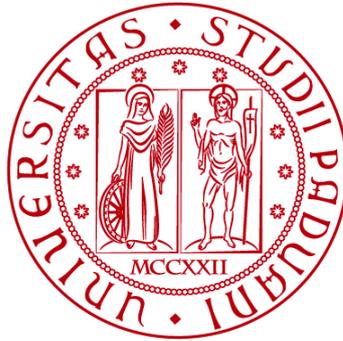


Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Biologia
Corso di Laurea in Biotecnologie



Elaborato di Laurea

***Approcci biotecnologici ed informatici per
ottimizzare la resa in biogas da matrici
agroalimentari***

Tutor: Prof. Lorenzo Favaro
Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse Naturali e
Ambiente (DAFNAE)

Co-tutor: Dott.ssa Sara Agostini
Dipartimento DAFNAE;
Dott. Guido Zampieri
Dipartimento di Biologia

Laureando: Davide Gnocco

Anno Accademico 2021/2022

Sommario

1. Abstract

2. Stato dell'arte

2.1. Digestione Anaerobica e applicazione industriale

2.2. Il progetto: Più-Biogas

3. Approccio sperimentale

3.1. Analisi statistica dei dati sperimentali di un impianto di biogas

3.2. BMP Test

4. Risultati e discussione

4.1. Analisi dei parametri chimico-fisici

4.2. Analisi della Produzione Energetica

4.3. BMP Test

5. Conclusioni

6. Bibliografia

1. Abstract

La degradazione di materiale organico che avviene all'interno di digestori anaerobici ad opera di popolazioni microbiche variabili, con metabolismi integrati e complementari, è ad oggi uno dei meccanismi più efficienti per la produzione di metano, utilizzato come fonte energetica rinnovabile. Il processo produttivo è tuttavia soggetto alla variazione di molti parametri che incidono sulla produzione totale di metano, causandone fluttuazioni ripetute e di intensità più o meno importante. I parametri anzidetti hanno natura da un lato insita nelle caratteristiche delle popolazioni microbiche che permettono il processo, dall'altro lato nei dettagli tecnici del processo (e.g. proprietà meccaniche degli impianti, caratteristiche e disponibilità dei substrati, condizioni ambientali ecc.).

Con il presente elaborato si intende caratterizzare il processo industriale di produzione di biogas, attraverso una discriminazione dei parametri tecnici, per poter in seguito distinguere da questi i parametri prettamente legati alla componente microbiologica del processo di digestione anaerobica. Pertanto con un primo approccio bio-informatico è stato analizzato l'andamento produttivo di un impianto di biogas il cui digestato è stato poi sfruttato per un test di *Biochemical Methane Potential* (BMP) al fine di valutare la produzione di metano da parte dell'inoculo in relazione ad uno specifico substrato.

2. Stato dell'arte

2.1. *Digestione anaerobica e applicazione industriale*

La crescente preoccupazione a livello mondiale riguardo il riscaldamento globale, spinge a sviluppare fonti energetiche alternative ai combustibili fossili e sistemi di smaltimento intelligente dei rifiuti organici (domestici, urbani e industriali).

Per tale motivo, l'interesse economico, ambientale e industriale aumenta nei confronti della digestione anaerobica (DA) per la produzione di biogas.

Il biogas è un gas combustibile composto principalmente da metano (CH_4), diossido di carbonio (CO_2) e altri elementi gassosi in tracce (e.g. azoto, idrogeno, ammoniaca e acido solfidrico).

Ad oggi la DA spicca tra i sistemi di smaltimento di rifiuti organici di diverso genere in quanto, dal trattamento dei rifiuti solidi e delle acque reflue è possibile derivarne biogas sfruttabile per la produzione di calore ed energia (e.g. in sistemi di cogenerazione noti come CHP – *Combined Heat and Power*), o raffinato e utilizzato come carburante per veicoli o pile a combustibile (*fuel cells*).

L'interesse verso gli impianti di biogas è elevato soprattutto in ambiente rurale ove letami, liquami, e scarti vegetali si accumulano in grandi quantità. Tale sistema, infatti, rappresenta un efficiente apparato di riutilizzo dei rifiuti organici in grado di generare energia eco-sostenibile da un lato e fertilizzanti di alta qualità dall'altro.

Il processo di produzione di biogas è condotto in impianti che differiscono tra regione e regione in funzione delle condizioni ambientali, della legislazione che vige sulla regione in questione, nonché della fonte organica da cui l'impianto genera biogas. Si distinguono impianti legati a imprese agricole e fattorie, impianti correlati al trattamento di acque reflue, impianti di biogas urbani, impianti di biogas industriali.

Questo elaborato si riferisce in particolare a impianti legati ad imprese agricole. Nonostante le dimensioni, la tecnologia e il design possano variare considerevolmente, gli impianti di biogas che sfruttano scarti di vegetali o di origine animale si sviluppano su uno schema base (Figura 1): un *pre-storage tank* raccoglie materiale organico che viene poi pompato attraverso una *pipeline* nel digestore (o fermentatore). Il digestore è un serbatoio impermeabile al gas e isolato termicamente, nonché dotato di sistemi di agitazione interni. Il digestato in uscita viene utilizzato come fertilizzante.

Una volta prodotto, il biogas viene sottoposto ad un eventuale *conditioning*, ovvero una serie di step che mira a raffinare il biogas per rispettare i requisiti minimi, fisici e chimici, imposti dai sistemi CHP (e.g. contenuto di solfuri, contenuto di cloro, fluoro, umidità relativa, temperatura, ecc.).

Il biogas così raffinato, stoccato in una porzione del digestore o in un serbatoio collegato ad esso, viene poi condotto generalmente a un sistema CHP.

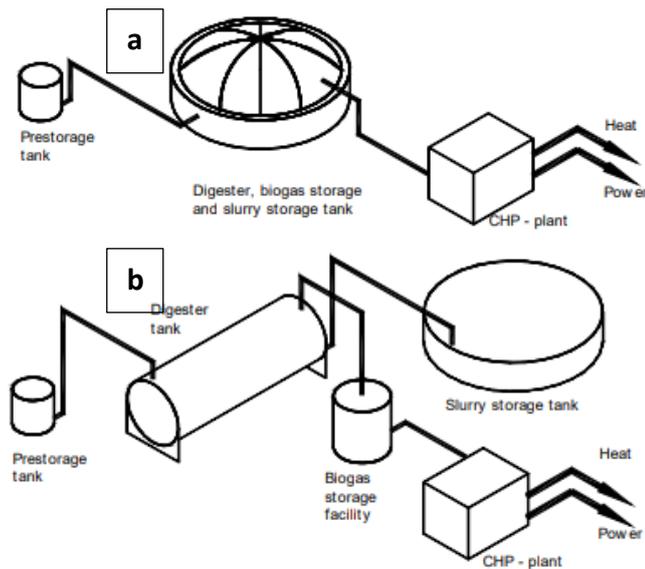


Figura 1: Rappresentazione schematica di due impianti di biogas. I rifiuti vengono inizialmente stoccati nel *pre-storage tank* per poi essere pompati verso il digestore: a) il digestore ha una struttura verticale che permette lo stoccaggio del biogas prodotto; b) il digestore è orizzontale e il biogas prodotto è raccolto in un secondo serbatoio. Infine il biogas alimenta un sistema CHP. (Al Seadi T., *Biogas Handbook*)

Una certa percentuale dell'energia prodotta (elettrica o termica) sostiene la richiesta energetica dell'impianto stesso, il surplus viene venduto.

Il mero processo biochimico alla base della digestione anaerobica è articolato in 4 fasi, guidate da popolazioni microbiche molto diverse che agiscono in condizioni anaerobiche. Sequenzialmente si distinguono i seguenti step: idrolisi, acidogenesi, acetogenesi e metanogenesi. L'intero processo può essere riassunto in due macro-fasi: fase acida (idrolisi e acidogenesi) e fase del metano (acetogenesi e metanogenesi). Ciascuna macro-fase è condotta da un gruppo principale di microorganismi. L'equilibrio tra le due popolazioni è molto importante e la sua alterazione si ripercuote negativamente sull'intero processo e quindi sulla produzione di biogas.

La prima fase del processo è l'idrolisi: microorganismi idrolitici convertono, grazie a pool enzimatici extracellulari, i composti ad elevato peso molecolare come lipidi, proteine e polisaccaridi in composti a ridotto peso molecolare sfruttati come fonte di energia. *Firmicutes* e *Bacteroidetes* sono i *phyla* principali, insieme a molti altri. È generalmente accettato pensare che l'idrolisi del substrato in composti solubili sia la fase limitante del processo di digestione anaerobica; nel caso di substrati facilmente degradabili lo step limitante è la metanogenesi.

Alla prima fase segue l'acidogenesi: gruppi anaerobi facoltativi o obbligati come *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria* guidano la seconda fase, utilizzando le macromolecole derivanti dal primo step, per produrre acidi

organici volatili (*Volatile fatty acids*, VFA) come l'acido formico, acido acetico, acido propionico, acido butirrico e pentatonico, nonché alcoli, CO₂ e H₂. Questi ultimi due prodotti, così come l'acetato possono essere utilizzati direttamente dai metanogeni per la produzione di metano.

L'acidogenesi è seguita dalla fase di acetogenesi: i composti che non possono essere metabolizzati dai metanogeni vengono utilizzati come substrato dagli acetogeni, che ossidano in condizioni anaerobiche i VFA (acidi grassi a catena corta) producendo acetato, CO₂ e H₂ (substrati metanogeni).

L'ultima fase del processo coincide con la metanogenesi: condotta dai metanogeni, archeobatteri ubiquitari in ambienti anaerobici, classificati in 7 ordini (Lyu Z., Liu Y. 2019), capaci di utilizzare diversi intermedi generati dagli step precedenti (acetato, CO₂, H₂ e composti metilici) per produrre CH₄. La sintesi di metano è lo step più lento della DA, e, nel caso di substrati facilmente degradabili, corrisponde allo step limitante del processo.

L'efficienza della DA è influenzata da alcuni parametri critici dipendenti sia dalla comunità microbica che dalle caratteristiche del reattore. Crescita e attività delle popolazioni microbiche sono influenzate da vari fattori tra cui: qualità e quantità di substrato, pressione parziale di ossigeno, temperatura, pH, velocità e parametri fisici legati agli agitatori, e HRT (*Hydraulic Retention Time*). Di seguito vengono analizzati nel dettaglio

Temperatura

Il processo complessivo può avvenire in condizioni di temperatura mesofiliche (approssimativamente tra 35°C-45°C) o termofiliche (vicine a 50°C-55°C). Il valore e la stabilità della temperatura influenzano fortemente la resa della DA.

In genere le condizioni termofiliche comportano dei vantaggi: incremento della velocità delle reazioni, migliore degradazione del substrato, aumento della sanificazione dell'ambiente del digestore e degli effluenti, necessità di reattori di dimensioni ridotte. Le alte temperature diminuiscono inoltre la quantità di digestato e residuo e ne elevano la qualità. Dall'altro lato tuttavia, le alte temperature aumentano il rischio di instabilità del processo e di inibizione (e.g. da ammoniaca derivata da proteine), nonché la quantità di energia richiesta per alimentare l'impianto (bilanciata da un miglior sistema di isolamento termico).

pH e VFA

Il range di pH entro il quale si svolge il processo varia da 6.0 a 8.5. Se il pH supera questi estremi, il processo di DA subisce una grave alterazione e la produzione di biogas cala drasticamente. Substrati facilmente degradati (e.g. ad alto contenuto di glucosio) possono portare ad un accumulo di VFA e conseguentemente ad

un'acidificazione del mezzo, mentre la rimozione di CO₂ o l'aumento della concentrazione di NH₃ aumentano il valore del pH.

Il calo del pH può verificarsi anche in seguito ad un aumento della concentrazione di VFA, sebbene tale crollo del pH sia conseguenza di concentrazioni di VFA talmente alte da risultare esse stesse, per prime, indicatori di un processo alterato. La concentrazione di VFA è infatti, prima del pH, un indicatore dello stato del processo, che viene quindi monitorato attraverso l'analisi dell'andamento della concentrazione dei singoli VFA o del rapporto tra le concentrazioni di VFA diversi.

H₂S

L'acido solfidrico costituisce in concentrazioni variabili una certa percentuale del biogas. Si tratta di un composto tossico che reagendo con il vapore acqueo forma acido solforico (H₂SO₄) in grado di danneggiare le superfici, i sistemi CHP e i condotti dell'impianto. Il biogas è quindi sottoposto a desolforazione, con metodi che possono variare e svolgersi nel digestore o fuori da questo.

Ossigeno

La risultante di tutte le reazioni biochimiche e fisiologiche che coinvolgono l'ossigeno determina l'effetto finale di questo sul processo. L'ossigeno risulta particolarmente dannoso verso alcuni acetogeni, ma soprattutto verso i metanogeni (archeobatteri sviluppatasi in ere anossiche). I digestori sono in grado di sostenere stabilmente il processo di digestione anche in presenza di basse concentrazioni di tale gas, in quanto un certo effetto protettivo è garantito dalla co-esistenza di popolazioni microbiche aerobiche, da aggregati di biomassa che ostacolano la diffusione dell'O₂ e da un minimo livello di tolleranza intrinseca proprio di alcuni anaerobi. La concentrazione di O₂ è pertanto uno dei parametri che viene monitorato costantemente.

2.2. Il progetto: Più-Biogas

Le caratteristiche della popolazione microbica in termini di struttura tassonomica, crescita e attività, influenzano i parametri sopra descritti (a altri non approfonditi in questa sede); viceversa i parametri fisici, chimici e biochimici condizionano il microbiota. Per ottimizzare la resa della digestione, in termini di produzione di biometano, il progetto Più-Biogas, finanziato dalla Fondazione CARIVERONA, ha lo scopo di sviluppare un sistema di monitoraggio ed analisi dei dati fisico-chimici e di processo, correlandoli ad analisi e controllo delle specie microbiche coinvolte nel processo di digestione anaerobica.

L'obiettivo del progetto è aumentare la resa di produzione di biogas almeno del 10% in aziende partner.

In questo elaborato, i dati registrati delle aziende verranno elaborati e utilizzati per sviluppare grafici in grado di fornire un quadro relativo all'andamento di alcuni dei parametri critici sopra descritti, il cui controllo è fondamentale nel processo di DA. Poiché il biogas è fonte di energia, verrà sviluppato un grafico relativo

all'andamento della Produzione Totale di energia di un Inoculo esemplificativo, selezionato tra i cinque oggetti di studio.

Infine verrà eseguito un *Biochemical Methane Potential Test* che permette di ottenere misurazioni volumetriche relative alla quantità di biogas prodotta da un certo inoculo che digerisce uno specifico substrato in condizione *Lab-scale*. Si tratta di un'analisi preliminare utile per la selezione e lo sviluppo di sistemi di digestione anaerobica in scala industriale.

Durante il BMP test l'inoculo oggetto di analisi viene incubato in bioreattori in piccola scala, ciascuno dei quali riproduce condizioni prestabilite e controllate: vengono di norma allestiti sistemi di controllo e bioreattori contenenti il substrato di cui se ne voglia determinare la potenzialità metanigena.

Durante l'incubazione l'inoculo consuma il substrato e produce biogas che si accumula nello spazio sovrastante alla frazione liquida (acqua, substrato e inoculo) contenuta nel bioreattore, così aumentando la pressione all'interno di questo. Il gas in sovrappressione viene periodicamente quantificato volumetricamente mediante *water displacement method*. Stabilito il volume di biogas prodotto, mediante gas-cromatografia viene analizzata la composizione percentuale del gas contenuto nel bioreattore, per poi poterne derivare il volume di metano prodotto fino al giorno dell'analisi e la resa in metano fino a quel punto.

3. Approccio sperimentale

3.1. Analisi statistica dei dati sperimentali di un impianto di biogas

Cinque impianti di biogas, gestiti dall'azienda in collaborazione nel progetto Più-Biogas App, sono stati selezionati e in questo elaborato saranno indicati come "Inoculo" seguito da un numero.

Ogni impianto registra quotidianamente, nell'arco dell'anno solare, i valori di ogni parametro indicato su un diario aziendale tabulato: data, orario di controllo, eventuale blocco dell'impianto (per cause di carattere tecnico), Temperatura del Fermentatore 1, T. del Fermentatore 2 (se presente), T. del Post-Fermentatore (*vessel* in cui confluiscono i digestati dai fermentatori principali per aumentare l'estrazione di biogas dal substrato), concentrazioni di CH₄, H₂S e O₂ nei Fermentatori e nel Post-Fermentatore, Produzione energetica Totale, Input di liquame, Ricircolo dal Post-Fermentatore e Input di sostanze solide.

I valori registrati e tabulati di giorno in giorno, per più anni consecutivi dalla data di installazione dell'impianto di produzione di biogas, vengono successivamente esportati in formato *.csv* (*Comma-Separated Values*) elaborabile grazie al linguaggio di programmazione *python* in output grafici per i quali vengono selezionati i campi dei quali si vuole rappresentare l'andamento dei valori relativi.

Nel capitolo “*Digestione anaerobica e applicazione industriale*” sono stati approfonditi i parametri considerati critici durante il processo di digestione anaerobica: Temperatura, pH, concentrazione di VFA, concentrazione di H₂S e di O₂. Escludendo il pH e la concentrazione di VFA dall’elaborazione grafica dei dati registrati nei diari aziendali, si vogliono confrontare le distribuzioni dei seguenti valori tra gli impianti:

- Concentrazione di metano: [Metano]
- Concentrazione di Ossigeno: [Ossigeno]
- Concentrazione di Acido solfidrico: [H₂S]
- Temperatura

Ogni parametro è misurato per i fermentatori principali (F1 ed eventualmente F2) e per il post-fermentatore (PF), in ogni impianto. Le concentrazioni di ossigeno e di metano sono espresse in percentuali calcolate sul volume di biogas totale all’interno dei *vessel*; la quantità di H₂S è espresso in parti per milione (ppm).

Confrontate le distribuzioni dei valori relative ai parametri, si vuole poi comparare la distribuzione dei valori di energia prodotta da ogni impianto attraverso i singoli sistemi CHP. Per fare questo sono stati elaborati i valori registrati giornalmente nei diari dei singoli impianti, per derivarne, mediante il linguaggio di programmazione *python*, cinque violin-plot. Il plot è sviluppato su un piano cartesiano con i valori di produzione energetica totale (in kWh) sull’asse delle ordinate e il nome dell’inoculo relativo ad ogni distribuzione sull’asse delle ascisse.

Dopo il confronto tra le distribuzioni dei valori di Produzione Energetica Totale tra i cinque impianti, vogliamo ora concentrarci sull’analisi dell’andamento (non più della variabilità) dei valori di PT (in kWh) di un singolo impianto (Inoculo 1), nell’arco di tutto il periodo di rilevamento dei dati, in funzione del tempo. Per farlo, ancora una volta sviluppiamo un plot dei valori mediante linguaggio *python*.

3.2. *BMP Test*

Il BMP test, è una procedura eseguita su piccola scala, volta a valutare la capacità metanigena di un inoculo anaerobio in funzione di diversi parametri. Il test prevede la quantificazione volumetrica di biogas e biometano prodotti dalle diverse condizioni testate ed eseguite in condizioni controllate. Tra quelli analizzati, l’inoculo selezionato per il BMP test è l’Inoculo 1. In questo esperimento sono stati screenati due substrati (F1 e F2) derivanti da un esperimento di fermentazione alcolica di *unripe rice* da parte di due ceppi di lievito geneticamente modificati, ed eseguito in passato nei nostri laboratori. Al termine dei due processi di fermentazione, condotti separatamente, l’amido presente nel substrato di origine è stato completamente utilizzato dai lieviti, di conseguenza i due substrati derivati dalla post-fermentazione hanno composizione identica.

Le condizioni sono state riprodotte in diversi bioreattori, consistenti in una bottiglietta da 120 mL con uno spazio di testa (occupato dai gas) pari a 90 mL. Il restante volume (30 mL) corrisponde al *working volume* ed è occupato da substrato, acqua e inoculo. Superiormente la bottiglietta è chiusa da un setto in gomma a prova di gas e sigillata con un tappo di alluminio.

Inizialmente in ciascuna bottiglietta vengono aggiunti acqua, substrato e inoculo, nelle quantità prestabilite, dopodiché, per eliminare l'ossigeno che risulterebbe dannoso per la popolazione microbica anaerobica, la frazione liquida che occupa il *working volume* viene sottoposta a *flushing*, per due minuti, mediante azoto insufflato nella frazione liquida mediante un ago collegato ad un cavo a sua volta connesso ad una fonte di azoto gassoso. Subito dopo il *flushing*, la bottiglietta viene sigillata con il setto di gomma e l'alluminio. A questo punto l'ago viene reinserito attraverso il setto per insufflare azoto per altri due minuti nello spazio di testa ed eliminare l'ossigeno anche da questa frazione. Per garantire la saturazione dello spazio di testa con l'azoto, ed evitare l'esplosione del bioreattore, viene inserito un secondo ago libero nel setto in gomma.

Alla fine le bottigliette vengono poste in un incubatore a 37°C e agitate quotidianamente per garantire l'omogeneità della soluzione.

Per ottenere dei risultati statisticamente significativi sono state allestite cinque repliche per ciascuna condizione. Due bottigliette per ogni substrato sono state campionate e utilizzate per l'analisi dei VFA (non riportata in questo elaborato) una volta raggiunto il plateau. La popolazione microbica è identica in tutte le bottigliette, con aggiunta dei rispettivi ceppi di lievito ingegnerizzati nei bioreattori F1 e F2.

Dovendo tener conto della produzione endogena di metano dell'inoculo, per ricavare il potenziale metanigeno prettamente legato al consumo del substrato, è stata allestita una condizione solamente con acqua deionizzata e inoculo (ci si riferisce a tale condizione come "bianco"). La resa effettiva è stata calcolata come differenza tra la resa in presenza di substrato e quella in assenza di esso.

$$resa_{effettiva} = resa_{substrato} - resa_{endogena}$$

Per accertare la corretta attività dell'inoculo durante l'esperimento, è stata preparata anche la condizione del controllo, in cui è stato fornito glucosio come substrato (Tabella 1).

Tabella 1 Riassunto delle principali quantità utilizzate per allestire il BMP test.

Sample	Substrato (g)	Glucosio (g)	Acqua d. (mL)	Inoculo (mL)
Bianco			6,000	24,000
Controllo		0,060	5,940	24,000
F1	0,0660		5,934	24,000
F2	0,0642		5,936	24,000

Durante l'incubazione l'inoculo produce gas. Ogni due o tre giorni il biogas prodotto nei bioreattori è stato analizzato: dapprima viene condotta un'analisi volumetrica mediante *water displacement method*. Raggiunta la pressione atmosferica nello spazio di testa alla fine di questo processo, viene condotta l'analisi della composizione del biogas al gas-cromatografo per misurare la percentuale dei singoli composti che compongono il biogas.

Per misurare il volume in sovrappressione, viene sfruttato il *water displacement method*. Nel bioreattore l'inoculo produce gas metano che aumenta la pressione sul sigillo in gomma. Il sistema consiste in una bottiglietta contenente una soluzione acquosa acida, sul cui tappo forato sono inseriti due tubi, di cui uno connesso, all'altra estremità, mediante un ago, al bioreattore (Figura 2). Una volta inserito l'ago attraverso il tappo di gomma del reattore, e capovolta la bottiglietta di soluzione, si ha uno spostamento di soluzione acida verso il cilindro in cui è inserito l'altro tubo, conseguente alla fuoriuscita di biogas dal reattore.

L'ago viene estratto quando non si osserva più gas attraversare la soluzione acida, per impedire il flusso di soluzione nel bioreattore. In tal modo, nella bottiglietta in analisi viene ristabilita una pressione pari a quella atmosferica esterna. Il volume di soluzione acida raccolto nel cilindro è pari al volume di gas fuoriuscito dal reattore e può a questo punto essere misurato.

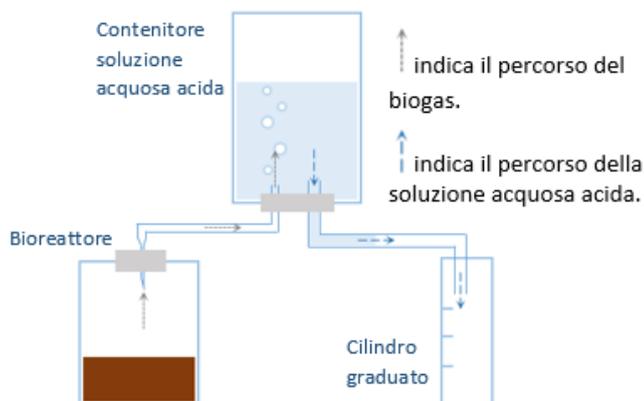


Figura 2 Schema del sistema utilizzato per la misurazione volumetrica, mediante *water displacement*, del biogas prodotto nel bioreattore.

La gas-cromatografia è stata condotta utilizzando il sistema MicroGC prodotto da Agilent Technologies. Il gas-cromatografo (GC) è collegato ad un computer sul quale i dati rilevati dal MicroGC vengono elaborati dal software *Soprane*, ottenendo così le percentuali di gas contenute nello spazio di testa dei bioreattori. Per fare questo, anzitutto, nel setto di gomma di ogni bottiglietta viene inserito un ago libero, al fine di verificare che la pressione dentro la bottiglietta sia pari a quella atmosferica esterna per non danneggiare il GC; per lo stesso motivo l'ago non deve essere in contatto con la frazione liquida.

L'ago inserito può poi essere collegato alla *pipeline* del GC per misurare le percentuali di gas nel bioreattore. Il volume di metano (in mL) prodotto si ottiene moltiplicando la percentuale di metano rilevata dal gas cromatografo nella bottiglietta per il volume in sovrappressione misurato con il *water displacement method*.

La resa in biometano viene calcolata per ogni condizione come segue: dai valori volumetrici cumulativi del metano (mL), relativi ad una singola condizione, per ogni data viene calcolato il rispettivo valore cumulativo medio.

Per ottenere la resa effettiva, a ciascun valore medio viene sottratto il valore cumulativo medio relativo al bianco, poi la differenza viene moltiplicata per un fattore di correzione della temperatura (0,881 considerando la temperatura di incubazione costante a 37°C) e diviso per i grammi di solidi volatili presenti nel reattore ($g VS = (\% \text{ sostanza secca}) * (100 - \% \text{ ceneri su s. s.})$).

La resa di metano così calcolata (mLCH₄/g VS) di giorno in giorno viene quindi inserita in un grafico che ne mostra l'andamento, in cui la resa è posta sull'asse delle ordinate, il tempo sull'asse delle ascisse.

4. Risultati e discussione

4.1. Analisi dei parametri chimico-fisici

La Figura 3 rappresenta l'elaborazione grafica dei dati relativi ai parametri sopra elencati. Ciascuno dei quattro parametri è misurato per ognuno dei tre *vessel* (F1, F2, se presente, e PF). La distribuzione dei valori indicati lungo l'asse delle ordinate è rappresentata da un box-plot corrispondente a un impianto (indicato come "Inoculo" seguito da un numero sull'asse delle ascisse).

Gli impianti corrispondenti a Inoculo 2, 3 e 5 non hanno un secondo fermentatore principale e, per questo motivo, in corrispondenza delle posizioni associate lungo l'asse delle x, non vi sono box-plot nei grafici relativi a parametri registrati nel Fermentatore 2.

La composizione chimica del biogas viene monitorata costantemente grazie a sensori sviluppati su diverse tecnologie.

Il biogas “grezzo” derivato dalla digestione anaerobica della materia organica è generalmente composto da metano in percentuali tra 40-65% (v/v), diossido di carbonio al 35-55% e tracce di H₂S (percentuali inferiori all’1% o di poco superiori), vapore acqueo e contaminanti eventuali. La percentuale finale di ogni composto chimico dipende dalle diverse caratteristiche del processo che hanno influenza sulla produzione finale. Parametri fisici, chimici e microbiologici possono implementare o decrementare la qualità del biogas prodotto.

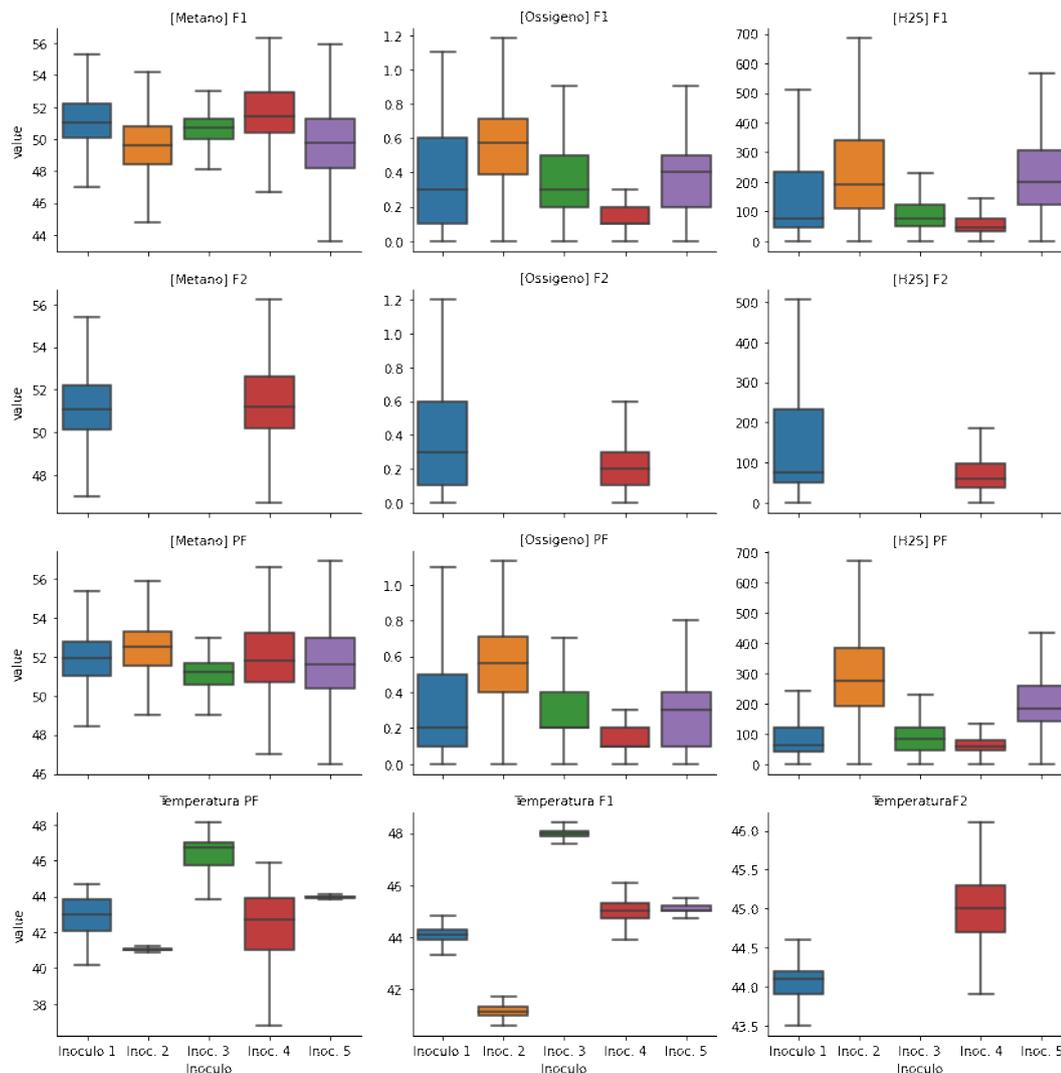


Figura 3: Output grafico multiplo, derivante dall'elaborazione dei dati di ogni azienda. Ogni grafico relativo ad uno dei parametri tra [Metano], [Ossigeno], [H₂S] e Temperatura, mostra il confronto tra le distribuzioni dei valori registrati nei 5 impianti per quel dato parametro. I box-plot sono divisi in 4 segmenti: ciascun segmento raggruppa il 25% delle misurazioni.

La temperatura è uno dei parametri fisici che più necessita di costante monitoraggio. Dai grafici si osserva che nel Fermentatore 1, Inoculo 3, 4 e 5 operano tra i 45°C e i 48°C, al limite di condizioni definibili mesofile, con Inoculo 3 operativo alla temperatura perlopiù stabile pari a 48°C; le oscillazioni attorno al

valore mediano sono generalmente molto ridotte come si deduce dalla compattezza dei box-plot. Inoculo 1 mantiene la temperature del Fermentatore 1 a valori che oscillano sul limite inferiore dell'intervallo indicativo che abbiamo definito. Inoculo 2 invece concentra le temperature di F1 verso valori inferiori, al limite superiore dell'intervallo mesofilico. Inoculo 1 e 4 rilevano le temperature anche del secondo fermentatore principale F2: i boxplot, sebbene appaiano più ampi, in realtà spaziano tra gli stessi valori di temperatura registrati per F1, mantenendo stabili e costanti le condizioni operative di entrambi i reattori.

Definire un valore efficiente della temperatura e garantirne la stabilità all'interno dei fermentatori durante la DA è, infatti, un fattore importante per aumentare la resa del processo.

Nel post-fermentatore si ha la produzione del 25% del biogas complessivo (DGR nr. 843 del 19 giugno 2019). Inoculo 2 e 5 mantengono temperature stabili nel PF, mentre gli altri impianti rilevano temperature che spaziano ampiamente con range (differenza tra valore massimo e minimo) di valori tra 4°C e 8°C. I valori mediani relativi al post-fermentatore vengono tuttavia mantenuti vicini ai valori mediani di F1.

Le distribuzioni dei valori relativi alla percentuale di metano (v/v), registrati in F1, sono molto simili: la variabilità, ovvero l'ampiezza dei box-plot è anch'essa simile tra le distribuzioni e piuttosto ampia (riflette il numero elevato di fattori che influenzano la produzione di metano). Inoculo 3 ha il range di valori più ristretto, mentre Inoculo 5 mostra un'oscillazione maggiore della percentuale. La percentuale di metano più bassa registrata tra gli impianti è poco inferiore al 44% (Inoculo 5), mentre quella massima viene registrata in Inoculo 4 che raggiunge valori appena sopra il 56%. Circa il 75% delle rilevazioni riporta percentuali intorno al 50%.

In F2, per Inoculo 1 e 4, la distribuzione dei valori registrati è simile alla distribuzione registrata in F1.

Nel post-fermentatore viene confermato il potenziale di ulteriore produzione di biogas da parte dei digestati derivati dai fermentatori principali: nel PF, infatti, la porzione di dati che supera il 50% è maggiore.

La quantità di ossigeno espressa in percentuale sul volume di biogas totale (v/v) è limitata a valori molto ridotti. Sia nei fermentatori principali, sia nei post-fermentatori, tutte le distribuzioni hanno raggiungono un minimo pari allo 0%. Inoculo 4 raggiunge solamente nel F2 lo 0.6% (valore massimo), mentre in F1 e PF la percentuale di O₂ è sempre inferiore a 0.4%. Inoculo 3 e 5 sfiorano l'1% in F1, mentre il loro massimo cala sotto lo 0.8% nel PF. Inoculo 1 e 2 sono soggetti alla variabilità maggiore. Inoculo 1 raggiunge valori superiori all'1% in ognuno dei tre *vessel*; Inoculo 2 supera i massimi di Inoculo 1 in F1 e PF raggiungendo circa l'1.2% di ossigeno nel biogas finale.

La presenza di minime quantità di ossigeno all'interno dei digestori anaerobici è inevitabile in quanto questi operano in contatto con l'ambiente aerobico. L'ossigeno infatti deriva principalmente dalla matrice organica introdotta nei digestori. La frammentazione di materiale vegetale libera minime quantità di ossigeno contenuto nei tessuti vegetali stessi.

L'ossigeno può influenzare negativamente il processo di generazione di biogas e la qualità dello stesso. Uno studio condotto da Botheju D. e Bakke R. nel 2011, dimostra tuttavia che, premesse alcune condizioni (e.g. impianti bi-fasici che separano fisicamente le due macro-fasi del processo di digestione anaerobica), è possibile sviluppare dei sistemi di *DA assistita da aerazione parziale* in cui l'ossigeno può implementare la resa dell'impianto di biogas. L'O₂, mantenuto in percentuali controllate nei digestori, può incrementare la fase idrolitica, limitare l'accumulo di VFA nelle fasi iniziali dello scaling-up, incrementare la qualità degli effluenti e ridurre la concentrazione di H₂S gassoso. Le possibilità di questa applicazione sono ancora oggetto di studio.

La traccia di acido solfidrico contenuta nel biogas viene misurata in parti per milione (ppm) sul volume totale. Come nel caso dell'ossigeno, si tratta di un composto presente in minime quantità; per questo motivo si può osservare che ogni box-plot ha un minimo di 0 ppm, mentre il massimo valore raggiunto varia sensibilmente tra gli impianti. In F1 la quantità di H₂S raggiunge quasi 700 ppm per Inoculo 2 che rileva la variabilità maggiore dei valori, mentre la variabilità più bassa si ha per Inoculo 4 che supera di poco 100 ppm. Inoculo 3 ha distribuzione poco più ampia del precedente impianto, mentre Inoculo 1 e 5 hanno variabilità maggiore, con distribuzione simile a Inoculo 2, ma con range minori, sotto i 600 ppm. Per questi tre impianti, il 75% dei valori rilevati non supera comunque 350 ppm.

Inoculo 1 e 4 mantengono la stessa distribuzione in F2: Inoculo 1 raggiunge 500 ppm, ma il 75% dei dati non supera 250 ppm, mentre l'Inoculo 4 concentra la distribuzione sotto i 200 ppm.

Nel post-fermentatore la variabilità di Inoculo 1 crolla visibilmente e la distribuzione dei valori non supera 300 ppm. Inoculo 2 mostra lo stesso range di valori, ma il 2°, 3° e 4° quartile si sollevano poiché un maggior numero di misurazioni rileva valori superiori a 200 ppm. Le distribuzioni di Inoculo 3 e 4 rimangono pressoché invariate. La distribuzione di Inoculo 5 mostra valori che calano sotto i 450 ppm.

4.2. *Analisi della Produzione Energetica*

Per confrontare la Produzione Energetica derivante dagli impianti, con lo stesso linguaggio di programmazione *python*, sono stati sviluppati 5 violin-plot che riassumono la distribuzione dei valori registrati relativi alla Produzione Energetica Totale (PT) espressa in kWh (sull'asse delle ordinate). Come indicato in Figura 4, la larghezza di una porzione del violin-plot è tanto maggiore quanto più è elevata la

quantità di dati con lo stesso valore riportato sull'asse y (l'inoculo corrispondente è indicato sull'asse x).

La produzione energetica media dell'impianto 5 è nettamente inferiore a quella degli altri impianti, per questo motivo il grafico di Inoculo 5 è separato, ma mantenuto nella stessa scala degli altri plot. Il range di valori sull'asse y è sempre pari a 8000 kWh, ma nel grafico di Inoculo 5 è compreso tra 10000 e 18000 kWh, il range del secondo grafico è compreso tra 18000 e 26000 kWh.

Si osserva che la PT di Inoculo 5 registra valori prevalentemente concentrati attorno a 15000 kWh, dove il plot è più ampio, sebbene siano frequenti valori registrati fino a 14000kWh, inferiormente, e fino a 15500 kWh superiormente. Valori maggiori di 15500 kWh e cali di PT sotto 14000 kWh sono molto rari, per questo il plot si restringe rapidamente verso le regioni estreme.

Inoculo 1 e 3 mostrano una distribuzione di valori con un profilo simile ad Inoculo 5; Inoculo 1 spazia in un range di valori maggiore, ma la distribuzione sia del primo, sia del terzo impianto mostra una sola ampia e bassa regione attorno a 24000 kWh, mentre allontanandosi da questo valore il plot si restringe rapidamente, indice di una certa stabilità in termini di energia prodotta dall'impianto.

Inoculo 2 e 4 mostrano una distribuzione soggetta a variabilità maggiore, a prima vista infatti le regioni più ampie risultano meno allargate rispetto alle altre distribuzioni: Inoculo 2 mostra frequenza maggiore tra 23500 e 24500 kWh, ma vengono rappresentati con una certa abbondanza anche i valori inferiori fino a 22500 kWh; il plot è infatti caratterizzato da una coda che si restringe più lentamente rispetto ai plot precedenti. Valori inferiori a 22500 kWh risultano essere più rari. L'impianto è quindi soggetto a numerosi cali di Produzione Energetica Totale, dovuti a motivi di vario genere.

Inoculo 4 è rappresentato da un plot con un profilo simile a Inoculo 2. I valori registrati spaziano quasi tra i limiti dell'asse y, e mostrano una frequenza significativa in un range ampio, tra 22500 kWh e 24500 kWh, ma la maggiore frequenza si ha ancora una volta vicino a 24000 kWh, dove la distribuzione è più ampia e si allontana con code che si restringono simmetricamente e più lentamente rispetto ai primi tre violin-plot.

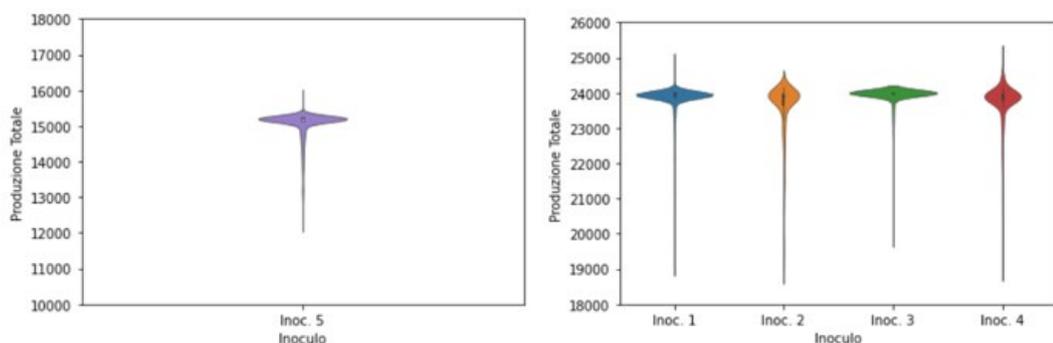


Figura 4 Output grafico relativo alla Produzione Energetica Totale dopo la conversione del biogas in energia (kWh) da parte dei sistemi CHP.

Il line-plot rappresenta l'oscillazione temporale dei kWh prodotti dal sistema CHP di Inoculo 1 nell'arco di 4 anni (Figura 5).

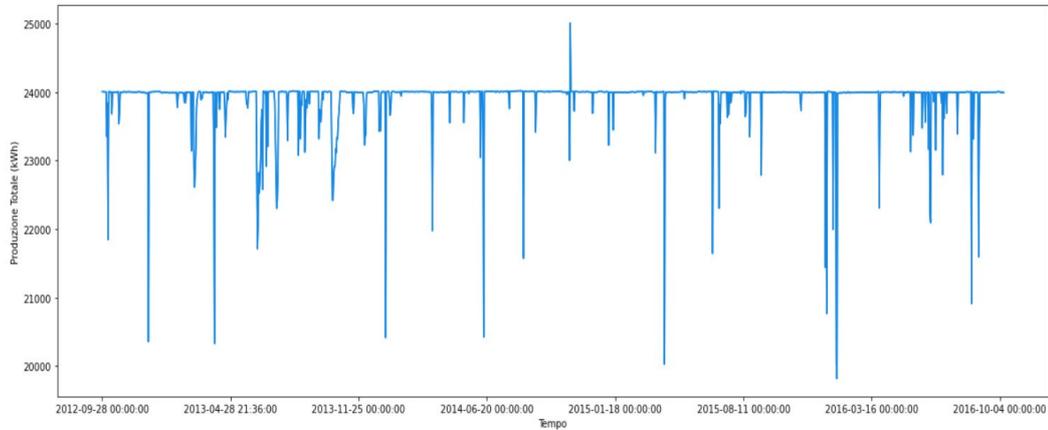


Figura 5: Line-plot che rappresenta l'andamento dei valori registrati di Produzione Energetica Totale (in kWh) dall'anno di installazione fino all'ultimo anno registrato (2016).

In prima analisi si osserva che il plot si sviluppa principalmente su una linea orizzontale in corrispondenza di 24000 kWh; *baseline* dalla quale poi derivano dei netti cali di produzione energetica in corrispondenza dei picchi rivolti verso il basso. Per la maggior parte del tempo quindi il sistema CHP produce energia con valori prossimi o uguali a 24000 kWh, una sola volta si registra un picco superiore significativo che raggiunge 25000 kWh, e poche altre oscillazioni di bassa intensità superano 24000 kWh. Sono più numerosi i picchi inferiori a 24000 kWh, ma rapportati alla quantità di rilevazioni con valore prossimo alla *baseline* dell'andamento, si tratta comunque di un numero ristretto di oscillazioni negative. Le fluttuazioni che definiscono il line-plot rispecchiano le proprietà del violin-plot elaborato per Inoculo 1 (Figura 3): la maggior parte delle rilevazioni registra valori vicini a 24000 kWh (dove la distribuzione è nettamente più larga) mentre valori superiori e inferiori si osservano poche volte determinando la delineazione di code che si restringono rapidamente.

Se osservassimo il grafico derivante da dati "grezzi", il numero di picchi, in particolare verso valori inferiori alla *baseline*, aumenterebbe notevolmente. Il plot è infatti realizzato sulla base di un diario di dati relativi all'impianto 1 "corretto". Durante l'anno l'impianto subisce più o meno arresti e cali di produzione energetica dovuti a malfunzionamenti, interruzioni della rete di alimentazione, manutenzione, ecc.

Per poter sviluppare un sistema di analisi dati che prescindere dai problemi di carattere tecnico-meccanico, ma che possa porre le basi per un software in grado di prevedere l'energia prodotta, in ottica di un'ottimizzazione della produzione stessa, basandosi sulla correlazione tra variazione dei parametri fisici e biologici, è necessario identificare ed eliminare dalle analisi le singole fluttuazioni della PT

dovute a problemi di carattere impiantistico. Per farlo il diario è stato scansionato manualmente, eliminando dal conteggio i cali energetici con questa origine. Dal grafico prodotto deriveranno le successive analisi che potranno definire una correlazione tra variazioni di PT e parametri fisici e/o biologici.

4.3. BMP Test

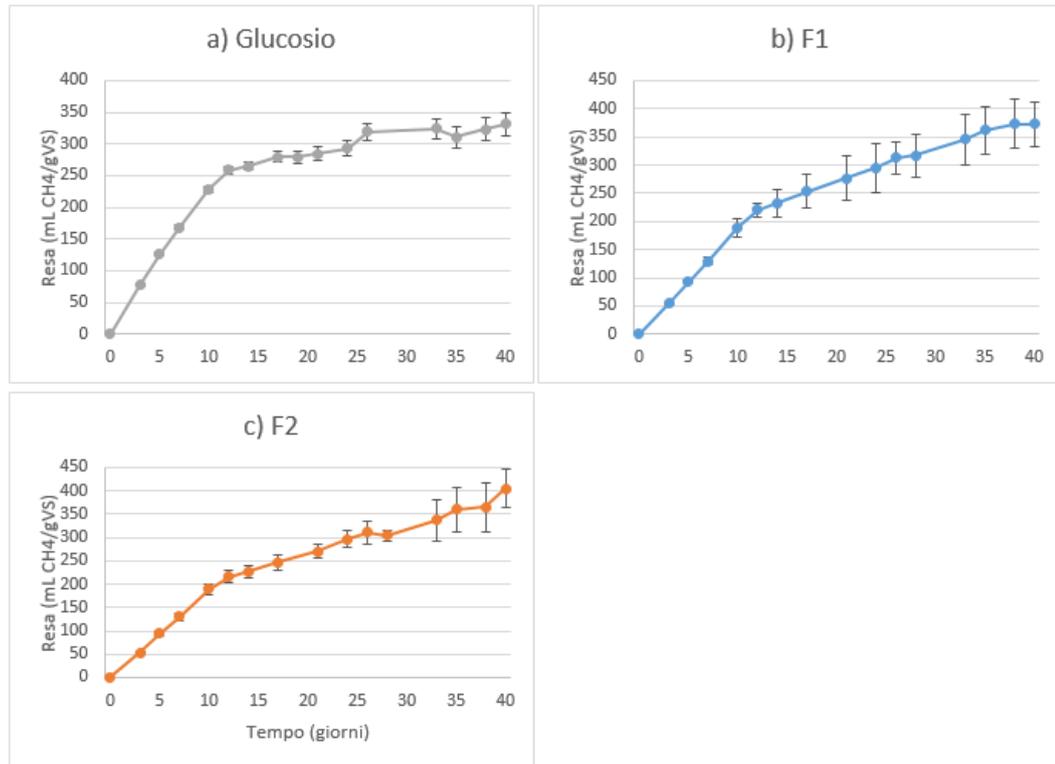


Figura 6 Andamenti della resa (mL_{CH_4}/g VS) giornaliera calcolata per il controllo positivo (a) e per le condizioni F1 (b) e F2 (c).

L'inoculo 1 è stato impiegato per la produzione di biogas in *lab-scale* testando due substrati spenti di fermentazione (F1 e F2). I due substrati derivano da due processi paralleli di conversione di *unripe rice* in etanolo, da parte di due ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* ricombinanti. Dai valori ricavati attraverso il BMP test sono stati elaborati i grafici della resa in termini in biometano.

La figura 6 mostra l'andamento della resa (espressa in mL_{CH_4}/g VS), in funzione del tempo (giorni), dell'Inoculo 1 in relazione alla quantità metano prodotto in condizioni di controllo e nelle condizioni F1 e F2. Il primo grafico è relativo all'andamento della resa nel controllo positivo e conferma la presenza di attività durante tutto l'esperimento.

Nella Figura 6d, in cui vengono confrontate le rese di F1 e F2, si osserva che l'andamento delle curve è pressoché identico. Esse, infatti, si sovrappongono quasi perfettamente e non si osservano differenze significative tra le due. Inizialmente la pendenza delle due curve è elevata. Il substrato viene quindi utilizzato rapidamente dalla popolazione microbica producendo elevate quantità

di metano (secondo i dati registrati il volume cumulativo medio di metano prodotto al giorno 12 è pari a 19,305 mL per F1 e 19,017 mL per F2).

Raggiunto il dodicesimo giorno la pendenza della curva, per entrambe le condizioni, diminuisce, poiché il substrato è stato già ampiamente utilizzato. La minima divergenza delle curve osservabile tra il giorno 25 e 40 non risulta significativa ed è unicamente determinata dalla variabilità correlata alla natura biologica dell'esperimento.

La massima resa riportata per F1 è pari a 372,61 mL_{CH₄}/g VS; per F2 è pari a 405,00 mL_{CH₄}/g VS. È possibile concludere che l'Inoculo 1 consente una buona produzione di biometano in presenza di tali substrati, che tuttavia, derivando da un processo di fermentazione etanolica del substrato di partenza *unripe rice* consistono unicamente nelle macromolecole non metabolizzate nello step precedente. Pertanto si deduce che la composizione molecolare dei substrati utilizzati nelle due condizioni sia identica, motivo per cui la resa delle stesse non consente di evidenziare differenze.

I risultati sono molto incoraggianti. È stata prodotta una quantità elevata di biogas dopo aver ottenuto concentrazioni molto alte (superiori a 60 g/L) di bioetanolo durante la fermentazione di *unripe rice*. In un'ottica di bioraffineria, uno scarto agro-industriale è stato efficientemente convertito in due biocarburanti molto promettenti nel contesto economico internazionale.

5. Conclusioni

Con questo elaborato sono stati trattati alcuni processi chiave che caratterizzano un progetto di ricerca industriale. Premessi gli scopi del progetto "*Più-Biogas App*" è stato utilizzato un approccio bio-informatico per elaborare rappresentazioni grafiche, per il confronto della distribuzione di valori di parametri chimico-fisici ed energetici entro impianti di biogas distinti.

Successivamente l'attenzione è stata focalizzata su un singolo impianto di biogas, di cui dapprima è stato rappresentato l'andamento dei valori di produzione energetica giornalieri, entro un range limitato di anni. In un secondo momento, l'inoculo relativo allo stesso impianto è stato utilizzato per condurre un BMP test per poter determinare le potenzialità metanigene di due substrati precedentemente fermentati, valutando quindi l'efficienza del *double-step process* che combina la fermentazione e la successiva digestione anaerobica.

L'approccio informatico e microbiologico sono stati combinati per caratterizzare alcuni aspetti di un processo di DA, al fine di sviluppare una visione più ampia sulle caratteristiche del processo di produzione di biogas e poter poi stabilire le relazioni che legano parametri tecnici, biologici e la resa degli impianti.

6. Bibliografia

- Adekunle, K. F., & Okolie, J. A. (2015). A Review of Biochemical Process of Anaerobic Digestion. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 06 (03), 205–212. <https://doi.org/10.4236/abb.2015.63020>
- Al Seadi, T., Rutz, D., Prassl, H., Köttner, M., Finsterwalder, T., Volk, S., & Janssen, R. (2008). *Biogas handbook*. University of Southern Denmark Esbjerg.
- Botheju, D. (2011). Oxygen Effects in Anaerobic Digestion – A Review. *The Open Waste Management Journal*, 4(1), 1–19. <https://doi.org/10.2174/1876400201104010001>
- Kougias, P. G., & Angelidaki, I. (2018). Biogas and its opportunities—A review. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 12 (3), 14. <https://doi.org/10.1007/s11783-018-1037-8>
- Lyu, Z., & Liu, Y. (2019). Diversity and Taxonomy of Methanogens. In A. J. M. Stams & D. Z. Sousa (A c. Di), *Biogenesis of Hydrocarbons* (pagg. 19–77). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-78108-2_5
- Nguyen, L. N., Nguyen, A. Q., & Nghiem, L. D. (2019). Microbial Community in Anaerobic Digestion System: Progression in Microbial Ecology. In X.-T. Bui, C. Chiemchaisri, T. Fujioka, & S. Varjani (A c. Di), *Water and Wastewater Treatment Technologies* (pagg. 331–355). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3259-3_15