



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



*Ministero dello Sviluppo Economico*

RICERCA DI SISTEMA ELETTRICO

## Valorizzazione bioenergetica degli scarti agrozootecnici

*F. De Poli, F. Fiocchetti, G. Izzo, A. Marone, G. Massini, L. Mentuccia, C. Patriarca,  
S. Rosa, A. Signorini, C. Varrone*

Report RdS/2011/268

Valorizzazione bioenergetica degli scarti agrozootecnici.

F. De Poli, F. Fiocchetti, G. Izzo, A. Marone, G. Massini, L. Mentuccia, C. Patriarca,  
S. Rosa, A. Signorini, C. Varrone (ENEA)

Settembre 2011

Report Ricerca di Sistema Elettrico

Accordo di Programma Ministero dello Sviluppo Economico – ENEA

Area: Produzione di energia elettrica e protezione dell'ambiente

Progetto: Studi sulla produzione elettrica locale da biomasse e scarti

Responsabile Progetto: Angelo Moreno, ENEA

## INDICE

1. Sviluppo dei sistemi di produzione del biogas.....	2
1.1 Introduzione.....	2
1.2. Attività svolta e risultati ottenuti.....	3
1.2.1 Caratterizzazione dei substrati.....	3
1.2.2 Caratterizzazione microbiologica degli inoculi utilizzati.....	4
1.2.3. Prove di efficienza di produzione di idrogeno di differenti inoculi su mix substrati.....	18
1.2.4. Prove in batch di produzione biologica di idrogeno utilizzando l'inoculo F <sub>210</sub> su diversi substrati singoli o in codigestione.....	18
2. Studio di processi di DA innovativi in grado di utilizzare Biomasse lignocellulosiche.....	22
2.1 Introduzione.....	22
2.2 Attività svolta.....	25
2.2.1 Idrolisi di rifiuti vegetali.....	25
2.2.2 Produzione di idrogeno dai prodotti di idrolisi di cellulosa ed emicellulosa.....	28
3. Studio e sperimentazione di metodi biologici per la purificazione del biogas.....	31
3.1 Introduzione.....	31
3.2 Attività svolta e risultati ottenuti.....	31
4 Analisi dei problemi connessi con la gestione del digestato e con la riduzione della componente azotata dello stesso.....	34
4.1 Introduzione.....	34
4.2 Attività svolta e risultati ottenuti.....	34
4.2.1 Aspetti tecnici.....	34
4.2.2 Aspetti normativi.....	40
Bibliografia.....	42

# 1. Sviluppo dei sistemi di produzione del biogas

## 1.1 INTRODUZIONE

Obiettivo di questo studio sperimentale è l'ottimizzazione dei processi di produzione di metano.

Cosa intendiamo per ottimizzazione? A nostro parere: aumento dell'efficienza di trasformazione dei substrati in energia, riduzione dei tempi di digestione, miglioramento della digestione di scarti industriali di vario tipo, evitando il più possibile il ricorso a food-stock.

Questo scopo viene perseguito con un approccio tipico dell'ecologia microbica che consiste nel migliorare la conoscenza del processo di digestione anaerobica nelle sue fasi, approfondire la conoscenza dei microorganismi coinvolti e trovare le migliori associazioni tra substrati (e miscele di substrati) e microrganismi specializzati nella loro digestione.

La digestione anaerobica per la produzione di biogas è una tecnologia relativamente antica, dato che i primi impianti risalgono agli anni '20 (Potenza, 1929, impianto per la produzione di energia elettrica da fanghi di depurazione). Anche le attività di ricerca iniziano e si sviluppano a partire dagli anni '70, con sensibili innovazioni tecnologiche per applicare il processo a diversi tipi di substrato, da quelli agroindustriali ai rifiuti solidi urbani. Oltre ai tradizionali impianti completamente miscelati (CSTR=Continuous Stirred Tank Reactor) abbiamo oggi impianti plug-flow, USB (Upflow Sludge Blanket), SBR (Sequential Batch Reactor), a letto fisso e ibridi. Le applicazioni sono state numerose, in Italia, tanto che negli anni '80 era il primo Paese, in Europa, per numero e volume d'impianti; c'è stato tuttavia un rallentamento fino a pochi anni fa, con una vera e propria rinascita a partire dal 2006, con l'introduzione degli impianti per il trattamento di biomasse agricole. Oggi la Germania, con oltre 1000 impianti operativi guida il panorama europeo, mentre gli impianti in Italia, pur frenati dalle incertezze sulla destinazione del digestato, sono oltre 100, considerando anche quelli in corso di realizzazione.

Va detto che se da un lato è stata data molta importanza alla tecnologia impiantistica, non ne è stata data altrettanta alla innovazione di processo. Negli ultimi anni si sta assistendo ad un maggiore impegno in tale innovazione guidata probabilmente dall'interesse mondiale verso la produzione biologica dell'idrogeno.

Il processo di digestione anaerobica (DA) della sostanza organica può essere suddiviso in tre fasi: idrolisi, acidogenesi/acetogenesi con produzione di idrogeno e successiva metanogenesi. Le conoscenze scientifiche mostrano che l'idrogeno può essere un substrato limitante per la metanogenesi (Weiland, 2010). Infatti pochi sono i microorganismi capaci di degradare l'acetato in metano e anidride carbonica rispetto a quelli in grado di usare l'idrogeno per la produzione di metano.

Il 90% degli impianti di biogas presenti in Europa sono a singolo stadio (Comino e altri, 2009). Il singolo stadio ha un'efficienza più ridotta in quanto dovendo mantenere un pH idoneo per la produzione di metano (ossia vicino alla neutralità) rallenta la fase di produzione di idrogeno che richiede pH acidi ed in alcuni casi, basici.

Ciò premesso i nostri esperimenti si sono principalmente concentrati sulla fase acidogenica/acetogenica con la produzione di idrogeno come propedeutica ad un'efficiente metanogenesi.

## 1.2. ATTIVITÀ SVOLTA E RISULTATI OTTENUTI

### Materiali e metodi

**Caratterizzazione del substrato:** la determinazione dei solidi totali ( TS ), volatili (VS) e del COD dei substrati è stata effettuata secondo APHA, 2005.

**Inoculi:** Sono stati utilizzati gli inoculi F<sub>210</sub>, GM, IM. Nel testo sono riportate le caratteristiche.

**Substrati utilizzati:** insilato di sorgo, letame bufalino, glicerolo grezzo, scotta (siero deproteinizzato), liquame bufalino.

**Trattamenti effettuati:** Sterilizzazione (121°C 15 min) dei substrati per eliminare la comunità microbica autoctona .

**Esperimenti per la produzione di idrogeno:** tutte le prove sono state effettuate in batch da 125 ml con un volume di fermentazione di 50 ml. Sono state effettuate tre repliche per ogni test. I substrati sono stati diluiti in acqua distillata e sterilizzati in autoclave. I contenitori chiusi ermeticamente erano insufflati per 10 min con azoto e inoculati (20% v/v). L'esperimento era condotto a 37°C in un bagnetto termostato e con agitazione a 120 rpm. Ad intervalli di tempo di 24 ore erano misurati il pH del liquido di coltura ed i prodotti della fermentazione, liquidi (HPLC) e gassosi (GC) secondo quanto descritto in seguito. Il biogas prodotto era misurato con la tecnica del *water displacement* (Kalia et al., 1994).

### Metaboliti analizzati:

- ✓ I prodotti metabolici della fermentazione (acidi grassi volatili, acido lattico, alcoli) sono stati analizzati mediante HPLC (High Performance Liquid Chromatography) Thermo Spectrasystem P4000, equipaggiato con rilevatore UV ( $\lambda = 210$  nm) e Indice di Rifrazione, utilizzando il metodo di analisi isocratica a 65°C con Colonna Rezex ROA Organic Acid H+ (8%) della Phenomenex, 300 x 7.8 mm, con particelle da 8  $\mu$ m, precolonna con cartucce Carbo-H (Phenomenex); fase mobile H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5mN (flusso: 0.6 mL/min). I campioni liquidi sono stati diluiti 1:10 in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5mN, centrifugati a 5000 rpm per 10 minuti e filtrati (filtri con porosità 0.22  $\mu$ m) prima dell'iniezione in HPLC
- ✓ La percentuale di H<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> nel biogas prodotto è stata quantificata tramite l'utilizzo di un gascromatografo Thermo equipaggiato con colonna impaccata (Hayesep Q 800/100 mesh ), rilevatore a conducibilità termica (TCD) e con l'azoto come gas carrier (30-35 ml/min). Le temperature di esercizio della colonna, iniettore e rivelatore erano rispettivamente di 60°C , 120°C, 200°C.

La produzione cumulativa di H<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> è stata calcolata utilizzando l'equazione, "Eq. (1)", di bilancio di massa (Logan et al., 2002)

$$V_{H,i} = V_{H,i-1} + CH_{i-1} (V_{G,i} - V_{G,i-1}) + V_H (CH_{i-1} - CH_{i-2}) \quad (1)$$

Dove V<sub>H,i</sub> e V<sub>H,i-1</sub> sono i volumi di gas cumulativi agli intervalli di tempo in corso (i) e quelli precedenti (i-1), rispettivamente. V<sub>G,i</sub> e V<sub>G,i-1</sub> sono i volumi del biogas totale prodotto e CH<sub>i</sub> e CH<sub>i-1</sub> sono le frazioni di H<sub>2</sub> agli intervalli di tempo in corso e quello immediatamente precedente, rispettivamente. V<sub>H</sub> è il volume totale dello spazio testa nel reattore.

### 1.2.1 Caratterizzazione dei substrati

I substrati utilizzati in questa sperimentazione sono tipici scarti industriali (ad eccezione del sorgo) e zootecnici la cui destinazione è lo smaltimento con costi alti e problematiche ambientali di non facile soluzione.

In tabella 1 vengono riportate le principali caratteristiche dei substrati utilizzati.

Tab.1 Principali caratteristiche dei substrati

	COD	TS	VS	Kj/g SS	densità	
	g O <sub>2</sub> /g SS	TS% tq	VS% tq	Kj/g SS	g/ml	pH
Sorgo	1,01	22,3	20,48	14,3	-	3,62
Letame	1,27	13,5	11,1	18,1	1,012	6,80
Glicerolo	1,05	91,8	86,6	14,9	1,28	6,39
Scotta	0,59	6,22	5,46	8,36	1,02	6,46
Liquame	0,44	0,95	0,7	6,26	0,988	7,16

La scotta (siero di latte deproteinizzato) è stata fornita da Formaggi Boccea s.r.l Roma. La produzione giornaliera dell'azienda si attesta intorno a 80-90 q al giorno.

Il glicerolo è stato fornito dalla Casa Olearia di Bari, un impianto di trasformazione di oli vegetali.

Il letame e liquame bufalino e l'insilato di sorgo sono stati forniti dal Centro Ricerche per l'Agricoltura (C.R.A.) di Montelibretti Roma.

## 1.2.2 Caratterizzazione microbiologica degli inoculi utilizzati

### Premessa

La biodiversità microbica può essere studiata mediante l'applicazione di metodi colturali proposti dalla microbiologia classica (metodi tradizionali basati su isolamento diretto ed isolamento dopo procedura di arricchimento mediante l'utilizzo di un substrato specifico) o mediante metodi molecolari che rendono l'indagine indipendente dai metodi di coltivazione e permettono di individuare il DNA specifico anche di ceppi batterici non coltivabili (Tolvanen and Karp, 2011). Tra le tecniche molecolari, quelle di *fingerprint*, che si basano sulla separazione elettroforetica di frammenti di DNA amplificati, consentono di stimare e di comparare, in modo relativamente semplice e veloce, i livelli di diversità nella comunità microbica e di monitorare i cambiamenti della sua struttura. Tuttavia tali metodologie producono un'immagine parziale della comunità identificando solo le sue componenti dominanti. Altre tecniche molecolari, come la costruzione di librerie genetiche, consentono uno studio più accurato per valutare contemporaneamente la composizione e la diversità delle comunità microbiche (Nocker et al., 2007).

Il gene batterico che codifica per l'RNA ribosomale 16S (16S rDNA) rappresenta il *marker* filogenetico generalmente utilizzato negli studi molecolari di biodiversità. La sua struttura di 1500 nucleotidi, caratterizzata da sequenze altamente conservate in tutti gli organismi, e da sequenze ipervariabili uniche per gli organismi di una stessa specie, lo rende idoneo per valutare la diversità genetica all'interno di comunità microbiche e per stabilire le relazioni filogenetiche tra i diversi organismi. Le sequenze conservate hanno permesso di individuare *primers* universali che sono utilizzati nelle reazioni di amplificazione del DNA (Backer et al., 2003).

L'amplificazione mediante Polymerase Chain Reaction (PCR) del gene 16S rDNA, o di sue porzioni, lo screening mediante le diverse metodologie molecolari, il sequenziamento e il

confronto delle sequenze con quelle di microrganismi già classificati e presenti in apposite banche dati, permette la caratterizzazione delle comunità microbiche.

La seguente linea di attività ha riguardato la caratterizzazione delle popolazioni microbiche presenti in inoculi selezionati di diversa origine (fango di depurazione, fango marino costiero, scarti vegetali) utilizzati per fermentazioni anaerobiche di alcune tipologie di biomasse (insilato di sorgo, letame e liquame bufalino, glicerolo grezzo, scotta) in condizioni di mesofilia.

L'analisi della biodiversità microbica degli inoculi è stata condotta mediante l'applicazione di due tecniche molecolari :

1. *fingerprint* dei frammenti del gene 16S rDNA mediante Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) allo scopo di determinare la presenza e l'abbondanza relativa delle differenti specie e di ottenere un profilo sia qualitativo (presenza/assenza di bande) che semiquantitativo (intensità delle bande) delle comunità microbiche.

La DGGE consiste nella separazione elettroforetica di frammenti di DNA (come ad esempio regioni del gene che codifica per l'RNA ribosomale 16S) precedentemente amplificati mediante PCR, su un gel di poliaccrilammide contenente un gradiente crescente di agenti denaturanti (urea e formammide) (Muyzer et al., 1993). La separazione dei frammenti (di uguale lunghezza e di dimensioni comprese tra 200 e 700 paia di basi) è basata sulla ridotta mobilità elettroforetica che hanno le molecole di DNA parzialmente denaturate rispetto al DNA a doppio filamento (dsDNA). Migrando lungo il gel, i frammenti di dsDNA incontrano condizioni denaturanti sempre maggiori che causano l'apertura del doppio filamento. La transizione da doppio filamento a filamenti parzialmente denaturati avviene in un range molto stretto; questo determina l'arresto della molecola sul gel in corrispondenza del suo specifico dominio di *melting*. Sequenze differenti hanno domini di *melting* differenti ed arresteranno la loro corsa in posizioni diverse sul gel. In questo modo è possibile separare frammenti di identica lunghezza, che differiscono per la sequenza di basi.

Talvolta i frammenti tendono però a denaturarsi completamente e non arrestano la loro corsa sul gel. Per ovviare a questo inconveniente, nella PCR di preparazione dei campioni si utilizza uno dei due *primers* modificato con delle sequenze ricche in GC, dette GC-clamps. Le GC-clamps, lunghe circa quaranta basi, impediscono la completa denaturazione del frammento di DNA durante la corsa elettroforetica determinandone l'arresto sul gel.

2. costruzione di una libreria genetica dei geni 16S rDNA, allo scopo di acquisire un elevato numero di cloni e ottenere una rappresentatività accettabile della popolazione microbica. La comparazione delle sequenze nucleotidiche ottenute con quelle disponibili in banche dati consente l'identificazione tassonomica delle specie fornendo quindi una immagine approfondita e reale della diversità microbica degli inoculi.

La costruzione di una libreria genetica (Leigh et al., 2010) consiste nell'inserimento del *pool* di frammenti del 16S rDNA amplificati tramite PCR in un plasmide idoneo caratterizzato da un sito di clonaggio provvisto di marcatori genetici, la cui presenza o assenza permette di selezionare le cellule batteriche trasformate con il plasmide (resistenze ad antibiotici o marcatori nutrizionali), e da diversi siti di taglio (unici e non) per gli enzimi di restrizione. I plasmidi ricombinanti, contenenti cioè ogni singolo frammento di DNA, sono inseriti all'interno di un ceppo batterico idoneo (ceppo trasformato) che è seminato su un terreno agarizzato contenente l'agente selettivo. Le colonie positive sono isolate e sottoposte ad estrazione del DNA plasmidico, utilizzato per le analisi di restrizione e di sequenziamento nelle successive analisi di *screening*. Per ottenere una buona efficienza di trasformazione e quindi un elevato numero di colonie positive è importante che la reazione di PCR risulti altamente specifica per l'amplificazione dei frammenti 16S rDNA.

### 1.2.2.1 Metodi utilizzati

L'applicazione delle tecniche molecolari ha richiesto la messa a punto di ogni singolo passaggio sperimentale idoneo alle caratteristiche dei campioni analizzati e alla finalità delle analisi.

Le procedure sperimentali utilizzate hanno seguito le seguenti fasi :

- 1) estrazione del DNA genomico dai diversi inoculi di fermentazione;
- 2) DGGE: amplificazione del DNA tramite PCR per ottenere i frammenti di 200 bp corrispondenti alla regione ipervariabile V3 del gene 16 S (V3-16SrDNA); separazione dei frammenti amplificati e isolamento delle singole bande per il sequenziamento del frammento
- 3) Libreria genetica: amplificazione del DNA tramite PCR dei frammenti di 1350 bp e successivo clonaggio utilizzando il kit commerciale TOPO TA cloning® (Invitrogen). I cloni trasformati sono stati isolati per la purificazione dei plasmidi che sono stati analizzati per lo specifico *pattern* di restrizione e successivamente sequenziali.

#### Inoculi ed estrazione del DNA

Sono stati analizzati tre diversi inoculi:

- 1) l'inoculo 'GM' selezionato da un fango di depurazione con un procedimento di arricchimenti successivi nel corso della fermentazione anaerobica di glicerolo (prodotto come scarto nella produzione di biodisel);
- 2) l'inoculo 'F<sub>210</sub>' selezionato dai sedimenti marini costieri, dopo 210 ore di produzione anaerobica di idrogeno in un reattore con agitazione in continuo, utilizzando il glucosio come substrato;
- 3) l'inoculo 'IM' costituito dal consorzio di singoli ceppi batterici isolati come produttori di idrogeno a partire da scarti vegetali.

1 ml di sospensione batterica prelevata nel corso della riattivazione dell'inoculo congelato (GM, F<sub>210</sub>) o dei ceppi (IM), è stata centrifugata (5 min, 3000g) ed i pellets ottenuti sono stati conservati a -20°C fino al momento dell' utilizzo. Successivamente, dopo il lavaggio dei pellets con soluzione salina (PBS buffer), si è proceduto all'estrazione del DNA. Per l' inoculo GM, considerata la complessità della matrice, sono stati utilizzati due diversi kit commerciali: il geneMATRIX™ Bacterial & yeast genomic DNA purification kit e il geneMATRIX™ Soil DNA purification kit dell'EUR<sub>x</sub> (forniti dalla ditta Carlbiotech). Per gli altri inoculi è stato utilizzato il primo kit, e in tutti i casi, è stato applicato il protocollo operativo consigliato.

#### PCR-DGGE

Per ottenere i frammenti di 200 bp, l'amplificazione del DNA purificato è stata effettuata applicando il seguente protocollo :

- 1) è stata condotta una prima reazione di PCR per amplificare il frammento di circa 1500bp utilizzando i primers rD1 (5' CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGC3') e fD1 (5'CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCG 3'). Le condizioni ottimali di PCR sono risultate le seguenti :

denaturazione : 95°C -7 minuti

25 cicli :

denaturazione : 94°C - 1 minuto



annealing : 56°C- 40 secondi

estensione : 72°C - 2 minuti

1 ciclo :

estensione : 72°C - 6 minuti

- 2) 4µl di amplificato della precedente reazione è stato utilizzato come stampo per la successiva amplificazione per ottenere il frammento V3-16SrDNA utilizzando i *primers* interni (nested-PCR) 534r (5'ATTACCGCGGGCTGCTGG3') e GC-341f (5'CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGGGACGGGGGGATCCCTACGGGAGGCAGCAG 3') specifici per gli Eubatteri. E' stato utilizzato il seguente protocollo :

denaturazione : 95°C -7 minuti

20 cicli (touchdown) :

denaturazione : 94°C - 30 secondi

annealing : 65°C- 30 secondi, diminuendo la temperatura di 0,5°C/ciclo fino a 55°C

estensione : 72°C - 1 minuto

10 cicli :

denaturazione : 94°C - 30 secondi

annealing : 55°C- 30 secondi

estensione : 72°C - 1 minuto

1 ciclo :

estensione : 72°C - 10 minuti

La procedura di *touchdown* permette di aumentare l'efficienza dell'amplificazione aumentando la specificità di legame dei *primers* sul DNA. Successivamente, i prodotti della PCR sono stati purificati e concentrati mediante il kit commerciale QIAquick PCR Purification Kit della Quiagen allo scopo di ottimizzare la risoluzione delle bande sul gel di DGGE.

### DGGE

Nella prima parte del lavoro si è proceduto all'ottimizzazione della tecnica di DGGE in funzione della sua applicabilità ai campioni di nostro interesse e consentire un corretto svolgimento dell'analisi.

L'analisi DGGE è stata condotta con il sistema DCodeTM Universal Mutation DetectionSystem (BIO-RAD).

Il gel utilizzato è costituito da acrilamide/bis acrilamide all' 8% con gradiente denaturante lineare formato da urea e formammide, ed è composto dal 'running gel' (gel denaturante di separazione), e dallo "*stacking gel*" (8% di Acrylamide/Bis-acrilamide) colato nella parte superiore e privo di agenti denaturanti per consentire la distribuzione omogenea del DNA all'interno dei pozzetti e un inizio uniforme della corsa elettroforetica per tutti i campioni.

Nella fase iniziale di ottimizzazione delle condizioni di corsa della DGGE, è stato scelto un range di denaturazione compreso fra 0% e 100% (7M urea, 40% formammide), il quale ha permesso di osservare una prima distribuzione dei frammenti di DNA di 200 bp all'interno del gel e determinare il range ottimale per una migliore risoluzione delle bande.

Dopo varie prove preliminari si è deciso di impiegare un *range* di denaturazione compreso fra 20% e 70%, in accordo con le conclusioni rilevate in altri studi, secondo le quali per batteri

derivati da campioni ambientali l'intervallo migliore di denaturazione è compreso tra 30%-60% o 20%-70%.

Anche per quanto riguarda le condizioni di corsa elettroforetica è stata condotta un'accurata analisi bibliografica che ha portato a definire le seguenti condizioni : 5 h a 60 °C passando da un voltaggio di 20 V, mantenuto per i primi dieci minuti, a 200 V per le successive ore. Il buffer di corsa utilizzato è stato il Tris - acetato .

Terminata la corsa, il gel veniva colorato tramite immersione (30 minuti al buio) in 200 ml di una soluzione 0,1M NaCl contenente il Nucleic Acid Gel Stain gel Red (Biotium, concentrazione finale 3x). La rilevazione delle bande avveniva tramite successiva osservazione al transilluminatore. Il gel veniva fotografato e le foto sottoposte ad analisi d'immagine con il software Quantity one 1-D analysis ( Bio-Rad) per calcolare il valore di intensità relativa di ogni singolo campione.

### Isolamento delle bande

A DGGE ultimata, il DNA delle bande corrispondenti agli inoculi GM e F210 è stato estratto dal gel per essere nuovamente amplificato e successivamente sequenziato. Sono state provate tre differenti metodiche di estrazione :

- 1) estrazione diretta dal gel con un puntale sterile;
- 2) taglio delle bande con una lametta sterile ed eluizione del DNA in 100 µl di tampone Tris-EDTA a 4°C per tutta la notte;
- 3) taglio delle bande con una lametta sterile ed eluizione del DNA in 500 µl di H<sub>2</sub>O sterile e biglie di vetro con agitazione per 3 min e successiva incubazione a 4°C per tutta la notte. Al termine, si centrifugavano le eppendorf a bassa velocità per separare il DNA eluito dalle biglie.

Al termine di ogni procedura di estrazione il DNA veniva nuovamente amplificato tramite PCR con la coppia di *primers* 341f/534r.

### PCR-clonaggio

Il DNA genomico purificato è stato amplificato utilizzando i *primers* universali per Eubatteri 27f (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') e 1389r (5' ACGGGCGGTGTGTACAAG 3') per ottenere i frammenti 16S rDNA di 1350 bp, usando il kit commerciale Perpetual taq PCR Master Mix dell' EURx, fornito dalla ditta Carli Biotech. Il protocollo finale di amplificazione, selezionato in seguito a diverse prove sperimentali, è stato il seguente:

denaturazione : 95°C -2 minuti

20 cicli (touchdown) :

denaturazione : 95°C - 40 secondi

annealing : 65°C- 40 secondi, diminuendo la temperatura di 0,5°C/ciclo fino a 55°C

estensione : 72°C - 90 secondi

8 cicli :

denaturazione : 95°C - 40 secondi

annealing : 55°C- 40 secondi

estensione : 72°C - 90 secondi

1 ciclo :

estensione finale : 72°C - 10 minuti

Per ogni reazione (50 µl) sono stati amplificati 15 ng di DNA in una mix contenente 1,25 U di Taq polimerasi, 1,5 mM  $Mg^{2+}$ , 0,2 mM di ogni nucleotide, 0,1 µM di ogni *primers*.

L'attività non *proofreading* della Taq polimerasi ha permesso, nel corso dell'estensione finale, l'aggiunta ai frammenti amplificati delle adenine (A) sporgenti all'estremità 3' necessarie per il successivo clonaggio.

Clonaggio

Il clonaggio dei frammenti di 1350 bp amplificati tramite PCR è stato effettuato con il kit TOPO TA cloning® (Invitrogen). Il vettore pCR®2.1-TOPO (fig.1) è fornito linearizzato con singole timine (T) sporgenti all'estremità 3' a cui è legata la topoisomerasi I di *Vaccinia virus*, e consente di clonare in un passaggio i prodotti di PCR attraverso l'*annealing* delle A terminali del frammento con le T del vettore e l'azione della topo isomerasi. Possiede geni per la resistenza alla kanamicina e all'ampicillina, e l'origine di replicazione pUC per il mantenimento e la propagazione in batteri. Il sito di clonaggio è inserito tra il promotore *Plac* ed il gene *lacZα* per consentire la selezione delle colonie che sono state trasformate dal solo vettore (vettore non ricombinante, colonie blu) o dal vettore con il frammento inserito (vettore ricombinante, colonie bianche) mediante saggio colorimetrico su piastra di agar contenente il substrato X-gal, ed è fiancheggiato dalle sequenze *forward* e *reverse* di priming per M13 e da siti di taglio per diversi enzimi di restrizione.

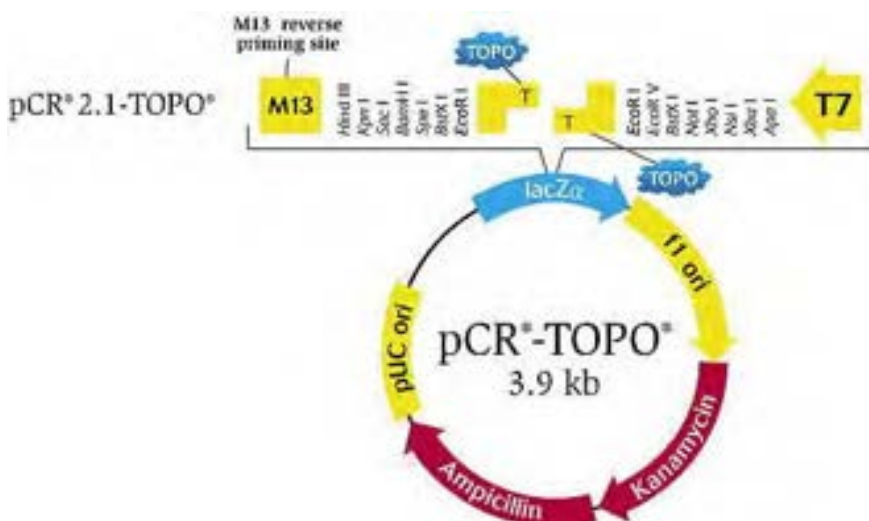


Figura 1: mappa del vettore di clonaggio dei frammenti PCR-16S rDNA

La reazione di clonaggio è stata svolta seguendo le relative istruzioni, e, parallelamente, con un campione di controllo : a 2 µl di miscela dei frammenti di 1350 bp amplificati (2µl di acqua sterile per il controllo), sono stati aggiunti 1 µl di vettore pCR®2.1-TOPO, 1 µl di *salt solution* e si è effettuata l'incubazione di 30 minuti a temperatura ambiente. 2 µl di questo prodotto sono stati sufficienti per trasformare 100 µl di cellule batteriche competenti Top10. Tre diverse concentrazioni (40 µl, 20 µl, 10 µl) di queste ultime sono state seminate su piastre di agar

addizionate con kanamicina (50 µg/ml) e precedentemente trattate con X-gal (40 mg/ml) e preriscaldate a 37°C . Le piastre sono state incubate a 37°C per una notte.

100 cloni positivi (colonie bianche) sono stati isolati, trasferiti in coltura di terreno LB addizionato con kanamicina (50 µg/ml) e lasciati crescere a 37°C per 24 ore. Successivamente 2 ml della coltura sono stati centrifugati per procedere con l'estrazione del plasmide, ed il resto è stato congelato in glicerolo (15%) e conservato a -80°C.

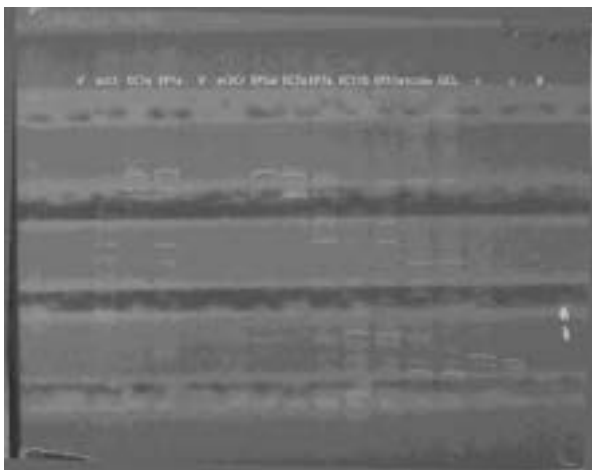
Estrazione dei plasmidi, caratterizzazione e sequenziamento

Dopo l'isolamento dei cloni, si è reso necessario effettuare lo *screening* dei vettori ricombinanti. E' stata effettuata l'estrazione dei plasmidi utilizzando il kit commerciale dell'EURx (fornito dalla ditta CarliBiotech) seguendo il protocollo operativo e si è proceduto all'analisi di restrizione: 200 ng di ogni campione sono stati digeriti parallelamente con 3 diversi enzimi di restrizione (EcorI, HindIII e PstI) in 20 µl di reazione contenente l'appropriato *buffer* e 1U/µg di ogni enzima incubati a 37°C per 2h. 10 µl di ogni reazione sono stati corsi su gel di agarosio 1.5% per 2 h a 200 V. Per verificare il corretto inserimento dei frammenti all'interno del plasmide, alcuni campioni sono stati sottoposti alla reazione di PCR, utilizzando le due coppie di *primers* 27f/1389r (*annealing* sul frammento) e M13f/M13r (*annealing* sul plasmide). Il sequenziamento dei frammenti è stato eseguito dai laboratori del servizio Genechron, a cui sono stati forniti i plasmidi purificati e i *primers* 27f e 1389r. In tal modo, per ogni ceppo purificato, sono stati sequenziati entrambi i filamenti del frammento 16S rDNA.

**1.2.2.2 RISULTATI**

Inoculo GM

Nella figura 2 è riportata la foto di un gel DGGE in cui sono stati separati i frammenti amplificati V3- 16SrDNA ottenuti dai campioni di DNA purificato durante fasi successive della procedura di arricchimento. Ogni singolo frammento corrisponde ad una unità tassonomica e, quindi, l'insieme delle bande presenti in ciascuna corsia rappresenta la composizione batterica che contraddistingue ogni singola fase del processo di arricchimento e che nel loro insieme hanno condotto dal fango iniziale (actS) al campione finale (GM).



**Figura 2** DGGE dei frammenti V3-16SrDNA di 200 bp su gel con gradiente di denaturazione 20%-70%.

Le diverse sigle corrispondono alle singole fasi del processo di arricchimento.

Le lettere c e v indicano,rispettivamente, il controllo negativo e le corsie vuote.

La DGGE mostra una diversa distribuzione delle bande e, quindi, delle diverse specie batteriche che si instaurano con una dominanza variabile (vedi anche fig.5) nel processo di arricchimento a partire dal fango attivo (actS).

L'interesse principale si è focalizzato sul campione GM che è stato utilizzato come inoculo negli esperimenti di fermentazione di altri substrati. Al fine di identificare le popolazioni batteriche presenti al suo interno è stata condotta una nuova elettroforesi DGGE con quattro repliche dei frammenti V3-16SrDNA del campione GM per verificare che il profilo elettroforetico ottenuto fosse replicabile.



**Figura 3** DGGE dei frammenti V3-16SrDNA di 200 bp su gel con gradiente di denaturazione 20%-70%.

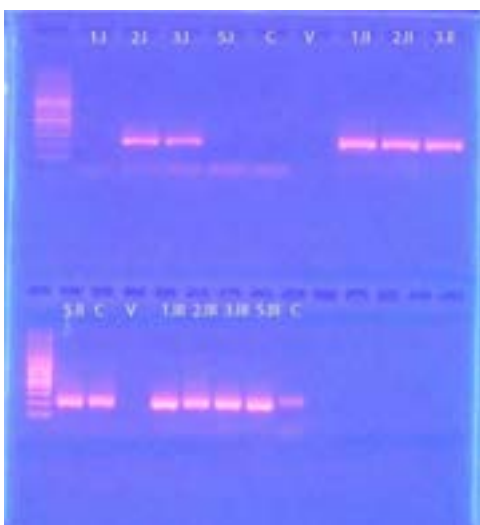
Il campione GM è stato caricato in 4 corsie diverse.

Le lettere C e V indicano, rispettivamente, il controllo negativo e le corsie vuote.

Avendo ottenuto un esito positivo, si è proceduto all'estrazione del DNA dalle singole bande.

Le bande escisse sono state trattate secondo tre metodologie diverse per eluire il DNA ed ottenere un campione sufficientemente pulito per ripetere la reazione di amplificazione e poter sequenziare il prodotto V3-16SrDNA.

Nella figura sottostante sono riportati i profili elettroforetici delle amplificazioni ottenute applicando tre diverse procedure di estrazione (indicate con I, II, III) a cui sono state sottoposte le quattro bande estratte dal gel.



**Figura 4** Gel di agarosio 1% dei prodotti di amplificazione V3-16SrDNA di 200 bp ottenuti dal DNA estratto dal gel DGGE con le tre diverse procedure descritte al par. 1.2.2.1 ed indicate con I,II e III.

Nella prima lane, il marcatore di peso molecolare, mentre le lettere C e V indicano, rispettivamente, il controllo negativo e le corsie vuote.

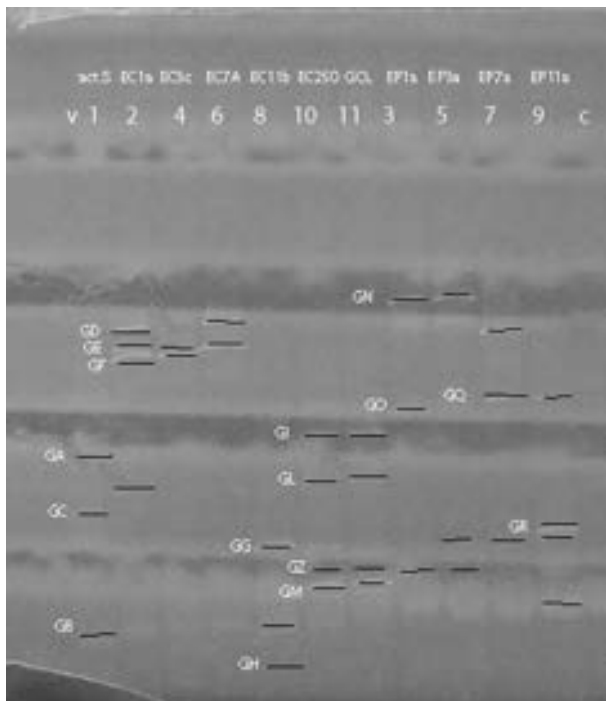
Le procedure II e III (eluizione del DNA in 100 µl di tampone Tris-EDTA a 4°C per tutta la notte ed eluizione del DNA in 500 µl di H<sub>2</sub>O sterile e biglie di vetro con agitazione per 3 min e successiva incubazione a 4°C per tutta la notte, rispettivamente ) sono risultate le migliori, in quanto il DNA estratto dalle quattro bande è stato tutto amplificato con una buona efficienza.

Il DNA amplificato prodotto dalla procedura II è stato sequenziato presso il laboratorio Genechron. Gli elettroferogrammi ottenuti sono stati analizzati con il programma ChromasPro e per ciascun campione la sequenza ritenuta più probabile è stata confrontata con quelle presenti in Genbank.

I risultati preliminari indicano che all'interno dell'inoculo GM siano presenti diverse specie appartenenti principalmente al genere *Klebsiella*.

Successivamente si è proceduto all'identificazione delle popolazioni batteriche presenti nelle diverse fasi del processo di arricchimento e mostrate in fig. 2.

E' stato nuovamente corso un gel DGGE con i frammenti V3-16SrDNA dei singoli campioni e sono state individuate le bande principali che sono state estratte dal gel per essere amplificate e sequenziate secondo lo stesso protocollo descritto precedentemente. Le bande esaminate sono state evidenziate nella figura sottostante in cui è riportato anche il valore dell'intensità relativa (espressa in percentuale) delle singole bande di ogni campione calcolato con il software per analisi di immagini della Bio-rad.



<u>1</u>	GA 23.4%
	GC 22.1%
	GB 54.5%
<u>2</u>	GD 37.0%
	GE 18.7%
	GF 27.9%
<u>8</u>	GG 49.3%
	GH 23.9%
<u>10</u>	GI 26.2%
	GL 23.2%
	GM 31.0%
	GZ 19.6%
<u>3</u>	GN 34.7%
	GO 37.0%
<u>7</u>	GQ 35.0%
	GR 33.0%

**Figura 5** DGGE dei frammenti V3-16SrDNA di 200 bp su gel con gradiente di denaturazione 20%-70%.

Le diverse sigle corrispondono alle singole fasi del processo di arricchimento a partire dal fango iniziale (act S) fino al campione finale (GM).

Le lettere C e V indicano, rispettivamente, il controllo negativo e le corsie vuote.

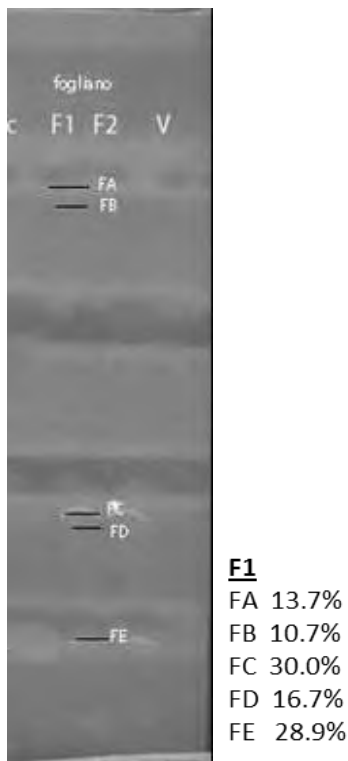
A destra sono riportate le intensità relative (esprese in percentuale) delle bande estratte.

La maggior parte delle reazioni di sequenziamento hanno fornito elettroferogrammi con un elevato rumore di fondo, che non ha permesso di ottenere risultati attendibili in banca dati. Questi sequenziamenti saranno quindi ripetuti.

Inoculo mix F210

Questo inoculo è stato selezionato da sedimenti marini costieri, dopo 210 ore di fermentazione anaerobica del glucosio in un reattore in continuo (CSTR), per le sue ottime capacità di produrre idrogeno. Il fermentato è stato conservato a -20°C e riattivato al momento del suo utilizzo in nuovi esperimenti di fermentazione.

Anche l'inoculo F210 è stato caratterizzato mediante un gel DGGE, la cui foto è riportata nella figura sottostante con i valori di intensità relativa delle singole bande.



**Figura 6** DGGE dei frammenti V3-16SrDNA di 200 bp su gel con gradiente di denaturazione 20%-70%

**F1, F2** :due repliche di inoculo F210

Le lettere c e v indicano,rispettivamente, il controllo negativo e le corsie vuote.

A destra sono riportate le intensità relative delle bande estratte.

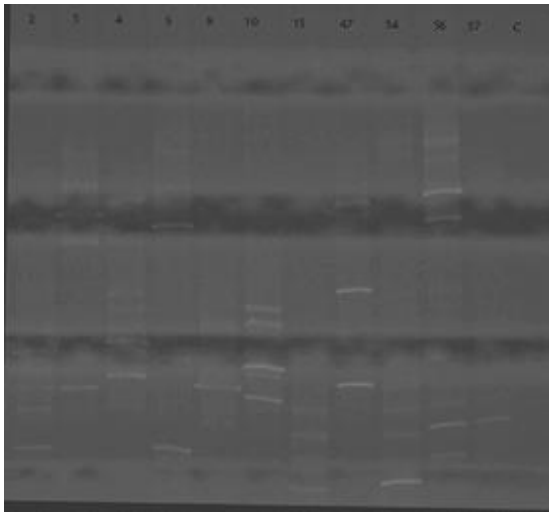
Dal profilo elettroforetico sono emerse cinque bande principali, di cui due dominanti (FC, FE) corrispondenti a diverse unità tassonomiche. Il sequenziamento delle bande estratte dal gel e il successivo allineamento delle sequenze ottenute con quelle presenti in Genbank hanno permesso di identificare le unità tassonomiche con il genere *Clostridium*.

Inoculo IM

Il terzo inoculo che si intendeva utilizzare è rappresentato da un consorzio di ceppi batterici produttori di idrogeno purificati dall'autofermentazione di scarti vegetali tramite crescita su piastra di agar contenente gli omogenati degli scarti vegetali.

Dal momento che questi inoculi non erano mai stati analizzati mediante DGGE, si è pensato di analizzarli tramite l'uso di tale tecnica e il profilo di *fingerprint* evidenzia un polimorfismo del frammento V3 16SrDNA amplificato per tutti i campioni analizzati (figura 7).





**Figura 7** DGGE dei frammenti V3-16SrDNA di 200 bp su gel con gradiente di denaturazione 25%-60%

**2-57:** inoculi

**C:** controllo negativo

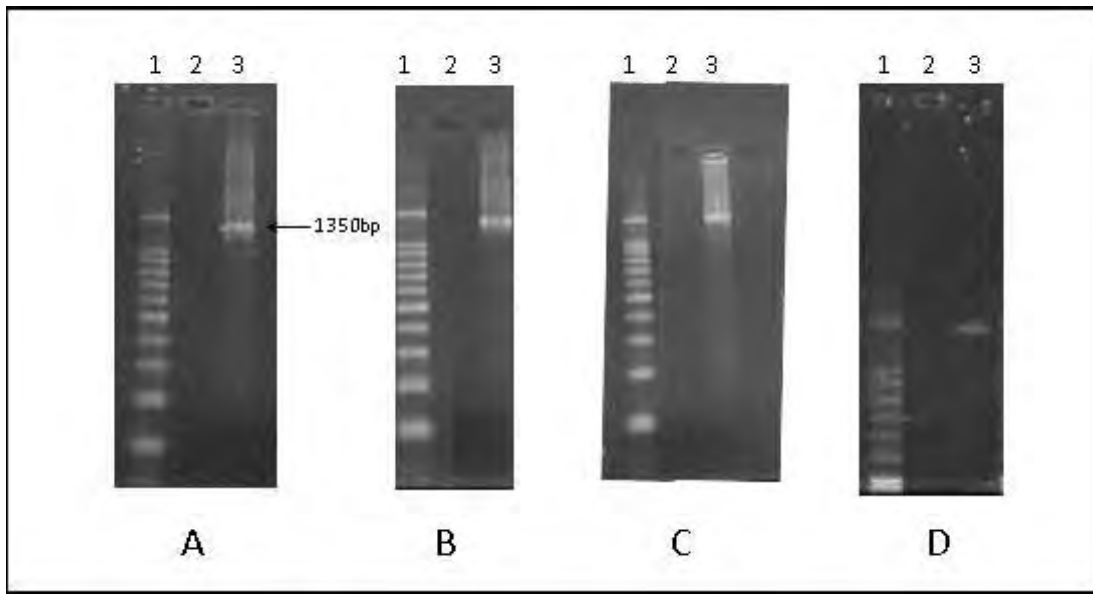
### **Libreria genetica del 16S rDNA**

Le attività iniziali sono state finalizzate alla messa a punto delle procedure sperimentali, concentrando l'attenzione sull'inoculo GM. I due diversi kit utilizzati per l'estrazione del DNA, uno specifico per i suoli, l'altro generico per colture batteriche, si sono mostrati equivalenti rispetto alla quantità e alla purezza del DNA estratto.

Sono state poi svolte numerose prove per ottimizzare la reazione di PCR del DNA con i *primers* universali per Eubatteri 27f e 1389r, allo scopo di ottenere sia una buona resa di produzione del frammento amplificato che la sua specificità. Quest'ultimo è un parametro estremamente importante per ottenere una reazione di clonaggio efficiente e rappresentativa.

La fig.8 mostra i gel di agarosio del frammento 16S rDNA che riassumono il progressivo miglioramento della reazione di PCR al variare di alcuni parametri sperimentali. Procedendo dal gel A al gel D (in tutti i gel è stato caricato un volume pari a 1/10 del volume di reazione), è stata abbassata la temperatura di *annealing* dei *primers* da 57°C (A) a 55°C (B), è stata diminuita la quantità di DNA da 25 ng (B) a 15 ng (C) ed è stata dimezzata la concentrazione dei *primers* da 0,2 µM (C) a 0.1 µM (D). In tutti i casi è stata applicata la procedura di *touchdown*, ma nelle ultime due prove (C e D) è stato allungato il tempo di estensione da 30 a 40 secondi e sono stati ridotti i cicli finali di amplificazione da 10 a 8. Nel controllo negativo (lane 2) non si è mai osservata contaminazione, e soltanto nelle condizioni sperimentali utilizzate nel caso D si osserva una banda discreta e priva di *smearing*, espressione di una amplificazione aspecifica. Le condizioni di PCR utilizzate nel caso D, riepilogate nel par. 1.2.2.1, sono state utilizzate per ottenere il *pool* di frammenti utilizzati nel clonaggio.





**Figura 8.** Gel di agarosio 1.5% dei frammenti 16S rDNA ottenuti dall'inoculo GM con i *primers* 27f/1389r nel corso dell'ottimizzazione

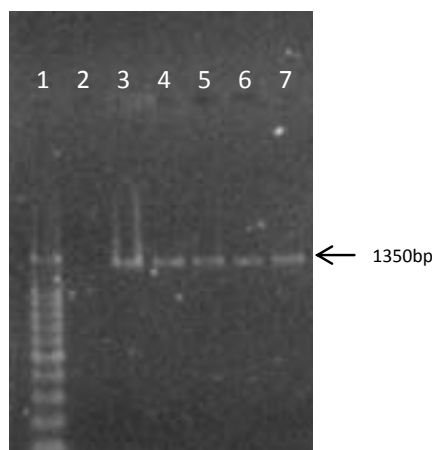
**A, B, C, D** : diverse prove sperimentali ( vedi testo). In tutte le foto :

**lane1:** *marker* GelPilot 100bp Plus Ladder (QIAGEN) (1500bp,1000bp,900bp,800bp,700bp,600bp,500bp,400bp,300bp,200bp,100bp);

**lane2:** controllo negativo;

**lane 3** : frammenti di 1350bp

Sebbene ripetibile, ogni reazione di PCR svolta con un *pool* di DNA, può essere caratterizzata da una variabilità propria dovuta al prelevamento di piccoli volumi, alla maggiore affinità di legame dei primers ai diversi stampi, ad eventuali errori della Taq polimerasi etc.etc. Per questo motivo, i frammenti utilizzati nel clonaggio sono stati ottenuti dall'unione di 5 reazioni di PCR indipendenti, il cui prodotto è mostrato nella fig.9.



**Figura 9.** Gel di agarosio 1.5% dei frammenti 16S rDNA ottenuti dall'inoculo GM con i *primers* 27f/1389r in 5 reazioni indipendenti

**lane1:** *marker* GelPilot 100bp Plus Ladder (QIAGEN) (1500bp,1000bp,900bp,800bp,700bp,600bp,500bp,400bp,300bp,200bp,100bp);

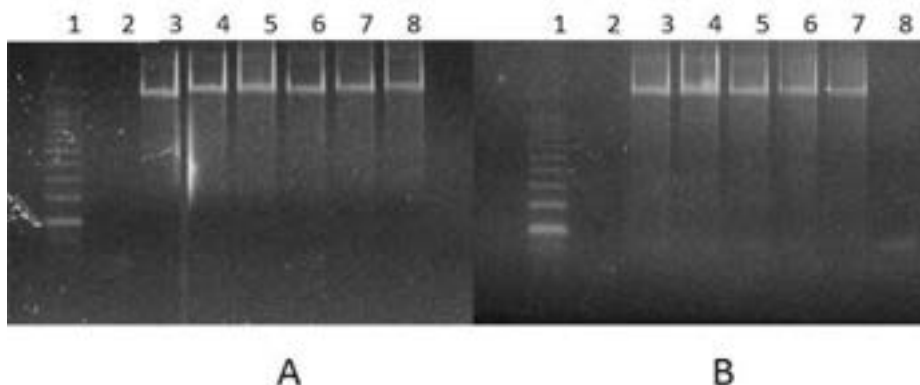
**lane2:** controllo negativo;

**lane 3-7** : frammenti di 1350bp

### **Screening dei cloni isolati**

Il clonaggio dei frammenti 16S rDNA e la successiva trasformazione dei batteri, ha prodotto numerosissimi cloni positivi (colonie bianche). Sono stati isolati 100 cloni e cinque, scelti casualmente, sono stati utilizzati per verificare la correttezza dell'inserimento dei frammenti all'interno del vettore pCR2.1-TOPO.

In una prima prova sperimentale, i plasmidi ricombinanti estratti dai cloni ed i frammenti di 1350bp, sono stati nuovamente amplificati tramite PCR utilizzando in reazioni parallele, le coppie di *primers* 27f/1389r e M13f/M13r. Nel primo caso, l'*annealing* preferenziale dei *primers* 27f/1389r al frammento clonato doveva generare un prodotto di PCR di 1350bp corrispondente a quello del frammento non clonato, mentre nel secondo caso, l'*annealing* preferenziale dei *primers* M13f/M13r alle sequenze fiancheggianti il sito di clonaggio, doveva produrre un prodotto di circa 1500bp ( frammento + sequenze limitrofe) e non doveva produrre alcuna amplificazione con il frammento non clonato. I risultati ottenuti, mostrati in fig.10, hanno confermato quelli attesi. L'amplificazione dei plasmidi ricombinanti con i *primers* 27f/1389r (A) e con i *primers* M13f/M13r (B) ha prodotto i frammenti attesi (lanes 3-7), mentre, solo nel primo caso, l'amplificazione è risultata positiva con i frammenti di 1350bp utilizzati per il clonaggio (A e B, lane 8).



**Figura 10.** Gel di agarosio 1.5% dei prodotti di amplificazione dei plasmidi estratti da 5 cloni con i *primers* 27f/1389r (A) e M13f/M13r (B)

**lane1:** marker GelPilot 100bp Plus Ladder (QIAGEN) (1500 bp,1000 bp,900 bp,800 bp,700 bp,600 bp,500bp,400bp,300bp,200bp,100bp)

**lane2 (A e B):** controllo negativo

**lane 3-7 (A e B):** prodotto di amplificazione ottenuto dal plasmide ricombinante

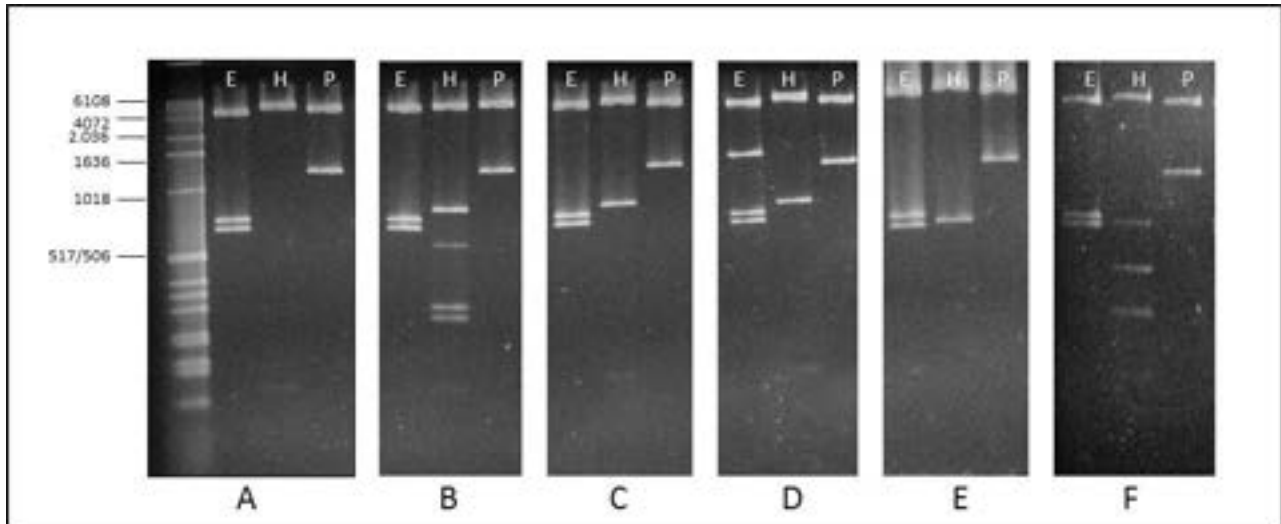
**lane 8 (A e B):** prodotto di amplificazione ottenuto dal frammento non clonato

Una successiva caratterizzazione è stata svolta attraverso l'analisi dei *patterns* di restrizione dei plasmidi ricombinanti. Sono stati scelti tre enzimi: EcoRI, Hind III e Pst I i cui profili di restrizione del vettore PCR 2.1-TOPO sono i seguenti (vedi anche fig.1) :

- EcoRI, che taglia in prossimità del sito di clonaggio, produce un frammento di circa 3870bp;
- HindIII, che linearizza e produce un frammento di 3890bp;
- Pst I, che possiede due siti di taglio, produce due frammenti di 1167bp e 2723bp.

Naturalmente l'inserimento del frammento nel vettore pCR2.1-TOPO, che nell'insieme costituiscono un plasmide ricombinante di circa 5250bp, può alterare questi *patterns* di restrizione perché gli stessi frammenti possono contenere le sequenze di taglio degli enzimi. Profili di restrizione diversi forniscono anche una indicazione della diversità di sequenza del

frammento clonato. Al momento, sono stati acquisiti i profili di restrizione di 40 cloni e i profili rappresentativi di quelli ottenuti sono mostrati in figura 11.



**Figura 11** Profili di restrizione dei plasmidi ricombinanti purificati da sei diversi cloni (A-F)

**lane1:** DNA *marker* di alto peso molcolare III (Roche)

**E :** profilo di EcoRI

**H:** profilo di HindIII

**P:** profilo di pstI

I 40 cloni della libreria genetica del gene 16S rDNA prodotta dall'inoculo GM, sono stati sequenziati utilizzando la coppia di *primers* 27f/1389r. Tutti, ad eccezioni di due cloni, hanno prodotto sequenze di ottima qualità.

### **Avanzamento del lavoro sperimentale**

Al momento è stata completata l'estrazione dei plasmidi dai 100 cloni isolati e sono in corso le analisi per completare i profili di restrizione ed il sequenziamento. Contemporaneamente, si sta procedendo alla elaborazione delle sequenze già ottenute, per creare la sequenza di consenso che sarà confrontata con quelle contenute nei database di sequenza di 16S rDNA batterici ed identificare le specie batteriche che caratterizzano l'inoculo GM.

La stessa procedura sperimentale sarà poi utilizzata per caratterizzare l'inoculo F210.

### 1.2.3. Prove di efficienza di produzione di idrogeno di differenti inoculi su mix substrati

La finalità principale di questa attività di ricerca è stata quella di valutare l'efficienza del processo di produzione di idrogeno su differenti substrati reali singoli ed in codigestione. Si è quindi deciso di effettuare un test preliminare finalizzato alla scelta dell'inoculo più efficiente tra due consorzi selezionati nei nostri laboratori (F<sub>210</sub> e GM) e una mix batterica (IM) di tre ceppi anaerobi facoltativi (*Buttiauxella* sp. 4, *Rahnella* sp. 10 *Raoultella* sp. 47) appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* isolati nei nostri laboratori da un substrato reale.

L'inoculo F<sub>210</sub> è un consorzio acclimatato sul glucosio mentre l'inoculo GM è un consorzio acclimatato sul glicerolo.

La prova è stata effettuata su una mix di tre substrati (scotta, letame e glicerolo) a uguale concentrazione di biomassa umida (g/l) e con una concentrazione di VS (solidi volatili) di 20g/l. Il pH di partenza era di 8,3.

Dai risultati ottenuti (tab. 2) il consorzio F<sub>210</sub> è stato utilizzato per i successivi esperimenti.

Tabella 2 Parametri del processo di produzione di idrogeno

INOCULO	T°C	time (h)	H2 (%)	H2 ml/l	ml H2 / g VS	pH
IM	37	46	43,3 ± 3,25	885 ± 1,72	43,7 ± 1,70	4,7
F <sub>210</sub>	37	46	34,4 ± 1,46	1019 ± 4,26	50,4 ± 4,21	4,8
GM	37	24	32,1 ± 2,26	773 ± 9,46	38,2 ± 9,12	5,0

### 1.2.4. Prove in batch di produzione biologica di idrogeno utilizzando l'inoculo F<sub>210</sub> su diversi substrati singoli o in codigestione

Le prove di produzione su substrati singoli sono state effettuate con e senza sterilizzazione del substrato. La sterilizzazione è una pratica adottata per l'arricchimento dell'inoculo di partenza in quanto le biomasse contengono una propria comunità autoctona in grado da una parte di competere con l'inoculo scelto per la produzione di idrogeno, dall'altra di consumare l'idrogeno prodotto. In particolare il letame e il liquame sono utilizzati proprio come inoculo nei processi di produzione di metano. I test di produzione di idrogeno sono stati effettuati senza controllo del pH ossia senza l'utilizzo di una soluzione tampone per diluire i substrati e senza il controllo manuale durante il corso della fermentazione.

Per tutti i test la concentrazione iniziale di VS era di 8 g/l

#### 1.2.4.1 Test su substrati singoli sterili

I risultati di seguito riportati (tab.3) hanno mostrato che tutti i substrati non sterili utilizzati nel processo fermentativo producono idrogeno con rese che vanno da 10,4 ml H<sub>2</sub>/g VS (letame) a 142,7 ml H<sub>2</sub>/g VS (scotta). Il pretrattamento con la sterilizzazione ha incrementato da due a tre volte le rese di produzione di idrogeno dal letame (da 10,4 a 37,7 ml H<sub>2</sub>/g VS) e dal glicerolo (da 52,4 a 129,6 ml H<sub>2</sub>/g VS), rispettivamente. Per la produzione di idrogeno dalla scotta, sterile e non sterile, non si sono osservate differenze così significative. Ciò è dovuto al fatto che tale substrato esce, come residuo della lavorazione del siero di latte per la produzione della ricotta, a circa 90-100°C.

Per l'insilato di sorgo si è resa necessaria l'aggiunta del tampone fosfato 0,1 M (pH 6,7) come ulteriore pretrattamento poiché, come si vede dalla tabella, il pH dell'insilato di sorgo è minore

(pH 3,6) del valore minimo per la produzione di idrogeno ( $\text{pH} \geq 4,5$ ). I pretrattamenti utilizzati hanno incrementato la resa da 10,3 a 65,4 ml  $\text{H}_2/\text{g VS}$ .

In condizioni non sterili dal liquame (Fig. 12, Tab. 3) si sta producendo metano (l'esperimento è ancora in corso) con rese medie di 248 ml  $\text{CH}_4/\text{g VS}$  confrontabili con quelle ottenute in altri lavori (Ward et. al., 2008).

Il migliore risultato sia in termini di resa (164,4 e 142,7 ml  $\text{H}_2/\text{g VS}$ ), produzione volumetrica (1447 e 1028 ml/l) e percentuale di idrogeno nel biogas (39,3 e 42,2%) è stato ottenuto con la scotta con e senza sterilizzazione. L'elevata concentrazione di lattosio, un disaccaride costituito da una molecola di beta D-(+)-galattosio e da una di D-(+)-glucosio, nella scotta (39-52 g/l), lo rende un substrato prontamente disponibile ai microorganismi per il processo di fermentazione.

Tabella 3. Parametri del processo di produzione di idrogeno. Per il liquame non sterilizzato sono anche riportati i parametri di produzione del metano.

substrati	%	pretrattamenti	Tempo fine produzione (h)	$\text{H}_2$ (%)	$\text{H}_2$ (ml/l)	ml $\text{H}_2/\text{g VS}$	pH in.	pH fin
scotta	100	/	144	42,4 ± 1,29	1028 ± 5,62	142,7 ± 0,78	6,5	4,5
letame bufalino	100	/	24	4,26 ± 0,49	83,3 ± 11,3	10,4 ± 1,41	6,8	6,2
glicerolo	100	/	120	20,9 ± 0,63	419,6 ± 8,20	52,4 ± 1,02	6,4	5,0
insilato di sorgo	100	/	48	4,6 ± 0,12	82,7 ± 3,31	10,3 ± 1,05	3,6	3,6
scotta	100	sterilizzazione	72	39,2 ± 0,58	1447 ± 0,69	164,4 ± 0,08	6,5	4,7
letame bufalino	100	sterilizzazione	114	17,8 ± 1	301 ± 14,5	37,7 ± 1,81	6,8	6,1
glicerolo	100	sterilizzazione	138	32,4 ± 0,59	1037 ± 142	129,6 ± 17,8	8,0	5,6
Liquame bufalino	100	sterilization	48	19,8 ± 1,89	321 ± 20,2	38,2 ± 2,42	8,0	6,5
insilato di sorgo	100	sterilizzazione e tampone fosfato 0,1M	114	33,6 ± 0,59	523 ± 16,2	65,4 ± 2,04	6,7	5,8
				$\text{CH}_4$ (%)	$\text{CH}_4$ (ml/l)	ml $\text{CH}_4/\text{g VS}$	pH in.	pH fin
liquame	100	/	337	68,7 ± 1,25	1985 ± 130	248 ± 13,6	7,2	6,8

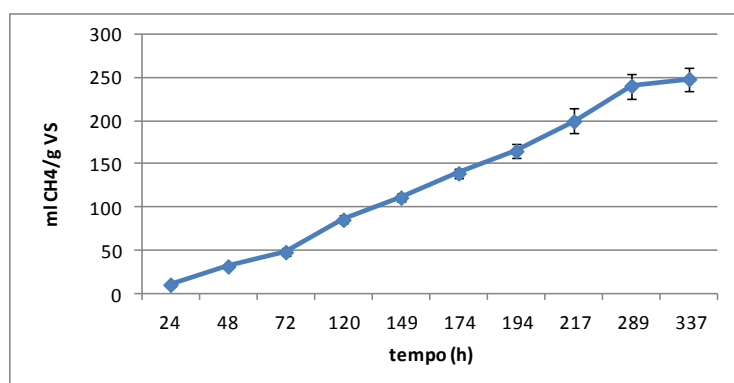


Fig. 1. Valore medio della resa di produzione cumulativa di metano dal liquame.

### 1.2.4.2 Test su mix di substrati sterili

In base ai risultati conseguiti su i substrati singoli, i test di co-digestione sono stati effettuati sterilizzando il substrato di partenza.

Le percentuali dei diversi substrati sono relativi alla concentrazione iniziale dei solidi volatili (8g/l). In Tab. 4 vengono presentati i risultati degli esperimenti.

Tabella 4. Parametri del processo di produzione di idrogeno.

substrati	Substrati (%)	Pretrattamento	Tempo fine produzione (h)	H <sub>2</sub> (%)	H <sub>2</sub> (ml/l)	ml H <sub>2</sub> / g VS	pH in.	pH fin.
scotta, glicerolo	90:10	sterilizzazione	48	40,32 ± 1,67	1502 ± 32,7	188 ± 4,08	6,7	4,3
letame bufalino glicerolo	90:10	sterilizzazione	24	17,15 ± 1,9	377 ± 10,8	47,16 ± 5,2	6,8	5,8
letame bufalino scotta	90:10	sterilizzazione	24	20,8 ± 2,12	516 ± 52,5	65,4 ± 6,57	6,5	6,1
letame bufalino scotta	50:50	sterilizzazione	72	33,6 ± 0,44	1028 ± 75,8	128 ± 9,48	6,5	5
Scotta, letame, glicerolo	33:33:33	sterilizzazione	72	34,7 ± 0,19	818 ± 4,24	102 ± 0,25	6,3	5,5
Scotta, letame, glicerolo	70:20:10	sterilizzazione	72	40,7 ± 0,58	1499 ± 24	170 ± 2,73	5,6	4,7
Scotta, letame, glicerolo	20:70:10	sterilizzazione	72	36,7 ± 0,53	924 ± 59,4	116 ± 7,42	6,5	5,5
sorgo, letame, glicerolo	70:20:10	sterilizzazione	144	28,5 ± 0,32	817 ± 7,24	102 ± 8,40	6,5	-

Le rese di produzione di idrogeno (ml H<sub>2</sub>/g VS) variano da un minimo di 47,2 ad un massimo di 188.

E' interessante notare che la produzione di idrogeno dal letame, generalmente considerato un substrato non idoneo alla fermentazione ad idrogeno, se co-digerito con 10% glicerolo e 10% di scotta, mostra un aumento della resa con valori di 47,2 e 65,4 ml H<sub>2</sub>/g VS, rispettivamente. Le rese incrementano fino ad un valore di 116 ml H<sub>2</sub>/g VS per la co-digestione del substrato contenente il 70% letame, 20% scotta e 10% glicerolo e di 128 ml H<sub>2</sub>/g VS per la mix letame e glicerolo (50:50)

Dalla tabella si può anche osservare che sebbene i test siano stati condotti in assenza di controllo del pH, i valori ottenuti alla fine della fermentazione sono ancora nel range ottimale della produzione di idrogeno, con i valori più bassi nelle mix di substrati a minore concentrazione o assenza del letame. Ciò conferma la capacità tampone di tale substrato (Weiland et. al, 2010)

In tabella 5 vengono presentati i risultati dei principali metaboliti (in mg/l) prodotti negli esperimenti a fine fermentazione.

Tabella 5. Metaboliti solubili prodotti a fine fermentazione (mg/l)

substrati	substrati (%)	lattico	formico	acetico	propionico	butirrico	1,3 propandiolo	etanolo
scotta, glicerolo	90:10	5	32	462	16	1794	15	0
letame, glicerolo	90:10	186	51	95	14	958	720	635
letame, scotta	10:90	44	20	108	50	1189	157	587
scotta, letame	50:50	19	34	331	27	1958	159	778
scotta, letame, glicerolo	33:33:33	59	145	498	29	1524	128	118
scotta, letame, glicerolo	20:70:10	57	121	302	54	1881	191	92
scotta, letame, glicerolo	70:20:10	21	55	318	283	1688	540	116

In tutti gli esperimenti la produzione di idrogeno avveniva tramite una fermentazione acido mista. Dalla tabella si può osservare che il *pathway* metabolico dominante era quello indirizzato alla produzione di acido butirrico. La sua concentrazione percentuale variava tra il 36 ed il 77%.

## Conclusioni

I processi di produzione di idrogeno sono stati fino ad ora studiati usando prevalentemente semplici zuccheri come il glucosio ed il saccarosio (Guo et al., 2010). La recente ricerca internazionale è orientata sia alla produzione di idrogeno da altri zuccheri derivanti dall'idrolisi della cellulosa ed emicellulosa (arabinosio, xilosio, cellobiosio) che a quella da substrati reali.

In tabella 6 vengono riportati i valori massimi di resa di produzione di idrogeno (ml H<sub>2</sub>/g VS) su substrati singoli e condizioni sperimentali (produzione in batch, con e senza pretrattamenti del substrato) confrontabili con i risultati di questa ricerca.

Tabella 6. Resa massima di produzione di idrogeno. I dati sono stati estratti da Guo et al., 2010

substrati	massima resa (ml H <sub>2</sub> /g VS)	pretrattamenti	temperatura (°C)	referenze
paglia di mais	68	1.5 Mpa 10 min	35	Li et al, 2007
paglia di frumento	66	1.2% HCl + 200°C 1 min	35	Datar et al, 2007
gambi di grano	150	0.2% HCl boiled 30 min	36	Zhang et al, 2007
insilato di erba	16	-	70	Karlsson et al, 2008
foglie di mais	42	130°C 30 min	70	Ivanova et al, 2009
crusca di riso	61	-	35	Noike et al, 2000
sorgo	32.4	130°C 30 min	70	Ivanova et al, 2009
canna da zucchero	19.6	130°C 30 min	70	Ivanova et al, 2009
paglia di grano	68	HCl 2% + microwave	36	Fan et al, 2006
crusca di grano	43	-	35	Noike et al, 2000
feci e urina bovina	29	-	60	Yokoyama et al, 2007
letame bovino	65	90°C 3h	52	Yokoyama et al, 2007
liquame bovino	53	-	45	Tang et al, 2008
letami misti	18	0.2% HCl boiled 30 min	36	Xing et al, 2010

Dal confronto si può osservare che i risultati conseguiti in questa attività di ricerca sono confrontabili con quelli della letteratura internazionale anche considerando che spesso i pretrattamenti hanno previsto l'uso di acidi o sono stati ottenuti in condizioni di termofilia (45-70 °C).

Inoltre da questi primi test di codigestione si evidenzia la reale possibilità di migliorare l'efficienza del processo di produzione di idrogeno dal letame e/o liquame con l'aggiunta di substrati quali scotta e glicerolo crudo. Risulta quindi fondamentale individuare la composizione ottimale della miscela di tali substrati, in modo da massimizzare la produzione di H<sub>2</sub>. Poichè esistono infinite combinazioni possibili, l'attività di ricerca proseguirà utilizzando il Disegno Sperimentale, un metodo statistico sulla base del quale impostare gli esperimenti, in modo tale che da un numero minimo di test è possibile calcolare la risposta del processo, al variare dei parametri, per tutte le combinazioni possibili.

Con il disegno sperimentale, si possono definire i valori ottimali delle variabili più importanti di un processo, valutare le interazioni tra le variabili, ottenere la massima informazione con il minimo costo (minor numero di esperimenti possibili, per la massima informazione), definire la zona stabile di un processo e costruire un buon set di calibrazione/validazione.

Si procederà pertanto all'uso del modello "*Mixture Design*" per ottimizzare la composizione % dei 3 substrati scelti (Prakasham et. Al., 2009). Ciò consente di ottenere un modello matematico predittivo che fornirà informazioni per tutte le combinazioni (miscele) possibili, individuando anche il valore ottimale.



## **2. Studio di processi di DA innovativi in grado di utilizzare Biomasse lignocellulosiche**

### **2.1 INTRODUZIONE**

La possibilità di utilizzare per le produzioni energetiche gli zuccheri contenuti nella parte strutturale o lignocellulosica (LC) delle piante, è divenuto argomento di grande interesse negli ultimi decenni, sul filone di quelle ricerche avviate dopo la crisi energetica degli anni '70, e che indaga sulla possibilità di produrre e/o utilizzare fonti energetiche in alternativa ai combustibili fossili. L'ipotesi è attraente dal momento che la fissazione fotosintetica mondiale del CO<sub>2</sub> è stata stimata con valori annui dell'ordine di  $1 \times 10^{11}$  tonnellate di materiale vegetale secco (Ljungdahl and Eriksson K-E., 1985; Saratale et al., 2008). Di tale enorme quantità, è effettivamente disponibile solo la Produzione Netta della Comunità, cioè quella frazione che non viene utilizzata negli ecosistemi e costituisce quindi un surplus nella produzione annuale.

Le attività agricole sono, per definizione, generatrici di tale surplus, principalmente di natura lignocellulosica: gli agroecosistemi infatti sono organizzati e gestiti al fine di incanalare e convertire l'energia solare il più possibile in prodotti commerciali, la cui lavorazione e consumo produce a sua volta una gran quantità di scarti LC. Per l'Italia, ad esempio, è stata stimata una produzione di scarti LC con valori nell'ordine di  $1 \times 10^6$  tonnellate di sostanza secca per anno (Boni et al., 2010) e tale quantità è in crescita.

Attualmente lo smaltimento degli scarti LC viene indirizzato per lo più verso: alimentazione zootecnica, valorizzazione energetica attraverso pirolisi o incenerimento, conferimento in discarica. Problemi sono generati dagli alti costi di trasporto, dal basso potere calorifico, dal fatto che non tutti i materiali sono idonei alla nutrizione animale. Inoltre il contenuto in umidità degli scarti pone dei limiti tecnici alle diverse modalità di produzione energetica ed insuccessi si registrano quando non si tiene conto di questo parametro.

Per tali motivi sono in corso numerosi studi sulla possibilità di convertire le biomasse in bioenergie mediante processi innovativi che coniugano sostenibilità economica e sostenibilità ecologica. Tra questi processi grande attenzione è rivolta alla produzione di biogas, idrogeno e metano, per via fermentativa. Tre sono i grandi vantaggi: il ridotto impatto sull'ambiente, l'economicità e la reperibilità delle materie prime, la parziale risoluzione del problema dello smaltimento dei rifiuti organici. Inoltre la disponibilità di tali materiali consente di pianificare i processi di conversione su lunghe scale dei tempi, con impianti dislocati a livello locale nei pressi delle aziende produttrici degli scarti senza costi aggiunti di trasporto.

Con il termine biomasse ligno-cellulosiche si definisce la biomassa vegetale che è composta da cellulosa, emicellulosa e lignina e che nelle piante terrestri contribuisce in maniera determinante nel supportarne la porzione aerea.

La composizione percentuale varia ampiamente ma in genere cellulosa ed emicellulosa, entrambi polisaccaridi, ne costituiscono i due terzi. Lignina ed emicellulosa, legano e proteggono la cellulosa, motivo per cui per poter disporre degli zuccheri esosi e pentosi potenzialmente utili per la produzione di biogas, il primo e indispensabile passaggio è l'idrolisi della biomassa. L'idrolisi generalmente comprende la pre-idrolisi e l'idrolisi vera e propria: con la pre-idrolisi viene rimossa la lignina mentre l'emicellulosa viene parzialmente idrolizzata. Con l'idrolisi della cellulosa si ottengono zuccheri ridotti fermentabili (Ren et al., 2009) da cui si possono ottenere idrogeno e acidi volatili, e da questi, per ulteriore fermentazione si ottiene metano ottimizzando il recupero di energia dalla biomasse LC (Zhu et al., 2008).



Nella utilizzazione delle biomasse lignocellulosiche per la produzione di bioenergie, la pre-idrolisi cioè la degradazione della lignina, è il processo limitante in quanto la sua complessa e eterogenea struttura la rende recalcitrante alla degradazione microbica.

Numerosi studi sono stati dedicati alla pre-idrolisi delle biomasse LC (generalmente riportata in letteratura con il termine "pretrattamento") utilizzando metodi fisici quali la *steam explosion* e/o chimici con acidi o basi forti o utilizzando complessi enzimatici commercialmente disponibili (Saratale et al, 2008). Il costo economico ed energetico, gli elevati impatti ambientali e i requisiti per la fattibilità tecnica dei trattamenti (ad esempio la *steam explosion* non è efficace per materiali con una elevata percentuale di umidità) rendono poco sostenibili tali processi e hanno indotto a riconsiderare percorsi "naturali" di mineralizzazione della sostanza organica.

In natura, infatti, la degradazione del materiale strutturale resistente delle pareti delle cellule vegetali è realizzata quasi esclusivamente da processi biologici (Swift, 1977) ed unicamente da microorganismi, quali funghi, batteri e lieviti.

La pre-idrolisi è stata studiata effettuando trattamenti delle biomasse in aerobiosi con funghi, principalmente funghi bianchi, per le loro ben note proprietà idrolitiche: essi infatti sono in grado di produrre enzimi extracellulari tra i quali ligninasi, glicosil idrolasi, beta-glucosidasi, Mn-perossidasi, mediante i quali vengono rilasciati monosaccaridi ed acidi grassi che successivamente sono utilizzati in processi fermentativi.. Poiché i funghi offrono il vantaggio di essere attivi anche in condizioni di bassa umidità, le colture possono essere allestite in assenza o quasi di acqua libera (Solid State Fermentation) piuttosto che in colture liquide (Liquid Fermentation).

Il limite principale dell'impiego dei funghi bianchi è dato dal fatto che al processo di produzione di biogas da LC è necessario anteporre uno stadio di idrolizzazione aerobico del substrato, aumentando i tempi di processo e aumentando la complessità degli impianti.

Meno studiato è il processo di pre-idrolisi, ad opera di batteri. I ceppi studiati provengono da ecosistemi aerobici ed anaerobici, terrestri ed acquatici. In particolare, in anaerobiosi, tramite l'uso di traccianti radioattivi, viene osservato che parte della lignina viene convertita in CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>, suggerendo l'azione di un consorzio microbico (Li et al., 2009).

L'idrolisi enzimatica della cellulosa e dell'emicellulosa è realizzata da enzimi cellulolitici prodotti sia da funghi che da batteri con produzione di oligosaccaridi e monosaccaridi. Molte ricerche sono ora rivolte verso batteri dotati di capacità idrolitiche e fermentanti. Sono infatti allo studio strategie alternative di produzione di biogas in cui l'idrolisi del substrato e la fermentazione sono realizzate in un unico stadio aprendo nuove potenzialità verso processi semplificati e quindi a minor richiesta energetica (Levin et al., 2009).

Altre ricerche hanno dimostrato che tra i Clostridi - batteri gram positivi anaerobi obbligati - sono compresi ceppi in grado di produrre cellulasi ed emicellulasi che consentono di ottenere rispettivamente cellobiosio dalla cellulosa e xilosio e xilobiosio dall'emicellulosa (Levin et al., 2009; Demain et al., 2005).

Questi studi hanno carattere di grande innovatività poiché quelli finora pubblicati, pur utilizzando reattori a diverse configurazioni e con varie strategie operative, vertono sulla produzione di idrogeno impiegando come substrati monosaccaridi e principalmente esosì. (Ren et al., 2011), quindi materiali di elevato valore economico. Proprio al fine di abbassare i costi e rendere commerciali le produzioni si mira allo *scaling up* di processo utilizzando scarti LC (Cheng et al., 2011; Levin et al., 2009; Saratale et al., 2008) anche se i principali problemi tecnici sono dati dalla eterogeneità dei materiali e dalla refrattarietà alla degradazione delle componenti strutturali del materiale LC.

Inoltre sempre più interesse viene rivolto ai pool microbici (autoctoni e alloctoni) piuttosto che a singoli ceppi dal momento che l'utilizzazione di scarti lignocellulosici eterogenei è più efficace in presenza di corredi enzimatici diversificati oltre che di forme multiple per ciascun enzima (Moon et al., 2011).

Liu et al. (2008) hanno osservato che *Clostridium thermocellum* JN4 è in grado di degradare la cellulosa microcristallina producendo idrogeno, etanolo, acido acetico ma la produzione di idrogeno incrementa di circa due volte e la resa passa da circa 0,8 a 1,8 moli H<sub>2</sub>/moli di glucosio se *C.thermocellum* è cresciuto in co-coltura con *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*.

Questi studi confermano che co-colture predefinite possono incrementare sinergicamente sia la velocità di conversione dei substrati sia le produzioni e le rese di H<sub>2</sub>. Lo sviluppo di "consorzi predefiniti" costituisce quindi un'area di ricerca molto promettente per la produzione di idrogeno e di biogas in genere.

In generale comunque gli studi sulla fermentazione di biomasse LC da parte di batteri vertono sulla selezione di pool batterici naturali e/o la realizzazione di consorzi artificiali testandone la versatilità metabolica e le caratteristiche di resistenza e resilienza dei *pathway* metabolici (rispettivamente la capacità di resistere alle variazioni di parametri di esercizio che si verificano nel corso delle produzioni mantenendo la funzione, e la capacità di tornare a funzionare dopo perturbazioni del sistema) (Li et al., 2007).

Sempre facendo ricorso ai processi che si realizzano in natura e che si sono evolutivamente consolidati su scale geologiche dei tempi, vengono recentemente pubblicate ricerche che mirano alla produzione di biogas utilizzando consorzi ruminanti e/o ambienti di fermentazione analoghi. I ruminanti infatti traggono energia dall'utilizzo di materiali LC che vengono degradati da una comunità microbica composta da batteri, funghi e protozoi coesistenti in ambiente strettamente anaerobio (Chang 2010; Chaucheyras-Durand 2010) ed al contempo nel rumine vengono prodotti H<sub>2</sub> e metano.

Moon et al., 2011 hanno rilevato che un ceppo batterico ruminale *Ruminococcus albus* 8 è in grado di metabolizzare cellulose ed emicellulosa, e gli autori ne sottolineano l'importanza per le sue applicazioni nella depolimerizzazione nelle pareti delle cellule vegetali.

Come detto precedentemente, studi e ottimizzazione dei processi di produzione biologica di H<sub>2</sub> sono stati finora svolti principalmente utilizzando glucosio monosaccaridi e principalmente glucosio come substrato. Tuttavia, la capacità dei microrganismi di utilizzare esosi (glucosio, galattosio e mannosio), pentosi (xilosio e arabinosio), e disaccaridi diversi (cellobiosio e xilobiosio) ottenuti per idrolisi della biomassa vegetale, può aumentare significativamente l'efficienza energetica del processo. Secondo le nostre conoscenze, solo pochi studi si sono concentrati sulla produzione di idrogeno da fermentazione degli zuccheri pentosi derivanti dall'idrolisi dell'emicellulosa (Niu et al., 2010; Ren et al., 2009). Inoltre, la produzione di idrogeno per via fermentativa da xilosio, arabinosio e cellobiosio finora è stata studiata principalmente utilizzando batteri anaerobi obbligati, appartenenti al genere *Clostridium*, e fanghi che sono dominati da specie *Clostridium* (Jayasinghearachchi et al., 2010; Li et al., 2008). L'uso di batteri anaerobi obbligati richiede un'efficiente manutenzione di un'atmosfera anaerobica. Questo rende l'utilizzo di batteri anaerobi facoltativi nei processi fermentativi più vantaggioso rispetto ai batteri strettamente anaerobi, dal momento che i primi sono meno sensibili alla presenza di ossigeno (Seol et al., 2008).

Alla luce di queste considerazioni lo studio ha avuto le seguenti finalità:

1. promuovere il processo di idrolisi di rifiuti reali (residui vegetali), a bassa temperatura (28°C) senza l'utilizzo di pretrattamenti, usando come inoculo tre singoli ceppi batterici anaerobi facoltativi, precedentemente selezionati e un consorzio artificiale dei tre ceppi. Sono state confrontate le capacità idrolitiche dei ceppi selezionati e del consorzio con quella della microflora naturalmente presente sui residui stessi.
2. analizzare l'effettiva capacità dei singoli ceppi batterici di utilizzare i prodotti di idrolisi della cellulosa e dell'emicellulosa (glucosio, xilosio, arabinosio e cellobiosio) per la produzione di idrogeno.

## 2.2 ATTIVITÀ SVOLTA

### 2.2.1 Idrolisi di Rifiuti Vegetali



Fig. 13. Gli scarti utilizzati.

Il substrato utilizzato è costituito da residui vegetali freschi provenienti dalla mensa dell' ENEA C.R. della Casaccia: scarto della pulitura di insalata mista (V) e di insalata mista e patate (VP).

Questi scarti sono prodotti giornalmente e provengono dalla prima fase di lavorazione del cibo all'interno della mensa. I Solidi Totali (TS) e i Solidi Volatili (VS) sono stati determinati secondo le metodiche standard, sono risultati rispettivamente 5.76% e 4.71% per V; 8.39% e 7.28% VP.

#### Microorganismi e Metodologie di Coltivazione

I ceppi, utilizzati nel presente studio, sono stati precedentemente isolati da rifiuti vegetali non pretrattati della stessa origine di quello utilizzato in questo studio: *Buttiauxella* sp.4 (Accession n° FJ587224.1) e *Rahnella* sp.10 (Accession n° FJ587227.1) sono stati ottenuti da V, mentre *Raoultella* sp.47 (Accession n° FJ587229.1) è stato isolato da VP (Marone et al, 2010). Questi ceppi appartengono alla famiglia delle Enterobacteriaceae i cui membri sono noti per la loro capacità di produzione H<sub>2</sub>. Nel corso di studi precedenti, effettuati nei nostri laboratori, i tre ceppi sono stati caratterizzati e stabiliti come potenziali produttori di H<sub>2</sub> per la prima volta. Questi batteri sono chemiorganotrofi, anaerobi facoltativi, in grado di crescere in condizioni di microaerofilia, su terreni di coltura contenenti una concentrazione di sali minerali minima e utilizzare una vasta gamma di fonti di carbonio (*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*) dimostrando una elevata versatilità metabolica. Il vantaggio di usare questi ceppi risiede proprio nella loro capacità di crescere sia in ambienti anaerobici che aerobici, pertanto non richiedono un efficiente controllo attivo di un'atmosfera rigorosamente anaerobica. Al contrario, la ricerca internazionale sulla produzione di idrogeno è per la maggior parte focalizzata sull'utilizzo di ceppi batterici anaerobi obbligati appartenenti alla famiglia delle *Clostridiaceae*.

*Buttiauxella* sp. 4, *Rahnella* sp. 10 e *Raoultella* sp. 47 sono stati riattivati in un terreno di attivazione (TA) con la seguente composizione (g/l): glucosio 20; peptone 4; NaCl 3; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1, L-cisteina HCl • 7 • H<sub>2</sub>O 0,5; FeSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O 0,1; MGM<sub>2</sub> 0,1; come riportato da Pan et al. (2008). Le colture, dopo essere state incubate al buio, in un bagnetto termostato, ad una temperatura di a 28°C, con agitazione a 120 giri al minuto, per 24 ore, sono state usate come inoculi a concentrazione cellulare uniforme (OD<sub>600</sub>).



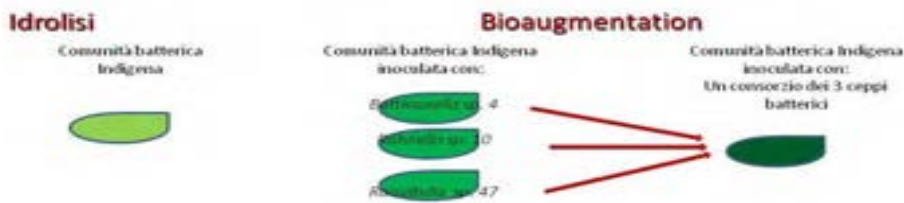
#### Esperimenti di idrolisi

Fig 14. Test di idrolisi

Gli esperimenti sono stati effettuati in bottiglie da siero da 125 ml con un volume di lavoro di 25 ml. I substrati vegetali sono stati sminuzzati e diluiti con tampone fosfato 0,1 M (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), pH 6,70, con un rapporto finale di 0,4 w/v. Le bottiglie, chiuse con un tappo in gomma bloccato da una ghiera metallica, insufflate per 2 min con azoto puro, inoculate al 10% v/v, sono state poste in bagnetto termostato a 28°C, con agitazione a 120 rpm. La concentrazione degli zuccheri ridotti (glucosio, xilosio, arabinosio e cellobiosio) rilasciati dopo

l'idrolisi e saccarificazione batterica delle biomasse cellulosiche è stata determinata periodicamente, durante il corso degli esperimenti, tramite analisi HPLC.

**1° esperimento: idrolisi rifiuti vegetali**



**Risultati**

L'analisi della concentrazione degli zuccheri ridotti (glucosio, xilosio, arabinosio e cellobiosio) rilasciati in soluzione durante il corso degli esperimenti ha evidenziato l'attuarsi di un efficace processo di idrolisi e saccarificazione delle biomasse cellulosiche ad opera dei microrganismi coinvolti. Si osservano notevoli differenze nei tempi di rilascio in soluzione e nelle concentrazioni dei diversi zuccheri dovute sia alla diversa tipologia di substrato che ai diversi inoculi utilizzati.

In generale per tutte le condizioni sperimentali testate è stato osservato un rapido rilascio di glucosio e xilosio (dopo 4 ore si ha già la massima concentrazione in soluzione), mentre l'arabinosio viene rilasciato più lentamente raggiungendo la massima concentrazione in soluzione solo alle 20 ore (figura 15). Il cellobiosio, invece è stato rilevato solo in piccole quantità. Ciò potrebbe indicare l'assenza di enzimi cellosolitici nella microflora fermentante o più probabilmente che il cellobiosio, ottenuto attraverso l'idrolisi della cellulosa, è stato rapidamente idrolizzato a glucosio. Per tutti gli inoculi testati sono state rilevate maggiori concentrazioni dei prodotti di idrolisi per il substrato V, costituito unicamente da scarti di insalata. Tale risultato potrebbe indicare che la microflora esaminata, possiede gli enzimi idrolitici necessari per degradare cellulosa ed emicellulosa ma non quelli adatti alla degradazione dell'amido, presente nelle bucce di patata.

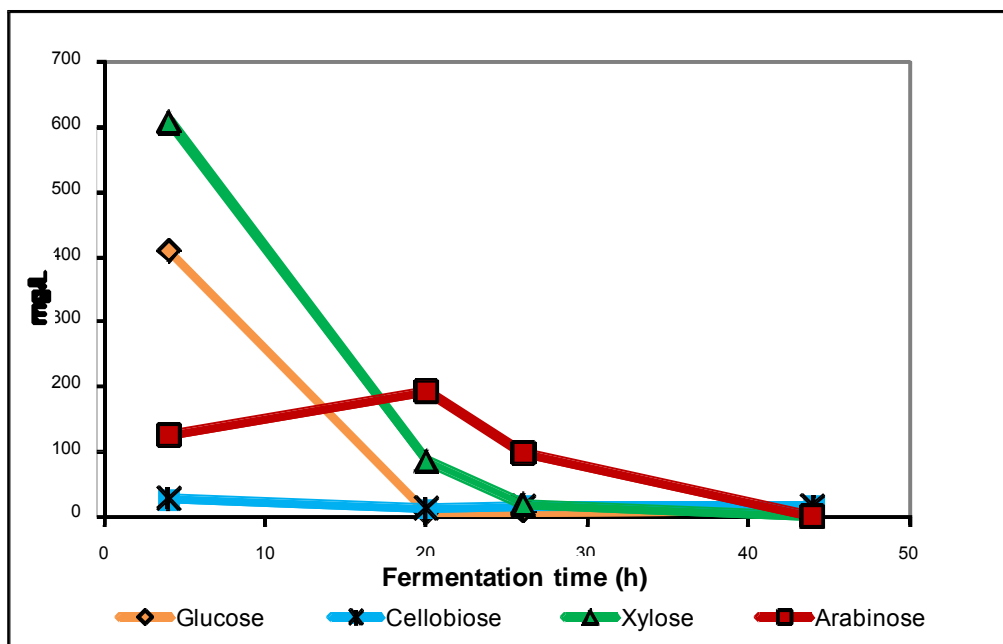


Fig. 15. Profilo temporale dei prodotti di idrolisi del rifiuto vegetale: glucosio, xilosio, cellobiosio, arabinosio. Viene riportato come esempio il caso del consorzio microbico sul substrato VP; queste cinetiche e trends sono analoghe per tutti gli esperimenti effettuati.

In relazione all'efficienza di utilizzo dei diversi prodotti di idrolisi si può osservare in figura 15 che il glucosio e lo xilosio vengono rapidamente consumati (entro le prime 20 ore di incubazione), mentre l'utilizzo dell'arabinosio avviene solo dopo le 20 ore di incubazione. La fermentazione dell'arabinosio richiede molteplici enzimi, implica quindi reazioni biochimiche relativamente complesse (Li et al, 2008). In ogni caso, in tutte le condizioni sperimentali, al termine degli esperimenti (44 ore), tutti gli zuccheri sono stati completamente consumati (figura 15 e figura 16) e *Buttiauxella sp. 4* è il ceppo che ha mostrato le migliori prestazioni cellulolitiche (figura 16). Infatti per questo inoculo, la massima concentrazione di glucosio rilevata in soluzione è stata di 2,5 g/l per il substrato V e 2 g/l per il substrato VP, mentre la concentrazione di glucosio, negli altri esperimenti, è variata da 0,02 a 0,9 g/l nel il substrato V e da 0,14 a 0,4 g/l nel substrato VP. Il consorzio ha esibito la seconda miglior performance cellulolitica con entrambi i substrati (concentrazione di glucosio in soluzione pari a 0,9 g/l per V e 0,4 g/l per VP), probabilmente a causa del contributo del ceppo *Buttiauxella sp. 4* all'interno del consorzio.

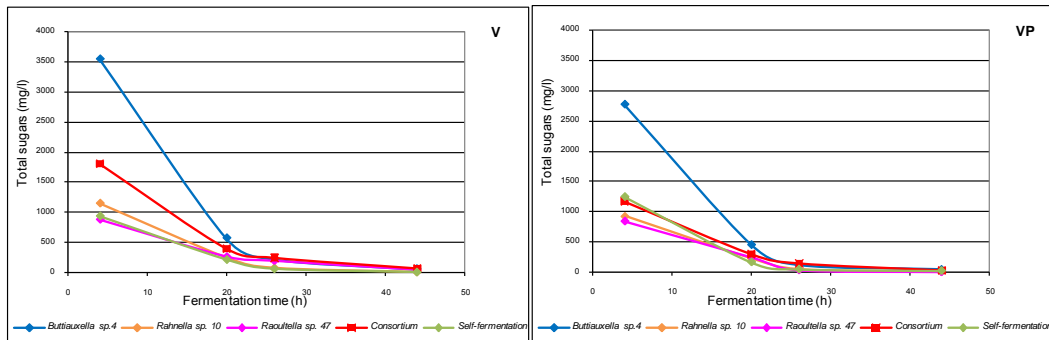


Fig. 16. Consumo dei carboidrati totali rilasciati dall'idrolisi dei rifiuti vegetali V e VP ad opera dei diversi inoculi utilizzati.

## 2.2.2 Produzione di idrogeno dai prodotti di idrolisi di cellulosa ed emicellulosa

Esperimenti in batch sono stati effettuati al fine di caratterizzare il metabolismo del processo fermentativo dei tre ceppi batterici selezionati, *Rahnella sp.10*, *Raoultella sp.47* e *Buttiauxella sp.4*, ed utilizzati nel precedente studio (paragrafo 2.2.1) utilizzando come fonti nutritive lo xilosio e l'arabinosio (pentosi) e il cellobiosio (esoso-.dimero), costituenti principali dei rifiuti agricoli, agroindustriali e orticoli.

I tre ceppi, in precedenti studi, sono stati selezionati e arricchiti e ne è stato caratterizzato il metabolismo fermentativo utilizzando il glucosio come substrato [Marone et al, 2010], per questo motivo il glucosio non è stato utilizzato in questo studio. Nel corso delle precedenti ricerche è stato inoltre studiato l'effetto della concentrazione iniziale del substrato (1, 5 e 10 g/l di glucosio) sulla produzione di idrogeno dei tre ceppi batterici, *Buttiauxella sp. 4*, *Rahnella sp. 10* e *Raoultella sp. 47*. I risultati hanno mostrato che aumentando la concentrazione di glucosio diminuiva l'efficienza di conversione (mol H<sub>2</sub>/mol glucosio) e si otteneva un concomitante accumulo di acido lattico: la produzione di tale metabolita non comporta evoluzione di H<sub>2</sub> e contemporaneamente contribuisce all'abbassamento del pH del mezzo di coltura, inibendo il processo fermentativo. Tuttavia, a concentrazioni intermedie di glucosio (5 g/l), è stata ottenuta una maggiore concentrazione di idrogeno (%) nel biogas. Questi risultati ci hanno guidato ad eseguire gli esperimenti di produzione di idrogeno potenziale su xilosio, arabinosio e cellobiosio alla concentrazione di 5 g/l.

Lo studio è stato effettuato in mesofilia ad una temperatura di 28°C. Nella maggior parte delle ricerche condotte in mesofilia viene utilizzata la temperatura di 36-37 °C mentre in condizioni di termofilia, le temperature superano valori di 50°C.

Esperimenti in batch



Fig. 17. Esperimenti in batch.

I tre ceppi batterici, prima di essere inoculati nei batch contenenti i vari substrati in esame, sono stati cresciuti su terreni specifici di attivazione (TA), secondo la metodologia precedentemente descritta.

I test di produzione con i singoli ceppi sono stati effettuati in bottiglie da siero da 125 ml sterili, contenenti terreno Base per la Fermentazione, BFM, composto da (g/l): peptone 3; estratto di lievito 1, L-cisteina HCl • H<sub>2</sub>O 0,5; FeSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O 0,1; MgM<sub>2</sub> 0,1; 10ml di una soluzione di Sali minerali (contenente 0,01 g / l MnSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O ; 0,05 g / l ZnSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O 0,01 g / l H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 0,01 g / l CaCl<sub>2</sub> • 2H<sub>2</sub>O; 0,01 g / l Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>; 0,2 g / l CoCl<sub>2</sub> • 6H<sub>2</sub>O; 0,01 g / l AlK (SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> • 12H<sub>2</sub>O 0,001 g / l NiCl • 6H<sub>2</sub>O) e 5ml di una soluzione di vitamine (contenente 0,01 g / l cobalamina, 0.025g / l di vitamina C; 0.025g / l riboflavina; 0,02 g / l di acido citrico;



0,05 g / l piridossale; 0,01 g / l folico acido; 0.025g / l creatina) disciolti in 1L di soluzione tampone, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, (concentrazione finale 0,1 M pH 6,70) (Pan et al, 2008). Il terreno veniva sterilizzato in autoclave (121 °C per 15 minuti) mentre i sali minerali, le vitamine e le fonti di carbonio (xilosio, arabinosio e cellobiosio), precedentemente preparati in stock e filtrati con filtri 0,22 µm, venivano aggiunti successivamente. Le bottiglie erano chiuse con un tappo in gomma bloccato da ghiera metallica, insufflate per 2 minuti con azoto puro, inoculate, in rapporto 1%, con cellule batteriche pre-attivate ed incubate a 28 °C in bagnetto termostato, al buio con agitazione a 120 rpm. Ad intervalli di tempo regolari sono stati misurati il pH del liquido di coltura ed i prodotti della fermentazione, liquidi (HPLC) e gassosi (GC). Tutti i test sono stati effettuati in modo indipendente in triplice replica.

**Risultati**

I tre ceppi considerati mostrano una resa di produzione di idrogeno (moli H<sub>2</sub>/moli di substrato o mmoli H<sub>2</sub>/L) su xilosio e cellobiosio comparabile ai più recenti risultati internazionali (Tabella 7). In particolare *Rahnella sp.10*, un microorganismo finora mai caratterizzato come produttore di idrogeno, mostra una elevata versatilità. La sua produzione di idrogeno ha le rese più elevate, rispetto ad *Buttiauxella sp.4* e *Raoultella sp. 47*, su arabinosio e xilosio con rese di 1.27 e 1.3 moli H<sub>2</sub>/moli di substrato, rispettivamente. Inoltre è l'unico che produce idrogeno su arabinosio, consumando tutto il substrato. Un altro parametro molto importante per valutare l'efficienza è la percentuale di idrogeno nel biogas. Ancora in *Rahnella sp.10* si osservano i valori più elevati con il 42%, il 46% e il 38% su xilosio, cellobiosio e arabinosio, rispettivamente.

Tabella 7. Rese di produzione di idrogeno in esperimenti batch utilizzando come fonti nutritive lo xilosio e l'arabinosio (pentosi) e il cellobiosio (esoso-.dimero).

Substrati	Inoculo	Temp (°C)	moliH <sub>2</sub> /moli substrato	Bibliografia
Xilosio	<i>Paenibacillus polymixa</i>	39	0.51	Marwoto et al, 2003
	Mix	36	1.92-2.25	Chi-Yue Lin et al, 2005
	<i>Enterobacter aerogenes</i> HGN-2	37	1.98	Jayasingharachchi et al, 2009
	<i>Clostridium tyrobutyricum</i> ATTC25755	37	0.77	Zhu and Yang (2004)
	<i>Clostridium butyricum</i> CGS5	37	0.77	Lo et al, 2008
	<i>Enterobacter doacae</i> IT-BT08	36	0.95	Kumar e Das, 2000
	<i>Buttiauxella sp.4</i>	28	1.17	Questo studio
	<i>Rahnella sp.10</i>	28	1.30	Questo studio
	<i>Raoultella sp. 47</i>	28	1.19	Questo studio
Cellobiosio	<i>C. thermocellum</i>	50	1.13	Levin et al, 2006
	Mix	35	2.19	Adav et al, 2008
	<i>Cl. acetobutylicum</i>	30-37	52±3 mmol <sup>-1</sup>	Z. Ren et al, 2007
	<i>Cl. cellulolyticum</i>	30-37	40±6 mmol <sup>-1</sup>	Ren et al, 2007
	<i>Cl. cellobioparum</i>	30-37	42±3 mmol <sup>-1</sup>	Ren et al, 2007
	<i>Cl. celerescens</i>	30-37	38±0 mmol <sup>-1</sup>	Ren et al, 2007
	<i>Buttiauxella sp.4</i>	28	24.6 mmol/L	Questo studio
	<i>Rahnella sp.10</i>	28	34 mmol/L	Questo studio
	<i>Raoultella sp. 47</i>	28	43.2 mmol/L	Questo studio
Arabinosio	Fanghi	37	1.98	Danko et al, 2008
	Fanghi	37	0.09	Abreu et al, 2008
	<i>Buttiauxella sp.4</i>	28	0.11	Questo studio
	<i>Rahnella sp.10</i>	28	1.27	Questo studio
	<i>Raoultella sp. 47</i>	28	0.01	Questo studio

Analizzando i

metaboliti a fine fermentazione si riscontrano differenze nelle vie metaboliche: la via metabolica "ethanol type" nella quale l'acetato e l'etanolo sono i prodotti metabolici a maggior concentrazione sembra essere la via metabolica comune a *Rahnella sp.10* e *Raoultella sp. 47*, mentre in *Buttiauxella sp.4* si riscontra una fermentazione Acido Mista.

Per il cellobiosio è presente, come descritto in letteratura per le *Enterobacteriaceae* sul substrato glucosio, la via della formato liasi.



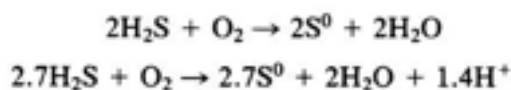
## 3. Studio e sperimentazione di metodi biologici per la purificazione del biogas

### 3.1 INTRODUZIONE

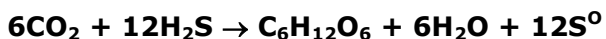
Il più problematico inquinante gassoso presente nel biogas prodotto per DA è l'H<sub>2</sub>S: infatti i batteri che utilizzano composti ossidati dello zolfo come accettori di elettroni sono ubiquitari e fortemente competitivi con i metanogeni per gli stessi donatori di elettroni.

Pertanto è estremamente difficile risolvere il problema a monte se un impianto è alimentato con scarti industriali e biomasse di varie provenienze mentre lo è se il materiale da convertire è unico e non contiene alcun composto dello zolfo in partenza.

Per ridurre le percentuali di zolfo ridotto presente nel biogas, gli impianti tradizionali usano in genere un processo biologico chemiosintetico microaerofilo in cui opera la specie batterica *Beggiatoa alba* che ha la capacità di ossidare lo zolfo secondo la reazione:



Non ci sono invece riscontri sul possibile utilizzo della fotosintesi anossigenica che avviene secondo la reazione di seguito riportata:



Questo è un processo ben noto in natura soprattutto in zone termali dove le continue emissioni di H<sub>2</sub>S alimentano reti trofiche ricche e spesso complesse. In particolare questo fenomeno è particolarmente rilevante in alcune zone oceaniche profonde dove la luce arriva a bassissime intensità e l'unica fonte di energia trasformabile in biomassa è quella chimica dell' H<sub>2</sub>S.

E' probabile che non si sia ancora pensato ad un'applicazione industriale di questo processo in quanto necessita di illuminazione a particolari lunghezze d'onda che fino ad ieri erano difficili e costose da realizzare, ma oggi si possono ottenere facilmente con una combinazione di led monocromatici ed un consumo energetico minore.

### 3.2 ATTIVITÀ SVOLTA E RISULTATI OTTENUTI

E' stata svolta un'indagine bibliografica e con interviste dirette di alcuni microbiologi specialisti di batteri fotosintetici per valutare quali fossero i più idonei per la nostra sperimentazione e la scelta si è indirizzata ad alcuni componenti delle famiglie dei "green and purple sulphur bacteria".

L'indagine bibliografica ha messo in evidenza che la letteratura su tale argomento è abbastanza scarsa e che i principali lavori prodotti sull'ecologia di tali batteri sono degli anni '60 e '70. Di recente le tecniche molecolari applicate alla tassonomia hanno consentito una più accurata classificazione di questi microrganismi ed una maggiore conoscenza della loro fisiologia

I "green sulphur bacteria" (Phylum *Chlorobi*) è una famiglia di batteri fotosintetici anaerobi obbligati. Sono generalmente di forma sferica, bastoncellare e spirale e privi di motilità propria. Sono dotati di batterioclorofille *a*, *c*, *d* ed *e* ed usano ioni solfuro come donatori di elettroni. Questi vengono poi ossidati come zolfo elementare e depositati all'esterno delle

cellule. Si riscontrano in ecosistemi acquatici anaerobici illuminati e stratificati, sia in colonna d'acqua che nei sedimenti. Una loro peculiare caratteristica ecologica è la capacità di vivere a bassissime intensità luminose dove nessun altro organismo fotosintetico sopravviverebbe, sono smo respiratorio o fermentativo.

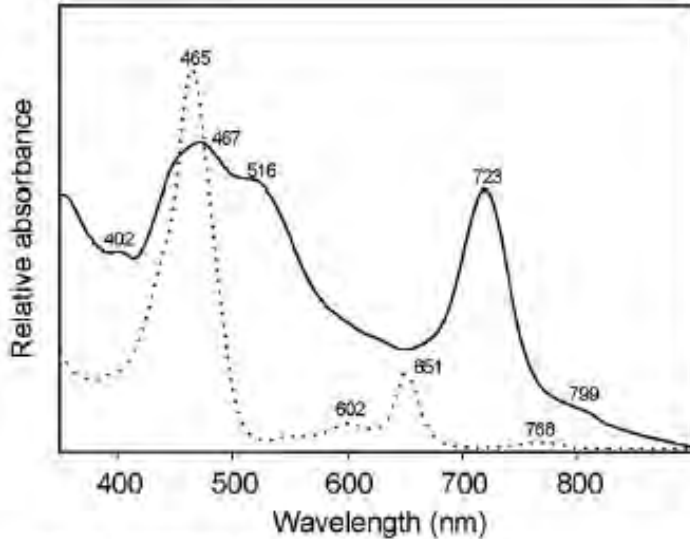


FIG. 5. Absorption spectra of whole cells (—) and acetone pigment extracts (· · · · ·) of the enrichment culture of phyloptype BS-1, grown at 0.1  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Fig. 18- immagine tratta da Manske et.al, Dec.2005

I "purple sulfur bacteria" sono un gruppo di batteri fotosintetici anaerobi o microaerofili che convertono gli ioni solfuro (donatori di elettroni) e depositano granuli di zolfo elementare all'interno delle cellule (che assumono un caratteristico colore rosso da cui *Chromatiaceae*) o all'esterno (*Ectothiorhodospiraceae*). Si trovano generalmente nelle colonne d'acqua di ambienti illuminati ed anossici dove si accumula l' $\text{H}_2\text{S}$  prodotto negli strati più profondi. L'idrogeno solforato può essere prodotto sia da processi biologici (es. solfato riduzione

atterica; vedi ad esempio lagune vertrofiche) che geochimici (es. sorgenti sulfuree superficiali e profonde).

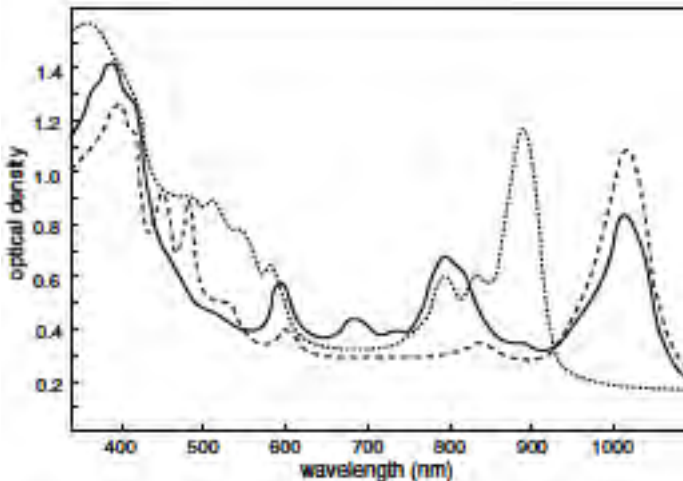


Fig. 6. Absorption spectra of chromatophore suspensions of *Halorhodospira halochloris* (—), *Halorhodospira halophila* (.....) and *Blastochloris sulfoviridis* (---).

g. 19 - Immagine tratta da Imhoff 2006

na importante informazione di carattere *reen sulphur bacteria*. Questi possono svilupparsi bene in un terreno contenente circa 100 ppm di solfuri, mentre i *purple* tollerano una concentrazione massima di 20 ppm. Tenendo in considerazione questa importante differenza si sono selezionate 4 specie batteriche su cui condurre la sperimentazione. 2 "green"

*Chlorobium limicola* (245T-DSMZ) e *Chlorobium phaeovibrioides* (267-DSMZ) e 2 "purple" *Marichromatium purpuratum* (1711-DSMZ), *Halochromatium salexigens* (4395-DSMZ)

Apparato sperimentale

Per effettuare le sperimentazioni con i batteri fotosintetici è stato necessario progettare e realizzare 2 fotobioreattori a colonna.



I fotobioreattori sono stati realizzati con tubi in plexiglass di cm 100x14 dotati di supporto di base e tappi di chiusura a tenuta di liquidi e di gas. L'apparato di illuminazione è stato realizzato con 3 serie di led monocromatici distribuiti all'interno di una superficie esagonale che viene disposta all'esterno del fotobioreattore. Il sistema di illuminazione è in grado di modulare la luce in frequenza ed intensità.

Gli esperimenti saranno condotti con i 4 batteri fotosintetici selezionati, variando le concentrazioni dell'H<sub>2</sub>S e la frequenza ed intensità della luce applicata.

*Fig. 20. Fotobioreattore a colonna per la sperimentazione dei batteri fotosintetici anossigenici.*

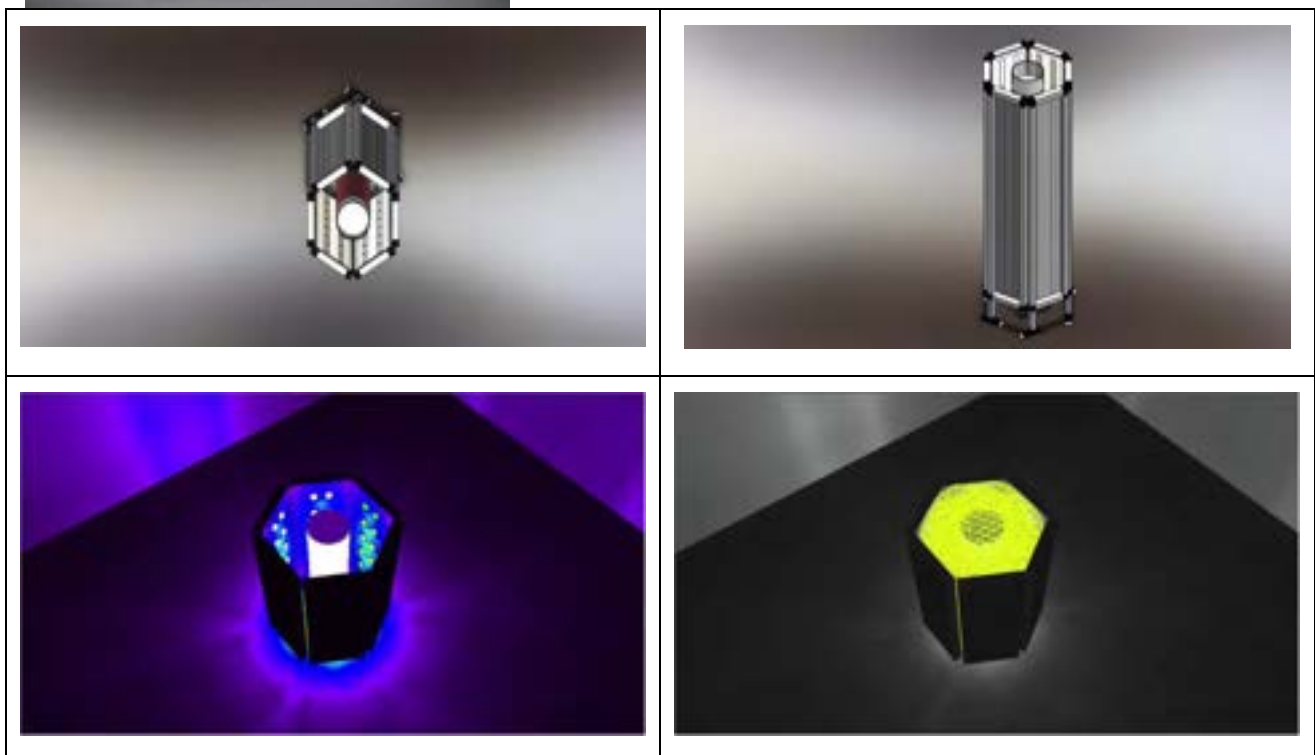


Fig.21 immagini del sistema di illuminazione multispettrale

## **4 Analisi dei problemi connessi con la gestione del digestato e con la riduzione della componente azotata dello stesso**

### **4.1 INTRODUZIONE**

L'applicazione della Direttiva Nitrati (91/676/CEE) limita la possibilità di un uso agronomico del digestato derivante da impianti di trattamento di reflui zootecnici e pone quindi dei vincoli alla diffusione di questi impianti di valorizzazione energetica dei reflui stessi.

L'utilizzo agronomico del digestato costituisce tuttavia la via preferenziale per questo sottoprodotto della digestione anaerobica, perché offre una serie di vantaggi:

- viene completamente recuperato sia il valore fertilizzante, costituito da nutrienti quali azoto e fosforo, sia quello della componente carbonica, che costituisce la frazione più rilevante del materiale, e che contribuisce validamente all'incremento della fertilità del suolo; coniugato questo con la presenza di micronutrienti e fattori di crescita che hanno da sempre privilegiato l'uso dei fertilizzanti e degli ammendanti organici rispetto a quelli minerali
- si ottiene un rilevante risparmio energetico rispetto a sistemi di purificazione spinta, che per raggiungere i limiti richiesti per lo scarico in acque superficiali richiederebbe costi di investimento ingenti e consumi di energia e materie prime assolutamente incompatibili con la corretta gestione dei reflui; sempre che tale depurazione spinta sia realmente raggiungibile in modo stabile e in ogni stagione
- il carbonio organico fornito ai terreni costituisce una forma di *carbon sink* di rilevante importanza, dato che lo stesso viene fissato per lungo tempo nell'humus.

Fatte queste premesse, il problema dell'utilizzo del digestato è stato esaminato nei due aspetti tecnici e normativi, al fine di giungere ad indicazioni valide per la proposta di tecnologie innovative valide e sostenibili.

### **4.2 ATTIVITÀ SVOLTA E RISULTATI OTTENUTI**

L'attività svolta è essenzialmente di carattere prevalutativo, ed ha portato all'analisi della situazione nazionale in termini tecnici e normativi.

L'analisi degli aspetti normativi assume particolare importanza perché la mancata definizione dell'accettabilità di questo materiale o la sua inclusione nella normativa sui rifiuti vanificherebbe gli sforzi per la ricerca di soluzioni tecniche adeguate.

#### **4.2.1 Aspetti tecnici**

Durante la digestione anaerobica avvengono profonde trasformazioni della composizione e della reologia del materiale in ingresso, tanto che il prodotto finale differisce sostanzialmente da quello in entrata nel reattore.

La componente carbonica del materiale in ingresso viene trasformata in biogas con un'efficienza elevata, dipendente solo dalla eventuale presenza di composti refrattari, quali polimeri a catena lunga, o frazioni, pure digeribili, legate a componenti che impediscono la penetrazione ottimale dei batteri idrolitici.

Nel digestato quindi si riduce la componente carbonica, con la conseguenza che l'effetto di *carbon sink* è inferiore a quello del materiale in ingresso, almeno nel breve periodo; tuttavia le

modificazioni introdotte permettono una maggiore stabilità del materiale, e una sua più facile utilizzabilità.

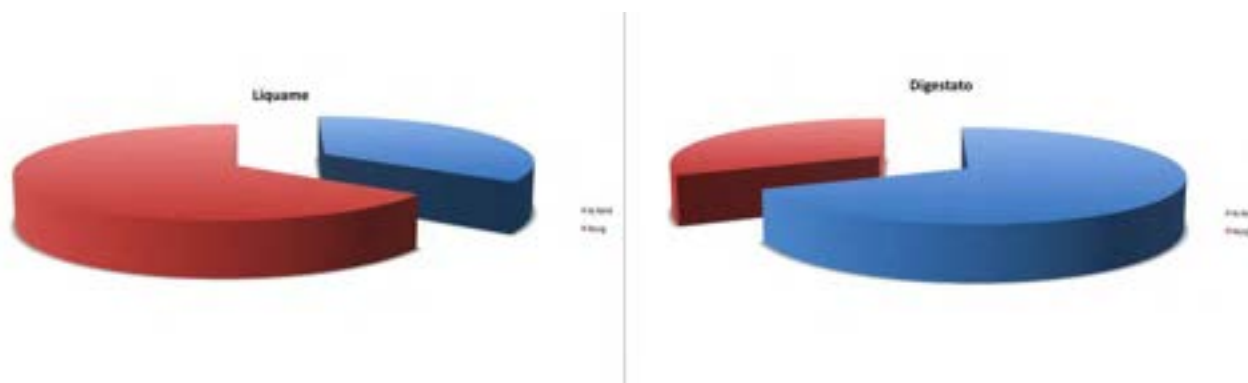
In particolare è più semplice una separazione solido/liquido, mentre l'idrolisi delle catene lunghe rende il materiale più facilmente pompabile e distribuibile sui campi.

Se è certo che la frazione trasformata in biogas è da considerarsi "persa" ai fini del sequestro nel suolo, tuttavia entra comunque positivamente nel ciclo complessivo della CO<sub>2</sub>, perchè il gas combustibile viene utilizzato in sostituzione di combustibili fossili, e contribuisce quindi alla riduzione delle emissioni climalteranti.

L'effetto di stabilizzazione della sostanza organica e la più facile distribuzione del materiale rendono più semplice e più conveniente, riducendo al contempo l'impatto ambientale, il reale e certo utilizzo nella coltivazione dei campi.

Le frazioni non carboniche non vengono in alcun modo ridotte quantitativamente dal processo, ma subiscono trasformazioni nella loro forma chimica che risultano interessanti ai fini dell'utilizzo agronomico.

In particolare l'azoto nitrico viene prevalentemente trasformato in forma ammoniacale, o resta catturato in forma organica.



**Figura 22 Trasformazione dell'azoto in digestione anaerobica**

I nitrati migrano rapidamente nei terreni, mentre l'azoto in forma ammoniacale resta maggiormente fissato dalle particelle del terreno, con il risultato che, con una fertilizzazione a base di digestato, si ottiene una maggiore crescita delle piante unita a un minor rischio di contaminazione delle acque sotterranee.

Tutto il fosforo contenuto nel substrato d'ingresso permane nell'effluente, ed è quindi utilizzabile con finalità fertilizzanti.

Nella tabella che segue, elaborazione ENEA e CRPA, sono riportati i valori dei principali componenti di interesse per l'uso agronomico.

Parametro	Unità di misura	Digestato suino	Digestato da biomassa	Digestato bovino + biomassa
Solidi totali	% tq	1,5 - 3	6 - 9	4 - 6
Solidi Volatili	% ST	48 - 59	60 - 70	60 - 70
Azoto totale	g/kg t.q	3 - 4	2,5 - 5	3 - 4
Azoto ammoniacale	% N tot	70 - 80	50 - 65	60 - 70
Fosforo totale	g/kg t.q.	0,7 - 1,1	0,4 - 0,7	0,4 - 0,7

Tab. 8

Un altro vantaggio fondamentale della digestione anaerobica è il miglioramento delle caratteristiche di separabilità del digestato. Questo può infatti essere trattato con macchine centrifughe o con nastropresse, fino ad ottenere due frazioni.

La frazione liquida ha concentrazioni d'azoto dell'ordine del 0,2%, gran parte del quale, dal 70 all'85%, in forma ammoniacale; presenta anche interessanti concentrazioni ( da 100 a 250 ppm ) di fosforo, e discrete concentrazioni di potassio ( 0,2 - 0,4%); essendo liquido, può facilmente essere distribuito sui campi per fertirrigazione.

Anche la frazione solida ha un notevole interesse agronomico, ma in questo caso il potere è essenzialmente ammendante; si tratta comunque di un materiale che ha caratteristiche fertilizzanti nettamente superiori a quelle del compost di qualità; un interessante applicazione, sempre legata al mondo agricolo, è l'impiego come lettiera per bovine da latte, che mostrano di gradire notevolmente questo materiale, preferendolo alla paglia o ad altri prodotti sostitutivi.

L'utilizzo agronomico del digestato, sia tal quale, sia dopo separazione solido/liquido è una pratica decisamente frequente nei vari Stati membri dell'UE.

Alcune problematiche sono:

1. Alto contenuto di azoto ammoniacale e pH elevato che rendono il digestato soggetto perdite di ammoniaca per volatilizzazione;
2. Nella distribuzione è importante un buon interrimento per diminuire le perdite in N;
3. La presenza di azoto organico complica la dinamica dell'azoto nel suolo (immobilizzazione e accumulo);
4. Elevata variabilità temporale nella concentrazione di nutrienti per le diverse razioni adottate, che determina il ricorso ad analisi chimico-fisiche (anche con metodi rapidi e poco costosi) prima del calcolo delle dosi di distribuzione.

Per i motivi citati ai punti 1 -3 si ricorre a sistemi di interrimento specializzati, del tipo di quelle illustrate nelle figura seguenti



Figura 23; Distribuzione del digestato in Danimarca





Figura 24; Distribuzione del digestato in Lombardia

Interessanti sono gli effetti della digestione anaerobica su alcuni aspetti potenzialmente negativi della distribuzione agronomica.

Si riscontra infatti una forte riduzione delle emissioni olfattive, fattore di notevole rilievo ai fini dell'accettabilità dell'utilizzo agronomico.

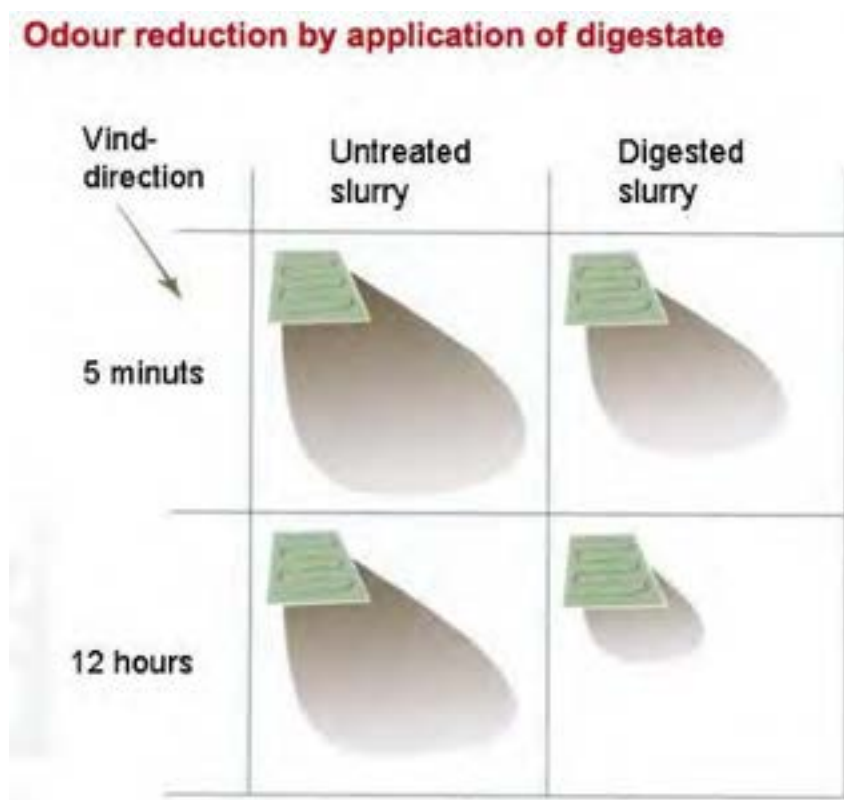


Figura 29; Valutazione della riduzione delle emissioni olfattive

Si riscontra inoltre una sensibile riduzione del numero dei microorganismi patogeni, altro fattore limitante il possibile utilizzo agronomico; la digestione anaerobica permette una più sicura applicazione sui suoli.

**Digestate has a low pathogen content**

Source: Dansk Landbrugsrådgivning

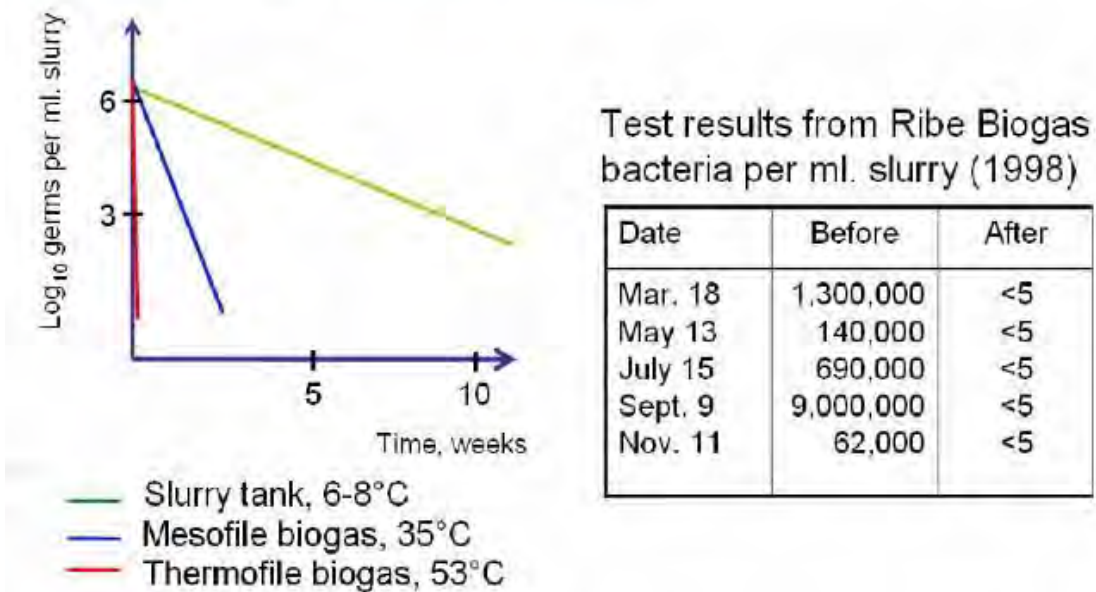


Figura 30; Riduzione dei patogeni nel digestato

I motivi che possono portare alla scelta di trattare il digestato, anziché destinarlo ad uso agronomico sono:

- impedimenti di carattere normativo, quali la sua inclusione nel novero dei rifiuti (problema che verrà trattato nella seconda sezione);
- surplus di nutrienti nell'area di destinazione; condizione che si verifica spesso, a causa dell'applicazione della direttiva nitrati, nelle aree a forte concentrazione agricola, quali la pianura padana
- volontà di produrre fertilizzanti organici

Tralasciando l'ultimo punto, che rientra ovviamente nella libera scelta dell'imprenditore che, se decide di effettuare l'investimento, lo fa sulla base di una precisa scelta economica, il problema tecnico che rimane aperto è quello della riduzione della quantità di nutrienti, ed in particolare dell'azoto.

Le tecnologie maggiormente usate per il trattamento del digestato, qualora non sia possibile il diretto utilizzo agronomico sono:

- processi di separazione solido/liquido impieganti presse a vite, centrifughe, nastropresse o filtri vibranti
- flocculazione/precipitazione, flottazione anche DAF
- essiccazione o compostaggio
- evaporazione
- ultrafiltrazione e osmosi inversa
- processi specifici per la rimozione dell'azoto quali lo strippaggio dell'ammoniaca, l'ANAMMOX, le resine a scambio ionico

Spesso si ricorre a una combinazione dei processi sopra citati, per migliorarne l'efficienza e ridurre le problematiche operative, ma tutti sono caratterizzati da costi, sia in termini impiantistici che energetici, che tendono a vanificare i vantaggi della digestione anaerobica.



Dall'analisi complessiva delle problematiche e dalle considerazioni soprattutto di carattere energetico si è ritenuto di esaminare un'ipotesi alternativa che preveda l'utilizzo di celle a combustibile biologiche, definite BEAMR in cui l'ammonio potrebbe venir convertito in idrogeno ed azoto molecolare.

Le BEAMR, sono celle a combustibile con batteri adesi all'anodo, nelle quali viene applicata una differenza di potenziale e viene eliminato l'ossigeno dalla cella del catodo; in questo modo è possibile produrre idrogeno puro, attraverso la ricombinazione di protoni ed elettroni sul catodo, a spese della sostanza organica presente in soluzione. Questo processo è stato definito come *bioelectro-chemically assisted microbial reactor* (BEAMR), ovvero l'elettrolisi microbica della sostanza organica (poiché elettroni e protoni derivano dalla sostanza organica e non dall'acqua).

La produzione di idrogeno per ossidazione della sostanza organica, da un punto di vista termodinamico, non è favorita. Tuttavia, se si applica una differenza di potenziale teorica di 40 mV il sistema è in grado di superare questa barriera energetica, ottenendo un rapporto tra energia immessa e prodotta stimabile in quasi il 150%.

Sfruttando lo stesso principio e batteri chemoautotrofi invece che gli eterotrofi, usati nella conversione dell'acetato, è possibile ottenere una reazione di scomposizione dell'ammonio liberando azoto molecolare all'anodo e idrogeno al catodo. I batteri deputati sono i nitrificanti, che crescono con l'energia ricavata dall'ossidazione dell'ammonio a nitrato in presenza di ossigeno. Il processo utilizzerà questi batteri, o gli enzimi da essi estratti, in assenza di ossigeno. Ciò appare fattibile perché l'ossigeno è l'accettore di elettroni nell'ossidazione dell'ammonio e viene sostituito dall'anodo della cella che ricrea la stessa differenza di potenziale favorevole alla reazione.

Gli elementi maggiormente innovativi riguardano la creazione di condizioni ottimali per l'adattamento alle condizioni di reazione dei batteri ammonio ossidanti. Le notevoli prospettive di questo processo, e la sua potenziale applicabilità su larga scala, rendono interessante lo sviluppo di un'attività specifica di ricerca negli anni successivi.

## 4.2.2 Aspetti normativi

Nella normativa comunitaria, sia per quanto riguarda i testi delle direttive, sia per quanto concerne i pronunciamenti della Corte di Giustizia, non esiste il concetto di sostanza che è o non è rifiuto; si rientra nella categoria dei rifiuti non per parametri oggettivi (l'inserimento nella lista europea dei rifiuti non è assolutamente condizione sufficiente per essere considerati tali), ma nel parametro soggettivo dell'intenzione, da parte del detentore, di disfarsene.

A conforto di questo, la Direttiva Rifiuti 98/2008 chiarisce che una sostanza può essere considerata sottoprodotto, e non rifiuto, se si verificano le seguenti condizioni:

- è certo che la sostanza o l'oggetto sarà ulteriormente utilizzata/o;
- la sostanza o l'oggetto può essere utilizzata/o direttamente senza alcun ulteriore trattamento diverso dalla normale pratica industriale;
- la sostanza o l'oggetto è prodotta/o come parte integrante di un processo di produzione;
- l'ulteriore utilizzo è legale, ossia la sostanza o l'oggetto soddisfa, per l'utilizzo specifico, tutti i requisiti pertinenti riguardanti i prodotti e la protezione della salute e dell'ambiente e non porterà a impatti complessivi negativi sull'ambiente o la salute umana.

Sulla base di quanto stabiliscono le norme comunitarie, si evince che il digestato, prodotto secondario della produzione di fonte rinnovabile, è da considerarsi sottoprodotto se è destinato con certezza all'uso agronomico (lettera a), e se vengono rispettate le norme ambientali, tra cui la più rilevante è la Direttiva nitrati.

Questo non è in contrasto con quanto previsto dall'Art.2, comma 2, lettera b della Direttiva rifiuti, perché il fatto che il materiale in ingresso possa essere considerato rifiuto non esclude che, a seguito della trasformazione anaerobica, lo stesso possa divenire sottoprodotto del processo di produzione del biogas.

D'altra parte il digestato può rientrare nella fattispecie prevista dall'Art. 6 della Direttiva rifiuti, che recita:

### *Art. 6 - Cessazione della qualifica di rifiuto*

*1. Taluni rifiuti specifici cessano di essere tali ai sensi dell'articolo 3, punto 1, quando siano sottoposti a un'operazione di recupero, incluso il riciclaggio, e soddisfino criteri specifici da elaborare conformemente alle seguenti condizioni:*

- *la sostanza o l'oggetto è comunemente utilizzata/o per scopi specifici;*
- *esiste un mercato o una domanda per tale sostanza od oggetto;*
- *la sostanza o l'oggetto soddisfa i requisiti tecnici per gli scopi specifici e rispetta la normativa e gli standard esistenti applicabili ai prodotti;*
- *l'utilizzo della sostanza o dell'oggetto non porterà a impatti complessivi negativi sull'ambiente o sulla salute umana.*

*I criteri includono, se necessario, valori limite per le sostanze inquinanti e tengono conto di tutti i possibili effetti negativi sull'ambiente della sostanza o dell'oggetto.*

Tali criteri sono in corso di definizione a livello comunitario, e le indicazioni tecniche provengono dalle BAT (best available technology) in corso di preparazione presso l'IPTS di Siviglia, che ha già predisposto una prima bozza in materia.

<http://susproc.jrc.ec.europa.eu/activities/waste/documents/IPTSEoWBiodegradablewaste1stworkingdocument20110221.pdf>

La definizione normativa è di estrema rilevanza, e questo è particolarmente vero se si considera l'importanza agronomica dell'utilizzo del digestato, in un Paese come l'Italia in cui il contenuto di sostanza organica nei suoli è basso, con tendenza ad abbassarsi ulteriormente a seguito dell'agricoltura intensiva e dei cambiamenti climatici, e tenendo conto di quanto già detto nella sezione dedicata agli aspetti tecnici.

Sulla base delle indicazioni tecniche e giuridiche di cui sopra, sarebbe opportuno che il legislatore emanasse norme valide su tutto il territorio nazionale per consentire una pratica, quella dell'utilizzo agronomico, che non solo non è nociva per l'ambiente, ma che anzi rappresenta un valido strumento per il miglioramento della fertilità dei suoli e per il contemporaneo effetto positivo per quanto riguarda le emissioni globali, stante che il suolo è in grado di accumulare, sotto forma di "carbon sink", grandissime quantità di gas serra, come si spiega nella sezione di carattere tecnico.

La distinzione tra uso (anche produttivo) di un rifiuto organico in agricoltura (operazione R 10, Trattamento in ambiente terrestre a beneficio dell'agricoltura o dell'ecologia) e quello dell'impiego di un sottoprodotto nelle operazioni di coltivazione non è solo semantica; se si rientrasse nella categoria dei rifiuti, si renderebbero necessari una serie di adempimenti burocratici ed autorizzativi tali da rendere praticamente impossibile una pratica che va invece nella direzione della protezione dell'ambiente, della riduzione del consumo delle risorse e del contenimento delle emissioni climalteranti.

Nelle more della predisposizione di una normativa nazionale, è interessante notare che molte regioni, a partire da quelle che hanno un maggiore sviluppo dell'agricoltura, hanno emanato norme locali, che hanno il pregio di fornire agli operatori le indispensabili certezze operative, ma il difetto di essere disomogenee e qualche volta divergenti. Tutte le norme fanno riferimento alle indicazioni della Direttiva nitrati, come limite di "legittimità", e per evitare di ricadere in quanto previsto alla lettera d) della definizione di sottoprodotto; ma non hanno la sufficiente uniformità, anche se tutte prevedono lo spandimento del digestato da refluo zootecnico puro, sia pure con diverse incombenze.

Ad esempio, il Piemonte consente l'utilizzo del digestato misto, purché almeno il 50% sia costituito da zootecnico; è sempre obbligatoria la comunicazione dello spandimento, come pure è sempre obbligatorio il Piano di Utilizzazione Agronomica (PUA).

In Veneto è consentito l'uso di digestato misto con biomasse vegetali, mentre l'obbligo di comunicazione e di PUA dipende dalle dimensioni aziendali, e non in base all'uso del digestato.

In Emilia Romagna i digestato ammessi sono più articolati: è ammesso il vegetale puro, quello da effluenti + colture vegetali + sottoprodotti vegetali da agroindustria, ed anche quello misto da effluenti + colture + sottoprodotti di origine animale; l'obbligo di comunicazione vale sempre, indipendentemente dalla vulnerabilità dell'area, tranne che nel caso di digestato esclusivamente da colture vegetali; il PUA è obbligatorio solo nelle zone vulnerabili, e per digestato zootecnico o misto.

La norma della Regione Lombardia è simile a quella dell'Emilia per quanto riguarda le categorie (anzi è leggermente più permissiva); l'obbligo della comunicazione e quello del PUA dipende dalle dimensioni aziendali, e non in base all'uso del digestato.

Come si vede, una situazione abbastanza variegata e che crea differenze difficilmente comprensibili, che possono provocare effetti distorsivi sulla competizione, per produzioni che sono normalmente marginali, e che accentuano le già gravi problematiche della zootecnia nazionale.

Importante è l'individuazione di caratteristiche tecniche per il digestato, e la definizione di un digestato di qualità, che possa essere utilizzato in agricoltura alle stesse condizioni del compost di qualità; una indicazione in questo senso è contenuta nell'Art. 10 del DLgs 205/2010.

## Bibliografia

APHA 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 21th ed. Washington, DC: American Public Health Association.

Comino E., Rosso M., Riggio V. 2009. Development of a pilot scale anaerobic digester for biogas production from cow manure and whey mix. *Bioresource Technology* 100 (21): 5072-5078.

Backer G.C., Smith J.J., Cowan D.A. 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of microbiological methods* 55:541.

Boni M.R., Biancamaria Pietrangeli B., Sbaffoni S., Letizia T. 2010. La produzione di biocarburanti: situazione attuale e prospettive future legate all'impiego della frazione organica dei rifiuti solidi urbani. *Prevenzione Oggi* 6 (1/2): 63-86.

Chang J.J., Lin J.J., Ho C.Y., Chin W.C., Huan, C.C. 2010. Establishment of rumen-mimic bacterial consortia: A functional union for bio-hydrogen production from cellulosic bioresource. *International Journal of Hydrogen Energy* 35 (24): 13399-13406.

Chaucheyras-Durand F., Masségla S., Fonty G., Forano E. 2010. Influence of the composition of the cellulolytic flora on the development of hydrogenotrophic microorganisms, hydrogen utilization, and methane production in the rumens of gnotobiotically reared lambs. *Applied and Environmental Microbiology* 76 (24): 7931-7937.

Cheng C.L., Lo Y.C., Lee K.S., Lee D.J., Lin C.Y., Chang J.-S. 2011. Biohydrogen production from lignocellulosic feedstock. *Bioresource Technology* in press.

Demain A.L., Newcomb M., Wu J.H.D. 2005. Cellulase, clostridia, and ethanol. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 69 (1): 124-154

Guo X. M., Trably E., Latrille E., Carrère H., Steyer J. P. 2010. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. *Int J Hydrogen Energy* 35 (19): 10660-10673.

Imhoff J.F. 2006. The Family Ectothiorhodospiraceae. *Prokaryotes* 6: 874-886. Capitolo 3.3.32.

Jayasinghearachchi H.S., Sarma P. M., Singh S., Aginihotri A., Mandal A. K., Lal B. 2009. Fermentative hydrogen production by two novel strains of *Enterobacter aerogenes* HGN-2 and HT 34 isolated from sea buried crude oil pipelines. *International Journal of Hydrogen* 34:7197-7207.

Kalia V.C., Jain S.R., Kumar A., Joshi A.P. 1994. Fermentation of biowaste to H<sub>2</sub> by *Bacillus licheniformis*. *World Journal of Microbiological Biotechnology* 21: 152-156.

Leigh M.B., Taylor L., Neufelad J.D. 2010. Clone libraries of ribosomal RNA gene sequence for characterization of bacterial and fungal communities. *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology* cap.47:3971.

Levin D. B., Carere C. R., Cicek N., Sparling R. 2009. Challenges for biohydrogen production via direct lignocellulose fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy* 34: 7390-7403.

Li J., Ren N., Li B., Qin Z., He J. 2008. Anaerobic biohydrogen production from monosaccharides by a mixed microbial community culture. *Bioresource Technology* 99 (14): 6528-6537.

Li J.Z., Ren N.Q., Liz Qui B. , He J. 2008. Anaerobic biohydrogen production from monosaccharides by a mixed microbial community culture. *Bioresource Technology* 99:6528-6537.

Li J., Yuan H., Yang J. 2009. Bacteria and lignin degradation. *Frontiers of Biology in China* 4 (1): 29-38.

Li Y.F., Ren N.Q., Chen Y., Zheng G.X. 2007. Ecological mechanism of fermentative hydrogen production by bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy* 32: 755-760.

Liu Y., Yu P., Song, X., Qu Y. 2008. Hydrogen production from cellulose by co-culture of *Clostridium thermocellum* JN4 and *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* GD17. *International Journal of Hydrogen Energy* 33 (12): 2927-2933.

Ljungdahl LG. Eriksson K-E. 1985. Ecology of microbial cellulose degradation. *Advances in Microbial Ecology* 8: 237-99.

Logan B.E., Oh S.-E., Kim I.S., Van Ginkel S. 2002. Biological Hydrogen Production Measured in Batch Anaerobic Respirometers. *Environmental Science of Technology* 36 (11): 2530 -2535.

Manske A. K., Glaeser J., Kuypers M. M. M., Overmann J. 2005. Physiology and Phylogeny of Green Sulfur Bacteria Forming a Monospecific Phototrophic Assemblage at a Depth of 100 Meters in the Black Sea. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 8049-8060.

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(2): 137-146.

Moon Y.H., Lakiviak M., Bauer M.S., Mackie R.I. and Cann I.K.O. 2011. Biochemical analyses of multiple endoxylanases from the rumen bacterium *Ruminococcus albus* 8 and their synergistic activities with accessory hemicellulose-degrading enzymes. *Applied and Environmental Microbiology* 77 (15): 5157-5169.

Muyzer G, De Waal E.C., Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturino gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rDNA. *Applied and environmental microbiology* 59: 695.

Niu K., Zhang X., Tan W. S., Zhu M. L. 2010. Characteristics of fermentative hydrogen production with *Klebsiella pneumonia* ECU-15 isolated from anaerobic sewage sludge. *International Journal of Hydrogen Energy* 35:71-80.

Nocker A., Burr M., Camper A. 2007. Genotypic microbial community profiling : a critical technical review. *Microbial ecology* 54 : 276.

Pan C.M., Fan Y.T., Zhao P., Hou H.W. 2008. Fermentative hydrogen production by the newly isolated *Clostridium beijerinckii* fanp3. *Int. J. Hydrogen Energy* 33(20): 5383-5391.

Prakasham R.S., Sathish T., Brahmaiah P., Subba Rao Ch., Sreenivas Rao R., Hobbs P. J. 2009. Biohydrogen production from renewable agri-waste blend: Optimization using mixer design. *International Journal of Hydrogen Energy* 34: 6143-6148.

Ren N.Q., Wanqian G., Bingfeng L., Guangli C. and Jie D. 2011. Biological hydrogen production by dark fermentation: challenges and prospects towards scaled-up production. *Current Opinion in Biotechnology* 22: 365-370.

Ren N.Q., Wang A., Cao G., Xu J., Gao L. 2009. Bioconversion of lignocellulosic biomass to hydrogen: Potential and challenges. *Biotechnology Advances* 27 (6): 1051-1060.

Saratale G.D., Chen S.-D., Lo Y.-C., Saratale R.G., Chang J.-S. 2008. Outlook of biohydrogen production from lignocellulosic feedstock using dark fermentation - A review. *Journal of Scientific and Industrial Research* 67 (11): 962-979.

Swift M.J. 1977. The ecology of wood decomposition. *Science PROG. Oxford*. 64: 175-199.

Tolvanen K., Karp M. 2011. Molecular methods for characterizing mixed microbial communities in hydrogen-fermenting system. *International journal of hydrogen Energy* 36 : 5280.

Ward A.J., Hobbs P., Holliman P., Jones D. L. 2008. Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresource Technology* 99: 7928-7940.

Weiland P. 2010. Biogas production: current state and perspective. *Applied Microbiological Biotechnology* 85: 849-860.

Zhu H., Stadnyk A., Béland M., Seto P. 2008. Co-production of hydrogen and methane from potato waste using a two-stage anaerobic digestion process. *Bioresource Technology* 99 (11): 5078-5084.