobici costituisca realmente un efficace pretrattamento di questo tipo di materiali, in grado di avvantaggiare il processo di DA. Sulla base dei risultati ottenuti nella precedente annualità è stata quindi pianificata un'attività sperimentale strutturata in due fasi principali, in cui la seconda costituisce lo scale up (10x) delle prove più interessanti ottenute dalla prima (presso l'Università di Napoli); le prove sono state condotte in configurazione di processo monofase e bifase, potenziando le componenti idrolitiche e acidogeniche della comunità metanigena mediante funghi anaerobi ruminali (ARF), supportati dal pool microbico fermentante F210.

Confrontando la paglia di fungaia con la paglia di grano alle stesse condizioni di inoculo, si rileva che le migliori produzioni si hanno sempre per la paglia di grano smentendo l'ipotesi sostenuta da molti autori e riportata in letteratura, che il preliminare attacco delle paglie con funghi aerobi possa costituire un promettente pretrattamento di tipo biologico, atto a favorire l'idrolisi. Di contro il potenziamento della comunità metanigena con funghi anaerobi e F210 ha portato ad un incremento della produzione del biometano fino al 220% per la paglia di fungaia e del 189% per la paglia di grano. Questo approccio offre l'indubbio vantaggio di evitare pretrattamenti che complicano l'impiantistica e aumentano i costi.

1 INTRODUZIONE

Le attività di ricerca presentate in questo rapporto tengono conto delle strategie europee sul trattamento delle biomasse di scarto (Waste 7-Call Climate) e della nuova proposta di Direttiva Europea (17/10/2012) che incidono in maniera sostanziale sulle Direttive 2009/28/EC1 (the "Renewable Energy Directive") e la 98/70/EC2 ("Fuel Quality Directive"). Queste ultime infatti, hanno promosso l'uso di energie rinnovabili con precisi obiettivi da raggiungere entro il 2020, ma hanno anche prodotto una serie di distorsioni nel settore degli impianti a biogas tra cui le principali riguardano un limitato sviluppo della tecnologia impiantistica e l'uso del suolo agricolo a scopi energetici più che alimentari. In particolare, queste due distorsioni s'incontrano nella pratica di alimentare gli impianti con cereali prefermentati (insilati). La proposta di Direttiva Europea (17/10/2012), modifica sostanzialmente le due precedenti introducendo nuovi meccanismi d'incentivazione che escludono le colture energetiche e premiano l'uso di scarti e sottoprodotti agroalimentari.

Tuttavia, la maggior parte degli impianti di DA sono dislocati presso aziende agricole dove gli impianti sono alimentati prevalentemente con scarti zootecnici e materiali lignocellulosici: si stima che il 40-60% del carbonio organico contenuto nelle fitomasse impiegate nella DA rimanga inutilizzato. L'idrolisi, infatti, primo step delle trasformazioni biochimiche nella DA, rappresenta infatti un vero e proprio "collo di bottiglia" che rallenta le successive reazioni biochimiche, limitando la produzione di biogas soprattutto se sono utilizzati biopolimeri resistenti alla degradazione.

Le ricerche svolte sono di grande interesse per l'Italia che, in Europa, è seconda solo alla Germania per numero di impianti di Digestione Anaerobica: l'EBA (European Biogas Association) riporta per il territorio italiano 1391 impianti su un totale di 14563, corrispondente a circa il 9,5% degli impianti europei (dati al 2013).

In questo rapporto si presentano i risultati relativi a:

- 1) studi di ottimizzazione della DA in un impianto pilota alimentato al 100% da scotta, scarto prodotto dalle industrie casearie; scaling up delle diverse configurazioni sperimentate negli ultimi due anni dell'AdP con analisi della redditività economica.
- 2) studi di ottimizzazione della digestione anaerobica da biomasse lignocellulosiche tramite l'utilizzo di funghi ruminali anaerobi e pool microbici fermentanti (in collaborazione con l'Università di Napoli "Federico II").

2 DESCRIZIONE DELLE ATTIVITÀ SVOLTE E RISULTATI

2.1 *Scaling up e analisi di redditività economica degli impianti a biogas in aziende lattiero caseari*

Finalizzato a tessere una relazione tra il mondo della ricerca e quello delle imprese, si è proceduto ad effettuare sia uno scaling up di tutte configurazioni sperimentate nella scorsa annualità dell'AdP, sia una analisi di redditività economica per valutare se i dati sperimentali prodotti consentissero di realizzare un impianto industriale efficiente ed economicamente vantaggioso per le industrie lattiero-casearie.

Sulla base dei risultati è stata avviata una nuova sperimentazione nell'impianto bistadio alimentato con scotta (scarto delle aziende lattiero-casearie).

2.1.1 Definizioni e criteri di redditività

La cronologia e l'intensità di un investimento possono essere rappresentati su un Cash Flow Diagram (CFD). Per confrontare investimenti che hanno luogo in corrispondenza di periodi temporali diversi, è necessario tener conto del valore del denaro nel tempo.

Ciascun flusso di cassa deve essere traslato all'indietro sino al medesimo periodo temporale (solitamente al tempo zero) per far sì che siano confrontabili tra di loro.

Il cash flow traslato viene detto scontato o attualizzato e viene calcolato nel seguente modo:

$$dCF = \frac{CF}{(1+i)^j}$$

dove: dCF è il cash flow scontato

CF, il cash flow dell'anno j-esimo

i, il tasso di interesse scelto

Per stimare quanto un investimento può essere redditizio sono disponibili diversi criteri: di liquidità, temporale e del tasso di interesse. Il criterio di liquidità è legato al valore del Net Present Value (NPV), cioè la situazione del cash flow cumulativo e scontato alla fine del progetto, per esempio alla fine della vita utile dell'impianto su cui si è investito.

Il NPV è calcolato con la seguente equazione

$$NPV = \sum_{j=1}^n dCF - I_0$$

dove: I_0 l'investimento iniziale

n la vita utile dell'impianto

Si definisce Annuity Factor (AF), la seguente sommatoria:

$$AF = \sum_{j=1}^n \frac{1}{(1+i)^j}$$

Il criterio temporale è legato alla determinazione del payback period (PBP), cioè il tempo richiesto, dopo lo start up, per recuperare l'investimento iniziale.

Nel CFD cumulativo è l'anno in cui il dCF è zero (se nel diagramma non viene considerato il costo del terreno). Il criterio del tasso di interesse è legato al calcolo del rate of Return On Investment (ROI) o Internal Rate of Return (IRR), cioè il tasso di interesse per cui il NPV del progetto è pari a zero. Un ulteriore criterio di redditività è rappresentato dal ritorno di investimento, calcolato dividendo il CF annuale per l'investimento iniziale.

2.1.2 Incentivi per la produzione di energia elettrica da biogas

Per analizzare la redditività economica di impianti che producono biogas è fondamentale conoscere gli incentivi che lo Stato Italiano concede per la produzione di energia elettrica da fonti rinnovabili. Il DM, entrato in vigore il 6 Luglio 2012, è stato applicato agli impianti che sono entrati in esercizio in data successiva al 31 dicembre 2012 e diversifica gli incentivi a seconda della potenza dell'impianto e del substrato utilizzato. Gli impianti sono suddivisi in 5 classi di potenza, con gli incentivi che decrescono man mano che si passa ad una classe superiore: la prima comprende impianti che hanno una potenza compresa tra 1 e 300 kW, la seconda tra 300 e 600 kW, la terza tra 600 e 1000 kW, la quarta tra 1000 e 5000 kW; la quinta comprende impianti con una potenza superiore ai 5000 kW. I substrati sono divisi in 4 tipologie:

- a) prodotti di origine biologica (*energy crops*);
- b) sottoprodotti di origine biologica (per esempio sottoprodotti dell'industria alimentare);
- c) rifiuti per i quali la frazione biodegradabile è determinata forfaitariamente;
- d) rifiuti non provenienti da raccolta differenziata e differenti da quelli della lettera c) (per esempio la scotta).

Le tipologie b) e d) permettono di avere i maggiori incentivi. In pratica in questo modo si cerca di disincentivare l'utilizzo di *energy crops* a favore di rifiuti o sottoprodotti.

Nei casi in cui l'alimentazione comprenda più tipologie di substrato, se il quantitativo di *energy crops* è inferiore al 30% si ricade negli incentivi legati alle lettere b) e d). In tabella 1 sono riportati gli incentivi vigenti nel 2014 divisi per classi e tipologie. È importante sottolineare che il valore di queste tariffe è decurtato del 2% all'anno. Inoltre il periodo di diritto ai meccanismi incentivanti decorre dalla data di entrata in esercizio commerciale dell'impianto ed è pari alla vita media utile convenzionale di 20 anni. Oltre a questi incentivi base possono essere aggiunti, e cumulati, i premi di seguito indicati: 40 €/MWh se gli impianti sono operanti in cogenerazione ad alto rendimento, 30 €/MWh se vi è la rimozione di almeno il 60% dell'azoto totale in ingresso all'impianto e le vasche di stoccaggio del digestato e quelle eventuali di alimentazione in ingresso siano dotate di copertura impermeabile. Per impianti alimentati da biogas di potenza fino a 600 kW, in alternativa al premio legato alla rimozione dell'azoto, è possibile accedere a premi più bassi di: 20 €/MWh garantendo un recupero del 30% dell'azoto totale in ingresso all'impianto e rispettando le condizioni relative alle vasche di stoccaggio ed alle emissioni in atmosfera; 15 €/MWh, garantendo una rimozione pari al 40% dell'azoto totale in ingresso all'impianto.

Tabella 1. Incentivi vigenti nel 2015 divisi per tipologie di substrato e classi di potenza

Tipologia	Potenza (kW)	Tariffa base (€/MWh)
a)	1<P≤300	176,4
	300<P≤600	156,8
	600<P≤1000	137,2
	1000<P≤5000	101,92
	P>5000	89,18
b) e d)	1<P≤300	231,28
	300< P≤600	201,88
	600<P≤1000	174,44
	1000<P≤5000	122,5
	P>5000	98,98
c)	300<P≤1000	211,68
	1000<P≤5000	106,82
	P>5000	83,3

Le configurazioni sperimentate sono alimentate tutte con scotta, quindi ci ritroviamo nella tipologia d). Inoltre, i quantitativi di scotta prodotti ogni giorno non ci consentono di progettare impianti di potenza elevata; ci ritroviamo sicuramente all'interno della prima classe di potenza. Gli impianti avrebbero quindi una tariffa incentivante base di 231,28 €/MWh, la più alta possibile. Per di più, il premio che possiamo aggiungere è quello legato alla cogenerazione. Sommando il tutto, otterremmo una tariffa di 271 €/MWh.

2.1.3 Impianti di biogas per industrie casearie di piccola taglia

Prima di tutto sono stati eseguiti gli scale up delle configurazioni M1, M3, B1, B2 e B3. In tabella 2 vengono riportati le rese ($NL_{g_{VS}^{-1}}$) di idrogeno e metano prodotte nelle differenti configurazioni sperimentate (AdP 2013).

Tabella 2. Riassunto della performance della produzione di idrogeno e di metano in tutte le configurazioni.

	M1 (5g/l VS)	M2 (10g/l VS)	B1 (5g/l VS)	B2 (5g/l VS)	B3 (10g/l VS)
$SGP(NL_{H_2} * g_{VS}^{-1})$	-	-	-	0.12 ± 0.02	0.62 ± 0.01
$SGP(NL_{CH_4} * g_{VS}^{-1})$	0.28 ± 0.016	0.23 ± 0.01	0.36 ± 0.02	0.34 ± 0.13	0.22 ± 0.01

Si è utilizzata come portata di scotta quella prodotta dal caseificio da cui ci rifornivamo, la "Formaggi Boccea", una piccola-media industria che lavora 3500 m³ di latte all'anno, cioè 10,5 t/d (considerando una densità di 1 t/m³). Questo quantitativo di latte produce 9,5-10 t/d di siero che vengono utilizzate completamente per la produzione di ricotta. La scotta prodotta ammonta quindi a circa 9 t/d.

M1 è stato alimentato con una scotta diluita 10 volte (5 g/L di VS,) quindi l'impianto scalato avrà, con una portata totale entrante di 90 t/d, 30000 t/a (considerando 333 giorni l'anno di produzione). Moltiplicando questa portata per l'HRT (7,5 giorni) e considerando una densità di 1 t/m³, si ottiene un volume di lavoro di 675 m³. La potenza dell'impianto siffatto è di 15 kW. Moltiplicando la portata totale per la concentrazione di VS, 5 g/L ossia 0,005 t/m³, si ottiene la portata di VS in ingresso, 150 t SV/a. Moltiplicando quest'ultima per l'SGP trovato sperimentalmente per la configurazione M1 ($0,28 NL_{CH_4} * g_{VS}^{-1}$, cioè $280 Nm^3 CH_4 t^{-1}$ di VS) si ottiene la portata prodotta di metano, circa 42500 m³/a.

La produzione di energia totale viene calcolata moltiplicando quest'ultimo valore per i MJ prodotti da 1 m³ di metano (35 MJ/m³). Si ottengono circa 1487 GJ/a. La produzione di energia elettrica viene calcolata tenendo conto del rendimento del cogeneratore. Ad una potenza di 15 kW può essere associato un microgeneratore con un rendimento elettrico del 30%. La produzione di energia elettrica ammonta a 124 MWh/a. Il cogeneratore produce anche 64 MWh/a di energia termica (calcolata moltiplicando l'energia elettrica prodotta per un rendimento del 52%).

M2 è alimentato con una scotta diluita 5 volte (10 g/L di VS), quindi l'impianto avrà una portata entrante di 45 t/d (9*5) cioè 15000 t/a. Considerando un HRT di 7,5 giorni si ottiene un volume di 338 m³. La potenza dell'impianto siffatto è di 13 kW. La portata di VS in ingresso sarà sempre di 150 t/a. Moltiplicando questo valore per l'SGP trovato sperimentalmente ($0,23 NL/g_{VS}$, cioè $230 Nm^3/t$ di VS) si ottiene la portata di metano prodotta, circa 35200 m³/a. La produzione di energia termica totale è di 1233 GJ/a. La produzione di energia elettrica è di 103 MWh/a considerando un rendimento del microgeneratore del 30%. Il cogeneratore produce anche 53 MWh/a di energia termica.

Per quanto riguarda lo scale up della configurazione B1, i calcoli riguardanti il secondo stadio sono identici a quelli effettuati per le configurazioni in monostadio. La portata totale in ingresso è di 90 t/d cioè 30 kt/a. Considerando un HRT di 7,5 giorni si ottiene un volume di 675 m³. Moltiplicando il valore del SGP trovato sperimentalmente ($360 m^3/t$ di VS) per la portata di 150 t SV/a si ottiene una portata di metano di 54000 m³/a. Il volume del primo stadio è calcolato moltiplicando il volume del secondo stadio per il rapporto tra gli HRT dei due stadi (0,5/7,5). Si ottiene un volume di 45 m³. Nella sperimentazione B1 non è stata ottenuta produzione di idrogeno. Tuttavia il processo fermentativo nel primo stadio ha determinato una

più elevata resa di metano nel secondo stadio e si è quindi deciso di inserirlo comunque nell'analisi economica.

La produzione di energia totale ammonta a 1888 GJ/a. Ad una potenza di 20 kW può essere associato un microgeneratore con un rendimento del 31%. Il cogeneratore produce 163 MWh/a e 84 MWh/a di energia elettrica e termica, rispettivamente.

Per la configurazione B2 (B1_H₂), moltiplicando il valore del SGP trovato sperimentalmente (340 m³/t di VS) per la portata di 150 tSV/a si ottiene una portata di metano di 5310 m³/a. Il volume del primo stadio è, in questo caso calcolato moltiplicando la portata (t/giorno) per l'HRT del primo stadio. Si ottiene un volume di 45 m³. Per tener conto della produzione di idrogeno nel calcolo della produzione di energia termica totale, il GPR del primo stadio (1,15 L H₂/L di reattore d⁻¹) viene moltiplicato per il volume del reattore e per i MJ prodotti da 1 m³ di idrogeno (11 MJ/m³). La produzione di energia termica totale, sommando il contributo del metano, è di 1984 GJ/a. La potenza dell'impianto siffatto è di 21 kW. La produzione di energia elettrica è di 171MWh/a considerando un rendimento del microgeneratore del 31%. Il cogeneratore produce anche 89 MWh/a di energia termica.

Nella sperimentazione B3 il volume del 1° stadio è di 22,5 m³ e quello a metano di 338 m³. La produzione di energia totale ammonta a 1201 GJ/a. Ad una potenza di 13 kW può essere associato un microgeneratore con un rendimento del 30%. Il cogeneratore produce 103 MWh/a e 54 MWh/a di energia elettrica e termica, rispettivamente.

In tabella 3 sono riassunti i volumi, le potenze, i rendimenti dei cogeneratori e le produzioni di energia elettrica degli scale up delle diverse configurazioni.

Tabella 3. Scale up delle diverse configurazioni: volumi, potenze ed energia elettrica prodotta

Configurazione	Volume (I stadio)	Volume (II stadio)	Energia Elettrica	Potenza
	(m ³)	[m ³]	[MWh/y]	(kW)
M1	---	675	124	15
M2	---	338	103	13
B1	45	675	163	20
B1_H₂	45	675	171	21
B3	22,5	338	100	13

A questo punto occorre valutare i costi di investimento. L'azienda CINE s.r.l. (Compagnia Italiana Nuove Energie) ci ha fornito la stima del costo di un impianto monostadio tradizionale con un reattore di 432 m³ e un microgeneratore da 20 kW (Modello Tandem della ditta asjaGen). Il costo totale di investimento risultava essere di 210000 €, 160000 € di reattore e pompe e 50000 € di microgeneratore. Inoltre abbiamo contattato l'azienda asjaGen che ci ha fornito il listino dei prezzi completo dei microgeneratori: il modello Tandem è prodotto anche per potenze di 25 kW con un costo di 60000 €, di 35 kW con un costo di 75000 € e di 45 kW con un costo di 90000 €. Per stabilire i costi dei nostri reattori è stata utilizzata la seguente formula:

$$Costo2 = Costo1 \left(\frac{Volume2}{Volume1} \right)^{0,6}$$

con la quale si è tenuto conto della cosiddetta economia di scala, per la quale il costo di costruzione di un nuovo impianto è funzione crescente della sua capacità, ma in misura meno che proporzionale. Il costo dei reattori del primo stadio sono stati moltiplicati per un fattore 1,1 per tener conto della loro maggior complessità dal punto di vista dei sistemi di controllo.

Il tasso di interesse è stato fissato al 7,5%; la vita utile degli impianti è di 20 anni. Il costo di investimento è stato ammortizzato lungo tutti gli anni (metodo della retta) e scontato tramite l'annuity factor. I costi di manutenzione sono stati stimati come il 6% dei costi totali di investimento. A questo punto il valore di energia elettrica vendibile annualmente (per legge solo l'89% dell'energia

elettrica effettivamente prodotta può essere venduta e quindi immessa in rete) è stato moltiplicato per la tariffa incentivante relativa ai nostri impianti (0,271 €/MWh). A questo valore, definito Gross income (k€/a), vengono sottratti i costi di ammortamento e i costi di manutenzione annuali e vengono addizionati i costi che l'azienda Formaggi Boccea sostiene annualmente per il trasferimento della scotta ad impianti di biogas (4,57 €/t) ottenendo il Net income, cioè i ricavi annuali. Infine sono stati valutati il NPV, moltiplicando il Net income per l'annuity factor, il PBP e il ROI. In tabella 4 sono riportati i costi di investimento ed i criteri di redditività sopra citati per le diverse configurazioni.

Tabella 4. Costi di investimento e criteri di redditività delle diverse configurazioni

Configurazione	Costo investimento (k€)	NPV [k€]	PBP [y]	ROI [%]
M1	259	+ 40	16	8,98
M2	188	+ 103	10	13,3
B1	314	+ 46	16	8,98
B1_H₂	314	+ 67	14	10,0
B3	218	+ 48	14	10,0

Come si può osservare dalla Tabella 4, per tutte le configurazioni sperimentate i costi di investimento risultano redditivi, dimostrando che i caseifici di piccola taglia (9 t/a di scotta) potrebbero investire per la produzione di energia elettrica e di calore dai propri scarti di produzione.

E' interessante mettere a confronto i risultati di questa analisi di redditività economica con le rese energetiche ottenute nella sperimentazione dello scorso anno (Tab. 5).

Tabella 5. Energia generabile dalla scotta nelle diverse configurazioni sperimentali.

	M1	M2	B1	B1_H ₂	B3
kJ/g VS (da H₂)	-	-	-	1,28	0,69
kJ/g VS (da CH₄)	8,86	7,28	11,4	10,8	6,96
kJ tot/g VS	8,86	7,28	11,4	12,0	7,70

Dal confronto si può osservare che l'investimento è molto più redditivo per l'impianto monostadio (M2), che risulta la configurazione con un valore di resa energetica inferiore a quella ottenuta sia per la configurazioni monostadio M1, sia per quella dei bistadio (B1 e B1_H₂). Inoltre risulta paragonabile a quella ottenuta per la configurazione bistadio B3 (Tab. 1).

Dal confronto tra le due diverse configurazioni monostadio (M1 e M2) si può dedurre che l'aumento della quantità di scotta in ingresso al reattore determina un abbattimento del costo di investimento in M2 che è più rilevante rispetto alla maggiore efficienza del processo in M1.

Confrontando la configurazione monostadio M1 e bistadio B1, dove nel primo stadio non si è avuta produzione di idrogeno, si osservano valori confrontabili di redditività nonostante un'efficienza energetica più elevata del bistadio. Anche il costo di investimento del bistadio B3, a parità di efficienza del processo energetico con M2, determina un rilevante abbattimento della redditività.

Solo per quanto riguarda il confronto tra il processo di digestione anaerobica monofase M1 e quello del bifase B1_H₂, dove nel 1° stadio si aveva produzione di idrogeno, i risultati sperimentali di resa energetica si accordano con i risultati dell'analisi di redditività economica. In questo caso il maggior costo di investimento per B1_H₂ viene abbattuto dalla più elevata efficienza del processo di digestione anaerobica.

2.1.4 Sperimentazione della digestione anaerobica in impianto pilota doppio stadio

Sulla base dei risultati dello scorso anno (Tab. 2) in cui l'aumento del carico organico utilizzato aveva determinato una diminuzione dell'efficienza energetica sia del monostadio (M2) che del bistadio (B3), è stato impostato un piano sperimentale con la finalità di aumentare l'efficienza dell'impianto portando i

tempi di ritenzione del 2° stadio a 15 giorni, utilizzando come substrato la scotta diluita 1:2 (a prescindere dal differente contenuto di sostanza organica dei diversi stock di scotta utilizzati (caseificio Formaggi Boccea s.r.l.). Inoltre per il primo stadio si è scelto di operare ad un HRT di 2 giorni, per aumentare l'efficienza di produzione di idrogeno.

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

M4 - Reattore CSTR Monostadio alimentato con scotta diluita 1:2; Volume di lavoro 50L; HRT 15 giorni; Temperatura 37°C; pH impostato a 7 con controllo del pH in automatico (NaOH 6N)

B4 - Reattore CSTR Bistadio in cui il 1° stadio veniva alimentato con scotta diluita 1:2; Volume di lavoro 6,7 L; HRT 2 giorni; pH impostato tra 5,8-6 con controllo del pH in automatico (NaOH 6N).

L'impianto è stato potenziato con l'allestimento di un nuovo reattore di vetro per il 1° stadio (10 L) e con un sistema di controllo automatico del pH per entrambi gli stadi (Fig. 1).



Figura 1. Impianto bistadio: a) reattore 1° stadio (10 L); b) reattore 2° stadio (61 L); c) Controllo in automatico del pH; d) Dispositivo di controllo automatico del pH

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 CH₄, H₂, CO₂, O₂, N₂. 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.

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 Propandiolio,), 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 μ m, precolonna con cartucce Carbo-H (Phenomenex); fase mobile H₂SO₄ 5 mN (flusso: 0,6 mL/min).

I campioni liquidi sono stati diluiti 1:10 in H₂SO₄ 5 mN. 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.

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. E' 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 della miscela uscente alla confluenza dei flussi. Giornalmente veniva monitorata la composizione del biogas dei singoli stadi ad un GC ad iniezione manuale.

2.1.5 Risultati

Configurazione M4 (monostadio alimentato con scotta diluita 1:2)

La configurazione M4, come si può osservare dalla figura 2, non ha un andamento stazionario nonostante i dati si riferiscano a tempi successivi al primo ricambio teorico di 15 giorni. Ciò è imputabile al fatto che le differenti partite di scotta utilizzate nel corso della sperimentazione avevano una concentrazione di sostanza organica diversa. Si è, quindi, ritenuto comunque corretto mediare il dato.

In figura 2, per la configurazione monostadio M4, sono riportate le medie calcolate ogni 4 ore, della portata giornaliera di metano (NL CH₄/d) e la sua concentrazione (%) nel biogas prodotto.

La produzione di biogas prodotto si attestava su un valore di 43,3 ± 6,58 NL/d con una percentuale di metano nel biogas di 52,4 % ± 2,20 (v/v). La produzione di metano risultava essere di 22,8 ± 2,93 NL/d.

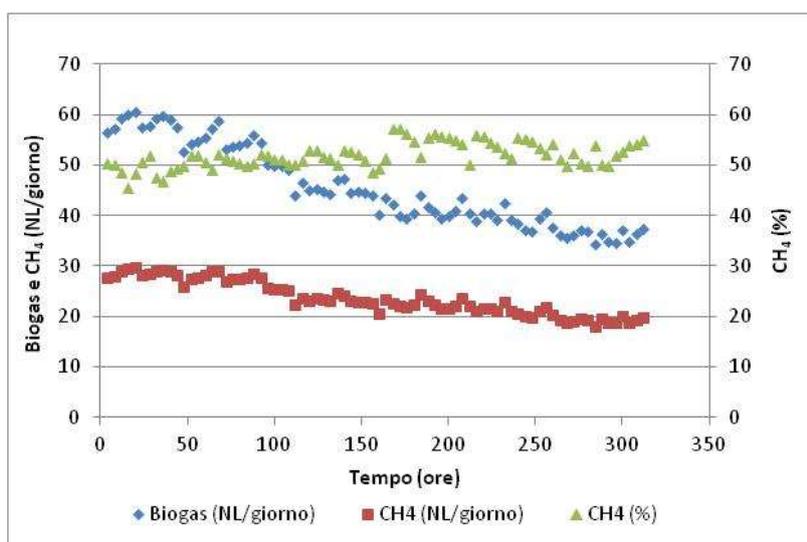


Figura 2. Configurazione M4 - Portata di metano e di biogas (NL/d) e concentrazione (%) di metano nel biogas

Configurazione B4 (bistadio alimentato con scotta diluita 1:2)

Nella configurazione B4, l'andamento di produzione dell'idrogeno è molto instabile. Si ottenevano produzioni di $5,27 \pm 1,72$ NL H₂/d con una % di idrogeno nel biogas di $35,1 \pm 2,48$. Con il 2° stadio si aveva una produzione di $21 \pm 1,55$ NL CH₄/d e con una % di metano nel biogas del $69,4 \pm 2,11$ (Fig.3)

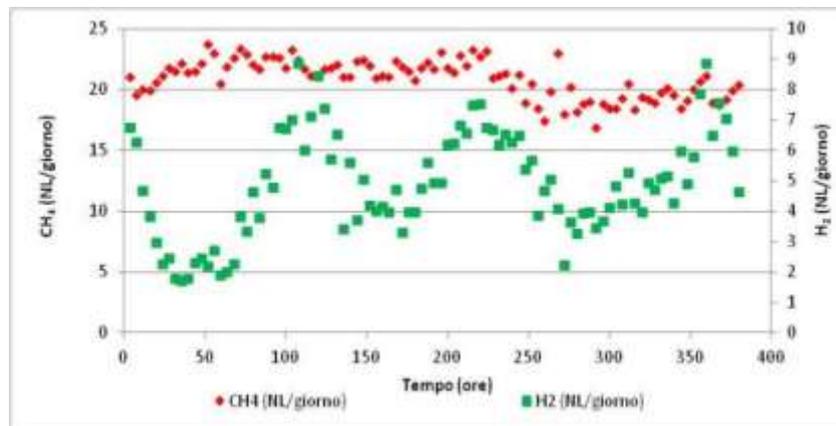


Figura 3. Configurazione B4 - Flusso di metano nel 2° stadio e di idrogeno nel 1° stadio (NL/d)

In figura 4 viene riportata la composizione della miscela alla confluenza dei flussi (H₂= $11,4 \pm 3,52$; CH₄= $50,3 \pm 6,00$; CO₂ = $33,3 \pm 5,20$). Intorno alla 250 ore (freccia nel grafico) è stata introdotta una trappola per l'anidride carbonica all'uscita del primo stadio con lo scopo di produrre una miscela sia a più alto contenuto di metano, sia con una concentrazione dell'idrogeno più stabile. In due giorni è stato ottenuto dal 1° stadio un biogas con l'H₂ all'88,7% e, nel periodo della sperimentazione, si è ottenuta una miscela composta da H₂ = $14,2 \pm 1,95$; CH₄= $58,8 \pm 2,67$; CO₂ = $25,9 \pm 1,91$).

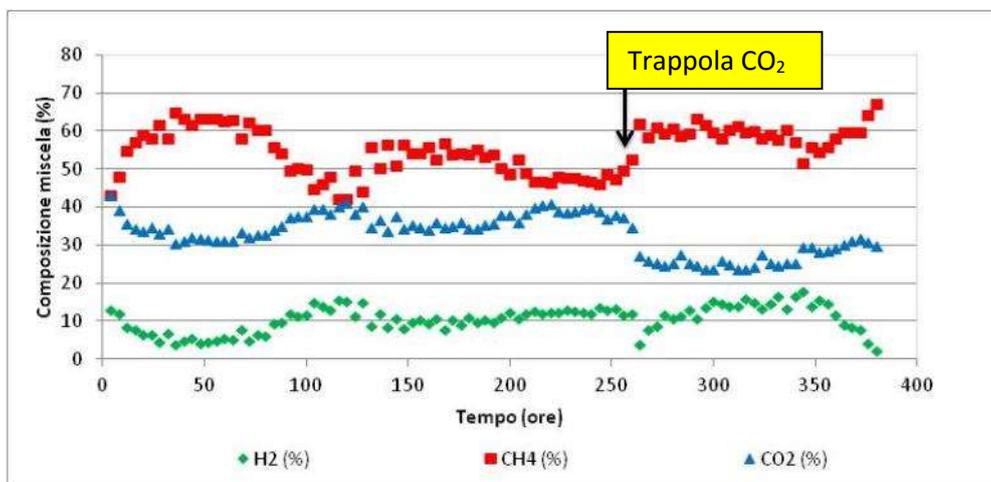


Figura 4. Configurazione B4 - Composizione (%) del biogas alla confluenza dei flussi

Anche per la configurazione M4 e B4 è stata effettuata lo scaling up e l'analisi di redditività economica (Tab. 6).

Tabella 6. Volumi, potenze, energia elettrica prodotta, costi di investimento e criteri di redditività delle configurazioni M4 e B4

Configurazione	Volume (I stadio) (m ³)	Volume (II stadio) (m ³)	Energia Elettrica [MWh/y]	Potenza (kW)
M4	--	270	114	14
B4	36	270	118	15
Configurazione	Costo investimento (k€)	NPV [k€]	PBP [y]	ROI [%]
M4	171	+ 158	7	18,2
B4	210	+ 105	10	13,3

Dal confronto si può osservare che il costo dell'investimento è più redditivo per l'impianto monostadio (M4), con un tempo di abbattimento dei costi di 7 anni.

E', inoltre, confermato anche da questa ultima sperimentazione che per gli impianti bistadio incide molto il costo di investimento iniziale per la parte relativa al primo stadio. Infatti nonostante i risultati delle sperimentazione indichino che in un impianto bistadio il biogas del II reattore sia di qualità più elevata (CH₄ =70% nel bistadio contro il 53% nel monostadio), la resa energetica, in particolare del I stadio, deve essere incrementata per poter abbattere il più elevato costo di investimento iniziale.

2.2 Processo per la valorizzazione energetica di substrati di scarto lignocellulosici

Le attività di seguito presentate sono state svolte in stretta collaborazione con l'Università degli Studi di Napoli "Federico II", Dipartimento di Ingegneria Civile Edile ed Ambientale. Le ricerche presentate sono state utilizzate per la validazione delle cinetiche di processo modellizzate dall'Università di Napoli.

La resistenza alla biodegradabilità dei materiali lignocellulosici ha fatto finora prendere in considerazione costosi pretrattamenti termici e chimici che ostacolano la convenienza economica della produzione del biogas, complicano la struttura degli impianti e possono avere ripercussioni negative sull'ambiente. Per trovare una valida alternativa molti autori hanno condotto studi e pubblicato ricerche mirate a potenziare la fase di idrolisi di fibre lignocellulosiche utilizzando funghi aerobi, puntando a sostituire, con un pretrattamento di tipo biologico, l'impiego di pretrattamenti chimico-fisici generalmente onerosi e/o impattanti sulla qualità del digestato.

D'altra parte, anche la parte iniziale delle nostre ricerche, pubblicate nel rapporto della prima annualità, è stata realizzata ipotizzando una migliore produzione di biogas dopo attacco dei substrati con ife di funghi aerobi. Non avendo ottenuto buoni risultati e al fine di avvalersi il più possibile di processi che si realizzano negli ambienti naturali valorizzandone la biodiversità funzionale, ci si è rivolti con successo al potenziamento dell'idrolisi della paglia mediante funghi anaerobi di origine ruminale (*Neocallimastix sp.* ed *Orpinomyces sp.*, report precedente annualità) supportati da un pool microbico fermentante F210 selezionato nei laboratori ENEA. Il potenziamento della comunità microbica metanigena con Funghi Anaerobi Ruminali (ARF), attualmente considerati tra i microorganismi con più elevate capacità idrolitiche, offre l'indubbio vantaggio di evitare pretrattamenti che complicano l'impiantistica del processo di DA.

Con le ricerche dell'ultima annualità sono stati confrontati due substrati, Paglia di Grano (PG) e Paglia di Fungaia (PF) residuo della produzione industriale di funghi commestibili (*Pleurotus sp.*), per verificare se l'attacco preventivo con ife di ceppi fungini aerobici costituisca realmente una efficace pre idrolisi avvantaggiando il processo di DA. Il potenziamento della fase di idrolisi è stato, quindi, realizzato integrando le comunità microbiche metano-produttrici con ceppi puri di Funghi Anaerobi Ruminali (ARF) altamente idrolitici e/o con l'inoculo batterico F210, selezionato nei laboratori ENEA, attivo nella fase idrolitica ma soprattutto nella successiva acidogenesi.

Le attività presentate costituiscono pertanto lo sviluppo di quelle già svolte nelle precedenti annualità.

2.2.1 Descrizione della sperimentazione

Sulla base dei risultati ottenuti nella precedente annualità è stato pianificata una attività sperimentale strutturata in due fasi principali, in cui la seconda costituisce lo scale-up (10x) delle prove più interessanti ottenute dalla prima (Tab 7, a e b), che è stata svolta presso l'Università di Napoli.

La paglia di fungaia (PF) è stata testata contro la paglia di grano (PG), già studiata nella precedente annualità (Risultati comunicati all'11th *International Conference on Renewable Resources and Biorefineries*, 3-5- Giugno, 2015 – York, UK).

Gli esperimenti sono stati condotti in configurazione di processo sia monofase che bifase al fine di porre in luce le caratteristiche della fermentazione primaria, composta da idrolisi e acidogenesi, con la relativa produzione di H₂.

Tabella 7. a) Schema riassuntivo del piano sperimentale; in b) le specifiche per l'allestimento delle differenti prove. Le prove, condotte su Paglia di Grano (PG) e Paglia di Fungaia (PF), sono state potenziate aggiungendo alla comunità metanigena (M) un inoculo di Funghi Ruminali Anaerobi (ARF) e il pool microbico fermentante F210 secondo il prospetto nelle tabelle. La comunità metanigena è stata aggiunta al t₀ (configurazione di processo monofase, bande rosse) oppure dopo 168 h (configurazione di processo bifase, bande verdi) tempo in cui si completa il ciclo vitale dei ARF ed è terminata la produzione H₂

a)

prove	substrati	inoculi al t ₀	Inoculo M dopo 168 h	configurazione processo
A	PG	M		monofase
B	PG	ARF + F210	M	bifase
D	/	M		monofase
E	PF	M		monofase
F	PF	ARF + F210	M	bifase

b)

substrati	Inoculi						Soluz Buffer mL	Volume totale mL	Configurazione processo
	FR		F ₂₁₀		M				
	%	mL	%	mL	%	mL			
PG					20	122	487,5	609,5	monofase
PG	10	48,75*	10	48,75*	20	122	390,0	609,5	bifase
PF					20	122	487,5	609,5	monofase
PF	10	48,75*	10	48,75*	20	122	390,0	609,5	bifase
/						122	487,5	609,5	monofase

Gli esperimenti sono stati allestiti in batch da 1,2 L in condizioni di mesofilia (38°C), utilizzando sempre una concentrazione del substrato di 8 g VS/L (Fig. 5). Ciascun batch è stato prima allestito con il suo substrato, cioè paglia, tagliata in frammenti di lunghezza non maggiore di 20 mm; ogni batch è stato poi sigillato con tappi a vite con 3 porte e sterilizzato a secco (20', 120°C) al fine di evitare una pre-idrolisi del substrato.



b) **Figura 5. a) Paglia di Fungiaia (a sinistra) e paglia di grano (a destra): si osservi la differenza anche morfologica delle paglie sfruttate per la produzione industriale di funghi commestibili del genere *Pleurotus*;**
b) Allestimento dell’esperimento in scale-up, utilizzando batch da 1,2 L con specifici tappi a vite a 3 porte

2.2.2 Substrati

Paglia di grano (PG). E’ un residuo agricolo e zootecnico tra i più diffusi in Italia. La sua composizione lignocellulosica però non si presta al processo fermentativo a causa dell’elevata stabilità strutturale che comporta una forte recalcitranza agli enzimi idrolitici. Ciò ostacola lo step critico idrolitico della DA e prolunga l’intero processo.

Paglia di fungaia (PF): residuo lignocellulosico esausto derivante dalla produzione dei funghi aerobi commestibili *Pleurotus*, fornito dall’azienda laziale Funghidea srl.

Per allestire il substrato per la coltivazione dei funghi, la paglia subisce una serie di pretrattamenti meccanici e fisici che comprendono triturazione, omogeneizzazione , trattamento termico con vapore (75°C), e e riattivazione dei microrganismi autoctoni. Il materiale viene quindi inviato alla formatura ed al confezionamento delle balle, ed in questa fase viene inserito l’inoculo fungino di *Pleurotus*.

Si stima che la produzione di substrato sfruttato per la produzione di *Pleurotus* nel Lazio sia di 50 t/sett. A livello nazionale, la produzione fungina industriale è concentrata in Veneto, Emilia Romagna e Lazio, con circa il 60% della produzione di funghi proveniente da circa 10 aziende, leader nel settore. Non potendo riutilizzare tale residuo nemmeno come fertilizzante, questi scarti esausti vengono radunati in grossi mucchi lasciati all’aperto. Per stimare la quantità di biomassa avviata a DA, le due tipologie di substrati in esame sono state caratterizzate [metodiche APHA]. tramite misurazione dei solidi totali (TS) e volatili (VS), riportate in tabella 8. Le prove sperimentali sono state effettuate in condizioni *wet*, ovvero con un contenuto di solidi sospesi pari al 5%.

Tabella 8. Determinazione dei solidi totali (TS)e solidi volatili (VS) per i substrati utilizzati

	TS %		VS %	
	media	DS	media	DS
Paglia Di Grano (PG)	89,35	1,55	73,60	0,96
Paglia Di Fungiaia (PF)	27,51	1,17	21,22	1,17

2.2.3 Inoculi

Funghi Anaerobi Ruminanti (ARF). Le due specie di funghi ruminanti anaerobi utilizzati nel presente studio, *Neocallimastix* sp e *Orpinomyces* sp (Fig. 6) sono state fornite dall'Università turca Kahramanmaraş Sutcu Imam University e conservati a -20°C. Per la loro riattivazione necessaria al ripristino dell'attività biologica, sono stati cresciuti su terreno Basal Medium come indicato dal protocollo messo a punto da Miller e Wolin, 1973, con modifiche.

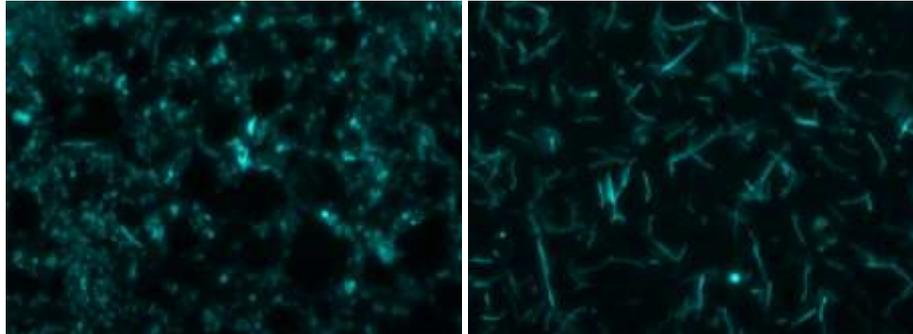


Figura 6. Zoospore di 6 giorni di *Orpinomyces* sp. (A) e *Neocallimastix* sp.(B). Colorazione in Calcofluor

Grazie ai loro enzimi idrolitici, quali cellulasi, xilanasi (Lowe et al. 1987; Srinivasan et al. 2001] ma anche emicellulasi, proteasi, amilasi, amiloglicosidasi, pectinasi, gli ARF sono ritenuti gli organismi con le più elevate capacità di idrolisi della cellulosa [Wood and Wilson, 1995]. Gli enzimi possono essere sia secreti a livello extracellulare in forma solubile sia organizzati in un complesso multi enzimatico extracellulare ad elevato peso molecolare, 3-80 MDa, [Wilson & Wood, 1992], chiamato cellulossoma [Krause et al, 2003; Joblin et al, 2010]. Questa complessa struttura, individuata originariamente anche nei batteri idrolitici del ruminante, favorisce in primo luogo l'adesione alla parete cellulare vegetale ed in seguito consente un vantaggio competitivo ai microrganismi in grado di utilizzare i prodotti solubili della sua idrolisi [Schwart, 2001].

Oltre a svolgere un'azione chimica i FR ne svolgono anche una fisica: infatti riescono a penetrare all'interno delle fibre vegetali con la formazione di miceli, contribuendo così ad una disgregazione meccanica dei substrati [Prochazka et al. 2012].

Pool batterico fermentante F210. Pool di batteri (Eubacteria) fermentanti e idrogeno-produttori (Fig. 7) isolato nei laboratori ENEA da sedimento della laguna ipertrofica di Fogliano [Izzo et al., 2014] denominato F210. E' stato selezionato in bioreattore CSTR alimentato a glucosio (10 g/L) con resa di idrogeno massima (56,3%) dopo 210 ore [Di Bonito et al., 2011]. Per l'allestimento delle prove sperimentali il pool è stato cresciuto in terreno Basal Fermentation Medium per 24 ore a 37°C.

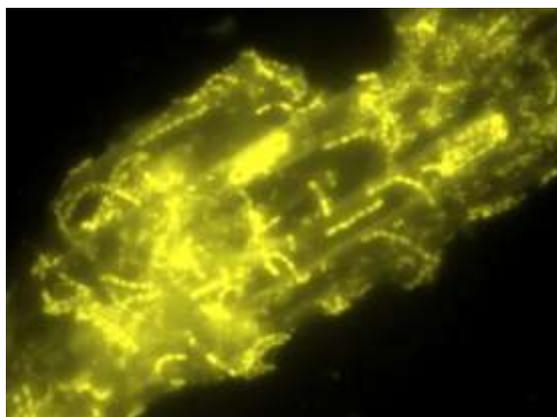


Figura 7. Batteri idrogeno-produttori dell'inoculo F210 colonizzanti una fibra di paglia di grano

Comunità metanigena. L'inoculo a metano (Fig.8) è stato effettuato utilizzando una comunità microbica ottenuta dall'effluente liquido di un impianto CSTR di DA su scala reale alimentato a scarti organici della mensa, presente nel Centro Ricerche Casaccia ENEA. L'effluente è stato lasciato a degasare (15 giorni, 37°C) prima di essere utilizzato.

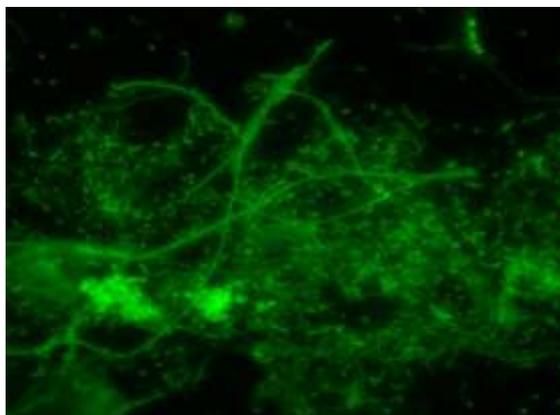


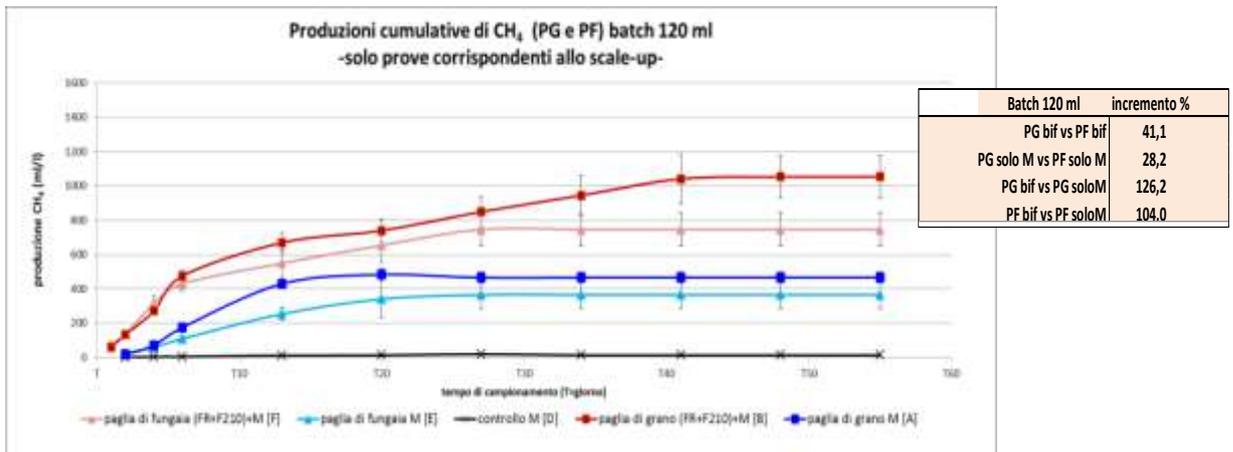
Figura 8. Comunità metanigena proveniente dall'impianto CSTR su scala reale nei laboratori ENEA. Nella micrografia sono evidenti entrambe le componenti di metanigeni acetotrofi (ARCHEA), in particolare dei *Methasarcina* sp. (acetotrofi generalisti forma coccoide ammassata) e *Methanosaeta* sp. (acetotrofi specialisti, forma filamentosa). Visualizzazione fluorescente con colorante Cyto-9 che ne evidenzia la vitalità

2.2.4 Risultati

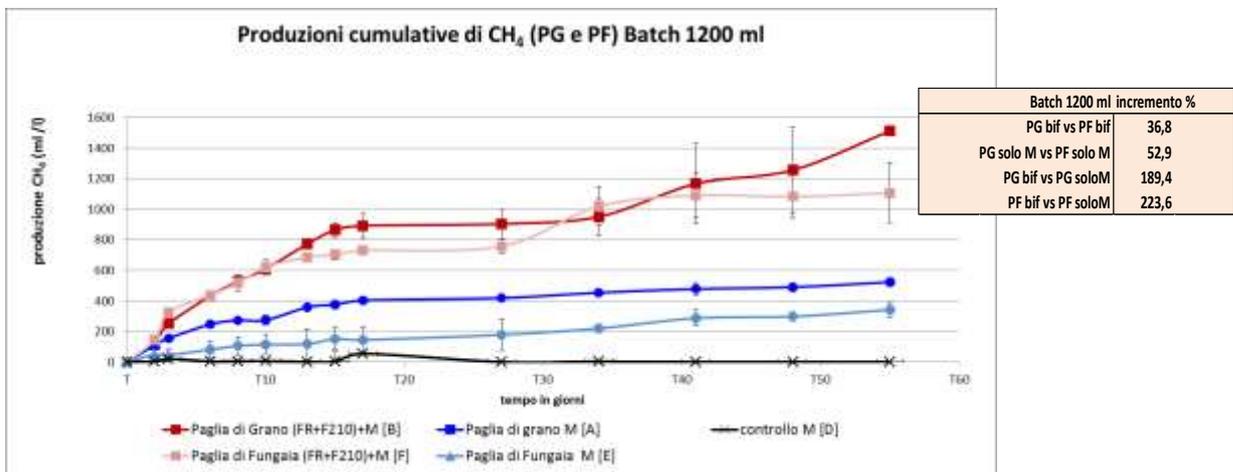
I principali risultati sono riportati nei grafici di figura 9: ai fini del confronto e della verifica della ripetibilità dei risultati ottenuti nei due laboratori, quello dell'Università di Napoli e quelli dell'ENEA, sono riportate le produzioni cumulative per entrambi gli esperimenti, condotti in batch da 120 mL (Napoli) e 1200 mL (ENEA).

I grafici mostrano come le migliori produzioni cumulative di metano per entrambi i substrati e per entrambi gli esperimenti siano ottenute in entrambi i casi con configurazione di processo in bifase, potenziando la comunità metanigena con ARF e F210.

Per tutte le prove sperimentali analoghe, cioè ottenute confrontando PF con PG alle stesse condizioni di inoculo, si rileva che le migliori produzioni si hanno sempre per la PG smentendo l'ipotesi sostenuta da molti autori e riportata in letteratura, che il preliminare attacco delle paglie con funghi aerobi (PF) possa costituire un promettente pretrattamento di tipo biologico, atto a favorire l'idrolisi. Evidentemente i miceli dei funghi aerobi utilizzano la parte maggiormente disponibile del substrato così che nelle paglie esauste la frazione più resistente alla degradazione viene concentrata. Inoltre è interessante rilevare che nelle prove dell'esperimento con incremento di scala 10x i risultati ottenuti nella precedente serie sperimentale vengono confermati ed anche enfatizzati: gli incrementi percentuali di produzione cumulativa di biogas ottenuti nelle due serie sperimentali sono riassunti nelle tabelle a fianco dei grafici: tra i più salienti sono da riportare le produzioni di PF che in bifase, potenziata con ARF e F210, produce il 223% in più rispetto al monofase non potenziato e analogamente per la PG, per la quale l'incremento è del 189%. Sempre in configurazione bifase, potenziando la comunità metanigena con ARF e F210, le rese di PG sono maggiori del 37% rispetto a PF.



a)



b)

Figura 9. Produzioni cumulative di CH₄. In a) risultati ottenuti nella prima serie sperimentale considerando solo le prove successivamente ripetute con l'esperimento di scale-up riportate in b), al fine di poterli meglio confrontare. In tabella sono riportati gli incrementi percentuali nelle produzioni di metano. Sono riportate le barre delle Deviazioni Standard

I risultati ottenuti in questa serie sperimentale presentano un'ottima concordanza sia con quelli ottenuti dall'Università di Napoli, sia con i risultati ottenuti nel corso della precedente annualità quando è stato studiato il potenziamento della comunità metanigena per la degradazione della paglia di grano, con configurazione di processo bifase: per un confronto, in figura 10 è riportato il grafico presentato nella precedente annualità in cui si mostra che le migliori produzioni erano ottenute anche in questo caso con ARF ed F210 con produzioni cumulative massime di CH₄, comprese tra 1200-1400 mL/L CH₄. Si osservi che anche in questo caso incrementando le dimensioni dei reattori vengono ottenute maggiori produzioni cumulative.

È in corso l'analisi microbiologica mediante microscopia in epifluorescenza per la caratterizzazione funzionale della comunità microbica nelle diverse condizioni sperimentali e nel corso del tempo. Le attività sono attualmente in corso ed il dato innovativo da segnalare è che, per alcune prove sono stati rilevati metanigeni idrogenotrofi metabolicamente attivi in mesofilia. Tale componente funzionale, ritenuta prevalente nei processi di DA in termofilia, è indicata come responsabile di circa il 30% della produzione di CH₄ in mesofilia, ma raramente si riesce a rilevarla in condizioni di attività (tecnica Fluorescence In Situ Hybridization, FISH).

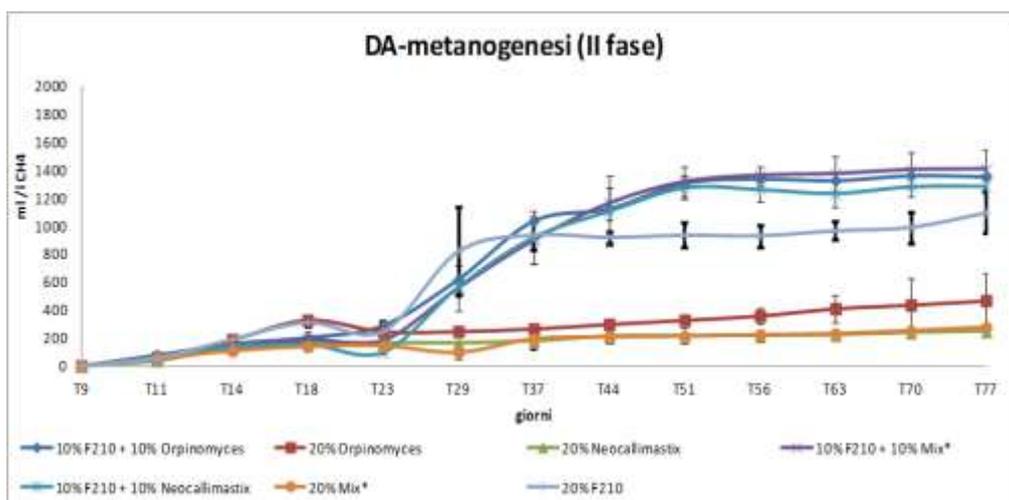


Figura 10. Produzione cumulativa di CH₄ ottenuta negli esperimenti della scorsa annualità utilizzando varie combinazioni di inoculi. Trattandosi di una configurazione di processo in bifase il T9 corrisponde al T0 della metanogenesi

Utilizzando i risultati ottenuti dalle attività sperimentali e per le quali si rileva un'ottima rispondenza, il gruppo dell'Università di Napoli "Federico II", ha studiato le cinetiche di produzione di metano e idrogeno modellizzandole. I risultati ottenuti sono propedeutici per lo sviluppo di un Modello Predittivo, utile alla progettazione di impianti in scala reale, che simuli il processo di DA e di *dark fermentation* (relativo cioè alla fermentazione primaria composta da idrolisi e acidogenesi) con produzioni rispettivamente di CH₄ e H₂.

2.3 Microbiologia funzionale

Sono in corso gli studi sulla composizione, struttura e caratteristiche funzionali delle comunità microbiche relativamente alle produzioni di biogas. Le indagini sulle differenti prove sperimentali nel corso del tempo, per entrambi i substrati sono condotte mediante microscopia in epifluorescenza utilizzando in particolare la tecnica Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) che consente di individuare e quantificare solo le componenti microbiche metabolicamente attive nel processo, in altri termini quelle che concorrono alle produzioni finali di biogas, determinandone quantità e composizione.

E' in corso la messa a punto della tecnica FISH per il rilevamento dei batteri metanigeni idrogenotrofi obbligati, attivi nella DA. Infatti tutte le prove sperimentali riportate sono state condotte in mesofilia (37°C), condizione per la quale la maggior parte della produzione di CH₄ (circa il 70%) viene attribuita all'uso dell'acetato da parte di batteri metanigeni acetotrofi. D'altra parte si può supporre un'attiva partecipazione al processo di produzione di CH₄ anche attraverso l'uso dell'H₂ da parte dei metanigeni idrogenotrofi. Questi funzionalmente si dividono in idrogenotrofi facoltativi in grado di *shiftare* il metabolismo verso le condizioni più convenienti e gli idrogenotrofi obbligati. L'effettiva identificazione di quest'ultimi mediante tecnica FISH è messa in discussione da molti Autori perchè le caratteristiche della parete cellulare, particolarmente resistente alla penetrazione delle sonde oligonucleotidiche, può condurre a falsi negativi nei risultati.

Per approfondire questo aspetto, che attualmente pone un limite allo studio della composizione funzionale della guild dei metanigeni, è stata svolta una specifica attività di rilevamento degli idrogenotrofi su ceppi puri ottenuti dalla DMSZ (tabella 5), selezionati tra i più interessanti rilevati in letteratura relativamente alle produzioni di biogas. La verifica della rispondenza delle specifiche sonde FISH alla presenza di batteri idrogenotrofi obbligati.

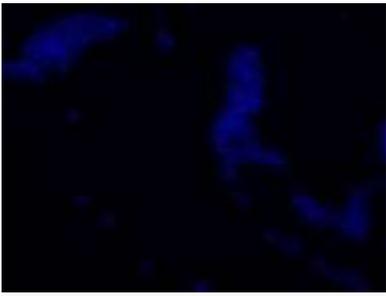
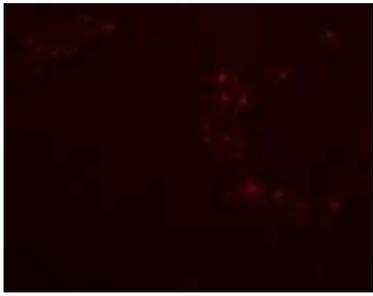
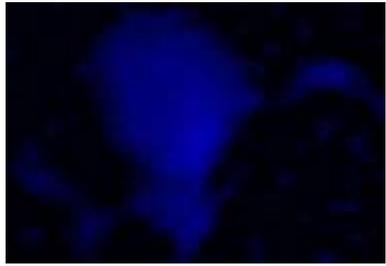
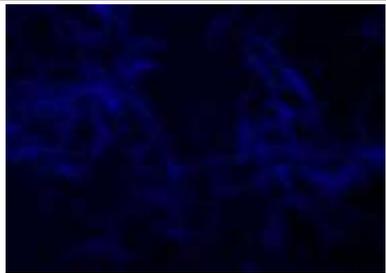
La verifica della rispondenza delle specifiche sonde FISH alla presenza di batteri idrogenotrofi obbligati metabolicamente attivi è stata ottenuta tramite confronto con colorazione DAPI (4',6-diamidin-2-fenilindolo), un composto fluorescente intercalante del DNA ampiamente utilizzato in microscopia per la rilevazione aspecifica di tutto il materiale genetico presente in un campione. Infatti il DAPI è in grado di

attraversare la membrana delle cellule sia vive che fissate, legandosi fortemente alle regioni del DNA ricche in A-T (Figura 11).

Tabella 5. Elenco dei ceppi di batteri metanigeni idrogenotrofi testati e relativi risultati ottenuti

n°	Ceppi	Codice DSMZ	Classificazione Ordine	Colorazione GRAM e Parete cellulare	substrato	T °C ottimale	Dimensioni (µm)	morfologia	Sonde specifiche
4	Methanoculleus bourgensis	3045	Methanomicrobiales	negativa guaina glicoprot	H ₂ alcol, formiato	37	1-2	Cocchi irregolari	MG 1200
5	Methanobrevibacter ruminantium	1093	Methanobacteriales	pseudomur	H ₂ /CO ₂ formiato	37	0,8-1,7	bacilli	MB 310 MB 1174
6	Methanobrevibacter smithii	11975	Methanobacteriales	positiva pseudomur	H ₂	37	Circa 1	Bacillo-Cocchi	MB 310 MB 1174
7	Methanobacterium beijingense	15999	Methanobacteriales	positiva pseudomur	H ₂	37	0,4-0,5x3-5	Bacilli filamentosi	MB 310 MB 1174
8	Methanobacterium arcticum	19844	Methanobacteriales	positiva pseudomur	H ₂	37	3-6	Bacilli filamentosi	MB 310 MB 1174
9	Methanobacterium kanagiense	22026	Methanobacteriales	positiva pseudomur	H ₂ +CO ₂ obbligato	40	1,6-5,0x0,3-0,5	Bacilli filamentosi	MB 310 MB 1174

Legenda: "+" e "-": segnale positivo e negativo alla sonda specifica per gli idrogenotrofi

DAPI	FISH (colorazione rossa: CY3 – sonda idrogenotrofi)
5 - Methanobrevibacter ruminantium	
La sonda MB1174-CY3 dà segnale positivo ma non per tutte le cellule evidenziate dalla colorazione DAPI	
	
6 - Methanobrevibacter smithii	
La sonda MB1174 risponde positivamente nella maggior parte delle cellule visibili anche con DAPI	
	
7 - Methanobacterium beijingense	
Ottima corrispondenza tra la colorazione DAPI e la sonda MB1174-CY3	
	

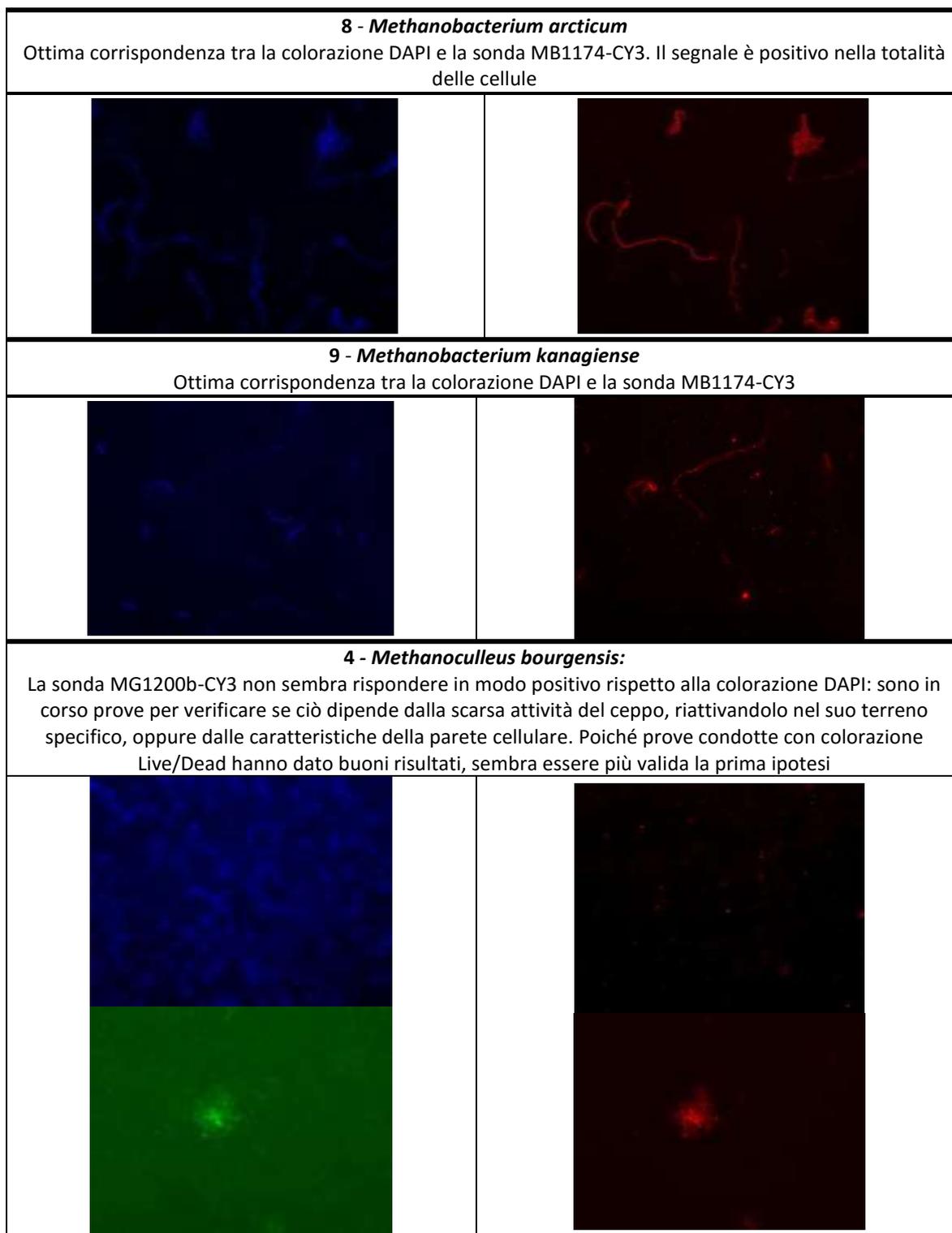


Figura 11. Tutti i ceppi di idrogenotrofi obbligati analizzati sono stati visualizzati mediante tecnica FISH: per tutte le prove: a sinistra colorazione di tutte le cellule con colorazione DAPI, a destra rilevamento mediante sonda molecolare specifica. Per il ceppo 4 *Methanoculleus bourgensis* sono riportate le colorazioni in Live (Syto 9, in verde) e Dead (Propidio di Ioduro, in rosso), effettuate separatamente

I diversi ceppi rispondono con una diversa intensità al segnale, dovuta al differente grado di attività del metabolismo batterico. Problemi di visualizzazione si sono incontrati con il ceppo 4, unico rappresentante dell'ordine dei *Methanomicrobiales*. Questo ceppo è stato infatti analizzato anche con coloranti Live/Dead per verificarne la vitalità (test positivo) e pertanto si ipotizzano problemi di penetrazione delle sonde. Riguardo alla componente fungina: tutte le attività presentate hanno richiesto il perfezionamento delle tecniche culturali degli ARF nonché delle tecniche di rilevamento in microscopia. Quest'ultimo viene attualmente eseguito utilizzando la colorazione in Calcofluor. Inoltre il microscopio Zeiss (AXIOSKOP 40) in dotazione nel laboratorio è stato recentemente equipaggiato con un dispositivo Time-Lapse che ha contribuito all'acquisizione di micrografie relative alle differenti fasi del ciclo vitale degli ARF (Axio Vision Software, Axio Cam MRm, Zeiss Germania) (figura 12).

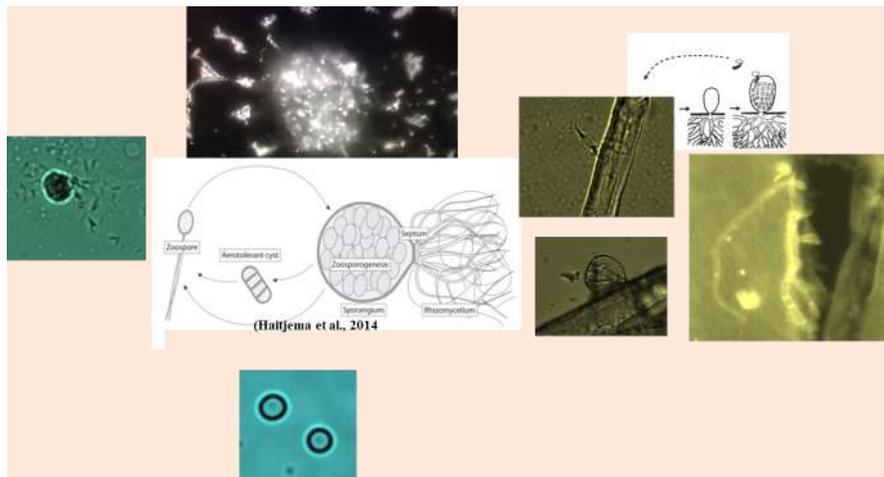


Figura 12. Micrografie relative alle differenti fasi del ciclo vitale dei Funghi Anaerobi Ruminanti

3 Conclusioni

L'attività svolta nella presente annualità ha riguardato due specifici campi di applicazione della digestione anaerobica (DA):

- 1) L'ottimizzazione della DA in un impianto pilota alimentato al 100% da scotta, scarto prodotto dalle industrie casearie e valutazione di un eventuale scaling up delle diverse configurazioni sperimentate negli ultimi due anni dell'AdP con analisi della redditività economica.
- 2) la digestione anaerobica di biomasse lignocellulosiche tramite l'utilizzo di funghi ruminali anaerobi e pool microbici fermentanti (in collaborazione con l'Università di Napoli "Federico II").

Nel primo caso sono state prese in considerazione diverse configurazioni impiantistiche, basate su processi mono o bistadio, analizzandole sia dal punto di vista delle efficienze di trasformazione sia per i costi necessari alla realizzazione ed alla gestione delle due tipologie di impianto.

Dal confronto si è potuto osservare che l'investimento è più redditivo per l'impianto monostadio, con un tempo di abbattimento dei costi di 7 anni. E', inoltre, confermato anche da questa ultima sperimentazione che per gli impianti bistadio incide molto il costo di investimento iniziale per la parte relativa al primo stadio. Infatti nonostante i risultati della sperimentazione indichino che in un impianto bistadio il biogas del 2° reattore sia di qualità più elevata (CH₄ circa il 70% nel bistadio contro il 53% nel monostadio), la resa energetica, in particolare del 1° stadio, deve essere incrementata per poter abbattere il più elevato costo di investimento iniziale.

Per quanto riguarda la sperimentazione sui materiali lignocellulosici, la loro resistenza alla biodegradabilità ha fatto finora prendere in considerazione costosi pretrattamenti termici e chimici che si traducono però in inevitabili modifiche agli impianti, complicando il layout del processo senza peraltro tradursi quasi mai in una maggiore convenienza economica della produzione del biogas. Per trovare una valida alternativa, molti autori hanno condotto studi e pubblicato ricerche mirate a potenziare la fase di idrolisi della componente lignocellulosica utilizzando funghi aerobi, puntando a sostituire il pretrattamento chimico-fisico con uno di tipo biologico. Con le ricerche effettuate nel corso della presente annualità la produzione di CH₄ dalla paglia di fungaia (PF), residuo della produzione industriale di funghi commestibili (*Pleurotus* sp), è stata confrontata con quella ottenuta dalla paglia di grano (PG) per verificare se l'attacco preventivo con ife di ceppi fungini aerobici costituisca realmente un efficace pretrattamento di questo tipo di materiali, in grado di avvantaggiare il processo di DA. Confrontando la paglia di fungaia con la paglia di grano alle stesse condizioni di inoculo, si rileva che le migliori produzioni si hanno sempre per la paglia di grano smentendo l'ipotesi sostenuta da molti autori e riportata in letteratura, che il preliminare attacco delle paglie con funghi aerobi possa costituire un promettente pretrattamento di tipo biologico, atto a favorire l'idrolisi. Di contro il potenziamento della comunità metanigena con funghi anaerobi e F210 ha portato ad un incremento della produzione del biometano fino al 220% per la paglia di fungaia e del 189% per la paglia di grano. Questo approccio offre l'indubbio vantaggio di evitare pretrattamenti che complicano l'impiantistica e aumentano i costi.

4 Riferimenti bibliografici

1. Griffith et al., 2010. Anaerobic fungi: Neocallimastigomycota. *IMA Fungus*. 2010 Dec; 1(2): 181–185.
2. Gruninger et al. Anaerobic fungi (phylum Neocallimastigomycota): advances in understanding their taxonomy, life cycle, ecology, role and biotechnological potential. *FEMS Microbiol Ecol* 90 (2014) 1–17.
3. Haitjema et al., 2014. Anaerobic gut fungi: Advances in isolation, culture, and cellulolytic enzyme discovery for biofuel production. *Biotechnology and Bioengineering*. Volume 111, Issue 8, pages 1471–1482, August 2014.
4. Krause et al., Rumen microbiology: Leading the way in microbial ecology. *J Anim Sci*. 2013;91:331–341.
5. Leis et al. Finding a robust strain for biomethanation: Anaerobic fungi (Neocallimastigomycota) from the Alpine ibex (*Capra ibex*) and their associated methanogens. *Anaerobe* 29 (2014) 34-43.
6. Lowe et al., 1987. The Life Cycle and Growth Kinetics of an Anaerobic Rumen Fungus. *Journal of General Microbiology*, 133, 1815- 1827.
7. Nagpal et al. Influence of bacteria and protozoa from the rumen of buffalo on in-vitro activities of anaerobic fungus *Caecomyces* sp. isolated from the feces of elephant. *Journal of Yeast and Fungal Research* Vol. 1(8), pp. 152 - 156, October 2010.
8. Nkemka et al. Bioaugmentation with an anaerobic fungus in a two-stage process for biohydrogen and biogas production using corn silage and cattail. *Bioresour technology* 185 (2015) 79-88.
9. Prochazka et al. Enhanced biogas yield from energy crops with rumen anaerobic fungi. *Eng. Life Sci.* 2012, 12, No. 3, 343–351.