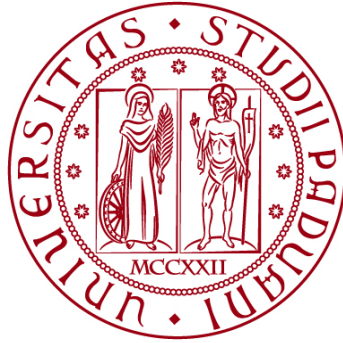


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

**Corso di Laurea in Biologia**



**ELABORATO DI LAUREA**

**ANALISI BIOINFORMATICA DI DATI BIOCHIMICI OTTENUTI DA IMPIANTI INDUSTRIALI  
UTILIZZATI PER LA PRODUZIONE DI BIOGAS**

**Tutor: Laura Treu  
Dipartimento di Biologia**

**Co-tutor: Guido Zampieri  
Dipartimento di Biologia**

**Laureanda: Virginia Baruzzo**

**ANNO ACCADEMICO 2022/2023**

## Indice

|   |    |
|---|----|
| Introduzione.....   | 1  |
| La digestione anaerobica .....  | 1  |
| Tappe della digestione anaerobica .....   | 1  |
| Metanogenesi come fonte di energia.....   | 2  |
| Utilità energetica del biogas e gli impianti.....   | 2  |
| I fattori che influenzano la digestione anaerobica .....  | 3  |
| L'importanza del substrato .....  | 5  |
| Macronutrienti e Oligoelementi .....  | 5  |
| Scopo dello studio.....   | 6  |
| Materiali e metodi .....  | 6  |
| Risultati e discussione .....   | 7  |
| Analisi dei dati biochimici .....   | 7  |
| Osservazioni sull'andamento del pH in relazione alla concentrazione degli acidi<br>grassi volatili, dell'ammonio e dei parametri ambientali ..... | 7  |
| Osservazioni sull'andamento del processo di DA .....  | 9  |
| Analisi sui macro e micronutrienti .....  | 10 |
| Conclusioni.....  | 13 |
| Bibliografia .....  | 14 |

## Introduzione

Al giorno d'oggi aumenta sempre di più l'interesse nei confronti delle ricerche volte a trovare nuove tecnologie meno impattanti sull'ambiente. È il caso delle industrie di biogas che cercano una via per produrre energia rinnovabile trovando alternative ai combustibili fossili sfruttando il processo di digestione anaerobica.

### La digestione anaerobica

La digestione anaerobica (DA) è un processo biologico che avviene in condizioni anossiche e che prevede la conversione del carbonio organico in anidride carbonica ( $\text{CO}_2$ ) e metano ( $\text{CH}_4$ ). Ciò avviene mediante successive ossidazioni e riduzioni ad opera di un'ampia gamma di microrganismi che agiscono in assenza di ossigeno ( $\text{O}_2$ ). È quindi un fenomeno mantenuto da un insieme di vie metaboliche che permette la conversione di rifiuti organici e residui agricoli in energia ed è stato promosso di conseguenza come una soluzione sostenibile per il recupero di risorse e di produzione di energia rinnovabile (Campanaro et al. 2020).

Gli ambienti anossici sono numerosi in natura e ospitano diverse comunità microbiche che sono le protagoniste degli stessi processi che vengono riprodotti in ambito industriale per la produzione di energia. I metanogeni, infatti, sono comuni in habitat poveri di accettori di elettroni diversi dalla  $\text{CO}_2$ , condizione tipica delle zone di alta produttività primaria dove questi vengono rapidamente consumati. Alcuni esempi sono le bocche idrotermali di acque profonde, il permafrost antartico, sedimenti d'acqua, paludi ma anche i tratti digestivi di alcuni animali (Lyu et al. 2018).

### Tappe della digestione anaerobica

Nella digestione anaerobica grandi molecole organiche (proteine, zuccheri e grassi) vengono scomposte a formare una miscela di gas. Il fenomeno può essere suddiviso in quattro diverse fasi, ciascuna caratterizzata da diversi stadi di decomposizione e diversa comunità microbica. Per quanto riguarda la comunità microbica le prime tre fasi sono caratterizzate da gruppi batterici mentre gli organismi coinvolti nell'ultima fase sono Archea.

**Idrolisi:** in questa prima fase avviene la trasformazione di materiali organici insolubili e di macromolecole (come lipidi, polisaccaridi, proteine, grassi, acidi nucleici ecc.) in materiali organici solubili (come monosaccaridi, amminoacidi e altri composti organici semplici).

Questa fase è essenziale in quanto rende disponibili materiali organici semplici che altrimenti sarebbero inaccessibili ai microrganismi che li utilizzano come substrato o fonte di energia. La velocità di decomposizione durante la fase di idrolisi dipende molto dalla natura del substrato. La trasformazione della cellulosa e dell'emicellulosa, ad esempio, avviene generalmente più lentamente della decomposizione delle proteine (Schnurer e Jarvis 2010).

**Acidogenesi:** è la seconda fase, in cui si ha l'assorbimento da parte dei batteri dei monomeri prodotti nella fase idrolitica per poi venir ulteriormente degradati in acidi organici a catena corta o alcoli (come acidi butirrici, acidi propanoici, acidi acetici, alcoli, idrogeno e anidride carbonica).

In questa fase la concentrazione del prodotto intermedio idrogeno è importante in quanto influenza il tipo di prodotto finale che verrà a formarsi. Se la pressione parziale dell'idrogeno è troppo alta diminuisce la quantità di composti ridotti.

**Acetogenesi:** i prodotti della fase acidogena vengono consumati come substrati dai microrganismi della terza fase detta anche fase acetogenica. Essa consiste in una serie di ossidazioni anaerobiche in cui acidi grassi e alcoli volatili (AGV) vengono ossidati in substrati metanogeni come acetato, idrogeno e anidride carbonica.

È importante che gli organismi che effettuano le reazioni di ossidazione anaerobica collaborino con il gruppo di microrganismi che formano metano; questa collaborazione dipende dalla pressione parziale dell'idrogeno presente nel sistema. Sotto ossidazione anaerobica, i protoni sono usati come accettori di elettroni finali che portano alla produzione di  $H_2$ . Perché queste reazioni di ossidazione procedano in maniera corretta è necessaria la collaborazione con i metanogeni, microrganismi della fase successiva, i quali consumano  $H_2$  per produrre metano. (Adekunle e Okolie 2015). Vediamo quindi quanto sia importante che tutte le fasi procedano in maniera equilibrata.

**Metanogenesi:** è la fase finale che porta alla produzione di metano. A seconda del substrato ed in base alla fonte di carbonio utilizzata dai metanogeni presente, possono essere utilizzate diverse vie metaboliche. I metanogeni idrogenotrofici ossidano  $H_2$  formando alcoli semplici e riducono  $CO_2$  per produrre  $CH_4$ . I metanogeni acetoclastici scindono l'acetato in  $CH_4$  e  $CO_2$ , mentre i metanogeni metilici lavorano su substrati metilati riducendo  $CO_2$  in  $CH_4$ . La maggior parte dei metanogeni descritti sembrano essere idrogenotrofici e la strategia idrogenotrofica sembra essere anche la più utilizzata negli ambienti industriali insieme a quella acetoclastica (Lyu et al. 2018), come verificato con l'isolamento di colonie.

La metanogenesi è la fase più lenta dell'intero processo di digestione anaerobica.

Avviene ad opera di microrganismi diversi dagli organismi coinvolti nelle fasi precedenti, gli Archea metanogeni. Essi, infatti, hanno tempi di generazione più lunghi. I metanogeni inoltre sono spesso i primi a risentire di varie alterazioni biochimiche come variazioni del pH o presenza di composti tossici come metalli pesanti o inquinanti organici (Ye Chen, Cheng, e Creamer 2008).

### Metanogenesi come fonte di energia

#### Utilità energetica del biogas e gli impianti

Il biogas rappresenta una valida fonte di energia grazie al suo alto contenuto di metano, presente in un range tra il 50% ed il 70%. È costituito inoltre da anidride carbonica a una concentrazione variabile tra il 30% ed il 50% e da altri composti quali azoto ( $N_2$ ) in concentrazioni inferiori al 3%, acido solfidrico ( $H_2S$ ) e altri contaminanti in tracce (Muñoz et al. 2015).

Le principali fonti di materia organica per la produzione di energia sono concimi, rifiuti industriali e residui agricoli. Questi materiali vengono raccolti e trattati in appositi impianti.

Nei prossimi paragrafi vedremo quelle che sono le condizioni dal punto di vista strutturale e dei parametri che devono essere prese in considerazione nell'ambito della produzione del biogas, al fine di un'efficiente avanzamento del processo di DA.

### *Struttura degli impianti di biogas*

Gli impianti di biogas sono strutture che prevedono diversi elementi a seconda della tipologia e della qualità delle biomasse utilizzate e alla quantità di materiale che possono ospitare. In generale consistono in diverse aree che possono essere vasche o serbatoi che ospitano il materiale digerito, dividendo le diverse fasi della digestione anaerobica in modo da garantire il mantenimento dei parametri necessari al corretto avanzamento delle reazioni di digestione.

Le principali componenti di un impianto a biogas sono:

- Aree di stoccaggio: dove il materiale viene raccolto ed eventualmente pre-trattato per eliminare impurità e prepararlo alla digestione. Il trattamento può avvenire mediante processi meccanici (es. triturazione, separazione, etc.) o termici;
- Digestori: grandi cisterne chiuse in modo ermetico dove le biomasse sono continuamente miscelate. Qui abbiamo la vera e propria digestione anaerobica. I diversi impianti possono decidere di dedicare diverse cisterne alle diverse fasi del processo (dividendo, per esempio, la fase di idrolisi dalla fermentazione o creare più cisterne di fermentazione) studiando diverse strategie per ottimizzare la produzione.
- Successive aree di stoccaggio del prodotto ed eventuale raffinazione del metano.

Esistono diversi tipi di impianti di biogas che possono essere classificati in maniera diversa a seconda della materia prima utilizzata e dai parametri ambientali mantenuti. La maggior parte degli impianti, tra cui quelli analizzati in questo studio, utilizzano matrici con materie prime miste date dalla stagionalità dei substrati e alta concentrazione di inibitori (es. fenoli, ammoniaca ecc.)

I fattori che influenzano la digestione anaerobica

Nelle diverse vasche vengono impostati diversi parametri ambientali e segue un attento monitoraggio per garantire il mantenimento di tali valori in modo da permettere il corretto avanzamento delle diverse fasi della digestione.

Ci sono diversi fattori, infatti, che sono in grado di influenzare le reazioni della DA. Tra questi, i più importanti sono: il tempo di ritenzione idraulico (HRT), la temperatura, il pH e la presenza di diversi composti che agiscono da inibitori del processo di digestione.

**HRT:** è il "hydraulic retention time", il tempo di ritenzione idraulica, ovvero il tempo di permanenza della matrice nel reattore, dato dal rapporto tra il volume del reattore e la portata volumetrica. È un parametro operativo che determina il tasso di crescita delle comunità microbiche che si creano nel substrato e che saranno responsabili delle diverse fasi della DA. Si traduce quindi in numero di giorni di mantenimento del substrato in determinate condizioni ambientali tali da garantire una corretta crescita della comunità per quella fase della digestione e il suo completamento.

**Temperatura:** Le condizioni di temperatura a cui possono operare i diversi reattori sono:

- mesofile (30°C–40°C, principalmente 35°C-37°C);
- termofile (50°C–60°C, principalmente 52°C-55°C).

La scelta della temperatura di esercizio è molto importante poiché influenza fortemente lo sviluppo della comunità microbica nei digestori e quindi l'andamento delle reazioni

del processo. Queste temperature dovranno inoltre essere mantenute stabili in quanto fluttuazioni causerebbero accumulo di acidi grassi volatili (AGV). La temperatura, infatti, è in grado di influenzare l'attività degli enzimi idrolitici. Nello specifico è stato dimostrato (Nie et al. 2021) che temperature elevate sono in grado di garantire una attività idrolitica più dinamica e quindi una quantità più cospicua di prodotti. La temperatura inoltre va a determinare la composizione della comunità microbica presente nelle fasi dell'acidogenesi, dell'acetogenesi e della metanogenesi. Diverse specie determinano differenti percorsi di reazioni e quindi diversi prodotti in diverse quantità, ma soprattutto le specie possono presentare disparate risposte agli inibitori come l'ammonio e il pH.

**pH e Acidi Grassi Volatili (AGV):** Anche nel caso del pH devono essere mantenuti stabili determinati valori per evitare di avere drastiche diminuzioni della produzione del metano. Un pH basico, con valori anche di 9.9, è stato dimostrato essere favorevole per l'idrolisi, permettendo la liberazione di grandi quantità di carboidrati e proteine rendendoli disponibili per la produzione di AGV. Anche la fase di acidogenesi è avvantaggiata da pH alcalino, di 8.9. Per la fase di metanogenesi invece pH superiori a 7,9 sono inibitori, è quindi necessario che ci sia la giusta concentrazione di AGV che abbassino il pH. (Yun Chen et al. 2017).

Il pH può essere regolato nelle differenti vasche attraverso agenti chimici ma bisogna tenere in considerazione che è anche influenzato da altri parametri operativi: l'accumulo di acidi organici durante acidogenesi (per valori però molto elevati) che abbassa il pH, mentre l'aumento delle concentrazioni di ammoniaca o la rimozione di CO<sub>2</sub> porta ad un incremento dei suoi valori.

Va anche tenuto conto che l'accumulo eccessivo di AGV è fortemente inibitorio per la produzione di metano in quanto va a intaccare le comunità microbiche metanogene attaccando le loro proteine di membrana e influenzando i loro processi metabolici (Ma et al. 2015).

**Rapporto FOS/TAC:** Un altro dato interessante per questo studio, che fa proprio riferimento alla concentrazione di AGV, sono i rapporti FOS/TAC.

il FOS è il contenuto di acidi grassi volatili e TAC: (capacità tampone) carbonio inorganico totale. È un calcolo che permette di determinare la stabilità del processo di digestione anaerobica. Se troviamo valori di FOS molto alti significa che il metabolismo è incompleto, indice di una possibile inibizione. Se però il livello del tampone è anch'esso alto il processo non viene bloccato (Lili et al., s.d.).

**Ammonio:** Oltre ai AGV, un'altra sostanza molto comune che può agire da inibitore del processo di digestione è l'ammoniaca. Una minima concentrazione di ammoniaca è necessaria per la crescita batterica, ma se troppo elevata riduce l'attività microbica.

Indice di un'eccessiva concentrazione di ammoniaca sono la diminuzione della produzione di metano e l'accumulo di AGV (Rajagopal, Massé, e Singh 2013) L'ammoniaca è spesso già presente nelle matrici digerite ma è anche prodotto finale della digestione di proteine, urea e acidi nucleici. Durante la fase di acidogenesi avviene la denitrificazione che porta come prodotto lo ione NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Lo stesso equilibrio tra ammonio libero e ione ammonio dipende dagli altri fattori precedentemente trattati: pH basico e alte temperature favoriscono alte concentrazioni di ammonio libero e quindi più tossicità (Kougias e Angelidaki 2018).

L'importanza del substrato

La composizione del substrato è molto importante per i microrganismi nel processo del biogas e quindi anche per la stabilità del processo e la produzione di gas in quanto deve soddisfare le esigenze nutrizionali dei microrganismi. Il substrato deve anche includere vari componenti necessari per l'attività dei sistemi enzimatici microbici, come oligoelementi e vitamine.

Nel caso di decomposizione di materiale organico in un impianto a biogas, anche il rapporto carbonio/azoto (rapporto C/N) è considerato di grande importanza. Questo dato è a sua volta influenzato dai livelli di presenza di fosforo e oligoelementi, dall'efficienza di decomposizione dei substrati (quindi la proporzione di materiale organico che viene convertito in metano) e dalla composizione del substrato. Ad esempio, composti come la cellulosa vengono scomposti lentamente e il rischio di acidificazione del processo è significativamente inferiore rispetto ai substrati ricchi di glucosio, che si degrada molto rapidamente.

Il materiale solitamente viene pre-trattato in modo da uccidere i microrganismi patogeni, rimuovere materiali che non possono essere degradati e/o che interrompono il processo ma soprattutto per concentrare il contenuto di materiale organico e aumentare la disponibilità di materia organica (con la triturazione).

Macronutrienti e Oligoelementi

Sia macronutrienti (P, N, K, Na, Mg, e Ca) che gli oligoelementi (Mn, Zn, Fe, B, Co, Ni, Cu, Mo, Se, Al) sono vitali per la crescita e il metabolismo dei microrganismi anaerobi, soprattutto metanogeni, e qualsiasi deficit si traduce in una minore produzione di metano. Svolgono infatti importanti ruoli nutritivi o sono componenti fondamentali per l'attività enzimatica (Laiq Ur Rehman et al. 2019). Elementi come zinco, rame, magnesio, calcio e potassio sono elementi essenziali alla crescita microbica ma sono invece inibitori del metabolismo il rame, il nichel, il cadmio, il cobalto e lo zinco (Matheri, Belaid, e Ngila 2016).

Analizzando il digestato, ovvero il residuo del processo di digestione anaerobica, possiamo ricavare dati sulla concentrazione di elementi in tracce, ovvero questi macro e micronutrienti. Monitorare la concentrazione di questi elementi è altresì importante in quanto devono rispettare alcuni valori soglia per non fungere da inibitori.

## Scopo dello studio

In questo studio, ho analizzato i dati quantitativi relativi al processo di produzione di biogas ottenuti dal monitoraggio delle vasche presso diversi impianti. Studiando il loro andamento e tenendo conto dei diversi parametri ambientali impostati dalle aziende ho mosso delle osservazioni su come questi influiscano sui processi biologici della digestione anaerobica.

## Materiali e metodi

I dati utilizzati provengono dal monitoraggio di diversi impianti di digestione anaerobica full-scale raccolti per il progetto “Più BIOGAS-App”, finanziato dalla fondazione Cariverona, il cui obiettivo principale è quello di aumentare la resa di produzione in biogas almeno del 10%.

I dati forniti consistono in: temperature registrate nelle vasche, HRT e le matrici utilizzate, tutti raccolti nella tabella 1. Sono state inoltre fornite le concentrazioni di acidi grassi volatili, dell’ammonio, il pH, il potenziale redox, il rapporto FOS/TAC e la concentrazione dei micronutrienti presenti in tracce. Queste informazioni provengono da un monitoraggio giornaliero delle vasche per periodi che vanno da un anno e sei mesi a tre anni e sei mesi.

I dati sono stati presentati in tabelle che organizzavano le registrazioni per data, ora e per vasca e impianto. La fase principale di analisi dei dati ha previsto la scrittura di un programma con il linguaggio di programmazione Python per la rielaborazione dei dati stessi e la relazione di grafici che riassumessero l’andamento delle rilevazioni negli impianti. Di seguito vengono menzionati gli strumenti di analisi e di manipolazione di dati per costruire i grafici che vengono riportati nelle immagini da 1 a 5.

- **Pandas:** per l’organizzazione dei dati e la costruzione di tabelle  
<https://pandas.pydata.org> ;
- **Seaborn e Matplotlib:** per la costruzione dei grafici  
<https://seaborn.pydata.org>  
<https://matplotlib.org> .

Le problematiche che è stato necessario risolvere per l’analisi dei dati durante la programmazione riguardavano il processamento, la selezione dei dati di interesse associati agli impianti, la standardizzazione, l’eliminazione di variabili non informative o contenenti dati non rilevanti.

Il risultato finale ha portato a visualizzare l’andamento dei parametri nelle diverse vasche degli impianti presi in esame. I grafici riportano sull’asse delle ascisse gli impianti numerati mentre sull’asse delle ordinate i valori registrati. La box racchiude i quartili del set di dati e la linea centrale nei box rappresenta la media. I baffi, invece, segnano l’andamento del resto della distribuzione.



## Risultati e discussione

In tabella vengono riportati alcuni dati sui parametri ambientali impostati nei diversi impianti e informazioni sui substrati utilizzati:

Tabella 1: dati relativi agli impianti presi in esame.

| IMPIANTO   | TEMPERATURA           | HRT        | MATRICI DIGERITE   | CARATTERISTICHE PECULIARI   |
|------------|-----------------------|------------|--|---|
| Impianto 1 | 45,5 estive           | 72 giorni  | 38 - 40 t Sansa di olive bifase denocciolata 16% SS, 0,4 t crusca o urea. Crusca e urea vengono utilizzate solo come fonte di azoto.   | Carenza azoto, pretrattamento biologico per eliminare fenoli                          |
| Impianto 2 | 49°C F1-F2<br>47°C PF | 92 giorni  | Silomais, liquame  | Produzione altalenante e lenta a salire, a volte nell'F1 il metano scende fino al 46% |
| Impianto 3 | 46 - 49 estive        | 110 giorni | 35 t Insilato di Mais (solo maggio e giugno - stagionalità), 8 t orzo  | Pretrattamento Estrusore (meccanico termico)  |
| Impianto 4 | 42 estive             | 41 giorni  | 30 t pollina ovaiole, 24 t Insilato di mais, 90 m3 liquame suino con acqua   | Vasca idrolisi, Azoto alto, pretrattamento Bio R (mulino con piastre)                 |
| Impianto 5 | 44 estive             | 85 giorni  | 10 t pollina broiler, 21 t patate, 8 t cipolle, 20 t insilato di mais. Le cipolle da 1 a 10 t al giorno e l'insilato di mais messo in conseguenza alla quantità di patate e cipolle. | Utilizzo di patate e cipolle in quantità elevati. Pretrattamento Estrusore            |
| Impianto 6 | F1 45,5° ; PF 44°     | 45 giorni  | Silomais, letame, liquame, farina. Brattee e tutoli, agosto - settembre; frumento luglio - settembre   | Periodo instabile   |

### Analisi dei dati biochimici

Di seguito osserveremo l'andamento della concentrazione di alcuni elementi e il valore di alcuni parametri nelle vasche dei diversi impianti presi in esame. In base all'impianto, si possono trovare:

- **Pre-vasca:** dove viene raccolto il substrato ed eventualmente pre-trattato;
- **Vasca idrolisi:** dove avviene la prima fase della digestione anaerobica;
- **Fermentatore e post fermentatore:** dove avvengono le fasi successive. Alcuni impianti ne dedicano più vasche altri una sola.

Osservazioni sull'andamento del pH in relazione alla concentrazione degli acidi grassi volatili, dell'ammonio e dei parametri ambientali

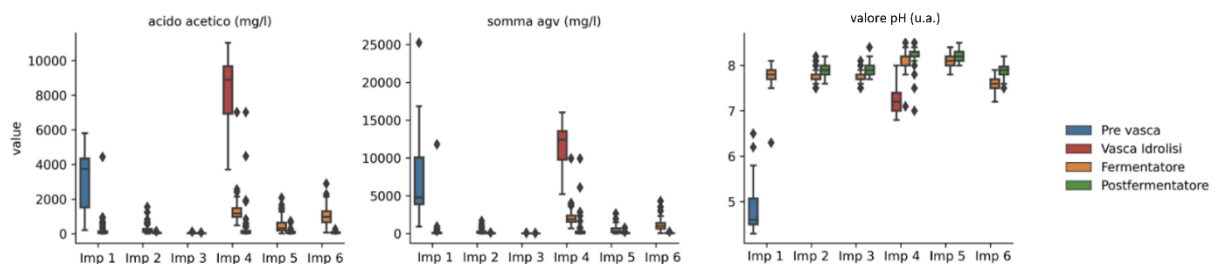


Figura 1: concentrazione di Acido acetico (sinistra), AGV totali (centro) e valori di pH in unità adimensionale (destra).

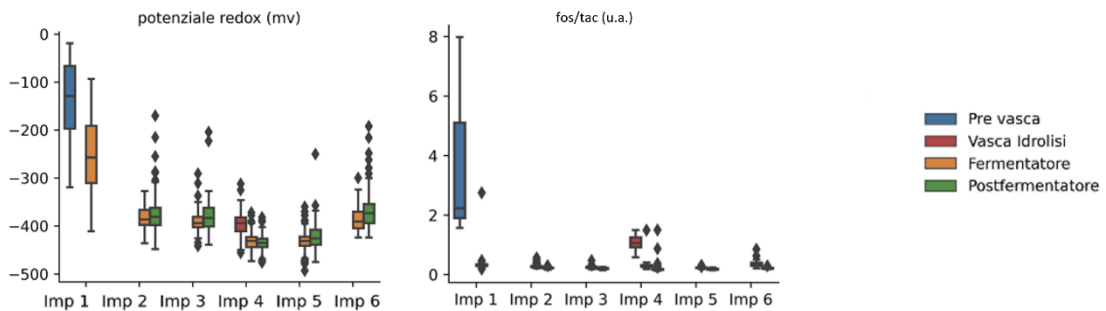
Il pH, come precedentemente spiegato, dovrà assumere valori intorno al 7.9-8.9 per garantire un corretto andamento delle reazioni della DA. Si osserva infatti (Fig. 1 - destra) che questa condizione viene rispettata: ogni impianto riporta pH intorno a 8 per quanto riguarda le vasche di fermentazione e post fermentazione.

Per comprendere bene perché il pH assume questi valori dobbiamo tener conto non solo del controllo che può esserci da parte dei tecnici per regolare le fluttuazioni del pH, ma anche dei prodotti delle diverse fasi della DA che influenzano tali valori.

Uno degli indicatori di stato per il processo di formazione del biogas sono proprio i AGV. La concentrazione dei singoli AGV, e soprattutto il rapporto tra di essi, possono fornire

informazioni essenziali per il monitoraggio del processo e indicarne eventuali squilibri. Nei grafici vengono quindi riportati gli andamenti delle concentrazioni dell'acido acetico, componente principale tra i AGV, e dei AGV complessivi (fig. 1 sinistra - centro).

Figura 2: potenziale redox (destra) e rapporto FOS/TAC (sinistra).



Vengono poi presentate in figura 3 le concentrazioni di ammonio ( $\text{NH}_4$ ) il quale, come già precedentemente dimostrato, porta ad un'alcalinizzazione del pH.

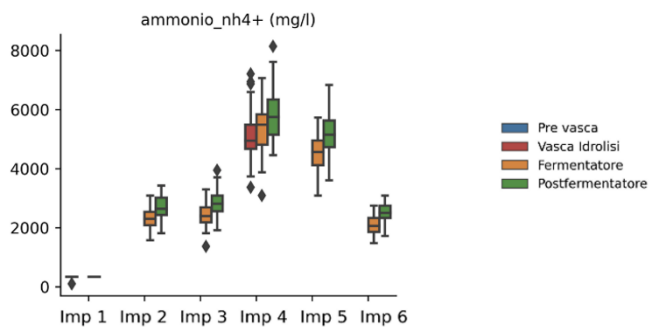


Figura 3: andamento della concentrazione di ammonio

Analizzando i dati quindi si osserva che al termine dell'idrolisi avremo alte concentrazioni di AGV (Fig. 1). Questo si traduce quindi in alti valori di concentrazione nella pre-vasca e nella vasca dedicata all'idrolisi, abbassando il pH nelle stesse (come si osserva per gli impianti 1 e 4). I AGV verranno poi consumati nelle reazioni successive e diminuiranno in concentrazione. Aumenterà invece la concentrazione di ammonio come prodotto della denitrificazione (lo osserviamo nella Fig. 3), portando ad un conseguente innalzamento del pH nelle vasche (Fig 1 - destra).

Un altro fattore che contribuisce all'alcalinizzazione del contenuto nella vasca è la sottrazione di  $\text{CO}_2$  da parte dei metanogeni. Nella digestione idrogenotrofica, strategia più diffusa tra i microrganismi metanogeni impiegati nella produzione del biogas, il carbonio della  $\text{CO}_2$  viene ridotto e ossidato l'idrogeno producendo metano ( $\text{CH}_4$ ) e acqua. La concentrazione di  $\text{CO}_2$  quindi diminuisce con la metanogenesi e questo porta all'innalzamento del pH che osserviamo nei reattori.

Osservazioni sull'andamento del processo di DA

Chiarito l'andamento generale del pH in relazione alle fasi che avvengono nelle diverse vasche vediamo ora quali sono le differenze tra i diversi impianti dovute alla matrice usata e ai parametri ambientali impostati.

Interessanti osservazioni si possono fare partendo dall'analizzare gli impianti 1 e 4, provvisti di pre-vasca o vasca di idrolisi. L'utilizzo di queste vasche (non presenti negli altri impianti) porta ad una ottimizzazione della produzione dei AGV dovuta all'isolamento delle prime fasi della AD.

Nel caso dell'impianto 4 abbiamo un grande aumento nell'accumulo di AGV. Questi verranno resi disponibili in gran quantità nel fermentatore e velocemente consumati, riscontrando quindi un grande calo di acidi grassi volatili nel post fermentatore. Nel caso dell'impianto 1, invece, si riscontra un'ottimizzazione della produzione di AGV, ma minore dell'impianto 4, probabilmente dovuta al pH molto acido che agisce da inibitore.

Sempre a causa del pH acido nella pre-vasca dell'impianto 1 avremo un'inibizione delle fasi successive all'idrolisi (che sono invece favorite da pH neutro-basico). Osservando i dati sul rapporto FOS/TAC (fig. 2 - destra) infatti vediamo che il rapporto è molto superiore ad 1, suggerendo che il contenuto di acidi grassi è così superiore alla sostanza tampone da inibire le fasi successive all'idrolisi. Osservando sempre i dati relativi all'impianto 1 vediamo valori bassi di AGV (fig. 1 sinistra - centro) nel fermentatore. Questo porta a pensare ad un consumo di AGV regolare che va a pari passo con la velocità di produzione degli stessi, impedendone così l'accumulo (se guardiamo anche al potenziale redox vediamo valori più vicini allo 0 – fig. 2 sinistra). Questo è inoltre coerente con gli altri dati che osserviamo per questo impianto (tab. 1): un HRT medio che favorisce un andamento lento e regolare come le temperature mesofiliche. La carenza di azoto inoltre potrebbe essere un altro fattore che inibisce e rallenta i processi del metabolismo.

Riprendendo i dati dell'impianto 4 vediamo che abbiamo una resa a disposizione di AGV (fig. 1) molto cospicua e rapida grazie alla vasca di idrolisi. Questo porta ad un aumento della dinamicità delle reazioni successive (vediamo infatti valori più decisi per quanto riguarda il potenziale redox – fig. 2 sinistra) e per quanto riguarda la presenza di AGV tra fermentatore e post-fermentatore osserviamo grosse differenze. Questo suggerisce un consumo veloce e irregolare delle componenti, coerente con il pH alcalino (che dimostra come prodotti delle reazioni successive che aumentano il pH si accumulino velocemente) e i livelli di ammonio alti.

Osserviamo ora l'andamento degli altri impianti

- Gli impianti 2 e 3 presentano valori simili all'impianto 1; abbiamo poca differenza nella concentrazione di AGV tra fermentatore e post-fermentatore suggerendo un consumo lento e regolare. Nel caso di entrambi gli impianti abbiamo matrici ricche di materiale vegetale, i cui tempi di decomposizione sono più lunghi, dando una disponibilità dei prodotti più razionata nel tempo, con temperature nell'intervallo mesofilico che non sono sufficienti a velocizzare i processi e un HRT molto alto.
- L'impianto 5 ha un andamento simile all'impianto 4: presentano entrambi come fonte di azoto la pollina (la quale presenta una bassa percentuale di azoto

organico ed è quindi più facilmente utilizzabile). La matrice è composta da poco insalato di mais e più da patate e cipolle che rendono più velocemente disponibili AGV rispetto all'insalato. Il pH basico (alzato anche dalla presenza delle cipolle) è indice di reazioni che procedono velocemente.

- L'impianto 6 assume condizioni intermedie ai casi precedenti: abbiamo una differenza visibile nel consumo di AGV tra fermentatore e post-fermentatore ma livelli di ammonio più bassi dell'impianto 4 e 5 per via della fonte. La matrice è ricca di insalato che rallenta la messa a disposizione dei AGV.

#### Analisi sui macro e micronutrienti

L'analisi riguarda gli elementi in tracce con maggior significato in termini di funzione e concentrazione. Di seguito, nella tabella 2, vengono riportate informazioni riguardanti il ruolo ricoperto dagli elementi nella digestione anaerobica e la concentrazione soglia raccomandata per non incorrere in tossicità, conosciuta grazie a studi precedenti.

Tabella 2: concentrazioni raccomandate per macro e micronutrienti e il loro ruolo nella digestione anaerobica (Matheri, Belaid, e Ngila 2016), (Jackson-Moss e Duncan 1991).

| ELEMENTO  | Simbolo | RUOLO nella Digestione Anaerobica  | Soglia tossica (mg/kg) |
|-----------|---------|--|------------------------|
| Ferro     | Fe      | Proprietà redox - Accettore di elettroni   | 10                     |
| Manganese | Mn      | Attivatore enzimatico - Stabilizza la produzione di metano - Reazioni redox - Cofattore di diversi enzimi  | 50                     |
| Magnesio  | Mg      | Attivatore enzimatico  | 360-4800               |
| Cobalto   | Co      | Attivatore enzimatico - Inibitore metabolico   | 1-4                    |
| Zinco     | Zn      | Attivatore enzimatico - Stimola la crescita della cellula; Idrogenasi batterica - Aggrava la tossicità degli altri metalli - Inibitore metabolico    | 1                      |
| Rame      | Cu      | Attivatore enzimatico - Inibitore metabolico - Può ridurre la tossicità degli altri metalli  | 40                     |
| Boro      | B       | Cofattore enzimatico   | 10                     |
| Zolfo     | S       | Cofattore e componenti di proteine importanti per il metabolismo   | 13000                  |
| Molibdeno | Mo      | Inibitore del batterio solforiduttore - Cofattore enzimatico   | 5                      |
| Nichel    | Ni      | Sintesi enzimatica - Cofattore enzimatico dell'ureasi  | 10                     |
| Selenio   | Se      | Idrogenasi batterica   | 0,8                    |
| Calcio    | Ca      | Permeabilità di membrana - Influenza gli effetti tossici dei metalli - Influenza il pH   | 2800                   |
| Alluminio | Al      | Reazioni redox - Tossicità   | 2500                   |
| Sodio     | Na      | Tossicità e inibizione della produzione di metano - Reazioni redox - Utilizzato per il controllo del pH come idrossido di sodio e carbonato di sodio | 350                    |
| Fosforo   | P       | Importante ruolo metabolico  | 10                     |
| Potassio  | K       | Permeabilità di membrana   | 3000                   |

Osservando i grafici rappresentanti le concentrazioni degli elementi in tracce (fig.5) si notano anche in questo caso differenze tra i diversi impianti.

La prima variabile da prendere in considerazione è il tipo di matrice utilizzata e la quantità caricata nelle vasche i quali andranno ad influenzare fortemente la concentrazione degli elementi (Bożym et al. 2015). Ad esempio, impianti alimentati con deiezioni di maiale, mucche e polli presentano alte concentrazioni di elementi in tracce. In particolare il liquame suino è una fonte molto ricca (Matheri, Belaid, e Ngila 2016). È infatti osservabile dai dati che l'impianto 4, alimentato con anche liquame suino, è quello che presenta le concentrazioni più alte per molti elementi. Segue l'impianto 5, alimentato a letame con alte concentrazioni di fosforo, calcio, nickel, rame, zolfo, manganese e magnesio.

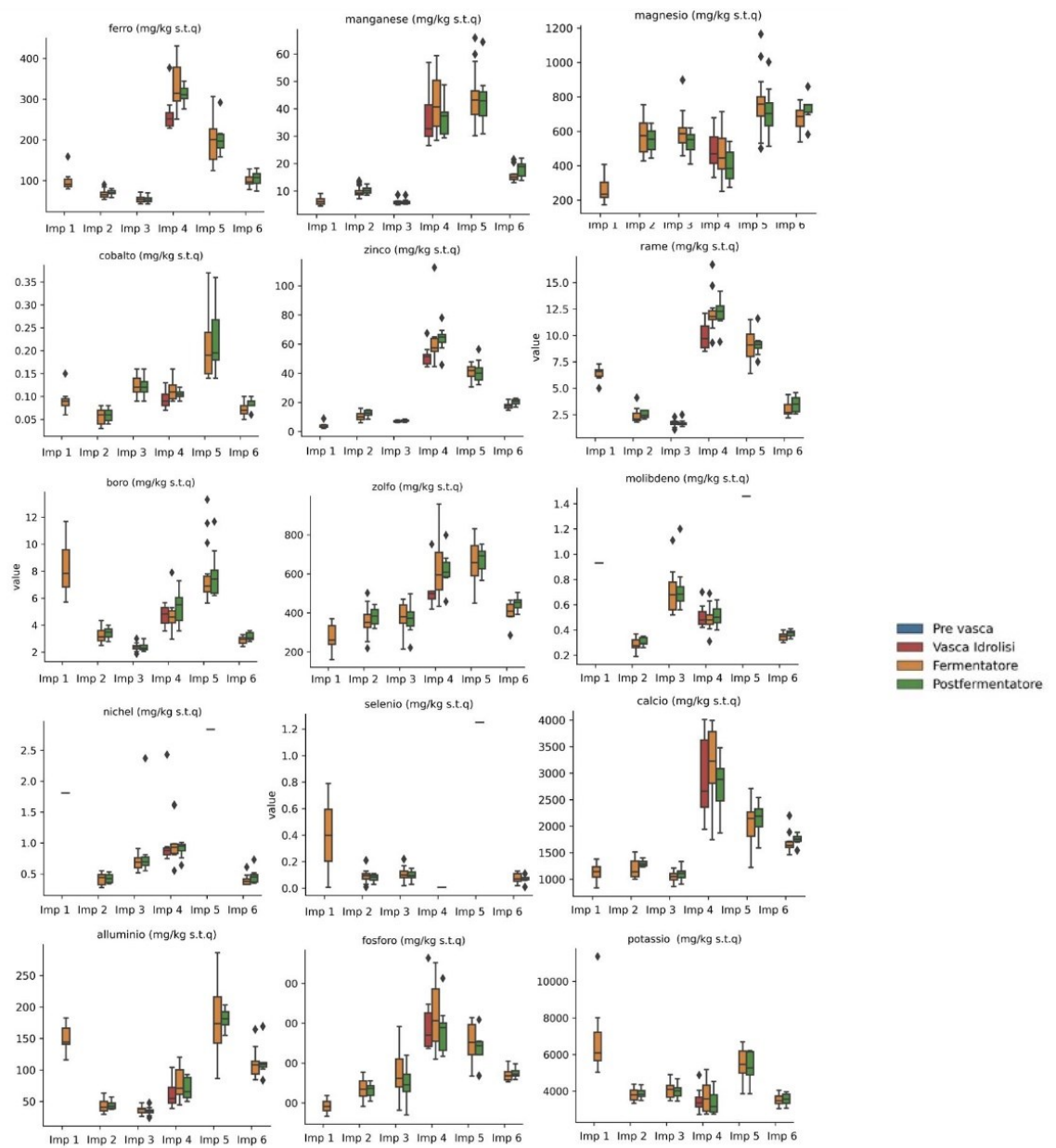
Anche l'impianto 6 presenta valori alti per molti elementi ed è infatti anche esso alimentato a letame più una gran varietà di prodotti vegetali.

Osservando i grafici vediamo che per la maggior parte degli elementi le concentrazioni sono ben al di sotto dei valori soglia, eccezion fatta per gli elementi ferro, zinco, calcio e potassio che superano di molto i valori soglia. Si tratta di elementi molto abbondanti in natura e che di conseguenza si presenteranno in grandi concentrazioni anche nelle matrici. Inoltre i valori soglia vengono superate soprattutto dagli impianti 4 e 5 che come visto in precedenza utilizzano matrici ricche di elementi in tracce. Per comprendere meglio come mai i valori soglia sono in alcuni casi superati, soprattutto nel caso del ferro e dello zinco, potrebbe essere utile svolgere un'indagine sul microbioma da cui sono stati ottenuti questi valori soglia e sulle metodologie utilizzate. È da tenere conto infatti che gli studi che hanno investigato sui valori soglia si sono serviti di matrici più uniformi rispetto a quelle prese in esame in questo studio. La varietà nella matrice può garantire un microbioma più eterogeneo e quindi la presenza di organismi più resistenti. Sono in corso diversi studi che testano ulteriormente la capacità di inibizione del processo di digestione anaerobica e soprattutto vi sono alcuni studi che dimostrano la capacità dei microrganismi di adattarsi alle alte concentrazioni di zinco, ferro (Jackson-Moss e Duncan 1990), calcio (Jackson-Moss, Duncan, e Cooper 1989) e potassio (Ye Chen e Cheng 2007). Nei citati studi si osserva infatti che dopo un rallentamento nella produzione di metano si verifica invece una ripresa. Quindi, nel caso preso in analisi, grandi concentrazioni di questi elementi, che oltretutto sono fortemente coinvolti nel metabolismo dei microrganismi e per questo fondamentali, possono essere non così determinanti.

È quindi vero che bisogna tenere in considerazione i valori che rappresentano un rischio di tossicità dei diversi elementi ma bisogna anche verificare se un eventuale rallentamento del processo non sia solo temporaneo.

Per quanto riguarda l'andamento della concentrazione dei diversi elementi nelle diverse vasche, ad influire saranno il ruolo ricoperto dall'elemento nel processo di digestione anaerobica e il fenomeno della precipitazione che dipenderà dai composti che si vengono a formare e quindi dalla fase della DA in cui ci si trova. A seconda della capacità del substrato di catturare ioni, infatti, verranno registrate diverse concentrazioni.

Figura 5: concentrazione degli elementi in tracce nelle vasche (mg/s.t.q. – sostanza tal quale: campione di materiale compreso della percentuale di acqua).



## Conclusioni

Dato il rapido esaurimento delle energie non rinnovabili e l'aumento dei problemi ambientali e di salute causati dall'utilizzo dei combustibili fossili, è fondamentale impegnarsi nella ricerca per lo sviluppo di queste nuove fonti.

Con questo studio si dimostra come la digestione anaerobica sia influenzata da un numero molto elevato di fattori (pH, temperatura, giorni di permanenza della matrice nelle vasche nelle diverse fasi, matrice di partenza e concentrazione di elementi in tracce, eventuali trattamenti) e come queste variabili si influenzino a vicenda modificando l'efficienza del processo.

Si è visto come una diversa organizzazione delle vasche per le diverse fasi della DA regoli l'accumulo degli AGV influenzando i livelli di pH nelle vasche. Tuttavia, rifacendoci anche ai dati forniti dalle imprese prese in considerazione sulla concentrazione di metano nel biogas prodotto, non si rilevano grandi differenze ma si aggirano tutte sul 50-52%. Questo perché, come osservato, il tipo di matrice utilizzata, la quantità, e come vediamo nella seconda parte dell'analisi, anche la concentrazione di elementi in tracce, agiscono sinergicamente sull'efficienza del processo portando a risultati conformi.

Continuando a monitorare gli impianti sarà possibile migliorare sempre di più l'utilizzo delle biomasse. Per una migliore valutazione delle prestazioni degli impianti è utile avere più dati possibili: fonte e quantità precise di matrice utilizzata, trattamenti effettuati, informazioni sulle comunità microbiche che agiscono e quantità di biogas prodotto, per poi mettere tutto insieme, ideare e testare nuove strategie.

## Bibliografia

- Adekunle, Kayode Feyisetan, e Jude Awele Okolie. 2015. «A Review of Biochemical Process of Anaerobic Digestion». *Advances in Bioscience and Biotechnology* 06 (03): 205. <https://doi.org/10.4236/abb.2015.63020>.
- Bożym, Marta, Iwona Florczak, Paulina Zdanowska, Janusz Wojdalski, e Marek Klimkiewicz. 2015. «An Analysis of Metal Concentrations in Food Wastes for Biogas Production». *Renewable Energy* 77 (maggio): 467–72. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2014.11.010>.
- Campanaro, Stefano, Laura Treu, Luis M. Rodriguez-R, Adam Kovalovszki, Ryan M. Ziels, Irena Maus, Xinyu Zhu, et al. 2020. «New Insights from the Biogas Microbiome by Comprehensive Genome-Resolved Metagenomics of Nearly 1600 Species Originating from Multiple Anaerobic Digesters». *Biotechnology for Biofuels* 13 (1): 25. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01679-y>.
- Chen, Ye, e Jay J. Cheng. 2007. «Effect of Potassium Inhibition on the Thermophilic Anaerobic Digestion of Swine Waste». *Water Environment Research* 79 (6): 667–74. <https://doi.org/10.2175/106143007X156853>.
- Chen, Ye, Jay J. Cheng, e Kurt S. Creamer. 2008. «Inhibition of Anaerobic Digestion Process: A Review». *Bioresource Technology* 99 (10): 4044–64. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.057>.
- Chen, Yun, Xie Jiang, Keke Xiao, Nan Shen, Raymond J. Zeng, e Yan Zhou. 2017. «Enhanced Volatile Fatty Acids (VFAs) Production in a Thermophilic Fermenter with Stepwise PH Increase – Investigation on Dissolved Organic Matter Transformation and Microbial Community Shift». *Water Research* 112 (aprile): 261–68. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.067>.
- Jackson-Moss, C A, e J R Duncan. 1990. «The Effect of Iron on Anaerobic Digestion». *Biotechnology Letters* 12 (2): 149–54. <https://doi.org/10.1007/BF01022433>.
- . 1991. «The Effect of Aluminium on Anaerobic Digestion». *Biotechnology Letters* 13 (2): 143–48. <https://doi.org/10.1007/BF01030466>.
- Jackson-Moss, C A, J R Duncan, e D R Cooper. 1989. «The Effect of Calcium on Anaerobic Digestion». *Biotechnology Letters* 11 (3): 219–24. <https://doi.org/10.1007/BF01026064>.
- Kougiass, Panagiotis G., e Irini Angelidaki. 2018. «Biogas and Its Opportunities—A Review». *Frontiers of Environmental Science & Engineering* 12 (3): 14. <https://doi.org/10.1007/s11783-018-1037-8>.
- Laiq Ur Rehman, Mian, Awais Iqbal, Chein-Chi Chang, Weizun Li, e Meiting Ju. 2019. «Anaerobic Digestion». *Water Environment Research* 91 (10): 1253–71. <https://doi.org/10.1002/wer.1219>.
- Lili, Mézes, Györgyi Biró, Erika Sulyok, Mihály Petis, János Borbély, e János Tamás. s.d. «NOVEL APPROACH ON THE BASIS OF FOS/TAC METHOD».
- Lyu, Zhe, Nana Shao, Taiwo Akinyemi, e William B. Whitman. 2018. «Methanogenesis». *Current Biology* 28 (13): R727–32. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.05.021>.
- Ma, Jingwei, Quan-Bao Zhao, Lieve L. M. Laurens, Eric E. Jarvis, Nick J. Nagle, Shulin Chen, e Craig S. Frear. 2015. «Mechanism, Kinetics and Microbiology of Inhibition Caused by Long-Chain Fatty Acids in Anaerobic Digestion of Algal Biomass». *Biotechnology for Biofuels* 8 (1): 141. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0322-z>.
- Matheri, Anthony Njuguna, Mohamed Belaid, e Jane Catherine Ngila. 2016. «The Role of Trace Elements on Anaerobic Co-Digestion in Biogas Production», 6.
- Muñoz, Raúl, Leslie Meier, Israel Diaz, e David Jeison. 2015. «A Review on the State-of-the-Art of Physical/Chemical and Biological Technologies for Biogas Upgrading».



- Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 14 (4): 727–59.  
<https://doi.org/10.1007/s11157-015-9379-1>.
- Nie, Erqi, Pinjing He, Hua Zhang, Liping Hao, Liming Shao, e Fan Lü. 2021. «How Does Temperature Regulate Anaerobic Digestion?» *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 150 (ottobre): 111453.  
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111453>.
- Rajagopal, Rajinikanth, Daniel I. Massé, e Gursharan Singh. 2013. «A Critical Review on Inhibition of Anaerobic Digestion Process by Excess Ammonia». *Bioresource Technology* 143 (settembre): 632–41.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.030>.
- Schnurer, Anna, e Asa Jarvis. 2010. «Microbiological handbook for biogas plants». *Swedish Waste Management U* 2009: 1–74.  
[https://www.offgridding.com/uploads/1/0/1/5/10150858/microbiologicalhandbook\\_biogas.pdf](https://www.offgridding.com/uploads/1/0/1/5/10150858/microbiologicalhandbook_biogas.pdf)