



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

DIPARTIMENTO DI SCIENZE ECOLOGICHE E BIOLOGICHE (DEB)

Corso di Dottorato di Ricerca in

Ecologia e Gestione delle Risorse Biologiche

XXV Ciclo

“Studio del Processo di Produzione Biologica d’Idrogeno mediante *Dark fermentation*”

(s.s.d. BIO/19)

Tesi di dottorato di:

Dott. Chiara Patriarca

Coordinatore del corso

Prof. Roberta Cimmaruta

Tutor

Dott. Giulio Izzo

Anno Accademico 2012/2013

INDICE	2
1.INTRODUZIONE	4
2.QUADRO NORMATIVO	8
2.Introduzione	9
2.1. Il sistema Energetico Internazionale	10
2.2. La politica dell'Unione Europea	10
2.2.1. Biocarburanti in Unione Europea	11
2.3. Il Sistema Energetico Italiano	13
2.3.1. La politica italiana per le fonti rinnovabili	14
2.3.2. Energia elettrica	14
3. LA PRODUZIONE DI ENERGIA DA FONTI RINNOVABILI	17
3. Fonti rinnovabili	18
3.1. Energia solare fotovoltaica	18
3.2. Energia eolica	19
3.3. Energia idraulica	21
3.4. Energia geotermica	23
3.5. Bioenergie	25
4.L'IDROGENO: METODI DI PRODUZIONE	28
4.1. Processi termochimici	30
4.2. Processi elettrochimici	31
4.3. Processi biochimici	32
5.LA DIGESTIONE ANAEROBICA	34
5.1. Idrolisi	36
5.2. Acidogenesi	36
5.2.1. La glicolisi	36
5.2.2. La fermentazione	37
5.3. Acetogenesi	38
5.4. Metanogenesi	38
6.DARK FERMENTATION	39
6.1. Principali parametri di processo e fattori di inibizione	42
6.1.1. pH	43
6.1.2. Temperatura	43
6.1.3. Pressione parziale d'idrogeno	44
6.1.4. HRT	45
6.1.5. VFA	45
6.1.6. Resource mapping	45
6.1.7. Concentrazione ioni metallici	46
7.SCOPO DEL LAVORO	47
8.MATERIALI E METODI	50
8.1. Inoculi: F_0 e F_{210}	51
8.2. Substrati sintetici e naturali	52
8.2.1. Glucosio	52
8.2.2. Biomasse di scarto e Energy crop	53
8.2.2.1. Scotta	53
8.2.2.2. Glicerolo	53
8.2.2.3. Letame e Liquame	53
8.2.2.4. Insilato di Sorgo (Sorghum gentile)	53
8.3. Indagini chimico-fisiche dei substrati	53
8.3.1. Determinazione dei Solidi Totali	54
8.3.2. Determinazione delle ceneri	54
8.3.3. Calcolo dei Solidi Volatili	54

8.3.4. Chemical Oxygen Demand (COD)	55
8.4. Tipologia di fermentatori	55
8.4.1. Batch	56
8.4.2. Continuo	56
8.5. Pretrattamenti	57
8.5.1. Tampone fosfato	58
8.5.2. Sterilizzazione	58
8.6. pH	58
8.7. Procedura sperimentale	58
8.8. Analisi del biogas	59
8.9. Prodotti di fermentazione	59
8.10. Analisi della cinetica di produzione di biogas	59
8.11. Analisi statistica	60
8.12. Caratterizzazione microbiologica dell'inoculo	60
8.12.1. Il clonaggio	60
8.12.2. Estrazione del DNA ed amplificazione del gene 16SrDNA	61
8.12.3. Libreria genetica	61
8.12.4. Estrazione dei plasmidi e PCR- ARDRA	62
8.12.5. Sequenziamento ed analisi filogenetica	62
8.12.6. Fluorescence in Situ Hybridization (FISH)	63
8.12.7. Conta diretta dell'abbondanza microbica (DAPI)	65
9.RISULTATI E DISCUSSIONI	66
9.1. Test in batch: produzione di H ₂ da sedimenti marini su glucosio	67
9.2. Test in continuo: selezione di un inoculo di idrogeno produttori (F ₂₁₀)	72
9.3. Caratterizzazione molecolare dell'inoculo F ₂₁₀	74
9.3.1. Clonaggio	74
9.3.2. Immunofluorescenza (FISH)	78
9.3.3. Risultati a confronto	80
9.4. Caratterizzazione dei substrati	80
9.4.1. Confronto tra inoculi	81
9.5. Produzione di H ₂ da biomasse di scarto e inoculo F ₂₁₀	81
9.5.1. Substrati singoli	81
9.5.2. Prove di codigestione variando le concentrazioni dei substrati in sterilità	83
9.5.3. Confronto letame-liquame	85
9.6. Ottimizzazione statistica della mix di substrati	86
9.7. Ruolo degli idrogeno-produttori nell'ultima fase della digestione anaerobica: ottimizzazione del processo di produzione di CH ₄	92
9.7.1. Potenziamento della produzione di metano dal liquame mediante inoculo di una comunità di idrogeno produttori	93
9.7.2. Produzione di idrogeno e metano da liquame: separazione delle fasi (idrogenogenesi e metanogenesi) mediante sterilizzazione	94
9.7.3. Produzione di idrogeno e metano da liquame: separazione delle fasi (idrogenogenesi e metanogenesi) mediante variazione del pH	96
9.7.4. Evidenza sperimentale della presenza di una comunità di idrogeno produttori nel liquame: produzione di metano da scotta	97
10.CONCLUSIONI	101

CAPITOLO I INTRODUZIONE

I problemi relativi all'approvvigionamento energetico, al clima e all'ambiente sono strettamente connessi con l'evoluzione delle attività umane e dei sistemi naturali. L'attuale situazione vede una società basata prevalentemente su risorse energetiche non rinnovabili; ad oggi le più utilizzate sono petrolio e gas naturale, anche se sono quelle che maggiormente scarseggiano e tuttavia governano e monopolizzano le politiche mondiali. Attualmente il consumo mondiale di energia ha superato ampiamente i 10 miliardi di tonnellate di petrolio equivalente (TEP) e secondo le previsioni più attendibili tale dato triplicherà nel 2050 rispetto ai valori attuali. L'analisi dell'attuale scenario energetico (International Energy Agency, 2010) impone la necessità di far fronte alla carenza dei combustibili fossili rispetto alla domanda mondiale di energia, al conseguente innalzamento dei loro costi e al problema ambientale derivante dal loro utilizzo.

E' difficile stimare le risorse petrolifere rimanenti a causa della loro difficile localizzazione sotto la superficie terrestre, della velocità con la quale esso viene estratto e dell'aumento della popolazione mondiale. Le stime delle risorse petrolifere globali si erano stabilizzate, già a partire dagli anni 1960, intorno a un valore medio di circa 2.000 miliardi di barili e dal 1985 si consuma più petrolio di quanto non se ne scopra. Poiché fino ad oggi abbiamo consumato circa 1.000 miliardi di barili e ogni anno ne consumiamo circa 25 miliardi, si stima che i giacimenti siano in grado di fornire greggio per un periodo di circa quaranta anni (Alekkett & Campbell, 2003). Il carbone, altro combustibile fossile, è presente in quantità piuttosto abbondanti, ma la difficoltà nella distribuzione ed i sistemi a bassa efficienza impiegati per lo sfruttamento lo rendono tutt'oggi inappetibile e molto inquinante rispetto alle fonti energetiche alternative. L'utilizzo per questo tipo di combustibile fossile giunge dalla gassificazione dello stesso, ma l'alta quantità d'energia impiegata per il fine lo rendono attualmente svantaggioso. L'attuale sfruttamento delle fonti fossili, sensibilmente superiore a quello della loro capacità di rigenerazione, rischia di alterare i processi biogeochimici ed i flussi energetici del pianeta con gravi ripercussioni sull'effetto serra e i conseguenti cambiamenti climatici (ENEA 2010).

Il consumo delle risorse energetiche, con un flusso superiore a quello della loro capacità di rigenerazione e l'incompletezza della cicizzazione delle attività industriali ha fatto sì che nel giro di pochi decenni siano stati riversati nell'ambiente enormi quantità di sottoprodotti e di scarti derivanti dalle attività umane: gas combustibili, liquidi inquinanti, manufatti e composti solidi. Va inoltre aggiunto che l'energia utilizzata viene, in ultimo dissipata nell'ambiente sotto forma di calore a bassa temperatura (entropia) contribuendo a modificare gli equilibri naturali. L'eccessiva abbondanza dei materiali di scarico e la loro distribuzione disomogenea nei comparti geologici di ciascun ciclo modificano la velocità di flusso e i tempi di turnover con cui gli elementi fondamentali circolano, alterando i cicli biogeochimici e provocando il fenomeno dell'inquinamento.

La combustione di carburanti fossili, infatti, comporta l'emissione di gas tossici per l'ambiente, alcuni dei quali contribuiscono ad amplificare drammaticamente l'effetto serra. A questo proposito la politica energetica europea più recente (Pacchetto Clima-Energia) enfatizza il risparmio energetico e tende ad incentivare l'utilizzo di fonti di energia rinnovabili. La prima e fondamentale traccia di un'inversione di marcia nella politica in campo energetico è il protocollo di Kyoto (1997) che, specie con i suoi strumenti

flessibili di Joint Implementation e di Clean Development Mechanism, definisce i termini di una concreta monetizzazione dei flussi di anidride carbonica penalizzandone le emissioni e premiandone la mancata generazione.

Per prevenire e contrastare l'attuale portata della crisi energetica ed ambientale e la stretta interconnessione tra utilizzo dei combustibili fossili ed i cambiamenti climatici, la comunità scientifica e politica delle nazioni tecnologicamente avanzate sta indirizzando la ricerca e le azioni sulla diversificazione delle fonti energetiche alternative.

In tale scenario si è aperto un vivace dibattito sull'idrogeno quale futuro vettore energetico. L'idrogeno, infatti è considerato il combustibile del futuro in quanto la sua combustione rende, a parità di peso, oltre tre volte il calore sviluppato dal petrolio mentre in termini di sostenibilità ambientale il processo di combustione porta alla sola formazione di vapore acqueo (Das e Veziroglu, 2001). L'idrogeno viene convenzionalmente ottenuto da materie prime di origine fossile o dall'acqua (steam-reforming di idrocarburi, gassificazione del carbone) mediante processi termochimici ed elettrolitici energeticamente svantaggiosi (Rosen e Scott, 1998). Se l'idrogeno venisse prodotto in questo modo per essere diffusamente utilizzato come vettore energetico, i problemi ambientali connessi con la generazione di "green house gas" anziché ridursi verrebbero aumentati significativamente.

Le ricerche scientifiche hanno evidenziato come l'unico modo potenzialmente disponibile per produrre idrogeno senza aggiunta di input energetici ausiliari quindi a bilancio energetico positivo sia mediante processi biologici.

Attualmente il più promettente processo biologico per la produzione di idrogeno è la fermentazione anaerobica (dark fermentation) legata allo sfruttamento delle biomasse, intendendo per biomasse tutti gli scarti vegetali e animali e i sottoprodotti dell'industria agroalimentare. L'utilizzo di biomasse di scarto offre inoltre la possibilità di contenere i costi di smaltimento dei rifiuti, trasformandoli in risorsa e di massimizzare il riciclo dei materiali.

Una soluzione ulteriormente vantaggiosa sia dal punto di vista ecologico che economico è la cofermentazione di effluenti zootecnici con colture energetiche o altri scarti organici, compresi i rifiuti organici, perché consente:

- 1) di aumentare la produzione di idrogeno riciclando le biomasse di scarto e riducendo i costi di smaltimento dei rifiuti;
- 2) di ottenere una matrice da degradare che risponda meglio alle caratteristiche chimico-fisiche per il processo fermentativo;
- 3) di compensare le fluttuazioni di massa stagionali dei rifiuti favorendo la stabilità del processo ed ottenendo l'effetto di diluizione nei confronti di sostanze inibenti più concentrate in alcuni substrati.

La fermentazione è un processo biologico naturale caratteristico delle prime fasi della digestione anaerobica, può avvenire a pressione e temperatura ambiente, e la produzione di idrogeno è continua (giorno e notte). Tale processo porta alla formazione di un'abbondanza di piccole molecole organiche (metaboliti) che se da una parte inibiscono l'ulteriore produzione di idrogeno dall'altra costituiscono un valore aggiunto per l'intero

processo in quanto essi stessi possiedono un intrinseco valore energetico. Infatti a seconda della loro natura, queste molecole possono essere utilizzate come substrato in reattori destinati alla produzione di metano, un biogas indicato dall'UE tra le fonti energetiche rinnovabili ed ecologiche che contribuiscono all'autonomia energetica e alla riduzione degli impatti ambientali.

Sulla base di queste considerazioni è stato fissato l'obiettivo della presente ricerca volta allo studio del processo della produzione biologica di idrogeno mediante fermentazione al buio di biomasse di scarto con l'utilizzo di batteri mesofili anaerobi facoltativi.

CAPITOLO II

QUADRO NORMATIVO

2.Introduzione

Dal 1850 ad oggi, la domanda mondiale di energia è cresciuta di circa 10 volte. Attualmente il consumo mondiale di energia ha superato ampiamente i 10 miliardi di Tonnellate di Petrolio Equivalente (TEP) (Fig.1) e secondo le previsioni più attendibili tale dato nel 2050 verrà triplicato rispetto ai valori attuali.

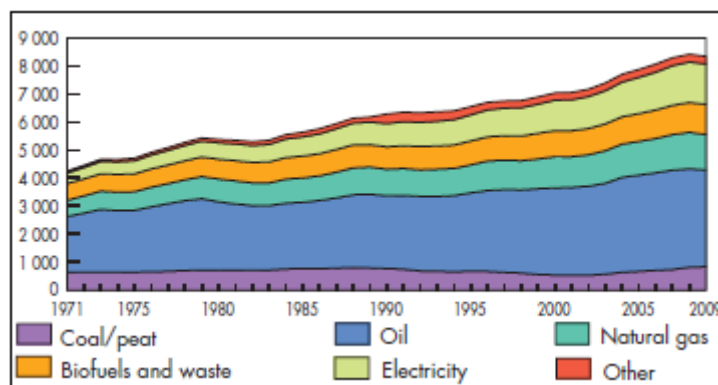


Fig.1 Consumo mondiale di Energia in milioni di Tonnellate di Petrolio Equivalente (Mtoe).

Allo stato attuale, la domanda energetica mondiale è soddisfatta quasi interamente dalla combustione di materie prime fossili. E' noto come la questione ambientale sia strettamente legata all'uso di fonti fossili la cui combustione ha dato origine e aggravato condizioni come: piogge acide, effetto serra a livello globale ed inquinamento dell'aria dovuto ai gas di scarico a livello locale; se a questo ci si aggiunge il problema delle fonti esauribili, appare evidente come le politiche internazionali e nazionali di ciascun paese mirino a far fronte al complicato sviluppo del sistema economico-ambientale. E' in questo contesto che si colloca la conferenza di Kyoto del 97', che ha rappresentato un momento di svolta, delineando obiettivi mirati alla riduzione dell'impatto ambientale dei sistemi di conversione energetica, concordando su riduzioni legalmente vincolanti delle emissioni dei gas serra, in media di 6%-8% rispetto ai livelli del 1990, tra gli anni 2008 e 2012.

Il protocollo inoltre prevede l'attribuzione, per ogni paese, di una quantità di Assigned Amount Units (AAU) corrispondenti alle tonnellate di emissioni ammesse. Per agevolare l'impegno dei paesi annessi sono stati introdotti dei meccanismi flessibili:

International Emission Trading (IET): un paese annesso può acquistare diritti di emissione AAU da altri annessi in grado di ridurre emissioni al di sotto del limite assegnato;

Clean Development Mechanism (CDM): i paesi annessi possono realizzare in quelli non aderenti al Trattato (in via di sviluppo) progetti di riduzione delle emissioni e acquisire crediti di emissione;

Joint Implementation (JI): un paese annesso può realizzare in altri aderenti al Trattato progetti di riduzione delle emissioni e acquisire crediti di emissione.

2.1. Il sistema Energetico Internazionale

Un panorama esaustivo del sistema energetico internazionale non può prescindere dall'esame di tre principali questioni, tra loro interrelate: l'impatto in termini di emissioni di gas serra da usi energetici, la sicurezza energetica per i Paesi importatori ed esportatori e la sostenibilità economica del soddisfacimento del fabbisogno energetico.

L'analisi dei dati storici e degli scenari tendenziali sviluppati dall'International Energy Agency (IEA) e dall'Energy Information Administration (International Energy Agency, 2010) mostra come il sistema energetico internazionale si stia muovendo su un sentiero di sviluppo non sostenibile e come sia quindi necessario prevedere degli interventi di policy che favoriscano lo sviluppo di una vasta gamma di tecnologie energetiche innovative. L'IEA da tempo sottolinea come sia necessaria una rivoluzione energetica, basata sulla diffusione su scala mondiale di tecnologie a basso contenuto di carbonio.

2.2. La politica dell'Unione Europea

Pacchetto clima-energia

Il 17 dicembre 2008 la Commissione europea ha adottato un Pacchetto di proposte che ha dato attuazione agli impegni assunti dal Consiglio europeo in materia di lotta ai cambiamenti climatici e promozione delle energie rinnovabili. Le misure previste hanno accresciuto significativamente il ricorso alle fonti energetiche rinnovabili in tutti i paesi e hanno imposto ai governi obiettivi giuridicamente vincolanti. Grazie a una profonda riforma del sistema di scambio delle quote di emissione, che ha imposto un tetto massimo alle emissioni a livello comunitario, tutti i principali responsabili delle emissioni di CO₂ sono stati incoraggiati a sviluppare tecnologie produttive pulite. Il pacchetto legislativo intende consentire all'Unione europea di ridurre di almeno il 20% le emissioni di gas serra e portare al 20% la quota di rinnovabili nel consumo energetico entro il 2020, secondo quanto deciso dai capi di Stato e di governo europei nel marzo 2007.

Il recepimento del pacchetto clima-energia ha portato all'approvazione di due differenti direttive: la direttiva 2009/28/CE sulle fonti energetiche rinnovabili e la 2009/30/CE sui combustibili diesel, gasolio e benzina.

Direttiva 2009/28/CE

La direttiva 2009/28/CE sulla promozione delle fonti rinnovabili approvata in Commissione europea il 23 aprile 2009 si pone come obiettivi da raggiungere per il 2020 di:

- Ridurre le emissioni di CO₂ del 20% rispetto ai livelli del 1990;
- Incrementare del 20% l'efficienza degli usi finali dell'energia rispetto ai livelli attuali;
- Promuovere le energie rinnovabili con un obiettivo vincolante del 20% sul totale dei consumi energetici della UE, con valori diversi per i diversi paesi (per l'Italia il 17%) e del 10%, per ciascun paese membro, dei consumi nel settore dei trasporti terrestri;
- Stabilire uno stretto collegamento tra lo sviluppo della produzione di energia da FER¹ e l'aumento dell'efficienza energetica.

¹ FER: Fonti Energetiche Rinnovabili

Direttiva 2009/30/CE

La direttiva 2009/30/CE, recepita nell'ordinamento nazionale con il decreto legislativo n.55 del 31 marzo 2011, ha stabilito le caratteristiche che devono avere benzina e combustibile diesel per essere commercializzati sul territorio comunitario, nonché l'introduzione di un meccanismo inteso a controllare e ridurre le emissioni di gas a effetto serra.

Pone le regole:

- per ridurre ulteriormente le emissioni di gas a effetto serra e il significativo contributo dei trasporti su strada su tali emissioni;
- per evitare l'effetto di incoraggiare la distruzione di terreni ricchi di biodiversità o carbonio per la produzione di biocarburanti;
- per stimolare l'innovazione;
- per chiedere di prevedere la regolare elaborazione di relazioni sulla possibilità di agevolare la "decarbonizzazione" dei combustibili per i trasporti.

2.2.1. Biocarburanti in Unione Europea

L'Unione Europea ha istituito già con la Direttiva 2003/30/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, dell'8 maggio 2003, un quadro comunitario volto a promuovere l'uso dei biocarburanti per ridurre le emissioni di gas a effetto serra e l'impatto ambientale dei trasporti, e per aumentare la sicurezza di approvvigionamento del carburante.

Il consumo europeo di biocarburanti nel settore dei trasporti, nel 2009, è stato di 12 Mtoe pari ad una quota del 4% sul consumo totale di carburanti, e risulta in continua crescita nell'ultimo decennio anche se con un ritmo rallentato nel 2010.

Attualmente i biocarburanti maggiormente utilizzati sono:

- miscele di esteri metilici derivati da oli vegetali e/o grassi animali (FAME), comunemente noti con il nome di biodiesel;
alcol etilico (bioetanolo), ottenuto da colture zuccherine o amilacee, e suoi derivati di sintesi chimica come gli eteri etil ter-butilico (ETBE) ed etil ter-amilico (TAEE);
oli vegetali puri e biogas (bioidrogeno e biometano);

Il 79,5% dell'ammontare complessivo di biocarburanti utilizzato nell'UE è costituito da biodiesel contro il 19,3% di bioetanolo. La parte restante è data dall'olio vegetale puro consumato in Germania e dal biogas in Svezia.

I primi cinque paesi consumatori sono Germania, Francia, Italia, Spagna e Regno Unito che insieme ammontano al 71% del consumo totale.

Tab.1 % di riduzione dei biocarburanti.

Biocarburanti- Riduzione minima emissioni		
All'entrata in vigore della Direttiva (*)	2017	Nuovi impianti entrati in funzione dopo il 1 gennaio 2017 (**)
35%	50%	60%
(*) dal 1 aprile 2013 per impianti in attività il 23 gennaio 2008		
(**) dal 1 gennaio 2018		

Per quanto riguarda invece i biocarburanti di “seconda generazione” la Direttiva CE n° 28/2009 non dà una definizione di biocarburanti di seconda generazione, ma parla di “futuri biocarburanti che non erano presenti sul mercato o erano sul mercato solo in quantità trascurabili nel gennaio 2008”, prevedendo specifiche agevolazioni per favorire la produzione e l’impiego di biocarburanti prodotti a partire da rifiuti, residui, materie cellulosiche non alimentari e materiali lignocellulosici.

Tab.2 Consumo di energia e biocarburanti in Europa 2005-2009 (Ktoe) Biofuel barometer eurobserv' ER 2010.

anno	Carburanti fossili	Biodiesel	Bioetanolo	Olio Vegetale	Totale biocarburanti	Quota % biocarburanti
2005	292876	2277	552	182	3011	1,02
2006	303125	4082	881	648	5611	1,82
2007	306295	6091	1246	768	8105	2,58
2008	346426	8018	1733	397	10189	3,4
2009	330797	9616	2339	137	12092	4

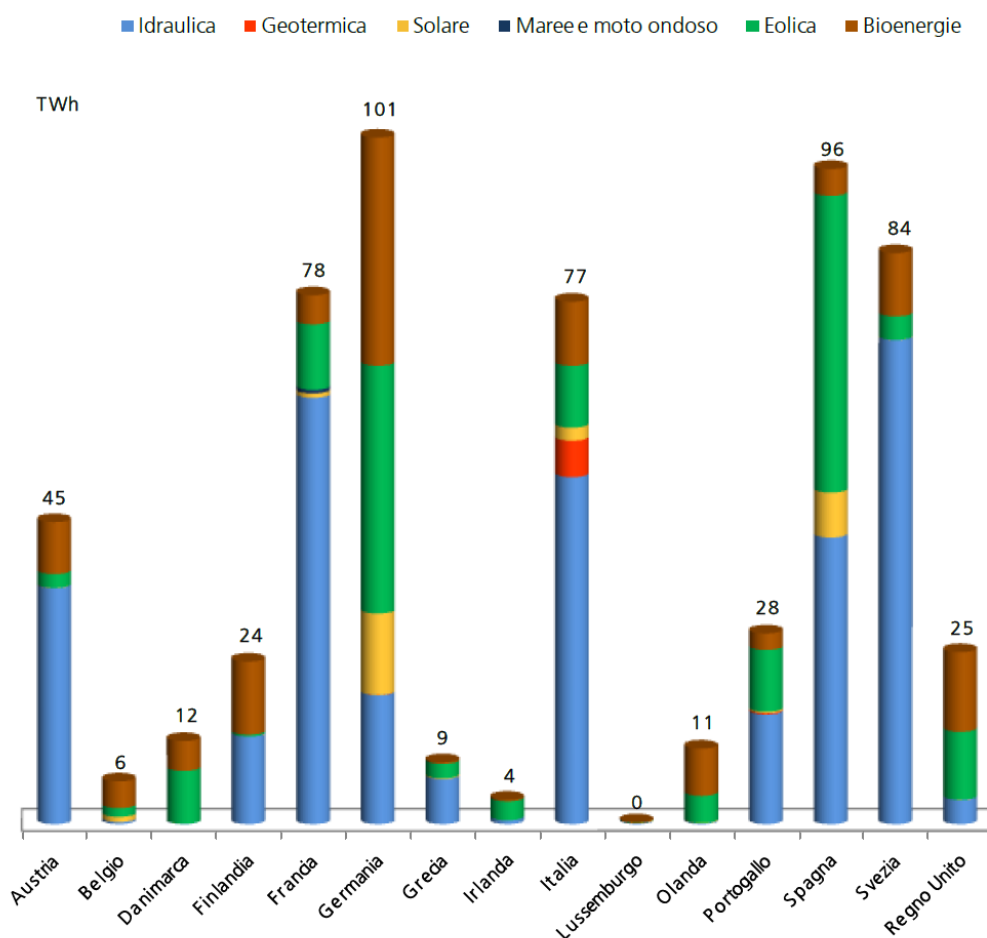


Fig.2 Produzione lorda di energia elettrica da FER in Europa nel 2010-GSE, 2011.

2.3. Il Sistema Energetico Italiano

Nell'ultimo decennio il settore energetico nazionale è stato interessato da significativi cambiamenti avvenuti in ambito istituzionale e di mercato, che hanno avuto come obiettivo la riforma del mercato elettrico e del gas², lo sviluppo delle fonti rinnovabili, la promozione dell'efficienza, del risparmio energetico e della sicurezza degli approvvigionamenti.

Tali cambiamenti, unitamente ad altri fattori, quali quello climatico e quello economico, hanno influito sull'andamento e sulla composizione dell'offerta e della domanda di energia e hanno contribuito a delineare le peculiarità del sistema energetico nazionale. L'Italia, infatti, rispetto agli altri Paesi dell'Unione europea, si contraddistingue per una maggiore vulnerabilità dal lato degli approvvigionamenti e per una maggiore dipendenza dagli idrocarburi, soprattutto nella generazione elettrica; di contro presenta un minore contenuto di energia per unità di Pil rispetto ad altri Paesi.

² I principali provvedimenti normativi che caratterizzano la Riforma sono il Decreto Legge del 29 novembre 2008, n.185 (Art.3), convertito in Legge del 28 gennaio 2009, n.2 e il Decreto del Ministro dello sviluppo economico del 29 aprile 2009.

2.3.1. La politica italiana per le fonti rinnovabili

Il Piano di Azione Nazionale (PAN), previsto dalla direttiva 2009/28/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 23 aprile 2009, sulla promozione dell'uso dell'energia da fonti rinnovabili è il documento programmatico che fornisce indicazioni dettagliate sulle azioni da porre in atto per il raggiungimento, entro il 2020, dell'obiettivo vincolante per l'Italia di coprire con energia prodotta da fonti rinnovabili il 17% dei consumi lordi nazionali. L'obiettivo deve essere raggiunto mediante l'utilizzo di energia prodotta da fonti rinnovabili nei settori: Elettricità, Riscaldamento - Raffreddamento e Trasporti.

Nell'elaborazione dei Piani di Azione Nazionale, gli Stati membri erano tenuti a seguire il modello stabilito, a norma dell'articolo 4 della direttiva 2009/28/CE, nella decisione della Commissione Europea del 30/06/2009. Questo ha garantito la completezza e la comparabilità delle informazioni contenute nei Piani dei diversi Stati Membri.

Il Piano di Azione Nazionale dell'Italia, trasmesso alla Commissione Europea il 28 luglio 2010, illustra la strategia nello sviluppo delle fonti energetiche rinnovabili e disegna le principali linee d'azione per ciascuna area di intervento (Elettricità, Riscaldamento - Raffreddamento e Trasporti) sul consumo energetico lordo complessivo. Contiene, inoltre, l'insieme delle misure (economiche, non economiche, di supporto e di cooperazione internazionale) necessarie per raggiungere gli obiettivi.

Il Piano considera, tra l'altro, sia l'introduzione di criteri di sostenibilità da applicare alla produzione di biocarburanti e bioliquidi, sulla base di sistemi di tracciabilità, sull'intera filiera produttiva, sia misure di cooperazione internazionale.

Per gli obiettivi che riguardano la riduzione delle emissioni di gas serra si fa riferimento al 2005, anno per il quale si dispone di dati affidabili e verificati sia per il sistema comunitario ETS (emissioni verificate a livello di impianto) sia per le emissioni di gas serra complessive degli Stati membri comunicate nell'ambito della convenzione quadro delle Nazioni Unite sui cambiamenti climatici (Unfccc).

In Italia, l'obiettivo del 14 per cento in meno rispetto al 2005 dovrà essere raggiunto tramite riduzioni del 21 per cento delle emissioni relative al settore ETS³ e del 13 per cento delle emissioni relative al settore non-ETS.

2.3.2. Energia elettrica

Nel 2009 la domanda di energia elettrica, pari a 317,6 miliardi di kWh, è diminuita del 6,4 per cento rispetto all'anno precedente, seguendo un andamento che si è presentato, anche se con una intensità molto più lieve, già a partire dal 2005. Il fabbisogno elettrico complessivo è soddisfatto per il 90,0 per cento dalla produzione nazionale, effettuata in gran parte utilizzando i combustibili primari, e per il 13,9 per cento dalle importazioni nette di energia elettrica prodotta all'estero, che nel 2009 sono aumentate dell'11 per cento rispetto al 2008 (mentre nel 2008 erano diminuite del 13,6 per cento).

³Emission Trading Scheme – Si tratta del sistema di scambio delle quote di CO₂ che ha l'obiettivo di aiutare gli Stati membri dell'UE a rispettare gli impegni assunti per limitare o ridurre le emissioni di gas serra in maniera economicamente efficace.

Tra le varie fonti energetiche rinnovabili utilizzate nel settore elettrico, quella idrica ha la maggiore incidenza (70,4 per cento sulla produzione totale da fonte rinnovabile), seguita dalle biomasse e dai rifiuti solidi urbani usati prevalentemente nelle centrali termoelettriche (11,5 per cento), dalla fonte eolica e fotovoltaica (10,1 per cento) e infine dalla geotermica (5,4 per cento).

Nel 2009 la quota da fonti rinnovabili è aumentata di 4,6 punti percentuali rispetto all'anno precedente (+4,8 punti percentuali rispetto al 2004), soprattutto grazie alla fonte idroelettrica (+3,4 punti percentuali rispetto al 2008 e +2,2 rispetto al 2004). Inoltre, rispetto al 2008 è salita di 1,1 punti percentuali la quota delle altre rinnovabili (eolico e biomasse a seguire il fotovoltaico) e di 0,1 punti quella della geotermia. Per quanto riguarda la produzione termoelettrica tradizionale, si osserva un'incidenza sulla produzione lorda complessiva che passa dall'81,2 per cento del 2004 al 76,4 per cento del 2009, a vantaggio della quota di rinnovabili la cui incidenza sulla produzione complessiva passa dal 18,8 per cento del 2004 al 23,6 per cento del 2009.

Tra i combustibili impiegati per la produzione termoelettrica si conferma il primato del gas naturale che, nel 2009, è pari al 66,7 per cento della produzione termoelettrica complessiva (53,9 per cento nel 2004). Si riduce, inoltre, la produzione termoelettrica da carbone (dal 18,9 per cento del 2004 al 17,9 per cento del 2009) e soprattutto quella da prodotti petroliferi, passata dal 16,0 per cento nel 2004 al 6,3 per cento nel 2009 (-9,7 punti percentuali) (ISTAT, 2010).

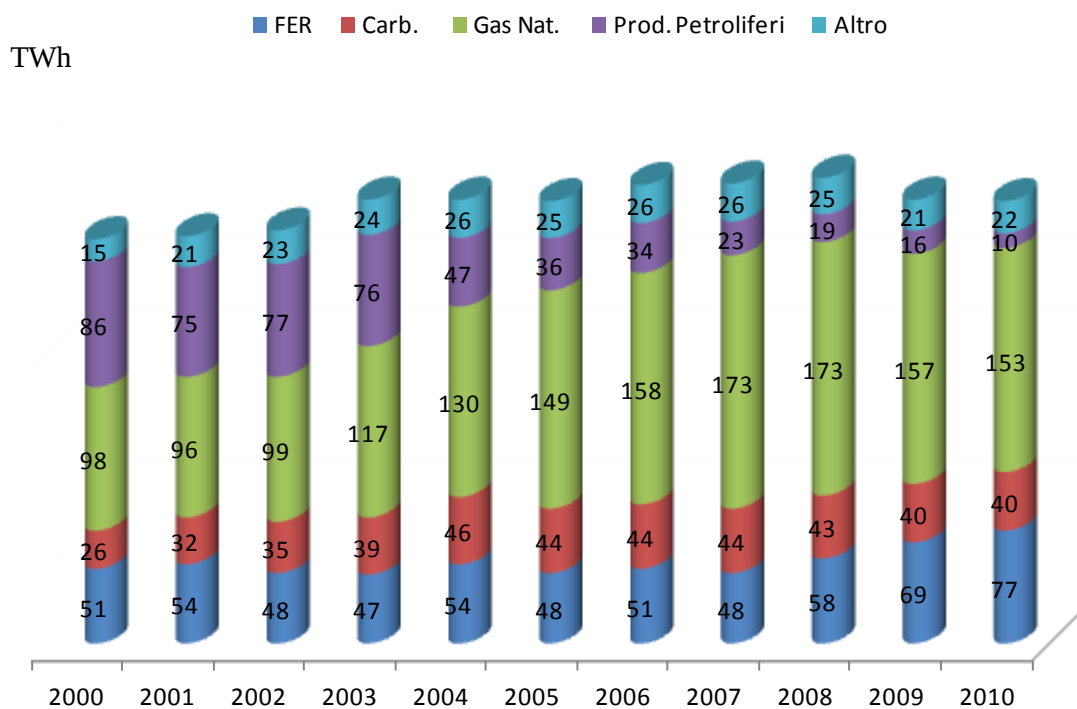


Fig.3 Produzione lorda di energia elettrica in Italia dal 2000 al 2010-GSE, 2011.

Obbligo di immissione in consumo di biocarburanti

Al fine di sviluppare la filiera e aumentare l'uso dei biocarburanti, in Italia è stato introdotto l'obbligo, per i fornitori di benzina e gasolio (soggetti obbligati), di immettere nella rete dei carburanti ("immissione in consumo") una quota minima di biocarburanti ogni anno.

La quota di biocarburanti da immettere in consumo è calcolata sulla base del potere calorifico totale di benzina e gasolio forniti l'anno precedente. L'attuale quota di immissione in consumo è pari al 4%: ciò significa che nel 2011 i fornitori di benzina e gasolio hanno immesso in rete una quantità di biocarburanti avente un potere calorifico pari al 4% dell'energia contenuta nella benzina e nel gasolio venduti nel 2010. La quota percentuale è destinata a salire, fino a raggiungere il 5 % entro il 2014.

CAPITOLO III

LA PRODUZIONE DI ENERGIA DA FONTI RINNOVABILI

3.Fonti rinnovabili

Come spiegato nel capitolo precedente, l'esigenza di trovare un alternativa ai combustibili fossili e al nucleare ha comportato un crescente interesse verso le fonti energetiche rinnovabili tra le quali quelle maggiormente sfruttate attualmente per la produzione di energia sono:

- Energia solare fotovoltaica
- Energia eolica
- Energia idraulica
- Energia geotermica
- Bioenergie

3.1. Energia solare fotovoltaica

La tecnologia fotovoltaica consente di trasformare direttamente l'energia associata alla radiazione solare in energia elettrica. Essa sfrutta l'effetto fotovoltaico, ossia la proprietà di alcuni materiali semiconduttori, opportunamente trattati, di generare elettricità se colpiti da radiazione luminosa. Tra questi il più utilizzato è il silicio, anche perché si tratta di un elemento molto diffuso in natura.

Il dispositivo elementare di tale tecnologia è la cella fotovoltaica che è in grado di produrre una potenza di circa 1,5 Watt (GSE, 2010); più celle insieme possono essere assemblate per ottenere dei pannelli fotovoltaici. La prima applicazione commerciale della produzione di energia fotovoltaica si ebbe nel 1954 negli Stati Uniti quando i laboratori Bell realizzarono la prima cella fotovoltaica utilizzando il silicio monocristallino. Attualmente esistono due tipi di sistemi fotovoltaici: gli impianti senza accumulo e quelli con accumulo; questi ultimi sono provvisti di accumulatori per (immagazzinare) “mettere in serbo”, durante il giorno e specialmente nelle ore di maggiore irraggiamento solare, l'energia elettrica da utilizzare poi durante la notte o quando il sole è coperto. L'energia viene conservata in batterie ed un regolatore di carica impedisce che la tensione di carica superi un certo valore per salvaguardare l'integrità degli accumulatori. Gli impianti con accumulo sono impiegati nelle “utenze isolate”, cioè là dove gli utilizzatori non essendo collegati alla rete elettrica, non dispongono di alternative energetiche, ed il fabbisogno energetico non potrebbe essere soddisfatto in continuità, con interruzioni dovute alla copertura della luce del sole da parte di nubi o la notte, proprio quando la luce elettrica diventa indispensabile. Gli impianti senza accumulo sono normalmente utilizzati per fornire energia a una rete elettrica già alimentata da generatori convenzionali e servono ad immettervi altra energia.

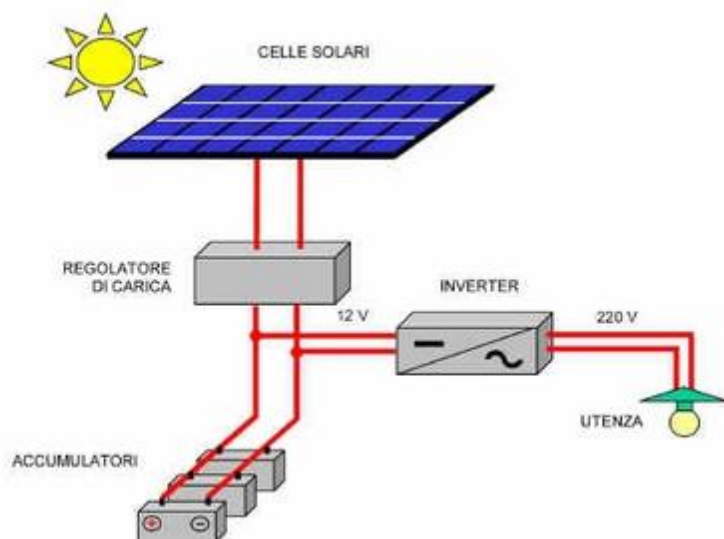


Fig.4 Impianto fotovoltaico.

Gli impianti fotovoltaici installati in Italia a fine 2010 hanno prodotto una quantità di energia pari a 1.905 GWh.

Inoltre con la novità introdotta dal D.M. 5 maggio 2011 (IV Conto Energia), al fine di salvaguardare l'ambiente e contribuire al recupero di materie prime secondarie che possono essere reimmesse nei cicli produttivi, tutti gli impianti fotovoltaici che sono entrati in esercizio successivamente al 30 giugno 2012 devono essere accompagnati da un certificato, rilasciato dal produttore dei moduli, attestante l'adesione del medesimo a un Sistema o Consorzio europeo per garantire il riciclo dei pannelli al termine della loro vita utile.

Aspetti economici:

Purtroppo l'attuale tecnologia fotovoltaica non è ancora competitiva con gli altri sistemi: il costo dell'energia ottenuta da sistemi fotovoltaici è dieci volte superiore al costo dell'energia ottenuta da sistemi eolici. Attualmente un impianto da un KW costa circa 10/15.000 € chiavi in mano, a cui bisogna aggiungere lo 0,5%, che corrisponde al costo annuo di manutenzione da conteggiare su tutto l'arco di vita del sistema (convenzionalmente fissato in 20-25 anni).

3.2. Energia eolica

L'energia eolica è stata largamente utilizzata sin dall'antichità in svariate applicazioni quali la navigazione a vela, la ventilazione dei cereali e l'essiccazione dei prodotti dell'agricoltura e della pesca.

Un impianto eolico (o parco eolico) è costituito in generale da uno o più aerogeneratori che trasformano l'energia cinetica del vento in energia elettrica. Il passaggio dell'aria fa ruotare un rotore, normalmente dotato di due o tre pale, generalmente in fibre di vetro per alleggerire il peso della struttura, collegate ad un asse orizzontale. La rotazione è successivamente trasferita, attraverso un apposito sistema meccanico di moltiplicazione dei giri, ad un generatore elettrico e l'energia prodotta, dopo essere stata adeguatamente trasformata ad un livello di tensione superiore, viene immessa nella rete elettrica.

Le turbine eoliche sono infine montate su una torre, sufficientemente alta per catturare maggiore energia dal vento, evitando la turbolenza creata dal terreno o da eventuali ostacoli. Infatti, la produzione di energia elettrica degli impianti eolici risulta proporzionale al cubo della velocità del vento per cui piccole differenze nelle caratteristiche anemometriche del sito possono tradursi in notevoli differenze di energia realmente producibile. Inoltre un generatore sia ad asse verticale che orizzontale (le turbine ad asse orizzontale sono quelle più note e diffuse, mentre le turbine ad asse verticale, utilizzate fin dall'antichità sono solo ultimamente oggetto di studi e ricerche per migliorare l'efficienza di questa tecnologia) richiede una velocità minima del vento (cut-in) di 3-5 m/s ed eroga la potenza di progetto ad una velocità del vento di 12-14 m/s. Ad elevate velocità (20-25 m/s, velocità di cut-off) l'aerogeneratore viene bloccato dal sistema frenante per ragioni di sicurezza.

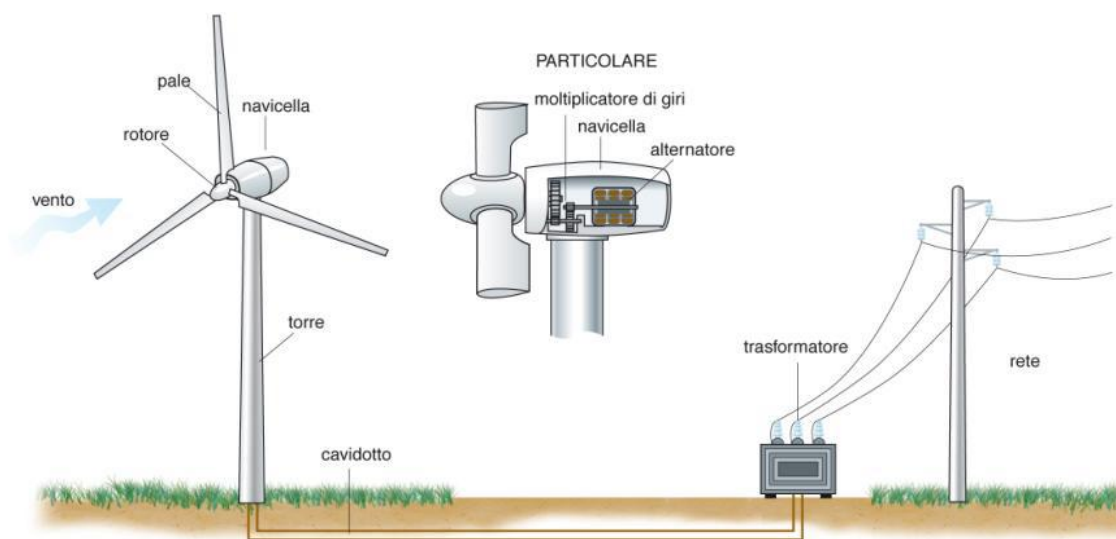


Fig.5 Impianto eolico.

Gli impianti eolici presenti in Italia a fine 2010 erano 487 per una potenza efficiente lorda di 5.814 MW. (GSE, 2010).

Impatto Ambientale:

L'energia prodotta da una turbina eolica durante il corso della sua vita media (circa 20 anni per gli impianti on-shore e più di 25 per gli impianti off-shore), è circa 80 volte superiore a quella necessaria alla sua costruzione, manutenzione, esercizio, smantellamento e rottamazione. Si è calcolato che sono sufficienti ad una turbina due o tre mesi di attività per recuperare tutta l'energia spesa per costruirla e mantenerla in esercizio. Nonostante questo alcune associazioni ambientaliste criticano apertamente l'installazione dei generatori eolici mettendo in evidenza soprattutto la rumorosità dei sistemi e l'impatto

paesaggistico delle torri eoliche. Attualmente, si è calcolato che, ad una distanza superiore a circa 200 metri, il rumore della rotazione dovuto alle pale del rotore si confonde completamente con il rumore del vento che attraversa la vegetazione circostante.

Aspetti economici:

L'energia eolica è diventata l'energia rinnovabile meno costosa, abbassando negli ultimi 15 anni il suo costo di circa l'85%. Poiché la potenza sviluppabile da un aerogeneratore varia col cubo della velocità del vento, l'economia eolica dipende molto dalla ventosità del sito dove viene ubicata.

Attualmente in Italia, il costo di installazione, ipotizzando l'impiego di aerogeneratori da almeno 600 KW di potenza nominale, si può ritenere compreso fra un minimo di 900 €/KW ed un massimo di 1.300 €/KW a cui bisogna aggiungere il costo della macchina pari circa ai 2/3 del costo di installazione.

3.3. Energia idraulica

Questo tipo di energia sfrutta la potenza generata dalla caduta di masse di acqua ad un certo dislivello. La potenza teorica di un impianto idroelettrico è denominato *rendimento globale dell'impianto*; nei moderni impianti idroelettrici esso va dall'80% al 90%, rappresentando un valore molto elevato (in particolare è il valore più elevato tra le varie fonti rinnovabili).

L'impianto idroelettrico trasforma l'energia potenziale dell'acqua in energia meccanica di rotazione della turbina che viene convertita direttamente in energia elettrica tramite il generatore. L'impianto è costituito da opere civili, idrauliche e da macchinari elettromeccanici. Lo schema impiantistico generale di un impianto idroelettrico, riportato nell'immagine sottostante, comprende:

- un'opera di sbarramento del corso d'acqua, costituita da una traversa o una diga, che può determinare un volume d'invaso in alveo tale da consentire o no l'accumulo delle portate naturali; con una o più paratoie di presa, seguite da una vasca di calma per la sedimentazione della sabbia trasportata dalla corrente e paratoie di scarico per la pulizia del bacino contro il suo interrimento;
- un canale di derivazione che può essere in tutto o in parte in galleria e una vasca di carico solitamente dotata di organi di scarico;
- una o più condotte forzate che convogliano l'acqua alle turbine idrauliche;
- un impianto di produzione dell'energia elettrica, in cui sono installate uno o più gruppi turbina-generatore, che scaricano l'acqua turbinata nell'alveo del corso d'acqua a valle dell'impianto, mediante il canale di restituzione, senza alcun consumo dell'acqua prelevata a monte.

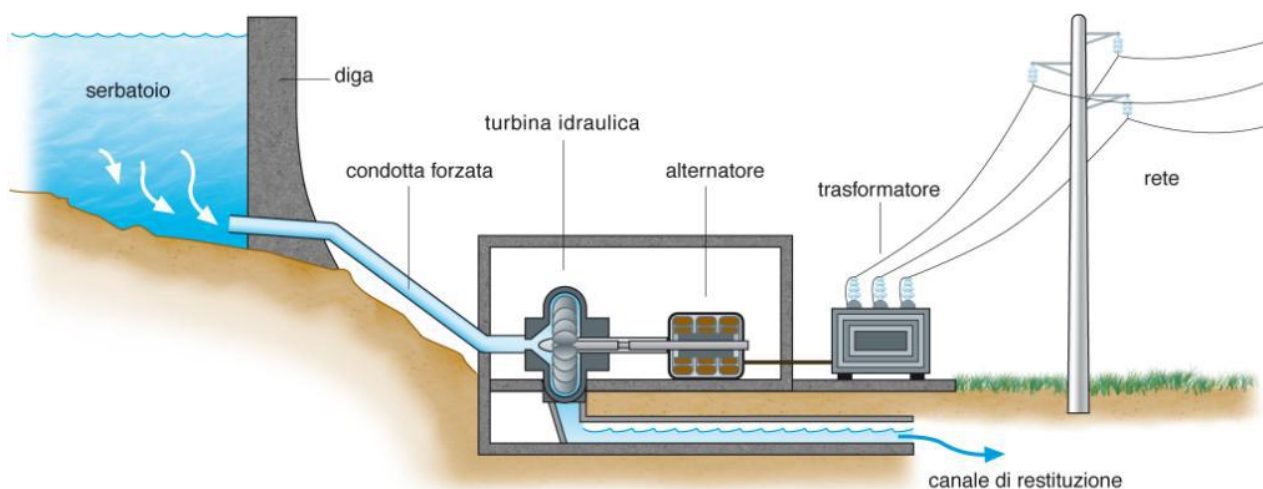


Fig.6 Impianto idroelettrico.

Gli impianti idroelettrici sono classificati in base alla durata di invaso dell'impianto, ossia al tempo necessario per fornire al serbatoio un volume d'acqua pari alla sua capacità utile con la portata media annua del corso d'acqua che in esso si riversa e pertanto si parla di:

5. impianti a serbatoio con durata di invaso maggiore o uguale a 400 ore;
6. impianti a bacino: con un serbatoio classificato come "bacino di modulazione" settimanale o giornaliero, con durata di invaso minore di 400 ore e maggiore di 2 ore;
7. impianti ad acqua fluente: senza serbatoio o che hanno un serbatoio con durata di invaso uguale o minore di 2 ore. Sono generalmente posizionati sui corsi d'acqua o sui canali di bonifica e la loro produzione dipende dalla portata disponibile nel fiume o nel canale. Sono ricondotti a questa categoria anche gli impianti installati negli acquedotti (in questo caso la turbina idraulica sostituisce la valvola di dissipazione del carico).

Nel 2010 la potenza idroelettrica installata ha rappresentato il 59% di quella relativa all'intero parco impianti rinnovabile (GSE, 2010).

Impatto ambientale:

La produzione di energia idroelettrica non provoca emissioni gassose o liquide che possano inquinare l'aria o l'acqua. Gli impianti mini-idroelettrici in molti casi, con la sistemazione idraulica che viene eseguita per la loro realizzazione, portano invece notevoli benefici al corso d'acqua (in particolare la regolazione e regimentazione delle piene sui corpi idrici a regime torrentizio, specie in aree montane ove esista degrado e dissesto del suolo e, possono contribuire efficacemente alla difesa e salvaguardia del territorio). I grandi impianti idroelettrici a bacino possono invece presentare qualche problema in più dal punto di vista dell'inserimento ambientale. Se si realizza una diga per un impianto a bacino si hanno le seguenti conseguenze: a monte dello sbarramento si forma un invaso, e si trasforma, quindi, un ambiente di acque correnti (acque lotiche) in un ambiente di acque ferme (acque lentiche), con un tempo di ricambio delle

acque più lungo e con possibili ricadute sull'ecosistema. A valle dello sbarramento, fino al punto in cui viene rilasciata l'acqua utilizzata dalla centrale, il corso d'acqua potrebbe andare in secca per alcuni periodi se non viene garantito un rilascio continuo affinché il fiume abbia, anche in quel tratto una portata minima adeguata "Deflusso minimo vitale"⁴ (da garantire per legge).

La diminuzione della quantità di acqua e l'effetto filtrante provocato dalla diga stessa, che impedisce il deflusso di sedimenti e minerali, potrebbe avere effetti sulla fauna acquatica e sulla vegetazione ripariale riducendo il carico organico necessario alla sopravvivenza di fauna e flora.

Aspetti economici:

Il costo del KWh ottenuto con i sistemi idroelettrici è sempre stato competitivo nei confronti delle fonti esauribili, in quanto i costi di produzione sono imputabili ai soli impianti di produzione e non ci sono costi per le materie prime.

3.4. Energia geotermica

Un impianto geotermoelettrico ha la funzione di trasformare in energia elettrica l'energia termica presente nel fluido geotermico (vapore d'acqua oppure una miscela di acqua e vapore) che si forma grazie al contatto dell'acqua con strati di roccia calda.

I bacini sfruttati per la produzione elettrica sono caratterizzati da temperature superiori ai 150°C e profondità da poche decine a qualche migliaio di metri. Generalmente un impianto geotermoelettrico è costituito dai seguenti componenti:

- sistema di raccolta, trattamento e convogliamento del fluido geotermico fino all'impianto di produzione dell'energia elettrica (pozzi, sistemi di sicurezza e sfioro a bocca pozzo, tubazioni di trasporto, sistemi di separazione acqua-vapore);
- sistema di produzione dell'energia elettrica (condotto di ammissione in turbina, turbina-generatore, trasformatore elevatore e connessione alla rete elettrica);
- sistema di trattamento del vapore esausto (condensatore e relativa pompa di estrazione condensato, torre di raffreddamento ad aria, sistema di estrazione dei gas incondensabili);
- sistema di reiniezione dell'acqua nel bacino geotermoelettrico.

⁴ Il concetto di "portata minima vitale" o "deflusso minimo vitale" è stato introdotto nel quadro legislativo italiano dalla legge 183/89 (art.3 comma1, lettera i) e poi ripreso dal D. Lgs. 75/93, dalla legge 36/94 e dal D. Lgs. 152/99. E' da sottolineare che il DMV non necessariamente coincide con il valore delle portate naturali di magra che in determinati periodi dell'anno possono essere, in alcuni casi, prossime a zero. In tali situazioni, il valore teorico di portata minima vitale è ottenibile, ove ritenuto necessario, con determinate azioni dei piani di bacino, mirate al raggiungimento di portate sufficienti a sostenere la continuità della "vita acquatica", in particolare attraverso il rilascio di scorte accumulate nei periodi di disponibilità della risorsa idrica. Il DMV è stato ed è uno strumento di particolare interesse gestionale concepito per far fronte alle situazioni critiche che si determinano negli ecosistemi fluviali per effetto della riduzione sensibile delle portate naturali, dovuta a captazioni di risorsa idrica, destinata a usi civili, agricoli o industriali, direttamente dai corsi d'acqua o da serbatoi (invasi) realizzati con lo sbarramento di fiumi o torrenti. Ampia è la gamma dei metodi proposti per la determinazione del DMV: si va da metodi basati su dati relativi alle portate naturali o sulle curve di durata delle portate a metodi sperimentali che utilizzano variabili idrauliche (velocità della corrente, profondità, granulometria del fondo) trasformate con criteri biologici che tengono conto dell'idoneità di tali variabili al mantenimento di specie acquatiche; o metodi che si fondano sulla definizione e classificazione, in termini fisici e biologici, dei differenti habitat per valutare il loro contributo alla struttura e alle funzioni delle biocenosi fluviali.

Possono anche essere presenti sistemi di abbattimento di alcuni composti presenti nei gas incondensabili (idrogeno solforato e mercurio), al fine di limitare l'impatto ambientale dell'impianto.

Le emissioni in atmosfera di questi tipi di impianti dipendono dalle caratteristiche del fluido geotermico ma, per unità di energia prodotta, sono comunque decisamente inferiori a quelle derivanti da impianti alimentati con combustibile fossile.

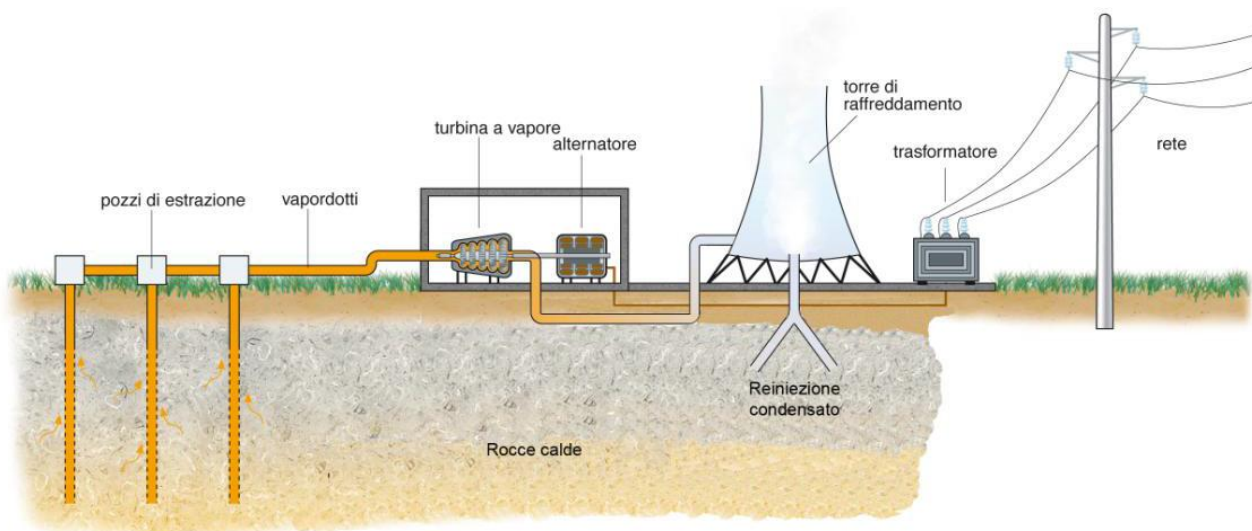


Fig.7 Impianto geotermico.

Nel 2010 il parco impianti installato in Italia ha prodotto una potenza effettiva lorda di 772 MW.

Impatto ambientale:

Il rumore percepibile nell'area di un campo geotermico è principalmente associato alle fasi di perforazione (impatto temporaneo e raramente al di sopra dei 90 dB⁵) e in quello derivante da prove di produzione (raramente al di sopra dei 120 dB). Nella fase di produzione, invece, un dispositivo silenziatore può ridurre il rumore ambientale al di sotto del limite di 65 dB.

Durante la fase di perforazione dei pozzi i rumori dovuti alla perforazione stessa e alle prove di produzione possono causare l'allontanamento temporaneo degli animali dalle zone prospicienti il sito. Durante la fase di sfruttamento i danni ad animali sono pressoché improbabili, a differenza di quanto avviene per la vegetazione che può essere parzialmente danneggiata.

Uno dei maggiori effetti dell'utilizzo dell'energia geotermica è l'inquinamento chimico delle falde acquifere superficiali per contaminazione con i fluidi geotermici profondi. I fluidi geotermici "esausti" contengono inquinanti ad alto rischio ambientale come l'arsenico (As), il boro (B), il mercurio (Hg), l'antimonio (Sb) ed altri metalli pesanti come il piombo (Pb), il cadmio (Cd), il ferro (Fe), lo zinco (Zn) e il manganese (Mn). Litio (Li), ammoniaca (NH₃) e alluminio (Al) possono essere, inoltre, presenti in concentrazioni dannose. Alcuni fluidi geotermici possono causare effetti negativi sull'ambiente, dovuti semplicemente alla loro eccessiva concentrazione salina (brine). Tutti questi effetti di contaminazione

⁵ dB: decibel

chimica possono essere ridotti grazie alla tecnica di re-iniezione di tutti i reflui liquidi nei serbatoi profondi tramite pozzi appositi.

Aspetti economici:

Gli impianti geotermici hanno una vita utile di circa 15-20 anni. E i costi di esercizio sono inferiori di circa il 60% rispetto ad un sistema di riscaldamento con caldaia a metano (per ciò che riguarda gli impianti residenziali).

3.5. Bioenergie

Le bioenergie sono quelle che si ricavano dalle biomasse (Rifiuti urbani biodegradabili e altre Biomasse), Biogas e Bioliquidi. Le biomasse in normativa vengono definite come la “Frazione biodegradabile dei prodotti, rifiuti e residui di origine biologica proveniente dall’agricoltura (comprendente sostanze vegetali e animali) dalla silvicoltura e dalle industrie connesse, comprese la pesca e l’acquacoltura, gli sfalci e le potature provenienti dal verde pubblico e privato, nonché la parte biodegradabile dei rifiuti industriali e urbani” (Decreto Legislativo 28/2011).

La produzione di energia elettrica da biomasse avviene generalmente secondo tre modalità:

- Termotrattamento di rifiuti solidi urbani;
- Utilizzo di biomasse legnose in impianti collegati alla rete;
- Utilizzo di biogas in impianti collegati alla rete.

Legna:

è considerata una delle principali biomasse in quanto risorsa rinnovabile poiché le piante dei boschi cedui (boschi da taglio) hanno una ricrescita di circa 20 anni.

Il rischio legato all’uso di questa fonte rinnovabile deriva dall’abbattimento scriteriato delle foreste che stanno lentamente scomparendo e riducendosi provocando il mancato riassorbimento della CO₂ durante il ciclo fotosintetico delle piante stesse e favorendo fenomeni di frane e smottamenti legate allo sradicamento dell’apparato radicale e delle sue capacità contenitive del terreno.

Biogas:

Il biogas, costituito prevalentemente da metano (almeno il 50%) ed anidride carbonica, si origina da fermentazione anaerobica di materiale organico di origine vegetale ed animale. Il Dlgs 28/2011 parla di “gas di discarica, gas residuati dai processi di depurazione e biogas” a seconda dell’origine e modalità di fermentazione. In effetti tutti i tre tipi di gas indicati sono dei biogas, ma la loro elencazione separata nella normativa richiamata mette in evidenza la molteplicità di matrici organiche da cui il biogas può essere prodotto: rifiuti conferiti in discarica ovvero frazione organica dei rifiuti urbani, fanghi di depurazione, deiezioni animali, scarti di macellazione, scarti organici agro-industriali, residui colturali, colture energetiche. Il biogas ha un ottimo potere calorifico dato l’elevato contenuto in metano, per cui si presta ad una valorizzazione energetica per combustione diretta, attuata in caldaia per sola produzione di calore, o in motori accoppiati a generatori per la produzione di sola elettricità o per la cogenerazione di elettricità e calore.

Va considerato poi che i fanghi derivanti dalla digestione opportunamente trattati possono essere utilizzati come ottimi fertilizzanti per il terreno (Direttiva nitrati 91/676/EEC)⁶ (Tricase, 2009).

Biocombustibili:

Una particolare fonte di energia possono essere considerati i biocombustibili, con il cui termine si indicano sostanze idonee ad essere utilizzate nei processi di combustione derivanti da prodotti vegetali, quindi rinnovabili su base annua. Possono essere solidi, liquidi o gassosi; i liquidi sono particolarmente interessanti e allo stato attuale della tecnica, sono sostanzialmente di due tipi: alcoli e oli. I primi vengono prodotti dalla canna da zucchero (bioetanolo) e possono essere trasformati in ETBE (EtilTerButilEtere) che può essere facilmente miscelato alla benzina senza particolari problemi; i secondi vengono prodotti dalla colza e dalla Jatropha (Tamalampudi, 2008; Leduc, 2009; Ganapathy, 2009) (biodiesel), e possono essere trasformati in estere con caratteristiche molto simili al gasolio. Le emissioni inquinanti dei biocombustibili sono normalmente inferiori a quelle dei combustibili fossili (benzina, gasolio, ecc.). La coltivazione “energy crop” da cui derivano i biocombustibili, non essendo destinata all’alimentazione umana, può comportare l’uso massiccio di erbicidi, pesticidi e concimi di origine chimica, oltre all’uso di varietà geneticamente modificate (OGM). Tra gli svantaggi maggiori però ci sono quello della deforestazione, come accade in Brasile dove è in atto una massiccia deforestazione per l’ampliamento di superfici coltivabili a tale scopo, e il fatto ben più grave che derrate agricole e suoli vengano sottratti alla produzione di alimenti.

Tab.3 Numerosità e potenza degli impianti a bioenergie in Italia.

	2010	
	n°	KW
biomasse:	138	1.242.659
rifiuti urbani	71	797.929
altre biomasse	67	444.730
biogas:	451	507.704
rifiuti	228	341.338
fanghi	47	14.569
deiezioni animali	95	41.371
attività agricole e forestali	81	110.426
bioliquidi:	97	601.182
oli vegetali grezzi	86	510.016
altri bioliquidi	11	91.166
bioenergie	669	2.351.547

⁶ La Direttiva Nitrati mira alla regolamentazione della gestione degli effluenti, indirizzando gli stati membri dell’UE a:

- Individuare le zone vulnerabili da nitrati di origine agricola (ZVN), nelle quali è introdotto il divieto di spargimento degli effluenti degli allevamenti oltre un limite massimo annuo di 170 Kg di N per ettaro;
- Regolamentare l’utilizzazione agronomica degli effluenti zootecnici;
- Elaborare codici di buona pratica agricola (CBPA) di riferimento per gli agricoltori.

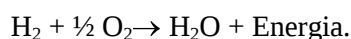
Le fonti rinnovabili e sostenibili di energia contribuiscono sempre più al nostro fabbisogno energetico. La maggior parte di queste fonti di energia sono però limitate a determinate località come le zone ricche di vento o di sole, e l'energia deve essere trasportata dai luoghi di produzione a quelli in cui è necessaria. Inoltre, l'energia deve essere immagazzinata, poiché la maggior parte delle fonti di energia rinnovabile non sono disponibili con continuità.

CAPITOLO IV
L'IDROGENO: METODI DI PRODUZIONE

Per prevenire e contrastare il peggioramento delle condizioni ambientali, le nazioni tecnologicamente avanzate stanno investendo risorse per la ricerca e lo sviluppo di fonti energetiche alternative.

In tale scenario si è aperto un vivace dibattito sull'idrogeno quale futuro vettore energetico. Sebbene molto abbondante in natura, l'idrogeno si trova però praticamente sempre legato ad altri elementi. Dunque la forma libera H_2 deve essere prodotta a partire da altre molecole, in particolare idrocarburi o acqua, ed è per questa ragione che ci si riferisce ad esso in termini di *vettore energetico* e non di fonte energetica.

Teoricamente i benefici dell'idrogeno lo rendono un componente ideale per lo sviluppo del concetto di energia rinnovabile e sostenibile. La produzione dell'idrogeno è una forma di immagazzinamento di energia la quale viene restituita al momento dell'impiego finale dell'idrogeno. La reazione di combustione dell'idrogeno è la seguente:



Come vettore energetico esso presenta degli indubbi vantaggi: oltre ad essere un combustibile pulito (l'unica emissione inquinante è costituita da ossidi di azoto, NO_x , con miscele povere di H_2 , ad alte temperature di combustione), in quanto 1 kg di H_2 fornisce 33.4 kWh, 9 kg di H_2O , e nessuna emissione di CO_2 ; inoltre, in termini di resa energetica l'idrogeno è il miglior combustibile che si conosca: la sua combustione rende, a parità di peso, oltre tre volte il calore sviluppato dal petrolio. Grazie all'elevata efficienza di conversione, riciclabilità e natura non inquinante è considerato il biocarburante del futuro (DAS e VEZIROGLU, 2001).

Tab.4 Tabella confronto potere calorifici dei combustibili.

Higher Calorific Value	
Fuel	KJ/KG
Lignite	16,3
Glycerin	19
Acetone	29
Charcoal	29,6
Ethanol	29,7
Alcohol, 96%	30
Tar	36
Ether	43
Petroleum	43
Turpentine	44
Diesel	44,8
Gasoline	47,3
Petrol	48
Butane	49,5
Propane	50,3
Methane	55,5
Hydrogen	141,8

Tutti i processi fisici e/o chimici più in uso per la produzione d'idrogeno (es. Elettrolisi, steam-reforming del carbone o del metano, etc.) hanno un elevato costo energetico con un bilancio energetico negativo.

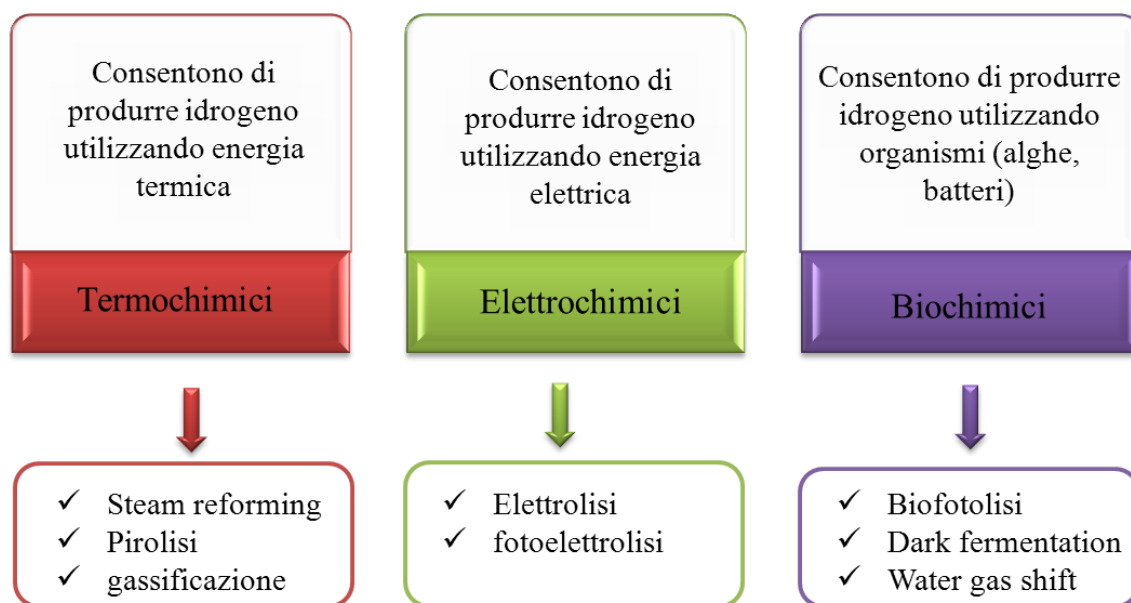


Fig.8 Classificazione delle tecnologie di produzione dell'idrogeno in funzione dell'energia impiegata.

4.1. Processi termochimici

Steam reforming

Lo steam reforming implica la reazione di metano e vapore in presenza di catalizzatori. Tale processo, su scala industriale, richiede una temperatura operativa di circa 800 °C ed una pressione di 2,5 MPa. La prima fase consiste nella decomposizione del metano in idrogeno e monossido di carbonio. Nella seconda fase, chiamata "shift reaction", il monossido di carbonio e l'acqua si trasformano in biossido di carbonio ed idrogeno (National Renewable Energy Laboratory, 1995). Il contenuto energetico dell'idrogeno prodotto è, attualmente, più elevato di quello del metano utilizzato ma l'enorme quantità d'energia richiesta per il funzionamento degli impianti fa scendere il rendimento del processo a circa 65% (Morgan e Sissine, 1995). Tramite assorbimento o separazione con membrane, il biossido di carbonio è separato dalla miscela di gas, la quale viene ulteriormente purificata per rimuovere altri componenti. Il gas rimanente, formato per circa il 60% da parti combustibili, è utilizzato per alimentare il reformer (Zittel e Wurster, 1996).

Pirolisi

La pirolisi o distillazione secca, è un processo di tipo chimico che avviene in reattori chiusi provocando la scissione di materiale di origine organica in catene molecolari più corte. Il tutto avviene in assenza di ossigeno o di altri ossidanti. Per mezzo della decomposizione termica, le molecole complesse delle sostanze organiche vengono spezzate in elementi semplici e separabili. Essa consiste nel riscaldare la sostanza a 500-

1850 °C (Pereira et al., 2002) in assenza di aria, in opportuni impianti, con ottenimento di sostanze volatili e di un residuo solido.

Gassificazione

La gassificazione può essere definita come la conversione termochimica (700-800°C) di un combustibile solido o liquido in un gas o miscela gassosa (syngas), attuata mediante la presenza di un agente gassificante ed altri reagenti (aria/ossigeno e/o acqua/vapore) conducendo ad una sua parziale combustione. Il processo nel complesso è formato concettualmente da tre fasi: una prima fortemente esotermica di combustione, una seconda di pirolisi ed infine la conversione del carbonio in gas (CO, H₂, CH₄; gassificazione propriamente detta).

4.2. Processi elettrochimici

Elettrolisi

Questo processo fu applicato per la prima volta da Sir William Grove, nell'anno 1839. La reazione può essere fatta avvenire a temperature prossime a quella ambiente soltanto fornendo energia come lavoro elettrico in un reattore elettrochimico. A fini pratici per scindere l'acqua nei suoi elementi è necessaria un'energia pari ad almeno 286kJ/mol.

L'elettrolizzatore è costituito da: un elettrodo (catodo) al quale avviene la formazione di H₂, un elettrodo (anodo) al quale avviene la formazione di O₂. Tra questi due elettrodi è interposta una soluzione contenente un elettrolita di supporto che deve assicurare il trasporto elettrico in forma ionica in aggiunta agli H⁺ e OH⁻ e garantire il corretto svolgersi delle reazioni agli elettrodi. Nella maggior parte dei casi per impedire il contatto e la ricombinazione dei gas che si formano ai due elettrodi è necessario dividere la soluzione in due scomparti separati da un opportuno diaframma o membrana. Un flusso di elettroni, mossi da una f.e.m.⁷ esterna, reagiscono al catodo con l'acqua liberando H₂ gassoso e OH⁻ i quali possono muoversi verso l'anodo, dove avviene la reazione di parziale riduzione degli ossidrilioni a O₂ con riformazione di acqua e immissione di elettroni nel circuito esterno. L'elettrolisi è il metodo più comune per la produzione di idrogeno anche se incontra notevoli ostacoli per la quantità limitata di idrogeno prodotta e per i costi, ancora troppo elevati, dovuti all'impiego di energia elettrica. Attualmente, solo il 4% della produzione mondiale di idrogeno avviene per elettrolisi dell'acqua e solo per soddisfare richieste limitate di idrogeno estremamente puro (Padrò e Putsche, 1999).

Tecnologie foto elettrochimiche

I sistemi fotoelettrochimici, scoperti già nel 1972, usano degli elettrodi semiconduttori in una cella fotoelettrochimica per convertire energia ottica in energia chimica. Esistono essenzialmente due tipologie di tali sistemi: una utilizza semiconduttori, l'altro metalli complessi dissolti. Nel primo tipo, un materiale

⁷ F.e.m.: forza elettromotrice

semiconduttore è utilizzato sia per assorbire l'energia solare sia per agire da elettrodo per la scissione dell'acqua. Questa tecnologia è ancora ai primi stadi del suo sviluppo sebbene l'efficienza di conversione dell'energia sia cresciuta da meno dell'1%, nell'anno 1974, all'attuale 10-12%. Efficienze ancora più elevate sono state ottenute con l'aggiunta di una carica elettrica esterna per facilitare la reazione chimica. L'azione a lungo termine di tali sistemi è limitata dalla corrosione dei materiali semiconduttori indotta dalla luce ed altri effetti chimici.

La tecnologia fotoelettrochimica permette di ottenere idrogeno dall'elettrolisi operata mediante energia solare su apposite celle costituite da un sistema a semiconduttori. E' ancora in via di sviluppo e l'obiettivo è quello di migliorarne l'efficienza, aumentarne la durata e contenere il costo. Vengono utilizzate particolari membrane in grado di ottenere idrogeno direttamente dal gas naturale separando l'ossigeno dall'aria. Si riscalda l'aria a 600°C e la si indirizza poi attraverso il reattore in cui è presente la membrana. Si genera quindi ossigeno che, convogliato verso un reticolo cristallino, reagisce con i catalizzatori del reformer. Viene prodotta, così, una miscela di gas contenente idrogeno e monossido di carbonio. Esso è infine purificato per isolare unicamente l'idrogeno.

4.3. Processi biochimici

Biofotolisi

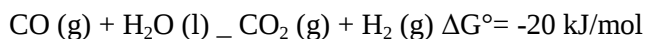
Sono processi innovativi e in fase di sperimentazione ma che nel breve termine non verranno utilizzati nella produzione dell'idrogeno in quanto oltre ad essere in fase di studio comporterebbero applicazioni energetiche improbabili e problematiche tecniche complesse. Infatti con le efficienze previste si può immaginare una resa dell'ordine di pochi KWh/Ha e la difficoltà di realizzare grandi superfici con materiali impermeabili all'idrogeno.

Tali processi sfruttano l'attitudine di alcune alghe e di alcuni batteri a produrre idrogeno in condizioni particolari. Assorbendo l'energia solare queste alghe separano l'idrogeno dall'acqua utilizzando un enzima (idrogenasi) con un'efficienza del 5%. Tuttavia, gli enzimi dell'alga vengono distrutti dall'ossigeno che si libera dalla scissione dell'acqua. Esistono, però, organismi che riescono a sopperire a questo problema e sono attualmente in fase di studio.

La ricerca su questo fronte ha due strade di sviluppo: "whole-cell" e "cell-free". La prima consiste nell'adozione di batteri che sembrano offrire a breve termine un'efficienza di conversione pari al 10%. La seconda, "cell-free", nell'impiego esclusivo dei soli enzimi produttori di idrogeno, con efficienze di circa 30%.

Water gas shift

Alcuni batteri fotoeterotrofi, appartenenti alla famiglia delle rodospirillacee, possono crescere al buio, usando CO come sola fonte di carbonio, per generare ATP, idrogeno e CO₂, mediante una reazione di via "water gas shift":



In questi organismi la reazione al buio è mediata da un complesso enzimatico CODeidrogenasi (CODH). Il *Rubrivivax gelatinosus* è un non sulphur-batterio che non solo garantisce la “water gas shift” della CO all’oscurità, convertendo il 100% della CO atmosferica nella quantità stechiometrica di H₂, ma assimila anche la CO in nuova massa cellulare alla luce (via fissazione della CO₂), quando la CO è la sola fonte di carbonio. Anche quando un substrato organico (quindi più favorevole) è disponibile con la CO, vengono utilizzati entrambi simultaneamente. Le rese del *Rubrivivax gelatinosus* si aggirano sulle 96 mmolH₂/l h.

Il vantaggio potenziale di questo processo è che opera a temperatura ambiente, pressioni basse ed in unico passaggio, in contrasto con i catalizzatori chimici che richiedono alte temperature e stadi multipli. Il processo di “biological water gas shift” più studiato prevede una prima fase di produzione di cellule in fotobioreattori ed una seconda fase di utilizzazione dei batteri così prodotti per la generazione di idrogeno.

Dark fermentation

La produzione d’idrogeno per via fermentativa è uno dei più antichi processi della vita: viene prodotto da molti e differenti microorganismi che sono in grado di ricavare energia da substrati organici (eterotrofi). Il processo fermentativo ha il vantaggio di produrre in modo semplice e rapido rese elevate di produzione di idrogeno rispetto alla foto-fermentazione. Inoltre ha il vantaggio di produrre idrogeno da scarti organici ottenendo il duplice vantaggio di produrre energia pulita e riciclare i rifiuti.

Durante la degradazione dei substrati organici vengono rilasciati protoni che possono agire da accettori di elettroni e produrre idrogeno molecolare in presenza dell’enzima idrogenasi (Sinha et al., 2011).

I microrganismi eterotrofi quindi traggono energia da un substrato, trasformandolo attraverso una serie di reazioni metaboliche che prendono il nome di catabolismo. Esistono diversi tipi di cammini metabolici e tra classe e classe di microrganismi c’è una certa variabilità riguardo a quali di questi percorsi siano percorribili. A determinare la capacità di un microrganismo a compiere un processo metabolico è il suo patrimonio genetico, nel quale sono contenute le informazioni per la sintesi degli enzimi che catalizzano ciascuna reazione metabolica.

A seconda delle specie batteriche presenti, dei substrati organici impiegati e quindi delle condizioni di fermentazione, il processo porta alla formazione di un’abbondanza di piccole molecole organiche, acidi grassi volatili (butirrato, acetato, lattato, malato) e alcoli (etanolo, propandiole butandiole) (REDWOOD, 2009). La resa teorica (moli di idrogeno prodotto per mole di substrato consumato) varia in funzione del pathway metabolico, ovvero dell’acido organico/alcool prevalente accumulato nel corso della fermentazione, ed è a sua volta l’espressione degli adattamenti degli organismi stessi ai “fattori ecologici” dell’ambiente di fermentazione (LI, 2007; HALLENBECK, 2009).

CAPITOLO V

LA DIGESTIONE ANAEROBICA

Il processo di digestione anaerobica consiste in una sequenza di reazioni biochimiche ad opera di diversi microrganismi che, in assenza di ossigeno, trasformano un substrato organico in molecole gassose semplici, quali l'idrogeno, il metano e l'anidride carbonica, ed energia utilizzata dai batteri per mantenere le proprie attività metaboliche, riprodursi e sintetizzare tali molecole gassose. La percentuale di metano nel biogas varia a seconda del tipo di sostanza organica digerita e delle condizioni di processo. Affinché il processo abbia luogo è necessaria l'azione di diversi gruppi di microrganismi in grado di trasformare la sostanza organica in composti intermedi, principalmente acido acetico, anidride carbonica ed idrogeno, utilizzabili dai microrganismi metanigeni che concludono il processo producendo il metano. Spesso i consorzi microbici lavorano in sintrofia svolgendo ruoli diversi nell'ambiente in cui sono stati attivati. Il biogas che viene prodotto dal processo fermentativo anaerobico è il risultato di una sequenza di trasformazioni. All'interno del processo di digestione, la fermentazione orientata alla produzione di idrogeno è riconducibile ad un attuazione incompleta del processo fermentativo classico, bloccato prima della fase metanigena. L'ultima fase, quella metanigena, è a tutti gli effetti una fase che consuma il quantitativo di idrogeno prodotto nelle fasi precedenti (Ruggeri et al., 2008).

Le tecniche di digestione anaerobica possono essere suddivise in due gruppi principali:

- digestione a secco (dry digestion), quando il substrato avviato a digestione ha un contenuto di sostanza secca superiore al 20%;
- digestione a umido (wet digestion), quando il substrato ha un contenuto di sostanza secca inferiore al 10%; è la tecnica più diffusa, in particolare con i liquami zootecnici.

La produzione di idrogeno per dark fermentation è un processo biologico naturale caratteristico delle prime due fasi della digestione anaerobica (idrolisi-acidogenesi) in cui i batteri coinvolti idrolizzano le macromolecole e ossidano parzialmente i substrati organici con produzione di H_2 e CO_2 . Le successive due fasi della digestione anaerobica (acetogenesi-metanogenesi) portano alla produzione di biogas, una miscela composta per il 50-70% da metano e per il 50-30% da anidride carbonica.

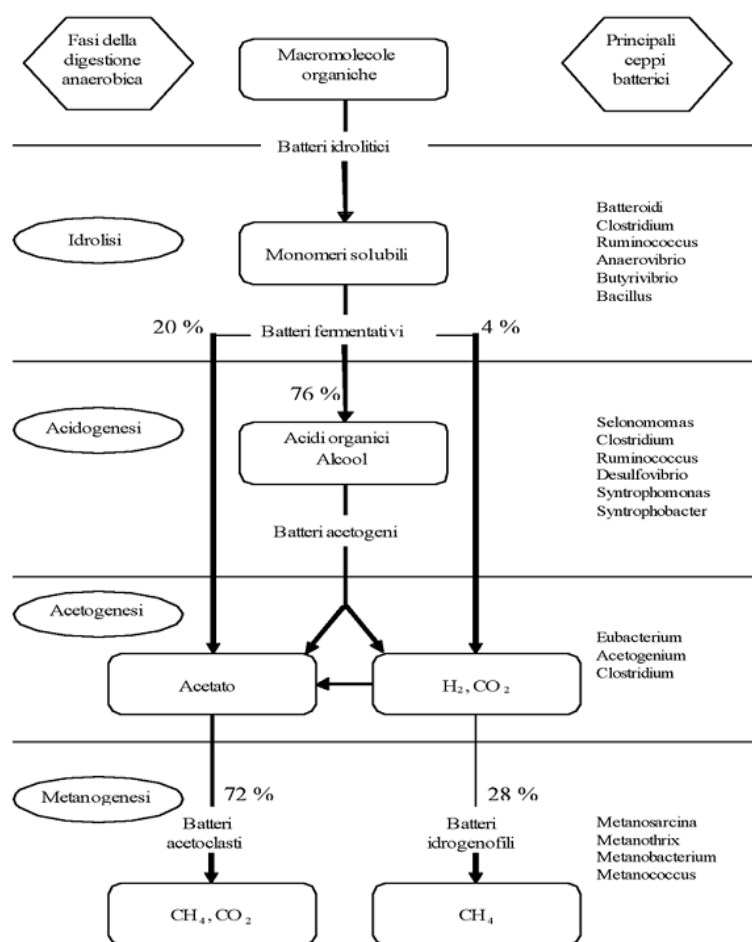


Fig.9 Fasi della digestione anaerobica (Gujer e Zehnder,1983).

5.1. Idrolisi

È la prima fase della digestione anaerobica in cui le molecole vengono scisse nei rispettivi monomeri costituenti. Questa fase è tra le più importanti, ed è ritenuta essere un vero e proprio “collo di bottiglia” per l'intero processo, poiché non tutti i batteri hanno capacità idrolitiche. La quantità di substrato idrolizzato contribuisce infatti a determinare le rese del processo. Determinante in questa fase è il ruolo di batteri idrolitici in grado di scindere le macromolecole organiche e permettere ai batteri idrogeno produttori di fermentare il substrato idrolizzato.

5.2. Acidogenesi

È il processo in cui avviene la trasformazione dei monomeri che costituiscono le macromolecole in acidi a basso peso molecolare (ad esempio acido acetico, propionico, butirrico e valerico).

5.2.1. La glicolisi

La glicolisi (via di Embden-Meyerhof-Parnas) è la principale via che precede numerose fermentazioni. Nelle reazioni fermentative la fosforilazione avviene a livello del substrato e l'energia derivata dall'ossidazione dell' NADH non viene utilizzata per la produzione di ATP, ma è in genere dissipata sotto forma di calore. Il metabolismo chiave del processo di fermentazione è l'acido piruvico in cui vengono convertiti quasi tutti i composti a 6, 5, 4 atomi di carbonio. La demolizione del glucosio si divide in due fasi:

fase preparatoria dove vengono consumate 2 molecole ATP e formato fruttosio 1,6-bisfosfato e fase di recupero energetico con formazione di piruvato e 4 molecole di ATP.

Una molecola di glucosio viene fosforilata (con il consumo di 1 ATP) a glucosio 6-P; mediante isomerizzazione ed un'ulteriore fosforilazione (che comporta il consumo di una seconda molecola di ATP) produce fruttosio-1,6-bisfosfato, che viene poi scisso in due molecole di gliceraldeide 3-fosfato. A questo punto si ha la deidrogenazione della molecola di fosfoglicerato, con il trasferimento dell'idrogeno all' NAD che viene ridotto a NADH . L'energia liberata dalla reazione viene utilizzata per legare un fosfato inorganico alla fosfogliceraldeide ridotta che viene così trasformata in acido 1,3-bisfosfoglicerato. Le 2 molecole di acido 1,3-bisfosfoglicerato trasferiscono il radicale fosforico a due molecole di ADP formando ATP e trasformandosi in acido 3-fosfoglicerico. E' questa la reazione che si chiama fosforilazione a livello del substrato. L'acido 3-fosfoglicerico a sua volta si trasforma in acido 2-fosfoglicerico che, per perdita di una molecola d'acqua, dà luogo alla forma enolica dell'acido fosfoenolpiruvico. Le due molecole di acido fosfoenolpiruvico cedono a loro volta il radicale fosforico ad altre due molecole di ADP formando due molecole di ATP e trasformandosi in acido piruvico. La resa netta è di 2 molecole di ATP per molecola di glucosio entrata nella via metabolica.

5.2.2. La fermentazione

In assenza di accettori di elettroni forniti dall'esterno, molti organismi compiono reazioni di ossido-riduzione dei composti organici internamente bilanciate, con rilascio di energia; questo processo è chiamato fermentazione.

La fermentazione è un processo metabolico anaerobico in cui il donatore e accettore di elettroni (e^-) sono molecole organiche. Più precisamente, nel corso della fermentazione, un composto organico funge da donatore di e^- , ossidandosi e generando nel contempo NADH (cioè NAD in forma ridotta). Il coenzima nicotinamide adenina dinucleotide ridotto (NADH) non può scaricare i suoi elettroni nella catena di trasporto; perciò per rigenerare il pool di NAD^+ necessario per il proseguimento del processo, avviene la riossidazione dell' NADH a spese di un composto intermedio del processo, che funge da accettore di e^- . La fermentazione è quindi un processo ossido-riduttivo bilanciato al suo interno.

Quando un organismo catabolizza un composto organico in un metabolismo energetico deve affrontare due problemi:

- Eliminare gli elettroni rimossi dal donatore di elettroni;
- Conservare, convertendola, in ATP parte dell'energia liberata durante il processo.

Nella fermentazione non si ha la completa demolizione del composto di partenza, che viene solo parzialmente fermentato in uno o più prodotti finali per lo più ancora organici, che mantengono ancora parte dell'energia del composto iniziale. Pertanto la resa energetica della fermentazione non è paragonabile a quella dei processi respiratori e l'ATP (adenosina trifosfato), un composto di fosfato ad alta energia, viene generato soltanto per trasferimento di un gruppo fosfato legato ad un intermedio del processo con un legame ad alto contenuto energetico all'ADP (fosforilazione a livello del substrato).

In diverse fermentazioni il bilancio ossidoriduttivo viene mantenuto producendo idrogeno molecolare. Generalmente la produzione di idrogeno è associata alla presenza nell'organismo di una proteina ferro-zolfo chiamata ferredossina, un trasportatore di elettroni a basso potenziale di ossidoriduzione. Il trasferimento di elettroni dalla ferredossina a H^+ è catalizzato dall'enzima idrogenasi. La diversità delle fermentazioni e dei percorsi metabolici utilizzati dai batteri porta alla formazione di un'alternativa di prodotti metabolici e poiché l'idrogeno ha il compito di mantenere il bilancio ossidoriduttivo, prodotti finali più ridotti determineranno una minor produzione di idrogeno. Ad esempio quando l'etanolo, più ridotto dell'acetato, viene prodotto sarà minore la produzione di idrogeno. Diversi batteri producono tra i prodotti della fermentazione acetato. La produzione di acetato è energeticamente vantaggiosa perché consente all'organismo di produrre ulteriore ATP, sempre mediante fosforilazione a livello del substrato. L'intermedio generato durante la produzione di acetato è l'Acetil-CoA, un intermedio ad alta energia, che può essere convertito in acetilfosfato, il cui gruppo fosfato è poi trasferito all'ADP con formazione di ATP e acetato.

5.3. Acetogenesi

Il terzo stadio della catena trofica di digestione anaerobica è rappresentato dall'acetogenesi. In questa fase gli acidi grassi volatili precedentemente prodotti vengono convertiti in acido acetico, anidride carbonica e idrogeno.

5.4. Metanogenesi

La produzione di metano rappresenta la conclusione della catena trofica anaerobica. La sua produzione può avvenire essenzialmente attraverso due differenti vie di reazioni: una via prevede la metanogenesi ad opera dei batteri idrogenotrofi, che operano l'ossidazione anerobica dell'idrogeno, mentre la seconda via, la cosiddetta via acetoclastica, prevede la dismutazione anerobica dell'acido acetico con formazione di metano ed ossido di carbonio. La maggior parte della produzione di metano avviene attraverso questo secondo meccanismo.

Il monitoraggio della quantità e della composizione del biogas (almeno in termini di metano e biossido di carbonio) del biogas è di fondamentale importanza per il controllo della stabilità del processo di digestione anerobica. Se il reattore sta operando in condizioni di stabilità la produzione e la composizione del biogas risultano costanti. Una diminuzione nella produzione complessiva di biogas e un aumento di percentuale di CO_2 possono indicare fenomeni di inibizione del processo. Ne consegue che l'analisi della produzione e della composizione percentuale del biogas dovrebbe sempre essere associata al controllo di parametri quali la concentrazione degli acidi grassi volatili.

CAPITOLO VI

DARK FERMENTATION

La produzione d'idrogeno per via fermentativa è uno dei più antichi processi della vita: viene prodotto da molti e differenti microorganismi che sono in grado di ricavare energia da substrati organici (eterotrofi). Ciò significa che gli organismi eterotrofi possono produrre idrogeno anche da fonti rinnovabili, quali le biomasse di scarto agricolo forestale, la frazione organica dei rifiuti municipali, le acque reflue di attività industriali e agricole, offrendo la possibilità di ottenere energia in modo economicamente ed ecologicamente ancor più sostenibile. Oltre a contenere i costi di smaltimento dei rifiuti, trasformandoli in risorsa, si indirizzano i processi produttivi agroalimentari e/o industriali verso circuiti chiusi, che massimizzano il riciclo dei materiali. E' un processo che può avvenire a pressione e temperatura ambiente, senza aggiunta di input energetici esterni, quindi è un processo a bilancio energetico positivo.

A seconda delle specie batteriche presenti, dei substrati organici impiegati e quindi delle condizioni di fermentazione, il processo porta alla formazione di un'abbondanza di piccole molecole organiche, acidi grassi volatili (butirrato, acetato, lattato, malato) e alcoli (etanolo, propandiol, butandiol) (REDWOOD, 2009). La resa teorica (moli di idrogeno prodotto per mole di substrato consumato) varia in funzione del pathway metabolico, ovvero dell'acido organico/alcool prevalente accumulato nel corso della fermentazione, ed è a sua volta l'espressione degli adattamenti degli organismi stessi ai "fattori ecologici" dell'ambiente di fermentazione (LI, 2007; HALLENBECK, 2009).

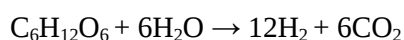
L'accumulo di tali metaboliti, mentre da una parte costituisce un fattore limitante per la produzione di idrogeno, dall'altra costituisce un valore aggiunto per l'intero processo in quanto essi stessi possiedono un intrinseco valore energetico. A seconda della loro natura, queste molecole possono essere utilizzate come substrato per ulteriore produzione di energia. Se si indirizza questa seconda fase verso l'idrogeno le possibili soluzioni impiantistiche sono:

a) foto-bioreattori in cui batteri rossi non solfurei producono H_2 in condizioni di illuminazione nel vicino infrarosso;

b) adozione della recentissima tecnologia dell'idrolisi organica in cui una cella elettrolitica, con caratteristiche costruttive avanzate (con batteri adesi all'anodo ed al catodo), stimolata con una differenza di potenziale di circa 0,4 volts, sviluppa idrogeno.

Una più fattibile alternativa è data dal trasferimento dei metaboliti in reattori destinati alla produzione di biometano, indicato dall'UE tra le fonti energetiche rinnovabili ed ecologiche che contribuisce all'autonomia energetica. Tale tecnologia, consolidata e ormai diffusa su larga scala, è inizialmente nata con l'obiettivo di ridurre gli impatti ambientali sull'aria e nel suolo derivanti dalle deiezioni animali (Tricase e Lombardi, 2009).

La resa teorica massima per mole di esoso da una completa conversione del glucosio è di 12 moli di idrogeno (Davila-Vazquez et al., 2008):



Ciò non consentirebbe però di produrre energia necessaria alla crescita dei batteri (Hallenbeck, 2005).

La resa di produzione del processo da glucosio (moli di H_2 /moli di substrato) varia a seconda dei prodotti finali che si formano, infatti come precedentemente già detto, l'idrogeno si forma esclusivamente per

bilanciare la reazione di ossidoriduzione, a seconda se il substrato sia più o meno ridotto si formerà meno o più idrogeno.

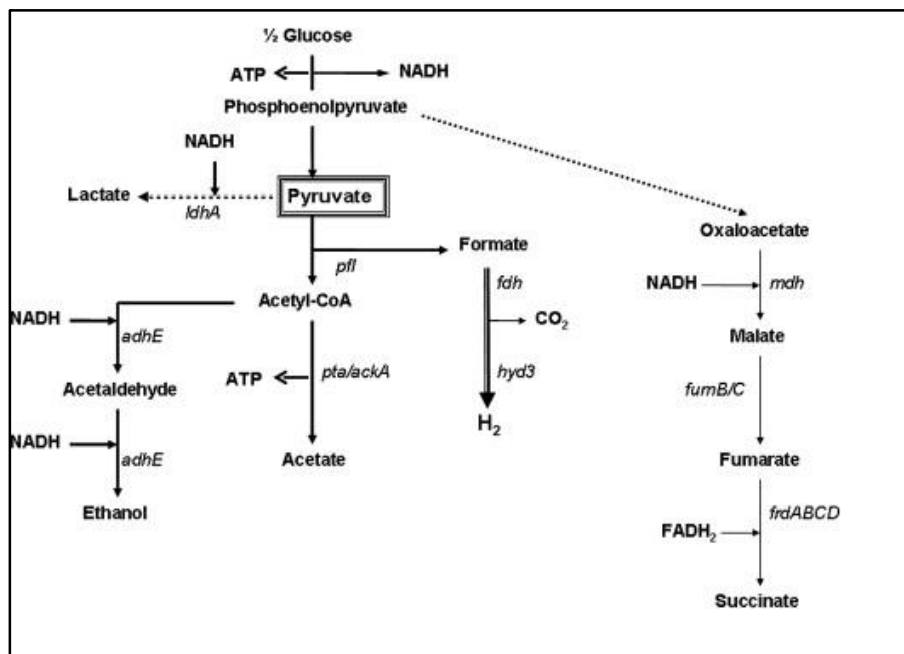
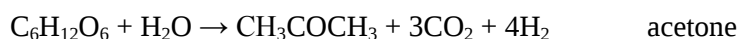


Fig.10 Catabolismo fermentativo (Hallenbeck, 2009).

La fermentazione acetica e butirrica insieme alla produzione di acetone assicurano il maggior accumulo di NADH corrispondente alla maggiore produttività di H_2 .



Inoltre anche la decomposizione dell'acido formico, sottoprodotto della fermentazione acetica e alcolica sintetizza idrogeno. Per questo la fermentazione acetica appare la più promettente per la sintesi d' H_2 e assicura una produttività potenziale di 4 moli d' H_2 per mole di glucosio, mentre la butirrica arriva ad un massimo di 2 moli.



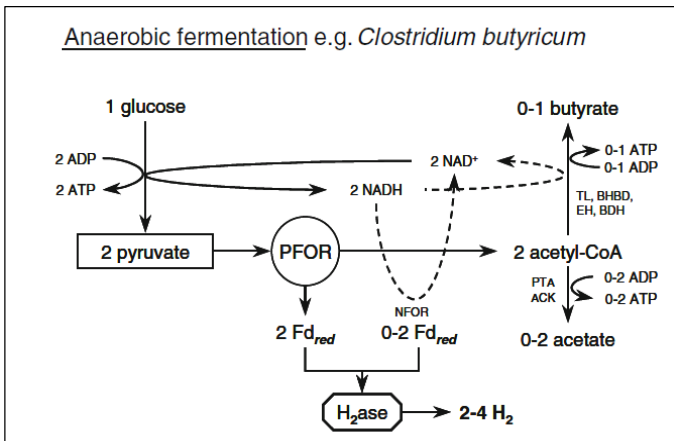


Fig.11 pathway metabolici dark fermentation (Redwood, 2009).

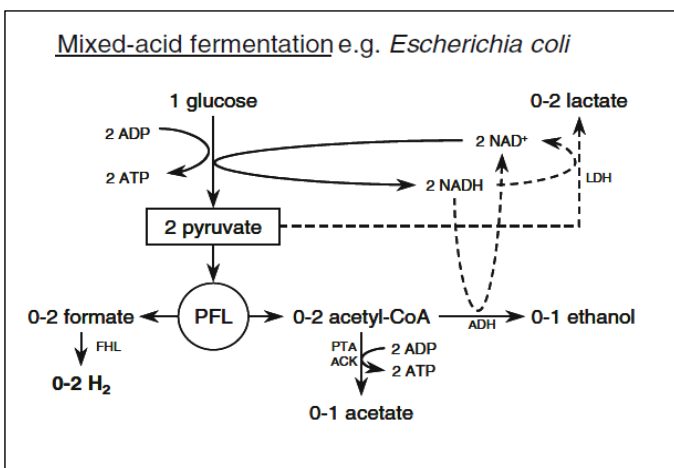


Fig.12 pathway metabolici dark fermentation (Redwood, 2009).

6.1. Principali parametri di processo e fattori di inibizione

In una popolazione batterica naturale mista e non i microorganismi fermentatori possiedono differenti complessi enzimatici e possono seguire più di un *pathway* metabolico, ma a discriminare quale diventi prevalente sono i parametri riferiti principalmente a :

- pH
- Temperatura
- Pressione parziale di idrogeno
- HRT (tempo di ritenzione idraulica)
- VFA (acidi organici volatili)
- *resource mapping* (quantità e tipo di substrato di fermentazione)
- concentrazione ioni metallici

6.1.1. pH

L'acidità del medium di fermentazione ha influenza non solo sulle condizioni di vitalità della biomassa ma anche sul tipo di prodotto. La variazione del pH si traduce in una variazione delle condizioni elettrostatiche (ioni H^+) che porta ad una modifica nella conformazione dell'enzima e dell'attività enzimatica responsabile dei processi metabolici riducendone l'azione catalitica. Può portare alla trasformazione dei substrati nutritivi trasformandoli in sostanze tossiche.

pH inferiori a 6-5,5 evitano il proliferare di batteri metanigeni (responsabili del consumo di idrogeno), ma pH inferiore a 5 riduce la produttività d' H_2 determinando uno shift metabolico in favore dell'acido lattico. Inoltre pH inferiore a 4,6 converte la fermentazione butirrica in etanolica riducendo le rese di produzione (Li et al., 2007).

Alcuni studi hanno dimostrato che un pH iniziale basso (4-4,5) può causare una più lunga fase stazionaria rispetto ad un pH iniziale alto (9) (Cai et al., 2004). Tuttavia la resa di idrogeno è più bassa con un pH iniziale alto, infatti ciò determina una rapida produzione di idrogeno e di acidi grassi che inibiscono le capacità tamponanti e i batteri non riescono ad adattarsi al repentino cambiamento ambientale (Khanal et al., 2004).

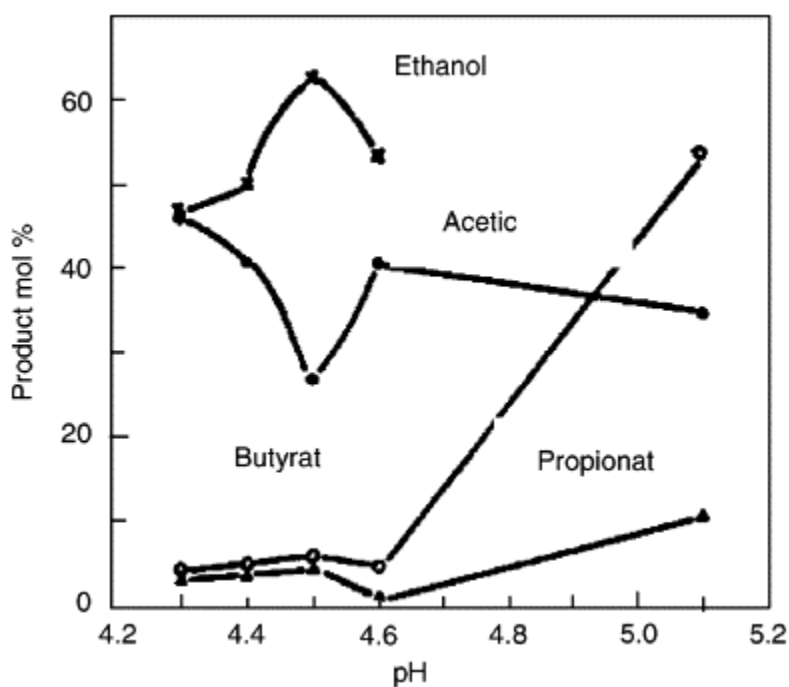


Fig.13 effetto del pH sui prodotti di fermentazione (Li, 2007).

6.1.2. Temperatura

La temperatura influenza tutte le attività fisiologiche dei microrganismi e i tassi di conversione dei prodotti di fermentazione. I batteri idrogeno produttori sono molto sensibili a variazioni di temperatura e il tasso di produzione subisce diverse fluttuazioni prima di stabilizzarsi ad una data temperatura (Li et al., 2007).

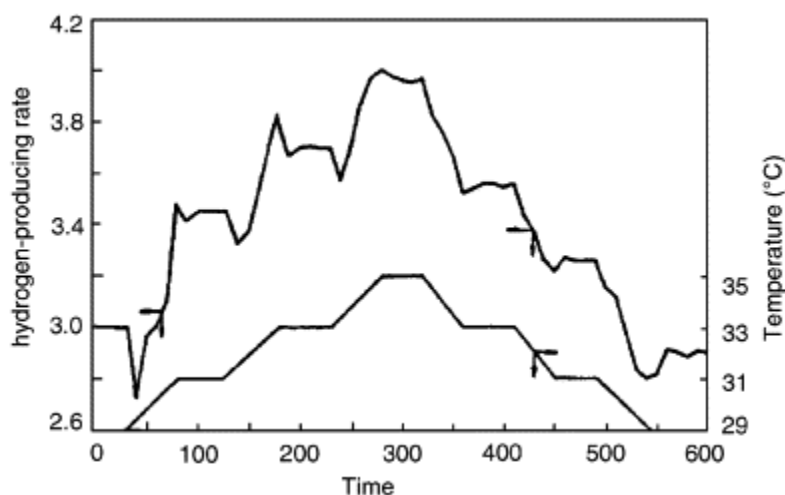


Fig.14 andamento produzione idrogeno VS oscillazioni temperatura (Li, 2007).

Tutte le reazioni di fermentazione possono avvenire a temperature mesofile (25-40°C), termofile (40-65°C) o ipertermofile (>80°C). In molti studi la produzione di idrogeno è favorita da condizioni mesofile e in alcuni anche termofile.

L'effetto della temperatura sulla produzione di idrogeno può essere spiegato termodinamicamente dall'equazione di Van't Hoff:

$$\ln K_1/K_2 = -\Delta H^\circ/R[1/T_1 - 1/T_2]$$

considerando l'energia libera di Gibbs e l'entalpia della conversione del glucosio a acetato:



$$\Delta G^\circ = -176,1 \text{ KJ/mol}$$

$$\Delta H^\circ = +90,69 \text{ KJ/mol}$$

Con l'aumentare della temperatura la costante dell'equilibrio cinetico aumenta perché la reazione è endotermica, quindi aumenta la concentrazione di idrogeno.

In altri studi è stato riportato che il tasso volumetrico della produzione di idrogeno in condizioni termofile era del 60% in più rispetto a condizioni mesofile. Già a 37°C ad esempio non solo viene inibita l'attività degli idrogeno consumatori ma viene anche soppressa la crescita dei batteri lattici (Sinha et al., 2011).

Alte temperature possono però provocare la denaturazione termica delle proteine danneggiando l'attività microbica e inoltre rispetto alle temperature ambientali il costo energetico è superiore.

6.1.3. Pressione parziale d'idrogeno

Studi teorici dimostrano che un aumento della pressione parziale di idrogeno inibisce la resa stessa di produzione di idrogeno (Hallenbeck, 2009). La pressione parziale dell'idrogeno influenza nettamente la sua stessa produzione, soprattutto nell'ottica della produzione in continuo, poiché quando la sua concentrazione aumenta, la sintesi diminuisce. Ciò è dovuto ad un meccanismo di inibizione a feedback negativo, che fa sì che vengano attivati altri percorsi metabolici alternativi, che portano alla sintesi di substrati più ridotti, come il lattato, l'etanolo, il butanolo o l'alanina. Un incremento di circa il 50% della produzione di H_2 è stato

ottenuto infatti rimuovendo tale prodotto dallo spazio di testa del bioreattore mediante “sparge” di azoto (Kraemer e Bagley 2006).

La pressione parziale di idrogeno ha influenza nel tasso di conversione dell’etanolo. E’ noto che l’etanolo può essere accumulato solo se la pressione parziale dell’idrogeno è superiore a 10^4 Pa. Quando invece la pressione parziale dell’idrogeno è inferiore a 10^4 Pa l’etanolo viene convertito in acido acetico.

6.1.4. HRT

Il tempo di ritenzione della fase a idrogeno è relativamente più breve (24-72h) rispetto a quello dei classici reattori metanogenici (15-40gg.), ciò permette una significativa riduzione delle dimensioni del fermentatore rispetto a quello a metano.

Alcuni studi hanno dimostrato che il grado di acidificazione durante il processo di fermentazione aumenta parallelamente al tempo di ritenzione idraulico passando da 28,2% a 4h a 59,1% a 24h. Inoltre il prolungamento dell’HRT favorisce la biodegradabilità di alcuni composti; seguendo l’ordine di degradazione: carboidrati > proteine > lipidi, (Fang et al., 2000).

L’HRT ha anche effetti significativi sulla distribuzione dei metaboliti prodotti durante il processo di fermentazione come riportato da Elefsiniotis e Oldham (1994) e da Henry et al. (1987). Infatti tempi di ritenzione più brevi favoriscono la produzione di propionato, ma in generale la produzione totale di VFA/alcool raddoppia passando da un tempo di ritenzione idraulico di 4h a 12h.

6.1.5. VFA

Gli acidi organici volatili sono strettamente legati al pH dell’ambiente di reazione, in grado di selezionare la via di fermentazione e anche alla produzione di idrogeno collegato alla produzione di acidi (in particolare acetato e butirato) da precisi rapporti stechiometrici. La stessa formazione di idrogeno accompagna la formazione di acidi organici, il cui accumulo influenza non solo la velocità di produzione di idrogeno ma può anche cambiare le strategie di fermentazione (Nath et al., 2004).

La fermentazione anaerobica porta oltre alla produzione di VFA, anche alla formazione di alcoli e prodotti terminali ridotti (coinvolgendo l’ossidazione dell’NADH), come etanolo, butanolo e lattato che contengono atomi di idrogeno non liberati come gas e che quindi riducono le rese di H_2 .

6.1.6. Resource mapping

Il tipo di substrato favorisce una competizione interspecifica tra i microorganismi idrogeno produttori, mentre la quantità di substrato determina una competizione intraspecifica e contribuisce a modificare l’attività enzimatica batterica determinando uno shift metabolico verso la produzione di acido lattico diminuendo le rese di produzione.

Il numero di popolazioni dominanti allo stadio stazionario dipende dal numero di tipi di substrati, ciò però non significa che la fermentazione anaerobica di un particolare substrato appartenga solo ad un tipo di

fermentazione. I percorsi metabolici possono shiftare nel corso della fermentazione con l'autoregolazione metabolica dei microrganismi che si adattano ai cambiamenti "ecosistemici" (Li et al., 2007).

6.1.7. Concentrazione ioni metallici

Gli ioni metallici (Na, Mg, Zn, Fe) sono micronutrienti essenziali per il metabolismo batterico, poiché sono richiesti nei processi di trasporto e metabolismo enzimatico. Il Fe ad esempio è coinvolto nell'ossidazione del piruvato ad Acetil-CoA e nel corretto funzionamento dell'enzima idrogenasi. Concentrazioni non ottimali di ione Fe possono determinare *shift* dei *pathway* metabolici. Quando la concentrazione di ioni Fe è molto bassa nel medium di fermentazione l'attività enzimatica favorisce la produzione di acido lattico all'etanolo riducendo la produzione di H₂. Recenti studi di letteratura hanno dimostrato che il ferro e il nichel sono elementi essenziali per la produzione del gas da parte dei microrganismi anaerobi, dato che sono costituenti indispensabili dell'enzima idrogenase, il quale catalizza la reazione di ossidazione dell'H₂ e di riduzione dei protoni durante il processo fermentativo di degradazione (Casalot e Rousset, 2001). I risultati di differenti ricerche (Liu e Shen, 2004; Lee et al., 2001; Wang and Wan, 2008 (a) (b); Zhang et al., 2005) hanno confermato che il dosaggio ottimale di nichel e ferro all'interno del sistema anaerobico, così come quello inibente la produzione di H₂, sono strettamente dipendenti dal substrato, dall'inoculo e dalle condizioni operative utilizzate nel processo di digestione.

Ioni	Concentrazione (mg/l)		
	stimolante	inibente	
		debolmente	fortemente
Sodio Na⁺	100-200	3500-5500	8000
Potassio K⁺	200-400	2500-4500	12000
Calcio Ca⁺⁺	100-200	2500-4500	8000
Magnesio Mg⁺⁺	75-150	1000-1500	3000
Ammonio NH₄⁺	50-200	1500-2000	3000 tossico
Zolfo S⁻⁻	-	<200	200

Fig.15 concentrazioni ammesse o tossiche di alcuni ioni.

CAPITOLO VII

SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questo studio sperimentale è stato “l’ottimizzazione” dei processi di produzione di idrogeno attraverso la fermentazione anaerobica e il miglioramento delle rese di produzione di metano nell’ultima fase della digestione anaerobica (metanogenesi) mediante l’utilizzo di biomasse residuali provenienti dagli scarti delle lavorazioni agro-industriali e zootecniche. Nella scelta delle biomasse di scarto sono state considerate quelle biomasse (reflui zootecnici) che, seppur non idonee per la produzione di idrogeno, rappresentano i substrati preferenziali negli impianti di produzione di metano (Weiland, 2010).

Il termine ottimizzazione ha un significato molto ampio, che nel nostro caso significa: sviluppo del processo e delle tecnologie che servono a rendere il processo più efficiente e più produttivo in termini di resa energetica e di “clean up” dell’intero ciclo dei prodotti e dei sottoprodotti. Tale studio ha permesso inoltre di evidenziare le differenze e le criticità emerse nella valutazione delle rese di produzione di idrogeno legate alla natura stessa dei substrati impiegati e alle specifiche condizioni operative richieste per la realizzazione sperimentale del processo.

L’attività è stata svolta nel laboratorio di Biomasse e Bioenergie, presso il Dipartimento di Energie Rinnovabili del Centro Ricerche ENEA (Casaccia) e presso l’Istituto di Ricerca sulle Acque (CNR) relativamente all’indagine di caratterizzazione delle comunità microbiche tramite tecniche di immunofluorescenza.

La procedura sperimentale, integrata con una accurata ricerca bibliografica, è stata realizzata in quattro fasi principali:

Fase I – Fermentazioni con substrato sintetico (glucosio) :

- Ha previsto le prove di fermentazione in *batch* allo scopo di valutare la fattibilità e l’efficienza del processo di produzione di idrogeno utilizzando come inoculo i sedimenti del lago di Fogliano (Parco Nazionale del Circeo).
- Successivamente sono state svolte le prove di fermentazione in *continuum* per isolare la comunità microbica di idrogeno produttori (F_{210}) e per valutare la capacità del sistema di mantenere stabili le condizioni operative ottimali individuate nei test in *batch*.

Fase II – Identificazione delle comunità microbiche presenti nell’inoculo F_{210} :

- Sono state utilizzate due diverse tecniche molecolari : il clonaggio del gene marker 16SrRNA e la tecnica di immunofluorescenza FISH (*Fluorescence in situ Hybridization*).

Fase III – Fermentazioni con biomasse di scarto (insilato di sorgo, scotta, glicerolo, letame/liquame):

- E’ stata svolta la caratterizzazione dei parametri chimico-fisici più significativi e necessari per l’esecuzione delle prove di fermentazione in *batch*.
- Sono state svolte le prove di fermentazioni con i substrati singoli e in codigestione.
- I substrati risultati ottimali ai fini della produzione di idrogeno (scotta, glicerolo, liquame), sono stati utilizzati per ottimizzare il processo con il metodo statistico sperimentale *Mixture design* che ha consentito di individuare le migliori proporzioni di ogni substrato per massimizzare sia la produzione di idrogeno sia l’utilizzo del liquame come substrato preferenziale.

Fase IV – Ottimizzazione del processo di Digestione Anaerobica:

- E' stato valutato il ruolo degli idrogeno produttori nel potenziamento delle rese di produzione di metano. Ai fini della valutazione dell'intero processo di metanogenesi sono state separate le fasi di idrogenogenesi e metanogenesi utilizzando sia il liquame che la scotta.

CAPITOLO VIII
MATERIALI E METODI

8.1. Inoculi: F_0 e F_{210}

L'inoculo ha lo scopo di apportare una popolazione microbica già attiva che messa nelle condizioni ideali di ambiente di fermentazione (in grado cioè di competere con la flora autoctona del substrato) possa svilupparsi e produrre idrogeno. La mix microbica utilizzata nel processo fermentativo ha origine dai sedimenti del lago di Fogliano, localizzato lungo la costa laziale, tra i Comuni di Latina e Sabaudia.



Fig.16 Localizzazione geografica del Lago di Fogliano.

Tale lago fa parte del Parco Nazionale del Circeo, ha una superficie di 408ha e una profondità media di 0,89m. Attualmente è considerato un lago costiero iperalino (salinità tra 28,5 e 48,9 ‰) in quanto è quasi del tutto alimentato dal mare attraverso la Foce del Duca e il ricambio teorico delle acque è stimato in un tempo di 60 giorni. I sedimenti marini costieri sono habitat ricchi di sostanza organica, spesso proveniente dalle acque di scarico di aziende agricole-zootecniche e dagli scarichi di corsi d'acqua e canali. Le condizioni di microaerofilia che si generano soprattutto nei mesi estivi e la presenza nel lago di una abbondante (99% della superficie) popolazione di fanerogama acquatica *Ruppia cirrosa*, favoriscono lo sviluppo di batteri eterotrofi fermentanti che dovrebbero essersi selezionati su scarti ricchi di cellulosa e proteine.

Nel lago sono state prelevate carote superficiali di sedimento (2cm di profondità; contenuto 50ml) tramite un campionatore ENEA e conservati in frigo a -4°C in una soluzione al 30% di glicerolo (Signorini et al., 2008).

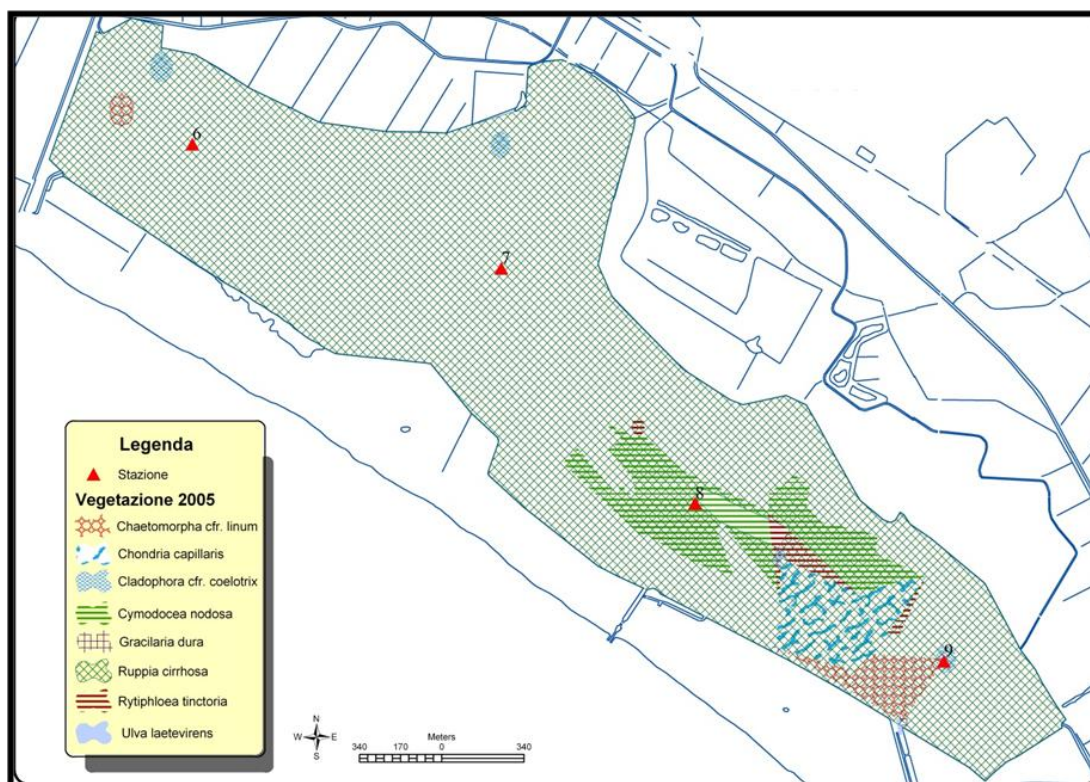


Fig.17 Mappa della distribuzione della vegetazione macrofitobentonica del Lago di Fogliano.

L'inoculo F₂₁₀ utilizzato nella maggior parte degli esperimenti è stato selezionato dai sedimenti del lago di Fogliano, utilizzati come inoculo in un esperimento di produzione di idrogeno in continuo da glucosio, a 37°, in un reattore CSTR⁸ da 2,5 litri. Alle 210 ore di produzione il fermentato è stato conservato in glicerolo (30%) a -20°C e riattivato al momento del suo utilizzo in nuovi esperimenti di fermentazione.

8.2. Substrati sintetici e naturali

I substrati naturali utilizzati sono biomasse di scarto provenienti da industrie agro-alimentari e colture energetiche dedicate alla produzione di bioenergie.

Tutti gli esperimenti, che avevano per substrato biomasse di scarto, sono stati effettuati ad una concentrazione di 8g/l di VS totale di substrato, parametro che rappresenta il contenuto organico della biomassa.

8.2.1. Glucosio

Per valutare le capacità produttive dell'inoculo è stato utilizzato come primo substrato il glucosio, in concentrazioni 10g/l, che permette di valutare stechiometricamente la produzione di idrogeno. La massima produzione teorica da una mole di glucosio è di 4 moli di H₂. Tuttavia valori di 2-3 mol H₂ mol₋₁ glucosio sono valori ottenibili in condizioni reali (Lee et al., 2011).

⁸ CSTR: continuous stirred-tank reactor

8.2.2. Biomasse di scarto e Energy crops

8.2.2.1. Scotta

Il siero di latte deproteinizzato o “scotta” è il residuo (circa il 97 %) del siero di latte nella produzione della ricotta, prodotto ultimo delle trasformazioni dell’industria lattiero-casearia. La scotta è stata fornita dalla Formaggi Boccea s.r.l Roma. La produzione giornaliera dell’azienda si attesta intorno a 80-90 q al giorno. La scotta viene prodotta dopo trattamento del siero di latte ad una temperatura di 90-100°C. Attualmente tale sottoprodotto viene in parte destinato, come alimento, agli allevamenti di suini e, in parte rilevato da aziende farmaceutiche e attualmente anche da proprietari di impianti di biogas. Tuttavia, in entrambi i casi, l’azienda produttrice della scotta deve sostenere il pagamento del trasporto. L’elevata concentrazione di lattosio (39-52 g/l) nella scotta, un disaccaride costituito da una molecola di beta D-(+)-galattosio e da una di D-(+)-glucosio, rende tale biomassa di scarto un substrato prontamente disponibile ai microorganismi per il processo di fermentazione.

8.2.2.2. Glicerolo

Il glicerolo, sottoprodotto principale della trasformazione dell’olio vegetale in biodiesel, è stato fornito dalla Casa Olearia di Monopoli (Bari) che possiede un impianto di trasformazione di oli vegetali ed una centrale elettrica ad oli combustibili. La produzione di biodiesel in Europa ha subito una brusca accelerazione negli ultimi anni, trasformando il glicerolo da risorsa a scarto industriale (Varrone et al., 2012).

8.2.2.3. Letame e Liquame

Il letame e liquame bufalini sono stati forniti dal Centro Ricerche per l’Agricoltura (C.R.A.) di Montelibretti Roma. Con questi ultimi si intendono le deiezioni degli animali da allevamento (feci e urina), eventualmente misti ad acqua e a materiale solido usato come lettiera (paglia, sabbia, segatura, ecc.).

I liquami zootecnici hanno una parte rilevante nell’inquinamento dell’aria e del suolo. In particolare la direttiva sui nitrati (Decreto 91/676 CEE) stabilisce che le dosi di letame o di liquame da distribuire, sono quelle che determinano un apporto di azoto disponibile al campo non superiore ai 170 Kg/ ha di azoto organico annui.

8.2.2.4. Insilato di Sorgo (*Sorghum gentile*)

L’insilato di sorgo è una coltura energetica destinata esclusivamente alla produzione di bio-energia ed è stata fornita anche essa dal Centro Ricerche per l’Agricoltura (C.R.A.) di Montelibretti Roma. L’utilizzo di una coltura energetica ha lo svantaggio di sottrarre terreni alle colture destinate all’alimentazione. Inoltre la tecnica di conservazione del foraggio nella produzione di insilato, subisce una duplice fermentazione (acetica aerobica prima e lattica poi) che porta il pH anche a valori minori di 4.

8.3. Indagini chimico-fisiche dei substrati

Tutti i substrati utilizzati in questa sperimentazione sono stati caratterizzati attraverso la determinazione dei solidi totali (TS), volatili (VS), COD (APHA, 2005), densità (ρ) e pH.

8.3.1. Determinazione dei Solidi Totali

Una certa quantità di campione, ca. 10 g, è essiccato in stufa, in crogiolo preventivamente tarato, a 105 °C per 24 ore. Dopo raffreddamento in essiccatore, si pesa fino a peso costante (si eseguono 5-6 misure per ogni campione): il peso del campione dopo essiccazione, riferito a 100 g, dà la percentuale di Solidi Totali (*Total Solid - TS*):

$$\% \text{ Solidi Totali} = \frac{c.e. \times 100}{c}$$

dove: c = peso campione, $c.e.$ = peso campione dopo essiccazione.

L'Umidità (U) contenuta nel campione è quindi:

$$\% \text{ Umidità} = 100 - \% \text{ TS}$$

8.3.2. Determinazione delle ceneri

La determinazione delle ceneri (CC) si esegue sullo stesso campione utilizzato per la determinazione dei TS. Il crogiolo, contenente la sostanza secca (SS) viene riscaldato gradualmente in muffola a 550 °C e mantenuto a questa temperatura per 6 ore e comunque fino alla scomparsa delle particelle carboniose.

Dopo raffreddamento in essiccatore, si pesa fino a peso costante:

$$\% \text{ ceneri nel campione} = \frac{r.c. \times 100}{c}$$

dove: $r.c.$ = peso campione dopo calcinazione.

Comunemente il dato viene riferito alla SS:

$$\% \text{ ceneri nella SS} = \frac{r.c. \times 100}{c.e.}$$

8.3.3. Calcolo dei Solidi Volatili

I Solidi Volatili (*Volatil Solid - VS*) si determinano per differenza tra il peso del campione dopo essiccazione ($c.e.$) ed il peso del campione dopo calcinazione ($r.c.$):

$$\% \text{ Solidi Volatili nel campione} = \frac{(c.e. - r.c.) \times 100}{c}$$

Cioè:

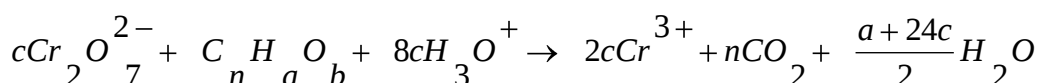
$$\% \text{ Solidi Volatili nel campione} = \% \text{ TS} - \% \text{ CC}$$

Comunemente il dato viene riferito ai TS:

$$\% \text{ SV nei TS} = \frac{(c.e. - r.c.) \cdot 100}{c.e.}$$

8.3.4. Chemical Oxygen Demand (COD)

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



$$c = \frac{2}{3}n + \frac{a}{6} - \frac{b}{3}$$

Il Cr^{3+} , proveniente dalla riduzione del $Cr_2O_7^{2-}$, viene determinato spettrofotometricamente. Si esegue la retta di taratura utilizzando, come standard primario, una soluzione 2000 mg/l di ftalato acido di potassio, effettuando le letture dell'assorbanza allo spettrofotometro a 623 nm. I campioni solidi essiccati e macinati, dopo averne pesato una quantità nota ($1,5 \div 2,5$ mg), sono posti nella provetta di digestione, dove sono addizionati 2 ml di H_2O e 2 ml di soluzione di reazione. La provetta tappata è posta nel termoreattore per 2 h a 150 °C. Dopo 10' dalla rimozione dal termoreattore si agita la provetta e si lascia, quindi, raffreddare a temperatura ambiente (ca 30°). Trasferita la soluzione in una cuvetta in polistirene, si legge l'assorbanza allo spettrofotometro.

2 ml dei campioni liquidi, opportunamente diluiti, sono posti nella provetta di digestione, dove sono addizionati di 2 ml di soluzione di reazione. Si segue quindi la procedura come per i campioni solidi.

La soluzione di reazione è preparata disciogliendo 6,1290 g di $K_2Cr_2O_7$ (0,25 N), dopo essiccazione a 105 °C per 2 h, in 60 ml di H_2O deionizzata e portando a volume, in un pallone tarato da 500 ml, con H_2SO_4 conc., contenete 10 g/l di Ag_2SO_4 . Per campioni contenenti Cl^- (≤ 2500 mg/l) alla soluzione ossidante è aggiunto del $HgSO_4$ (25 g/l).

8.4. Tipologia di fermentatori

Gli aspetti progettuali operativi relativi alla struttura e il funzionamento dei bioreattori che devono sia contenere la coltura microbica, sia captare l' H_2 prodotto, sono spesso più limitanti dei meccanismi biologici stessi, in quanto devono creare quelle condizioni di nicchie ecologiche più prossime agli optimum per le mix batteriche al fine di ottenere i migliori risultati possibili rispetto alla fisiologia dei microorganismi e pertanto vanno tenuti in debita considerazione, in quanto la loro scelta riveste un ruolo fondamentale.

8.4.1. Batch

È un reattore discontinuo completamente miscelato, in cui i valori delle variabili cambiano con continuità al variare del tempo.

I microorganismi si accumulano in un volume fisso di terreno liquido; mentre si sviluppa la crescita microbica, le sostanze nutritive si consumano e i prodotti della crescita (biomassa, metaboliti) si accumulano; perciò, l'ambiente nutritivo all'interno del bioreattore è soggetto a continue variazioni, che a loro volta provocano cambiamenti nel metabolismo cellulare. Infine, le cellule cessano di moltiplicarsi, in seguito all'esaurimento o alla scarsità del nutriente o dei nutrienti e all'accumulo delle sostanze tossiche di rifiuto, escrete dagli organismi stessi.

Il tempo di ritenzione idraulica coincide con il tempo di reazione e con il tempo di ritenzione di qualsiasi particella solida o liquida presente; assumendo che il reattore sia completamente miscelato, la velocità delle reazioni che avvengono in esso è una funzione del tempo e non dello spazio.

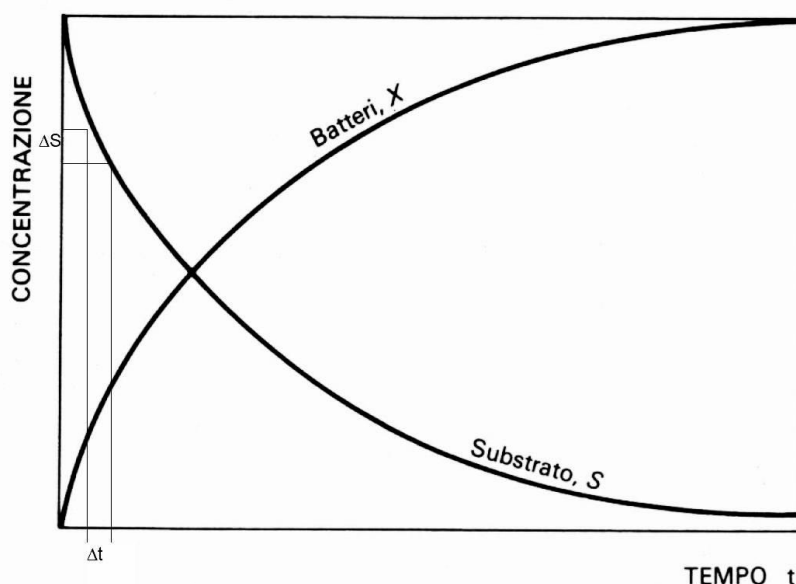


Fig.18 Riduzione della concentrazione di substrato (S) e incremento della massa batterica (X) nel tempo in un reattore ideale batch completamente miscelato.

8.4.2. Continuo

È un reattore continuo completamente miscelato, in cui i valori delle variabili rimangono uguali indefinitamente in condizioni di regime stazionario.

Si aggiunge ad una coltura in batch, durante la fase di crescita esponenziale, una certa quantità di terreno fresco e si preleva un identico volume di terreno con cellule; si ottiene così una crescita pressoché bilanciata, con scarse fluttuazioni nelle concentrazioni di nutrienti e di metaboliti, nel numero di cellule o nella quantità di biomassa.

Le particelle solide e liquide che entrano in continuazione vengono immediatamente disperse in tutto il volume dalla violenta miscelazione; la distribuzione statistica di tale popolazione fa sì che in questi reattori si

verifichi sempre un effetto di corto circuito per cui un certo numero di particelle permane per un tempo inferiore al tempo teorico di ritenzione idraulica e altre per un tempo superiore.

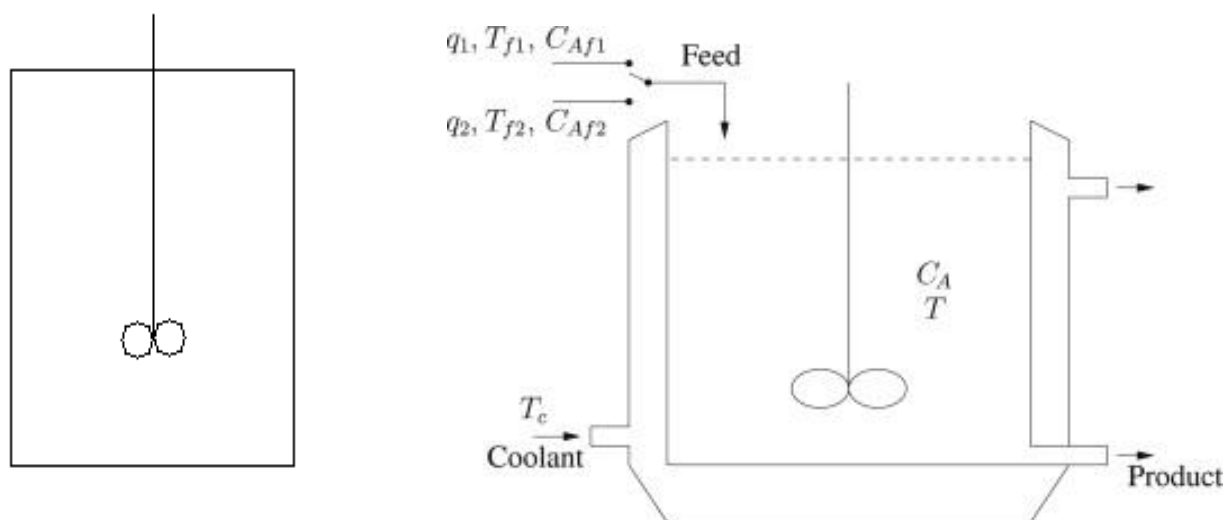


Fig.19 Reattori in batch e continuo.

8.5. Pretrattamenti

I processi di digestione anaerobica e di dark fermentation condividono infatti molte fasi, nell'eccezione però che per massimizzare la produzione di idrogeno si deve verificare un'inibizione della fase metanigena (Hawkes et al., 2002).

Per l'inibizione si sfruttano alcune caratteristiche proprie dei batteri fermentativi e dei batteri metanigeni. Ad esempio, la capacità di produrre spore da parte di batteri fermentativi può essere sfruttata per l'inibizione dell'attività metanigena; la quale inibizione, generalmente si ottiene sottoponendo la biomassa a shock termico nei tempi e alle temperature più efficaci a seconda del consorzio batterico. A differenza dei batteri idrogeno-produttori, che sono capaci di formare spore, i batteri metanigeni non sopportano lo stress termico indotto e pertanto vengono inattivati o muoiono. (Sung et al., 2002).

Un altro metodo di inibizione dell'attività metanigena consiste nel mantenere il pH a valori compresi tra 4,5 e 6,0 (Kim et al., 2004). Questo range di pH non rappresenta una condizione ottimale per i batteri metanigeni che si trovano quindi inibiti nella loro azione di consumo dell'idrogeno prodotto. L'ulteriore possibilità per la loro inibizione consiste nell'operare con bassi tempi di ritenzione idraulica (HRT) nei reattori di fermentazione. Dal momento che la velocità di riproduzione dei metanigeni è molto più lenta rispetto a quella dei batteri fermentativi, si verifica una cortocircuitazione dei primi, che rimanendo all'interno del reattore per un tempo troppo breve non hanno modo di riprodursi e realizzare condizioni stabili di consumo dell'idrogeno prodotto.

L'impiego inoltre di substrati naturali, quali scarti agro-alimentari e deiezioni animali potrebbe determinare la compresenza di microorganismi idrogeno consumatori quali batteri omoacetogeni, metanigeni e solfo-batteri presenti come flora autoctona dei substrati stessi. La necessità di uno stadio di pretrattamento che favorisca lo sviluppo delle comunità desiderate garantisce una più elevata produzione di idrogeno.

8.5.1. Tampone fosfato

Il tampone fosfato ($\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$) è stato utilizzato, testando diverse molarità per mantenere stabile il pH durante il processo fermentativo nei substrati sintetici e nei substrati naturali che avevano un pH non idoneo ai batteri idrogeno produttori presenti nella mix selezionata (pH 5,5-6,5 optimum per gli idrogeno produttori).

8.5.2. Sterilizzazione

In seguito si è deciso di pretrattare attraverso sterilizzazione dei substrati (121°C per 15 min.) 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 (Guo et al., 2008, Sung et al., 2002). In particolare il letame contiene una elevata comunità autoctona di batteri metanigeni (consumatori di idrogeno), inoltre diversi studi hanno dimostrato che la sterilizzazione favorisce il processo di idrolisi dei substrati favorendo l'efficienza di digestione (Lee e Mueller, 2001).

8.6. pH

Gli esperimenti sono stati condotti a pH diversi sia su glucosio (pH 5,8, 6,5, 6,7) sia in alcuni test su scotta (pH 5,5 e 6,2) per ottimizzare il processo di produzione d'idrogeno.

8.7. Procedura sperimentale

Gli esperimenti in *batch* sono stati condotti in fermentatori da 125, 590, 1000 ml, con un volume finale di lavoro di 50, 236, 500 ml rispettivamente. L'inoculo F_{210} è stato precedentemente attivato nel terreno di coltura Basal Fermentation Medium (BFM) costituito da (g/l): glucosio 10, peptone 3; estratto di lievito 1; L-cysteine HCl H_2O 0.5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1; MgCl_2 0.1, 10ml Sali minerali (composti da 0,01g/l $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05g/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01g/l H_3BO_3 , 0,01g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,01g/l Na_2MoO_4 , 0,2g/l $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,01g/l $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,001g/l $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e 5ml di vitamine (contenenti 0,01g/l cobalamina, 0,025g/l vitamina C, 0,025g/l riboflavina, 0,02g/l acido citrico, 0,05g/l piridoxalina, 0,01g/l acido folico, 0,025g/l creatina) e disciolti in 1l di $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ tampone (concentrazione finale 0,1M pH 6.70). Il terreno è stato sterilizzato in autoclave (121°C per 15 min.) mentre i Sali, le vitamine e il glucosio sono stati sterilizzati per filtrazione con un filtro da 0,22 μm .

I batch sono stati inoculati con il 20% (v/v) di F_{210} , flussati con azoto il tempo necessario per rimuovere tutto l'ossigeno e incubati a 37°C in agitazione (120rpm). Per ogni esperimento sono state effettuate tre repliche.

E' stata condotto un esperimento *in continuum* in un fermentatore da 2500ml e un *working volume* di 1000 ml durato circa due mesi in cui è stato selezionato l'inoculo F₂₁₀.

8.8. Analisi del biogas

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

La percentuale di H₂ presente nel biogas prodotto nei reattori è stata misurata tramite l'utilizzo di un gascromatografo (GC) Thermo con colonna “Stainless Steel” con riempimento Hayesep Q 800/100 mesh e rilevatore a conducibilità termica (TCD). Tale colonna consente la rilevazione di H₂ CH₄ e CO₂ in un'unica corsa. Il gas carrier utilizzato è stato l'azoto ad un flusso di 30-35 ml/min, le temperature di colonna e iniettore sono state rispettivamente di 120°C e 120°C.

Il volume di H₂ prodotto è stato calcolato mediante l'equazione di bilancio di massa (Logan et al., 2002):

$$V_{H,i} = V_{H,i-1} + C_{H,i} (V_{G,i} - V_{G,i-1}) + V_H (C_{H,i} - C_{H,i-1})$$

Dove $V_{H,i}$ e $V_{H,i-1}$ sono il volume cumulativo di H₂ al tempo corrente (i) e precedente (i-1),rispettivamente; $V_{G,i}$ e $V_{G,i-1}$ sono il volume totale di biogas al tempo corrente (i) e precedente (i-1); $C_{H,i}$ e $C_{H,i-1}$ rappresentano la frazione di H₂ nell' *headspace* al tempo corrente (i) e precedente (i-1), e V_H rappresenta il volume totale di *headspace* nel fermentatore.

8.9. Prodotti di fermentazione

I prodotti metabolici della fermentazione (Acidi Grassi Volatili, Acido Lattico, Etanolo) ed alcuni zuccheri (glucosio, cellobiosio, xilosio, lattosio) sono stati analizzati mediante HPLC (high performance liquid chromatograph) Thermo Spectrasystem P4000, equipaggiato con rilevatore UV ($\lambda = 210$ nm) e Indice di Rifrazione, utilizzando il metodo di analisi isocratica a 65°C con Colonna Rezex ROA Organic Acid H+ (8%) della Phenomenex, 300 x 7.8 mm, con particelle da 8 μ m, precolonna con cartucce Carbo-H (Phenomenex); fase mobile H₂SO₄ 5mN (flusso: 0.6 mL/min).

I campioni liquidi sono stati diluiti 1:20 in H₂SO₄ 5mN. Il campione tal quale è stato prima centrifugato a 13000 rpm per 10 minuti e dopo essere stato diluito (1:20) ricentrifugato a 13000 rpm per 10 minuti prima dell'iniezione in HPLC.

8.10. Analisi della cinetica di produzione di biogas

Nei test in *batch* con substrato glucosio, i dati di produzione cumulativa di idrogeno sono stati fittati con l'equazione modificata di Gompertz (1) (Chen et al., 2006), che è stata ritenuta essere un modello appropriato e ampiamente utilizzato per descrivere l'andamento dei dati di produzione di biogas negli esperimenti in *batch* (Khanal et al., 2004; Mu et al., 2007; Lay, 2001; Lin et al., 2005):

$$H(t) = P \exp \left(- \exp \left(\frac{R'e}{P} (\lambda - t) + 1 \right) \right) \quad (1)$$

dove $H(t)$ è la produzione cumulativa di H₂ (mL) al tempo di fermentazione t (h), P è la produzione potenziale di H₂ (mL), R' è il tasso massimo di produzione di H₂ (mL/h), λ è la fase lag (h), e e è l' $\exp(1) = 2.71828$.

I valori dei parametri sono stati ottenuti minimizzando la somma dei quadrati residui (RSS) tra i dati sperimentali e i valori attesi attraverso il comando “Solver” in Microsoft Excel versione 12 (Microsoft, Inc., USA).

8.11. Analisi statistica

L’analisi statistica dei parametri iniziali e dei dati sperimentali ottenuti è stata effettuata con il software R (versione “R Studio” 2.11.1), utilizzando il package *corrgram* e le relative librerie grafiche. I risultati ottenuti, sono stati analizzati statisticamente con il metodo parametrico della correlazione di Pearson e il valore del test T per studiare la significatività del coefficiente R di Pearson.

In alcuni test è stata effettuata l’analisi della varianza (ANOVA) ad un fattore con un alfa di 0,05 e il test non-parametrico di Siegel- Tukey per verificare la differenza di scala all'interno dei gruppi, cioè le medie di quali gruppi discostano significativamente tra di loro.

Per effettuare inoltre un’ottimizzazione statistica della composizione dei substrati per la produzione di idrogeno è stato impiegato il software statistico della Camo, l’Unscrambler X. Questo software consente, attraverso la progettazione del piano sperimentale e l’analisi statistica multivariata (ANOVA), l’ottimizzazione statistica del processo (Enea, 2012). L’uso di questi nuovi metodi di ottimizzazione statistica applicato alle biotecnologie sembra essere molto promettente, e può portare ad un incremento delle rese di produzione di idrogeno prossime al 100% (Pan et al., 2008).

8.12. Caratterizzazione microbiologica dell’inoculo

L’identificazione delle comunità microbiche coinvolte nei processi di fermentazione anaerobica rappresenta un passaggio importante per descrivere le interazioni tra i diversi gruppi e le rispettive funzioni all’interno del consorzio oltre a fornire informazioni essenziali sui percorsi metabolici. L’inoculo F₂₁₀ è stato caratterizzato tramite l’uso di tecniche molecolari : il clonaggio del gene 16S rDNA e la Fluorescence In Situ Hybridization (FISH).

8.12.1. Il clonaggio

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.

Una libreria genetica 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). 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 fasi successive della caratterizzazione.

8.12.2. Estrazione del DNA ed amplificazione del gene 16SrDNA

L'estrazione del DNA dall'inoculo F₂₁₀ è stata effettuata da 1,5 ml di sospensione batterica prelevata nel corso della riattivazione dell'inoculo congelato. I pellets ottenuti dopo centrifugazione (5 min, 6000g) 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 utilizzando il kit commerciale: Bacterial & yeast genomic DNA purification kit dell'EURX (forniti dalla ditta Carlibiotech) e applicando il protocollo operativo consigliato.

Il DNA genomico purificato dell'inoculo F₂₁₀ è stato amplificato utilizzando i *primers* universali per Eubatteri 27f (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') e 1492r (5' CTACGGCTACCTTGTACGA 3') per ottenere i frammenti 16S rDNA di circa 1450 bp, corrispondenti alla sequenza del quasi intero gene batterico, 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

poi 25 cicli:

denaturazione : 95°C - 30 secondi

annealing : 55°C - 30 secondi

estensione : 72°C – 1.40 minuti

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 MgCl₂, 0,2 mM di ogni nucleotide, 0,2 µM di ogni *primers*.

Il ciclo di estensione finale ha permesso l'aggiunta ai frammenti amplificati delle adenine (A) sporgenti all'estremità 3' necessarie per il successivo clonaggio.

Cinque reazioni di PCR indipendenti sono state unite prima di procedere al clonaggio.

8.12.3. Libreria genetica

Il clonaggio dei frammenti di 1450 bp amplificati tramite PCR è stato effettuato con il kit TOPO TA cloning® (Invitrogen). Il vettore pCR®2.1-TOPO 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 topoisomerasi. 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.

La reazione di clonaggio è stata svolta seguendo le relative istruzioni, e, parallelamente, con un campione di controllo : a 3,5 µl di miscela dei frammenti di 1450 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.

150 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 15% di glicerolo e conservato a -80°C.

8.12.4. Estrazione dei plasmidi e PCR- ARDRA

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 alla loro caratterizzazione tramite l'Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA). L'ARDRA consiste nella digestione enzimatica dei frammenti 16S rDNA nuovamente amplificati dal plasmide purificato con la coppia dei primers 27f/1492r e nella successiva analisi dei *patterns* di restrizione su gel di agarosio. I cloni che producono lo stesso profilo di restrizione costituiscono una singola Operational Taxonomic Unit (OTU). Sono stati utilizzati gli enzimi di restrizione *RsaI*, *MboI* e *HaeIII*, prodotti dall'EURx (forniti dalla ditta CarliBiotech), tutti con siti di taglio tetramerici, in reazioni di digestione con gli enzimi singoli ed in combinazione tra loro. La reazione di PCR è stata svolta con 3ng di plasmide e applicando le stesse condizioni descritte sopra. 10 µl di reazione di PCR sono stati incubati con 3U di ogni enzima ed incubati a 37°C overnight.

2 µl di ogni campione digerito sono stati separati su gel di agarosio al 2%, corso a 90V in TBE per 2.30 ore e successivamente colorato con SYBR green (Invitrogen).

8.12.5. Sequenziamento ed analisi filogenetica

Per ogni singola OTU è stato sequenziato il 50% dei cloni, utilizzando i primers del vettore di clonaggio M13f e M13r allo scopo di ottenere le sequenze di entrambi i filamenti del frammento 16S rDNA. Il sequenziamento dei frammenti è stato eseguito con l'analizzatore ABI 3730 DNA analyzer presso i

laboratori del servizio Genechron (CR ENEA-Casaccia). Le sequenze dei DNA generati ottenuti dall'inoculo F₂₁₀ sono state assemblate allineando le sequenze del forward e del reverse utilizzando il programma Clustal X (versione 2.0) e gli allineamenti sono stati corretti a mano utilizzando il programma Chromas Pro (versione 1.5). Le sequenze risultanti sono state comparate con il database del National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizzando il software BLAST nucleotide (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), mentre la classificazione filogenetica è stata svolta utilizzando l'RDP classifier del database Ribosomal Database project (RDP) (<http://rdp.cme.msu.edu/>).

Le relazioni filogenetiche tra le sequenze ottenute dalle diverse OTUs e le sequenze di riferimento di maggiore omologia sono state messe in evidenza mediante la costruzione di un albero filogenetico utilizzando il software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA, versione 5), utilizzando l'algoritmo Neighbor-Joining (NJ) (Saitou et al., 1987) e la matrice di distanza Kimura2 (Kimura et al., 1980).

La robustezza degli alberi ottenuti è stata verificata con l'analisi statistica del bootstrap applicata a 1000 repliche.

8.12.6. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)

L'ibridazione fluorescente *in situ* (FISH: *Fluorescence In situ Hybridization*) permette di identificare e di quantificare microrganismi non coltivati, utilizzando sonde oligonucleotidiche a rRNA marcate con un fluorocromo e complementari ad una determinata sequenza, specifica del microorganismo stesso. Essa si basa quindi sull'utilizzo di sonde molecolari oligonucleotidiche (lunghe 15-20 nucleotidi), legate covalentemente con un fluorocromo all'estremità 5', che impartiscono alle cellule che contengono una sequenza di acido nucleico complementare, una fluorescenza rilevabile in microscopia ad epifluorescenza (Amann and Ludwig, 2000).

In questo studio sono state utilizzate sonde con un target a rRNA (16S) in grado di identificare i popolamenti batterici a diversi livelli filogenetici. Ogni cellula batterica risulterà fluorescente al microscopio se n-molecole (nell'ordine di qualche migliaio) del suo rRNA avranno ibridizzato con la sonda specifica utilizzata.

Il numero di cellule bersaglio rilevate, per esempio, con la sonda oligonucleotidica universale EUB338 oscilla da 1 al 100% del totale dei batteri contati in una coltura arricchita, dipendente anche dallo stato fisiologico delle cellule (Bouvier e Del Giorgio, 2003). Questo largo intervallo è dovuto al fatto che la tecnica FISH è estremamente sensibile non solo alle variazioni negli aspetti metodologici del protocollo ma anche alle condizioni ambientali. In particolar modo, le varie fasi di crescita nella vita dei microrganismi rappresentano le condizioni che più influenzano la quantità di rRNA presente e l'intensità della fluorescenza negli esperimenti FISH.

Negli esperimenti sono state utilizzate le sonde (Tabella 5) disponibili in commercio che hanno permesso di identificare i taxa batterici.

Tab.5 Sonde utilizzate con i relativi taxa identificati, sequenze nucleotidiche, siti target sull'rRNA corrispondente e la stringenza (in termini di % di formammide necessaria per l'ibridazione).

Sonda	Taxa identificati	Sequenza (5'-3')	Posizione rRNA	% Formammide
ARCH915 (1)	<i>Archea</i>	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	16S(915 – 934)	20
EUB338 (2)	<i>Bacteria</i>	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	16S(338-355)	20
EUB338II (3)	<i>Bacteria</i>	GCAGCCACCCGTAGGTGT	16S(338-355)	20
EUB338III (3)	<i>Bacteria</i>	GCTGCCACCCGTAGGTGT	16S(338-355)	20
ALF1b (4)	<i>α-Proteobacteria</i>	CGTTCGYTCTGAGCCAG	16S(19-35)	20
ALF968 (5)	<i>α-Proteobacteria</i>	GGTAAGGTTCTGCGCGTT	16S(968-985)	20
BET42a (4)	<i>β-Proteobacteria</i>	GCCTTCCCACATTCGTTT	23S(1027-1043)	35
GAM42a (4)	<i>γ-Proteobacteria</i>	GCCTTCCCACATTCGTTT	23S(1027-1043)	35
DELTA495a (6)	<i>δ-Proteobacteria</i>	AGTTAGCCGGTGCTTCCT	16S(495-512)	35
DELTA495b (6)	<i>δ-Proteobacteria</i>	AGTTAGCCGGCGCTTCCT	16S(495-512)	35
DELTA495c (6)	<i>δ-Proteobacteria</i>	AATTAGCCGGTGCTTCCT	16S(495-512)	35
EPS710 (7)	<i>ϵ-Proteobacteria</i>	CAGTATCATCCCAGCAGA	16S(710-727)	30
SRB385 (2, 8)	<i>Desulfovibrionales e altri Bacteria</i>	CGGCGTCGCTGCGTCAGG	16S(385-402)	35
EBAC1790 (9)	<i>Enterobacteriaceae</i>	CGTGTTTGCACAGTGCTG	23S(1790-1807)	40
PLA46 (10)	<i>Planctomycetes</i>	GACTTGCGATGCCTAATCC	16S(46-63)	30
PLA886 (10)	<i>Planctomycetes</i>	GCCTTGCGACCATACTCCC	16S(886-904)	35
CF319a (11)	<i>Bacteroidetes</i>	TGGTCCGTGTCTCAGTAC	16S(319-336)	35
LGC354a (12)	<i>Firmicutes</i>	TGGAAGATTCCCTACTGC	16S(354-371)	35
LGC354b (12)	<i>Firmicutes</i>	CGGAAGATTCCCTACTGC	16S(354-371)	35
LGC354c (12)	<i>Firmicutes</i>	CCGAAGATTCCCTACTGC	16S(354-371)	35
HGC69a (13)	<i>Actinobacteria</i>	TATAGTTACCACCGCCGT	23S(1901-1918)	25
(1) = Stahl e Amann, 1991; (2) = Amman <i>et al.</i> , 1990; (3) = Daims <i>et al.</i> , 1999; (4) = Manz <i>et al.</i> , 1992; (5) = Neef, 1997; (6) = Loy <i>et al.</i> , 2002; Luckner <i>et al.</i> , 2007; (7) = Watanabe <i>et al.</i> , 2000; (8) = Manz <i>et al.</i> , 1998; (9) = Bohnert <i>et al.</i> , 2000; (10) = Neef <i>et al.</i> , 1998; (11) = Manz <i>et al.</i> , 1996; (12) = Meier <i>et al.</i> , 1999; (13) = Roller <i>et al.</i> , 1994.				

La stima del numero delle cellule che si legano a ciascuna sonda fluorescente è stata calcolata come proporzione rispetto al numero totale delle cellule ottenuto con la tecnica DAPI.

8.12.7. Conta diretta dell'abbondanza microbica (DAPI)

Per misurare l'abbondanza batterica (N. batteri/mL) è stato utilizzato il metodo quantitativo della conta diretta in epifluorescenza (Di Corcia *et al.*, 1999; Barra Caracciolo *et al.*, 2002): la tecnica sfrutta la capacità della molecola 4'-6'-diamino-2-fenilindolo, riportata più brevemente come DAPI, di formare complessi fluorescenti con il doppio filamento di DNA delle cellule (Porter e Feig, 1980). Questa molecola è in grado di intercalarsi tra le basi che costituiscono il DNA ed in particolare tra i ponti formati da Adenina e Timina (Adenina e Uracile nell'RNA).

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

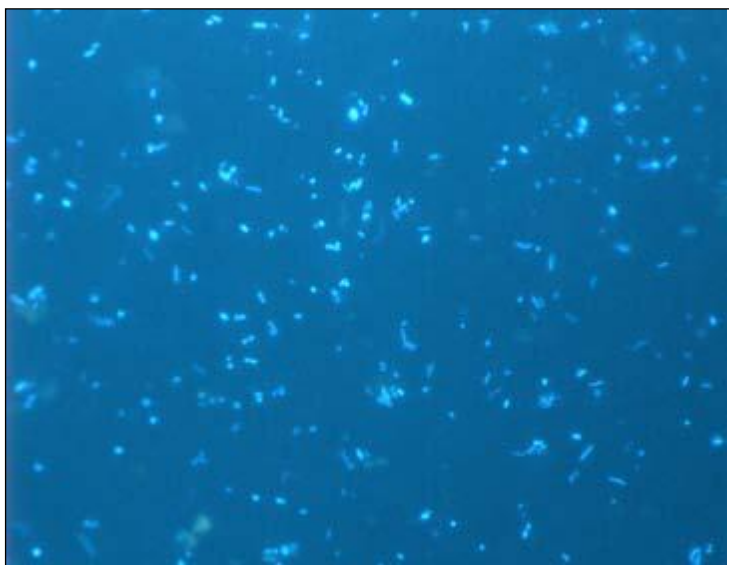


Fig.20 Abbondanza batterica: immagine fotografica di batteri al microscopio ad epifluorescenza dopo trattamento di un campione con il colorante DAPI.

CAPITOLO IX

RISULTATI E DISCUSSIONE

9.1. Test in batch: produzione di H₂ da sedimenti marini su glucosio

Al fine di esplorare la produzione potenziale di idrogeno della comunità microbica presente nel sedimento di Fogliano sono stati effettuati test in batch da 1L (500 ml volume di lavoro) utilizzando glucosio come substrato (10g/l) e il sedimento, come inoculo, ad una concentrazione di 5g/l. Inoltre, data l'assenza di informazioni sulla composizione di tale comunità e quindi sulla possibile presenza di microorganismi metanigeni consumatori di idrogeno, i test sono stati condotti a due differenti valori di pH (pH 5,8 e pH 6,5), utilizzando il tampone fosfato a due diverse molarità (0,07M e 0,2M rispettivamente).

I risultati (Tab.6 e 7) hanno mostrato che l'inoculo misto, costituito dai sedimenti marini prelevati nella laguna di Fogliano, ad entrambi i pH, produce idrogeno e non viene rilevata la presenza di metano. A pH 6,5 si ottiene una più elevata efficienza di conversione (26,9% contro il 21,5 %) con una resa massima di 1,08 mol H₂/mol glu. A pH più basso (5,8), tuttavia, la produzione di idrogeno inizia già alle 18 ore (con una resa di 0,76 mol H₂/mol glu) ed alle 20 ore raggiunge il suo valore più elevato (con una resa di 0,86 mol H₂/mol glu). Il biogas prodotto contiene il 51,9% e il 43,5% di idrogeno per l'inoculo a pH 6,5 e 5,8 rispettivamente. L'analisi dei prodotti metabolici solubili a fine fermentazione indica, per entrambi i pH, un percorso metabolico caratteristico di una fermentazione acido-mista (butyric acid type fermentation) con concentrazioni più elevate di acido acetico e acido butirrico. Il pathway di fermentazione è un importante fattore, determinante per le rese di produzione (Song et al., 2011). A seconda delle specie presenti, dei substrati organici impiegati e quindi delle condizioni di fermentazione, il processo porta alla formazione di un'abbondanza di molecole organiche. La resa varia in funzione del percorso metabolico, ovvero dell'acido organico/alcool prevalente accumulato nel corso della fermentazione. I batteri idrogeno produttori si dividono, principalmente, in ceppi che hanno un percorso metabolico "ethanol type, butyric acid type e mixed acid type" (Lin and Chang, 1999; Hallenbeck and Benemann, 2002). A pH 6,5 è presente, inoltre, una significativa concentrazione di acido formico (Fig.21). La presenza di elevate concentrazioni di acido formico consente di ipotizzare che alla produzione di idrogeno contribuisca anche la degradazione dell'acido formico catalizzata dal complesso formato-idrogenoliasi (FHL) (Mathews and Wang, 2009; Sinha and Pandey, 2011).

A pH 5,8 l'analisi dei metaboliti mostra che non tutto il substrato viene consumato ed è possibile ipotizzare che il basso valore di pH (pH 4,5) e la più elevata pressione parziale di idrogeno raggiunte alle 18 ore impediscano l'ulteriore produzione di idrogeno. Invece a pH 6,5 la produzione si arresta per l'esaurimento del substrato e il valore del pH a fine fermentazione è di 5,8. Le deviazioni standard delle tre repliche strumentali sono inferiori al 5% e non sono state riportate nelle tabelle a favore di una maggiore leggibilità delle tabelle stesse.

Tab.6 parametri di processo di produzione a pH 5,8, la deviazione standard è minore del 5%.

tempo (h)	H ₂ (%)*	H ₂ (ml/l)*	ml H ₂ / g glucose*	mole H ₂ / mole glu*	Resa(%)*	pH
18	43,42	1068	106	0,76	18,89	5,8
19	43,55	1139	113	0,81	20,14	4,5
20,2	42,83	1217	121	0,86	21,53	4,5
21,45	42,37	1213	121	0,86	21,45	4,5

Tab.7 parametri di processo di produzione a pH 6, la deviazione standard è minore del 5%.

tempo (h)	H ₂ (%)*	H ₂ (ml/l)*	ml H ₂ / g glucose*	mole H ₂ / mole glu*	Resa(%)*	pH
18	15,03	174	17,44	0,12	3,08	6,5
19	23,30	327	32,70	0,23	5,78	5,8-6
20,2	39,80	738	73,87	0,52	13,06	5,8-6
21,45	50,24	1355	135	0,96	23,97	5,8-6
22,3	50,37	1457	145	1,03	25,77	5,8-6
24	51,86	1524	152	1,08	26,95	5,8-6

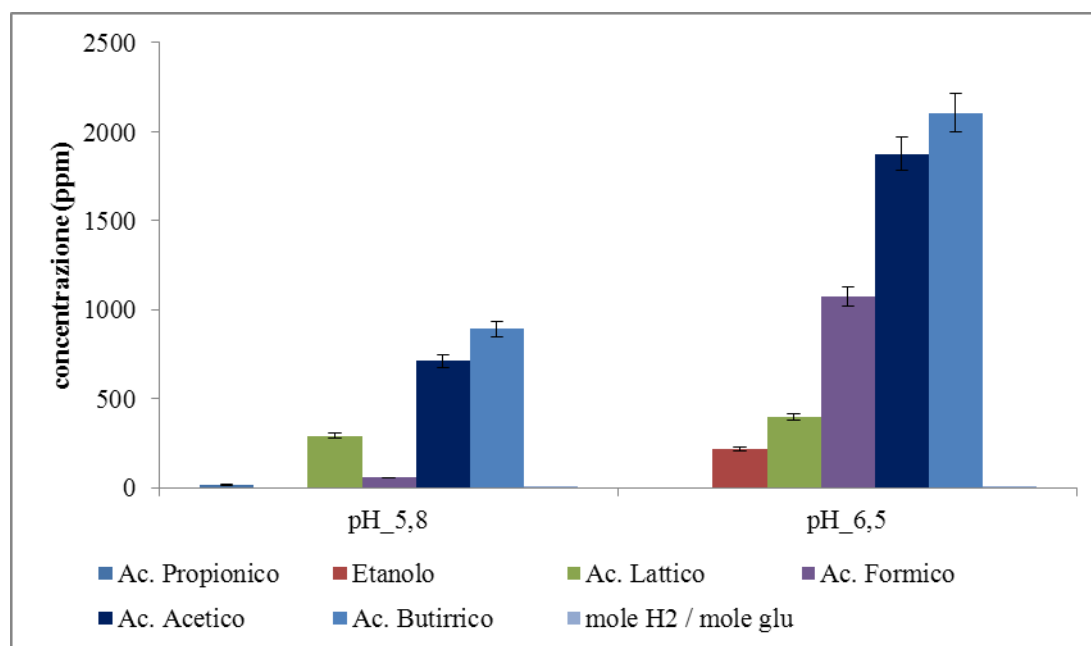


Fig.21 prodotti metabolici a fine fermentazione.

Alla produzione cumulativa di idrogeno è stata applicata l'equazione di Gompertz modificata (Chen et al., 2006), per determinare la massima produzione potenziale di idrogeno (ml/l), la velocità di produzione (ml/l/h) ed il tempo di latenza. Tale modello è stato ritenuto essere il migliore nel descrivere la produzione cumulativa di biogas negli esperimenti in *batch*, ciò è confermato da un R^2 superiore a 0,99 in entrambi gli esperimenti (il che significa che il modello è in grado di descrivere il 99% della variabilità totale del sistema).

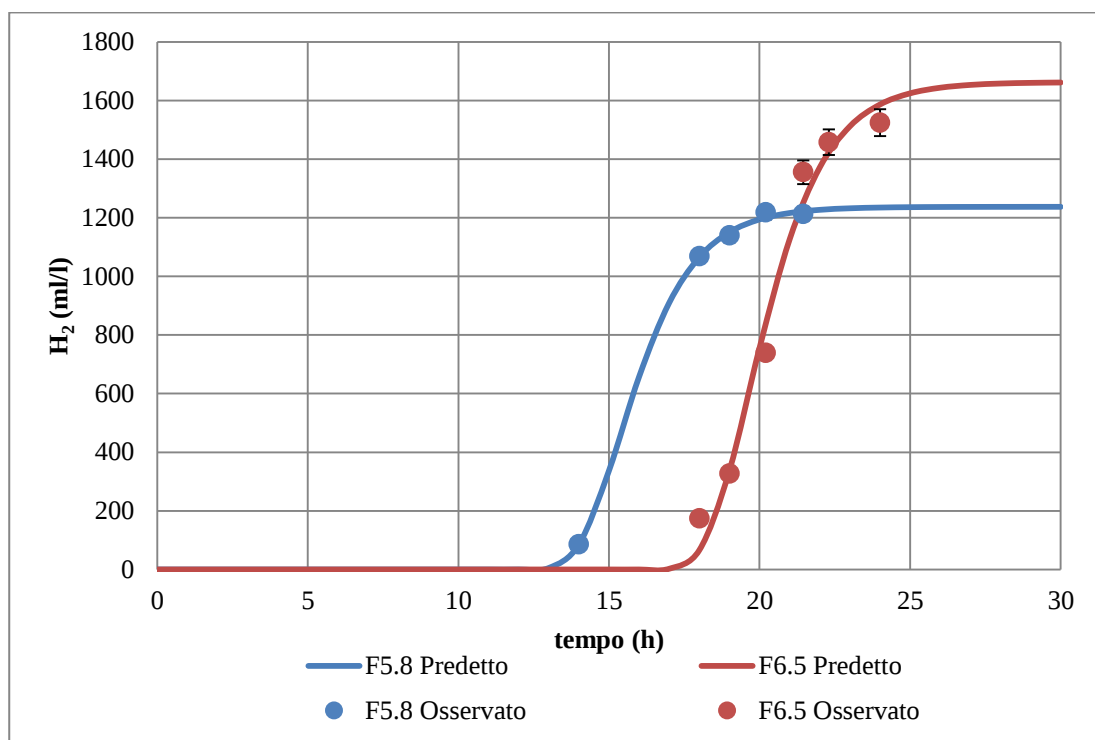


Fig.22 andamento nel tempo della produzione di idrogeno espressa in ml/l, mediante equazione di Gompertz

Tab.8 parametri equazione di Gompertz

	$p \text{ H}_2 \text{ (ml/l)}$	$r \text{ H}_2 \text{ (ml/l/h)}$	$\lambda \text{ time (h)}$	r^2
F_5.8	1237	328	13,98	0,9997
F_6.5	1662	431	18,25	0,9904

Sulla base dei risultati ottenuti, sono stati effettuati test in *batch* da 125ml (50 ml di volume di lavoro) con 10g/l di glucosio come substrato, tampone fosfato 0,1 M ed è stata aumentata la concentrazione del sedimento a 10g/l per verificare se l'aumento di concentrazione dell'inoculo favoriva l'incremento di resa del processo.



Fig.23 immagine dei batch durante l'esperimento.

I risultati (tab.9) hanno mostrato che, aumentando la concentrazione dei sedimenti e quindi dell'inoculo, la produzione di idrogeno è stata più efficiente in termini di resa passando da $1,08 \pm 0,05$ a $1,31 \pm 0,03$ mol H_2 /mol glu e in termini di produttività passando da 1457 ± 73 a 1846 ± 40 ml/l. Non si è osservata la produzione di metano. Le deviazioni standard delle tre repliche strumentali sono inferiori al 5% e non sono state riportate nelle tabelle a favore di una maggiore leggibilità delle tabelle stesse. Anche in questo esperimento si osserva un percorso metabolico caratteristico di una fermentazione acido-mista (butyric acid type fermentation) con concentrazioni più elevate di acido acetico e acido butirrico. La presenza di acido formico è tipica inoltre di una fermentazione acido mista caratteristica di batteri anaerobi facoltativi (Redwood et al., 2009).

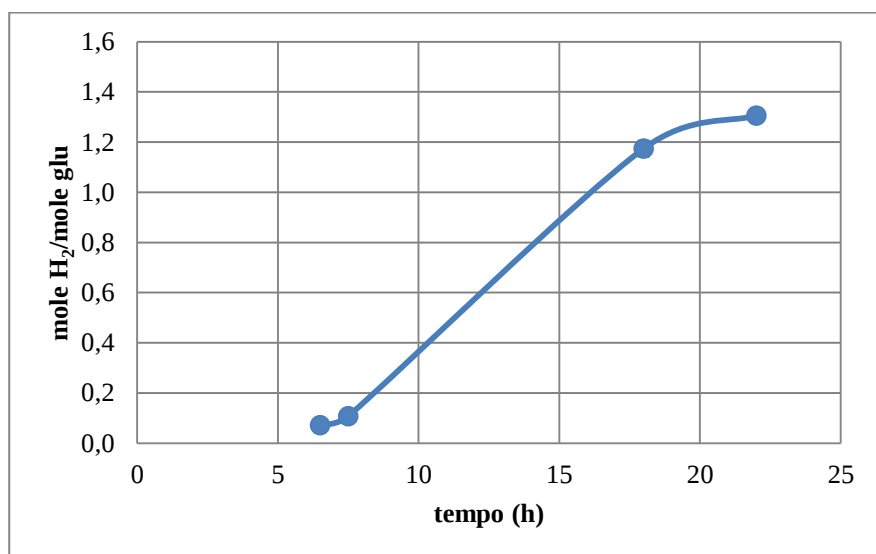


Fig.24 Produzione di idrogeno espressa in mole H_2 /mole glucosio, la deviazione standard è minore del 5%.

Tab.9 parametri di produzione esperimenti in batch, la deviazione standard è minore del 5%.

ore inc.	Vol. (ml)	H_2 (%)*	H_2 (ml/l)*	ml H_2 / g glucose*	mole H_2 / mole glu*
6	12	5,85	101	10,19	0,07
7	3	8,86	152	15,22	0,11
18	134	39,28	1660	166	1,17
22	26	38,22	1846	184	1,31

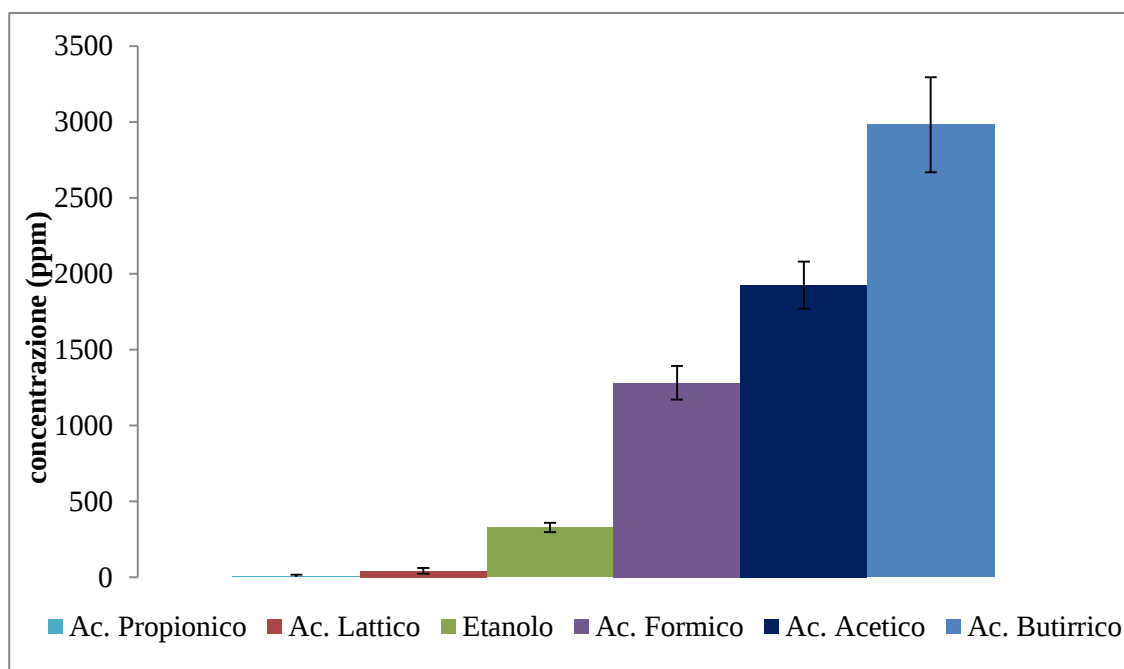


Fig.25 prodotti metabolici a fine fermentazione.

l'equazione di Gompertz modificata ha mostrato, con un R^2 superiore a 0,99, quanto il modello spieghi perfettamente i dati osservati.

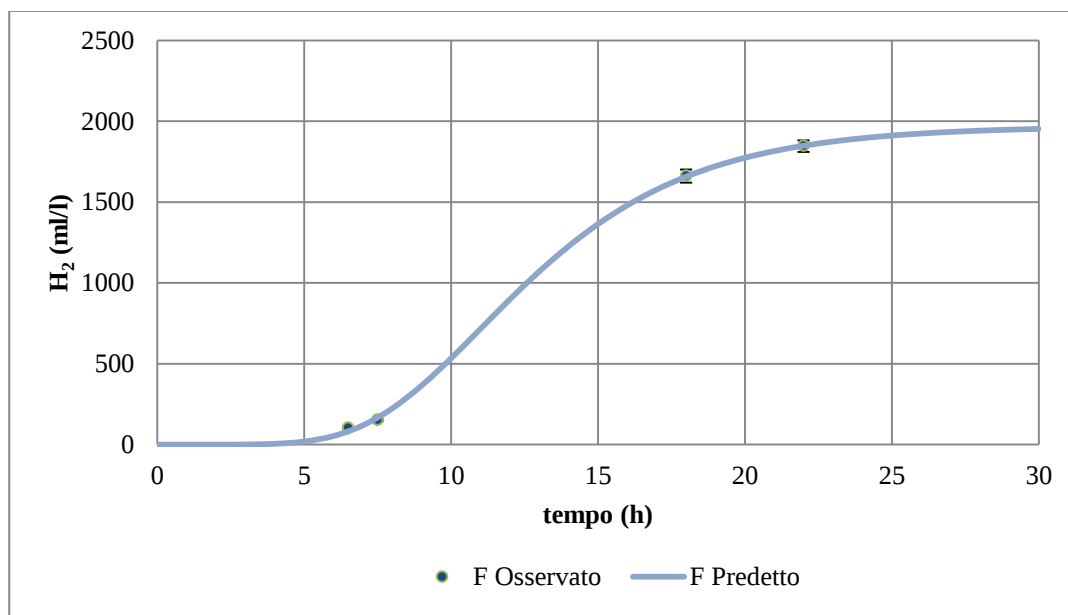


Fig.26 andamento nel tempo della produzione di idrogeno espressa in ml/l, mediante equazione di Gompertz.

Tab.10 parametri equazione di Gompertz.

	p H ₂ (ml/l)	r H ₂ (ml/l/h)	λ time (h)	r ²
F_1	2038	180	7,13	0,9999
F_2	1944	174	7,06	0,9999
F_3	1924	199	7,18	0,9998

L'analisi della varianza (ANOVA) ad un fattore con un alfa di 0,05, utilizzando come parametro la differenza di pH (5.8 e 6.5) e quella della concentrazione dell'inoculo (5g/l e 10g/l) e come variabile la produzione di idrogeno (ml/l), ha mostrato che non ci sono differenze statisticamente significative a pH diversi né a concentrazioni diverse. Infatti per entrambi i parametri, il range è stato mantenuto comunque all'interno di valori compatibili con la produzione di idrogeno e non sono stati osservati valori di "outliers".

9.2. Test in continuo: selezione di un inoculo di idrogeno produttori (F_{210})

E' stato effettuato un test su un reattore da 2,5L (volume di lavoro 1L), mantenendo gli stessi rapporti, tra volume di lavoro e spazio di testa, degli esperimenti in *batch*, per una prova in continuo al fine di ottimizzare la resa (moli H_2 /mol glucosio) in funzione della molarità del tampone fosfato. Dagli esperimenti in *batch*, precedentemente effettuati, si è osservato che un abbassamento della molarità del tampone fosfato ha permesso di ridurre il tempo di latenza anticipando il processo fermentativo. Lo scopo di questa prova è stato quello di ridurre il tempo di latenza senza raggiungere valori di pH (≤ 4.5) inibenti la produzione di idrogeno. Il test è stato quindi effettuato a pH 6,75 0,07M.



Fig.27 immagine reattore in continuo da 2500 ml.

In tali condizioni è stato ottenuto il 50,3% di idrogeno nel biogas prodotto con resa massima di 1,7 mol H_2 /mol glu. Anche in questo esperimento si osserva un percorso metabolico caratteristico di una fermentazione acido-mista (butyric acid type fermentation) con concentrazioni più elevate di acido acetico e acido butirrico. Tuttavia la presenza di etanolo, come maggiori prodotti tra i metaboliti finali determina una riduzione delle rese di H_2 in quanto contiene atomi di idrogeno non liberati come gas.

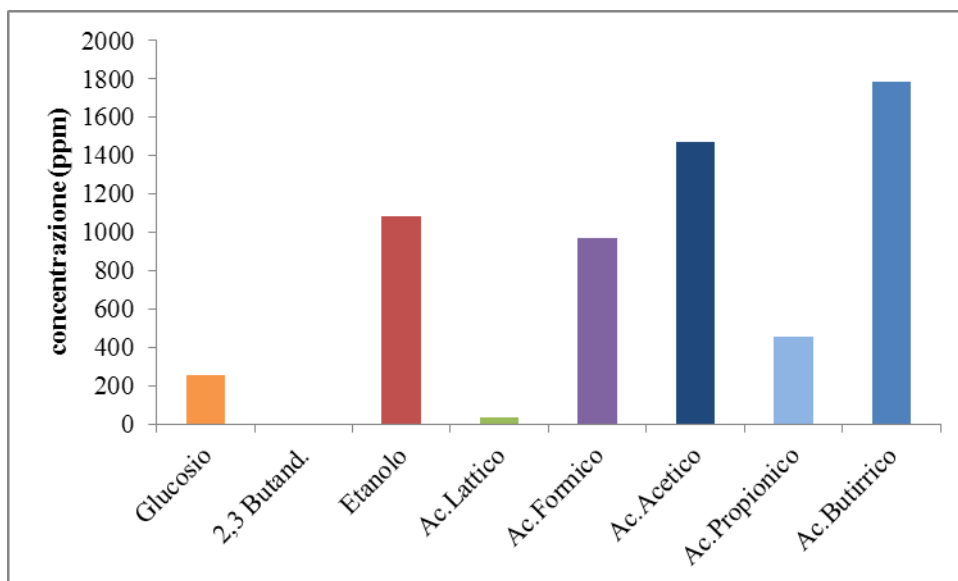


Fig.28 prodotti metabolici a fine fermentazione.

I risultati hanno mostrato che le rese ottenute nella prima fase *batch* del continuo (24h) (223,8 ml H₂/g glucosio), normalizzate alla temperatura di 25°C, si attestano tra i valori più alti riscontrati in bibliografia (tab.11) (l'intervallo di valori osservati in letteratura si attesta tra 58 e 333 ml H₂/g esoso). Alcuni tra i valori più alti riscontrati in bibliografia sono stati ottenuti con batteri termofili, invece i risultati di questo esperimento sono stati ottenuti a 37°C (286 e 151 ml H₂/g esoso), con una comunità microbica mesofila e senza alcun pretrattamento del sedimento. Il vantaggio dell'utilizzo facoltativo del pretrattamento porta ad un incremento nelle rese di produzione. Ciò permette di abbassare i costi energetici necessari in un trattamento grazie all'assenza di batteri metanigeni nell'inoculo.

Tab.11 confrontobibliografico tra rese di produzione di idrogeno.

substrato	inoculo	pH	T°C	fermentatore	resa (ml H ₂ / g hexose) ^a	re fe re nze
glucose	sewage sludge	7,0	35	batch	114	Chen et al. 2002
glucose	soil	6,0	26	batch	125	Logan et al. 2002
glucose	anaerobic digested sludge		35	batch	126	Liang et al. 2002
glucose	anaerobic digested sludge	6,2		batch	132	Oh et al. 2003
glucose	compost		50-60	batch	286	Morimoto et al. 2004
glucose	anaerobic digested sludge	5,5	35	batch	117	Lee et al. 2004
glucose	soil	5,5		batch	201	Oh et al. 2004
glucose	acclimated sludge	5,5	55-64	batch	151	Oh et al. 2004
glucose	anaerobic activated sludge		35	batch	79	Li et al. 2008
sucrose	soybean meal	6	37	batch	125	Lee et al. 2001
sucrose	compost and soil	5,5	37	batch	333	Van Ginkel et al. 2001
sucrose	sewage sludge	6,1	35	batch	269	Wu et al. 2002
sucrose	sewage sludge	6,7	35	batch	102	Chang et al. 2004
sucrose	compost	5,5	37	batch	139	Fang et al. 2004
fructose	anaerobic activated sludge		35	batch	58	Li et al. 2008
glucose	lake sediment	6,7	37	batch	233	presente lavoro

^a normalizzato alla temperatura di 25°C

L'esperimento in continuo è durato circa 50 giorni e ha prodotto in media il $50 \pm 6\%$ di idrogeno. La stessa percentuale di idrogeno si è mantenuta costante per tutto l'esperimento, confermando le capacità del continuo di mantenere nel tempo la stessa percentuale di idrogeno ottimale individuata nei test in batch. Tra le 250 e 350 ore di fermentazione si è verificato un problema dovuto ad un blocco della pompa di ingresso che ha causato l'immissione di ossigeno nel reattore, determinando un calo nella percentuale di idrogeno. Da questo esperimento è stato isolato alle 210 ore di fermentazione ($1,68 \text{ mol H}_2/\text{mol glucosio}$; H_2 55,8%) l'inoculo utilizzato e caratterizzato per tutti gli esperimenti successivi. F_{210} è stato congelato e conservato in glicerolo al 30%.

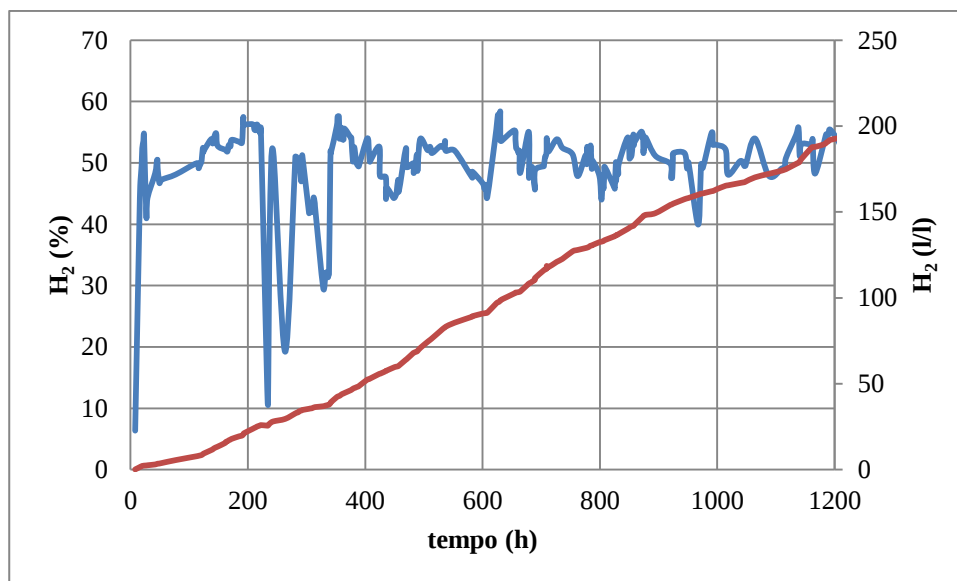


Fig.29 andamento del processo di produzione in continuo.

9.3. Caratterizzazione molecolare dell'inoculo F_{210}

9.3.1. Clonaggio

Per caratterizzare l'inoculo F_{210} è stata isolata la libreria genetica dei cloni contenenti il frammento di 1450 bp del 16S rDNA. Sono stati isolati 150 cloni che sono stati sottoposti allo screening tramite la metodica ARDRA allo scopo di limitare il successivo sequenziamento ad un numero limitato di OTUs (Operational Taxonomic Unit). L'ARDRA consiste nell'analisi del profilo elettroforetico ottenuto dai frammenti amplificati dai plasmidi isolati con la coppia dei primers 27f/1492r. Per ottimizzare la metodica sono state svolte diverse prove preliminari con quattro cloni rappresentativi utilizzando gli enzimi di restrizione RsaI, MboI e HaeIII singolarmente ed in combinazione tra loro. La migliore capacità discriminante è stata ottenuta utilizzando in combinazione gli enzimi HaeIII + RsaI.

La figura 30 mostra un gel di agarosio con alcuni profili enzimatici rappresentativi.



Fig.30 Gel di agarosio al 2% che mostra l' ARDRA di 14 cloni isolati dalla libreria genetica dell'inoculo F_{210}
 lane a: marker Perfect Ladder (EURx) (1500bp,1000bp,900bp,800bp,700bp,600bp,500 bp,400bp,300bp,200bp,100bp);
 lane b-q : profili di restrizione dei frammenti di 1450 bp amplificati dai cloni F_{210} con i primers 27f/1492r e digeriti con HaeIII + RsaI..

L'analisi ARDRA ha permesso di suddividere i 150 cloni della libreria F_{210} in cinque OTUs (A, B, C, D, E) all'interno delle quali si è distribuito il 96% dei cloni isolati e cinque OTUs secondarie rappresentate da singole sequenze (4%) non utilizzabili e, quindi, escluse dalle successive considerazioni. Il 50% delle sequenze 16S rDNA dei cloni all'interno di ogni OTUs sono state sequenziate ed elaborate. I risultati ottenuti sono riportati nella tabella 12.

Tab.12 Affiliazione filogenetica delle OTUs identificate nell'inoculo F_{210}

° Similarità tra le sequenze 16S rDNA della libreria F_{210} e le sequenze presenti nel NCBI database

* Classificazione filogenetica delle sequenze 16S rDNA della libreria F_{210} condotta con l' RDP Classification Algorithm. Sono riportati i valori di confidenza di bootstrap (la classificazione è ben supportata da valori >80%)+ % di cloni F_{210} affiliati a livello di genere all'interno di ogni OTUs.

OTUs	Closest relatives	n.o accessione	identità°	relazione filogenetica*			abbondanza ⁺ (%)
				Ordine	Famiglia	Genere	
F210-A	Uncultured gammaproteobacteria clone OTU-9_BBA	JN981929	99%	Enterobacteriales [100%]	Enterobacteriaceae [100%]	Enterobacter [67%]	7,33
F210-B1	Enterobacter sp. B2-3	HQ189499	99%	Enterobacteriales [100%]	Enterobacteriaceae [100%]	Enterobacter [82%-92%]	47,33
F210-B2	Enterobacter sp. FC99	JF772097	99%	Enterobacteriales [100%]	Enterobacteriaceae [100%]		
F210-C	Clostridium butyricum NCIMB8082	X68178	99%	Clostridiales [100%]	Clostridiaceae [100%]	Clostridium sensu stricto [100%]	23,33
F210-D	Clostridium butyricum DSM2478	X68177	99%	Clostridiales [100%]	Clostridiaceae [100%]		
F210-E1	Clostridium bifermentans strain JCM1386	AB618787	99%	Clostridiales [100%]	Peptostreptococcaceae [100%]	Clostridium cluster XI [100%]	17,33

Le comunità microbiche dell'inoculo F₂₁₀ sono distribuite in due ordini principali: *Enterobacteriales* (phylum: *Gammaproteobacteria* – 54.67% dei cloni isolati) e *Clostridiales* (phylum: *Firmicutes* - 40.66%).

All'interno del primo, si distinguono due differenti OTUs : F₂₁₀-A e F₂₁₀-B entrambe affiliate con la famiglia delle *Enterobacteriaceae* e il genere *Enterobacter*. La OTU F₂₁₀-A è risultata correlata, con una similarità del 99%, ad un batterio non coltivabile (*Uncultured gammaproteobacteria* clone OTU-9_BBA) e, considerando l'affiliazione a livello di genere non significativa (67%), si può ipotizzare che questa OTU identifichi un *taxa* non conosciuto.

La OTU F₂₁₀-B, risultata dominante nell'intera comunità microbica (48% dei cloni), si suddivide in due sottoclassi in conseguenza della diversa omologia con le rispettive sequenze di *Enterobacter*: la OTU F₂₁₀-B1 omologa alla specie B2- 3 e la OTU F₂₁₀-B2 omologa alla specie FC99 (99% in entrambe i casi).

All'ordine *Clostridiales* appartengono le OTUs F₂₁₀-C e F₂₁₀-D (rispettivamente : 22% e 1,33% dei cloni isolati), affiliate alla famiglia *Clostridiaceae*, e la OTU F₂₁₀-E affiliata alla famiglia *Peptostreptococcaceae*. Le OTUs C e D, affiliate al genere *Clostridium*, sono risultate strettamente correlate a *C. butyricum* (99% di identità), mentre la OTU D, affiliata al genere *Clostridium* cluster XI, si suddivide nelle sottoclassi D1 e D2 omologhe, rispettivamente, a *C. bifermentans* e *C. sp. zx5* (99% di omologia).

L'albero filogenetico, ottenuto con il metodo neighbor-joining, rappresentativo dell'inoculo F₂₁₀ è mostrato in figura 31.

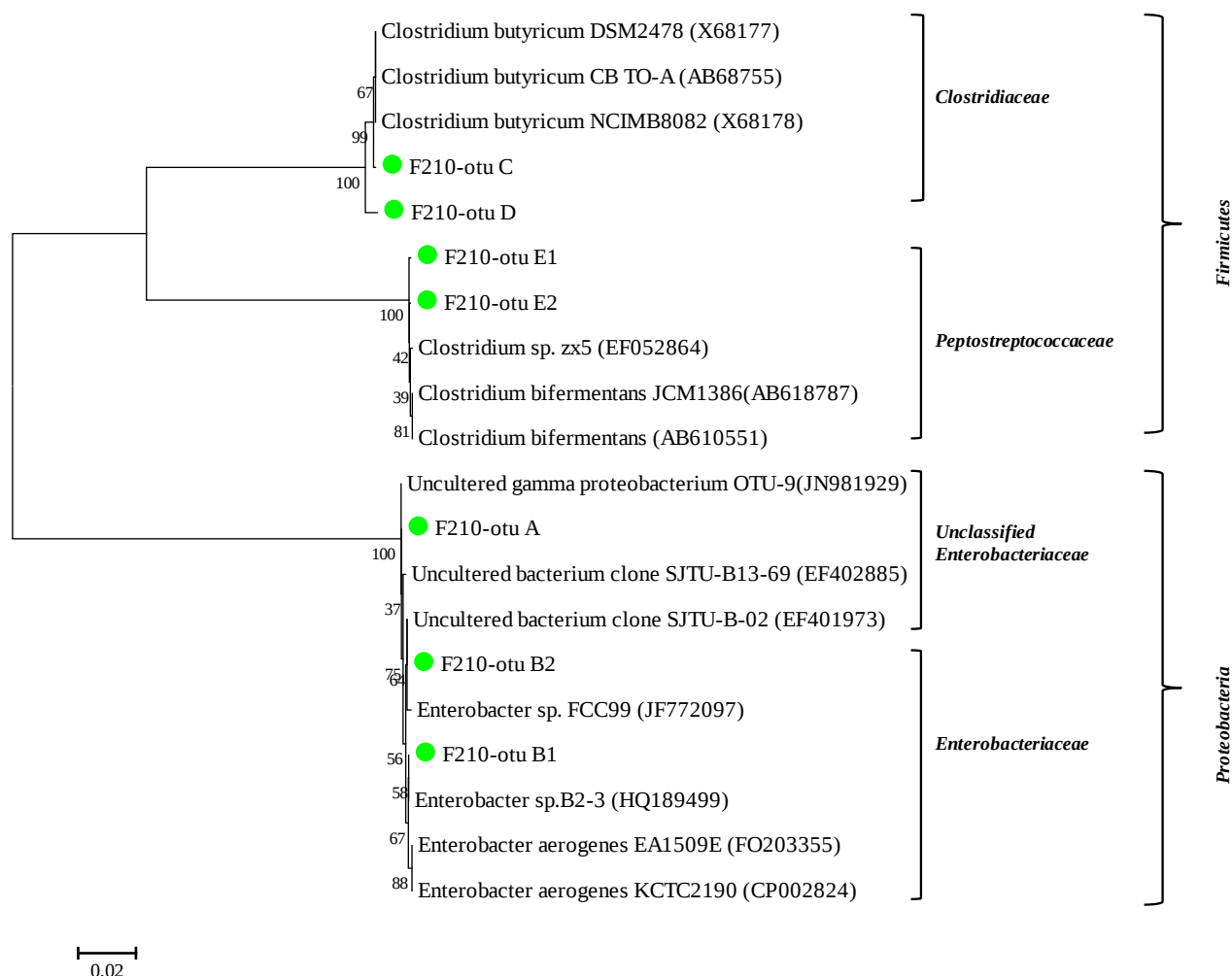


Fig.31 Albero filogenetico che mostra le relazioni tra le sequenze rappresentative delle OTUs identificate nell'inoculo F_{210} (F_{210} -otu) con le sequenze di maggiore omologia scaricate da GenBank (i numeri in parentesi indicano gli accession number). L'albero è stato costruito usando il metodo Neighbor-Joining con 1000 repliche di bootstrap. La barra indica una divergenza di sequenza del 2%.

Le OTUs si distribuiscono nei tre clusters *Clostridiaceae* (OTUs C e D), *Peptostreptococcaceae* (OTU E) ed *Enterobacteriaceae* (OTUs A e B). All'interno di quest'ultimo si distingue il gruppo di sequenze *unclassified* che risultano, comunque, strettamente associate alle altre sequenze del cluster. Il genere *Clostridium* comprende un gran numero di specie batteriche isolate da diverse matrici ambientali (Lee et al., 2011). Il genere non forma un gruppo monofiletico e include, oltre il genere *Clostridium* in senso stretto (cluster I) diversi gruppi filogenetici ben caratterizzati come produttori di idrogeno da diversi substrati organici (Tracy et al., 2012). L'identificazione di *Enterobacter* spp. nella comunità microbica dell'inoculo F_{210} non è sorprendente considerando che all'interno di questo genere sono compresi numerosi organismi caratterizzati per la capacità di produrre idrogeno attraverso la fermentazione anaerobica del glucosio e di altri zuccheri pentosi e disaccaridi (Marone et al., 2012).

Si evidenzia, quindi, una struttura della comunità microbica ben definita e costituita da due componenti ben differenziate di batteri idrogeno produttori appartenenti al genere *Enterobacter*, anaerobi facoltativi, e al genere *Clostridium*, anaerobi obbligati e con la proprietà di formare spore resistenti al calore. Questa struttura rappresenta un prototipo di consorzio microbico, così come evidenziato da Hung (2011) secondo il

quale *Enterobacter* provvede a rimuovere l'ossigeno che può essere introdotto nel bioreattore e a creare l'ambiente anossico ideale e necessario per la fermentazione da parte di *Clostridium*.

9.3.2. Immunofluorescenza (FISH)

Sono state studiate e confrontate le composizioni delle comunità batteriche ottenute dalle analisi filogenetiche del sedimento iniziale (Figura 32) e di quella nel bioreattore in continuo a 210 ore idrogeno (Figura 33) è tramite la tecnica di ibridazione fluorescente *in situ* (FISH).

I dati sono espressi come percentuali di batteri positivi ad ogni sonda fluorescente applicata rispetto al numero totale di cellule rilevate sullo stesso filtro con la conta totale DAPI (% batteri positivi vs DAPI). Le sonde applicate ai campioni sono: ARCH915, EUB338I-III, ALF1b, ALF968, BET42a, GAM42a, EBAC1790, DELTA495a,b,c, SRB385, PLA46, PLA886, CF319a, LGC354a,b,c, HGC69a.

Nel sedimento iniziale (Figura 31) è stato riscontrato circa l'80% di batteri positivi al dominio dei *Bacteria*, mentre nessun segnale positivo è stato rilevato per la sonda specifica per il dominio degli *Archea*.

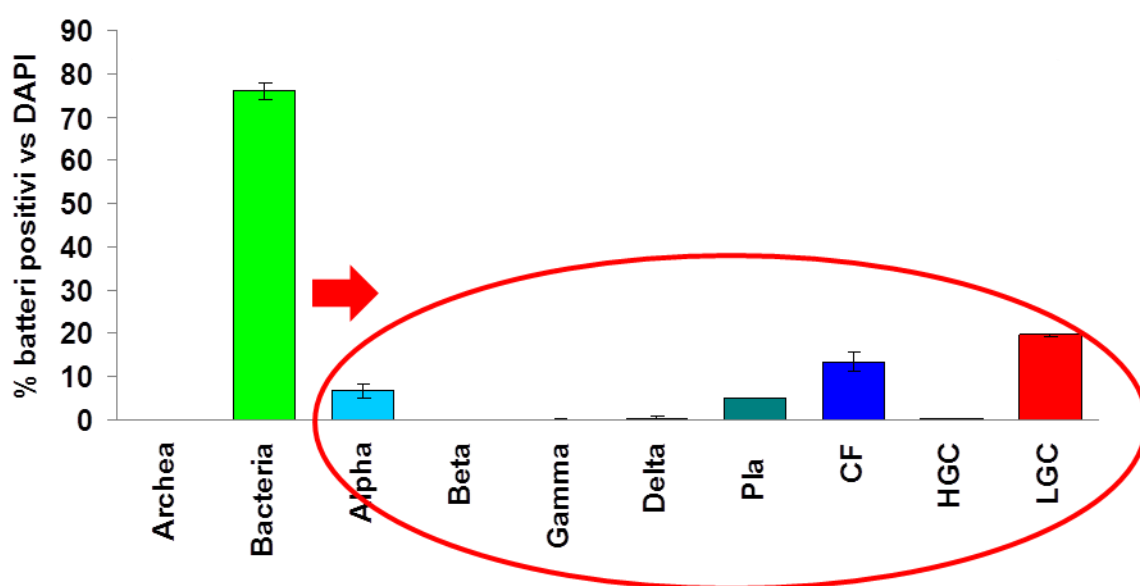


Fig.32 Analisi filogenetica del sedimento iniziale della comunità batterica tramite tecnica FISH. Il dominio dei bacteria (barra verde) comprende tutti i gruppi successivi: Alpha = Alpha-Proteobacteria; Beta = Beta-Proteobacteria; Gamma = Gamma-Proteobacteria; Delta = Delta-Proteobacteria; PLA = Planctomycetes; CF = Cytophaga-Flavobacter; HGC = Gram + con alto contenuto di G+C (Actinobacteria); LGC = Gram + con basso contenuto di G+C (Firmicutes).

Questo risultato indica che tale dominio non è significativamente presente o attivo nel sedimento campionato ed è in accordo con il fatto che in tale ambiente i processi di metanogenesi, che sono tipicamente dovuti agli *Archea*, siano trascurabili anche perché il sedimento è ricco di solfati (Madigan e Martinko, 2006).

In assenza di metanogeni si può ottenere produzione di idrogeno tramite la degradazione della sostanza organica ad acidi grassi volatili, come composti liquidi, e CO₂ e H₂, come composti gassosi (Krupp e Widmann, 2009).

All'interno del dominio dei *Bacteria*, si rileva la dominanza di batteri Gram-positivi con basso contenuto di guanina e citosina, quali i *Firmicutes* (LGC) e batteri appartenenti al gruppo dei *Bacteroidetes* (CF); inoltre sono stati rilevati sia batteri appartenenti al gruppo degli *Alpha-Proteobacteria* (6,8%), che a quello dei *Planctomycetes* (4,9%); infine, sebbene a basse percentuali (< 1%), sono stati rilevati i *Gamma-Proteobacteria*, i *Delta-Proteobacteria* e gli HGC (batteri Gram-positivi con alto contenuto di guanina e citosina).

Analizzando l'inoculo F₂₁₀ (Figura 33) si può notare uno *shift* significativo (*t* test, *p* < 0,01) della comunità batterica, che dimostra la “selezione” operata dalle condizioni sperimentali con la scomparsa di gruppi inizialmente dominanti (LGC e CF) e l'incremento significativo degli *Alpha-Proteobacteria* (42%) e dei *Gamma-Proteobacteria* (20%); questi due gruppi rappresentano da soli circa il 62% della comunità presente.

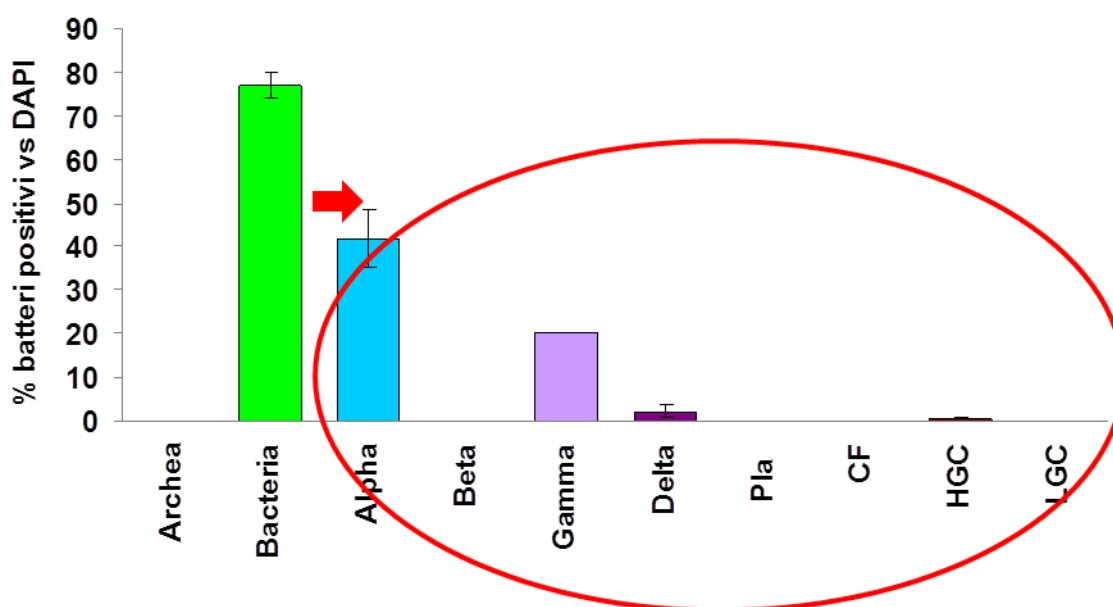


Fig.33 Analisi filogenetica della comunità batterica F₂₁₀. Il dominio dei bacteria (barra verde) comprende tutti i gruppi successivi: Alpha = Alpha-Proteobacteria; Beta = Beta-Proteobacteria; Gamma = Gamma-Proteobacteria; Delta = Delta-Proteobacteria; PLA = Planctomycetes; CF = Cytophaga-Flavobacter; HGC = Gram + con alto contenuto di G+C (Actinobacteria); LGC = Gram + con basso contenuto di G+C (Firmicutes).

Utilizzando una sonda più specifica, quale la sonda EBAC, che identifica un gruppo particolare di *Gamma-Proteobacteria*, quale la famiglia delle *Enterobacteriaceae*, è stato possibile evidenziare che circa il 50% dell'incremento osservato in corrispondenza della fase di stabilizzazione della produzione di idrogeno era ascrivibile proprio a questa famiglia (Fig.34).

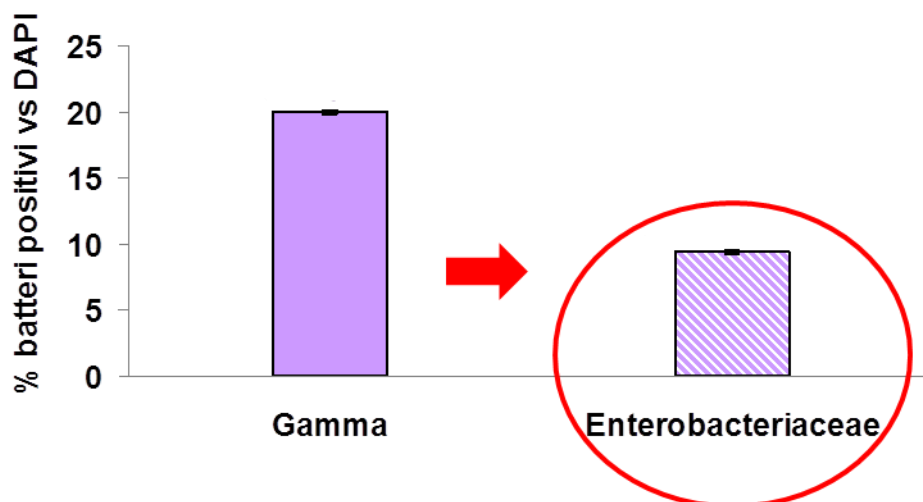


Fig.34 Percentuale totale della comunità batterica in corrispondenza della migliore produzione di idrogeno appartenente al gruppo dei Gamma-Proteobacteria (colonna di sinistra) ed in particolare alla famiglia delle Enterobacteriaceae (colonna di destra).

9.3.3. Risultati a confronto

Le tecniche molecolari utilizzate per caratterizzare la composizione dell'inoculo F_{210} , hanno prodotto risultati sovrapponibili solo in parte. Tramite il clonaggio del 16SrDNA sono state infatti identificate le comunità microbiche rappresentate dalle famiglie *Enterobacteriaceae*, *Clostridiaceae* e *Peptostreptococcaceae*. La presenza di questi microorganismi idrogeno produttori è compatibile con il pathway metabolico acido-misto, caratterizzato dalla produzione prevalente di acido acetico e acido butirrico e minoritaria di acido formico, e individuato alla fine della fermentazione del glucosio (fig.21). Tramite la FISH, è stata invece identificata la comunità dominate delle *Enterobacteriaceae*, mentre una comunità dominante di *Firmicutes*, phylum a cui appartengono i clostridi, è stata rilevata nel sedimento di Fogliano, prima di procedere all'acclimatazione sul glucosio e all'isolamento dell'inoculo F_{210} .

Questi risultati possono essere spiegati prendendo in considerazione le peculiarità delle due tecniche: il clonaggio del 16SrDNA è indipendente dallo stato metabolico dei batteri, mentre la FISH dipende non solo dalla vitalità cellulare ma anche dal contenuto di RNA ribosomale che è esso stesso funzione dell'attività metabolica cellulare (Detmers et al., 2004). E' di conseguenza possibile che nell'inoculo F_{210} la comunità dei clostridi produca idrogeno alla fine della fase esponenziale di crescita, quando gli organismi entrano nella fase stazionaria iniziale, così come evidenziato per *C. butyricum* (Chen et al., 2005).

9.4. Caratterizzazione dei substrati

Prima di effettuare gli esperimenti con le biomasse di scarto, tutti i substrati sono stati caratterizzati attraverso la determinazione dei solidi totali (TS), solidi volatili (VS), COD (APHA, 2005), densità (ρ) e pH.

Tab.13 Range dei principali parametri chimico-fisici dei substrati utilizzati.

Parametri	COD g O ₂ /g TS	TS TS% tq	VS VS% tq	Potere calorifico Kj/g TS	densità g/ml	pH
Sorgo	0,94	22,3	20,41	14,34	-	3,62
Letame	0,48-1,27	13,5-16,4	11,1-13,9	6,83-18,1	1,012	6,8
Glicerolo	1,05-1,39	91,8-96,1	86,6-91,4	14,9	1,28-1,33	6,39
Scotta	0,588-1,17	5,16-6,22	4,49-6,7	6,83-16,64	1,007-1,037	4,5-6,46
Liquame	0,44-0,94	0,95-2,67	0,7-2,06	6,26-13,32	0,988-1,014	6,7-7,16

9.4.1. Confronto tra inoculi

I test di produzione di idrogeno sono stati allestiti sia per confrontare l'efficienza di produzione degli inoculi F_0 e F_{210} sia per monitorare l'eventuale produzione di metano da parte della comunità autoctona dei singoli substrati - sorgo, letame e glicerolo.

Il consorzio F_{210} risulta comunque più produttivo di F_0 (Tab. 14) sebbene le percentuali di idrogeno nel biogas e le rese di produzione siano basse, ad eccezione di quelle ottenute dal glicerolo. La produzione di metano è stata rilevata solo con il substrato letame, per entrambi gli inoculi.

Tab. 14 Confronto dei parametri di processo di produzione di idrogeno degli inoculi F_0 e F_{210} su substrati singoli. I valori sono riferiti ai tempi di fine fermentazione.

substrati	inoculo	ore	H ₂ (%)	H ₂ (ml/l)	ml H ₂ /g VS
letame	F₀	96	0,13 ± 0,01	2,16 ± 0,26	0,26 ± 0,03
letame	F₂₁₀	24	4,26 ± 0,48	83,3 ± 11,34	10,4 ± 1,41
sorgo	F₀	24	1,11±0,12	16,65±2,16	2,08±0,27
sorgo	F₂₁₀	48	4,6±0,50	82,68±10,75	10,33±1,34
glicerolo	F₀	48	3,98 ± 0,58	75,4 ± 14,22	9,43 ± 1,77
glicerolo	F₂₁₀	120	21,0 ± 0,62	419 ± 8,2	52,4 ± 1,02

In seguito a questi primi risultati si è deciso di utilizzare F_{210} come inoculo per i successivi esperimenti.

9.5. Produzione di H₂ da biomasse di scarto e inoculo F_{210}

9.5.1. Substrati singoli

Sono state avviate prove sperimentali di produzione di idrogeno mirate alla selezione dei singoli substrati disponibili come biomasse di scarto. Le prove sono state effettuate senza pretrattamento e sterilizzando il substrato di partenza, come tecnica di pretrattamento, al fine di inibire un eventuale comunità di batteri idrogeno consumatori presente come flora autoctona nelle biomasse di scarto utilizzate come substrati e incrementare la resa di processo.

Tab.15 parametri di processo nella produzione di idrogeno su singoli substrati. I valori sono riferiti al tempo in cui la produzione è terminata. Nell'ambito di ciascuna prova, i valori senza alcuna lettera in comune differiscono significativamente per $P \leq 0,05$ secondo il test HSD di Tukey.

substrati	%	pretrattamenti	Tempofine produzione (h)	H ₂ (%)	H ₂ (ml/l)	ml H ₂ /g VS	pH in.	pH fin.
scotta	100	/	144	42,4 ± 1,29	1028 ± 5,62 ^{bdeh}	142 ± 0,78	6,5	4,5
letame	100	/	24	4,26 ± 0,49	83,3 ± 11,3 ^{afgil}	10,4 ± 1,41	6,8	6,2
glicerolo	100	/	120	20,9 ± 0,63	419 ± 8,20 ^{afgil}	52,4 ± 1,02	6,4	5
liquame	100	/	337	3,54 ± 0,88	57,6 ± 14,2 ^{afgi}	7,2 ± 1,77	7,16	6,5
insilato di sorgo	100	/	48	4,6 ± 0,12	82,7 ± 3,31 ^{afgi}	10,3 ± 1,05	3,6	3,6
scotta	100	sterilizzazione	72	39,2 ± 0,58	1447 ± 0,69 ^c	164 ± 0,08	6,5	4,7
letame	100	sterilizzazione	114	17,8 ± 1	301 ± 14,5 ^{agil}	37,7 ± 1,81	6,8	6,1
glicerolo	100	sterilizzazione	138	32,4 ± 0,59	1037 ± 142 ^{bh}	129 ± 17,8	8	5,6
liquame	100	sterilizzazione	48	19,8 ± 1,89	225 ± 19,1 ^{abdg}	28,9 ± 2,42	8	6,5
insilato di sorgo	100	sterilizzazione e tampone fosfato 0,1M	114	33,6 ± 0,59	523 ± 16,2 ^{abdeh}	65,4 ± 2,04	6,7	5,8

I risultati (tab.15) hanno mostrato che tutti i substrati non sterili utilizzati nel processo fermentativo producono idrogeno con rese che vanno da 10,4 ml H₂/g VS (letame) a 142,7 ml H₂/g VS (scotta). Il pretrattamento con la sterilizzazione ha incrementato da due a tre volte le rese di produzione di idrogeno dal letame (da 11,4 a 37,7 ml H₂/g VS) e dal glicerolo (da 52,2 a 130 ml H₂/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 (pH ≥ 4,5). I pretrattamenti utilizzati hanno incrementato la resa da 10,3 a 65,4 ml H₂/g VS. Il confronto dei dati di produzione di idrogeno con il sorgo e quelli con la scotta, indica una maggiore efficacia di quest'ultimo che è uno scarto dell'industria casearia a differenza del primo che è invece un "energy crop". Tale risultato ha permesso di abbandonare ulteriori sperimentazioni con il sorgo. E' stata effettuata l'analisi della varianza (ANOVA) ad un fattore, utilizzando un alfa di 0,05. I risultati hanno mostrato che le differenze sono statisticamente significative. E' stato inoltre effettuato il test non-parametrico di Siegel- Tukey per verificare la differenza di scala all'interno dei gruppi, cioè le medie di quali gruppi discostano significativamente tra di loro con e senza pretrattamento. La scotta sterile è risultato essere l'unico substrato statisticamente differente da tutti gli altri substrati sterili e non sterili. Ciò conferma l'importanza della scotta quale substrato necessario ad incrementare significativamente le rese di produzione del processo. In tabella 16 vengono riportati i valori massimi di resa di produzione di idrogeno (ml H₂/g VS) presenti in letteratura e ottenuti in condizioni sperimentali (substrati singoli, produzione in batch, con e senza pretrattamenti del substrato) confrontabili con i risultati di questa ricerca.

Tab.16 Resa massima di produzione di idrogeno. I dati sono stati estratti da Guo et al., 2010.

substrati	massima resa (ml H ₂ /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	130°C 30 min	70	Ivanova et al, 2009
canna da zucchero	19	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

9.5.2. Prove di codigestione variando le concentrazioni dei substrati in sterilità

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

Tab.17 parametri di processo di produzione in codigestione a fine fermentazione.

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

Le rese di produzione di idrogeno (ml H₂/g VS) variano da un minimo di 47,2 ad un massimo di 187,8.

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 H₂/g VS, rispettivamente. Le rese incrementano fino ad un valore di 116 ml H₂/g VS per la co-digestione del substrato contenente il 70% letame, 20% scotta e 10% glicerolo e di 128 ml H₂/g VS per la mix letame e scotta (50:50) (Patriarca et al., 2012).

Dalla tabella 17 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 (Patriarca et al., 2012). Ciò conferma la capacità tampone di tale substrato (Weiland et al., 2010), e il suo possibile utilizzo, negli impianti a scala industriale, come sistema naturale di controllo del pH (Tenca et al., 2011).

Tab.18 prodotti metabolici a fine fermentazione.

substrati	substrati (%)	lattico	formico	acetico	propionico	butirrico	1,3 propandiolo	etanolo
scotta, glicerolo	90:10	5,08 ± 0,65	32,09 ± 0,87	461 ± 25,34	16,30 ± 0,58	1793 ± 8,82	14,71 ± 20,81	869 ± 122
letame, glicerolo	90:10	186 ± 0,77	50,86 ± 1,12	94,67 ± 1,69	14,4 ± 0,72	957 ± 137	719 ± 8	635 ± 240
letame, scotta	90:10	44,11 ± 16,9	20,40 ± 11,2	107 ± 3,49	49,87 ± 3,82	1188 ± 119	157 ± 110	586 ± 135
scotta, letame	50:50	18,86 ± 13,1	33,69 ± 0,37	331 ± 84,1	26,91 ± 0,65	1957 ± 13,5	159 ± 81,6	777 ± 47,6
scotta, letame, glicerolo	33:33:33	58,69 ± 2,68	145 ± 0,26	498 ± 12,7	29,19 ± 1,84	1523 ± 74,7	127 ± 63,7	118 ± 61,6
scotta, letame, glicerolo	20:70:10	56,82 ± 5,18	120 ± 2,04	301 ± 8,10	54,36 ± 3,07	1881 ± 27,30	191 ± 48,1	92,41 ± 40,5
scotta, letame, glicerolo	70:20:10	21,16 ± 0,72	55,30 ± 4,56	317 ± 4,77	283 ± 7,45	1688 ± 51,3	539 ± 22,4	116,3

Si può osservare che anche nei substrati in codigestione (Tabella 18) il pathway metabolico dominante è quello indirizzato alla produzione di acido butirrico. La sua concentrazione percentuale variava tra il 36 ed il 77%. Ren (2007) ha individuato lo stesso pathway metabolico tra quelli ottimali per la produzione di bio-idrogeno.

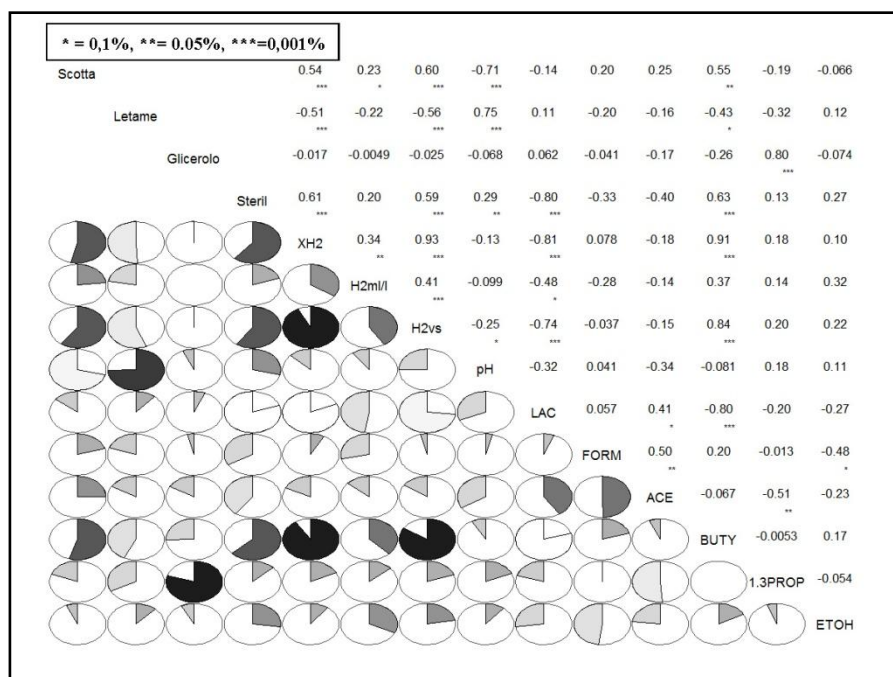


Fig.35 Diagramma di correlazione e significatività.

I risultati di questi esperimenti (Patriarca et al., 2012) sono stati confermati e supportati da quelli dell'analisi della correlazione. I valori numerici descrivono l'entità della correlazione tra le variabili e gli asterischi la significatività statistica. Come si può osservare, una correlazione significativamente positiva è stata ottenuta, con valore 0.84 e 0.91 rispettivamente, tra le rese di produzione di idrogeno e la concentrazione di acido butirrico e la stessa con la percentuale di idrogeno prodotto. Una correlazione significativamente positiva è stata anche ottenuta tra la sterilizzazione dei substrati e la percentuale d'idrogeno prodotto e la resa di produzione (0.61 e 0.59 rispettivamente). Una correlazione significativamente negativa con valore -0.74 è stata rilevata tra la resa di produzione d'idrogeno e la produzione di acido lattico come già osservato in letteratura (Hallenbeck, 2009).

9.5.3. Confronto letame-liquame

I risultati di seguito riportati (tab.19) confermano ulteriormente che il pretrattamento di sterilizzazione incrementa di circa tre - quattro volte le rese di produzione di idrogeno dal letame (da 10,4 a 37,7 ml H₂/g VS) e dal liquame (da 7,2 a 28.9 ml H₂/g VS). Dalla tabella si può anche osservare la capacità tamponante dei substrati: sebbene i test siano stati condotti in assenza di tampone e di controllo del pH, i valori ottenuti alla fine della fermentazione erano ancora nel range ottimale della produzione di idrogeno. Dal confronto dei parametri di processo di produzione di idrogeno dai due substrati sterilizzati, è rilevante osservare che sebbene le rese e le percentuali di idrogeno nel biogas siano confrontabili, con il liquame il processo risulta più veloce. Con entrambi i substrati non sterilizzati il biogas prodotto conteneva oltre all'H₂, il CH₄ e la CO₂.

Tab.19 confronto liquame/letame parametri processo di produzione.

substrati	inoculo	pretrattamenti	Tempo fine produzione (h)	H ₂ (%)	H ₂ (ml/l)	ml H ₂ /g VS	pH in.	pH fin.
letame	F ₂₁₀	/	24	4,26 ± 0,49	83,3 ± 11,3	10,4 ± 1,41	6,8	6,2
letame	F ₂₁₀	sterilizzazione	114	17,8 ± 1	301 ± 14,5	37,7 ± 1,81	6,8	6,1
liquame	F ₂₁₀	/	24	3,54 ± 0,88	57,6 ± 14,2	7,2 ± 1,77	7,2	6,5
liquame	F ₂₁₀	sterilizzazione	48	19,8 ± 1,89	225 ± 19,1	28,9 ± 2,42	8	6,5

Da questo confronto si è deciso di utilizzare il liquame come substrato in codigestione per gli esperimenti successivi.

9.6. Ottimizzazione statistica della mix di substrati

Tra gli obiettivi prefissati da questa ricerca è stato quello di effettuare un'ottimizzazione statistica della composizione dei substrati per la produzione di idrogeno. A tale scopo è stato impiegato il nuovo software statistico della Camo, l'Unscrambler X. Questo software consente, attraverso la progettazione del piano sperimentale e l'analisi statistica multivariata, l'ottimizzazione statistica del processo, nel nostro caso per la produzione di idrogeno. L'uso di questi nuovi metodi di ottimizzazione statistica applicato alle biotecnologie sembra essere molto promettente, e può portare ad un incremento delle rese di produzione di idrogeno prossime al 100% (Pan et al., 2008).

Il disegno sperimentale serve principalmente a definire le variabili più importanti di un processo, valutare se ci sono interazioni tra le variabili, ottenere la massima informazione con il minimo costo (minor numero di esperimenti possibili, per la massima informazione), definire le superfici di risposta ottimali, definire la zona stabile di un processo e costruire un buon set di calibrazione/validazione per costruire un modello predittivo. Esistono diversi modelli statistici (ad es. il Plakett-Burman Screening Design, Box-Behnken Optimization Design, Central Composit Design, etc), che vanno scelti in funzione del processo che si vuole studiare ed ottimizzare e, quindi, dell'informazione che si vuole ottenere. Volendo individuare 1) la composizione migliore di substrati per massimizzare la produzione di idrogeno, da una parte, e 2) la degradazione preferenziale di liquame, dall'altra, è stato scelto un Mixture Design, che viene utilizzato nel caso di miscele e che ha mostrato risultati positivi anche nel caso di bio-produzione di idrogeno da scarti agricoli (Prakasham et al., 2009). Il vantaggio di questo approccio non risiede solo nel fatto di poter ottenere un modello matematico predittivo del processo, ma anche nella possibilità di effettuare un numero limitato di esperimenti ed inferire quindi i risultati per qualsiasi altra composizione dei substrati (sarebbe infatti impossibile effettuare esperimenti per tutte le possibili combinazioni di miscele).

In questa serie sperimentale per garantire l'omogeneità dell'inoculo sono stati considerati idonei unicamente i pools microbici che dopo 24 ore di incubazione mostravano una produzione di biogas di 1000-1200 ml con percentuali di idrogeno intorno al 40-50%. Una volta appurata l'idoneità, gli inoculi venivano centrifugati, il surnatante eliminato ed i pellets risospesi in tampone fosfato 0,1M sterile pH 6,78, in tal modo si preveniva

l'inserimento di potenziali substrati (residui di glucosio, estratto di lievito e peptone) e inibitori del processo fermentativo (acidi grassi e alcoli) contenuti nel terreno di riattivazione.

I substrati - glicerolo grezzo, scotta, liquame bufalino - conservati a -20°C fino all'utilizzo, sono stati sterilizzati (121°C 15 min) per eliminare la comunità microbica autoctona. Il modello statistico, infatti, richiede di limitare al minimo le sorgenti di variabilità affinché possa essere valutata correttamente la variabilità intrinseca delle caratteristiche chimico-fisiche dei substrati e quindi la composizione ottimale che favorisca la produzione di idrogeno.

Gli esperimenti per la produzione di idrogeno sono stati effettuati in reattori batch da 590 ml con un volume di fermentazione di 250 ml e con un inoculo al 20%. Le prove sperimentali e relative repliche sono state determinate dal modello statistico.

Gli esperimenti sono stati condotti con un contenuto di solidi volatili (VS) di 2,06 %. Tale quantità è stata determinata per garantire il massimo contenuto di VS possibile in quanto rappresenta il contenuto in solidi volatili del liquame, il substrato più diluito. Per ottenere tale concentrazione quindi il liquame è stato utilizzato tal quale mentre scotta e glicerolo sono stati opportunamente diluiti con acqua di rubinetto. Prima dell'inoculo i batch contenenti i substrati sono stati sterilizzati in autoclave a 120°C per 20 minuti. Una volta inoculati i reattori, il pH è stato portato a 6,5 tramite aggiunta di soluzioni di NaOH o KCl. I contenitori chiusi ermeticamente sono stati insufflati per 10 min con azoto. Gli esperimenti sono stati condotti a 37°C in un bagnetto termostato e con agitazione a 120 rpm. Ad intervalli di tempo di 24 ore sono stati misurati il pH del liquido di coltura, i prodotti della fermentazione liquida (acidi grassi volatili, acido lattico, alcoli) e gassosi (H_2 , CH_4 e CO_2) e il biogas prodotto.

In tabella 20 sono riportate le condizioni sperimentali ed i valori medi dei principali parametri del processo di produzione di idrogeno: contenuto di idrogeno nel biogas (%), produzione volumetrica di idrogeno (ml), resa (ml H_2/g VS) e il pH a fine fermentazione. La produzione volumetrica di idrogeno è stata utilizzata come parametro target per l'ottimizzazione statistica.

I diversi parametri di produzione variano da valori minimi ottenuti utilizzando come substrato il 100% di liquame a valori massimi ottenuti utilizzando la scotta come unico substrato, mentre il pH a fine fermentazione segue un andamento inverso andando da un minimo di $4,45 \pm 0,02$ ottenuto per la scotta ad un massimo di $6,57 \pm 0,01$ ottenuto per il liquame. Tali risultati confermano la scotta come substrato ottimale per la produzione di idrogeno e l'elevato potere tamponante del liquame.

Tab.20 Condizioni sperimentali e principali parametri del processo di produzione di idrogeno.

	Composizione del substrato (%VS)			H ₂ (%)	H ₂ (ml/l)	ml H ₂ /g VS	pH finale
	Liquame	Scotta	Glicerolo	media	media	media	media
Complete	33,3333	33,3333	33,3333	39,25±2,45	1605,12±209,6	97,4±12,72	4,85±0,12
Edge 01	66,6667	33,3333	0	35,68±1,99	1367,88±145,64	83±8,84	5,3±0,45
Edge 02	33,3333	66,6667	0	41,19±0,69	1838,28±359,56	111,55±21,82	4,73±0,04
Edge 03	66,6667	0	33,3333	25,37±1,97	598,96±265,04	36,35±16,08	5,43±0,00
Edge 04	0	66,6667	33,3333	39,2±1,06	1562,48±154,96	94,81±9,4	4,49±0,06
Edge 05	33,3333	0	66,6667	17,42±0,82	395,28±10,4	23,99±0,63	5,33±0,16
Edge 06	0	33,3333	66,6667	38,77±3,33	1181,68±125,28	71,7±7,6	4,66±0,09
Vertice 01	100	0	0	3,18±0,6	46,44±9,04	2,82±0,55	6,57±0,01
Vertice 02	0	100	0	42,05±4,47	1680,48±542	101,97±32,89	4,45±0,02
Vertice 03	0	0	100	24,76±2,14	527,96±39,96	32,04±2,43	5,01±0,1

In tabella 21 sono riportati i valori di fine fermentazione dei principali metaboliti prodotti durante il processo di produzione di idrogeno nelle diverse condizioni testate. I valori riportati sono relativi ai campioni più rappresentativi (con produzione di idrogeno vicina al valor medio) di tutte le condizioni sperimentali testate. Le deviazioni standard delle tre repliche strumentali sono inferiori al 20% e non sono state riportate a favore di una maggiore leggibilità della tabella stessa. Come mostrato in tutte le condizioni sperimentali si rileva un tipo di fermentazione acido mista con scarsa produzione di etanolo. Ad eccezione del Vertice 01, contenente solo liquame, il principale metabolita associato alla produzione di idrogeno sembra essere l'acido butirrico, seguito da acido acetico ed acido formico. Per quanto riguarda i metaboliti non associati alla produzione di idrogeno l'acido propionico si rileva in concentrazioni piuttosto elevate mentre l'acido lattico si riscontra solo in piccole quantità. Come atteso, il 1,3 propandiolo e il 2,3 butandiolo, metaboliti associati ai pathways metabolici coinvolti nella degradazione del glicerolo, si riscontrano unicamente nelle prove contenenti tale substrato.

Tab.21 Metaboliti prodotti (ppm) a fine fermentazione nelle diverse condizioni sperimentali.

	succinico	lattico	formico	acetico	propionico	butirrico	1,3 propandiolo	2,3 butandiolo	etanolo
Complete	154	0	371	658	514	2140	1437	0	0
Edge 01	183	1,73	455	1153	2182	2025	0	0	109
Edge 02	100	47,9	582	882	2841	2043	0	1504	506
Edge 03	4,56	0	213	469	401	2190	3034	0	162
Edge 04	216	101	78,1	637	2,56	1756	0	2998	87,7
Edge 05	70,8	0	137	482	126	1572	3744	0	0
Edge 06	64,7	37,9	51,5	696	9,01	1348	72,9	1324	30,9
Vertice 01	0	5,12	78,1	1121	1200	161	0	0	158
Vertice 02	623	803	308	720	168	1403	0	3974	0
Vertice 03	0	133	67,9	471	11,6	1479	2204	2046	19,3

Al fine di valutare l'effettiva bio-conversione del substrato in idrogeno è stata calcolata l'efficienza di degradazione del lattosio contenuto nella scotta e dei suoi prodotti di idrolisi, il glucosio e il galattosio. Tale scelta è stata determinata sia dal fatto che gli zuccheri rappresentano il substrato ottimale per la produzione di idrogeno, sia perché, tramite analisi cromatografiche (HPLC), è possibile monitorare la loro concentrazione durante il processo fermentativo. Come si nota in tabella 22, l'efficienza di utilizzo degli zuccheri diminuisce in funzione della quantità di scotta e quindi della concentrazione degli zuccheri stessi presenti nel substrato iniziale. Tale risultato fa supporre che il carico organico utilizzato nelle prove sperimentali (2.06% in VS) sia eccessivo e che quindi si potrebbe migliorare ulteriormente la produzione di idrogeno diluendo il substrato. Tale ipotesi è ben rappresentata dall'efficienza di degradazione del lattosio la quale è praticamente totale (98 o 100%) a contenuto di scotta pari al 33.333% mentre scende a circa il 40% per le mix contenenti il 66.6667% di scotta, fino ad arrivare al 31% al Vertice 02, costituito da 100% di scotta.

Tab.22 Efficienza % di degradazione degli zuccheri nelle diverse condizioni sperimentali.

	Substrate composition %			efficienza degradazione %		
	Cow_Manure	Cheese_Whey	Crude_Glycerol	lattosio	glucosio	galattosio
Complete	33,3333	33,3333	33,3333	98	100	100
Edge 01	66,6667	33,3333	0	100	100	100
Edge 02	33,3333	66,6667	0	43	100	100
Edge 04	0	66,6667	33,3333	39	82	63
Edge 05	33,3333	0	66,6667	-	-	-
Edge 06	0	33,3333	66,6667	nd	nd	nd
Vertice 01	100	0	0	-	-	-
Vertice 02	0	100	0	31	93	48
Vertice 03	0	0	100	-	-	-

Come si può vedere nella figura 36 , il valore medio della produzione massima di idrogeno predetta dal modello oscilla intorno ai 458 ml di idrogeno (*range* della superficie di risposta ottimale : 432-484 ml di H₂), con il massimo rilevato sperimentalmente pari ad 459,57±36,41 ml di H₂, ed ottenuto miscelando il 66% di scotta con 33% di liquame.

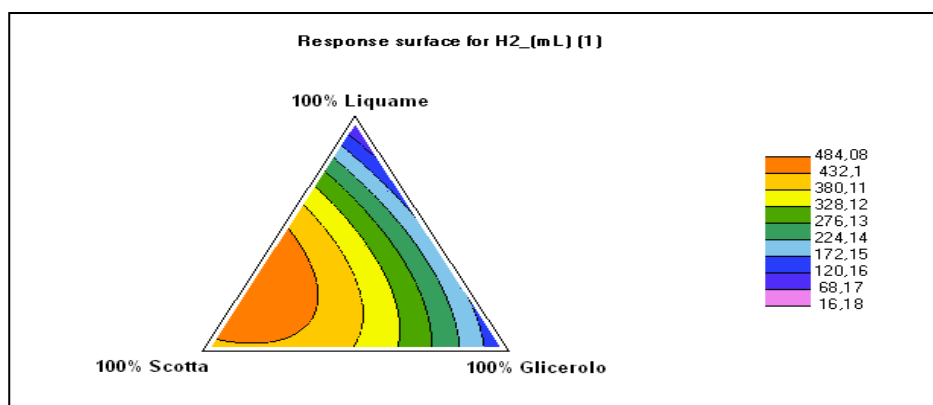


Fig.36 Superficie di risposta del Mixture Design per la produzione di idrogeno (ml).

La superficie di risposta ottimale mostra inoltre la possibilità di miscelare i substrati in modo diverso, a seconda delle rispettive disponibilità, pur mantenendo la massima produzione entro un range ottimale sufficientemente ampio (Fig.36). Per quanto riguarda la scotta, la percentuale massima che consente di rimanere all'interno di tale superficie di risposta ottimale è pari al 92%, con 8% di liquame. Il contributo del glicerolo, invece, è più modesto, con una percentuale massima pari al 28%, insieme al 16% di liquame e 56% di scotta. Infine, per quanto riguarda il liquame, la composizione ottimale può raggiungere al massimo il 54%, insieme con il 46% di scotta. Tuttavia, è interessante notare come in condizioni sub-ottimali con una risposta che oscilla comunque tra i 380-432 ml di H₂, sia possibile aumentare la percentuale di liquame utilizzato fino al 64%, miscelandolo con un 36% di scotta. Quest'ultima rappresenta sicuramente il tipo di substrato più idoneo e prontamente disponibile per la bio-conversione in idrogeno, con un contributo, all'interno della risposta ottimale, in ogni caso superiore al 46%.

Tab.23 Range ottimali dei 3 substrati ai fini della produzione di idrogeno.

substrati	%min	%max
Liquame	8	54
Scotta	46	92
Glicerolo	0	28

E' importante sottolineare che lo studio tramite tali superfici di risposta permette di operare in modo molto flessibile con i suddetti substrati, in base alle esigenze e quantità da smaltire. Il glicerolo, ad esempio, che rappresenta il substrato meno influente, in condizioni sub-ottimali (quindi con una produzione di idrogeno comunque superiore ai 379 ml) può arrivare al 47%, insieme al 49% della scotta ed il 4% del liquame. Questa informazione sarebbe molto importante nel caso si avesse interesse a smaltire un maggior quantitativo di tale substrato. Ciò conferma l'utilità del disegno sperimentale come strumento di gestione per un processo di questo tipo, visto che le disponibilità dei vari substrati possono anche cambiare nell'arco delle stagioni e che impianti installati in aziende diverse avranno disponibilità e/o quantitativi di substrati differenti. Avere quindi uno strumento predittivo che consente di stimare il range all'interno del quale si possono miscelare vari substrati (a seconda delle proprie esigenze e disponibilità) per mantenere una produzione di

idrogeno ottimale o sub-ottimale, offre un notevole vantaggio dal punto di vista della gestione efficiente di un tale impianto

Tab.24 Analisi della varianza ANOVA.

ANOVA Table - H ₂ (ml)					
ANOVA	SS	DF	MS	F-ratio	p-value
Summary					
Model	247584,5000	5,0000	49516,9023	35,7785	0,0001
Error	9687,9033	7,0000	1383,9862		
Corr. total	257272,4063	12,0000			
Variables					
Linear Mixture	169282,3125	3,0000	56427,4336	40,7717	0,0001
cow_manure*cheese_whey (AB)	58146,1523	1,0000	58146,1523	42,0135	0,0003
cow_manure*glycerol (AC)	8495,8438	1,0000	8495,8438	6,1387	0,0424
cheese_whey*glycerol (BC)	14374,2354	1,0000	14374,2354	10,3861	0,0146
Model check					
Mean					
Linear	169282,3125	3,0000	56427,4336	40,7717	0,0001
Interaction 2	78302,1953	3,0000	26100,7324	18,8591	0,0010
Interaction 3	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	1,0000
Quadratic					
Cubic					
Total					
Lack of Fit					
Lack of fit	7227,6108	5,0000	1445,5221	1,1751	0,5193
Pure Error	2460,2930	2,0000	1230,1465		
Error	9687,9033	7,0000	1383,9862		
Quality					
Method used	design				
R-square	0,9623				
Adjusted R-square	0,9354				
R-square prediction	0,7420				
S	37,2020				
Mean	296,0515				
C.V. in %	12,5660				
PRESS	66372,2500				

Tab.25 Tabella di confronto tra i dati sperimentali (Actual Value) e quelli predetti dal modello (Predicted Value). I campioni cp01-cp03 vengono utilizzati dal modello per confrontare la variabilità intra (variabilità tra repliche) con quella extra (variabilità tra condizioni sperimentali diverse).

Diagnostics for H ₂ (ml)								
Diagnostics	Random Order	Actual Value	Predicted Value	Residual	Leverage (hii)	Student Residual	Cook Distance	Std Order
Complete	12	401,28	370,5716	30,7084	0,1618	0,9016	0,0261	1
Edge01	3	341,97	352,388	-10,418	0,4594	-0,3809	0,0205	2
Edge02	13	459,57	482,4137	-22,8437	0,4594	-0,8351	0,0988	3
Edge03	11	149,74	125,6052	24,1348	0,4594	0,8823	0,1103	4
Edge04	6	390,62	409,358	-18,738	0,4594	-0,685	0,0665	5
Edge05	1	98,82	156,2166	-57,3966	0,4594	-2,0983	0,6236	6
Edge06	10	295,42	309,9438	-14,5237	0,4594	-0,531	0,0399	7
Vertice01	8	11,61	16,1823	-4,5723	0,8655	-0,3352	0,1205	8
Vertice02	9	420,12	406,2594	13,8606	0,8655	1,0161	1,1077	9
Vertice03	7	131,99	108,0166	23,9734	0,8655	1,7574	3,3138	10
cp01	4	345,26	370,5716	-25,3116	0,1618	-0,7431	0,0178	11
cp02	2	387,37	370,5716	16,7984	0,1618	0,4932	0,0078	12
cp03	5	414,9	370,5716	44,3284	0,1618	1,3015	0,0545	13

Come si può osservare in tabella 24, l'analisi della varianza ANOVA mostra un R^2 pari a 0,962 (il che significa che il modello è in grado di descrivere il 96% della variabilità totale del sistema) ed un valore di p altamente significativo (p-value = 0,0001). Inoltre la bontà del modello è anche confermata da un lack of fit $> 0,05$. La capacità predittiva risulta sufficientemente buona, con l'eccezione del punto sperimentale Edge 5, che potrebbe dipendere da un set di esperimenti non andato bene (ad es. a causa di problemi di perdita di gas, di attivazione dell'inoculo, od altro). Questo motivo potrebbe spiegare anche l'abbassamento dell' R^2 in predizione, che scende a 0,742. Ad ogni modo la differenza tra il valore predetto e quello sperimentale si attesta intorno al 16,11 % (valore medio), malgrado la notevole variabilità riscontrata in questo sistema, a riprova della validità del modello.

9.7. Ruolo degli idrogeno-produttori nell'ultima fase della digestione anaerobica: ottimizzazione del processo di produzione di CH₄

I processi di digestione anaerobica a singolo e doppio stadio sono stati recentemente impiegati per la produzione di metano da differenti tipologie di biomasse, sia a scala di laboratorio, che pilota e di impianto. E' ampiamente riconosciuto che la digestione anaerobica a doppio stadio oltre ad essere necessaria per substrati con valori di pH bassi e scarso potere tamponante, presenta il vantaggio di produrre al primo stadio l'idrogeno.

Uno degli aspetti, scarsamente indagati ma fortemente suggeriti nell'ambito di questo processo, è quello relativo alle comunità microbiche coinvolte in entrambi gli stadi (Demirel et al., 2010). D'altronde l'importanza delle relazioni sintrofiche tra i microorganismi nella produzione di metano è stata fondamentale per la comprensione del processo di digestione anaerobica. In particolare sebbene sia stato riconosciuto che

la produzione di idrogeno possa essere un fattore limitante per la metanogenesi, esistono pochi studi sul ruolo di questi microorganismi nei consorzi utilizzati per la produzione di metano.

Ad esempio, Bagi et al., nel 2007 (Bagi et al., 2007) ottengono un incremento della produzione di metano del 160-170% da liquame di maiale arricchito con l'effluente di un digestore anaerobico, tramite l'aggiunta di un ceppo batterico idrogeno produttore (*Caldicellulosyruptor saccharolyticus*) al naturale consorzio di produzione di biogas. Questo approccio, a nostra conoscenza, non ha avuto un giusto seguito nei molti lavori pubblicati che indagano il processo della digestione anaerobica sia a singolo che a doppio stadio.

Inoltre nel liquame/letame animale sono presenti consorzi microbici in grado di effettuare tutti gli step necessari al processo di digestione anaerobica: idrolisi, acidogenesi-acetogenesi e metanogenesi. Tuttavia, per la presenza preponderante di microorganismi metanigeni e per la bassa concentrazione di carboidrati, sono pochi i lavori che hanno indagato la produzione di idrogeno da questi substrati (Yokoyama et al., 2007, Xing et al., 2010).

9.7.1. Potenzamento della produzione di metano dal liquame mediante inoculo di una comunità di idrogeno produttori

Al fine di mettere in evidenza il ruolo di un'inoculo di idrogeno produttori (F_{210}) nella complessiva produzione di metano sono state allestite prove di produzione di metano dal liquame non trattato (assenza di trattamenti di sterilizzazione o di pH con e senza l'aggiunta dell'inoculo F_{210}).

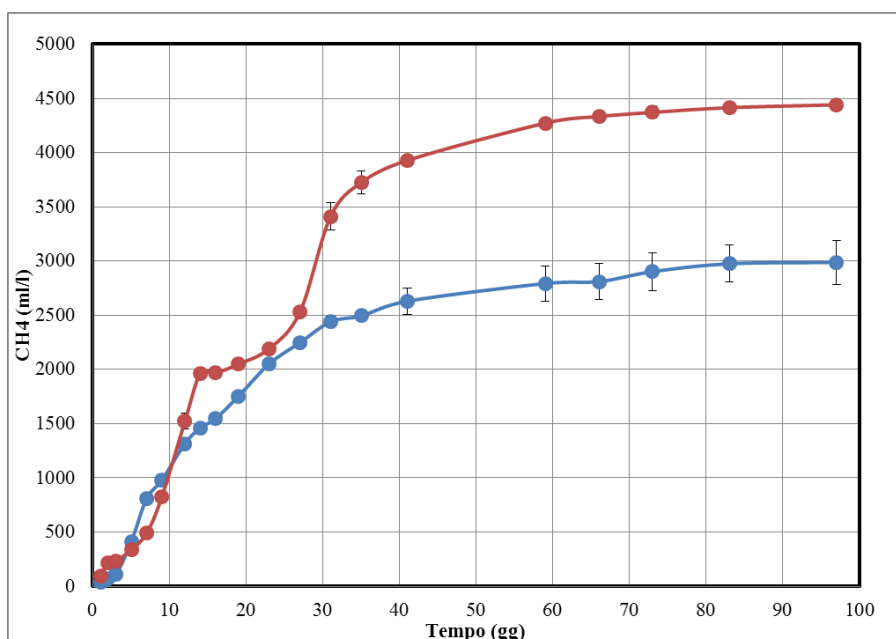


Fig.37 Produzione cumulativa di metano dal liquame in presenza e assenza (rosso, blu) dell'inoculo F_{210} .

Tab. 26 Parametri di processo di produzione di metano dal liquame in presenza dell'inoculo F_{210} .

substrati	CH ₄ (ml/l)	Resa CH ₄ (ml/g VS)	CH ₄ (%)	Resa H ₂ (ml/g VS)	H ₂ (%)
LiqNS + F210 (pH 6,78)	4433±30	477±3,28	62-64	2	1
LiqNS (pH 6,78)	3000±202	373±25,3	56-59	0	0,02

I risultati mostrano che la produzione volumetrica di CH_4 (ml/l) e la percentuale di CH_4 nel biogas incrementano in presenza dell'inoculo F_{210} .

Solo nel reattore con l'aggiunta di F_{210} veniva rilevata, nelle prime 24 ore di fermentazione, una percentuale di H_2 nel biogas del 6% che scendeva al 3% nelle successive 72 ore fino a scomparire del tutto. È possibile ipotizzare che con l'inoculo F_{210} sia attiva, nel corso del processo, una produzione di idrogeno concomitante al suo consumo.

Le rese ottenute e corrette per il VS dell'inoculo confermano l'efficienza maggiore del processo di digestione anaerobica del reattore con F_{210} . L'analisi della varianza (ANOVA) ad un fattore con un alfa di 0,05, utilizzando come parametro la presenza/assenza dell'inoculo di idrogeno produttori e come variabile la produzione di idrogeno (ml/l), ha mostrato che le differenze sono statisticamente significative.

9.7.2. Produzione di idrogeno e metano da liquame: separazione delle fasi (idrogenogenesi e metanogenesi) mediante sterilizzazione

Sono stati avviati due batch, con liquame non sterile tal quale (reattore A) e con liquame non sterile inoculato con F_{210} (reattore B). Questi stessi batch sono stati poi utilizzati come inoculo di metanigeni per altre due serie di batch, rispettivamente liquame sterile tal quale (reattore C) e liquame sterile inoculato con F_{210} (reattore D), già avviati alla produzione di H_2 ma alla fine del processo produttivo. Ne sono scaturite due ulteriori batch che hanno prodotto metano (rispettivamente il reattore E ed il reattore F).

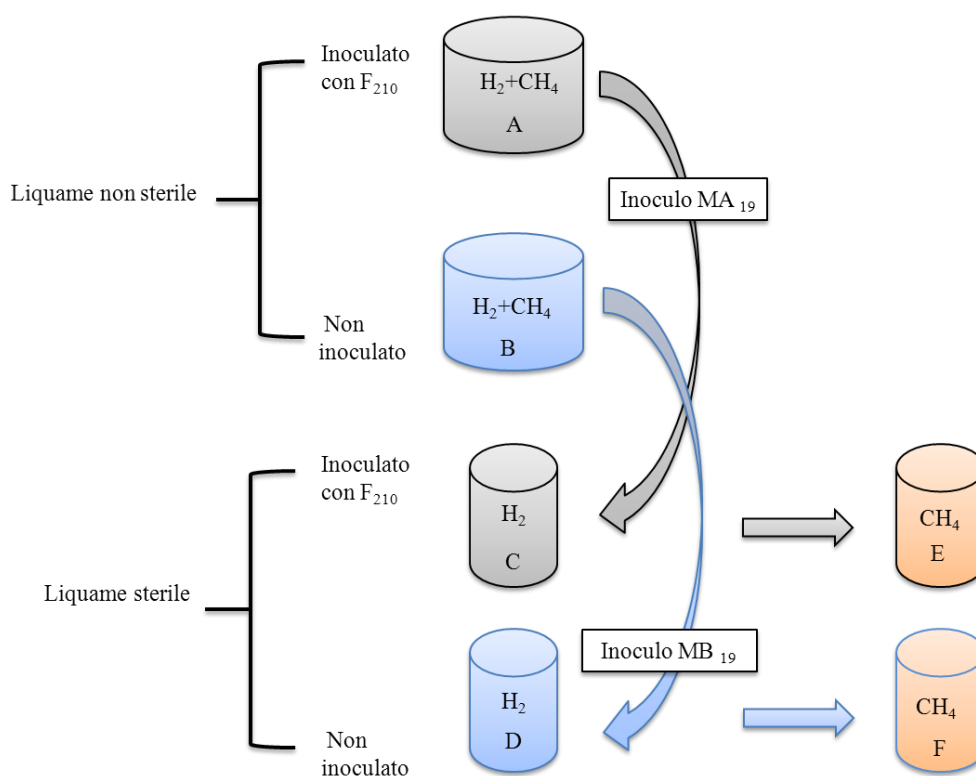


Fig.38 Schema sperimentale per la produzione di idrogeno e metano dal liquame.

Tab.27 Parametri di processo di produzione di idrogeno e metano dal liquame. Da rilevare che i reattori C e D diventano E ed F dopo aggiunta degli inoculi rispettivamente MA₁₉ e MB₁₉.

Produzione di idrogeno e metano a singolo stadio													
pretrattamento liquame	inoculo H ₂ produttori	Reattore	Tempo fine produzione (H ₂)	H ₂ (%)	H ₂ (ml/l)	ml H ₂ /g VS	pH.fin	inoculo CH ₄ produttori	Tempo fine produzione (g)	CH ₄ (%)	CH ₄ (ml/l)	ml CH ₄ /g VS	pH fin.
-	F ₂₁₀	A	24	3,54	32,9	4,21	6,4-6,7	no	44	74,8	2267	293	6,4-6,7
-	-	B	24	0,07	0,83	0,12	6,4-6,7	no	44	59,1	1672	241	6,4-6,7
Produzione di idrogeno e metano a doppio stadio													
pretrattamento liquame	inoculo H ₂ produttori	Reattore	Tempo fine produzione (H ₂)	H ₂ (%)	H ₂ (ml/l)	ml H ₂ /g VS	pH.fin	inoculo CH ₄ produttori	Tempo fine produzione (g)	CH ₄ (%)	CH ₄ (ml/l)	ml CH ₄ /g VS	pH fin.
sterilizzazione	F ₂₁₀	C	48	19,8	225	28,9	5,5-5,8	MB ₁₉ (E)	36	81,6	2260	299	6,4-6,7
sterilizzazione	-	D	72	0,6	6,02	0,86	6,4-6,7	MB ₁₉ (F)	31	75,6	1587	225	6,4-6,7

Come si può osservare dalla tabella 27, solo con il substrato sterile ed inoculato con F₂₁₀ (reattore C) si sono ottenuti valori significativi di produzione e di percentuale d'idrogeno nel biogas, rispettivamente di 225 ml H₂/l e 19,8%. Ciò conferma la presenza nel liquame, di una popolazione microbica attiva di consumatori d'idrogeno. E' interessante osservare, tuttavia, che anche l'aggiunta dell'inoculo di idrogeno produttori nel liquame non sterile (A) incrementa la produzione di idrogeno rispetto alla prova senza inoculo (B). Quindi la sterilizzazione permette di separare le due fasi eliminando i metanigeni.

Con il liquame non sterilizzato la produzione di metano nei due reattori si è conclusa dopo 44 giorni: nel reattore A la produzione di metano è stata significativamente più elevata (2,27 l CH₄/l) rispetto a quella nel reattore B (1,67 l CH₄/l) così come la percentuale di metano nel biogas, che è passata dal 59,1% nel reattore B al 75,8% nel reattore A.

Successivamente per valutare la produzione di metano a doppio stadio, 15 ml del fermentato del reattore A e B, al diciannovesimo giorno di produzione di metano, sono stati utilizzati come inoculo di metano produttori (MA₁₉ e MB₁₉), rispettivamente nei reattori C e D, al termine del processo di produzione di H₂. I reattori così inoculati sono stati siglati E ed F.

Nel reattore E (liquame sterile inoculato con F₂₁₀) la produzione cumulativa di metano è risultata più elevata - 2,22 l CH₄/l - rispetto a quella nel reattore F (liquame sterile non inoculato) - 1,57 l CH₄/l. La percentuale di metano nel biogas si è rivelata ma con valori maggiori nel reattore E (81,6%) rispetto al reattore F (75,6%). Infine, dal confronto dei parametri di processo della produzione potenziale di metano a singolo e doppio stadio, si può osservare che a parità di produzione volumetrica e di resa (ml CH₄/g VS), il processo a doppio stadio consente:

- di diminuire significativamente i tempi di produzione di metano, passando da 44 giorni (reattori A ed B) a 36 giorni (reattori E) e a 31 giorni (reattori F);
- di incrementare la produzione di metano con l'ulteriore produzione di idrogeno (10% di idrogeno nel biogas).

Inoltre l'aggiunta di un inoculo selezionato di idrogeno produttori (F_{210}) incrementa la produzione volumetrica di CH_4 (ml/l) e la percentuale di CH_4 nel biogas sia a singolo (reattore A) che a doppio stadio (reattore C-E). E' anche rilevante osservare che:

- il valore del pH a fine processo di produzione di idrogeno (pH 5,5-5,8) non inibisce l'attività dei metano produttori.

Tab 28 Parametri di processo di produzione di metano dal liquame.

pretrattamento liquame	inoculo idrogeno produttori	inoculo metano produttori	Tempo fine produzione (g)	CH_4 (%)	CH_4 (ml/l)	ml CH_4 /g VS	pH in.	pH fin.	g VS/l reattore
-	F_{210}	autoctona	44	74,8	2267	293	6,4-6,7	6,4-6,7	7,82
-	-	autoctona	44	59,1	1672	241	6,4-6,7	6,4-6,7	7,00
sterilizzazione	F_{210}	M_{19}	36	81,6	2260	299	5,5-5,8	6,4-6,7	7,56
sterilizzazione	-	M_{19}	31	75,6	1587	225	6,4-6,7	6,4-6,7	7,05

9.7.3. Produzione di idrogeno e metano da liquame: separazione delle fasi (idrogenogenesi e metanogenesi) mediante variazione del pH

E' stata allestita una serie sperimentale per verificare la possibilità di separare le fasi di idrogenogenesi e metanogenesi mediante variazione del pH del liquame. A tal fin il pH iniziale del liquame inoculato e non con F_{210} è stato portato a pH 5,5 e non è stato poi modificato nel corso dell'esperimento.

I risultati mostrano che il pH 5.5 permette di separare le due fasi produttive, e consente di ottenere un incremento della produzione volumetrica di CH_4 , della % di CH_4 nel biogas e delle rese; inoltre la produzione complessiva di bioenergia nel doppio stadio risulta ulteriormente incrementata dalla produzione di idrogeno. L'analisi della varianza (ANOVA) ad un fattore ha confermato la differenza statisticamente significativa ($\alpha \leq 0,05$) tra i trattamenti che hanno subito la modifica del pH e aggiunta dell'inoculo F_{210} e quelli non pretrattati e senza aggiunta di F_{210} .

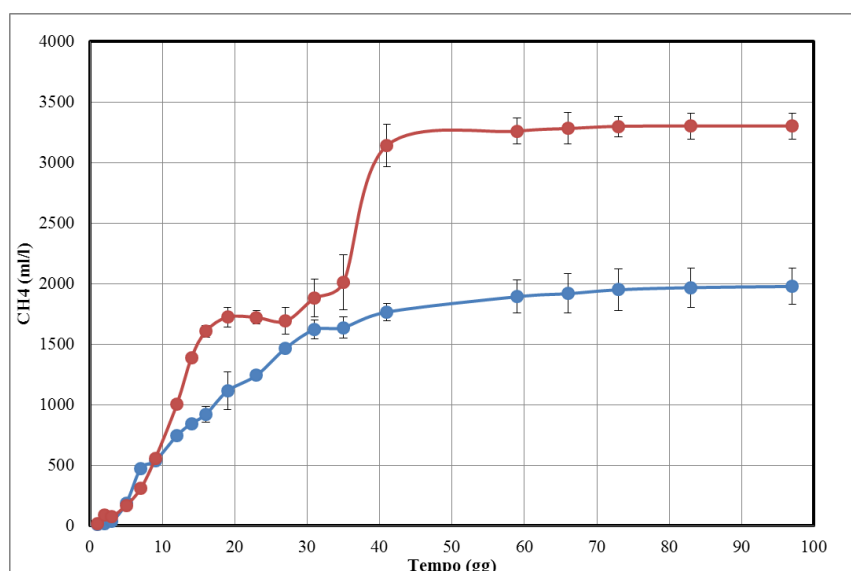


Fig.39 Produzione cumulativa di metano dal liquame acidificato, con e senza (rosso e blu) inoculo F_{210} .

Tab. 29 Parametri di processo di produzione di metano dal liquame a singolo e doppio stadio.

Produzione di idrogeno e metano a singolo stadio											
pretrattamento liquame	inoculo H_2 produttori	Reattore	Tempo fine produzione (H_2)	H_2 (%)	H_2 (ml/l)	ml H_2 /g VS	pH.fin	CH_4 (%)	CH_4 (ml/l)	ml CH_4 /g VS	pH fin.
-	-	L	72	0,02-0,03	-	-	6,4-6,6	54-56	1978±148	247±18,5	6,5-6,8
Produzione di idrogeno e metano a doppio stadio											
pretrattamento liquame	inoculo H_2 produttori	Reattore	Tempo fine produzione (H_2)	H_2 (%)	H_2 (ml/l)	ml H_2 /g VS	pH.fin	CH_4 (%)	CH_4 (ml/l)	ml CH_4 /g VS	pH fin.
pH 5,5	F_{210}	M	24	11±0,43	224±12	24±1,3	5,4-5,7	61-65	3261±107	351±14	6,5-6,8

9.7.4. Evidenza sperimentale della presenza di una comunità di idrogeno produttori nel liquame: produzione di metano da scotta

Avendo sperimentalmente verificato sia la produzione di H_2 , anche se in bassa percentuale, nel liquame non inoculato sia l'incremento di produzione di metano con l'aggiunta di F_{210} , si è proceduto a realizzare una nuova serie sperimentale mirata ad evidenziare la presenza funzionale di microorganismi idrogeno produttori nel liquame. A tal fine le prove sono state allestite utilizzando come substrato la scotta che, come detto precedentemente, è un substrato favorevole agli idrogeno produttori. Per questo esperimento è stato effettuato un scaling up di cinque volte inoculando batch da 590 ml, contenenti scotta sterile, con una comunità di metanigeni (M_{12}) proveniente dalla digestione anaerobica di liquame a 37°C. La percentuale di metano nel biogas al momento del prelievo dell'inoculo e dopo 12 giorni era del 45%. La prova è stata effettuata a due condizioni di pH, la prima di 6,2, cioè al naturale valore di pH della scotta, la seconda a pH 5,5, condizione ritenuta favorevole agli idrogeno produttori e sfavorevole per i metanigeni. Una seconda serie di batch è stata preparata allo stesso modo aggiungendo però anche F_{210} , per verificare se comunque l'aggiunta di un consorzio specifico di idrogeno produttori potesse ulteriormente incrementare la produzione di metano. Nelle due prove il pH, dopo la fase ad idrogeno, è stato portato a 7.

In tabella 30 sono presentati i risultati dei parametri di processo riguardo all'idrogeno ed al metano ottenuti mentre in figura 40 la produzione cumulativa di metano è mostrata in relazione alla produzione dei principali metaboliti.

Tab.30 Parametri di processo relativi alla produzione di metano da scotta sterile inoculata con metanigeni (liquame acclimatato M_{12}) e con un inoculo misto di idrogeno produttori e metanigeni ($F_{210} + M_{12}$) a due condizioni di pH: pH 6,2 (tal quale) e a pH corretto a 5,5; i valori senza alcuna lettera in comune differiscono significativamente per $P \leq 0,05$ secondo il test HSD di Tukey.

substrati	fine prod. H_2 (h)	% H_2	ml H_2 /g VS	H_2 (ml/l)	% CH_4	ml CH_4 /g VS	CH_4 (ml/l)	fine prod. CH_4 (gg)
Scotta sterile pH 6,2 + M_{12}	120	31,7 ± 2,37	95,5 ± 6,08	1025 ± 66,1	68,1 ± 0,83	271 ± 10,9	2939 ± 118 ^{abd}	85
Scotta sterile pH 5,5 + M_{12}	168	30,2 ± 1,85	100 ± 9,75	1087 ± 11,7	68,1 ± 1,56	252 ± 20	2742 ± 222 ^{ab}	85
Scotta sterile pH 6,2 ($M_{12} + F_{210}$)	48	35,0 ± 0,70	109 ± 12,5	1332 ± 153	71,1 ± 1,21	316 ± 7,00	3853 ± 82 ^{cd}	57
Scotta sterile pH 5,5 ($M_{12} + F_{210}$)	48	33,5 ± 0,83	106 ± 5,29	1290 ± 215	70,4 ± 1,21	276 ± 21,0	3366 ± 255 ^{acd}	57

come ipotizzato nel liquame (M_{12}) è presente una comunità di idrogeno produttori. La produzione di idrogeno ad entrambi i pH è inferiore, ma tuttavia paragonabile, a quella ottenuta per l'inoculo F_{210} dalla scotta in precedenti esperimenti (1447 ml H_2 /l, 39,2% H_2).

Non si rilevano sostanziali differenze nella produzione di H_2 per le due condizioni di pH. Con l'aggiunta di F_{210} si riducono i tempi di produzione di H_2 e si ottiene un incremento sia delle % di idrogeno nel biogas che della produzione.

L'aggiunta di un substrato favorevole alla produzione di idrogeno avvantaggia la comunità idrogeno produttrice.

L'aggiunta di F_{210} abbassa i tempi di massima produzione di metano da 85 a 57 giorni. Inoltre, come si può osservare dagli andamenti della produzione di metano non cumulativa (ΔCH_4 ml/l), la velocità di produzione è molto più elevata negli esperimenti con l'aggiunta di F_{210} . L'analisi della varianza (ANOVA) ad un fattore, utilizzando un alfa di 0,05 ha mostrato che le differenze tra i trattamenti sono statisticamente significative. Il test non-parametrico di Siegel- Tukey ha confermato una differenza significativa nei test con aggiunta e senza aggiunta di inoculo di idrogeno produttori, tuttavia non sembra esserci una differenza significativa nell'utilizzo di pH diversi. Ciò conferma i risultati degli esperimenti preliminari eseguiti in *batch* su glucosio, nei quali si è osservato che scarti di pH troppo bassi sono ancora nel range ottimale degli idrogeno produttori, inoltre su un substrato altamente zuccherino quale la scotta, tali valori di pH non rappresentano un parametro discriminante per i batteri metanigeni.

Per entrambe le condizioni sperimentali alla fase esponenziale della curva di produzione di metano corrisponde il consumo di acido acetico e butirrico mentre il propionico è utilizzato nella fase di produzione più lenta.

Dal confronto con i risultati di produzione di metano dal liquame inoculato con F_{210} è possibile ipotizzare che, oltre all'aggiunta di un substrato ricco in carboidrati (come è nella maggior parte degli impianti a biogas), un potenziamento della comunità degli idrogeno produttori nel reattore a metano dovrebbe

ulteriormente migliorare il processo, in termini di produzione volumetrica, di % di metano nel biogas e di resa.

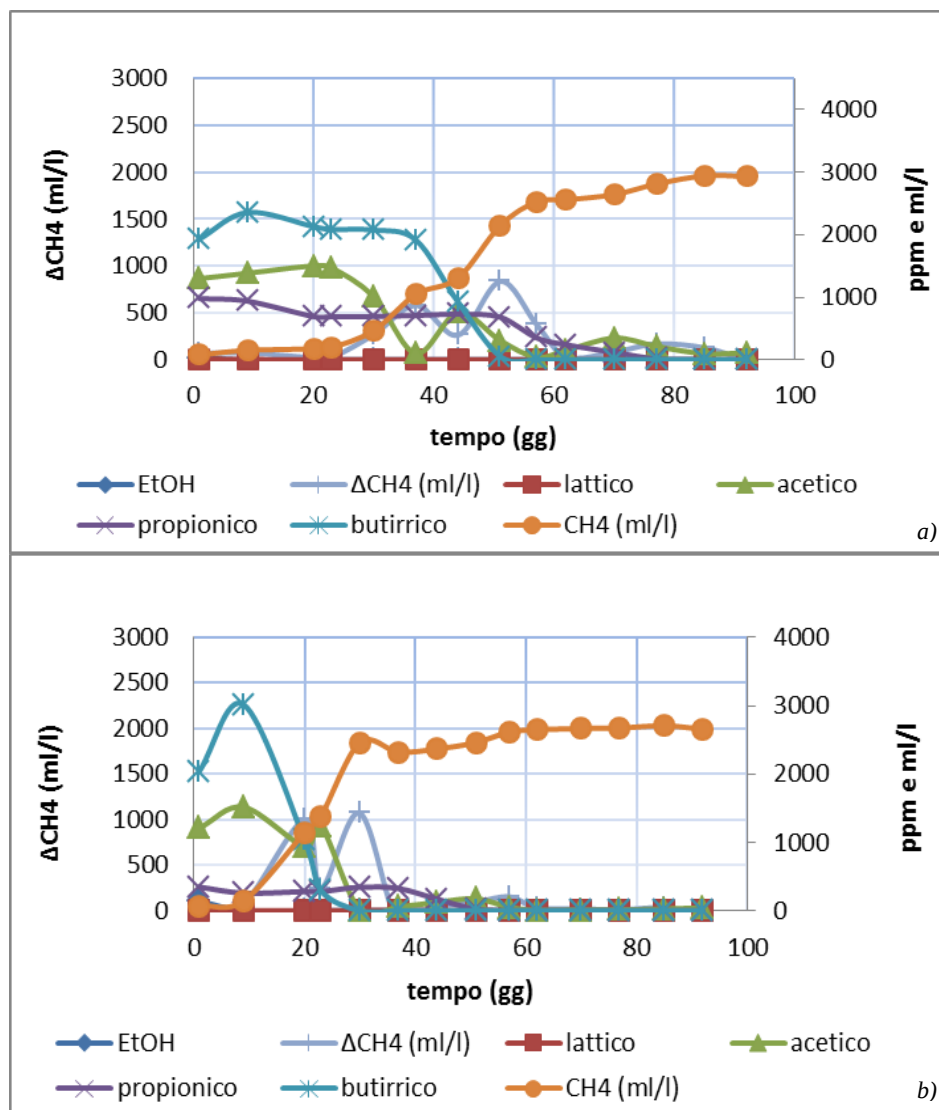


Fig.40 Produzione cumulativa di metano dalla scotta inoculata con metanigeni (liquame acclimatato M_{12}) a due condizioni di pH: a) tal quale (pH 6.2) e b) 5,5 in relazione alla produzione dei principali metaboliti.

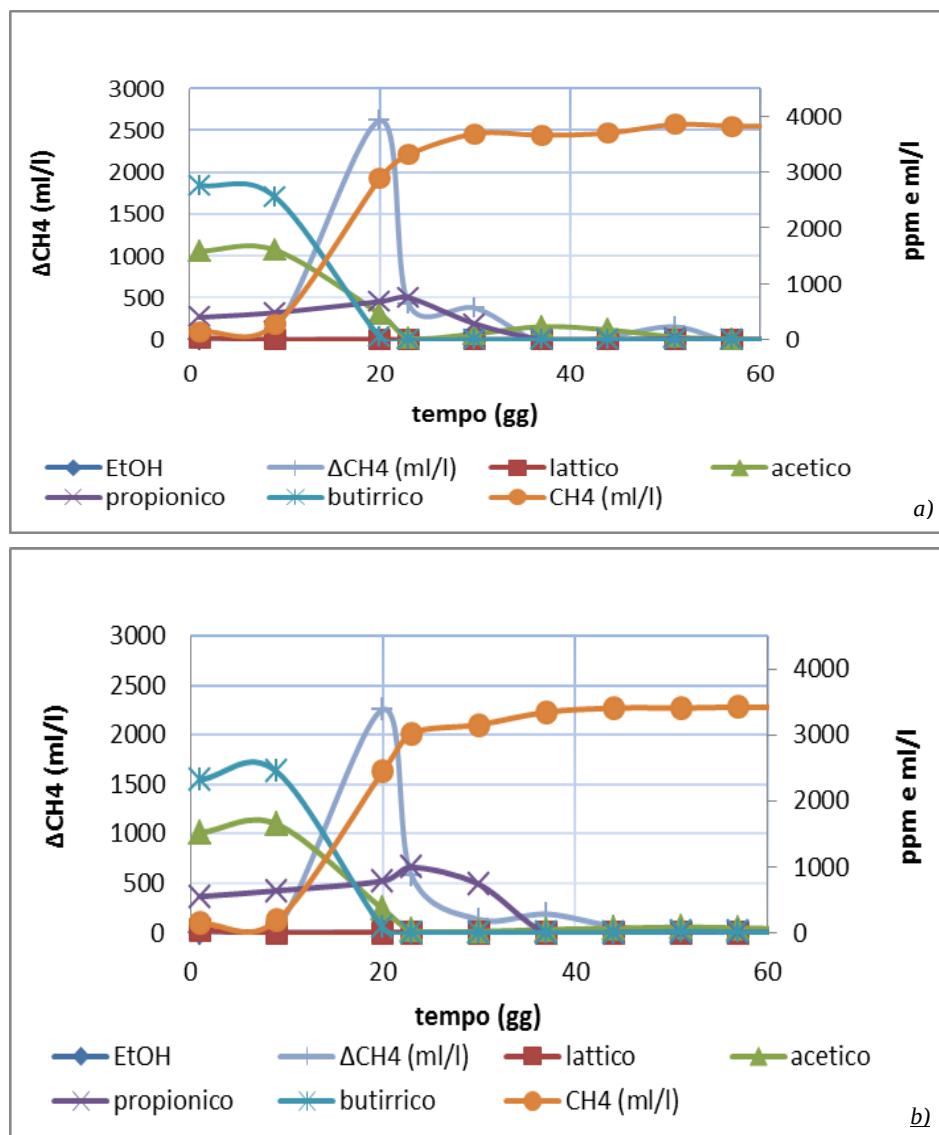


Fig.41 Produzione cumulativa di metano dalla scotta inoculata con un inoculo misto di idrogeno produttori e metanigeni ($F_{210} + M_{12}$) a due condizioni di pH : a) tal quale (pH 6.2) e b) 5,5 in relazione alla produzione dei principali metaboliti.

**CAPITOLO X
CONCLUSIONI**

L'analisi dell'attuale scenario energetico (International Energy Agency, 2010) impone la necessità di far fronte alla carenza dei combustibili fossili rispetto alla domanda mondiale di energia, al conseguente innalzamento dei loro costi e al problema ambientale derivante dal loro utilizzo (Hallenbeck, 2009). L'attuale situazione vede una società basata prevalentemente su risorse non rinnovabili; infatti le fonti energetiche oggi più appetite, petrolio e gas naturale, sono quelle che maggiormente scarseggiano. Attualmente il consumo mondiale di energia ha superato ampiamente i 10 miliardi di tonnellate di petrolio equivalente (TEP) e secondo le previsioni più attendibili tale dato triplicherà nel 2050 rispetto ai valori attuali. Per prevenire e contrastare l'attuale portata della crisi energetica ed ambientale e la stretta interconnessione tra utilizzo dei combustibili fossili ed i cambiamenti climatici, la comunità scientifica e politica delle nazioni tecnologicamente avanzate sta indirizzando la ricerca e le azioni sulla diversificazione delle fonti energetiche alternative.

In questo quadro si inserisce il presente Progetto di Ricerca di durata triennale, sviluppato nell'ambito del Dottorato di Ricerca in Ecologia e Gestione dei Sistemi Biologici presso l'Università La Tuscia e in collaborazione con l'Agenzia Nazionale per le nuove tecnologie, l'energia e lo sviluppo economico sostenibile (ENEA). L'obiettivo è stato quello di valutare le rese produttive in termini di idrogeno e metano da scarti organici di origine diversa, mediante il processo di fermentazione e digestione anaerobica, evidenziando le differenze e le criticità emerse nella valutazione delle rese di processo legate alla natura stessa dei substrati impiegati e alle specifiche condizioni operative richieste per l'applicazione del processo.

Sulla base delle numerose ricerche sperimentali svolte sull'argomento su substrati semplici e/o sintetici, è apparso fondamentale analizzare e comprendere i fenomeni che potrebbero verificarsi in reattori anaerobici che utilizzano matrici di rifiuto reali. Infatti, la complessità delle matrici impiegate genera una maggiore difficoltà nel controllo di fattori che possono essere causa di variazioni delle condizioni nel processo fermentativo in atto e di repentini cambiamenti all'interno dei percorsi metabolici in corso, il cui effetto risulta immediato sulle rese qualitative e quantitative del biogas prodotto.

Nel presente lavoro è risultato pertanto di notevole importanza individuare un pool microbico in grado efficientemente di produrre idrogeno ($1,68 \text{ mol H}_2/\text{mol glu}$) rispetto ai 2-4 moli teorici. E' stato evidente, nel corso della sperimentazione in cui sono state testate diverse categorie di scarti agro-industriali separatamente e in codigestione tra loro, che sono tutti substrati idonei per la produzione biologica di idrogeno attraverso *dark fermentation*. Il pretrattamento di sterilizzazione ha incrementato da 2 a 3 volte le rese di produzione sui substrati singoli (fatta eccezione per la scotta che viene prodotta dopo un trattamento termico del siero di latte) probabilmente favorendo l'eliminazione dei batteri non sporigeni idrogeno consumatori presenti come flora indigena nei substrati. La scotta è risultato essere il substrato più idoneo, grazie all'elevato contenuto in zuccheri ($39\text{-}52\text{g/l}$ lattosio). Al contrario, l'insilato di sorgo, altra biomassa ricca in carboidrati e usata prevalentemente negli impianti di produzione di metano, presentava rese inferiori nonché la necessità di un ulteriore pretrattamento necessario ad alzare il pH nel *range* ottimale per la produzione di idrogeno. Inoltre l'insilato di sorgo è considerato un "*energy crop*" e non uno scarto.

Dai risultati dei test di codigestione si evidenzia inoltre la reale possibilità di migliorare l'efficienza del processo di produzione di idrogeno dal letame con l'aggiunta di substrati quali scotta e glicerolo crudo. La capacità tamponante del letame ha permesso inoltre di mantenere il pH nel corso di tutto il processo fermentativo nel *range* ottimale per la produzione di idrogeno. Inoltre il disegno sperimentale (*Mixture Design*) per effettuare un'ottimizzazione statistica della composizione dei substrati si è rivelato un utile strumento predittivo per stimare il range all'interno del quale si possono miscelare vari substrati (a seconda delle esigenze e della disponibilità delle biomasse) mantenendo una produzione di idrogeno ottimale o sub-ottimale,

Dai risultati di questo studio è stato inoltre dimostrato e confermato che tramite l'aggiunta di un ceppo batterico idrogeno produttore al naturale consorzio di produzione di biogas si ottiene un incremento della produzione di metano compresa tra il 31 e il 48%. Ciò conferma il ruolo chiave degli idrogeno-produttori anche nell'ultima fase della digestione anaerobica per incrementare le rese di produzione di metano. Inoltre F_{210} non è soltanto un inoculo ottimale per la produzione di idrogeno, ma favorisce, incrementa e velocizza la produzione energetica in generale determinando un'azione sinergica con altre comunità di idrogeno produttori. Separando dunque le fasi della digestione anaerobica si raggiunge un'efficienza energetica pari all'89%.

Attualmente gli studi di produzione di idrogeno a partire da biomasse, come documentato anche in questo lavoro, sono numerosi a scala di laboratorio ma la tecnologia odierna ancora non ne permette un uso industriale. È tuttavia possibile immaginare di realizzare degli impianti delocalizzati di dimensioni contenute, funzionanti come supporto elettrico in piccoli distretti energetici, assolvendo al duplice scopo di ridurre i costi di trasporto e stoccaggio dei rifiuti e di limitare la fornitura elettrica da rete (Brentner et al., 2010). Ad esempio, sulla base dei risultati ottenuti in questo studio è possibile, convertendo in energia elettrica la resa più elevata di produzione di H_2 dalla codigestione dei tre substrati (170 ml H_2 /g VS), produrre una quantità di energia elettrica, per tonnellata di VS, pari a 90,6 Kwh al giorno, equivalente al fabbisogno elettrico di 10 abitazioni monofamiliare tipo con fornitura di 3 kW/h.

BIBLIOGRAFIA

Aleklett K., Campbell C., 2003. The Peak and Decline of World Oil and Gas Production Minerals & Energy - Raw Materials Report.

Amann R and Ludwig W, 2000. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. FEMS Microbiology Reviews 24: 555-565.

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

Bagi Z., Ács N., Bálint B., Horváth L., Dobó K., Perei K.R., Rákhely G., Kovács K.L, 2007. Biotechnological intensification of biogas production, Applied Microbiology and Biotechnology 76: 473-482.

Balkwill D.L., Ghiorse W.C., 1985. Characterization of Subsurface Bacteria Associated with Two Shallow Aquifers in Oklahoma. Applied and Environmental Microbiology 50: 580-588.

Barra Caracciolo A., Bottoni P., Grenni P., 2010. Fluorescence in situ hybridization in soil and water ecosystems: A useful method for studying the effect of xenobiotics on bacterial community structure. Toxicological & Environmental Chemistry, 92:567-579.

Brentner L.B., Jordan, P.A., Zimmerman, J.B., 2010. Challenges in developing biohydrogen as a sustainable energy source: Implications for a research agenda. Environmental Science and Technology, 44:2243-2254.

Bouvier TC, del Giorgio PA, 2003. Factors influencing the detection of bacterial cells using fluorescence in situ hybridization (FISH): A quantitative review of published reports. FEMS Microbiology Reviews 44: 3-15.

Cai M. L., Liu J. X., Wei Y. S., 2004. Enhanced biohydrogen production from sewage sludge with alkaline pretreatment. Environmental Science and Biotechnology, 38: 3195-3202.

Casalot, L., Rousset, M. 2001. Maturation of the [NiFe] hydrogenases. Trends in Microbiology 9:228-237.

Chen WM., Tseng ZJ., Lee KS., Chang JS., 2005. Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. International Journal of Hydrogen Energy 30: 1063-1070.

Chen WH, Chen SY, Khanal S, Sung S., 2006. Kinetic study of biological hydrogen production by anaerobic

fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31:2170-2178.

Cohen A., 1982. Influence of phase separation on the anaerobic digestion of glucose-II. Stability and kinetic responses to shock loadings. *Water Research*, 16:449-455.

Das D., Veziroglu T. N., 2001. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, 26:13-28.

Datar R., Huang J., Maness P. C., Mohagheghi A., Czernik S., Chornet E., 2007. Hydrogen production from the fermentation of corn stover biomass pretreated with a steam-explosion process. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32:932-939.

Davila-Vazquez G., Arriaga S., Alatrisme-Mondragòn F., Leon-Rodriguez A., Rosales-Colunga L. M., Razo-Flores E., 2008. Fermentative biohydrogen production: trends and perspectives. *Environmental Science and Biotechnology*, 7:27-45.

Demirel B., Scherera P., Yenigunb O., Onay T., 2010. Production of Methane and Hydrogen from Biomass through Conventional and High-Rate Anaerobic Digestion Processes, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 40: 116-146.

Detmers J., Strass H., Schulte U., Bergmann A., Knittel K., Kuever J., 2004. FISH shows that *Desulfotomaculatum* spp. Are the dominating sulphate-reducing bacteria in a pristine aquifer. *Microbial Ecology*, 47:236-242.

De Vrije T, Claassen PAM, 2003. Dark hydrogen fermentations. In: *Bio-methane & Bio-hydrogen: Status and perspectives of biological methane and hydrogen production*. Edited by Reith JH, Wijffels RH, Barten H. The Hague: Smiet Offset:103-123.

Di Corcia A, Barra Caracciolo A, Crescenzi C, Giuliano G, Murtas S, Saperi R, 1999. Subcritical Water Extraction Followed by Liquid Chromatography Mass Spectrometry for Determining Terbutylazine and Its Metabolites in Aged and Incubated Soils. *Environmental Science & Technology* 33:3271-3277.

Elefsiniotis P., Oldham W. K., 1994. Effect of HRT on acidogenic digestion of primary sludge. *Journal of Environmental Engineering*, 120:645-660.

Enea , Rapporto tecnico, 2012. Studi sulla produzione di energia elettrica locale da biomasse e scarti. Accordo di Programma MSE/ENEA.

Enea, 2010. Rapporto Energia e Ambiente.

Fan Y., Zhang Y., Zhang S., Hou H., Ren B., 2006. Efficient conversion of wheat straw wastes into biohydrogen gas by cow dung compost. *Bioresource technology*, 97:500-503.

Fang H. H. P., Yu H. Q., 2000. Effect of HRT on mesophilic Acidogenesis of Dairy Wastewater. *Journal of Environmental Engineering*, 126:1145-1148.

Ganapathy T., Murugesan K., Gakkhar R. P., 2009. Performance optimization of Jatropha biodiesel engine model using Taguchi approach. *Applied energy*, 86:2476-2486.

GSE-Gestore Servizi Energetici, 2010. Impianti a fonti rinnovabili, Rapporto Statistico.

Gujer, W. - Zehnder, A.J.B., 1983. Conversion process in anaerobic digestion. *Water Science and Technology* 15:127 - 167.

Guo L., Li X. M., Bo X., Yang Q., Zeng G. M., Liao D. X., Liu J. J., 2008. Impacts of sterilization, microwave and ultrasonication pretreatment on hydrogen producing using waste sludge. *Bioresource technology*, 99:3651-3658.

Guo X.M., Trably E., Latrille E., Carrere H., Steyer J. P., 2010. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35:10660-10673.

Hallenbeck P. C., 2005. Fundamentals of the fermentative production of hydrogen. *Water Science and Technology*, 52:21-29.

Hallenbeck P. C., Benemann J. R., 2002. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27:1185-1193.

Hallenbeck, 2009. Fermentative hydrogen production: Principles, progress, and prognosis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34:7379-7389.

Hawkes F.R., Dinsdale R., Hawkes D.L., Hussy I., 2002. Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimisation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27: 1339-1347.

Henry M. P., Sajjad A., Ghosh S., 1987. The effects of environmental factors on acid-phase digestion of sewage sludge. *Proceedings 42nd Purdue Industrial Waste Conference, Indiana*, 727-737.

Hung CH, Chang YT, Chang YJ., 2011. Roles of microroganism other than *Clostridium* and *Enterobacter* in anerobic fermentative biohydroegn production system – A review. *Bioresource Technology* 102: 8437-8444.

Hunger S., Gößner A.S., Drake H.L., 2011. Trophic Links between the Acetogen *Clostridium glycolicum* KHa and the Fermentative Anaerobe *Bacteroides xyloxyticus* KHb, Isolated from Hawaiian Forest Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 6281-6285.

IEA -International energy Agency, 2010. Key world energy statistics.

ISTAT, 2010. Statistiche Ambientali.

Ivanova G., Ràkhely G., Kovács K. L., 2009. Thermophilic biohydrogen production from energy plants by *Cladicellulosiruptor saccharolyticus* and comparison with related studies. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34:3659–3670.

Karlsson A., Vallin L., Ejlertsson J., 2008. Effects of temperature, hydraulic retention time and hydrogen extraction rate on hydrogen production from the fermentation of food industry residues and manure. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33:953–962.

Kalia V.C., Jain S.R., Kumar A., Joshi A.P., 1994. Fermentation of biowaste to H₂ by *Bacillus licheniformis*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 10:224-227.

Khanal S. K., Chen W. H., Li L., Sung S. W., 2004. Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29:1123–1131.

Khanal S. K., Chen W. H., Li L., Sung S., 2004. Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29:1123-1131.

Kim In S., Hwang Moon H., Jang Nam J., Hyun Seong H., Lee S. T., 2004. Effect of low pH on the activity of hydrogen utilizing methanogen in bio-hydrogen process. *International Journal of Hydrogen Energy* 29:1133-1140.

Kimura M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences, *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.

Kraemer J., Bagley D., 2006. Supersaturation of Dissolved H₂ and CO₂ During Fermentative Hydrogen Production with N₂ Sparging. *Biotechnology Letters*, 28:1485-1491.

- Krupp M, Widmann R, 2009. Biohydrogen production by dark fermentation: Experiences of continuous operation in large lab scale. *International Journal of Hydrogen Energy* 34: 4509-4516.
- Kumar N., Ghosh A., Das D., 2001. Redirection of biochemical pathways for the enhancement of H₂ production by *Enterobacter cloacae*. *Biotechnology letters*, 23:537-541.
- Lay J. J., 2001. Biohydrogen generation by mesophilic anaerobic fermentation of microcrystalline cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, 74:280-287.
- Leduc S., Natarajan K., Dotzauer E., MacCallum I., Obersteiner M., 2009. Optimizing biodiesel production in India. *Applied Energy*, 86:125-131.
- Lee D. J., Mueller J. A., 2001. Preliminary treatments. In: Spinoso, L., Vesilind A., (Eds.), *sludge into Biosolid-Processing, Disposal, Utilization*. IWA Publishing, London, UK.
- Lee D. J., Show K. Y., Su A., 2011. Dark fermentation on biohydrogen production: Pure culture. *Bioresource Technology*, 102:8393-8402.
- Lee Y.J., Miyahara T., Noike T., 2001. Effect of iron concentration on hydrogen fermentation. *Bioresour Technol.* 80: 227–31.
- 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.
- Li D., Chen H., 2007. Biological hydrogen production from steam-exploded straw by simultaneous saccharification and fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy* 32:1742-1748.
- Lin C. Y., Chang R. C., 1999. Hydrogen production during the anaerobic acidogenic conversion of glucose. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 74:498-500.
- Lin C. Y., Lay C. H., 2005. A nutrient formulation for fermentative hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30:285-292.
- Liu G., Shen J., 2004. Effects of Culture and Medium Conditions on Hydrogen. *Journal of Bioscience and bioengineering* 98, 4: 251-256.

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

Madigan MT, Martinko JM, 2006. Brock. *Biologia dei microrganismi*, 11a edizione, Ambrosiana, Milano.

Marone A., Massini G., Patriarca C., Signorini A., Varrone C., Izzo G., 2012. Hydrogen production from vegetable waste by bioaugmentation of indigenous fermentative communities. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37: 5612–5622.

Morgan D., Sissine F., 1995. Rapporto del congress, Hydrogen: Technology and Policy, tratto dalla pagina web del National Council for Science and the Environment, (<http://www.cnie.org>).

Mu Y., Yu H. Q., Wang G., 2007. A kinetic approach to anaerobichydrogen-producing process. *Water Research*, 41:1152-1160.

Nath K., Das D., 2004. Improvement of fermentative hydrogen production: Various approaches. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65:520-529.

National Renewable Energy Laboratory, Marzo 1995. Hydrogen the fuel for the future, tratto dalla pagina web del NREL, (<http://www.nrel.com>).

Noike T., Mizuno O., 2000. Hydrogen fermentation of organic municipal wastes. *Water Science and Technology*, 42:155-162.

Noike T., Takabatake H., Mizuno O., Ohba M., 2002. Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria. *International Journal of Hydrogen Energy* 27: 1367-1371.

Padrò C.E.G., Putsche V., 1999. Survey of the Economics of Hydrogen Technologies, rapporto tecnico eseguito per il Department Of Energy, Stati Uniti d’America, tratto dal sito del DOE, 1-9, 11-16, 29-34.

Pan C.M., Fan Y.T., Xing Y., Hou H.W., Zhang M.L., 2008. Statistical optimization of process parameters on bio-hydrogen production from glucose by *Clostridium* sp. *Fanp2., Bioresour Technology*, 99:3146–54.

Patriarca C., Massini G., Mentuccia L., Pannicelli A., Signorini A., 2012. Produzione biologica di idrogeno da scarti agro-alimentari e zootecnici: ruolo della codigestione. *Rivista di studi di Sostenibilità*, n° speciale. DOI

10.3280/RISS 2012-SU2004.

Pereira-Filho, E.R., Poppi, R.J., Arruda, M.A.Z., 2002. Employment of factorial design for optimization of pyrolysis and atomization temperatures for Al, Cd, Mo and Pb determination by ETAAS. *Quimica Nova* 25:246-253.

Porter KG, Feig YS, 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography* 25: 943-948.

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

Redwood M. D., Paterson-Beedle M., Macaskie L. E., 2009. Integrating dark and light bio-hydrogen production strategies: towards the hydrogen economy. *Environmental Science and Biotechnology*, 8:149-185.

Ren N. Q., Chua H., Chan S. Y., Tsang Y. F., Wang Y. J., Sin N., 2007. Assessing optimal fermentation type for bio-hydrogen production in continuous-flow acidogenic reactors. *Bioresource Tecnology*, 98:1774-1780.

Rosen M.A. e Scott D. S., 1998. Comparative efficiency assessments for a range of hydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 23:653-659.

Ruggeri B., Zitella P., Goretti m., Scaletta A., 2008. H₂ da fermentazione di biomasse con popolazioni batteriche miste. *La Termotecnica*, Maggio 2008.

Saitou N., Nei M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, *Molecular biology and evolution*, 4:406-425.

Schröder C., Selig M., Schönheit P., 1994. Glucose fermentation to acetate, CO₂ and H₂ in the anaerobic hyper-thermophilic eubacterium *Thermotoga maritima* – Involvement of the Embden-Meyerhof pathway. *Archives of Microbiology*, 161:460-470.

Signorini A., Massini G., Migliore G., Tosoni M., Varrone C., Izzo G., 2008. Sediment biogeochemical differences in two pristine Mediterranean coastal lagoons (in Italy) characterized by different phanerogam dominance-A comparative approach. *Acquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 18:S27-S44.

Sinha P., Pandey A., 2011. An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production.

International Journal of Hydrogen Energy, 36:7460-7478.

Song J., An D., Ren N., Zhang Y., Chen Y., 2011. Effects of pH and ORP on microbial ecology and kinetics for hydrogen production in continuously dark fermentation. *Bioresource technology*, 102:10875-10880.

Sung S., Raskin L., Duangmanee T., Padmasiri S., Simmons J. J., 2002. Hydrogen production by anaerobic microbial communities exposed to repeated heat treatments. U. S. DOE Hydrogen Program Review. NREL/CP-610-32405.

Tamalampudi S., Talukder M. R., Hama S., Numata T., Kondo A., Fukuda H., 2008. Enzymatic production of biodiesel from Jatropha oil: A comparative study of immobilized-whole cell and commercial lipases as a biocatalyst. *Biochemical Engineering Journal*, 39:185-189.

Tang G., Huang J., Sun Z., Tang Q., Yan C., Liu G., 2008. Biohydrogen production from cattle wastewater by enriched anaerobic mixed consortia: influence of fermentation temperature and pH. *Journal of Bioscience and bioengineering* 106:80-87.

Tenca, A., Schievano, A., Perazzolo, F., Adani, F., Oberti, R., 2011. Biohydrogen from thermophilic co-fermentation of swine manure with fruit and vegetable waste: Maximizing stable production without pH control. *Bioresource technology*, 102:8582-8588.

Tracy B.P., S.W. Jones, A.G. Fast, D.C. Indurthi, E.T. Papoutsakis, 2012. Clostridia: the importance of their exceptional substrate and metabolite diversity for biofuel and biorefinery applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 23:364–381.

Tricase C., Lombardi M., 2009. State of the art and prospects of Italian biogas production from animal sewage: technical-economic considerations. *Renewable energy*, 34:477-485.

Varrone, C., Giussani, B., Izzo, G., Massini, G., Marone, A., Signorini, A., Wang, A. 2012. Statistical optimization of biohydrogen and ethanol production from crude glycerol by microbial mixed culture. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37:16479-16488.

Wang, J., Wan W., 2008 (a). Effect of Ni_2^+ concentration on biohydrogen production. *Bioresource Technology*, 99: 8864-68.

Wang J., Wan W., 2008 (b). Effect of Fe_2^+ concentration on fermentative hydrogen production by mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33: 1215-1220.

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

Xing Y., Li Z., Fan Y., Hou H., 2010. Biohydrogen production from dairy manures with acidification pretreatment by anaerobic fermentation. *Environmental Science and Pollution Research* 17:2392-399.

Yokoyama H., Waki M., Moriya N., Yasuda T., Tanaka Y., Haga K., 2007. Effect of fermentation temperature on hydrogen production from cow waste slurry by using anaerobic microflora within the slurry, *Applied Microbiology and Biotechnology* 74: 474-483.

Zhang M. L., Fan Y., Xing Y., Pan C., Zhang G., Lay J., 2007. Enhanced biohydrogen production from cornstalk wastes with acidification pretreatment by mixed anaerobic cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31: 250-254.

Zittel W, Wurster R., 1996, Hydrogen in the energy sector, tratto dal sito "Hy Web - Hydrogen and Fuel Cell Information Sistem", Germania, sezione: H₂ Compendium, (<http://www.hydrogen.org>).