

POLITECNICO DI MILANO

Facoltà di Ingegneria Civile, Ambientale Territoriale

Corso di Laurea Specialistica in Ingegneria per l'Ambiente e il
Territorio



Valorizzazione del siero di latte: produzione di metano e idrogeno.

Relatore: Ing. Elena Ficara

Correlatore: Ing Aronne Teli

Tesi di: Daniela Basei
Matricola n°: 767274

Anno Accademico 2012-2013

SOMMARIO

ABSTRACT	15
OBIETTIVO DELL'ATTIVITA' SPERIMENTALE	17
1 STATO DELL'ARTE	19
1.1 SIERO DI LATTE E VALORIZZAZIONE	19
1.1.1 L'INDUSTRIA LATTIERO CASEARIA IN ITALIA	19
1.1.2 IL SIERO DI LATTE	20
1.1.2.1 CARATTERISTICHE CHIMICO-FISICHE	20
1.1.2.2 QUANTITA' PRODOTTE DAL SETTORE LATTIERO CASEARIO ITALIANO	23
1.1.2.3 TRATTAMENTI	23
1.2 DIGESTIONE ANAEROBICA	26
1.2.1 GENERALITA' SUL PROCESSO	26
1.2.2 FASI DEL PROCESSO DI DIGESTIONE ANAEROBICA	27
IDROLISI E ACIDIFICAZIONE	28
ACETOGENESI	28
METANOGENESI	29
1.2.3 BIOCHIMICA DEL PROCESSO	30
1.2.4 PARAMETRI DI STABILITA' DI PROCESSO	31
pH	32
TEMPERATURA	33
ALCALINITA'	34
ACIDI GRASSI VOLATILI (VFA)	35
PRODUZIONE E COMPOSIZIONE DI BIOGAS	35
TOSSICITA' DELL'AMBIENTE DI CRESCITA	36
1.2.5 PARAMETRI DI GESTIONE DEL REATTORE	37
1.2.6 TIPOLOGIA DI REATTORI	38
PROCESSI IN DISCONTINUO	38
PROCESSI IN CONTINUO	39
REATTORI A FLUSSO A PISTONE (PLUG-FLOW)	39
REATTORI COMPLETAMENTE MISCELATI (CSTR)	39
REATTORI AD ALTO CARICO	40
1.2.7 BMP DI SIERO DI LATTE	40
1.2.8 DIGESTIONE ANAEROBICA DI SIERO DI LATTE E REFLUI DELL'INDUSTRIA LATTIERO-CASEARIA	42
1.3 IDROGENO	44
1.3.1 CARATTERISTICHE GENERALI E ASPETTI DI SICUREZZA	44
1.3.2 PRODUZIONE DI IDROGENO	47
1.4 DARK FERMENTATION	49
1.4.1 BIOCHIMICA E TERMODINAMICA DI PROCESSO	49
1.4.2 DINAMICA DI PRODUZIONE	52
1.4.3 INOCULO	54
1.4.3.1 MICROBIOLOGIA	54
1.4.3.2 BATTERI CONSUMATORI DI IDROGENO E COMPETITORI METABOLICI	55
1.4.3.3 PRETRATTAMENTI	56
1.4.4 SUBSTRATO	61

1.4.4.1	CONCENTRAZIONE INIZIALE E CARICO ORGANICO	65
1.4.4.2	NUTRIENTI	66
1.4.4.3	TEMPERATURA	67
1.4.4.4	pH	71
1.4.5	PARAMETRI DI PROCESSO	77
1.4.5.1	HRT	77
1.4.6	RAPPORTO ALIMENTO/MICROORGANISMI (F/M) o CARICO del FANGO	77
1.4.7	PRODOTTI INIBENTI	78
1.4.8	TIPOLOGIE IMPIANTISTICHE	79
1.4.9	ESEMPI DI FERMENTAZIONE AL BUIO DI SIERO DI LATTE	84
1.4.10	ESEMPI DI FERMENTAZIONE AL BUIO SEGUITA DA DIGESTIONE ANAEROBICA	87

2 MATERIALI E METODI **89**

2.1 MATRICI E SOLUZIONI **89**

2.1.1	SIERO DI LATTE	89
2.1.2	FANGO DI INOCULO	89
2.1.2.1	DIGESTATO TAL QUALE	89
2.1.2.2	DIGESTATO PRETRATTATO TERMICAMENTE	90
2.1.2.3	CULTURE PURE	90
2.1.3	SOLUZIONI	90
	SOLUZIONE DI MACRO-NUTRIENTI	90
	SOLUZIONE TAMPONE	91
	ALIMENTO REATTORI	92

2.2 STRUMENTAZIONE **92**

2.2.1	AMPTS	92
2.2.2	BAGNOMARIA PER PRETRATTAMENTO DELL'INOCULO	94
2.2.3	REATTORI ALIMENTATI IN MODO SEMI-CONTINUO	96

2.3 DETERMINAZIONI ANALITICHE **98**

2.3.1	pH	98
2.3.2	SOLITI TOTALI E VOLATILI	98
2.3.3	SOLIDI SOSPESI TOTALI E VOLATILI	99
2.3.4	COD	99
2.3.5	AZOTO AMMONIACALE	100
2.3.6	AZOTO NITOSO	100
2.3.7	AZOTO NITRICO	100
2.3.8	AZOTO TOTALE	101
2.3.9	SOLFURI	101
2.3.10	ULTERIORI DETERMINAZIONI ANALITICHE	101
2.3.11	ALCALINITA'	103

2.4 CONDUZIONE DELLE PROVE **103**

2.4.1	CARATTERIZZAZIONE DEL SIERO DI LATTE	103
2.4.2	TEST DI PRODUZIONE POTENZIALE DI METANO (BMP)	104
	ALLESTIMENTO DELLA PROVA	104
	CONDUZIONE PROVA	105
	ANALISI FINALI	106
2.4.3	TEST DI POTENZIALE DI IDROGENO (BHP)	107
	ALLESTIMENTO DELLA PROVA	107
	CONDUZIONE PROVA	109

ANALISI FINALI	111
2.4.4 DIGESTIONE ANAEROBICA	112
ALLESTIMENTO PROVA	112
CONDUZIONE PROVA	112
ANALISI DI MONITORAGGIO	115
2.4.5 DARK FERMENTATION + DIGESTIONE ANAEROBICA	115
ALLESTIMENTO PROVA	115
CONDUZIONE PROVA	116
ANALISI INIZIALI E FINALI	118
2.4.6 ELABORAZIONE DEI DATI	119
2.4.6.1 DIGESTIONE ANAEROBICA	119
2.4.6.2 PROVE DI BHP	119
2.4.6.3 PROVA BHP+BMP	121
3 DISCUSSIONE DEI RISULTATI	123
3.1 CARATTERIZZAZIONE SIERO DI LATTE	123
ANALISI CHIMICHE FISICHE E BIOLOGICHE	123
BMP	124
3.2 CARATTERIZZAZIONE INOCULO	126
3.2.1 FANGO DI DIGESTIONE ANAEROBICA TAL QUALE.	126
3.2.2 FANGO DI DIGESTIONE ANAEROBICA PRE-TRATTATO TERMICAMENTE	127
3.3 RISULTATI DELLE PROVE DI BHP	127
3.3.1 ELABORAZIONE DEI RISULTATI SPERIMENTALI	128
3.3.2 RIPRODUCIBILITA' DI PROVA	133
3.3.3 EFFETTO DI DIFFERENTI SUBSTRATI	139
3.3.4 EFFETTO DI DIFFERENTI RAPPORTI F/M	145
3.3.5 INOCULO PT	150
3.3.6 INOCULO PURO	154
3.3.7 EFFETTO DI DIFFERENTI CONCENTRAZIONI DI MES	160
3.3.8 VFA	164
3.4 RISULTATI DELLA PROVA DI DIGESTIONE ANAEROBICA	170
3.5 DARK FERMENTATION SEGUITA DA DIGESTIONE ANAEROBICA	174
4 CONCLUSIONI	177
5 Bibliografia	181

INDICE DELLE FIGURE

Fig. 1 Diagramma complesso delle diverse fasi coinvolte nel processo di digestione anaerobica (Gujer e Zehnder, 1983 modificato).	28
Fig. 2 Andamento ottimale del pH durante il processo di digestione anaerobica, in funzione della fase di processo e di conseguenza dei prodotti ottenuti (Vismara, et al., 2011).	32
Fig. 3 Effetto della temperatura sulle cinetiche di degradazione anaerobica. Le righe tratteggiate indicano gli intervalli ottimali di lavoro, mentre le bande in grigio, gli intervalli in cui il processo non è ottimizzato (Bonomo, 2011).	33
Fig. 4 Risultati della prova di BMP con siero di latte	41
Fig. 5 Limiti di infiammabilità di idrogeno e metano in aria. Tali limiti sono influenzati in modo diretto dalla temperatura e in modo inverso dal contenuto di vapore d'acqua presente.	46
Fig. 6 Energia minima di accensione per miscele idrogeno-aria e metano-aria	46
Fig. 7 Produzione e distribuzione di idrogeno.	48
Fig. 8 Effetto della pressione parziale di idrogeno. (a) Ossidazione di NADH con produzione di idrogeno termodinamicamente favorevole solo quando la pressione parziale di idrogeno è inferiore a 60 Pa; (b) Pressione parziale di idrogeno maggiore, e formazioni di altri prodotti di fermentazione. Nelle reazioni (a) e (b): 1, metabolismo del glucosio attraverso reazione di glicolisi o Entner-Doudoroff; 2 decarbossilazione ossidativa del piruvato a piruvato:ferredossina ossido reduttasi; 3 formazione di idrogeno per idrogenasi; 4 fermentazione butirato. (Angenent, et al., 2004).	51
Fig. 9 Volume cumulato di biogas prodotto durante un generico processo di dark fermentation, rappresentato su assi logaritmici.	53
Fig. 10 Effetti del pretrattamento di fango di digestione anaerobica sulla produzione di idrogeno espressa in termini di moli di H ₂ prodotte per mole di glucosio consumata. (a) Wang et al. dopo 36h; concentrazione di glucosio 6.7 g/L; temperatura di 35°C; pH iniziale di 7; 177 mg SSV.; (b) Kan dopo 72h; concentrazione di glucosio 20 g/L; temperatura di 20°C; pH iniziale pari a 7; volume di inoculo di 30 mL. Tutte le produzioni di gas sono state riportate alle condizioni standard (0°C, 760 mm Hg).	58
Fig. 11 Confronto tra cinque sperimentazioni dell'andamento del pH finale in funzione del pH iniziale.	72
Fig. 12 Operazioni preliminari di gestione del digestato anaerobico prelevato a Peschiera Borromeo.	89
Fig. 13 AMPTS Bioprocess control; le lettere A,B,C indicano le rispettive unità di cui è composto lo strumento.	93
Fig. 14 Posizionamento delle ampole all'interno dello strumento precedentemente riempito con acqua deionizzata.	95
Fig. 15 Configurazione reattori oxitop.	97
Fig. 16 Allestimento della prova mediante AMPTS.	106
Fig. 17 Schema esemplificativo della procedura e delle analisi effettuate per una prova di BMP.	107
Fig. 18 Schema esemplificativo della procedura e delle analisi effettuate per una prova di BMP	111
Fig. 19 Schema esemplificativo della modalità di preparazione della prova sia per le bottiglie di prova sia per il bianco e delle analisi effettuate.	118
Fig. 20 Volume cumulato netto di metano prodotto dai due reattori alimentati con siero di latte deproteinizzato e concentrato.	125
Fig. 21 Portata di metano prodotto nell'unità di tempo.	126
Fig. 22 Volume cumulato di idrogeno nel tempo, e la portata di produzione nel tempo.	129
Fig. 23 Volume cumulato di idrogeno nel tempo (a) e tasso di produzione di idrogeno nel tempo (b).	135
Fig. 24 Massimo HPR in funzione della prova. La linea rossa tratteggiata indica il valore medio calcolato impiegando tutti i valori di HPR, le linee viola indicano invece il valore minimo e massimo del parametro.	136
Fig. 25 Tempo di ritardo iniziale di ciascuna prova, in funzione del tipo di inoculo e pretrattamento termico effettuato sull'inoculo. Le etichette riportano il numero di prova.	136
Fig. 26 pH finale di prova. La linea rossa tratteggiata indica il pH finale medio calcolato come valor medio di tutte le prove (da 1 a 7)(a); variazione di pH per ogni prova (b).	137

Fig. 27 Massimo volume di idrogeno prodotto in funzione della prova (a); Massimo BHP percentuale in funzione della prova (b). In entrambi i casi la linea tratteggiata rossa indica il valore medio dei parametri indagati. La media è stata calcolata escludendo la prova numero 11. _____	138
Fig. 28 Volume cumulato di idrogeno nel tempo (a,c,e) e portata di idrogeno prodotto nel tempo (b, d, f). In ogni grafico, la curva blu rappresenta i reattori alimentati con lattosio (L), mentre quella rossa i reattori alimentati con siero (S). Per ogni grafico è riportato il rapporto F/M adottato. _____	140
Fig. 29 Variazione del pH durante il corso della prova in funzione del substrato e del rapporto F/M (a); pH finale di prova in funzione del substrato e del rapporto F/M (b). _____	141
Fig. 30 Ritardo iniziale in funzione del substrato e del rapporto F/M (a); Durata complessiva della prova in funzione di substrato e rapporto F/M (b). _____	143
Fig. 31 Massimo volume cumulato di idrogeno in funzione di substrato e rapporto F/M (a); Massima portata di idrogeno prodotto in funzione di substrato e rapporto F/M (b). _____	144
Fig. 32 Massimo BHP percentuale in funzione del substrato e del rapporto F/M. _____	144
Fig. 33 Massimo BHP percentuale in funzione del rapporto F/M applicato, del tipo di substrato e della concentrazione della soluzione di MES. _____	146
Fig. 34 Durata delle prove in funzione del rapporto F/M (a); Ritardo iniziale in funzione del rapporto F/M (b). _____	147
Fig. 35 Variazione percentuale del pH in funzione del rapporto F/M (a); pH finale in funzione del rapporto F/M (b). _____	148
Fig. 36 Degradazione percentuale del COD in funzione del rapporto F/M (a); Variazione percentuale degli SV totali misurati in funzione del rapporto F/M (b). _____	149
Fig. 37 Massimo BHP percentuale in funzione di F/M e dell'inoculo impiegato. _____	151
Fig. 38 Massimo BHP percentuale in funzione della variazione di pH (a) e del pH finale (b). Le etichette associate alle serie riportano il rapporto F/M. Le prove considerate sono state alimentate unicamente con lattosio. _____	152
Fig. 39 Ritardo iniziale in funzione del rapporto F/M e del tipo di inoculo (a); Durata di prova in funzione del rapporto F/M e del tipo di inoculo (b). _____	153
Fig. 40 Rateo massimo in funzione del rapporto F/M applicato e dell'inoculo impiegato, per le sole prove con lattosio. _____	154
Fig. 41 Volume cumulato di idrogeno prodotto nel tempo per prove con inoculo misto e puro. _____	156
Fig. 42 Massimo BHP percentuale in funzione del tipo di coltura (a); Massimo HPR in funzione del tipo di coltura (b). _____	157
Fig. 43 pH finale di prova in funzione della prova e del tipo di coltura. _____	159
Fig. 44 Massimo BHP percentuale in funzione del rapporto F/M e della concentrazione di MES. Le etichette di ciascuna serie indicano il numero della sperimentazione di laboratorio, e non corrispondono al numero identificativo di prova. Etichette con lo stesso numero indicano prove che sono state effettuate contemporaneamente. _____	160
Fig. 45 pH finale di prova in funzione del rapporto F/M e della concentrazione della soluzione di MES addizionata. _____	161
Fig. 46 Massimo BHP% in funzione del rapporto tra le concentrazioni di lattosio e MES addizionati al sistema. _____	163
Fig. 47 Durata e ritardo iniziale di prova in funzione del rapporto F/M e della concentrazione di MES addizionata (a,b). _____	164
Fig. 48 Massimo BHP% in funzione del rapporto Bu/Ac, e del rapporto F/M. _____	168
Fig. 49 Concentrazione dei prodotti solubili e VFA a fine prova in relazione al massimo BHP. _____	169
Fig. 50 Sovrappressione netta misurata nei due reattori (R1 e R2) in seguito all'alimentazione effettuata il 22-esimo giorno di prova. _____	171
Fig. 51 Sovrappressione generata dai due reattori in due intervalli temporali successivi, in particolare a seguito dall'alimentazione associata ai giorni 14 e 22. _____	171
Fig. 52 I grafici rappresentano l'andamento nel tempo di: pH (a), concentrazione di SV(b), alcalinità totale (c) e concentrazione di COD solubile in uscita (d). _____	172
Fig. 53 Resa di metanizzazione in funzione del giorno di prova. _____	173
Fig. 54 Volume cumulato di idrogeno e portata di idrogeno prodotta nel tempo. Il grafico a fa riferimento alla prova 23 mentre il grafico b alla prova 25. _____	175
Fig. 55 Volume cumulato di metano netto e portata di produzione nel tempo per le prove 23 (a) e 25 (b). _____	176

Fig. 56 Il grafico riporta il volume cumulato di idrogeno per unità di tempo misurato nel corso delle singole prove dallo strumento AMPTS. Le prove 1 e 2 non sono riportate poiché sono state alimentate con alimentazioni impulsive e hanno dato andamenti di produzione anomali. _____ 190

Fig. 57 Il grafico riporta il volume cumulato di idrogeno misurato nel corso delle singole prove dallo strumento AMPTS. Le prove 1 e 2 non sono riportate poiché sono state alimentate con alimentazioni impulsive e hanno dato andamenti di produzione anomali. _____ 190

INDICE DELLE TABELLE

Tab. 1 Caratteristiche chimiche del siero di latte intero non scremato presenti in letteratura (Ercoli, et al.).	22
Tab. 2. Processo di digestione anaerobica della molecola di glucosio. Sono riportati i substrati e i prodotti di ogni fase, con la rispettiva equazione chimica (IWA, 2002).	31
Tab. 3 Esempi di digestione anaerobica di siero di latte (CW) e siero diluito (CW diluito). UASB: up-flow anaerobic sludge blanket; CP: contact process; TSMAMD: two-stage mixed anaerobic membrane digester; UAF: up-flow anaerobic filter (Prazeres, et al., 2012)	43
Tab. 4 Proprietà di idrogeno, metano e benzina.NBP: punto normale di ebollizione; NTP: 1 atm e 20°C; (*) a 1 atm e 0°C.	45
Tab. 5 Effetto del pH finale sulla produzione di idrogeno (Kan, 2012) (Wang, et al., 2008).	59
Tab. 6 Produzione di idrogeno da rifiuti e biomasse derivanti dall'attività agricola in modalità batch (Guo, et al., 2010).I margini tratteggiati, fanno riferimento a una stessa prova sperimentale condotta in condizioni differenti.	62
Tab. 7 Produzione di idrogeno da rifiuti e biomasse derivanti dall'allevamento di bestiame (Guo, et al., 2010).I margini tratteggiati, fanno riferimento a una stessa prova sperimentale condotta in condizioni differenti.	63
Tab. 8 Produzione di idrogeno da rifiuti e biomasse derivanti dall'industria alimentare (Guo, et al., 2010).I margini tratteggiati, fanno riferimento a una stessa prova sperimentale condotta in condizioni differenti.	64
Tab. 9 Concentrazione di nutrienti e substrato in termini di esosi [mg/L], e rapporto tra COD e azoto e fosforo in sei studi con produzione continua di idrogeno a partire da culture miste (Hawakes, et al., 2006).	66
Tab. 10 Effetto della temperatura sulla fermentazione al buio. ΔT : intervallo sperimentato; T_{ott} : temperatura ottimale osservata; HY: resa di produzione (Jianlong Wang, 2009).	69
Tab. 11 Resa potenziale di idrogeno (HY) e durata della produzione in funzione di pH iniziale e concentrazione del substrato (Effects of pH value and substrate concentration on hydrogen production from the anaerobic fermentation of glucose., 2008).	73
Tab. 12 Tabella riassuntiva delle sperimentazioni condotte per determinare il pH ottimale di prova rispetto alla resa di produzione di idrogeno.	76
Tab. 14 Esempi di studi condotti in continuo con differenti reattori .S in: concentrazione di substrato alimentato; B in: concentrazione di biomassa in ingresso; DS: degradazione percentuale del substrato;FA: fango anaerobico,CM: cultura batterica mista	80
Tab. 14 Tabella riassuntiva delle sperimentazioni di dark fermentation condotte utilizzando siero di latte come substrato. CW: siero di latte, CWD: siero di latte diluito, CWP: siero di latte in polvere; CWCP: siero di latte concentrato in polvere; %DS: percentuale di degradazione del substrato.	85
Tab. 15 Tabella riassuntiva dei risultati dei principali test BHP e BMP. a: g COD/g glucosio; b: L/g SV; c: mol/mol glucosio; d: glucosio+peptone+estratto di lievito (Giordano, et al., 2011).	87
Tab. 16 Soluzione di macronutrienti UNI EN ISO 11734:2004 modificata. (*) : Dovrebbe essere utilizzato solfuro di sodio fornito di recente, oppure prima dell'utilizzo si dovrebbe lavarlo ed essiccarlo, per assicurarne sufficiente capacità riduttiva.	90
Tab. 17 Ulteriori determinazioni analitiche effettuate presso il laboratorio di Ingegneria Ambientale.	102
Tab. 18 Condizioni impiegate nelle porve di BHP..	108
Tab. 19 Parametri operativi ottimali in condizioni di regime del sistema;i valori di temperatura e pH sono quelli impostati a inizio prova.	112
Tab. 20 Piano di carico per entrambi i reattori OxiTop. Alimento costituito da una soluzione di lattosio di concentrazione definita in tabella, e nutrienti.	114
Tab. 21 La tabella riporta il nome dell'elemento di cui è stata misurata la concentrazione, l'unità di misura e il valore. n.r.: parametro non rilevato.	123
Tab. 22 Prova di stabilità del siero di latte alla temperatura di 4°C. I dati di concentrazione dei VFA totali sono stati misurati presso il laboratorio DICA.	124
Tab. 23 Caratteristiche del fango di digestione anaerobica prelevato a Peschiera Borromeo. Le lettere A,B,C contraddistinguono tre differenti prelievi.	126

<i>Tab. 24</i> Caratteristiche del fango tal quale A,B,C per ogni pretrattamento termico eseguito; i parametri sono stati misurati a fine trattamento. PT: pretrattamento termico; n.d: non disponibile. _____	127
<i>Tab. 25</i> Caratteristiche della prova numero 12. _____	128
<i>Tab. 26</i> Parametri significativi delle prove di BHP. _____	129
<i>Tab. 27</i> Risultati ottenuti dall'elaborazione dei dati sperimentali. _____	131
<i>Tab. 28</i> Concentrazione di VFA e prodotti solubili sulla miscela a fine prova. n.r: non rilevato. _____	132
<i>Tab. 29</i> Statistiche dei parametri misurati per le 7 prove. Max: massimo; Min: minimo; Range: differenza tra valore massimo e minimo; Media: è la media dei parametri di tutte le prove; Dev.st: deviazione standard. _____	133
<i>Tab. 30</i> Statistiche dei parametri calcolati. _____	134
<i>Tab. 32</i> Statistiche dei parametri misurati in funzione del tipo di coltura impiegata. _____	155
<i>Tab. 33</i> Statistiche dei parametri calcolati in funzione della coltura impiegata. _____	156
<i>Tab. 34</i> ID di prova e corrispondente concentrazione della soluzione di MES. _____	160
<i>Tab. 34</i> Concentrazione dei prodotti solubili e di alcuni VFA rilevati al termine delle prove. n.r: non rilevato. _____	165
<i>Tab. 35</i> Errore percentuale sulla concentrazione di COD a fine prova. _____	165
<i>Tab. 36</i> Errore percentuale sul bilancio di massa di COD in ingresso al sistema e in uscita. _____	166
<i>Tab. 37</i> Elaborazione dei dati di concentrazione di VFA e prodotti solubili a fine prova. Rapporto tra le concentrazioni di acido butirrico e acido acetico; degradazione percentuale del lattosio alimentato; percentuale di un VFA specifico rispetto alla concentrazione molare di VFA totale. _____	167
<i>Tab. 38</i> Media e deviazione standard dei parametri misurati. _____	174
<i>Tab. 40</i> Media e deviazione standard dei parametri calcolati. _____	174
<i>Tab. 40</i> Statistiche dei parametri misurati e calcolati per la prova di digestione anaerobica. _____	175
<i>Tab. 42</i> Caratteristiche di prova delle sperimentazioni di BHP _____	187
<i>Tab. 43</i> Parametri misurati _____	188
<i>Tab. 44</i> Parametri calcolati _____	189
<i>Tab. 45</i> Caratteristiche alimento, volume prelevato e alimentato, concentrazione dell'alimento e concentrazione finale in bottiglia. _____	191
<i>Tab. 46</i> Parametri misurati nel corso della prova. _____	192
<i>Tab. 47</i> Resa di metanizzazione _____	193

ABSTRACT

Il siero di latte è il refluo principale derivante dall'attività lattiero casearia. Le caratteristiche di contaminazione organica e inorganica di tale substrato fanno sì che sia necessario un trattamento di depurazione adeguato.

Infatti lo sversamento di siero può determinare problemi di eutrofizzazione dovuto all'alto carico di azoto e fosforo contenuto, eccessivo consumo di ossigeno, tossicità, etc. nell'ambiente ricevente.

La crescente e continua richiesta di approvvigionamento energetico richiede lo sviluppo di sistemi di produzione di energia basati sullo sfruttamento di fonti energetiche rinnovabili, in alternativa ai combustibili fossili di uso comune e in via di esaurimento.

Il siero di latte, in questi termini, può essere considerato quindi una risorsa, e può essere impiegato come substrato in processi di digestione anaerobica e dark fermentation.

L'attività sperimentale svolta, ha indagato l'applicabilità di tali processi a scala di laboratorio.

Per quanto riguarda il processo di digestione anaerobica, si è avviato un sistema in modalità semi-batch, alimentato con una soluzione di lattosio puro e macro-nutrienti, impiegando come inoculo del fango di digestione anaerobica proveniente da un impianto civile.

L'obiettivo di tale prova è stato quello di avviare il processo e portarlo allo stato di regime alimentando soluzioni di substrato di concentrazione crescente fino a una concentrazione finale di 40 gCOD/L con HRT di 30giorni, per studiarne l'andamento in termini di produzione di metano. Tale prova è stata però fallimentare a seguito di un sovraccarico del sistema da parte del substrato, con conseguente accumulo di VFA e inibizione della biomassa.

Per il processo di dark fermentation l'obiettivo principale è stato quello di determinare la concentrazione di substrato ottimale e di conseguenza il rapporto F/M che permetteva di ottenere la massima produzione di idrogeno in termini di potenziale biochimico di idrogeno (BHP). Il rapporto F/M applicato è stato fatto variare tra 0.3 e 9.4 gCOD/gSV.

Per le prove si è utilizzato sia un inoculo con colture batteriche pure sia con colture miste, in particolare si è utilizzato del digestato di origine civile pretrattato termicamente. I substrati impiegati sono stati siero di latte e lattosio. I reattori utilizzati sono stati reattori batch completamente miscelati e la temperatura di prova è stata di 35°C.

Contestualmente si è indagato sulla riproducibilità del metodo sperimentale, sull'utilizzo di differenti substrati confrontando lattosio e siero di latte, sull'utilizzo di una soluzione tampone di MES e sulla sua concentrazione. Si è poi verificato l'effetto di ogni aspetto, sul processo fermentativo, in termini di BHP, massimo rateo di produzione, durata, ritardo iniziale, pH, concentrazione di COD e VFA.

Il processo risulta essere applicabile a scala di laboratorio e consente di ottenere buoni risultati in termini di BHP, in particolare si sono ottenuti valori di BHP compresi tra 6% e 92% in funzione dei parametri di processo.

OBIETTIVO DELL'ATTIVITA' SPERIMENTALE

L'attività sperimentale si compone di più parti: caratterizzazione di siero di latte, digestione anaerobica, dark fermentation e il processo di dark fermentation seguito da digestione anaerobica.

Per quanto riguarda il siero di latte, l'obiettivo è stato quello di effettuare una caratterizzazione chimico fisico e biologica.

Per il processo di digestione anaerobica, lo scopo della sperimentazione è stato quello di implementare una configurazione reattoristica costituita da reattore biologico, trappola di soda e punto di misura del biogas prodotto utilizzando dei reattori OxiTop, e verificarne la fattibilità e la riproducibilità. In seguito tali reattori sono stati impiegati per l'avvio di un processo di digestione anaerobica.

L'obiettivo era quello di far acclimatare la biomassa anaerobica e farla crescere in modo graduale alimentando il substrato (una soluzione di lattosio) di concentrazione crescente sino a una concentrazione finale di 4gCOD/L, e verificare il comportamento del sistema nella fase transitoria e a regime, analizzando pH, alcalinità, ST,SV, concentrazione di COD e volume di metano prodotto.

Per quanto riguarda il processo di dark fermentation ci si è posti come obiettivo, quello di confrontare differenti rapporti F/M (da 0.3 gCOD/gSV a 9.4 gCOD/gSV) in modo da determinare il rapporto ottimale che permette di ottenere il massimo BHP percentuale, e le condizioni di processo e gestione affinché ciò avvenga. Contestualmente si sono confrontati più substrati e si è utilizzata una soluzione tampone di MES in diverse concentrazioni, al fine di definire gli effetti che tali aspetti hanno sul processo fermentativo e sulle rese di produzione.

Infine sono effettuate delle prove con dark fermentation seguita da digestione anaerobica per determinare l'applicabilità dei due processi in serie e le rese di produzione di idrogeno e metano potenzialmente producibili.

1 STATO DELL'ARTE

1.1 SIERO DI LATTE E VALORIZZAZIONE

1.1.1 L'INDUSTRIA LATTIERO CASEARIA IN ITALIA

L'industria lattiero-casearia è articolata nella produzione di latte pastorizzato e sterile, burro, crema, lattici fermentati, condensati e concentrati e formaggi (freschi, stagionati, cotti, ecc.).

Circa il 60% del latte prodotto in Italia viene destinato alla trasformazione in prodotti caseari. Questo comparto produttivo è chiaramente differenziato tra media e grande industria da un lato, e caseifici cooperativi a dimensione artigianale e residue piccole unità annesse alle aziende agrarie dall'altro. La maggior parte delle medie e grandi industrie operano nel comparto del latte alimentare e in quello della produzione dei formaggi freschi di largo consumo, mentre le imprese di piccole dimensioni e le aziende cooperative sono prevalentemente dedite alla produzione di formaggi duri o semiduri tipici e di qualità (come parmigiano reggiano, grana, provolone).

L'Italia occupa una posizione preminente nel panorama mondiale della produzione di latte vaccino contribuendo da sola, con una produzione pari a 11.305.601 t (92.4% della produzione totale di latte) a circa il 10% della produzione della Unione Europea che copre, a sua volta, oltre il 22% della produzione mondiale. A questa ricchezza produttiva si deve aggiungere il latte di altre specie lattifere, quali ovini (660.453 t pari al 5.4% del totale), caprini (120.790 t pari all'1% del totale) e bufalini (150.500 t pari all'1.2% del totale) che hanno un notevole peso nel contesto produttivo italiano.

Per quello che riguarda i formaggi, invece, la produzione europea rappresenta il 45% circa della produzione mondiale. L'Italia, dal canto suo, si colloca al 5° posto con il 6% della produzione totale dopo USA, ex URSS, Francia e Germania (Ercoli, et al.)

Alla produzione di yogurt, formaggio fresco, formaggio stagionato, burro, gelato, etc è associata la generazione di effluenti con caratteristiche diverse, in funzione del prodotto ottenuto e della tipologia di lavorazione del latte adottata.

In generale, i reflui derivanti dall'attività lattiero casearia presentano un alto carico organico dato dalla presenza di carboidrati e proteine del latte, come lattosio e caseina, il quale viene monitorato mediante Domanda Biologica di Ossigeno(BOD) e Domanda Chimica di Ossigeno (COD), quest'ultimo parametro varia tra 0.1-100 kg·m⁻³. La biodegradabilità degli effluenti viene definito mediante un indice, espresso come il rapporto tra BOD₅ e COD, ed è compreso tra 0.4 e 0.8.

Inoltre, grassi (0.1-10.6 kg·m⁻³), solidi sospesi (0.1-22 kg·m⁻³) e nutrienti (azoto e fosforo) contribuiscono a incrementare il grado di contaminazione di tali effluenti. Per questo motivo, non è possibile smaltirli senza un opportuno trattamento senza arrecare danno all'ambiente ricevente (Prazeres, et al., 2012).

Il capitolo seguente si focalizza su un effluente specifico, il siero di latte, descrivendone la modalità di produzione, le caratteristiche chimico-fisiche e le quantità prodotte sul territorio italiano.

1.1.2 IL SIERO DI LATTE

1.1.2.1 CARATTERISTICHE CHIMICO-FISICHE

Il siero di latte è un liquido di colore giallo verde, piuttosto torbido, che rimane nella caldaia in seguito alla separazione solido liquido della cagliata, ossia il processo di precipitazione e rimozione della caseina del latte per la produzione di formaggio. Esso contiene, quindi, tutti gli elementi solubili del latte che non hanno partecipato direttamente alla coagulazione, quali, lattosio, sieroproteine, sali solubili e grassi.

Relativamente alla sua composizione, essa varia in funzione di diversi fattori, quali la specie allevata, l'alimentazione di questa, la razza, la stagione di produzione del latte, la fase di lattazione, il tipo di formaggio nonché la tipologia di lavorazione utilizzata per produrlo (Tab. 1).

A seconda della tecnologia adottata, il siero prodotto può risultare dolce (cioè a bassa acidità) con pH > 5.6, oppure acido con pH < 5.1; nel nostro Paese la stragrande maggioranza di siero prodotto è di tipo dolce, ma questo va spontaneamente incontro ad una rapida acidificazione per azione dei batteri lattici e raggiunge in ogni caso, nel giro di poche ore, valori di pH inferiori a 4.

Il peso specifico del siero è di circa 1,025-1,030 a 15°C (Ercoli, et al.).

Tab. 1 Caratteristiche chimiche del siero di latte intero non scremato presenti in letteratura (Ercoli, et al.).

Componente		Fonte bibliografica					
		<i>Mucchetti, 2001</i>	<i>Sciancalepore, 1998</i>	<i>Corradini, 1995</i>	<i>Robbins et al., 1996</i>	<i>Radford et al., 1986</i>	<i>Sharratt et al., 1959</i>
Residuo secco	%	6-7	6,3-6,5	6,83-7,82	8,0	5,87	-
Grassi	%	0,2-10,0	0,4-0,5	0,15-0,7	-	-	-
Azoto totale	mg/kg	1065-1460	7000-8000	-	900-2200	1400	1200-1500
Azoto proteico	mg/kg	-	-	8200-9000	-	-	-
di cui:							
Sieroproteine	mg/kg	5000-7000	-	-	-	-	-
Azoto non proteico (Nx6,38)	mg/kg	1800-2300	-	-	-	-	-
Lattosio	g/kg	38,2-46,6	42-48	43-55,3	-	39,4	-
Acido lattico	mg/kg	100-12000	1000-4000	-	-	-	-
Sali minerali	mg/kg	4500-7500	7000-8000	-	-	-	-
Fosforo	mg/kg	600-950	-	400-700	300-600	390	400-500
Sodio	mg/kg	600-700	-	-	360-1900	560	280-800
Cloruri	mg/kg	1100-1300	-	-	-	-	-
Calcio	mg/kg	480-1400	-	400-900	430-1100	470	300-350
Ferro	mg/kg	0,05-0,09	-	-	-	-	-
Piombo	mg/kg	0,08-0,12	-	-	-	-	-
Rame	mg/kg	0,17-0,33	-	-	-	-	-
Iodio	mg/kg	0,4-0,5	-	-	-	-	-
Potassio	mg/kg	-	-	-	100-1400	1480	1600-1800
Magnesio	mg/kg	-	-	-	90-120	90	50-60
Ceneri	mg/kg	-	-	5000-19600	-	8100	-

E' da evidenziare, inoltre, come la composizione del siero presenti ampie variazioni in conseguenza della tecnologia di caseificazione impiegata, in particolare le variazioni sono da imputare al sistema impiegato per la coagulazione della caseina e dal livello raggiunto dalla fermentazione del lattosio.

Il tenore di calcio e fosforo nel siero dipende, ad esempio, dal tipo di coagulazione del latte. Il processo di caseificazione influenza anche il tenore di grasso e di acido lattico; inoltre il siero sarà più ricco di questi elementi se proveniente da lavorazioni da latte intero, specialmente se a cottura molto spinta.

La maggior parte del lattosio contenuto nel latte, circa 39-60 kg/m³, rimane all'interno del siero, costituendo la frazione organica principale (dall'80 al 90%). La concentrazione di grassi e proteine varia

rispettivamente tra 0.99-10.58 kg/m³ e 1.4-8.0 kg/m³. BOD e COD hanno valori compresi tra 27-60 kg/m³ e tra 50-102 kg/m³. L'indice di biodegradabilità (BOD₅/COD) risulta essere superiore a 0.5.

La contaminazione inorganica del siero è attribuibile alla presenza di sali minerali (0.46-10%), principalmente NaCl, KCl e sali di sodio. Tali sali vengono addizionati durante il processo di produzione di formaggio.

Inoltre, si hanno significative quantità di altri componenti, quali: acido citrico, urea, acido urico, vitamine del gruppo B, β-Lactoglobulina, α-Lactoglobulina, immunoglobulina, albumina e lactoferrina.

Le caratteristiche di contaminazione organica e inorganica del substrato fanno sì che sia necessario un trattamento di depurazione adeguato. Lo sversamento di siero può determinare problemi di eutrofizzazione dovuto all'alto carico di azoto e fosforo contenuto, eccessivo consumo di ossigeno, tossicità, etc. nell'ambiente ricevente. (Prazeres, et al., 2012).

Tuttavia, attualmente si sta cercando di valorizzare questo sottoprodotto, in quanto risulta essere utilizzabile nell'alimentazione animale, nel settore alimentare, nel settore farmaceutico e nel settore energetico.

1.1.2.2 QUANTITA' PRODOTTE DAL SETTORE LATTIERO CASEARIO ITALIANO

Le quantità di siero prodotte sono strettamente legate al quantitativo di latte lavorato e alla sua resa in formaggio.

In particolare, il rapporto ANPA relativo allo studio di settore sui rifiuti del comparto agroalimentare, ha concluso che il fattore di produzione di siero risulta essere di 5.9 chilogrammi di siero per tonnellata di formaggio prodotto.

Il quantitativo totale di siero ottenuto, considerando una quantità di prodotto principale pari a 1.023.811 t/a, è stato, pertanto, stimato in circa 6.092.000 t/a. L'ISTAT valuta in 362.000 t/a la quantità di questo sottoprodotto inviata alla lavorazione della ricotta. Precedenti stime, condotte nel corso della predisposizione del "Primo Rapporto sui Rifiuti Speciali ANPA/ONR" hanno permesso di quantificare in circa 2.000.000 t/a le quantità di siero avviate alla produzione di lattosio e siero in polvere.

Conseguentemente, i quantitativi di questo sottoprodotto destinati alla zootecnia e allo smaltimento ammontano approssimativamente a 3.730.000 t/a che salgono a circa 4.075.000 t/a includendo la scotta (residuo della lavorazione della ricotta).

1.1.2.3 TRATTAMENTI

In passato, la maggior parte degli effluenti dell'industria casearia veniva sversata direttamente in corsi d'acqua, senza effettuare alcun tipo di pretrattamento. Altre soluzioni meno critiche dal punto di vista

ambientale, prevedevano la costruzione di bacini di stoccaggio per un trattamento di lagunaggio, o lo scarico in fognatura, con conseguente trattamento da parte degli impianti di tipo civile, o ancora l'utilizzo come alimento per animali.

E' inoltre possibile utilizzare il siero di latte come fertilizzante agricolo, grazie alla presenza di sali minerali, sostanza organica e nutrienti quali: fosforo, calcio, sodio, azoto, potassio, magnesio, etc.

Possono però insorgere dei problemi a seguito dell'elevato contenuto di solidi sospesi e della salinità del siero. In particolare, i solidi sospesi tendono a depositarsi sulla superficie del terreno, determinandone un calo della permeabilità. Un'eccessiva salinità, invece, riduce la disponibilità di acqua alle piante; e ciò ha effetti sulla crescita della pianta stessa e sulla sua produzione di frutta e verdura. Inoltre, questo comporta un incremento della conducibilità del terreno che a sua volta porta alla diminuzione dell'aerazione e dell'infiltrazione di acqua.

Per questi motivi, è bene diluire il siero prima di utilizzarlo come fertilizzante, in modo da ottenere una concentrazione di sali totali compresa tra 40 e 60 kg ha⁻¹, e prestare attenzione affinché l'acqua di irrigazione non raggiunga la falda sotterranea.

Attualmente il siero viene prevalentemente trattato. E' possibile considerare tre differenti opzioni di gestione e/o smaltito:

1. Applicazione di tecnologie di valorizzazione degli effluenti;
2. Trattamenti biologici aerobici e anaerobici;
3. Trattamenti chimico-fisici.

La prima possibilità, prevede l'impiego di tecnologie che permettano di concentrare e recuperare alcuni componenti di pregio, quali lattosio e proteine. Ogni litro di siero, contiene infatti da 5 a 10 g di proteine, e da 40 a 50 g di lattosio. Attualmente, i processi di valorizzazione costituiscono l'opzione principale di trattamento, devono però essere seguiti da un successivo trattamento per lo smaltimento degli effluenti.

In secondo luogo è possibile effettuare dei trattamenti biologici. Tali trattamenti possono anche essere utilizzati per la valorizzazione del substrato, ad esempio, l'idrolisi di lattosio e proteine, permette di ottenere rispettivamente gli zuccheri monosaccaridi del lattosio (glucosio e galattosio), peptidi e amminoacidi.

Oppure, il processo di fermentazione controllata, può essere adoperato per la produzione di acido lattico, acido butirrico, butanolo, acido acetico, glicerolo, acetone, etanolo, idrogeno, metano, etc.

La terza scelta prevede il ricorso a metodi di trattamento chimico-fisici, come, coagulazione, flocculazione, ozonizzazione, precipitazione, ossidazione elettrochimica, etc. Tali trattamenti possono essere eventualmente combinati ai precedenti.

Il trattamento ottimale da adottare dipende principalmente dalle caratteristiche della matrice, dalla quantità, dalle tecnologie a disposizione e dall'efficienza di rimozione necessaria per rispettare i limiti di legge. Inoltre, alle tecnologie di valorizzazione sono associati costi piuttosto elevati, che non sono tollerabili dalle piccole e medie imprese (Prazeres, et al., 2012).

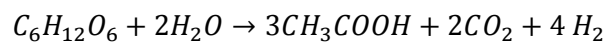
1.2 DIGESTIONE ANAEROBICA

1.2.1 GENERALITA' SUL PROCESSO

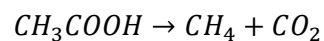
La degradazione biologica della sostanza organica in condizione di anaerobiosi (in assenza, cioè, di ossigeno molecolare, come O_2 , o legato ad altri elementi, come nel caso dell'azoto nitrico, NO_3^-), determina la formazione di diversi prodotti, i più abbondanti dei quali sono due gas: il metano ed il biossido di carbonio. Essa coinvolge diversi gruppi microbici interagenti tra loro: i batteri idrolitici, i batteri acidificanti (acetogeni ed omoacetogeni) ed, infine, i batteri metanigeni. Tali batteri occupano quindi la posizione finale della catena trofica anaerobica.

Il metano, poco solubile in acqua, passa in fase gassosa, mentre la CO_2 si ripartisce tra la fase gassosa e la fase liquida.

Un tipico esempio di degradazione anaerobica di un substrato organico puro è rappresentato dalla digestione anaerobica del glucosio. In questo caso si ha un primo passaggio in cui il glucosio viene convertito ad acido acetico (Eq. 1) ed un successivo in cui l'acido acetico viene ulteriormente degradato a metano e biossido di carbonio (Eq. 2):



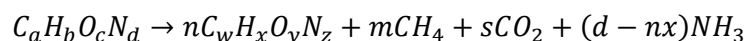
(Eq. 1)



(Eq. 2)

Qualora si considerino substrati organici più complessi si possono ottenere ulteriori prodotti del processo degradativo anaerobico e, tra quelli di maggior rilievo, troviamo l'ammoniaca che deriva dalla demolizione delle proteine.

Ad esempio, nel caso della stabilizzazione anaerobica di una matrice con formula bruta $C_aH_bO_cN_d$, la relazione stechiometrica complessiva può essere rappresentata dalla relazione (Eq. 3):



(Eq. 3)

Con:

$$s = a - nw - m$$

$$r = c - ny - 2s$$

Come si può vedere dalla relazione riportata si ha la parziale distruzione di materiale organico complesso con formazione di metano, biossido di carbonio, acqua ed ammoniaca (F. Cecchi, et al., 2005).

L'attività biologica anaerobica è stata evidenziata in un ampio intervallo di temperatura: tra - 5 e + 70 °C. Esistono, tuttavia, differenti specie di microrganismi classificabili in base all'intervallo termico ottimale di crescita: psicrofili (temperature inferiori a 20 °C), mesofili (temperature comprese tra i 20 °C ed i 40 °C) e termofili (temperature superiori ai 45°C).

1.2.2 FASI DEL PROCESSO DI DIGESTIONE ANAEROBICA

La conversione di substrati organici complessi in metano avviene, come accennato, attraverso una catena trofica anaerobica. Ad essa partecipano almeno tre gruppi metabolici distinti di microrganismi che si differenziano sia per i substrati che per i prodotti del loro metabolismo.

Il processo biodegradativo si compone delle seguenti fasi: una prima fase di idrolisi dei substrati complessi accompagnata da acidificazione con formazione di acidi grassi volatili, chetoni ed alcoli; una successiva fase acetogenica, in cui, a partire dagli acidi grassi, si ha la formazione di acido acetico, acido formico, biossido di carbonio ed idrogeno molecolare, ed, infine, un'ultima fase in cui, a partire dai prodotti della fase precedente, si osserva la metanizzazione, cioè la formazione di metano a partire dall'acido acetico o attraverso la riduzione del biossido di carbonio utilizzando l'idrogeno come co-substrato. In minor misura si ha la formazione di metano a partire dall'acido formico.

L'intero processo biologico è schematizzato nella figura Fig. 1.

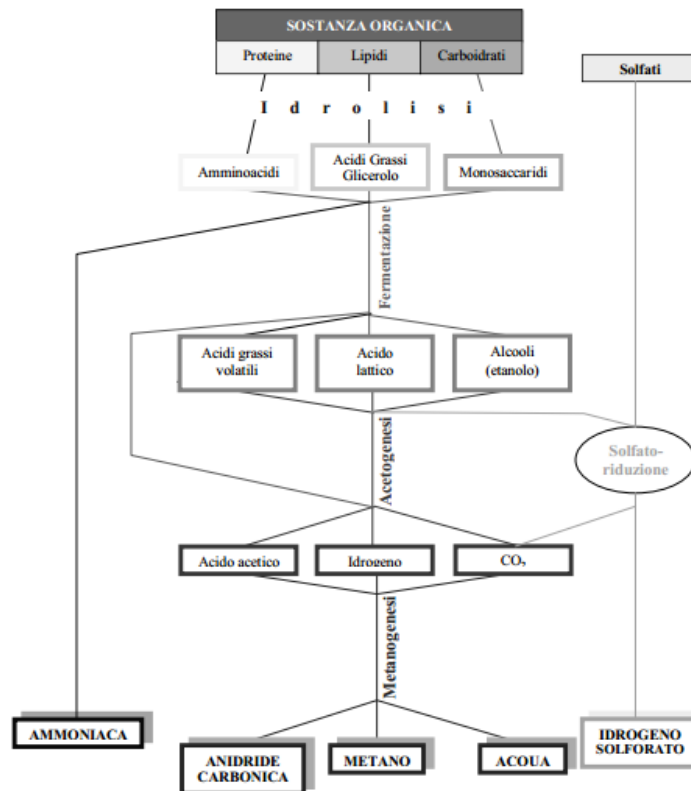


Fig. 1 Diagramma complesso delle diverse fasi coinvolte nel processo di digestione anaerobica (Gujer e Zehnder, 1983 modificato).

IDROLISI E ACIDIFICAZIONE

In questa prima fase, per intervento di diversi gruppi batterici, si ha la degradazione di substrati organici complessi particolati o solubili, quali proteine, grassi e carboidrati, con formazione di composti semplici, quali aminoacidi, acidi grassi e monosaccaridi in forma solubile. In particolare, i microrganismi idrolizzanti possono colonizzare il materiale particolato e degradarlo, oppure produrre enzimi extracellulari in grado di scindere le molecole organiche complesse in oligomeri e monomeri che sono quindi resi disponibili per il trasporto all'interno delle cellule di microrganismi acidogeni fermentativi. Questi operano generalmente l'ossidazione dei substrati organici semplici a piruvato che viene poi trasformato in acidi grassi volatili, alcoli e chetoni che rappresentano i substrati di partenza per la successiva fase acetogenica.

Il processo idrolitico può essere inibito dall'accumulo di aminoacidi e zuccheri.

Dalla fermentazione degli aminoacidi viene inoltre prodotto ammonio. In generale il processo idrolitico non implica la crescita di microrganismi.

ACETOGENESI

A partire dai substrati formati nel corso della fase di idrolisi ed acidificazione (acidi volatili, essenzialmente propionato e butirato, ma anche alcoli) i batteri acetogeni producono acido acetico, acido formico, CO₂ ed H₂.

Due differenti meccanismi devono essere considerati a seconda che la degradazione avvenga a partire da acidi grassi a catena lunga (LCFA, long chain fatty acids) o a catena corta (SCFA, short chain fatty acids, o VFA, volatile fatty acids). In generale, si definiscono acidi grassi a catena lunga quelli con più di 5 atomi di carbonio.

Durante la produzione di acido acetico la presenza di idrogeno molecolare nel mezzo può determinare problemi di inibizione.

METANOGENESI

La produzione di CH_4 rappresenta la conclusione della catena trofica anaerobica.

Il metano infatti è l'unico composto non reattivo nell'intero processo di digestione anaerobica e può, pertanto, essere considerato il prodotto finale dell'intero processo.

La produzione di metano può avvenire essenzialmente attraverso due differenti vie:

- Metanogenesi idrogenotrofa : ad opera dei batteri idrogenotrofi, che operano l'ossidazione anaerobica dell'idrogeno;
- Metanogenesi acetoclastica: prevede la dismutazione anaerobica dell'acido acetico con formazione di metano e biossido di carbonio.

La maggior parte della produzione di metano avviene attraverso questo secondo meccanismo.

Con la loro attività i due ceppi di batteri metanigeni svolgono due importanti funzioni nell'ambito della catena trofica anaerobica: da un lato degradano l'acido acetico e quello formico a CH_4 eliminando gli acidi dal mezzo ed impedendo quindi l'inibizione dei fenomeni di degradazione di substrati organici per eccesso di acidità, e dall'altra mantengono la concentrazione di H_2 a bassi livelli così da consentire la conversione degli acidi grassi a catena lunga e degli alcoli ad acetato ed H_2 . Infatti, se la via idrogenotrofa è rallentata si osserva un accumulo di H_2 nel mezzo che inibisce la produzione del metano, mentre la via acetoclastica può subire fenomeni di inibizione da substrato in presenza di elevate concentrazioni di acido acetico.

Il più importante dei fattori che controllano la possibilità di utilizzo dell'acetato da parte dei batteri metanigeni è rappresentato dalla forma chimica con cui tale substrato è presente nel mezzo. In particolare si ha che, se presente in forma indissociata (CH_3COOH), l'acido acetico può attraversare la membrana batterica e risultare quindi utilizzabile (questo fenomeno è favorito in un intervallo di pH piuttosto ristretto, generalmente compreso tra 6 ed 8).

A più elevati valori di pH nel mezzo, l'acido acetico è presente per lo più nella forma dissociata (CH_3COO^-): ne deriva che la concentrazione della forma indissociata nel mezzo non è sufficiente a garantire un gradiente di concentrazione tale da consentire il trasporto trans-membrana del substrato. Nel caso di ambienti caratterizzati da pH relativamente bassi (inferiori a 5), si ha una elevata concentrazione di acido

indissociato che attraversa la membrana cellulare e la concentrazione dell'acido acetico può risultare superiore alle capacità di metabolizzazione cellulare con conseguente inibizione da eccesso di substrato.

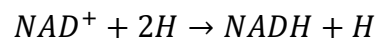
1.2.3 BIOCHIMICA DEL PROCESSO

La degradazione di substrati organici ha il duplice fine di ricavare l'energia necessaria per il metabolismo batterico (catabolismo) sotto forma di energia chimica di ossidazione e, in misura molto minore, di sintetizzare nuove cellule (anabolismo).

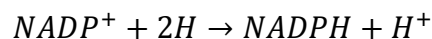
Mentre i microrganismi aerobi utilizzano ossigeno molecolare come accettore finale di elettroni nei processi ossidativi della sostanza organica, i microrganismi anaerobi utilizzano altra sostanza organica.

L'ossidazione avviene essenzialmente a causa della perdita di una coppia di atomi di idrogeno da parte della sostanza organica ossidata (deidrogenazione): l'idrogeno viene quindi trasferito alla specie ossidante (accettore di idrogeno).

L'ossidazione di composti organici in ambiente anaerobico è catalizzata da enzimi ed avviene grazie all'intervento di coenzimi come NAD^+ (nicotinamide adenina dinucleotide-forma ossidata) ed $NADP^+$ (nicotinamide adenina dinucleotide fosfato forma ossidata):



(Eq. 4)



(Eq. 5)

E' proprio il passaggio attraverso queste reazioni che fornisce l'energia che viene immagazzinata attraverso una ritrasformazione in energia chimica, sotto forma di ATP (adenosina tri-fosfato).

Nella tabella seguente (Tab. 2.) sono riportate le reazioni di degradazione per ogni fase del processo biologico, per un substrato semplice, ossia il glucosio.

Tab. 2. Processo di digestione anaerobica della molecola di glucosio. Sono riportati i substrati e i prodotti di ogni fase, con la rispettiva equazione chimica (IWA, 2002).

Fase	Substrato	Prodotti	Reazione
Acidogenesi	Glucosio	Acido acetico	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 3CH_3COOH + 2CO_2 + 4H_2$
		Acido propionico	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \rightarrow 3CH_3CH_2COOH + 2H_2O$
		Acidi acetico e propionico	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow \frac{4}{3}CH_3CH_2COOH + \frac{2}{3}CH_3COOH + \frac{2}{3}H_2O + \frac{2}{3}CO_2$
		Acido butirrico	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + 2CO_2 + 2H_2$
		Acido lattico	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CHOHCOOH$
		Etanolo	$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CH_2OH + 2CO_2$
Acetogenesi	Acido propionico	Acido acetico	$CH_3CH_2COOH + 2H_2O \rightarrow CH_3COOH + CO_2 + 3H_2$
	Acido butirrico		$CH_3CH_2CH_2COOH + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 2H_2$
	Acido palmitico		$CH_3(CH_2)_{14}COOH + 14H_2O \rightarrow 8CH_3COOH + 14H_2$
Metanogenesi idrogenotrofa	Idrogeno e anidride carbonica	Metano	$4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$
Metanogenesi acetoclastica	Acido acetico	Metano e anidride carbonica	$CH_3COOH \rightarrow CH_4 + CO_2$

1.2.4 PARAMETRI DI STABILITA' DI PROCESSO

Poiché il processo di digestione si basa sull'azione di numerosi ceppi batterici, che svolgono la degradazione in sequenza, tale processo risulta essere particolarmente sensibile alle condizioni operative, con il rischio che effetti di inibizione specifici per alcune popolazioni possano ripercuotersi sulla globalità del processo.

Occorre comunque ricordare, che per un corretto monitoraggio del processo, è necessario valutare complessivamente le informazioni ottenute da tutti i parametri di processo. La variazione di un singolo parametro risulta difficilmente interpretabile.

Di particolare importanza nel monitoraggio risultano parametri quali il pH, l'alcalinità, la concentrazione di acidi grassi volatili (VFA), il rapporto tra acidi grassi volatili e alcalinità, la produzione di biogas e la sua composizione e infine la temperatura.

pH

Il pH fornisce un'indicazione della stabilità del mezzo di reazione, in quanto una sua variazione è associata sia alla capacità tamponante del sistema da parte del mezzo di reazione che a variazioni dell'equilibrio tra le specie che partecipano alla catena trofica dei microrganismi coinvolti nel processo.

Per valori di pH compresi tra 6.5 e 7.5 il processo di digestione è generalmente considerato stabile (F. Cecchi, et al., 2005).

Il valore del pH in un digestore è determinato essenzialmente dalla presenza di CO₂ nel mezzo liquido, e quindi dalla sua pressione parziale nel biogas e dai valori di concentrazioni degli acidi grassi volatili e dell'ammoniaca.

L'idrolisi e l'acidogenesi si svolgono più rapidamente ed efficacemente a pH acidi e con elevate concentrazioni di substrato, mentre la metanogenesi è inibita a pH acidi e da elevate concentrazioni di acidi indissociati, come appunto si riscontrano a pH acidi (Fig. 2).

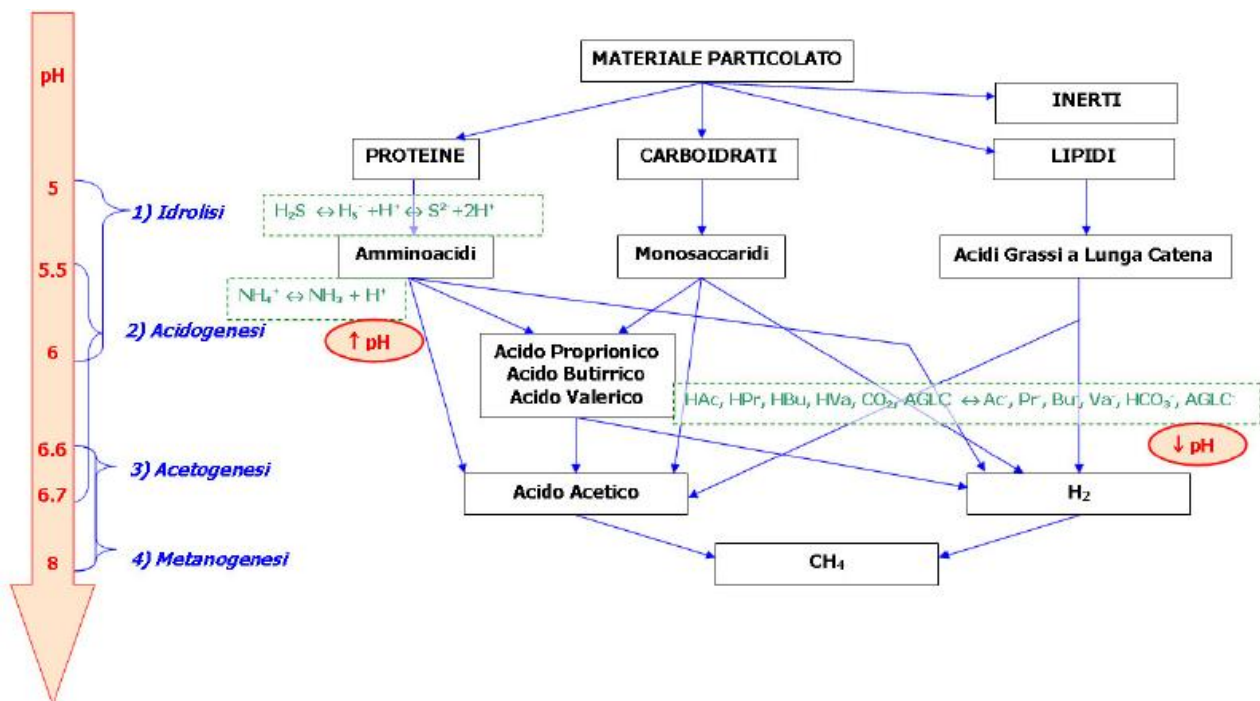


Fig. 2 Andamento ottimale del pH durante il processo di digestione anaerobica, in funzione della fase di processo e di conseguenza dei prodotti ottenuti (Vismara, et al., 2011).

Occorre rilevare che questo parametro è in grado di indicare condizioni di squilibrio del sistema, ma solo con un certo ritardo rispetto all'evoluzione dell'effetto tampone del mezzo.

TEMPERATURA

Dato che i processi di degradazione anaerobica sono determinati dall'attività di popolazioni microbiche eterogenee l'effetto delle variazioni di temperatura è particolarmente importante. Ciò è imputabile al fatto che, al variare della temperatura, non si avrà un semplice rallentamento o accelerazione dei processi metabolici ma la vera e propria sostituzione di popolazioni batteriche, che risultano presenti solo in alcuni ristretti intervalli di temperatura.

Si distinguono tre diversi intervalli operativi:

- Campo psicofilo: 4-15°C;
- Campo mesofilo: 20-40°C, con valore ottimale di 35°C;
- Campo termofilo: 45-70°C, con valore ottimale di 55°C.

In ciascun campo operano popolazioni batteriche specificatamente adatte al corrispondente intervallo di temperatura e incapaci di operare al di fuori di esso. All'interno di ciascun intervallo, si osserva un incremento delle cinetiche di processo con andamento che riflette la relazione di Vant'Hoff-arrhenius, con un successivo rallentamento in prossimità del valore ottimale, seguito da una rapida decrescita (Fig. 3),(Spence, 1996) .

Variazioni di soli 2-3 °C possono influire sulle prestazioni generali del processo, specialmente in prossimità dei limiti dell'intervallo operativo.

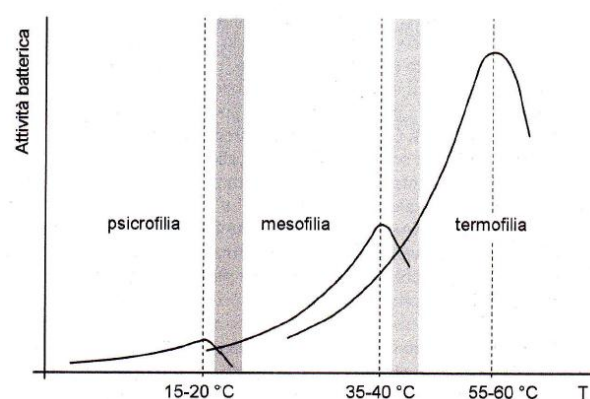


Fig. 3 Effetto della temperatura sulle cinetiche di degradazione anaerobica. Le righe tratteggiate indicano gli intervalli ottimali di lavoro, mentre le bande in grigio, gli intervalli in cui il processo non è ottimizzato (Bonomo, 2011).

Confrontando i tre campi, dallo psicofilo al termofilo, si osservano:

- Un incremento delle cinetiche di processo;

- Una diminuzione delle costanti di semisaturazione;
- Un più rapido decadimento batterico.

In campo mesofilo, il processo è più stabile, ossia è meno sensibile alla variazione delle condizioni operative; in campo termofilo, le alte temperature esercitano un effetto di igienizzazione nei confronti di eventuali microrganismi patogeni (Bonomo, 2011).

ALCALINITA'

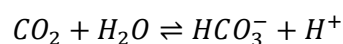
Questo parametro è di fondamentale importanza nei processi anaerobici. Tenendo infatti presente che i tassi di crescita della biomassa metanigena sono estremamente ridotti, può capitare che in occasione di un incremento del carico organico le aumentate capacità idrolitiche ed acidificanti del sistema determinino uno sbilanciamento della popolazione batterica a favore della componente acidogenica e quindi a sfavore della componente metanigena.

Si avrà, pertanto, una fase transitoria in cui si osserverà un incremento di concentrazione degli acidi grassi volatili. Tuttavia il solo monitoraggio del pH non è sufficiente a prevenire eventuali fenomeni di inibizione. In questi casi risulta fondamentale la capacità tamponante del sistema, che deve essere in grado di neutralizzare l'abbassamento di pH determinato dall'accumulo degli acidi organici.

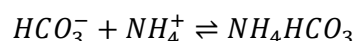
L'alcalinità di un digestore anaerobico è determinata essenzialmente dalla presenza di un sistema tampone dovuto alla coesistenza di ammoniacale, originata dalla degradazione di proteine, e di bicarbonato, derivante dalla dissoluzione del biossido di carbonio nel mezzo.

L'interazione del biossido di carbonio con la fase liquida e la conseguente formazione del sistema tampone determinato dalla contemporanea presenza di acido carbonico ed ammonio prende il nome di sistema calco-acetico.

Si ha, in generale, la formazione di NH_4HCO_3 :



(Eq. 6)



(Eq. 7)

La presenza di questo sale disciolto in soluzione porta ad una elevata alcalinità nel mezzo.

ACIDI GRASSI VOLATILI (VFA)

Gli acidi grassi volatili vengono rappresentati dalla formula generale:



Dove R è un gruppo alchilico del tipo: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$.

In generale i batteri idrolitici ed acidificanti producono, nel corso del processo di digestione anaerobica, acidi grassi volatili in cui R contiene tra 0 e 3 atomi di carbonio (acidi grassi a catena corta).

Il livello di concentrazione degli acidi volatili, generalmente espresso in termini di acido acetico o di COD, dipende dal tipo di substrato trattato, e varia da circa 200 fino a 2000 mgAc/L.

Di norma non è la concentrazione assoluta ad essere assunta come parametro di stabilità ma piuttosto la variazione di concentrazione. In particolare, variazioni repentine con incremento della concentrazione indicano che il processo sta scivolando verso processi acidogenici piuttosto che metanigenici.

In generale si potrà osservare che un incremento degli acidi volatili è conseguente all'aumentato carico di substrato da trattare che determina l'accelerazione dei fenomeni idrolitici ed acidogenici con conseguente sbilanciamento della catena trofica e variazione del sistema verso condizioni di basso pH a seguito dell'esaurimento della capacità tamponante del mezzo.

Il valore di concentrazione degli acidi grassi volatili non va disgiunto dal dato della produzione del biogas e dalla sua composizione, oltre che dai dati relativi a pH ed alcalinità.

La concentrazione degli acidi grassi volatili e l'alcalinità sono i due parametri che mostrano una più rapida variazione quando il sistema tende ad allontanarsi da condizioni di stabilità.

PRODUZIONE E COMPOSIZIONE DI BIOGAS

La produzione di metano dipende soprattutto da due fattori:

- La tipologia dei substrati alimentati: esistono in letteratura ampi riferimenti ai valori di biogas producibile (in termini di m^3 biogas / kg_{SV}) che dipendono dalla composizione chimica dei substrati;
- La concentrazione di sostanza organica biodegradabile nella miscela di alimentazione al digestore. A parità di massa liquida, una maggiore concentrazione di secco in alimentazione produrrà una maggiore produzione di biogas in termini di m^3/d , ma non si può però aumentare molto tale concentrazione per non ostacolare l'efficacia di miscelazione nel reattore; Di conseguenza anche il carico alimentato è molto importante. Più il digestore viene alimentato e più biogas si produce. Ciò è vero fino a un punto critico oltre il quale il processo si blocca per sovraccarico e la produzione di biogas crolla. La conoscenza di questo punto critico è della massima importanza i quanto il blocco

del processo può protrarsi per diversi giorni prima del ripristino delle condizioni di produzione voluta (Vismara, et al., 2011).

Il monitoraggio della quantità e della composizione (almeno in termini di metano e biossido di carbonio) del biogas è di fondamentale importanza per il controllo della stabilità del processo di digestione anaerobica.

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 ed un aumento nella percentuale di CO₂ possono indicare fenomeni di inibizione a danno della componente metanigena dovuti, ad esempio, all'eccessiva presenza di acidi grassi volatili ed 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 e l'alcalinità del mezzo.

TOSSICITA' DELL'AMBIENTE DI CRESCITA

La presenza di alcuni fattori può inibire o limitare sia la crescita del consorzio batterico che la resa di trasformazione del substrato nel prodotto finale. In particolare, i metanigeni sono comunemente considerati i microrganismi più sensibili di tutto il consorzio batterico deputato alla conversione anaerobica delle sostanze organiche a metano in quanto caratterizzati da una bassa velocità di crescita.

I parametri che possono influenzare negativamente l'intero processo di digestione anaerobica sono rappresentati dal substrato stesso e da eventuali elementi inibenti quali metalli pesanti, sali, azoto ammoniacale (NH₄⁺), residui di pesticidi e prodotti farmaceutici, detergenti e disinfettanti, solventi, inibitori da trattamenti chimici per la conservazione di cibi, ecc.

In alcuni casi, però, si è osservato come i batteri anaerobici siano in grado di tollerare alcune varietà di composti tossici e persino biodegradarne alcuni. Inoltre, si possono manifestare anche casi di acclimatazione alla tossicità e di reversibilità della stessa.

Come già accennato in precedenza, il substrato stesso può costituire un fattore di inibizione in quanto la sua concentrazione può regolare e/o rallentare la velocità di reazione degli stadi successivi.

Anche alcuni intermedi metabolici che si formano durante il processo di metanizzazione possono limitare lo sviluppo degli stadi successivi, portando, quindi, ad un effetto globale negativo.

Alte concentrazioni di acidi grassi volatili (VFA) possano avere effetti tossici, principalmente a causa della risultante diminuzione del pH.

Ad esempio, il propionato è un intermedio quantitativamente importante nei digestori anaerobici, in genere secondo solo all'acido acetico. Sebbene la concentrazione di propionato sia di solito abbastanza bassa, l'inibizione del meccanismo di degradazione del propionato, pertanto, può portare ad un repentino aumento della sua concentrazione che può risultare tossica. Il limite di tossicità per il propionato sembra attestarsi intorno a 3 g/L (F. Cecchi, et al., 2005).

1.2.5 PARAMETRI DI GESTIONE DEL REATTORE

I parametri di gestione del reattore definiscono l'esercizio in termini di tempi di permanenza della massa alimentata nel reattore, di concentrazione dei microrganismi, di rese di produzione di biogas in relazione al volume del reattore ed alle caratteristiche del substrato trattato.

Il substrato è generalmente definito, nell'ambito dei processi di digestione, in termini di solidi totali (ST), di solidi totali volatili (SV), di domanda chimica di ossigeno (COD), di domanda biologica di ossigeno a 5 giorni (BOD_5), o di produzione potenziale biochimica di metano (BMP).

I parametri di gestione del reattore sono i seguenti:

- Tempo medio di residenza idraulico (HRT), definito come il rapporto tra il volume del reattore considerato e la portata di alimentazione al reattore;
- Tempo medio di residenza dei fanghi (SRT), è dato dal rapporto tra la massa totale di solidi volatili presenti nel reattore e la portata di solidi estratta dal reattore.
- Carico organico volumetrico (OLR) Il carico organico volumetrico di substrato applicato al reattore è definito come la quantità di substrato entrante nel reattore riferita all'unità di volume del reattore stesso ed al tempo.
- Produzione specifica di gas (SGP): Questo parametro rappresenta la quantità di biogas che viene prodotta per quantità di sostanza volatile alimentata al reattore; viene quindi espressa in termini di $m^3_{\text{biogas}}/kg_{\text{substrato alimentato}}$. E' un parametro molto utilizzato per definire le rese dei processi di digestione anaerobica, è in realtà strettamente correlato alla biodegradabilità del substrato trattato piuttosto che alle proprietà del processo adottato.
- Velocità di produzione del biogas (GPR), definita come la portata di biogas prodotto rispetto al volume del reattore ed al tempo (F. Cecchi, et al., 2005) ;
- Efficienza di rimozione del substrato. Esistono diversi modi di esprimere il rendimento di rimozione del substrato nel corso del processo di digestione, legati ai diversi parametri utilizzati per esprimere la sua concentrazione (ST, SV, COD o BOD). Ipotizzando di esprimere il substrato in termini di concentrazione di COD la relazione è la seguente:

$$\eta(\%) = \frac{Q \cdot S - Q_e \cdot S_e}{Q \cdot S}$$

(Eq. 8)

Dove:

- η : esprime la percentuale di COD rimosso [%];
- Q : è la portata influente [L/d];
- Q_e : è la portata di effluente [L/d];
- S : è la concentrazione di substrato nella portata influente in termini di COD [g COD/L];
- S_e : è la concentrazione di substrato nella portata effluente in termini di COD [g COD/L].

1.2.6 TIPOLOGIA DI REATTORI

Gli impianti di digestione anaerobica esistenti in Europa presentano, in maggioranza, digestori di tipo continuo (CSTR), monostadio o multistadio, con flusso liquido (concentrazione di solidi totali di circa 10%).

Le taglie dimensionali degli impianti e le opzioni tecnologiche sia di trattamento che di produzione energetica variano in funzione delle tipologie di biomassa disponibili e dei quantitativi avviati alla fermentazione.

Di seguito vengono presentate le principali tipologie di reattori disponibili per il processo di digestione anaerobica.

PROCESSI IN DISCONTINUO

In questo caso il processo viene gestito in maniera cosiddetta "batch"; si avrà, cioè, l'alimentazione del reattore con il substrato ed un inoculo ed il conseguente avanzamento del processo fino ad esaurimento del substrato.

Mentre in reattori di tipo CSTR il processo viene operato in un punto stabile della curva di crescita della coltura, nel caso di reattori batch si sfrutta tutta la curva di crescita, dall'inizio alla fine.

Il vantaggio dei processi batch consiste nei bassi costi di esercizio e degli impianti meccanici, a fronte di svantaggi relativi alla discontinuità della produzione di biogas e agli elevati consumi energetici.

PROCESSI IN CONTINUO

Per processo continuo si intende un sistema alimentato in modo continuo o semicontinuo con un tempo di permanenza medio del substrato nel reattore espresso dal tempo di residenza idraulico (HRT) e quello dei microrganismi dal tempo di residenza dei solidi (SRT).

I processi possono essere, a seconda della soluzione adottata, ad una o due fasi.

Nei processi a fase unica le fasi biologiche della digestione, idrolisi/acidogenesi, acetogenesi e metanogenesi, hanno luogo nel medesimo reattore e contemporaneamente.

Nei processi a due fasi si hanno due reattori distinti, posti in serie tra loro, ciascuno dedicato ad una serie di reazioni: nel primo hanno luogo i fenomeni di idrolisi/acidogenesi ed acetogenesi con un tempo di ritenzione idraulico basso (da 1-3 fino a 5 giorni) e un elevato carico idraulico volumetrico (superiore ai 10 kgSV m⁻³ d⁻¹) mentre nel secondo si sviluppa la fase metanogenica in un secondo reattore. Ciò permette di associare il tempo di residenza nel reattore alle diverse cinetiche dei ceppi microbici connessi alle due diverse fasi del processo di digestione.

Poiché il substrato viene alimentato in modo costante al digestore anche il biogas viene prodotto in maniera continua. I digestori che appartengono a questa categoria possono essere distinti in reattori con flusso a pistone (plug-flow) o completamente miscelati (CSTR).

REATTORI A FLUSSO A PISTONE (PLUG-FLOW)

Vengono principalmente impiegati per la digestione di effluenti zootecnici liquidi e di piccola taglia, in vasche longitudinali prive di miscelazione ed eventualmente compartimentalizzate.

Il reattore a pistone può essere utilizzato sia nel trattamento dei liquami zootecnici sia nella stabilizzazione dei fanghi derivanti dalla flottazione di reflui agro-zootecnici. L'altro ambito di applicazione si ha nella digestione a secco di matrici solide, quali le coltivazioni energetiche.

REATTORI COMPLETAMENTE MISCELATI (CSTR)

I reattori completamente miscelati (Completely Stirred Tank Reactor) rappresentano la tipologia più comune di reattore di digestione anaerobica operanti a umido (tenori di secco fino al 15%).

Questa tipologia di reattori è idonea per il trattamento dei liquami suini e bovini e/o alla codigestione degli effluenti suini e/o bovini con altri co-substrati, quali colture energetiche e/o scarti organici industriali.

Sono costituiti da vasche cilindriche provviste di sistemi di miscelazione e possono operare sia in condizioni mesofile che termofile. Nei processi ad umido si opera con carichi organici volumetrici compresi tra 2 e 5 kgSVm⁻³d⁻¹.

REATTORI AD ALTO CARICO

I reattori ad alto carico consentono un aumento dell'efficienza grazie all'immobilizzazione all'interno del reattore di elevate concentrazioni di biomassa. Sono quindi in grado di operare a carichi volumetrici più elevati rispetto agli altri reattori a flusso continuo ($8-20 \text{ kgSVm}^{-3}\text{d}^{-1}$).

Tuttavia, si tratta di sistemi che sono poco efficienti nel convertire la frazione particolata del substrato in biogas e nei quali possono formarsi accumuli di materiale particolato non digerito.

Appartengono a questa tipologia i seguenti reattori:

- Reattori a biomassa adesa, nei quali la biomassa aderisce a supporti installati nel reattore sottoforma di un biofilm. Tra i reattori a biomassa adesa compaiono i reattori a letto fisso, a letto espanso e i filtri anaerobici.
- Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB), nei quali la biomassa può essere presente in forma fioccosa (per carichi idraulici inferiori a 0.2 mh^{-1}) o granulare per carichi idraulici più elevati (dell'ordine di 0.5 mh^{-1}). Tipicamente hanno forma circolare e sono dotati di un sedimentatore trifasico per una più efficiente separazione della fase liquida, solida e gassosa che consente di massimizzare il tempo di residenza dei solidi e di minimizzare il dilavamento della biomassa.
- Sistemi MBR anaerobici, che utilizzano una membrana come barriera fisica per separare le fasi solida/liquida/gassosa e la ritenzione della biomassa; sono indicati per trattare elevati carichi inquinanti con portate limitate e molto concentrate.

1.2.7 BMP DI SIERO DI LATTE

La produzione di metano, anche definita in letteratura come BMP (Biochemical Methane Potential, Potenziale Biochimico di Metanizzazione), è definita come la produzione di metano che si osserverebbe per un tempo di degradazione infinito ed in condizioni ottimali (inoculo acclimatato, assenza di inibizione, condizioni ambientali quali: miscelazione, temperatura, pH - ottimali).

Tale parametro rappresenta il corrispondente anaerobico del BOD (Biochemical Oxygen Demand) e, come il BOD, è valutabile solo per via sperimentale (Ficara, et al.).

In condizioni reali, a causa dell'incompletezza delle reazioni di biodegradazione, non tutto il contenuto di sostanza organica presente nella matrice in digestione viene effettivamente convertito in biogas. In condizioni favorevoli di materia organica solubile, si possono ottenere livelli di conversione superiori al 90-95%. Se la materia organica è particolata e se contiene frazioni significative di materiale lignocellulosico, la percentuale di conversione può scendere anche significativamente.

Ergüder et al., (2001) effettuarono delle prove di BMP utilizzando come substrato del siero di latte acido. La sperimentazione ha indagato differenti concentrazioni di substrato iniziale in termini di COD, e l'eventuale presenza di macro-nutrienti e alcalinità. Le prove in cui non è stata addizionata la soluzione di macro-nutrienti, metalli ed alcalinità, ha dato per ogni valore di concentrazione di COD iniziale, volumi di biogas inferiori. In particolar modo, per elevate concentrazioni di COD alimentato, in assenza della soluzione di nutrienti si hanno effetti di inibizione (Ergüder, et al., 2001).

Per quanto riguarda le prove in cui sono stati addizionati i macro-nutrienti, i risultati ottenuti sono i seguenti:

- Con concentrazione iniziale di COD pari a 5525 mg/L, il sistema produce complessivamente 176 mL di biogas, di cui 157 mL (90%) nei primi 16 giorni, senza che si verificano effetti di inibizione;
- Con concentrazione iniziale di COD pari a 11050 mg/L, il sistema produce complessivamente 325 mL di biogas, di cui 292 mL (90%) nei primi 24 giorni;
- Con concentrazione iniziale di COD pari a 22100 mg/L, il sistema produce complessivamente 598 mL di biogas.

Le prove hanno avuto una durata di 68 giorni.

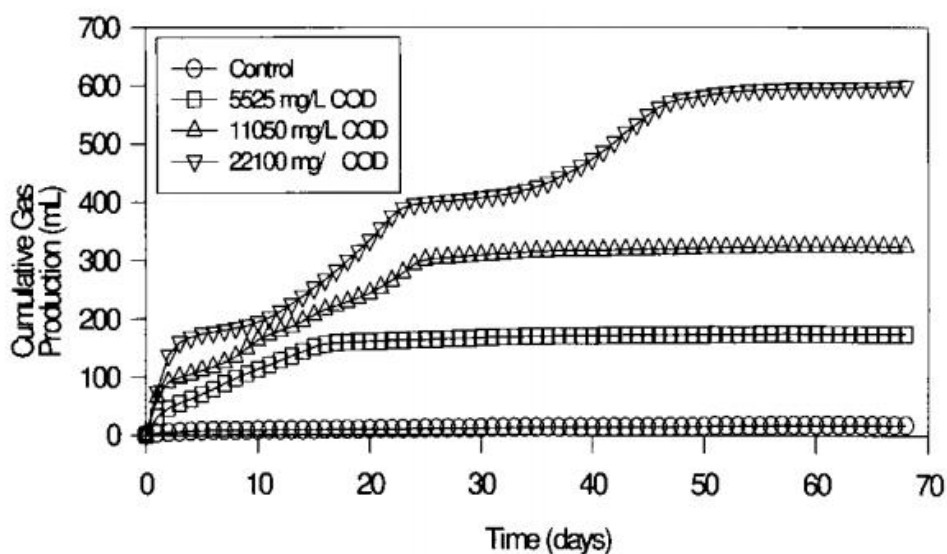


Fig. 4 Risultati della prova di BMP con siero di latte

Il valore di BMP medio ottenuto è di 424 mL CH₄/g COD, 23.4 L CH₄/L siero alimentato, mentre la concentrazione di metano nel biogas è di 77±5% (G.N. Demirer, 2000; Ergüder, et al., 2001).

Antonopoulou et al. (2008), ottennero valori di BMP inferiori e pari a 0.31 m³CH₄/kg COD alimentato, o, 17.9 L CH₄/L siero di latte.

1.2.8 DIGESTIONE ANAEROBICA DI SIERO DI LATTE E REFLUI DELL'INDUSTRIA LATTIERO-CASEARIA

Come è già stato accennato nel capito precedente, la digestione anaerobica del siero di latte risulta essere una buona alternativa per la gestione e lo smaltimento del siero; tuttavia, il processo presenta delle complicazioni dovute alle caratteristiche del substrato, quali: elevata concentrazione di sostanza organica (compresa tra 60 e 110 g_{COD} L⁻¹), bassa alcalinità (50 meq L⁻¹), elevata concentrazione di solidi sospesi, tendenza ad acidificare molto rapidamente (T.H Ergüder, 2001).

Ci sono numerosi studi in letteratura, che si sono dedicati alla digestione anaerobica del siero di latte.

Risultati simili sono stati ottenuti anche da Blonskaja(Blonskaja, et al., 2006). Utilizzando un reattore UASB con HRT pari a 2.5 giorni, ottennero una rimozione del COD del 98% con concentrazione di COD nell'effluente di 4.6 g COD/L.

Sono state implementate anche configurazioni che prevedevano un digestore a due stadi, separando la fase acidogena da quella metanigena.

Saddoud et al. (Saddoud, et al., 2007) ottennero in questo modo, un rendimento di rimozione del COD del 98.5% con concentrazione nell'effluente finale di 1.03 g/L e una produzione di metano di 0.3 m³/kg COD, lavorando con HRT di 5 giorni.

Gannoun et al. (Gannoun, et al., 2008) utilizzarono invece siero precedentemente sottoposto a un pre-trattamento specifico per la rimozione di grassi e proteine. Facendo in questo modo ottennero rendimenti di rimozione del COD compresi tra il 95 e il 98%, con elevate produzioni specifiche di metano (0.28-0.38 m³/kg_{COD}).

Di seguito si riporta una tabella riassuntiva in cui sono riproposti gli esempi di digestione anaerobica su siero di latte tal quale e siero diluito precedentemente descritti (Tab. 3).

Tab. 3 Esempi di digestione anaerobica di siero di latte (CW) e siero diluito (CW diluito). UASB: up-flow anaerobic sludge blanket; CP: contact process; TSMAMD: two-stage mixed anaerobic membrane digester; UAF: up-flow anaerobic filter (Prazeres, et al., 2012)

Substrato	Reattore	pH	T	HRT	OLR	COD in	COD out	COD rimosso	%CH ₄	Produzione specifica di CH ₄	Riferimento
–	–	–	°C	d	kg/(m ³ xd)	kg/m ³	kg/m ³	%	%	m ³ /(kg COD)	–
CW diluito	UASB	4-7	35	2,06-2,46	22,6-24,6	55,7-58,4	1,7-2,7	95-97	77	0,424	(Ergüder, et al., 2001)
CW	CP	–	36	7	4,3-18,3	60,3-66,7	4,7	83	76	(0,28-0,59)x10 ⁻³	(Blonskaja, et al., 2006)
CW	UASB	6,5-7,5	36	2,5	0,5-9,0	60,3-66,7	4,6	98	78	–	(Blonskaja, et al., 2006)
CW in polvere	ASBR	0,5-4,0	30	–	0,6-4,8	0,5-4	0,1-0,6	>90	–	–	(Mockaitis et al., 2006)
CW	TSMAMD	6,5	37	5	19,78 mg/(Lxd)	68,6	1,03	98,5	>70	0,3	(Saddoud, et al., 2007)
CW pre-trattato	UAF	7,2	35	2-5	4	5-20	–	98	–	0,28	(Gannoun, et al., 2008)
CW pre-trattato	UAF	7,2	35	2-5	3	15	0,75	95	–	0,28-0,38	(Gannoun, et al., 2008)

1.3 IDROGENO

Lo sviluppo di idrogeno offre opportunità notevoli per la risoluzione dei problemi che affliggono l'attuale sistema energetico quali, l'esaurimento dei combustibili fossili, l'incremento delle emissioni inquinanti e il cambiamento climatico.

Per questo motivo il mercato dell'energia si sta spostando verso una composizione di combustibili caratterizzata dall'aumento della componente gassosa e del rapporto idrogeno/carbonio.

L'idrogeno non è una fonte energetica primaria, ma un vettore energetico, poiché non ne esistono giacimenti in natura, di conseguenza per disporre di una qualsiasi quantità è necessario produrla a partire da altri composti, come ad esempio acqua o metano, spendendo energia, rispettivamente elettrica o termica, che deve essere quindi disponibile a monte di tale processo.

Un vettore energetico permette l'accumulo e il trasporto di energia come l'energia elettrica, la quale, altrimenti non può essere stoccata. Vi sono però anche due svantaggi nell'utilizzo di un vettore energetico. Il primo consiste nella perdita di energia che si verifica nella trasformazione da una forma di energia all'altra. Tale trasformazione comporta un processo aggiuntivo a quello tradizionale, che si traduce in un ulteriore impianto nella filiera e di conseguenza nell'aumento del costo dell'energia.

1.3.1 CARATTERISTICHE GENERALI E ASPETTI DI SICUREZZA

L'idrogeno è un gas incolore, inodore e insapore, a molecola biatomica, inoltre è completamente atossico. Il

suo peso specifico è 0,0899 g/l (è 14,4 volte più leggero dell'aria).

L'idrogeno liquido ha un peso specifico di 70,99 g/l e il suo punto di ebollizione è -252,77°C.

Tra tutti i combustibili e carburanti, l'idrogeno possiede la maggiore densità energetica: 1 kg di idrogeno contiene la stessa energia di 2,1 kg di gas naturale o di 2,8 kg di benzina.

I vantaggi ambientali nell'uso di idrogeno come combustibile in motori o turbine a gas risiedono nelle quantità limitate di emissioni inquinanti. L'unica emissione nociva sarebbero gli ossidi di azoto, dovuti all'elevata temperatura a cui avviene il processo di combustione.

Eventuali tracce di idrocarburi o monossido di carbonio sono da attribuirsi esclusivamente alla combustione di olio lubrificante del motore.

Utilizzando celle a combustibile, in cui avviene la conversione elettrochimica dell'idrogeno, le emissioni vengono addirittura azzerate.

L'idrogeno è un combustibile potenzialmente pericoloso, i rischi maggiori sono dovuti alla sua infiammabilità ed esplosività.

Confrontando l'idrogeno con altri combustibili tradizionali, quali benzina e metano, è possibile osservare che esso presenta il maggior rischio di incendio ed esplosione poiché presenta i più ampi intervalli di infiammabilità e di detonabilità (Fig.5) e la più bassa energia minima di accensione.

Nella tabella seguente sono riassunte le caratteristiche generali e le proprietà dei combustibili presi in esame (Tab.4).

Tab. 4 Proprietà di idrogeno, metano e benzina. NBP: punto normale di ebollizione; NTP: 1 atm e 20°C; (*) a 1 atm e 0°C.

Proprietà	Idrogeno	Metano	Benzina
Peso molecolare	2,016	16,043	~107,0
Punto di ebollizione normale NBP [K]	20,268	111,632	310÷478
Pressione critica [atm]	12,759	45,387	24,5÷27
Temperatura critica [K]	32,976	190,56	540÷569
Densità del liquido al NBP [g/cm ³]	0,0708	0,4226	~0,70*
Densità del vapore al NBP [g/cm ³]	0,00134	0,00182	~0,0045
Potere calorifico inferiore a 25°C [kJ/kg]	120000	50050	44000
Limiti di infiammabilità in aria [vol %]	4,0÷75,0	5,3÷15,0	1,0÷7,6
Energia minima di accensione in aria [mJ]	0,02	0,29	0,24
Diffusività in aria [cm ² /s]	0,63	0,2	0,08

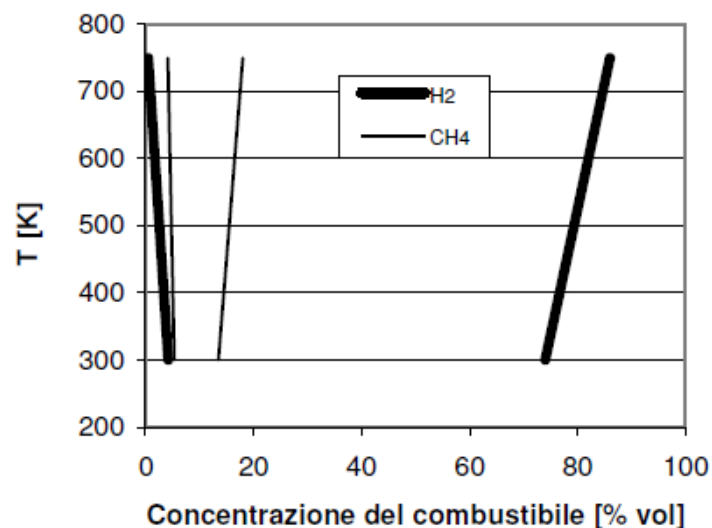


Fig. 5 Limiti di infiammabilità di idrogeno e metano in aria. Tali limiti sono influenzati in modo diretto dalla temperatura e in modo inverso dal contenuto di vapore d'acqua presente.

L'idrogeno presenta la minore energia di attivazione tra tutti i gas combustibili, pari a 0.02 mJ, per fare un confronto, una piccola scarica elettrostatica rilasciata dal corpo umano può raggiungere circa i 10 mJ, cinquecento volte maggiore.

L'energia di accensione non è una costante ma varia in funzione del rapporto combustibile-aria e per l'idrogeno essa raggiunge il minimo per una frazione volumetrica compresa tra il 25% e il 30% (Fig. 6).

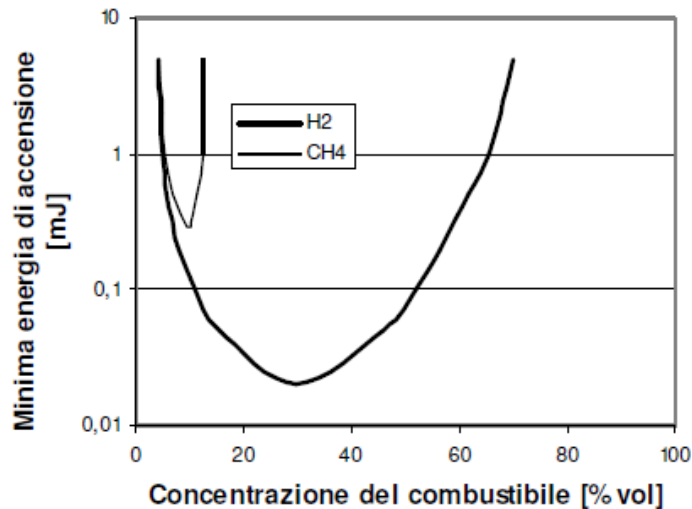


Fig. 6 Energia minima di accensione per miscele idrogeno-aria e metano-aria

L'idrogeno ha la più elevata velocità di diffusione in aria, così in aree non chiuse un'eventuale perdita può formare una miscela infiammabile più rapidamente di metano e benzina, ma può anche disperdersi più velocemente nell'aria diminuendo la durata del rischio di incendio ed esplosione, e la sua concentrazione al di sotto del limite inferiore di infiammabilità più rapidamente del metano.

Inoltre presenta la maggior tendenza a passare attraverso piccole aperture, quali fori o giunture, a causa delle piccole dimensioni della sua molecola.

Infine, gli incendi di idrogeno sono contraddistinti da alcune caratteristiche specifiche. In particolare sono difficili da individuare ed estinguere, perché le fiamme sono invisibili a occhio nudo, ed irradiano poco calore. Di conseguenza le persone o i materiali che si trovano in prossimità dell'incendio hanno meno probabilità di accorgersene, ma anche di essere incendiate o danneggiate per la radiazione termica.

Per ridurre il pericolo è dunque opportuno maneggiare tale combustibile all'aperto ogni qualvolta sia possibile, oppure dotare aree chiuse di una ventilazione adeguata.

1.3.2 PRODUZIONE DI IDROGENO

L'idrogeno generalmente, non viene commercializzato ai fini della produzione energetica. Esiste però un mercato maturo dell'industria della produzione di tale elemento che coinvolge prevalentemente raffinerie e industrie chimiche.

Attualmente la produzione mondiale annua di idrogeno è di circa 500 miliardi di normal metri cubi (Nm³), di cui il 40% viene impiegato nelle raffinerie per processi di desolforazione, deidrogenazione di oli pesanti e raffinazione di prodotti petrolchimici, il 59% viene utilizzato dall'industria chimica per la sintesi di ammoniaca, etilene e metanolo. Il restante 1% viene adoperato per le applicazioni di industria elettronica, metallurgica, alimentare e spaziale. (Gallo Stampino, 2012).

Più del 90% dell'idrogeno attualmente utilizzato nei processi industriali viene prodotto dagli stessi utilizzatori, mentre solo una piccola parte (6-9%) viene appositamente prodotta per coprire la domanda di quei settori industriali per i quali non risulta conveniente la produzione in proprio.

Il 40% circa viene soddisfatto senza ricorrere a impianti appositi, poiché l'idrogeno risulta essere un coprodotto dei processi chimici adottati, il restante 60% viene soddisfatto da impianti di steam reforming del metano, ossidazione parziale di idrocarburi pesanti e carbone ed elettrolisi dell'acqua (Gallo Stampino, 2012).

Di seguito si riporta uno schema con i principali metodi di produzione di idrogeno sviluppati (Fig.7).

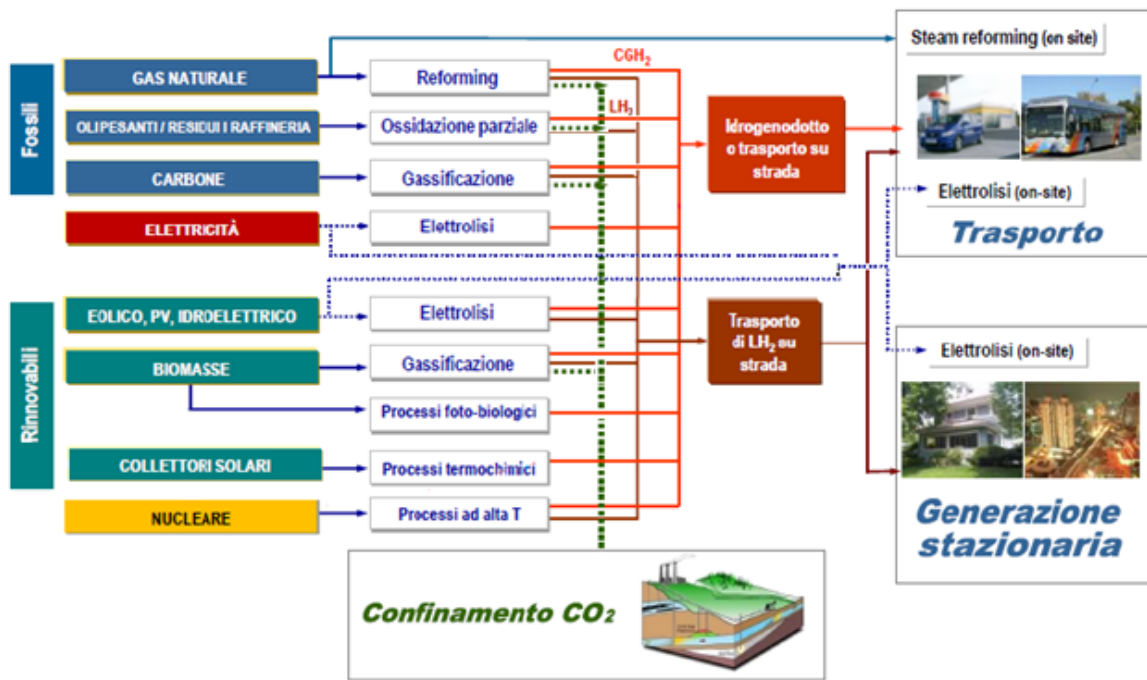


Fig. 7 Produzione e distribuzione di idrogeno.

Attualmente la sola tecnologia matura per la produzione di questo combustibile si basa sull'utilizzo di combustibili fossili. Al fine di realizzare un ciclo energetico perfettamente rinnovabile e sostenibile, si assiste a una crescente diffusione e sviluppo delle tecnologie di produzione legate alle fonti primarie rinnovabili, quali energia solare, eolica, idroelettrica e al trattamento delle biomasse.

Nei paragrafi successivi si analizzeranno i principali metodi di produzione al fine di mettere in risalto le differenze e i vantaggi/svantaggi di ciascuna tecnologia.

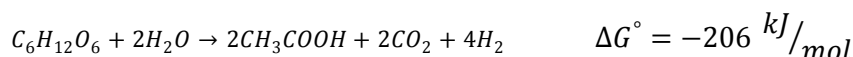
1.4 DARK FERMENTATION

Il processo di dark fermentation o fermentazione al buio, è un processo biologico che permette di produrre idrogeno a partire da un substrato ricco di carboidrati, mediante biomassa specifica.

Il capitolo seguente ha lo scopo di chiarire la tipologia di inoculo e i ceppi batterici che intervengono nel fenomeno, i substrati impiegati e la concentrazione ottimale, i parametri di processo più idonei e i reattori impiegati.

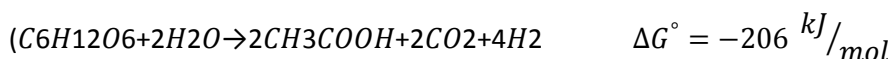
1.4.1 BIOCHIMICA E TERMODINAMICA DI PROCESSO

L'equazione seguente rappresenta l'equazione complessiva del processo di fermentazione al buio del glucosio (Eq. 9).



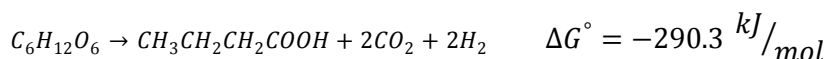
Eq. 9

La massima produzione teorica di idrogeno a partire da substrati organici ricchi di carboidrati è pari a 4 moli di idrogeno per mole di glucosio consumata (pari a 498 mL H₂ g esoso⁻¹ a 0°C e 1 atm), nel caso in cui venga prodotto unicamente acido acetico



Eq. 9).

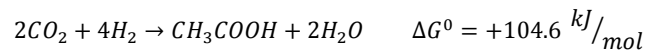
La produzione reale è però inferiore a tale valore, poiché parte dei carboidrati viene impiegata nella sintesi di nuove cellule batteriche e in reazioni da cui si ottengono differenti prodotti finali, come l'acido butirrico (Eq. 10).



(Eq. 10)

Questa seconda via metabolica porta alla formazione di sole 2 moli di idrogeno per mole di glucosio degradata (pari a 249 mL H₂ g esoso⁻¹ a 0°C e 1 atm), tuttavia tale processo risulta essere favorito dal punto di vista energetico rispetto alla reazione che produce acetato (Eq. 9). Per massimizzare la produzione di idrogeno è dunque necessario che la reazione che porta alla produzione di acetato sia predominante (Angenent, et al., 2004).

Tuttavia, l'accumulo di acetato non implica necessariamente un aumento nella produzione di idrogeno, poiché alcune specie microbiche sono in grado di convertire idrogeno e anidride carbonica in acetato secondo la reazione di omoacetogenesi (Eq.11).



(Eq. 11)

Nei processi fermentativi tale reazione è piuttosto favorita e determina un'importante riduzione nella produzione di bioidrogeno; infatti per ogni mole di acetato prodotta, vengono consumate 4 moli di idrogeno. La reazione inversa, che potrebbe portare a un'ulteriore produzione di idrogeno è però sfavorita termo dinamicamente.

Molte sperimentazioni in continuo con inoculo misto mostrano che acetato e butirato sono i principali prodotti finali, con rapporto di produzione butirato/acetato di 3:2, che corrisponde a una produzione di 2.5 moli di idrogeno per mole di esoso consumata (Hawakes, et al., 2006; Guo, et al., 2010).

La produzione di idrogeno da *Clostridium*, è una proprietà dell'enzima idrogenasi. Tale enzima, trasferisce elettroni dalla forma ridotta di ferredossina o NADH ai protoni, per rigenerare le rispettive forme ossidate (Fd_{ox} e NAD^+) richieste dai processi di glicolisi e decarbossilazione ossidativa del piruvato per la generazione di nuovo ATP.

La reazione è però sfavorevole dal punto di vista termodinamico, infatti Logan et al. (Logan, et al., 2002) misurando la produzione di idrogeno in due prove batch con diverso sistema di misura della produzione di biogas, a parità di condizioni, e confrontarono tra loro il metodo di Owen, con rilascio di gas in modo periodico, e il metodo respirometrico, con rilascio in continuo, riscontrarono una sovrappressione massima nello spazio di testa della bottiglia di 254 kPa nel caso di rilascio periodico, e una produzione di idrogeno inferiore del 43% a quella misurata con metodo respirometrico, in cui il gas prodotto viene rilasciato in continuo.

Da ciò si deduce che, se la pressione parziale di idrogeno è sufficientemente bassa, il NADH può essere ossidato dall'idrogenasi, producendo idrogeno (Hawakes, et al., 2006).

In particolare, la produzione di idrogeno risulta essere termodinamicamente favorevole per valori di pressione parziali inferiori a $P_{H_2,max}$ (Eq. 12):

$$P_{H_2,max} \leq \exp \left\{ \frac{2F(E_{H_2}^{o'} - E_x^{o'})}{RT} \right\}$$

(Eq. 12)

Dove, $E_x^{o'}$ è il potenziale redox del donatore di elettroni, ossia ferredossina ($E_{Fd}^{o'} = -400mV$) o NADH ($E_{NADH}^{o'} = -320mV$), F è la costante di Faraday, R e T sono rispettivamente la costante dei gas ideali e la temperatura assoluta.

Per la ferredossina, la produzione di idrogeno può continuare sino al raggiungimento di un valore di pressione parziale di circa 0.3 atm (3×10^4 Pa); mentre per NADH, la pressione parziale deve essere inferiore a 6×10^{-4} atm (60 Pa). Dal punto di vista termodinamico, la reazione che coinvolge NADH è dunque limitante.

Se la pressione parziale è sufficientemente bassa (< 60 Pa), la NADH che è stata prodotta può essere utilizzata per generare idrogeno, con una produzione massima pari a 2 moli di idrogeno per mole di glucosio consumata (Fig. 8 (a)).

Tuttavia, la maggior parte della NADH viene probabilmente ossidata secondo altri percorsi fermentativi, come la produzione di butirrato (Fig.8 (b)).

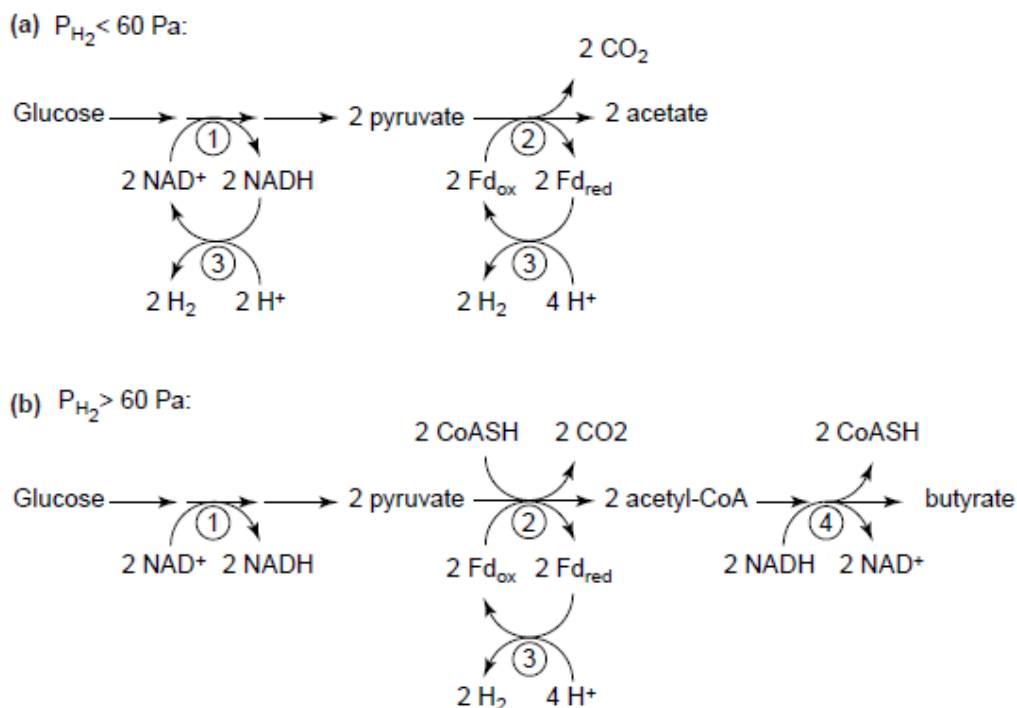
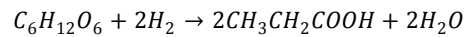


Fig. 8 Effetto della pressione parziale di idrogeno. (a) Ossidazione di NADH con produzione di idrogeno termodinamicamente favorevole solo quando la pressione parziale di idrogeno è inferiore a 60 Pa; (b) Pressione parziale di idrogeno maggiore, e formazioni di altri prodotti di fermentazione. Nelle reazioni (a) e (b): 1, metabolismo del glucosio attraverso reazione di glicolisi o Entner-Doudoroff; 2 decarbossilazione ossidativa del piruvato a piruvato:ferredossina ossido reduttasi; 3 formazione di idrogeno per idrogenasi; 4 fermentazione butirrato. (Angenent, et al., 2004).

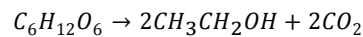
Le vie metaboliche che portano alla produzione di altri prodotti fermentativi, quali acido lattico, acido propionico ed etanolo, rappresentano percorsi alternativi al metabolismo del

piruvato, e sono generalmente associati a una produzione di idrogeno inferiore a 2 moli di idrogeno per mole di glucosio degradata (Angenent, et al., 2004).

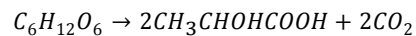
In particolare, la reazione di produzione del propinato porta a un consumo di idrogeno (Eq.13), mentre etanolo e acido lattico vengono generati da vie metaboliche che non riducono la quantità di idrogeno prodotta (Eq.14 e 15).



(Eq. 13)



(Eq. 14)



(Eq. 15)

Concettualmente, sono stati fatti importanti passi avanti per ottimizzare la produzione di idrogeno. Attualmente i rendimenti di produzione sono inferiori al massimo teorico, e tipicamente variano tra 1 e 2.5 moli di idrogeno per mole di glucosio degradata; Il rendimento di produzione di idrogeno diminuisce quando si ottengono prodotti organici maggiormente ridotti, perché rappresentano vie metaboliche che bypassano le principali reazioni di produzione di idrogeno.

Anche in condizioni ottimali, non è possibile raggiungere il rendimento massimo, perciò molti gruppi di ricerca hanno considerato processi ibridi costituiti da dark fermentation seguita da digestione anaerobica, per incrementare l'efficienza dell'intero sistema.

1.4.2 DINAMICA DI PRODUZIONE

La Fig. 9 mostra l'andamento tipico di produzione di biogas in un generico processo di dark fermentation condotto in batch in cui un adeguato inoculo batterico è posto a contatto con glucosio.

La prima fase che è possibile individuare, prende il nome di Lag phase, ossia fase di ritardo. Durante tale fase non si ha produzione di idrogeno; infatti le specie microbiche presenti nell'inoculo hanno bisogno di acclimatarsi alle condizioni ambientali di prova. Nel caso di inoculo pre-trattato, le spore presenti nel campione, poste in condizioni ambientali favorevoli e in presenza di substrato e nutrienti, sono in grado di germinare e dare luogo

alla forma attiva del microorganismo; ciò richiede un certo intervallo temporale funzione del microorganismo stesso e delle condizioni ambientali a cui è sottoposto.

In un tipico processo anaerobico, l'idrogeno viene prodotto durante la fase di crescita logaritmica dei batteri idrogenofili (Log growth phase). Quando la popolazione batterica raggiunge la fase stazionaria, la produzione di idrogeno rallenta (Late log growth phase), fino a raggiungere anch'essa la fase stazionaria (Stationary phase) (Logan, et al., 2002).

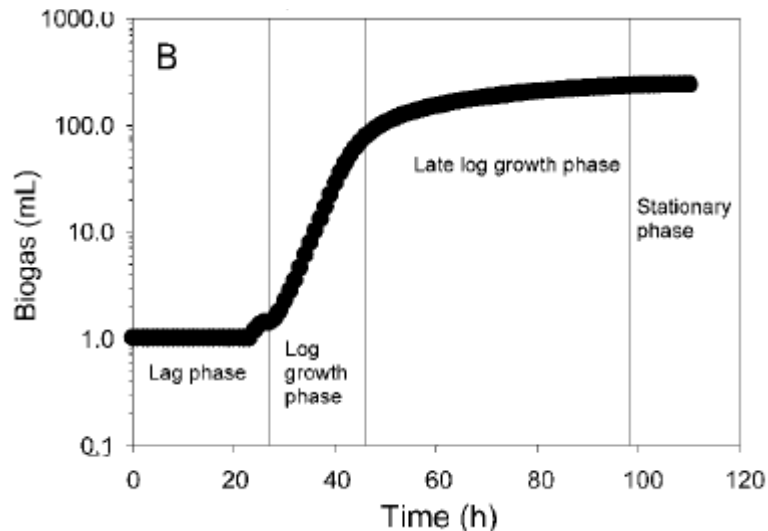


Fig. 9 Volume cumulato di biogas prodotto durante un generico processo di dark fermentation, rappresentato su assi logaritmici.

La produzione di idrogeno è accompagnata alla produzione di acidi grassi volatili (VFA) e solventi (come etanolo e più di rado butanolo). I maggiori VFA prodotti sono acetato (724-2135 mgCOD/L) e butirato (274-5778 mg COD/L) (Lin, et al., 2006).

Le sperimentazioni di dark fermentation in batch, hanno una durata di molto inferiore rispetto a una comune prova di BMP (biochemical methane potential), generalmente infatti vanno da poche ore a qualche giorno. Ad esempio Li, et al.(2008) hanno osservato una durata della prova compresa tra le 15 e le 30 ore.

Per quanto riguarda la produzione di biogas, i parametri generalmente misurati sono i seguenti:

- Volume cumulato di biogas e di idrogeno [NmL, NL];
- Percentuale di idrogeno nel biogas [%];
- Resa potenziale di produzione di idrogeno (HY, hydrogen yield) [$\text{molH}_2/\text{mol}_{\text{substrato consumato}}$, $\text{molH}_2/\text{mol}_{\text{substrato alimentato}}$];

- Tasso di produzione di idrogeno (HPR, hydrogen production rate)
[NmL/(L_{reattore}·h), NmL/h, NmL/d].

1.4.3 INOCULO

1.4.3.1 MICROBIOLOGIA

Una grande quantità di microrganismi appartenenti a gruppi tassonomici e fisiologici differenti possono produrre bioidrogeno da biomassa e rifiuti; i principali includono i generi anaerobi obbligati di *Clostridia*, i batteri anaerobi facoltativi quali, *Escherichia Coli*, *Enterobacter* e *Citrobacter*, e batteri di tipo aerobico come *Bacillus* e *Alcaligenes*.

Fang et al. hanno condotto uno studio specifico per la determinazione delle specie microbiche presenti in un reattore CSTR per la produzione di idrogeno inoculato con fango di origine civile (pH 5.5, 36°C, 6.6h HRT). Il 64.4% dei microrganismi apparteneva al genere dei *Clostridiaceae*, con il 43.8% di *Clostridium cellulosi*, il 12.5% di *Clostridium acetobutylicum* e l'8.3% di *Clostridium tyrobutyricum*. Il 18.8% dei batteri rimanenti era costituito da *Enterobacteriaceae* e il 3.1% da *Streptococcus bovis*.

I microrganismi appartenenti al genere dei *Clostridiaceae* presentano alti tassi di sintesi di idrogeno, sono molto versatili e possono utilizzare un ampio range di substrati complessi, quali amido, cellulosa ed emicellulosa.

Tuttavia questa flessibilità metabolica comporta una riduzione della produzione di idrogeno, a causa della generazione di diversi prodotti finali (Hawakes, et al., 2006) infatti, nella fermentazione del glucosio, porta alla produzione di acetato, butirrato, anidride carbonica e idrogeno molecolare.

Nonostante quest'aspetto negativo, gran parte degli studi sono stati condotti utilizzando come inoculo culture batteriche pure di *Clostridium*.

Taguchi et al. osservarono che una cultura pura di *Clostridium* può produrre idrogeno in modo continuo a pH 6 usando come substrato xilosio. Il più alto tasso di produzione ottenuto è stato di 21.03 mmolH₂/(l x h). La produzione, dopo 5 h HRT è stata di 2.36 mol H₂/mol di substrato (Levin, et al., 2003).

Lin et al. (Lin, et al., 2007), con l'obiettivo di capire meglio il metabolismo del glucosio e il rendimento di produzione di idrogeno, confrontarono tra loro quattro differenti specie di *Clostridium*: *C. acetobutylicum* M121, *C. butyricum* ATCC19398, *C. tyrobutyricum* FYa102 e *C. beijerinckii* L9.

La sperimentazione è stata condotta in batch. L'andamento dei parametri osservati (pH, concentrazione della biomassa e VFA ed alcoli prodotti) era il medesimo per le quattro

culture batteriche, importanti differenze sono state però individuate sulle quantità prodotte. In entrambi i casi viene prodotta nuova biomassa e la maggior parte dei prodotti fermentativi è costituita da acetato e butirato.

La fermentazione del glucosio produce principalmente butirato (0.37-0.67 mmol/mmol glucosio) e acetato (0.34-0.42 mmol/mmol glucosio)(**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**).

La più alta produzione di idrogeno è stata ottenuta con la cultura di *C. beijerinckii*, con 2.81mmoli di H₂ per mmole di glucosio degradata, che equivale a un'efficienza del 70%, superiore ai valori in letteratura, in cui l'efficienza di produzione di idrogeno utilizzando glucosio come substrato varia generalmente tra il 22% e il 57%.

E' possibile utilizzare come inoculo anche colture batteriche miste, derivanti da fanghi anaerobici, fanghi di origine civile o sedimenti fluviali (Show, et al., 2011).

L'inoculo in questo caso, viene generalmente pretrattato con lo scopo di selezionare i batteri idrogenofili, ossia i produttori di idrogeno, ed eliminare o inibire tutti i batteri metanigeni e omoacetogeni, i quali tendono invece a consumarlo.

L'inoculo viene sottoposto a trattamento chimico o termico. Il metodo utilizzato è importante poiché può avere effetti sull'avvio, sull'efficacia di selezione e sulla stabilità e continuità di produzione di idrogeno.

Ogni trattamento sfrutta la capacità di alcuni batteri coinvolti nella produzione di idrogeno, in particolare *Clostridium* e *Bacillus*, di formare spore in condizioni ambientali sfavorevoli come ad esempio la mancanza di nutrienti e/o l'aumento della temperatura. In condizioni ottimali, ossia in presenza di amminoacidi, zuccheri, enzimi e a pressione idrostatica, si ha poi la germinazione delle spore e la rigenerazione della forma attiva del microrganismo. I batteri metanigeni non hanno questa capacità e vengono quindi inibiti dal trattamento.

1.4.3.2 BATTERI CONSUMATORI DI IDROGENO E COMPETITORI METABOLICI

Attualmente si conoscono quattro gruppi di microrganismi che interferiscono direttamente o indirettamente sulla produzione di bioidrogeno da carboidrati: batteri solfato riduttori (SRB), batteri metanigeni (MPB), batteri omoacetogeni (HAB) e batteri produttori di acido lattico (LAB).

I batteri omoacetogeni sono stati osservati per la prima volta da Fischer et al. nel 1932; sono microrganismi strettamente anaerobi estremamente versatili, i quali sono in grado di convertire differenti substrati in acetato. Questo implica che negli studi condotti, si

potrebbe verificare un accumulo di acetato e una riduzione dell'idrogeno prodotto proprio per la presenza di tali microrganismi.

Il pretrattamento termico, che come verrà esposto in seguito, è il più comune, tuttavia non permette di inibire completamente i batteri omoacetogeni, poiché all'interno di questo gruppo di microrganismi, si ritrovano anche dei microrganismi che appartengono al genere dei *Clostridium*. Quindi, l'unico parametro operativo che può essere adottato per ridurre il consumo di idrogeno, è quello di rimuovere l'anidride carbonica dallo spazio di testa, perché, costituisce la fonte di carbonio utilizzata per la produzione di nuovo acetato.

I batteri metanigeni sono considerati i principali microrganismi consumatori di idrogeno in ambiente anaerobico. Esistono diverse opzioni per inibire l'attività metanigena: inibizione chimica, basso pH, pretrattamento termico dell'inoculo e basso HRT.

I rifiuti provenienti dall'industria della carta, dalle distillerie e dall'industria del pesce, contengono alte concentrazioni di solfati. I batteri solfato riduttori, durante il processo di fermentazione, anche per basse concentrazioni di solfato, consumano l'idrogeno producendo solfuri, prodotti estremamente dannosi per le celle a combustibile. L'unico parametro su cui si può agire è il pH. Per valori di pH inferiori a 6 si ha una significativa inibizione dell'attività dei SRB.

Noike et al. osservarono un cambio nel metabolismo fermentativo con produzione di acido lattico, a causa della presenza di batteri produttori di acido lattico (LAB) all'interno dell'inoculo. È stato inoltre evidenziato, che la concentrazione di tali batteri aumenta con l'aumentare del carico di substrato organico alimentato. Attualmente non vi sono pretrattamenti che permettano di inibire tali microrganismi. (Guo, et al., 2010; Noike, et al., 2002).

1.4.3.3 PRETRATTAMENTI

I metodi di pretrattamento implementati sin'ora includono: trattamento termico, trattamento acido o basico, la combinazione delle due metodologie, ossia acidificazione o basificazione dell'inoculo con successivo shock termico, aerazione, trattamento con cloroformio e congelamento e scongelamento (Kan, 2012; Baghchehsaraee, et al., 2008).

Il trattamento termico consiste nel portare e mantenere l'inoculo a temperatura compresa tra i 65°C e 105°C per un tempo compreso tra i 15 minuti e le 2 ore. Il trattamento acido viene eseguito aggiustando il pH dell'inoculo a 3 con HCl 1N e mantenendo questo valore di acidità per 24 ore. Il pretrattamento basico, operativamente è simile, e viene condotto

portando il pH dell'inoculo a 10 con NaOH 1N e mantenendo questo valore di pH per 24 ore. La combinazione di trattamento chimico e termico, consiste nel trattare chimicamente l'inoculo e poi sottoporre questo a shock termico. Il trattamento di aerazione viene invece effettuato aerando l'inoculo per 24h. Infine il pretrattamento con cloroformio consiste nell'aggiungere una soluzione di cloroformio di concentrazione nota (2%) al fango.

Molte delle sperimentazioni condotte negli ultimi anni hanno avuto l'obiettivo di confrontare tra loro gli effetti dei diversi pretrattamenti, analizzando la massima produzione di idrogeno e il suo andamento nel tempo, l'efficienza di degradazione del substrato, la concentrazione della biomassa e l'andamento o il valore finale di pH.

Per quanto riguarda gli effetti sulla produzione di idrogeno, la maggior parte delle sperimentazioni ha dimostrato che la produzione di idrogeno a seguito di inoculo pretrattato risulta essere maggiore rispetto a quella ottenuta dall'inoculo tal quale. Lo studio condotto da Kan (Kan, 2012) ha dimostrato che il pretrattamento termico consente di ottenere produzioni di idrogeno in termini volumetrici maggiori rispetto alle metodologie confrontate, ossia: acidificazione, basificazione e pretrattamento acido/basico e termico combinato. Lo stesso risultato è stato osservato da Wang et al. (Wang, et al., 2008) i quali hanno comparato tra loro pretrattamento termico, acido, basico, aerazione e trattamento con cloroformio.

In entrambi i casi la sperimentazione è stata condotta in batch. Ciascuna bottiglia è stata preparata aggiungendo l'inoculo desiderato, una soluzione di glucosio come substrato, e una soluzione di macronutrienti. Al termine dell'allestimento, il pH di ciascuna bottiglia è stato modificato con HCl (1M) e NaOH (1M) in modo da ottenere un pH iniziale noto e pari a 7. Infine, ambedue le prove prevedevano il flussaggio delle bottiglie con azoto o argon per alcuni minuti, in modo da rimuovere l'ossigeno disciolto.

L'andamento della produzione volumetrica di idrogeno è il medesimo per ciascuna prova. Ogni bottiglia presenta un ritardo di produzione dovuto al fenomeno di germinazione delle spore con successivo ritorno alla forma vegetativa del microrganismo. Tale ritardo varia in funzione del pretrattamento a cui è stato sottoposto l'inoculo, poiché tutte le bottiglie sono poste nelle stesse condizioni operative. In particolare, il ritardo osservato per pretrattamento chimico è simile a quello della prova di controllo con inoculo tal quale; mentre il ritardo di inoculo pretrattato termicamente, con cloroformio ed aerazione risulta essere superiore, e varia tra le 10 e le 14 ore (Wang, et al., 2008).

In entrambi gli studi si è potuto osservare come la produzione di idrogeno sia maggiore nelle prove con inoculo pretrattato, rispetto a inoculo tal quale, tranne per il trattamento con cloroformio. Una possibile spiegazione a questo fenomeno è che il cloroformio, in concentrazioni comprese tra 0.25 e 5% (Hu, et al., 2007) possa sopprimere l'attività dei batteri produttori di idrogeno.

Il pretrattamento cui corrisponde la massima produzione è per l'appunto il pretrattamento termico (Fig. 10). Questo risultato è probabilmente dovuto al fatto che tale pretrattamento non solo elimina i batteri metanigeni, ma è anche particolarmente efficace nel rimuovere i batteri omoacetogeni.

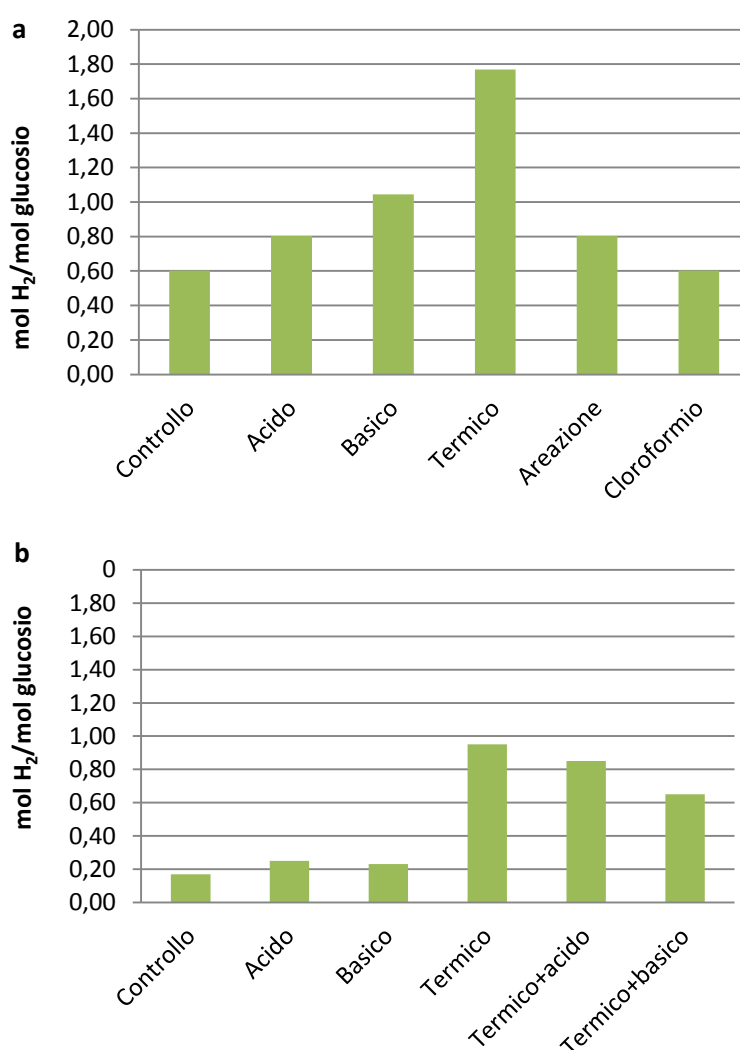


Fig. 10 Effetti del pretrattamento di fango di digestione anaerobica sulla produzione di idrogeno espressa in termini di moli di H₂ prodotte per mole di glucosio consumata. (a) Wang et al. dopo 36h; concentrazione di glucosio 6.7 g/L; temperatura di 35°C; pH iniziale di 7; 177 mg SSV.; (b) Kan dopo 72h; concentrazione di glucosio 20 g/L; temperatura di 20°C; pH iniziale pari a 7; volume di inoculo di 30 mL. Tutte le produzioni di gas sono state riportate alle condizioni standard (0°C, 760 mm Hg).

Il trattamento termico da solo permette di produrre idrogeno da 3 a 5,3 volte di più rispetto alla prova condotta con inoculo tal quale.

Al termine di ciascuna prova sono state misurate le concentrazioni di acidi grassi volatili ed alcuni metaboliti solubili, acetato ed etanolo sono stati i metaboliti maggiormente prodotti. La concentrazione di acido acetico delle prove condotte con inoculo pretrattato risulta però inferiore a quella della prova con inoculo tal quale. Questo dimostra che un pretrattamento dell'inoculo consente di inibire l'attività di batteri omoacetogeni, i quali consumano l'idrogeno prodotto producendo nuovo acetato.

Un ulteriore fattore che influisce sulla produzione di idrogeno e sulle comunità batteriche è il pH. Il pH ottimale per i microrganismi produttori di idrogeno è compreso tra 5,5 e 6; un pH inferiore a 4 determina un'inibizione completa dei batteri *Clostridium* e quindi una bassa produzione di idrogeno.

Pretrattamento	pH finale	
	Kan	Wang et al.
Controllo	3,8	3,4
Acido	3,8	4
Basico	3,7	3,5
Termico	4,5	4,3
Areazione	–	3,5
Cloroformio	–	3,5
Termico+acido	4,6	–
Termico+basico	4,3	–

Tab. 5 Effetto del pH finale sulla produzione di idrogeno (Kan, 2012) (Wang, et al., 2008).

L'assenza di pretrattamento o un trattamento chimico determina un pH finale inferiore a 4, a causa dell'alta produzione di acidi grassi volatili (Tab. 5).

L'inoculo pretrattato mediante shock termico non solo consente la più elevata produzione di idrogeno, ma anche la massima efficienza di degradazione del substrato. Wang et al. dimostrano infatti che gli inoculi pretrattati con il metodo acido, basico o termico hanno un'efficienza di degradazione superiore all' inoculo non trattato, con valori compresi tra 80 e 98%, con la massima rimozione di glucosio associata al pretrattamento termico (Wang, et al., 2008).

Lo stesso studio ha osservato infine, che la concentrazione di biomassa al termine delle prove con fango pretrattato è superiore a quella per l'inoculo tal quale, e che è massima proprio per trattamento termico.

Il pretrattamento termico risulta dunque essere il metodo più semplice ed efficace per selezionare le specie batteriche di interesse.

Ulteriori indagini sono state effettuate da Baghchehsaraee et al. (Baghchehsaraee, et al., 2008), i quali hanno comparando l'effetto della temperatura del trattamento sulla selezione batterica e sulla conseguente produzione di idrogeno in due differenti inoculi: fango di digestione anaerobica e fanghi attivi.

Le due tipologie di inoculo sono state sottoposte a 65, 80 e 95°C per 30 minuti.

La sperimentazione è stata condotta in batch; ogni bottiglia è stata preparata con inoculo e una soluzione di nutrienti contenete glucosio 10 g/L come unica fonte di carbonio. In seguito il pH iniziale di ciascuna prova viene portato a 6.7, e la bottiglia flussata con azoto per un minuto.

Nel corso della prova è stato misurato il volume di biogas prodotto, la sua composizione e la concentrazione di acidi organici quali: acido acetico, acido butirrico, acido iso-butirrico, acido lattico, acido valerico, acido iso-valerico e acido formico.

La massima produzione di idrogeno è stata osservata per le prove con inoculo pretrattato a 65 e 80°C, ed è rispettivamente pari a $1.64 \pm 0.07 \text{ molH}_2/\text{mol}_{\text{glucosio}}$ e $1.32 \pm 0.21 \text{ molH}_2/\text{mol}_{\text{glucosio}}$ per inoculo proveniente da fanghi attivi, e $2.30 \pm 0.08 \text{ molH}_2/\text{mol}_{\text{glucosio}}$ e $2.12 \pm 0.05 \text{ molH}_2/\text{mol}_{\text{glucosio}}$ per fango anaerobico.

I risultati ottenuti confermano quanto detto in precedenza, ossia che effettuando un pretrattamento termico è possibile selezionare i ceppi batterici più idonei al processo desiderato, aumentandone quindi la produttività. Infatti il volume di idrogeno prodotto con inoculo sottoposto a shock termico è da 4 a 6 volte superiore rispetto a quello ottenuto da inoculo non trattato.

Produzione e produzione specifica diminuiscono con l'aumentare della temperatura di pretrattamento; infatti il più alto tasso di produzione ($2.3 \text{ molH}_2/\text{mol}_{\text{glucosio}}$) e produzione specifica di idrogeno ($63.3 \text{ mmol H}_2/\text{g SSV}$) sono stati riscontrati per la prova condotta con fango anaerobico pretrattato a 65°C.

La concentrazione di metaboliti solubili è stata misurata a vari intervalli temporali al fine di ottenerne l'andamento nel tempo. La produzione di idrogeno è accompagnata dalla formazione di grandi quantità di acetato e butirato. Il più basso rapporto butirato/acetato è stato riscontrato proprio nelle prove condotte con inoculo pretrattato a 65°C.

Alti livelli di etanolo e acido lattico sono stati osservati solo per le prove relative a inoculo non trattato e alla prova con fango attivo pretrattato a 95°C, alle quali è associata anche una scarsa produzione di idrogeno. Il metabolita predominante è l'acido lattico con concentrazioni variabili tra 51% e 68,3% rispetto ai metaboliti solubili totali. Questo risultato è in linea con quanto osservato nelle sperimentazioni di Noike et al. e Kawagoshi et al., ossia che la produzione di acido lattico inibisce l'attività dei batteri idrogenotrofi. Per quanto riguarda la sperimentazione di Baghchehsaraee et al. (2008), in ciascuna prova, il pH iniziale è stato modificato fino a raggiungere il valore di 6,7. Nel corso della sperimentazione il pH è stato poi monitorato e ciò ha permesso di osservare che si ha una forte riduzione che porta a valori compresi tra 3,8 e 4,6 nelle prime 24 ore dall'avvio delle prove di fermentazione. La diminuzione di pH è più rapida e maggiore nel caso di inoculo non trattato e pretrattato a 95°C.

La produzione di idrogeno e le comunità microbiologiche impiegate sono influenzate dalla tipologia di pretrattamento adottato e dalla modalità con cui questo viene eseguito. In particolare, il trattamento termico risulta essere quello più efficace al fine di garantire alti tassi di produzione di idrogeno.

1.4.4 SUBSTRATO

I principali criteri di selezione del materiale da utilizzare come substrato nella produzione di bioidrogeno, sono la disponibilità, il costo, il contenuto di carboidrati e la biodegradabilità dello stesso.

La maggior parte degli studi sono stati condotti impiegando substrati puri, facilmente biodegradabili, quali: glucosio, saccarosio e lattosio. Tuttavia ciò rende il processo più costoso. Per questo motivo, sono stati utilizzate come substrato anche biomasse di rifiuto, principalmente residui derivanti dall'agricoltura, reflui zootecnici e dell'industria alimentare contenenti carboidrati sufficientemente concentrati al fine di ottenere un processo più sostenibile, energeticamente favorevole e meno costoso (Hawkes, et al., 2002).

I substrati agricoli utilizzati per la produzione di bioidrogeno includono paglia, pannocchie, gambi, bagassa e altri residui lignocellulosici. Questi materiali sono estremamente abbondanti e hanno il vantaggio di essere poco costosi.

La biomassa lignocellulosica è composta da tre componenti distinte, cellulosa, emicellulosa e lignina. I residui agricoli, ad esempio, paglia di grano, mais e riso sono costituiti rispettivamente da: 32-47% di cellulosa, 19-27% di emicellulosa e il restante 5-24% di lignina (Ren, et al., 2009).

La produzione di bioidrogeno a partire da questi materiali è limitata dall'attività idrolitica della struttura eterogenea e cristallina della lignina. Per questo motivo generalmente viene effettuato un pretrattamento del substrato chiamato preidrolisi volto ad alterarne la struttura della biomassa per rendere più accessibile la cellulosa agli enzimi che convertono polisaccaridi in zuccheri semplici. I pretrattamenti principali si basano su metodi meccanici, fisici, chimici o biologici.

La tabella riportata di seguito (Tab. 6) mostra alcuni esempi di produzione di idrogeno in prove in batch a partire da residui agricoli tal quali o sottoposti a una fase di preidrolisi.

Tab. 6 Produzione di idrogeno da rifiuti e biomasse derivanti dall'attività agricola in modalità batch (Guo, et al., 2010). I margini tratteggiati, fanno riferimento a una stessa prova sperimentale condotta in condizioni differenti.

Substrato	Massima produzione di idrogeno	Preidrolisi alimento	Temperatura
–	mL H ₂ /g _{SV}	–	°C
Residui di mais	9	–	35
	68	1,5 Mpa per 10min	35
Residui di mais	49	220°C per 3 min	35
	66	1,2% HCl + 200°C per 1 min	35
Stocchi di mais	3	–	36
	57	0,5% NaOH	36
	150	0,2% HCl+ 100°C per 30 min	36
Foraggio insilato	6	–	35
	16	–	70
Foglie di mais	18	–	70
	42	130°C per 30 min	70
Crusca di riso	61	n.d	35
Paglia di grano	1	–	36
	68	2% HCl+ microonde	36
Paglia di grano	49	130°C per 30 min	70
Crusca di frumento	43	n.d	35

La produzione di idrogeno maggiore si ha per fermentazione degli steli di mais (condotta da Zhang et al.), opportunamente pretrattati con una combinazione di trattamento chimico e termico. Il valore ottenuto di $150 \text{ mL H}_2 \text{ g}_{\text{SV}}^{-1}$ è più del doppio di quello ottenuto con in solo pretrattamento chimico ($57 \text{ mL H}_2 \text{ g}_{\text{SV}}^{-1}$), e circa 50 volte il valore riscontrato con alimento tal quale ($3 \text{ mL H}_2 \text{ g}_{\text{SV}}^{-1}$). L'efficacia di un opportuno pretrattamento viene dimostrata anche da Fan et al., i quali pretrattando paglia di grano con acido (HCl al 2%) e microonde ottengono un incremento degli zuccheri solubili dallo 0.2% al 9.6%, e una riduzione di cellulosa dal 22% al 15% e di emicellulosa dal 21% al 13% (Guo, et al., 2010). La massima quantità di idrogeno prodotto in questo caso è di $68 \text{ mL H}_2 \text{ g}_{\text{SV}}^{-1}$, ben 136 volte superiore al valore ottenuto con alimento non trattato ($1 \text{ mL H}_2 \text{ g}_{\text{SV}}^{-1}$).

Anche i reflui zootecnici costituiscono una risorsa importante. La produzione di bioidrogeno a partire da questi materiali varia tra i 4 e i $29 \text{ mL H}_2 \text{ g}_{\text{SV}}^{-1}$, come si nota dalla tabella seguente (Tab. 7), ed è di molto inferiore rispetto a quella ottenuta a partire da rifiuti agricoli vista in precedenza.

Tab. 7 Produzione di idrogeno da rifiuti e biomasse derivanti dall'allevamento di bestiame (Guo, et al., 2010). I margini tratteggiati, fanno riferimento a una stessa prova sperimentale condotta in condizioni differenti.

Substrato	Massima produzione di idrogeno	Preidrolisi alimento	Temperatura	Modalità operativa reattore
–	$\text{mL H}_2/\text{g}_{\text{SV}}$	–	°C	–
Feci e urina bovine	18	–	75	Batch
	29	–	60	Batch
	0,7	–	37	Batch
Letame bovino	65	90°C per 3h	52	Batch
Reflui bovini	53	–	45	Batch
Letame bovino	18	0,2% HCl+ 100°C per 30 min	36	Batch
	14	0,2% NaOH+ 100°C per 30 min	36	Batch
	14	Radiazione infrarossa per 2 h	36	Batch
Liquame suino	4	–	70	Batch
Liquame suino	209	–	35	semi-continuo

In molte sperimentazioni il substrato viene pretrattato chimicamente o termicamente oppure viene impiegato in prove condotte in condizioni termofile, al fine di inibire l'attività di batteri metanigeni e di igienizzare il materiale.

La più alta produzione di idrogeno osservata, è pari a $65 \text{ mL H}_2 \text{ g}_{\text{SV}}^{-1}$, ed è associata all'utilizzo di letame bovino fresco, pretrattato termicamente alla temperatura di 90°C per una durata di 30 minuti (Guo, et al., 2010).

Valori molto bassi di produzione si riscontrano per substrati non pretrattati o utilizzati in condizioni mesofile. Nel caso di liquame suino si osserva una resa pari a $4 \text{ mL H}_2 \text{ g}_{\text{SV}}^{-1}$, dovuta sostanzialmente a un'elevata concentrazione di ammonio ($1.5\text{-}4 \text{ gNL}^{-1}$ a seconda del tipo di liquame) che genera un'inibizione nei processi biologici anaerobici e di produzione di idrogeno per via fermentativa.

Anche i rifiuti dell'industria alimentare offrono grandi potenzialità, infatti, hanno un elevato contenuto energetico e sono facilmente biodegradabili. E' possibile utilizzare molti materiali, come: residui di cucina, co-prodotti dell'industria alimentare, reflui industriali come il siero di latte, e molti altri. I rendimenti ottenuti sono estremamente variabili (da $3 \text{ mL H}_2 \text{ g}_{\text{SV}}^{-1}$ a $209 \text{ mL H}_2 \text{ g}_{\text{SV}}^{-1}$), e ciò è dovuto alle diverse composizioni chimiche, ma in media, si ottengono valori sostanzialmente superiori a quelli ottenuti con residui agricoli e reflui derivanti dall'allevamento di bestiame (Tab. 8).

Tab. 8 Produzione di di idrogeno da rifiuti e biomasse derivanti dall'industria alimentare (Guo, et al., 2010).I margini tratteggiati, fanno riferimento a una stessa prova sperimentale condotta in condizioni differenti.

Substrato	Massima produzione di idrogeno	Preidrolisi alimento	Temperatura	Modalità operativa reattore
–	$\text{mL H}_2/\text{g}_{\text{SV}}$	–	$^\circ\text{C}$	–
Riso	96	–	35	Batch
Carote	71	–	35	Batch
Cavolo	62	–	35	Batch
Pelle di pollo	10	–	35	Batch
Uova	7	–	35	Batch
Rifiuti alimentari	196	160°C per 2h	36	Batch
Rifiuti alimentari	60	n.d	35	Batch
Rifiuti alimentari	77	–	35	Batch
Rifiuti alimentari	125	–	35	CSTR
Rifiuti alimentari	63	pH 12,5 per	35	ASBR

		24h		
Rifiuti alimentari	65	–	40	Semi-continuo
Rifiuti alimentari	13	–	20	CSTR
	3	–	37	CSTR
	16,5	–	55	CSTR
Rifiuti di cucina	72	–	n.d	plug flow inclinato
Molassa	2,5 molH ₂ /mol _{saccarosio}	–	37	CSTR
Molassa	2,1 molH ₂ /mol _{esoso}	–	35	CSTR
Farina di fave	21	n.d	35	CSTR
Siero di latte	290	NaHCO ₃ 20 g/L	35	CSTR
Reflui olio di palma	84,4	–	60	Batch

Molassa e siero di latte presentano le massime rese di produzione di idrogeno, rispettivamente 2,5 molH₂/mol_{saccarosio} e 290 mL H₂/g_{SV}.

In conclusione, residui agricoli, reflui dell'attività zootecnica e dell'industria alimentare risultano essere substrati potenzialmente idonei per il processo di dark fermentation. Rifiuti e residui alimentari danno rendimenti maggiori, seguiti da residui agricoli e reflui zootecnici.

1.4.4.1 CONCENTRAZIONE INIZIALE E CARICO ORGANICO

Oltre alle caratteristiche del substrato, operando in batch è importante definire la concentrazione iniziale ottimale da alimentare al reattore.

Molti studi riportano elevate produzione di idrogeno da rifiuti e biomasse per concentrazioni iniziali di substrato inferiori a 40 gCOD L⁻¹ (Lin, et al., 2012).

E' stato inoltre osservato che i maggiori rendimenti di conversione si ottengono per basse concentrazioni di substrato, mentre all'aumentare di tale concentrazione si ha una riduzione della resa di produzione di idrogeno (Van Ginkel, et al., 2001; Danko, et al., 2008; Kyazze, et al., 2005).

Van Ginkel et al. osservarono che per concentrazioni di substrato di 15-35 gCOD/L, il rendimento di conversione è elevato (38.9-46.6 mLH₂/(gCOD/L)), poiché il substrato viene utilizzato in maniera più efficiente; mentre, aumentando la concentrazione di substrato iniziale, il sistema viene sovraccaricato provocando un'iniziale produzione di idrogeno che determina un innalzamento della pressione parziale di H₂ e un abbassamento del pH. Se il

sovraccarico persiste, il substrato in eccesso può rimanere inutilizzato oppure può essere convertito in prodotti finali più ridotti di acetato e butirato come gli alcoli (Van Ginkel, et al., 2001).

Danko et al., ottennero i massimi rendimenti pari a $1.5-2 \text{ molH}_2/\text{mol}_{\text{substrato consumato}}$ per concentrazioni iniziali di substrato comprese tra 5.3 e 10.6 gCOD/L, valori inferiori rispetto a quelli osservati da Van Ginkel et al.

Kyazze et al. verificarono la stabilità del processo e il rendimento in termini di idrogeno, utilizzando un reattore completamente miscelato alimentato in semi continuo con una soluzione di saccarosio con concentrazione iniziale variabile tra 11 e 56 gCOD/L e un valore di HRT pari a 12 ore. L'idrogeno viene prodotto dopo 15 ore dall'avvio, in modo stabile e regolare per le concentrazioni iniziali di 22 gCOD/L e 44 gCOD/L. Passando da una concentrazione iniziale di 11 gCOD/L a 56 gCOD/L si osserva una forte riduzione nel rendimento di produzione, da 1.7 ± 0.2 a $0.8 \pm 0.1 \text{ molH}_2/\text{mol}$ esoso.

Danko et al., osservarono inoltre che l'effetto della concentrazione iniziale di arabinosio sulla produzione di idrogeno risulta essere meno accentuato nel caso si utilizzi biomassa granulare, rispetto a fango di digestione anaerobica tal quale.

Nonostante siano stati adottati parametri di processo e matrici differenti, ciò che si è riscontrato è che un sovraccarico del substrato alimentato determina instabilità e inibizione del processo.

All'aumentare della concentrazione iniziale di substrato, si ha una riduzione sia dell'efficienza di rimozione del substrato (Danko, et al., 2008; Kyazze, et al., 2005) sia della percentuale di idrogeno presente nel biogas prodotto (Van Ginkel, et al., 2001; Kyazze, et al., 2005).

1.4.4.2 NUTRIENTI

Oltre ad azoto (N) e fosforo (P) è necessario aggiungere anche ferro (Fe) e zolfo (S), poiché sono componenti significativi per la produzione dell'enzima idrogenasi.

Molti studi utilizzano soluzioni di nutrienti piuttosto complesse, altri aggiungono soltanto azoto e fosforo (Hawakes, et al., 2006).

La richiesta di nutrienti da parte dei batteri acidogeni, è funzione della tipologia dei batteri e delle condizioni sperimentali (H. Argun, 2011), per questo motivo la maggior parte degli studi di laboratorio con substrati puri aggiunge nutrienti in eccesso rispetto al carbonio

disponibile, il quale rappresenta così il substrato limitante la crescita batterica (Zoetemeyer et al., 1982).

Nella Tab. 9 vi sono sei esempi di soluzioni di nutrienti utilizzate in reattori operanti in continuo e alimentati con glucosio (le prime 4 colonne) o amido (la quinta colonna) o ancora saccarosio (l'ultima colonna).

Tab. 9 Concentrazione di nutrienti e substrato in termini di esosi [mg/L], e rapporto tra COD e azoto e fosforo in sei studi con produzione continua di idrogeno a partire da culture miste (Hawakes, et al., 2006).

Elemento	(H.H.P. Fang, 2002)	(Lin C.Y., 1999)	(Mizuno O., 2000)	(Zoetemeyer R.J., 1982)	(Hussy I., 2003)	(Mu Y., 2000)
N	131	929	680	351	680	72,9
K	112	56	113	97	183,7	53
S	42	5,5	0,6	12,8	9,9	–
Mg	32	13	32	3,6	37,8	12
Ni	12	–	0,13	–	12,05	1,23
Ca	14	–	–	0,2	18	18,02
B	0,4	–	0,07	–	1,36	0,69
Mo	0,01	–	0,2	–	7,61	8,66
Zn	11	–	0,24	0,4	11,04	2,4
Co	6,2	0,04	0,74	–	3,72	1,24
Cu	3,7	1,3	–	–	3,73	1,42
Mn	8,3	–	0,69	–	6,95	1,39
I	–	–	1,91	–	–	–
Fe	17,2	5,03	1	2,9	17,3	11
P	102,3	22	44,5	76,2	101,5	21,03
Esoso	7000	20000	10000	10000	7765	5330
COD:N	57:1	23:1	16:1	30:1	11,4:1	73:1
COD:P	73:1	970:1	240:1	140:1	77:1	253:1

Gli elementi presenti in tutte le sei soluzioni oltre ad N e P sono K, Mg e Fe. Il rapporto COD:N varia tra 11:1 e 73:1, mentre il rapporto COD:P varia tra 73:1 e 970:1. In tutti gli studi, a parte quello condotto da Zoetemeyer et al., per il quale non è stato misurato, il rendimento di produzione di idrogeno è compreso tra 1.4 e 2.1 mol mol esosi⁻¹.

Quindi, a dispetto dell'ampia varietà di nutrienti addizionati, il rendimento di produzione di idrogeno è piuttosto soddisfacente ed uniforme.

In futuro sarà necessario condurre ulteriori studi in merito alla soluzione da aggiungere, in funzione del substrato utilizzato e delle condizioni operative fissate.

1.4.4.3 TEMPERATURA

La temperatura è uno dei principali fattori di influenza dell'attività batterica e della fermentazione. E' stato dimostrato che, in un appropriato intervallo di temperatura, aumentando tale parametro sino ad un valore ottimale aumenta la produzione di idrogeno; aumentando ulteriormente la temperatura oltre tale valore si ha invece un calo di produzione (Jianlong Wang, 2009).

Le sperimentazioni condotte sino a questo momento per determinare gli effetti della temperatura sul processo di fermentazione si sono focalizzate principalmente sull'uso di substrati semplici quali glucosio e saccarosio con alimentazione in discontinuo (modalità batch), e su intervalli di temperatura mesofilo (30-35°C) e termofilo (50-60°C) (Chiu-Yue Lin, 2003); tuttavia sono state condotte delle prove anche in condizioni di ipertermofilia (70-80°C) (T.A. Kotsopoulos, 2006).

Inoculo	Substrato	Tipologia di reattore	Temperatura		HY		Riferimento
			°C				
-	-	-	ΔT	T_{ott}	-		-
<i>Ethanoligenens harbinense</i> YUAN-3	Glucosio	Batch	20-44	37	1,34	mol/mol glucosio	(D.F. Xing, 2008)
Fango anaerobico	Glucosio	Batch	25-55	40	2,21	mol/mol glucosio	(J.L. Wang, 2008)
Fango anaerobico	Glucosio	Batch	33-41	41	1,67	mol/mol glucosio	(Yang Mu, 2006)
Fango anaerobico	Saccarosio	Batch	25-45	35,1	3,7	mol/mol saccarosio	(G. Wang, 2005)
Fango anaerobico	Saccarosio	Batch	25-45	35,5	2,03	mol/mol glucosio	(G. Wang, 2006)
Fango di digestione anaerobica	Reflui dal trattamento del riso	Batch	37-55	37	346	mL/g carboidrato	(H.H.P Fang, 2006)
Fanghi da impianto civile	Saccarosio	Continuo	30-45	40	3,88	mol/mol saccarosio	(K.S. Lee, 2006)
<i>Thermoanaerobacterium thermosacchatolyticum</i> PSU-2	Saccarosio	Batch	40-80	60	2,53	mol/mol esoso	(S. O-Thong, 2008)
Fanghi da impianto civile	Amido	Batch	37-55	55	1,44	mmol/g amido	(K.S. Lee, 2008)
Fanghi da impianto civile	Xilosio	Continuo	30-55	50	1,4	mol/mol xilosio	(C.Y. Lin, 2008)
Letame bovino	Letame bovino	Batch	37-75	60	743	mL/kg letame bovino	(H. Yokoyama, 2007)
Liquame bovino	Liquame bovino	Batch	37-85	60	392	mL/L liquame	(H. Yokoyama, 2007)
Fango di digestione anaerobica	Rifiuti organici	Semi-continuo	37-55	55	360	mL/g SV	(I. Valdez-Vazquez, 2005)

Tab. 10 Effetto della temperatura sulla fermentazione al buio. ΔT : intervallo sperimentato; T_{ott} : temperatura ottimale osservata; HY: resa di produzione (Jianlong Wang, 2009).

Dalla Tab. 10 è possibile osservare che le temperature ottimali non sono costanti, ma variano in funzione di substrato e inoculo.

Lin et al., (2003) lavorarono a temperatura nell'intervallo tra 15°C e 34°C con fango proveniente da digestore anaerobico mesofilo come inoculo, e con glucosio come substrato. Nonostante la biomassa utilizzata fosse di tipo mesofilo, nel corso della prova si è adattata perfettamente alle variazioni di temperatura, senza che si verificassero grossi cambiamenti di produzione e composizione di biogas e concentrazione di VFA. La produzione di idrogeno tende ad aumentare in modo significativo con l'aumento della temperatura.

La massima resa è stata misurata nell'intervallo di temperatura 30-34°C, con SRT di 0.25 giorni e OLR di 416 mmol glucosio L⁻¹ d⁻¹, si sono ottenute 1.15 mol H₂·mol glucosio⁻¹ e 214 mmol H₂ g SSV⁻¹d⁻¹. All'aumentare della temperatura si è osservato un incremento dell'efficienza di degradazione del substrato, della concentrazione di VFA, della percentuale di idrogeno nel biogas e della portata di idrogeno prodotto.

Mu et al., (2006) condussero uno studio in campo mesofilo (33-41°C) per chiarire quale fosse l'andamento del processo di fermentazione in termini di produzione di idrogeno, distribuzione dei sottoprodotti, crescita cellulare ed efficienza di degradazione del substrato.

Il fermentatore utilizzato alimentato con una soluzione di glucosio e macro-nutrienti e inoculato con fango di digestione anaerobica pretrattato termicamente operava a 33, 35, 37, 39 e 41°C.

All'aumentare della temperatura è stato osservato un incremento sia dell'efficienza di degradazione del substrato sia della velocità con cui questo avviene. A 33°C il glucosio viene degradato con un'efficienza del 97.6±2.6% in 20 ore; a 41°C il glucosio viene degradato in sole 10 ore con un'efficienza del 98.9±2.5%. Con l'aumentare della temperatura si è inoltre riscontrato un incremento della produzione totale di biogas, da circa 0.97±0.04 molH₂/mol_{glucosio} a 33°C a circa 1.67±0.04 molH₂/mol_{glucosio} a 41°C. La percentuale di idrogeno nel biogas ha seguito un andamento simile, raggiungendo il valore massimo di 57.6±5.0% proprio a 41°C.

Inoltre, all'aumentare della temperatura si ha una riduzione del tempo di ritardo in fase iniziale da 11.3 ore a 33°C a 5.6 ore a 41°C.

Il rendimento di produzione specifico risulta massimo alla temperatura di 39°C, e decresce da 3922±45 mLgSSV⁻¹d⁻¹ a 3780±39 mLgSSV⁻¹d⁻¹ a 41°C; mentre l'efficienza di produzione cresce con l'aumento della temperatura e vale 1.67±0.04 molH₂ mol glucosio⁻¹ a 41°C.

La crescita cellulare ha un andamento simile a quello riscontrato per l'efficienza di degradazione del substrato, con concentrazione di biomassa massima per la temperatura di 41°C.

Per quanto riguarda i VFA prodotti e la loro concentrazione, si è notato che sino a 39°C i prodotti prevalenti erano acetato ed etanolo; a 39 e 41°C la concentrazione di butirato aumenta a scapito di quella di etanolo, e questo permette infatti di massimizzare la produzione di idrogeno.

Nonostante, le condizioni mesofile siano più economiche rispetto a condizioni operative termofile grazie a inferiori costi energetici, in alcuni casi può risultare opportuno lavorare in condizioni termofile; le elevate temperature permettono di eliminare gli agenti patogeni igienizzando il materiale e consentono di ottenere migliori condizioni cinetiche e termodinamiche di fermentazione (Tong Zhang, 2003; T.A. Kotsopoulos, 2006). Inoltre lavorare in condizioni iper-termofile permette di impiegare anche substrati più complessi e garantisce l'inibizione di eventuali batteri metanigeni (T.A. Kotsopoulos, 2006).

Zhang et al., (2003) utilizzano come inoculo del digestato di origine civile proveniente da un digestore mesofilo. L'inoculo viene impiegato in reattori batch alimentati con una soluzione di amido e nutrienti. Vengono effettuate due prove, una alla temperatura di 37°C e una di 55°C. Si osserva che l'inoculo mesofilo può essere impiegato anche in campo termofilo senza che vi sia un'adeguata acclimatazione; naturalmente il ritardo iniziale è superiore a quello dell'inoculo sottoposto alla temperatura di 37°C, perché le popolazioni microbiche hanno bisogno di più tempo per adattarsi alle nuove condizioni ambientali. Nonostante ciò in condizioni termofile si ha una maggior resa di produzione di idrogeno. A 37°C si ottengono 47 mL H₂ g amido⁻¹ e 480 mLH₂ gSSV⁻¹d⁻¹, contro i 78mLH₂ g amido⁻¹e 365 mLH₂ gSSV⁻¹d⁻¹ a 55°C.

1.4.4.4 pH

Il pH non solo influisce sull'attività dell'enzima idrogenasi, ma incide anche sulla struttura delle comunità microbiche, sulle vie metaboliche seguite da quest'ultime e di conseguenza sui prodotti finali di reazione.

Il processo di dark fermentation porta alla contestuale produzione di idrogeno e VFA, questi ultimi, determinano un'acidificazione del mezzo di reazione; è opportuno prestare attenzione, poiché lavorare a pH troppo bassi può determinare l'inibizione delle comunità batteriche con conseguente riduzione della produzione di idrogeno (Lin, et al., 2012).

E' dunque importante che il pH sia mantenuto nell'intervallo di valori ideale per massimizzare la produzione di idrogeno, intesa come resa potenziale di idrogeno e tasso di produzione. Per questo motivo la maggior parte delle sperimentazioni si è concentrata sul confronto di differenti valori di tale parametro al fine di definire il pH ottimale di lavoro.

Da letteratura i batteri del genere *Clostridium* sono in grado di crescere in un intervallo di pH pari a 4.5-7.0. Un pH di 5.5 risulta ottimale per questi microrganismi, il tasso di produzione specifico di idrogeno risulta massimizzato per pH di 5.5-5.7 (Lin, et al., 2006).

Tuttavia, non esiste un unico valore ideale, il pH ottimale varia infatti in funzione delle condizioni di fermentazione, del tipo di inoculo e del substrato alimentato in termini di tipologia e concentrazione (Wang, et al., 2009).

L'effetto del pH sulla produzione di idrogeno è stato analizzato sia mediante prove condotte con controllo del pH in linea (prove in batch e in continuo), sia mediante prove senza controllo analizzando unicamente l'effetto del pH iniziale (prove in batch).

In questo secondo caso, ossia dove non si ha un controllo di pH, si osserva una forte riduzione di tale parametro nel periodo immediatamente seguente all'avvio della prova, sostanzialmente dovuta alla produzione di acidi associati a loro volta alla produzione di idrogeno. Il calo in fase iniziale, avviene rapidamente nelle prime 5-24 ore dall'avvio della prova (Lee et al., 2002).

Il pH finale raggiunto, è funzione del pH iniziale e della modalità operativa. L'intervallo di valori che si può ottenere al termine della prova è variabile. Ferchichi, et al., analizzando gli effetti di differenti valori di pH iniziale (5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 e 10.0) sulla produzione di idrogeno per via biologica ottengono valori finali compresi tra 5.46-6.13; mentre Lin et al. (2008), per pH iniziale di 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 e 9.0 ottengono un intervallo di valori finali compreso tra 4.8 e 8.9. Li et al., 2008, confrontando pH iniziali pari a 5.0, 6.0 e 7.0 ottengono valori finali compresi tra 4.65 e 4.85 (Fig. 11).

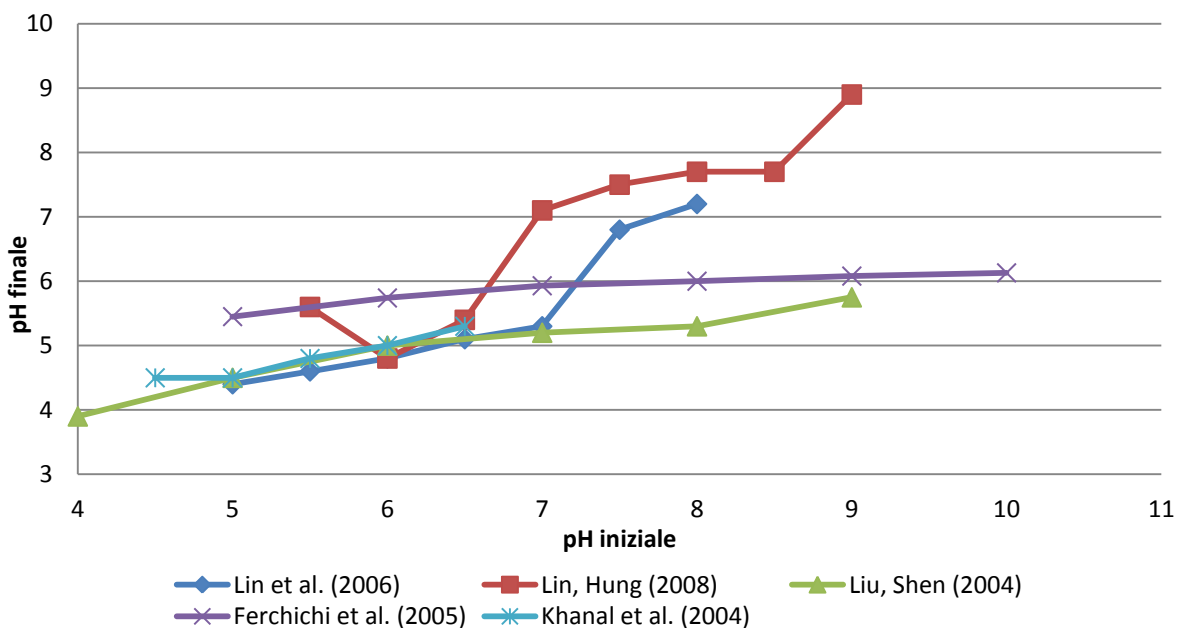


Fig. 11 Confronto tra cinque sperimentazioni dell'andamento del pH finale in funzione del pH iniziale.

Dalla figura precedente (Fig. 11) si osserva come il valore di pH finale vari notevolmente da una sperimentazione ad un'altra, in funzione di modalità operativa, substrato e inoculo adoperato. Non vi sono semplici leggi o modelli in grado di collegare però questi parametri essendo il pH finale influenzato dalla concentrazione e composizioni degli acidi volatili, dall'alcalinità iniziale del mezzo e dalla pressione parziale della CO₂ nello spazio di testa.

Per quanto riguarda l'andamento della produzione di idrogeno in funzione del pH di prova e della concentrazione di substrato, di seguito si riporta un esempio (Tab. 11) .

Tab. 11 Resa potenziale di idrogeno (HY) e durata della produzione in funzione di pH iniziale e concentrazione del substrato (Effects of pH value and substrate concentration on hydrogen production from the anaerobic fermentation of glucose., 2008).

Concentrazione del substrato	pH iniziale					
	5.0		6.0		7.0	
	HY	Durata	HY	Durata	HY	Durata
g/L	mol H ₂ /mol glucosio	h	mol H ₂ /mol glucosio	h	mol H ₂ /mol glucosio	h
5	1,18	25,3	1,21	25,5	1,68	24,4
7,5	1,13	27,3	1,63	27,2	1,85	21,7
10	1,56	33,3	1,34	24,3	1,31	23,0
20	1,05	31,6	0,95	25,8	1,10	19,8

La tabella (Tab. 11), fa riferimento a una sperimentazione in batch condotta da Li et al.(2008), che ha utilizzato sedimenti fluviali come inoculo e una soluzione di glucosio come substrato. La prova, inoltre è stata condotta alla temperatura di 37°C. La massima resa potenziale di 1.85 molH₂/mol glucosio si riscontra per pH pari a 7 e una concentrazione di 7.5 g glucosio/L. Tuttavia, questi dati non mostrano una chiara dipendenza del valore di HY nè dalla concentrazione di substrato nè dal pH iniziale.

Diversamente da quanto osservato da Li et al. (2008), molti studi condotti in batch hanno evidenziato che all'aumentare del pH si ha una riduzione della produzione di idrogeno in termini di volume, resa potenziale, tasso di produzione e produzione specifica (Ferchichi, et al., 2005; Khanal, et al., 2004). L'effetto è più marcato per substrati complessi, perché più difficilmente biodegradabili, come ad esempio nel caso di amido rispetto a glucosio (Khanal, et al., 2004).

Ferchichi, et al., 2005, confrontarono la produzione di idrogeno in una sperimentazione condotta in batch, facendo variare il pH iniziale tra 5 e 10, alimentando siero di latte crudo (87.5% v/v) ad un inoculo puro di *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*. Tasso di produzione e resa potenziale hanno un picco per pH iniziale pari a 6, e sono rispettivamente pari a 28.3 mLH₂/h e 7.89 mmolH₂/g lattosio (corrispondente a 2.7 molH₂/mol lattosio consumata). All'aumentare del pH iniziale si ha una riduzione di questi due parametri.

Khanal, et al., 2004, condussero una serie di test in batch, utilizzando due differenti substrati, amido e saccarosio, facendo variare il pH iniziale tra tra 4.0 e 7.0. Il massimo tasso di produzione specifico è stato ottenuto per pH compreso tra 5.5 e 5.7, e rispettivamente è di 10 mLH₂/h ×g_{SSV} per saccarosio e 4.5 mLH₂/h ×g_{SSV} per amido.

Lin, et al., 2006, utilizzando del compost come inoculo, e alimentando una soluzione di xilosio di concentrazione 20 g COD L^{-1} , variando il pH iniziale tra 5.0 e 8.0 alla temperatura di 35°C ottennero la massima resa potenziale e il massimo tasso di produzione si ottengono per pH iniziale di 6.5, rispettivamente di $1.3 \text{ mol H}_2/\text{mol}_{\text{substrato}}$ e $0.25 \text{ mol H}_2/(\text{Lxd})$.

Per quanto riguarda la durata della prova, Lin, et al. notarono che non vi è correlazione con il pH iniziale. Dalla loro sperimentazione emerse che per pH compresi tra 6 e 8 la prova è più breve (50-52 h) mentre per pH superiori a 8 si ha una durata maggiore (62-80 h) (Lin, et al., 2005).

Khanal, et al. osservarono l'andamento opposto, ossia la riduzione del tempo di prova all'aumentare del pH. La motivazione proposta è la seguente: alti pH iniziali, determinano una rapida produzione di idrogeno e acidi grassi volatili. Ciò porta a una caduta del pH nelle prime ore dall'avvio della prova, generando un ambiente superacido in cui i microrganismi non sono in grado di sopravvivere. Per bassi pH iniziali (4.5), la produzione di idrogeno e sottoprodotti è più graduale, di conseguenza il potere tampone della soluzione non viene impoverito, e la prova ha una durata maggiore (Khanal, et al., 2004).

Quindi utilizzare un pH alto potrebbe essere sufficiente per tamponare la soluzione dagli acidi prodotti per fermentazione, aumentando quindi l'efficienza del processo (Li et al., 2008). Inoltre la maggior parte delle sperimentazioni ha evidenziato che non vi è alcuna produzione di idrogeno per pH inferiori o uguali a 4, a causa dell'inibizione della biomassa (O-Thong, et al., 2008; Liu, et al., 2004).

Un ulteriore parametro influenzato dal pH di prova è l'efficienza di degradazione del substrato.

Lee, et al. appurarono che l'efficienza di degradazione aumenta con l'aumentare del pH iniziale nell'intervallo 3.0-9.0 passando dal 37% al 90%. Per pH compreso tra 5.0 e 7.0 osservarono un andamento stabile pari al 60%, mentre la massima efficienza di degradazione di saccarosio è pari al 95% ed è stata riscontrata per pH 9.5. Per pH superiori non è invece stata osservata degradazione del substrato. (Lee, et al., 2002).

Un andamento analogo è stato evidenziato dalla sperimentazione condotta da Lin, et al. Essi osservarono valori di efficienza minori per pH iniziale basso, ad esempio per pH pari a 4 è stato ottenuto un rendimento di rimozione di circa l'80%. Con il crescere del pH, si ha un incremento dell'efficienza che raggiunge valori superiori al 90%. In particolare per pH compresi tra 5 e 9 il rendimento è costante e pari al 97%, per pH 10 scende al 92%.

Fang, et al. studiando l'intervallo di pH 5.5-7 osservarono efficienze crescenti da 90% ad addirittura il 99% (Fang, et al., 2002).

Purtroppo, l'efficienza di degradazione del substrato non è direttamente correlata alla produzione di idrogeno, infatti nell'intervallo di pH 5-9 si ha una riduzione della resa potenziale di idrogeno. L'elevata efficienza di degradazione e la diminuzione della resa, suggerisce che vi sia un cambio metabolico con produzione di alcol e acidi (Lin, et al., 2007).

L'andamento della concentrazione di prodotti solubili e VFA è funzione del pH (Lin, et al., 2006).

Lin, et al., ottengono un rapporto H₂/HAc nel corso della prova che varia tra 0.2 e 4 in funzione del pH, raggiungendo il massimo a pH 6.5 per il quale si osserva anche la massima resa potenziale (1.3 mol H₂/mol substrato). (Lin, et al., 2006)

Un ulteriore prodotto finale è l'etanolo. La produzione di quest'ultimo si ha generalmente per pH attorno a 8 (Lin, et al., 2008)

Riprendendo l'ultimo esempio proposto, l'etanolo raggiunge la concentrazione massima di 2.6 g/L (4993 mg COD/L) a pH 8 , per il quale si riscontra anche la minima resa potenziale di 0.5 mol H₂/mol_{substrato}.

Il controllo del pH in linea, consente di ottenere rese potenziali maggiori rispetto a sistemi in batch in cui è possibile modificare unicamente il pH iniziale della prova. Tale differenza è dovuta alla rapida acidificazione dell'ambiente con conseguente inibizione dell'attività batterica in sistemi senza controllo del pH (Li, et al., 2008).

Il valore di pH ottimale varia anche in funzione della modalità operativa, infatti Li et al., osservarono che il valore di pH pari a 7 che permetteva di massimizzare resa potenziale e tasso di produzione in batch, non era più ottimale nel caso di controllo del pH in continuo, poiché neutralizzava troppo rapidamente la produzione di acidi e impoverendo il metabolismo batterico. Il valore che massimizza la produzione con questa modalità operativa è pari a 6 (Li, et al., 2008).

Un effetto analogo è stato verificato da Fang et al. (2002) Essi osservarono che resa potenziale e produzione specifica diminuivano all'aumentare del pH. Per pH compresi tra 4 e 5.5 si aveva una produzione stabile con valori compresi tra 1.5 e 2.1 molH₂/mol_{glucosio} e 4-5L/(g SSV d). Per pH compresi tra 5.5 e 7, la resa potenziale passava da 2.1 a 0.5 molH₂/mol_{glucosio} e da 4.5 a 0.5 L(g SSV d).

La Tab. 12 riassume gli esempi proposti sin'ora.

Tab. 12 Tabella riassuntiva delle sperimentazioni condotte per determinare il pH ottimale di prova rispetto alla resa di produzione di idrogeno.

Inoculo	Substrato	pH iniziale		T	Massima resa di		Massimo tasso di		Riferimento
		Range studiato	Ottimo	°C	idrogeno		produzione		
Compost	Saccarosio	4,5-6,5	4,5	37,0	214	mL/g _{COD}	2	mL/(h×g _{SSV})	(Khanal et al., 2004)
Fango anaerobico	Amido	5,0-7,0	5,0	35,0	1,1	mol/mol _{esoso}	22,3	mL/h	(Lin, et al., 2008)
<i>Clostridium butyricum</i> CGS5	Saccarosio	5,0-6,5	5,5	37,0	2,78	mol/mol _{saccarosio}	163	mL/(L×h)	(Chen, et al., 2005)
Fanghi attivi	Acque reflue	4,0-8,0	6,0	–	47,1	mmol/g _{COD}	–	–	(Wu, et al., 2004)
Fango anaerobico	Amido	4,0-9,0	6,0	55,0	92	mL/g _{amido}	194	mL/(d×g _{SSV})	(Zhang, et al., 2003)
<i>Clostridium saccharoperbutylaceticum</i> ATCC 27021	Siero di latte crudo	5,0-10,0	6,0	30,0	7,89	mmol/g _{lattosio}	28,3	mL/h	(Ferchichi et al., 2005)
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> PSU-2	Saccarosio	4,0-8,5	6,3	60,0	4,91	mol/mol _{esoso}	5,73	mmol/(L×h)	(O-Thong et al., 2008)
Fango da impianto civile	Xilosio	5,0-9,5	6,5	35,0	2,25	mol/mol _{xilosio}	12	mL/h	(Lin, et al., 2006)
Fango da impianto civile	Xilosio	5,0-8,0	6,5	35,0	1,3	mol/mol _{xilosio}	15,6	mL/h	(Lin, et al., 2006)
Letame bovino	Scarti di mais	4,0-9,0	7,0	36,0	149,69	mL/SV	–	–	(Zhang, et al., 2007)
Sedimenti fluviali	Glucosio	5,0-7,0	7,0	37,0	1,85	mol/mol _{glucosio}	0,9	mol/(mol _{glucosio} ×h)	(Li et al., 2008)
Letame bovino	Cellulosa	5,5-9,0	7,5	55,0	2,8	mmol/g _{cellulosa}	–	–	(Lin, et al., 2008)
Fango da impianto civile	Saccarosio	5,5-8,5	7,5	37,0	2,46	mol/mol _{saccarosio}	745	mL/(L×h)	(Wang, et al., 2006)
Fango anaerobico granulare	Siero di latte in polvere	3,88-8,12	7,5	37,0	3,1	mol/mol _{lattosio}	8,1	mmol/(L×h)	(Davila-Vazquez, et al., 2008)
Cereali frantumati	Amido	4,0-9,0	8,0	35,0	120	mL/g _{amido}	165	mL/(d×g _{SSV})	(Liu et al., 2004)
Fango anaerobico	Saccarosio	3,0-12,0	9,0	37,0	126,9	mL/g _{saccarosio}	36,3	mL/(h×g _{SSV})	(Lee, et al., 2002)

1.4.5 PARAMETRI DI PROCESSO

1.4.5.1 HRT

Il tempo di ritenzione idraulica (HRT) è un valido strumento per selezionare le popolazioni microbiche di interesse.

I batteri produttori di metano hanno velocità massima di crescita specifica di $0.0167-0.02 \text{ h}^{-1}$, di molto inferiore rispetto a quello dei batteri produttori di idrogeno, che è di circa 0.172 h^{-1} (Show, et al., 2011). Perciò, modificando il valore di HRT è possibile dilavare i batteri metanigeni ritenendo invece i batteri produttori di idrogeno.

A scala di laboratorio vi sono infatti due metodi per limitare la crescita di batteri metanigeni, e consistono appunto nell'applicare bassi HRT per dilavare tali microrganismi, oppure nell'operare a bassi valori di pH per inibirli.

Chen et al., (2001), utilizzarono una soluzione di saccarosio e sali minerali come alimento, e del fango proveniente da un impianto di trattamento delle acque civili, non pretrattato come inoculo. Gradualmente ridussero il valore di HRT da 20 giorni a 2.5 giorni. Anziché modificare il pH, lo lasciarono fisso a 6.7, abbassando unicamente l'HRT. Per HRT pari a 8 ore, la biomassa dominante è stata *C. pasteurianum*, con la quale ottennero buoni rendimenti di produzione di idrogeno. Per HRT inferiori a 6h osservarono il dilavamento della biomassa e di conseguenza una scarsa produzione di idrogeno.

Lin et al., (1999), utilizzarono come inoculo del fango di digestione anaerobica. Alimentarono il reattore in modo continuo con una soluzione di glucosio 20 g COD/L e con una soluzione di sali minerali. Confrontarono due diversi pH di reazione, 5.7 e 6.4, facendo variare l'HRT tra 2 giorni e 6 ore. A HRT pari a 6 ore, per entrambi i valori di pH, si ha una degradazione del substrato dell'80%, mentre per HRT di 12 ore, il rendimento di degradazione del substrato aumenta sino al 99%, e la resa di produzione di idrogeno ottenuta è stata di 1.7 mol/mol glucosio, con elevate concentrazioni di butirrato.

Valori di HRT maggiori vennero adottati da Krupp et al. (2009). Essi lavorando con un reattore CSTR (30L) in continuo, osservarono alte rese di produzione di idrogeno ($2.51-2.93 \text{ molH}_2/\text{mol}_{\text{glucosio}}$), per valori di OLR (organic loading rate) compresi tra $8-10 \text{ kgSV}/(\text{m}^3\cdot\text{d})$, e valori di HRT di 14-15h. Conclusero che lavorare ad elevati OLR e bassi HRT consente di massimizzare la produzione di idrogeno in termini di resa potenziale.

1.4.6 RAPPORTO ALIMENTO/MICRORGANISMI (F/M) o CARICO del FANGO

Il rapporto F/M (Food/Microorganisms) definisce la massa di substrato inizialmente alimentato al sistema per unità di biomassa in prove in batch. Le unità di misura generalmente adottate sono le seguenti: g COD

$\text{alimento}/\text{g SV}_{\text{inoculo}}$, $\text{g COD}_{\text{alimento}}/\text{g SSV}_{\text{inoculo}}$ oppure $\text{g SV}_{\text{alimento}}/\text{g SV}_{\text{inoculo}}$. Il parametro corrispondente per i reattori continui è il carico del fango espresso in $\text{g COD}_{\text{alimento}}/(\text{g SV}_{\text{inoculo}} \cdot \text{d})$, $\text{g COD}_{\text{alimento}}/(\text{g SSV}_{\text{inoculo}} \cdot \text{d})$ oppure $\text{g SV}_{\text{alimento}}/(\text{g SV}_{\text{inoculo}} \cdot \text{d})$.

Nars et al., (2013), studiarono l'effetto di differenti rapporti F/M sulla produzione di idrogeno in termini di resa potenziale e di tasso di produzione. Utilizzarono un reattore UASB con HRT di 6.7h alimentato con amido, e come inoculo utilizzarono fango ispessito proveniente da un impianto civile di trattamento delle acque reflue. I rapporti F/M indagati furono: 0.5, 0.9, 1.4, 1.9 e 2.8 g COD/(g SSV·d), e i gli OLR applicati sono stati rispettivamente pari a 18, 36, 54, 72 e 108 gCOD/(L·d). Essi osservarono che il tasso di produzione aumenta al crescere del rapporto F/M, in particolare nella prova aumentava da 75 a 229 mL_{H₂}/L·h per F/M da 0.5 a 1.4 g COD/(g SSV·d). Stesso andamento venne riscontrato per la concentrazione di biomassa nel reattore (256-303 mg SSV/g amido), per il tasso di produzione specifico (da 47 a 145 mL_{H₂}/(g SSV·d)) e per l'efficienza di degradazione del substrato (44-46.7%).

La produzione di idrogeno aumenta sino a un determinato valore di F/M, dopo il quale tende a diminuire. Il rapporto di F/M che massimizza la produzione di idrogeno per Nars et al., è pari a 1.4 g COD/(g SSV·d).

Uno studio dell'Iowa State University (Sung, 2001) ha indagato l'effetto del rapporto F/M con differenti substrati sull'efficienza di produzione di idrogeno. Utilizzarono un reattore ASBR, con HRT pari a 16h e pH pari a 4.9. L'inoculo impiegato era una cultura batterica mista.

L'andamento di produzione di idrogeno segue quello osservato da Nars et al., ossia si ha un incremento, il raggiungimento del picco di produzione e una successiva riduzione della produzione. Il rapporto di F/M per il quale si ottiene la massima produzione di idrogeno e il valore di tale produzione sono funzione del tipo di substrato adoperato. I substrati utilizzati sono stati: saccarosio, latte in polvere senza grassi e rifiuti alimentari. I risultati ottenuti sono stati:

- Saccarosio: massima HY pari a 234mL/g COD per F/M pari a 7.3 gCOD/gSSV; con massimo HPR compreso tra 120 e 140 mL/(g SSV·h) per F/M pari a 3.6gCOD/g SSV
- Rifiuti alimentari: massima HY di 101 mL/gCOD a F/M di 7.8 gCOD/gSSV;
- Latte in polvere senza grassi: massima HY di 114-119 mL/g COD per F/M di 14.7 gCOD/gSSV;

Per carboidrati o substrati ricchi di carboidrati si osserva che il valore massimo di HPR viene raggiunto per bassi rapporti di F/M.

1.4.7 PRODOTTI INIBENTI

La pressione parziale di idrogeno in fase liquida è uno dei fatto principali che influenzano la produzione di idrogeno. Un'elevata pressione parziale tende a inibire il processo, viceversa, una bassa pressione parziale favorisce la produzione di idrogeno.

Hawakes et al., (2002) dimostrarono che fluxare con azoto un reattore operante con inoculo misto permette di ottenere un incremento di idrogeno prodotto.

L'accumulo di acidi grassi volatili all'interno del sistema può inibire la crescita batterica e di conseguenza la produzione di idrogeno.

Kim et al., (2008), riscontrarono un'inibizione significativa per concentrazioni di acido acetico superiori a 5000 mg/L e di acido butirrico superiori a 3000 mg/L.

1.4.8 TIPOLOGIE IMPIANTISTICHE

La maggior parte degli studi relativi alla produzione di idrogeno gassoso è stata realizzata in modalità batch con microrganismi e substrati differenti. L'obiettivo principale di queste sperimentazioni è quello di identificare culture, substrati e condizioni idonee per massimizzare la produzione.

Tuttavia, studi condotti con alimentazione in continuo o semi-continuo permettono di ottenere rendimenti di produzione di idrogeno maggiori e compresi tra 0,58 mol H₂ mol glucosio⁻¹ e 2.80 mol H₂ mol glucosio⁻¹, rispetto ai valori ottenuti in batch di 1.5-2.5 mol H₂ mol glucosio⁻¹ (H. Argun, 2011).

I reattori utilizzati sono gli stessi che vengono adoperati per la digestione anaerobica, e sono i seguenti:

- Reattori completamente miscelati (CSTR);
- Reattori in sequenza di fasi anaerobici (ASBR);
- Bioreattori a membrana (MBR);
- Reattori a biomassa granulare e a flusso verso l'alto (UASB).

I reattori CSTR vengono comunemente usati per il processo di fermentazione al buio, poiché, grazie all'efficace miscelazione si ha un buon contatto tra substrato e biomassa batterica. Tuttavia, non è possibile mantenere elevate concentrazioni di biomassa e per bassi valori di HRT si ha un vero e proprio dilavamento della biomassa stessa.

In funzione del valore di HRT e dell'OLR, la concentrazione della biomassa nel reattore, generalmente varia tra 1 e 4 g SSV L⁻¹.

L'utilizzo di reattori con biomassa adesa o granulare, permettono di mantenere maggiori concentrazioni di biomassa lavorando a HRT minori, garantendo una miglior efficienza di produzione di idrogeno (Ren., et al. 2011).

I reattori ASBR, sono stati utilizzati principalmente per studiare l'influenza che il parametro OLR ha sulla fermentazione al buio. Ulteriori studi, hanno invece indagato l'effetto di temperatura, HRT, pH e concentrazione iniziale del substrato.

L'uso di reattori MBR consente di mantenere concentrazioni di biomassa all'interno del reattore superiori rispetto a quelle che potrei avere in sistemi CSTR. Ad esempio, Oh et al., (2004), confrontarono un reattore CSTR con un reattore a membrana. I due reattori operavano con HRT pari a 3.3h e il reattore MBR con SRT di 12h. La concentrazione di biomassa nel reattore a membrana era 2.6 volte superiore rispetto a quella dell'altro reattore, con concentrazione di 5.8 g/L contro 2.2 g/L, che permettono di applicare carichi maggiori. In questo modo si è ottenuto anche un rendimento di produzione di idrogeno superiore. Tuttavia i problemi di impaccamento della membrana e gli elevati costi di gestione limitano l'utilizzo di reattori MBR.

I reattori UASB sono stati impiegati per l'elevata efficacia di trattamento e per la capacità di trattenere un'elevata concentrazione di biomassa, inoltre è stato dimostrato che la resa di idrogeno è funzione del valore di HRT impostato (Show, et al., 2011).

La Tab. 13 **Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.** mostra alcuni esempi di processi di dark fermentation condotti con differenti reattori e condizioni operative.

Tab. 13 Esempi di studi condotti in continuo con differenti reattori .S in: concentrazione di substrato alimentato; B in: concentrazione di biomassa in ingresso; DS: degradazione percentuale del substrato;FA: fango anaerobico,CM: cultura batterica mista

Matrice	Organismo	Tipo di reattore	pH	T	HRT	SRT	S in		B in	OLR	DS	HPR		H ₂	H ₂ prodotto		Riferimento
							g COD/L	g/L				L H ₂ /(Lreattore d)	%				
–	–	–	–	°C	h	h	g COD/L	g/L	g SSV/L	gSV/(Ld)	%	L H ₂ /(Lreattore d)	%				
Glucosio	Soil acclimated slurry 3:1 w/w	CSTR	6	55	72	–	–	1	108	36	–	–	–	2,8	mol/mol glucosio	Tenca et al., 2011	
Frazione organica	Soil acclimated slurry 3:1 w/w	CSTR	5,78	55	72	–	151 g/kg	–	108	36	62	2,2	NL/(L d)	35	–	–	Tenca et al., 2012
Glucosio	FA	CSTR	5,5	35	15	–	–	–	–	14 kg SV/(m ³ d)	22,18	–	–	44-52	1,78	mol/mol glucosio	Krupp et al., 2008
Glucosio	Sedimenti agricoli PT	CSTR	–	–	10	–	–	2,5	–	6 kg glucosio/(m ³ d)	–	–	–	–	2,8	mol/mol glucosio	Van Ginkel et al., 2003
Glucosio	FA PT	immobilized cell fluidized bed	5,5	37	0,25	–	–	10	34_37	960 g glucosio/(Ld)	–	7600	mL/(L h)	45	1,7	mol/mol glucosio	Zhang et al., 2008
Fruttosio	–	MBR+CSTR	6,7	35	1	–	20	–	–	480 kg COD/(m ³ d)	–	2750	mL/(L h)	–	1,36	mol/mol esoso	Lee et al., 2007
amido	FA su PAC	AGSB	5,5_6		12	–	–	20 g amido/L	–	960 kg amido/(m ³ d)	–	700	mL/(L h)	–	0,83	mol/mol glucosio	Cheng. Et al., 2008
Reflui barbabietola	FA	CSTR	5,2	32	14,2	–	10	–	–	16 kg zuccheri tot/(m ³ d)	–	–	–	–	1,7	mol/mol esoso	Hussy et al., 2005
Reflui zucchero	Fango compost	CSTR	6,8	60	0,5	–	31,85	–	–	–	–	4,85	L/(Ld)	–	2,52	mol/mol esoso	Ueno et al., 1996
Glucosio	–	CSTR	5,5	23	8	–	7,51	–	–	22 g COD/(Ld)	60	0,13	mol/(Ld)	52-57	1,8	mol/mol glucosio consumato	Shen et al., 2009
Glucosio	–	MBR	5,5	23	8	24	7,29	–	–	23 g	98	0,2	mol/(52-57	1,77	mol/mol	Shen et al.,

										COD/(Ld)			Ld)			glucosio consumato	2010
Glucosio	FA	CSTR	5,7	35	6,00	-	20	-	-		80				1,7	mol/mol esoso	Lin et al., 1999
Glucosio		CSTR	-	-	-	-	-	-	4,59	80 g COD/(Ld)	-	0,8	L/(Ld)		2,06	mol/mol esoso	Zhang et al.,2004
Glucosio		CSTR	5,5	26	3,3	3,3	-	10	2,2	72	-	0,146	L/(Ld)	58,5	0,4	mol/mol esoso	Oh et al.,2004
Glucosio		CSTR+MBR	5,5	26	3,3	12	-	10	5,8 g SST/L	72	-	0,187	L/(Ld)	58,5			Oh et al.,2005
Saccarosio	<i>Clostridium</i>	CSTR	5,5	37	38,4	-	-	-	1,53	20 g sacc./(Ld)	83,5				1,72	mol/mol esoso consumato	Mariakakis et al.,2011
Glucosio	CM	CSTR	5,5	36	6	-	-	-	1	28 g COD/(Ld)	90	4,6	L/(gSS V d)	64	2,1	mol/mol esoso consumato	Fang et al., 2002
Saccarosio	-	CSTR	6,9	35	3	-	20	-	1,737	60 g COD/(Ld)	-	26,9	L/(Ld)	47	2,87	mol/mol esoso consumato	Chen et al., 2003
Carboidrati	CM	CSTR	5,5	55	6	-	-	5,91	0,069		41	183	mL/h	44	2	mol/mol gluc. Cons.	Gavala et al.,2006
Digestato civile mesofilo	<i>Clostridium</i>	chemostat type anaerobic reactor	6,3	15-18	-	60	-	-	1,134	8 g COD/(Ld)	97,4	7,3	mmol/(Ld)	34,9	0,18	mol/mol glucosio	Lin et al.,2003
			6,3	16-19	-	48	-	-	1,506	10 mg COD/(Ld)	97,3	21,3	mmol/(Ld)	45,6	0,42	mol/mol glucosio	
			6,2	24-28	-	36	-	-	1,58	13,33 mg COD/(Ld)	98	46,3	mmol/(Ld)	45,1	0,68	mol/mol glucosio	
			5,9	25-29	-	24	-	-	1,41	20 mg COD/(Ld)	99,5	135	mmol/(Ld)	48,4	1,3	mol/mol glucosio	
			6	28-32	-	12	-	-	1,628	40 mg COD/(Ld)	98,4	290	mmol/(Ld)	43,4	1,42	mol/mol glucosio	

			6,2	30-34	-	6	-	-	1,674	80 mg COD/(Ld)	75,1	359	mmol /(Ld)	42,6	1,15	mol/mol glucosio	
--	--	--	-----	-------	---	---	---	---	-------	-------------------	------	-----	---------------	------	------	---------------------	--

1.4.9 ESEMPI DI FERMENTAZIONE AL BUIO DI SIERO DI LATTE

I principali reattori utilizzati sono CSTR, batch e UASB. I reattori CSTR presentano HRT compresi tra le 6 e le 48 ore, i reattori UASB hanno HRT di circa 12 ore, mentre i sistemi in batch hanno HRT che vanno dalle 24 alle 280 ore.

La maggior parte degli studi esaminati ha lavorato in condizioni mesofile, con pH del mezzo di reazione prossimo a 5.

Le rese mediamente riscontrate sono comprese tra 2-2.8 molH₂/mol lattosio.

La percentuale di idrogeno nel biogas prodotto è maggiore per i sistemi in batch (50-88%) rispetto alle altre configurazioni (20-60%).

La degradazione del COD è piuttosto elevata ed è di circa 89-90%, e la degradazione degli zuccheri è compresa tra l'86% e il 97%. La concentrazione di COD nell'effluente finale varia tra 0,12 e 28 kg m⁻³ in funzione della configurazione adottata.

Anche se si ha un'alta degradazione del substrato, l'effluente non può essere scaricato direttamente, ma necessita di un post-trattamento poiché oltre all'idrogeno si ha la produzione di acidi grassi volatili, tra cui, principalmente acido acetico e butirrico in concentrazioni piuttosto elevate (Prazeres, et al., 2012).

Alcuni esempi sono riportati nella tabella seguente (Tab. 14).

Tab. 14 Tabella riassuntiva delle sperimentazioni di dark fermentation condotte utilizzando siero di latte come substrato. CW: siero di latte, CWD: siero di latte diluito, CWP: siero di latte in polvere; CWCP: siero di latte concentrato in polvere; %DS: percentuale di degradazione del substrato.

Matrice	Organismo	Reattore	COD in	pH	T	HRT	Lattosio out	%DS	% H ₂	HY		HPR		Riferimento
–	–	–	kg COD/m ³	–	°C	h	kg/m ³	%	v/v	–				–
CWD	<i>Clostridium saccharoperbutyl acetonicum</i>	Batch	89,3	6	30	50_52	1,2	97	87,5	2,7	mol/ mol lattosio	47,07	mL/h	Ferchichi et al.,2005
CWCP	<i>Cultura microbatterica mista</i>	Batch	–	5_7	35_38	24	0,103	>95	49,6	10,1	mM/ g COD	390	mL/h	Yang et al.,2007
CWP	<i>Escherichia Coli</i>	Batch	–	7,5	37	280	4	91	–	2,74	mol/ mol lattosio	2,76	mL/h	Rosales-Colunga et al.,2010
CWCP	50% <i>Lactobacillus</i> +5% <i>Clostridia</i>	CSTR	–	4_5	35_38	24	–	–	26_33	1,8_2,3	mM/ g COD	2,8_5,1	L/d	Yang et al.,2007
CWD	99% di <i>Thermoanaerobac teriaceae bacterium</i>	CSTR	40	5,5	55	84	0,103	90	42	22	mmol/ g COD	2,5	L/ (Ld)	Azbar et al.,2009
CWP	<i>Clostridium genus</i>	CSTR	–	5,9	37	6	–	–	49_58	2,1_2,8	mol/ mol lattosio	23,32_4 6,61	mmol/ (Lh)	Davila-Vazquez et al.,2009
CW	Cultura mista	CSTR	60,5	5,2	35	24	–	86	23,8	0,78	mol/ mol glucosio	2,9	L/ (Ld)	Venetsaneas et al.,2009
CW	Batteri anaerobi misti	CSTR	–	5,5	55	24	6,1	–	40_60	1,8_5,1	mol/ mol lattosio	2,5_5,0	L/ (Ld)	Azbar et al., 2010
CW diluito	Cultura mista	UASB	10	5	30	12	–	–	20_30	–	–	122	mL/ (Ld)	Castello et al.,2009

1.4.10 ESEMPI DI FERMENTAZIONE AL BUIO SEGUITA DA DIGESTIONE ANAEROBICA

Durante il processo di dark fermentation, contestualmente alla produzione di idrogeno, vengono prodotti anche VFA e alcoli, i quali possono essere impiegati come substrati per altri processi biologici, tra cui la digestione anaerobica (Hawakes, et al., 2006). Accoppiando i due processi, non solo si otterrebbero grossi vantaggi dal punto di vista energetico (produzione di H₂ e CH₄), ma anche ambientale (trattamento dei reflui della dark fermentation).

Recentemente Giordano et al. (2011) effettuarono una prova di BHP (biochemical hydrogen potential) seguita da una prova di BMP (biochemical methane potential). Per la prova di BHP, alimentarono a un reattore batch con una soluzione di glucosio e nutrienti; terminata la produzione di idrogeno, il reattore è stato aperto e alimentato con digestato tal quale, in modo da avviare la prova di BMP. La medesima prova è stata effettuata con reflui dell'industria alimentare Tab. 15 .

Tab. 15 Tabella riassuntiva dei risultati dei principali test BHP e BMP. a: g COD/g glucosio; b: L/g SV; c: mol/mol glucosio; d: glucosio+peptone+estratto di lievito (Giordano, et al., 2011).

Substrato	Reattore	F/M	H ₂ yield	CH ₄ yield	Conversion e H ₂	Conversion e CH ₄	Riferimento
–	–	g COD/ g SV	L/ kg COD	L/ kg COD	% COD/COD	% COD/COD	–
Glucosio	Batch	1.07 ^a	185±13	267±13	13.3	75.5	Giordano et al., 2011
Fruento	Batch	1.14±0.21	47±12	202±14	3.4	57.8	
Semola di grano	Batch	1.14±0.22	76±12	243±11	5.5	69.5	
Purè di patate	Batch	1.14±0.23	177±14	207±13	12.6	59.3	
Glucosio	Batch	1.07 ^a	320	248	22.8	70.8	Xie et al., 2008a
Patate	Batch	1.2	271 ^b	158 ^b	15.9	37.6	Xie et al., 2008b
Patate	Continuo	1.22	58	192	4.2	58.8	Zhu et al., 2008
Fruento da foraggio	Continuo	1.16	55	228	3.9	65.0	Hawakes et al., 2008
Mix^d	Continuo	n.d	25 ^c	42 ^c	2.8	18.9	Cooney et al., 2007
Siero di latte	Continuo	n.d	41	310	2.9	88.5	Antonopoulou et al., 2009

La fermentazione al buio seguita da digestione anaerobica è una valida soluzione al processo di sola digestione anaerobica del siero di latte.

Antonopoulou et al., utilizzarono un reattore CSTR alla temperatura di 35°C con HRT di 24h per effettuare una prova di dark fermentation. Aggiungendo alcalinità ottennero un HPR di $2.9 \pm 0.2 \text{ LH}_2/(\text{L}_{\text{reattore}} \cdot \text{d})$ e HY di $0.78 \pm 0.05 \text{ molH}_2/\text{mol}_{\text{glucosio consumato}}$. L'effluente del reattore CSTR è stato poi alimentato a un digestore anaerobico operante in condizioni mesofile e con HRT di 20d, e questo ha prodotto approssimativamente $1 \text{ LCH}_4/\text{d}$ con una resa pari a $6.7 \text{ LCH}_4/\text{L}_{\text{influyente}}$.

2 MATERIALI E METODI

2.1 MATRICI E SOLUZIONI

2.1.1 SIERO DI LATTE

Il siero di latte utilizzato per le prove è stato prelevato presso la ditta Simar Costruzioni Meccaniche s.r.l. di Sospiro (Cremona), la quale progetta e produce impianti per il settore alimentare, nello specifico quello caseario (Grana Padano, Provolone, Parmigiano Reggiano).

Il siero utilizzato era stato precedentemente deproteinizzato attraverso un processo di ultra-filtrazione, e sottoposto successivamente a osmosi inversa per la concentrazione del lattosio nel retentato.

Il substrato è stato congelato direttamente dall'azienda Simar s.r.l. è stato trasportato presso il laboratorio del dipartimento, dove è stato poi scongelato e conservato in frigorifero alla temperatura di 4°C.

2.1.2 FANGO DI INOCULO

2.1.2.1 DIGESTATO TAL QUALE

Il digestato utilizzato (Fig. 12) proveniva dal digestore anaerobico dell'impianto di trattamento delle acque reflue di Peschiera Borromeo (MI).



Fig. 12 Operazioni preliminari di gestione del digestato anaerobico prelevato a Peschiera Borromeo.

L'inoculo è stato prelevato dall'impianto in tre momenti successivi mediante l'uso di taniche in plastica e trasportato presso il laboratorio del dipartimento. Dopo aver prelevato un'aliquota per effettuare la caratterizzazione dell'inoculo, il digestato rimanente è stato conservato in frigorifero alla temperatura di 4°C.

Le analisi di caratterizzazione effettuate sono state le seguenti

- pH;
- Solidi totali (ST) e solidi totali volatili (SV),
- Solidi sospesi totali (SST) e solidi sospesi volatili (SSV);

2.1.2.2 DIGESTATO PRETRATTATO TERMICAMENTE

Si tratta di fango di digestione anaerobica tal quale pretrattato termicamente, secondo la modalità descritta nel paragrafo 2.2.2.

2.1.2.3 CULTURE PURE

Si sono utilizzate due differenti culture pure di microrganismi in fase di crescita esponenziale del genere *Clostridium*, in particolare sono stati identificati mediante il seguente codice:

- 792;
- 56.

In entrambi i casi, la concentrazione della sospensione era di 17600 UFC/mL.

2.1.3 SOLUZIONI

Di seguito vengono riportate le soluzioni impiegate e la modalità di preparazione adottata per ciascuna.

SOLUZIONE DI MACRO-NUTRIENTI

La soluzione di macro-nutrienti impiegata risulta essere una variante del mezzo di prova riportata nella norma italiana UNI EN ISO 11734 per la valutazione della biodegradabilità anaerobica ultima di composti organici in fanghi digeriti.

In Tab. 16 sono riportati i reagenti impiegati e le relative quantità.

Tab. 16 Soluzione di macronutrienti UNI EN ISO 11734:2004 modificata. () : Dovrebbe essere utilizzato solfuro di sodio fornito di recente, oppure prima dell'utilizzo si dovrebbe lavarlo ed essiccarlo, per assicurarne sufficiente capacità riduttiva.*

Diidrogenofosfato di potassio anidro	KH_2PO_4	0,27 g
Idrogenofosfato di sodio dodecaidrato	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	1,12 g
Cloruro di ammonio	NH_4Cl	0,53 g
Cloruro di calcio diidrato	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,075 g
Cloruro di magnesio esaidrato	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
Cloruro di ferro (II) tetraidrato	$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,02 g
Solfuro di sodio nonaidrato	$\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	0,1 g

Ai reagenti viene poi addizionata acqua deionizzata in modo tale da portare a volume di 1 L. Allo scopo di realizzare condizioni anossiche, viene fatto gorgogliare nel mezzo, immediatamente

prima del suo utilizzo, dell'azoto gas per circa 20 min, in modo da eliminare l'ossigeno.

Inoltre, se necessario, il pH del mezzo viene regolato con acido o base minerale diluiti fino a $7 \pm 0,2$.

La soluzione finale ottenuta, risulta essere una soluzione madre concentrata. Al momento dell'utilizzo, è necessario diluirla con fattore di diluizione 1:10.

SOLUZIONE TAMPONE

La maggior parte delle prove di BHP ha impiegato anche una soluzione di MES, ossia acido 2-(N-morfolino)-etansulfonico ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{NNaO}_4\text{S}$). Si tratta di un tampone organico che rientra nei cosiddetti 'Good buffers' (dal nome di chi ne ha esplorato l'uso in biochimica e biologia cellulare), come anche Bicina, PIPES, HEPES ed altri.

E' una sostanza poco tossica per le cellule, ed estremamente costosa.

Tale tampone viene impiegato nell'intervallo di pH compreso tra 5.5 e 6.7, ed ha un valore della costante di dissociazione acida (pK_a) pari a 6.1 alla temperatura di 25°C.

Le soluzioni preparate per le prove di BHP sono le seguenti:

- 1M ossia $217.22 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;
- 2M ossia $434.44 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;
- 3M ossia $651.55 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

Ciascuna soluzione viene conservata in frigorifero, alla temperatura di 4°C per non più di 3 giorni.

ALIMENTO REATTORI

I reattori OxiTop sono stati alimentati in modalità semi-continuo con una soluzione di lattosio la cui concentrazione è variata nel corso della sperimentazione, come mostrato nella

Tab. 20. La soluzione conteneva anche sali di azoto (NH_4Cl) e fosforo (KH_2PO_4), e bicarbonato di sodio (NaHCO_3) per regolare l'alcalinità del sistema.

La concentrazione di tali sali è funzione della concentrazione di COD alimentato al sistema:

- 9.38 mg KH_2PO_4 /g COD;
- 76.47 mg NH_4Cl /g COD;
- 1.14 g NaHCO_3 /g COD.

Inoltre in condizioni di criticità, i reattori OxiTop sono stati alimentati mediante aggiunte impulsive di una soluzione di acetato di sodio di concentrazione 1.6, 6.2 e 50 g COD per litro di alimento.

Per le prove di BHP effettuate mediante reattori batch vengono utilizzati due ulteriori substrati oltre al siero di latte: lattosio e glucosio.

Tali reagenti sono puri e in polvere. Non viene preparata una soluzione specifica per ogni prova, ma nota la massa di reagente necessaria, questa viene disciolta in un'aliquota di acqua dechlorata e aggiunta poi direttamente nel reattore.

2.2 STRUMENTAZIONE

2.2.1 AMPTS

AMPTS (Automatic Methane Potential Test System) è uno strumento prodotto dall'azienda svedese Bioprocess control (Fig. 13). Nasce con l'esigenza di determinare la potenziale produzione biochimica di metano, e l'andamento della degradazione del substrato, in modo rapido e semplice.

In questo caso viene impiegato sia per la determinazione del potenziale di produzione biochimico di metano (BMP) sia del potenziale di produzione biochimico di idrogeno (BHP).

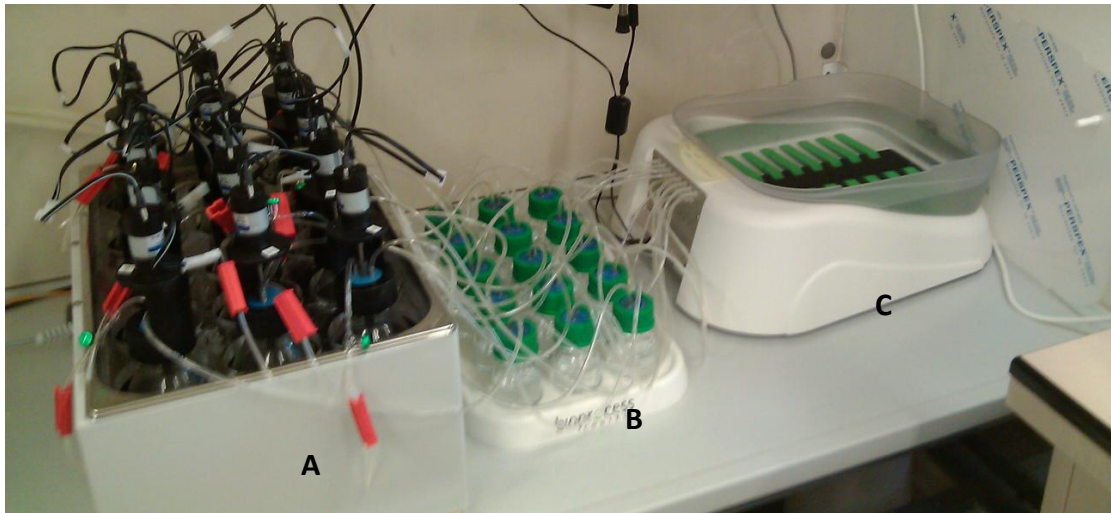


Fig. 13 AMPTS Bioprocess control; le lettere A,B,C indicano le rispettive unità di cui è composto lo strumento.

Lo strumento AMPTS consente di effettuare l'analisi e la registrazione dei dati in modo del tutto automatico durante tutto il periodo di prova; ciò riduce notevolmente i tempi di lavoro per effettuare le analisi. Inoltre è possibile ricavare una grande quantità di dati, utili per estrarre informazioni relative alle cinetiche di degradazione.

Lo strumento è costituito da tre unità fisiche, più un'unità logica costituita dal software per la registrazione e l'elaborazione dei dati. La Fig. 13 mostra le componenti fisiche A,B,C :

- A. L'unità A, o unità di incubazione del campione, è un bagno termostato con 15 postazioni di lavoro, ossia può contenere fino a 15 bottiglie. Ciascuna bottiglia costituisce un piccolo reattore di volume pari a 0,630 L. I reattori posti all'interno di tale unità, vengono mantenuti a temperatura costante, e fissata dall'operatore, e sono completamente miscelati grazie alla presenza di un agitatore meccanico. Il biogas prodotto continuamente fluisce dalle bottiglie alla seconda unità dello strumento.
- B. L'unità B, o unità trappola di soda, consente di fissare la CO₂ prodotta durante il processo biologico. Il biogas prodotto da ogni bottiglia, viene fatto gorgogliare sotto battente all'interno di un recipiente chiuso, contenete una soluzione alcalina, in particolare soda 3 M. I gas acidi presenti nel biogas, principalmente CO₂ e H₂S, reagiscono con NaOH, determinando la formazione di precipitati insolubili, mentre il metano e/o l'idrogeno non reagiscono, e fluiscono verso la terza unità.
- C. L'unità C, è l'unità di misura volumetrica del gas prodotto. Il volume di CH₄ rilasciato dall'unità B, viene misurato utilizzando un dispositivo di misurazione che funziona secondo il principio di spostamento del liquido e di galleggiabilità, e può monitorare

piccoli flussi di gas. Al passaggio di un volume definito di gas di circa 10mL, viene generato un impulso digitale.

L'unità logica, consiste in un software che permette di avviare le prove e di visualizzare, acquisire ed elaborare i risultati. I dati sono visualizzabili online, ed è possibile scaricarli in ogni momento dall'avvio della prova. Il programma fornisce un unico file Excel contenente le informazioni impostate dall'utente per ogni prova, il volume cumulato per ciascuna prova ed il tasso di produzione orario entrambi espressi in condizioni normali.

2.2.2 BAGNOMARIA PER PRETRATTAMENTO DELL'INOCULO

Nel corso della sperimentazione è stato necessario operare un pretrattamento termico sul digestato civile, al fine di selezionare la biomassa batterica più idonea al processo di dark fermentation, inattivando i microrganismi metanigeni. Il pretrattamento consiste nel portare il fango anaerobico alla temperatura di $90\pm 2^{\circ}\text{C}$, e mantenerla per 30 minuti.

Per questo scopo si è utilizzato un bagnomaria Falc, il quale garantisce un bagno caldo non miscelato .

Lo strumento è costituito da una struttura esterna in acciaio, con 4 aperture sulla parte superiore.

Al suo interno si ha una vasca di contenimento in lamiera d'acciaio inox 18/8, nell'intercapedine viene inserito dell'isolante termico costituito da fibra di vetro ottenendo un ottimo isolamento tra interno ed esterno.

La vasca è dotata di un rubinetto di scarico per lo svuotamento delle vasche.

La regolazione ed il controllo della temperatura avviene attraverso un termostato con scala graduata in $^{\circ}\text{C}$ e di una sonda ad espansione di fluido .

Il bagnomaria viene completamente riempito con acqua deionizzata, in modo da evitare la formazione di precipitati calcarei.

L'inoculo da pretrattare, precedentemente caratterizzato, viene versato all'interno di appositi contenitori in vetro (ampolle).

Le ampolle vengono poi posizionate all'interno delle aperture della vasca di contenimento del bagnomaria Falc, e fissate alla struttura portante con pinze metalliche (Fig. 14) in modo

tale da non far aderire l'ampolla con la base della vasca di contenimento, sotto la quale è situata la serpentina riscaldante.



Fig. 14 Posizionamento delle ampolle all'interno dello strumento precedentemente riempito con acqua deionizzata.

All'interno di una delle ampolle, viene posizionato un termometro al fine di monitorare la temperatura del campione.

Per ottenere temperature dell'inoculo di circa 90°C, è necessario che l'acqua contenuta nel bagnomaria sia almeno alla temperatura di 120°C.

Dopodiché, si attende sino a quando l'inoculo ha raggiunto la temperatura desiderata, e a quel punto la si mantiene per 30 minuti.

Al termine del pretrattamento, si spegne lo strumento, lo si svuota utilizzando il rubinetto posto sul retro del bagnomaria e si fanno raffreddare le ampolle in un bagno d'acqua freddo.

Quando il digestato nelle ampolle ha raggiunto la temperatura ambiente è possibile svuotare il bagnomaria Falc, e le ampolle.

2.2.3 REATTORI ALIMENTATI IN MODO SEMI-CONTINUO

Per la realizzazione dei reattori semi-continui sono state impiegate bottiglie OxiTop della WTW Xylem utilizzate per le prove sono del tipo OxiTop Control AN6/AN12. Si tratta di bottiglie in vetro del volume di 1.2 L, dotate di una testa di misura che permette di misurare la sovrappressione che si genera all'interno della bottiglia, e due aperture su cui sono posizionati dei setti porosi da cui è possibile, mediante l'uso di una siringa, effettuare eventuali campionamenti e alimentazioni.

La misura della sovrappressione generate viene effettuata mediante un apposito telecomando, il quale permette di trasmettere dati senza cavo (a infrarossi) e con il quale è possibile impostare le caratteristiche di prova, avviare, monitorare l'andamento del sistema nel tempo e chiudere la prova. I dati raccolti vengono automaticamente salvati sul dispositivo, il quale connesso al computer, consente di scaricarli in formato testo per poi elaborarli.

La testa di misura rileva le variazioni di pressione rispetto a una pressione iniziale fino a una sovrappressione massima di 350 hPa, con una precisione di ± 10 hPa.

I reattori OxiTop vengono generalmente impiegati per la determinazione del BOD, ma possono essere utilizzate anche per effettuare prove in anaerobico.

La configurazione implementata è qui di seguito descritta e viene riprodotta in doppio.



Fig. 15 Configurazione reattori oxiTop.

Il sistema finale si compone di 2 bottiglie OxiTop (A e B):

- A. La sezione A è il reattore biologico vero e proprio. Rispetto alle normali bottiglie OxiTop, la differenza principale è che manca la testa di misura, la quale è stata sostituita con un tappo in plastica dotato di due aperture. La prima, consente di effettuare campionamenti e di alimentare il sistema, mentre la seconda connette la bottiglia A alla bottiglia B e permette al biogas prodotto di defluire nella seconda unità. Inoltre all'interno di questa bottiglie è stata posta un'ancoretta magnetica.
- B. La sezione B funge da serbatoio di raccolta del biogas prodotto, il quale viene convogliato mediante un tubo in silicone dalla bottiglia A alla bottiglia B. La bottiglia B contiene al suo interno 100 mL di NaOH 3 M. Il biogas gorgoglia sottobattente esattamente come per la trappola soda dell'AMPTS. La misura del biogas prodotto viene effettuata dalla testa OxiTop.

L'intera configurazione ha una capacità di 2.32 L.

Le bottiglie sono poi poste all'interno di un termostato alla temperatura di $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, su una base magnetica che, grazie alla presenza dell'ancoretta nella bottiglia A, consente una miscelazione costante della miscela biologica.

L'avvio, il monitoraggio e la chiusura della prova vengono effettuati con l'apposito telecomando OxiTop. I dati raccolti sono scaricabili su computer sottoforma di file di testo, che contiene le informazioni relative alla prova e la sovrappressione misurata in funzione del tempo.

2.3 DETERMINAZIONI ANALITICHE

2.3.1 pH

Il pH di una soluzione viene determinato per via potenziometrica utilizzando, come sensore, un elettrodo a vetro combinato con opportuno elettrodo di riferimento. Il valore da determinare viene ottenuto dopo aver effettuato una operazione di taratura con due soluzioni tampone a pH noto.

Il pH-metro fornisce direttamente la misura di pH e di temperatura.

2.3.2 SOLITI TOTALI E VOLATILI

La misura dei solidi totali presenti in un campione è data dal residuo totale che si ottiene per evaporazione della fase liquida a 105°C fino a peso costante.

Si definiscono invece solidi non volatili, il residuo che si ottiene dopo incenerimento in muffola a 450°C per circa 1 h; i solidi volatili sono dati dalla differenza tra solidi totali e solidi non volatili.

Per quanto riguarda i solidi totali, nel caso si lavori con matrici liquide, è necessario effettuare un pretrattamento su piastra riscaldante alla temperatura di 100°C per ridurre il contenuto di umidità, dopodiché possono essere poste in stufa. Inoltre, prima di effettuare l'analisi dei solidi volatili del siero di latte pre-essiccato o di matrici ricche di carboidrati, è bene effettuare un ulteriore pretrattamento su piastra dei medesimi campioni, alla temperatura di circa 350°C

La determinazione dei solidi totali e volatili è stata condotta secondo il metodo APAT IRSA/CNR (2003).

2.3.3 SOLIDI SOSPESI TOTALI E VOLATILI

Con il termine solidi sospesi totali si intendono tutte quelle sostanze indisciolte, presenti nel campione di acqua da esaminare, che vengono trattenute da un filtro a membrana, di determinata porosità, quando il campione stesso viene sottoposto a filtrazione. Il filtro da usarsi, per ottenere una separazione della totalità di solidi sospesi (colloidali compresi), deve avere pori di diametro medio pari a 0,45 μm .

I solidi sospesi totali presenti in un'aliquota di campione d'acqua vengono raccolti per filtrazione su un apposito filtro a membrana e determinati per via gravimetrica dopo essiccamento del filtro ad una temperatura di 105°C fino a peso costante.

Se il tempo richiesto per la filtrazione risulta troppo lungo (superiore a un'ora) è opportuno operare una prefiltrazione del campione su filtro avente porosità superiore a 0,45 μm e filtrare il liquido risultante su filtro da 0,45 μm . Il contenuto di solidi sospesi si determina dalla somma dei due residui.

La determinazione dei solidi totali e volatili è stata condotta secondo il metodo APAT IRSA/CNR (2003).

2.3.4 COD

Il COD rappresenta la misura dell'ossigeno necessario ad ossidare chimicamente le sostanze presenti in un campione, per mezzo di un ossidante forte in ambiente acido a caldo.

Il metodo prevede l'ossidazione delle sostanze organiche ed inorganiche, presenti in un campione, mediante una soluzione di dicromato di potassio in presenza di acido solforico concentrato e di solfato di argento, come catalizzatore dell'ossidazione. La concentrazione delle sostanze organiche ed inorganiche ossidabili, nelle condizioni del metodo, è proporzionale alla quantità di dicromato di potassio consumato il quale può essere quantificato per titolazione e per via spettrofotometrica.

Il metodo è valido per un contenuto di cloruri non superiore a 1000 mg/L.

La determinazione del COD è stata condotta secondo lo standard internazionale ISO 15705:2002, utilizzando dei test in cuvetta pronti all'uso della Hach Lange .

I kit impiegati permettevano di misurare il COD nei seguenti intervalli di concentrazione:

- 15-150 mg O₂ · L⁻¹;
- 100-2000 mg O₂ · L⁻¹.

2.3.5 AZOTO AMMONIACALE

L'ammoniaca per reazione con salicilato sodico e cloro forma un derivato dell'indofenolo, il quale, in ambiente nettamente alcalino ed in presenza di nitroprussiato sodico che agisce da catalizzatore, assume una colorazione verde-blu, misurabile spettrofotometricamente alla lunghezza d'onda di 690 nm.

La determinazione dell'azoto ammoniacale è stata condotta secondo lo standard internazionale ISO 7150-1, utilizzando dei test in cuvetta pronti all'uso della Hach Lange.

I kit impiegati permettevano di misurare l'azoto ammoniacale nei seguenti intervalli di concentrazione:

- 0.02 - 2.5 mg $\text{NH}_4 \cdot \text{L}^{-1}$ ossia 0.015 - 2.0 mg $\text{NH}_4\text{-N} \cdot \text{L}^{-1}$;
- 2.5 - 60 mg $\text{NH}_4 \cdot \text{L}^{-1}$ ossia 2 - 47 mg $\text{NH}_4\text{-N} \cdot \text{L}^{-1}$.

2.3.6 AZOTO NITOSO

Il metodo è basato sulla diazotizzazione.

La determinazione dell'azoto nitroso è stata condotta secondo lo standard internazionale EN ISO 26777, utilizzando dei test in cuvetta pronti all'uso della Hach Lange.

I kit impiegati permettevano di misurare l'azoto nitroso nei seguenti intervalli di concentrazione:

- 0.05 - 2 mg $\text{NO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ ossia 0.015 - 0.6 mg $\text{NO}_2\text{-N} \cdot \text{L}^{-1}$;
- 2 - 20 mg $\text{NO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ ossia 0.6 - 6.0 mg $\text{NO}_2\text{-N} \cdot \text{L}^{-1}$.

2.3.7 AZOTO NITRICO

Il metodo si basa sulla reazione tra i nitrati e il salicilato di sodio in soluzione acida per acido solforico.

Il composto ottenuto ha, in soluzione alcalina, un colore giallo stabile misurabile spettrofotometricamente alla lunghezza d'onda di 420 nm.

La determinazione dell'azoto nitroso è stata condotta secondo lo standard internazionale ISO 7890-1-2-1986, utilizzando dei test in cuvetta pronti all'uso della Hach Lange.

I kit impiegati permettevano di misurare l'azoto nitrico nell'intervallo di concentrazione di 1.0 - 60.0 mg $\text{NO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ ossia 0.23 - 13.5 mg $\text{NO}_3\text{-N} \cdot \text{L}^{-1}$.

2.3.8 AZOTO TOTALE

Il metodo si basa sulla digestione con Persolfato (Perossidisolfo) e misura fotometrica con 2,6-Dimetilfenolo.

La determinazione dell'azoto nitroso è stata condotta secondo lo standard internazionale EN ISO 11905-1, utilizzando dei test in cuvetta pronti all'uso della Hach Lange.

I kit impiegati permettevano di misurare l'azoto nitroso nei seguenti intervalli di concentrazione:

- 20-100 mg $N_{\text{tot}} \cdot L^{-1}$;
- 5-40 mg $N_{\text{tot}} \cdot L^{-1}$.

2.3.9 SOLFURI

Il metodo si basa sulla Dimetil-p-fenilendiammina.

La determinazione dei solfuri è stata condotta secondo lo standard internazionale ISO 10530-1991, utilizzando dei test in cuvetta pronti all'uso della Hach Lange.

I kit impiegati permettevano di misurare i solfuri nell'intervallo di concentrazione di 0.1 - 2.0 mg $S^{2-} \cdot L^{-1}$.

2.3.10 ULTERIORI DETERMINAZIONI ANALITICHE

Ulteriori analisi chimiche o biochimiche sono state effettuate presso il laboratorio DICA di Ingegneria Ambientale.

La

Tab. 17 riporta i parametri misurati, l'unità di misura adottata ed il metodo seguito per effettuare le analisi.

Tab. 17 Ulteriori determinazioni analitiche effettuate presso il laboratorio di Ingegneria Ambientale.

Descrizione parametro	Unità di misura	Incertezza	Metodo
TKN	mg/L	n.d	n.d
Alcalinità	mg CaCO ₃ /L	5%	SM 2320 B, 2012
Conducibilità	μS/cm 20°C	5%	APAT-IRSA 2030, 2003
TOC	mg C/L	20%	SM 5310 B, 2012
BOD20	mg O ₂ /L	20%	DIAR/POP.99.421 Agg.1
BOD5	mg O ₂ /L	20%	DIAR/POP.99.421 Agg.2
Fosfati	mg P/L	10%	MU 201, 2006
Fosforo totale	mg P/L	10%	MU 201, 2007
Calcio	mg/L	5%	EN ISO 7980, 2004
Magnesio	mg/L	10%	EN ISO 7980, 2005
Sodio	mg/L	10%	ISO 9964-3, 1993
Potassio	mg/L	10%	ISO 9964-3, 1994
Litio	mg/L	10%	APAT IRSA 3170A, 2003
Cloruri	mg/L	5%	APAT-IRSA 4090, 2003
Solfiti	mg/L	15%	IRSA 4130-4, 1994
Ferro	mg/L	10%	UNI EN ISO 17294-1, 2007 E 17294-2, 2005
Manganese	μg/L	10%	UNI EN ISO 17294-1, 2007 E 17294-2, 2006
Rame	mg/L	10%	UNI EN ISO 17294-1, 2007 E 17294-2, 2007
Zinco	mg/L	10%	UNI EN ISO 17294-1, 2007 E 17294-2, 2008
Nichel	ug/L	10%	UNI EN ISO 17294-1, 2007 E 17294-2, 2009
Selenio	mg/L	10%	UNI EN ISO 17294-1, 2007 E 17294-2, 2010
VFA	mgCH ₃ COOH/L	10%	MU 201, 2006

2.3.11 ALCALINITA'

La misura di alcalinità viene determinata mediante titolazione secondo il metodo APAT IRSA/CNR (2003).

Il campione è titolato direttamente aggiungendo volumi noti di soluzione di riferimento di acido cloridrico 0.015N e annotando, dopo ogni aggiunta, il valore del pH misurato con un pHmetro.

Il procedimento adottato è il seguente:

- si lavano accuratamente gli elettrodi del pHmetro con acqua distillata, e si asciugano poi tamponandoli con della carta;
- Si introduce in un beaker un volume noto di campione che si vuole titolare. La soluzione nel beaker viene miscelata continuamente mediante un sistema meccanico;
- Si aggiunge la soluzione titolante da una buretta. Il volume di una singola aggiunta non deve superare 0,5 mL;
- Dopo ogni aggiunta, si attende che venga raggiunto l'equilibrio, si legge e si annota il pH;
- Continuare la titolazione fino ad ottenere i dati di pH necessari, ossia fino a pH pari a 4.3;
- Tracciare la curva di titolazione riportando i valori di pH letti.

2.4 CONDUZIONE DELLE PROVE

2.4.1 CARATTERIZZAZIONE DEL SIERO DI LATTE

La caratterizzazione del siero di latte, viene condotta in parte dagli studenti e in parte dai tecnici del laboratorio di Ingegneria Ambientale.

Le analisi effettuate dagli studenti sono le seguenti:

- pH ;
- ST, SV;
- COD solubile;
- Azoto totale;
- Azoto ammoniacale;
- Azoto nitrico;

- Azoto nitroso;
- Solfuri;

E' stato inoltre effettuato un test di produzione potenziale di BMP (2.4.2) e un ulteriore prova di stabilità della matrice a 4°C.

Quest'ultima prova, consiste nell'effettuare misure successive di pH e VFA sul siero di latte stoccato in frigorifero alla temperatura di 4°C. Per quanto riguarda la misura di pH, si procede in questo modo:

- si preleva un'aliquota della matrice dal campione totale conservato in frigorifero;
- si lascia riscaldare l'aliquota a temperatura ambiente;
- si misura e si annota il valore di pH mediante un pHmetro.

La misura del pH viene effettuata al momento del prelievo del campione dall'azienda produttrice, e successivamente dopo 24 e 48 ore, e dopo 7 giorni dal campionamento.

Agli stessi intervalli temporali, il laboratorio DICA, effettua analisi sui VFA del campione.

2.4.2 TEST DI PRODUZIONE POTENZIALE DI METANO (BMP)

L'obiettivo della prova è quello di definire la produzione di metano ottenuta in seguito a digestione anaerobica del siero di latte deproteinizzato e concentrato, per verificarne la biodegradabilità anaerobica.

ALLESTIMENTO DELLA PROVA

Per la prova BMP si è lavorato con un rapporto substrato su inoculo pari a 0.5 $\text{gSV}_{\text{substrato}} \cdot \text{gSV}_{\text{inoculo}}^{-1}$, e con una concentrazione di solidi volatili di 2.2 gSV per bottiglia, ossia $5.7 \text{ gSV} \cdot \text{L}^{-1}$.

Lo strumento impiegato per la sperimentazione è l'AMPTS. La temperatura del bagno termostato è stata impostata a 35°C.

La miscela contenuta in ciascuna bottiglia è costituita da:

- Inoculo: 330mL di fango di digestione anaerobica tal quale (2.1.2.1);
- Substrato: 17mL di siero di latte deproteinizzato e concentrato (2.1.1);
- 50mL di soluzione di macro-nutrienti (0);
- 100mL di acqua dechlorata.

Le prove sono state effettuate in doppio e con l'aggiunta di un bianco contenente il solo inoculo.

CONDUZIONE PROVA

Si è proceduto nel modo seguente:

- L'inoculo viene lasciato acclimatare all'interno di un termostato a temperatura costante di 35°C per almeno 7 giorni, per ridurre la produzione di biogas non specifica;
- Si effettua l'analisi dei soliti totali e volatili sia dell'inoculo, sia del substrato;
- Sulla base degli SV dell'inoculo, è possibile determinare il volume di inoculo necessario per rispettare la concentrazione desiderata di 2.22 gSV per bottiglia, ossia 5.66 gSV·L⁻¹;
- Sapendo che il rapporto desiderato tra substrato e inoculo (F/M, Food/Microrganism) è di 0.5 gSV_{substrato}·gSV_{inoculo}⁻¹, è possibile definire il quantitativo di substrato da aggiungere;
- Si sono aggiunti 50 mL di soluzione di macro-nutrienti;
- Si sono aggiunti 100 mL di acqua dechlorata, in modo da ottenere un volume finale all'interno della bottiglia di 500 mL.

Prima di avviare la prova, si è insufflato azoto gassoso nello spazio di testa della bottiglia per alcuni minuti, in modo da creare delle condizioni anossiche.

Oltre alle bottiglie alimentate con siero di latte, sono state preparate altre due bottiglie, in cui non è stato addizionato alcun substrato, in modo da poterle impiegare come bianco.

La Fig. 16 mostra l'allestimento e la preparazione dello strumento AMPTS per la prova BMP.



Fig. 16 Allestimento della prova mediante AMPTS.

Le prove di BMP effettuate hanno avuto una durata di 31 giorni, in ogni caso si può considerare terminata la prova quando la produzione di metano risulta trascurabile.

ANALISI FINALI

Oltre alle analisi di caratterizzazione delle matrici vengono effettuate ulteriori determinazioni analitiche a fine prova.

In particolare sulla miscela tal quale vengono misurati:

- pH;
- ST e SV.

In più, un'aliquota della miscela viene filtrata mediante filtro in acetato di cellulosa con porosità pari a $0.45 \mu\text{m}$ per determinare:

- COD solubile;
- VFA.

Poiché risulta lungo e dispendioso filtrare direttamente con questo tipo di filtro, può essere utile effettuare delle pre-filtrazioni mediante filtri a più elevata porosità.

La Fig. 17 riassume la preparazione della miscela impiegata per la prova di BMP e le analisi effettuate a inizio e fine prova.

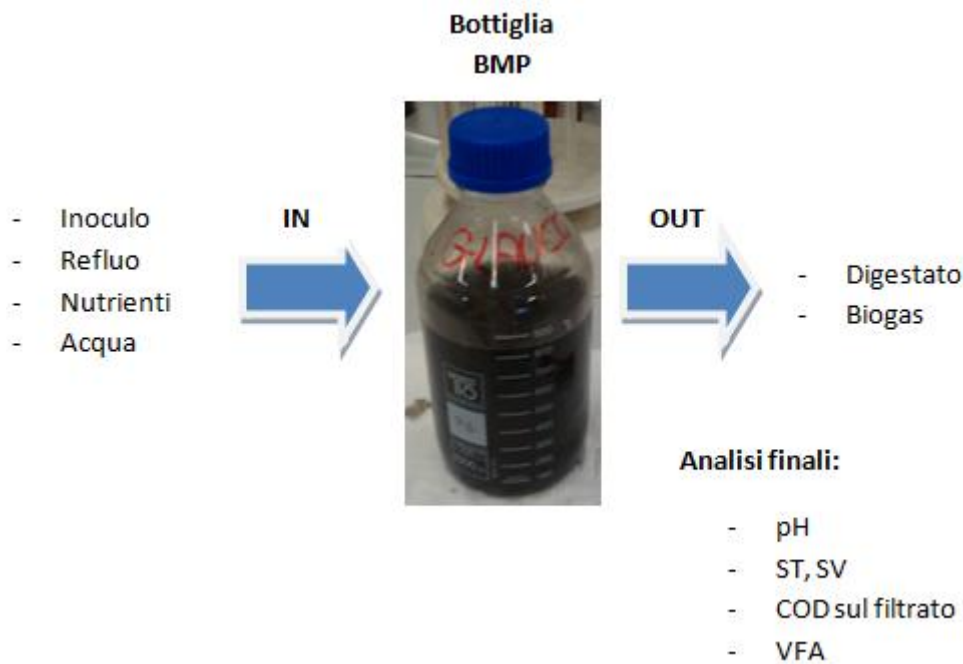


Fig. 17 Schema esemplificativo della procedura e delle analisi effettuate per una prova di BMP .

2.4.3 TEST DI POTENZIALE DI IDROGENO (BHP)

L'obiettivo di tali prove è stato di valutare l'effetto del rapporto F/M di prova, espresso in termini di $\text{g COD} \cdot \text{g SV}^{-1}$, sulla produzione potenziale di idrogeno.

I rapporti F/M sperimentati sono stati molteplici e variavano nell'intervallo compreso tra 0.3 e 9.37 g COD/g SV .

ALLESTIMENTO DELLA PROVA

Le prove di BHP sono state effettuate mediante l'uso dello strumento AMPTS. La temperatura di prova è stata mantenuta pari a 35°C . Alcune prove sono state condotte senza utilizzare la trappola di soda.

La miscela contenuta in ciascuna bottiglia e il metodo impiegato per allestire la prova sono simili a quelli adoperati per le prove di BMP. La differenza sostanziale tra queste due sperimentazioni riguarda il fatto che si è utilizzato un inoculo pre-trattato termicamente o una cultura pura, a differenza dell'inoculo tal quale, con l'obiettivo di selezionare le specie batteriche più idonee alla produzione di idrogeno. Un'ulteriore diversità è dovuta alla necessità di controllare il pH, questo ha fatto sì che si utilizzasse anche una soluzione tampone.

La miscela impiegata è la seguente:

- Inoculo: fango di digestione anaerobica pre-trattato termicamente (A,B,C) (2.1.2.1), o culture pure (D,E);
- Substrato: siero di latte deproteinizzato e concentrato (2.1.1), glucosio o lattosio;
- Soluzione di macro-nutrienti (0);
- Acqua declorata;
- Soluzione tampone di MES di concentrazione 1,2 o 3 M (0), che vengono impiegate per ottenere concentrazioni finali in bottiglia rispettivamente di: 0.043 M, 0.087 M e 0.129 M. Alcune prove sono state effettuate senza il controllo del pH.

Le quantità di inoculo e substrato vengono determinate rispettivamente in funzione della concentrazione di solidi volatili in bottiglia e del rapporto F/M. La quantità di MES è a sua volta funzione della concentrazione che si desidera nella bottiglia. Il volume d'acqua si ricava per differenza tra il volume finale che si vuole ottenere e la somma di inoculo, refluo e MES. Nel caso in cui non venga addizionato MES, il volume si determina nello stesso modo.

La Tab. 18 riporta in maniera riassuntiva, il tipo di substrato utilizzato, se è stato addizionato MES e in che concentrazione, se si è utilizzata la trappola di soda e che tipo di inoculo è stato impiegato. In più sono riportate le caratteristiche di prova desiderate, ossia il volume della miscela, la concentrazione di solidi volatili e il rapporto F/M.

Tab. 18 Condizioni impiegate nelle porve di BHP..

MATRICI IMPIEGATE E SODA					CARATTERISTICHE PROVA		
n	substrato	MES	SODA	Inoculo	V	SV	F/M
	tipologia	M	si/no	(A,B...)	L	g SV/L_{bott}	gCOD/gSV
1	lattosio	1	si	B	0,54	4,20	0,30
2	siero	1	si	B	0,54	4,20	0,30
3	glucosio	1	si	B	0,54	2,32	6,71
4	lattosio	1	si	B	0,54	2,32	6,99
5	lattosio	1	si	B	0,54	2,32	1,50
6	lattosio	1	si	B	0,54	2,32	9,37
7	lattosio	1	si	B	0,54	2,32	2,50
8	lattosio	1	si	B	0,54	2,32	4,00
9	lattosio	1	si	B	0,54	2,32	5,50
10	siero	1	si	B	0,54	2,29	2,51

11	siero	1	si	B	0,54	2,29	4,05
12	siero	1	si	B	0,54	2,29	5,57
13	lattosio	0	si	B	0,18	4,05	3,12
14	lattosio	1	no	B	0,18	4,07	3,12
15	lattosio	2	si	B	0,18	4,07	3,97
16	lattosio	2	si	C	0,54	2,31	6,99
17	lattosio	1	si	C	0,54	2,31	6,99
18	lattosio	1	si	C	0,54	2,31	4,00
19	lattosio	1	no	C	0,54	2,31	4,00
20	lattosio	0	si	C	0,54	2,31	4,00
21	lattosio	2	si	C	0,54	2,31	4,00
22	lattosio	1	si	C	0,54	2,30	3,96
23	lattosio	1	si	C	0,54	2,30	3,96
24	lattosio	1	si	C	0,54	2,30	3,96
25	lattosio	1	si	C	0,54	2,30	3,96
26	lattosio	1	si	C	0,54	2,31	6,99
27	lattosio	2	si	C	0,54	2,31	6,99
28	lattosio	1	si	C	0,54	2,31	9,37
29	lattosio	3	si	C	0,54	2,31	9,37
30	lattosio	1	si	C	0,54	2,31	0,00
31	lattosio	1	si	D	0,54	n.d	4,0*
32	lattosio	1	si	D	0,54	n.d	4,0*
33	lattosio	1	si	E	0,54	n.d	4,0*
34	lattosio	1	si	E	0,54	n.d	4,0*

CONDUZIONE PROVA

Nel caso di inoculo misto si è proceduto nel modo seguente:

- L'inoculo viene pre-trattato termicamente secondo la procedura riportata nel paragrafo 2.2.2, dopodichè si misurano ST e SV;
- Nel caso si utilizzi come substrato del siero di latte, è necessario misurare la concentrazione in di COD. Per lattosio e glucosio, poiché si tratta di reagenti puri, il valore è ricavabile stechiometricamente;
- Sulla base degli SV dell'inoculo, è possibile determinare il volume di inoculo necessario per rispettare la concentrazione di SV in bottiglia desiderata;

- Noto il rapporto tra substrato e inoculo (F/M, Food/Microrganism) in termini di $\text{gCOD}_{\text{substrato}} \cdot \text{gSV}_{\text{inoculo}}^{-1}$, è possibile definire il quantitativo di substrato da aggiungere;
- Vengono poi aggiunti 50 mL di soluzione di macro-nutrienti;
- Viene poi aggiunta acqua dechlorata in quantità tale da raggiungere il volume complessivo desiderato.

Prima di avviare la prova, si modifica il pH della miscela, portandolo nell'intervallo compreso tra 6.2 e 6.5 con l'aggiunta di poche gocce di H_2SO_4 puro al 98%.

Dopo aver aggiustato il pH iniziale, se la prova lo richiede, si addiziona il MES in quantità tale da rispettare la concentrazione in bottiglia prefissata.

Si prepara sempre miscela in eccesso, 150 mL in più rispetto al volume che si vuole utilizzare nel reattore, in modo da poter effettuare le analisi sulla miscela iniziale.

Nel caso di inoculo puro, non è necessario effettuare il pretrattamento, poiché la biomassa utilizzata è già stata selezionata. Il volume di inoculo da addizionare è quindi vincolato, poiché dipende dal volume di inoculo puro fornito dal laboratorio di microbiologia. Il volume di substrato viene calcolato, ipotizzando di effettuare una prova con rapporto $F/M=4.0 \text{ g COD/g SV}$, in cui l'inoculo abbia la stessa concentrazione di ceppi batterici (UFC) di quello impiegato precedentemente.

La miscela è costituita da:

- Inoculo: 50mL;
- Lattosio: 6.35 g;
- Nutrienti: 50mL;
- MES 1 M: 27mL;
- Acqua dechlorata: 458mL.

La modalità di preparazione della miscela è la medesima rispetto a quella adottata nelle prove con inoculo misto, unica differenza sta nel fatto di aver addizionato il MES prima di aver effettuato la modifica del pH.

Anche in questo caso la soluzione preparata è in eccesso rispetto al volume che verrà impiegato nel reattore.

In entrambi i casi si insuffla azoto gassoso nello spazio di testa della bottiglia per alcuni minuti, in modo da creare delle condizioni anossiche, e si fa partire la prova

Le prove di BHP effettuate hanno avuto una durata di pochi giorni, in ogni caso si può considerare terminata la prova quando la produzione di metano risulta trascurabile .

ANALISI FINALI

I parametri misurati sono i seguenti:

- pH;
- ST e SV;
- COD solubile;
- VFA.

Anche in questo caso risulta lungo e dispendioso filtrare direttamente con questo tipo di filtro, perciò si effettuano delle pre-filtrazioni successive.

La

Fig. 18 Riassume in modo chiaro e semplice la preparazione della miscela impiegata per la prova di BMP e le analisi effettuate a inizio e fine prova.

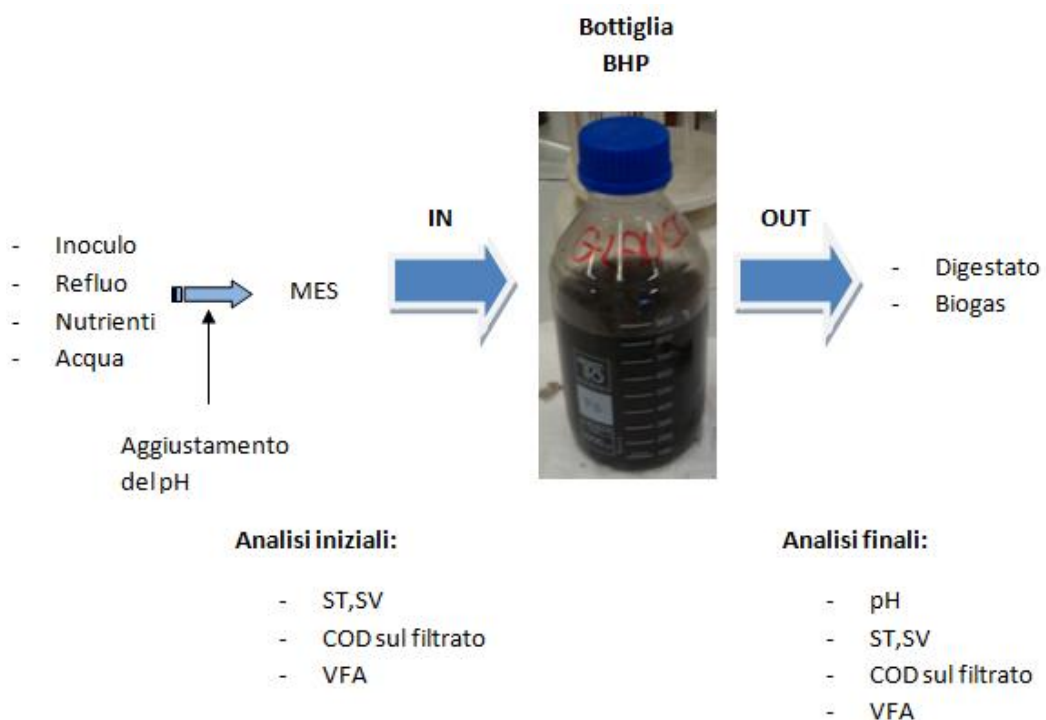


Fig. 18 Schema esemplificativo della procedura e delle analisi effettuate per una prova di BMP

2.4.4 DIGESTIONE ANAEROBICA

ALLESTIMENTO PROVA

L'obiettivo della sperimentazione è quello avviare un reattore di digestione anaerobica di volume utile pari a 1 L, alimentato con una soluzione di lattosio di concentrazione via via crescente durante la fase di transitorio, sino a raggiungere la concentrazione di lattosio alimentato pari a 40 gCOD/L.

La portata in uscita è uguale alla portata in ingresso e pari a 0.05 L/d.

La Tab. 19 mostra i parametri operativi adottati per la sperimentazione.

Tab. 19 Parametri operativi ottimali in condizioni di regime del sistema; i valori di temperatura e pH sono quelli impostati a inizio prova.

Temperatura	T	35	°C
pH	pH	7,4	
età del fango	SRT	20	d
tempo di ritenzione idraulica	HRT	20	d
organic loading rate	OLR	2	kg COD/m ³ /d

Per effettuare la prova si sono utilizzati i reattori semi-continui descritti al paragrafo 2.2.3. Il primo reattore viene riempito con 1 L di inoculo, mentre nel secondo reattore si aggiungono 100mL di soda. Il sistema complessivo ha quindi circa 1.22 L di spazio di testa.

Questi sono poi stati posizionati all'interno di un termostato al fine di mantenere la temperatura costante e pari a 35°C. Inoltre i reattori sono completamente miscelati mediante un'ancoretta magnetica inserita nella bottiglia OxiTop.

CONDUZIONE PROVA

La prova è stata condotta in doppio ed è durata complessivamente 50 giorni. La modalità con cui è stata condotta è la seguente:

- Il fango di digestione anaerobica tal quale viene tenuto all'interno di un termostato per ridurre la produzione di biogas non specifica;
- Ciascun reattore OxiTop, viene riempito con 1 L di fango di digestione anaerobica, dopodiché si insuffla azoto in entrambe le bottiglie della configurazione per alcuni minuti;

- Ogni giorno (5 giorni su 7) si misura la produzione di biogas mediante l'apposito telecomando di cui sono dotate le bottiglie OxiTop. Inoltre, è necessario sfiatare periodicamente il sistema, poiché la testa di misura è in grado di registrare i dati di pressione fino a una pressione di 350 hPa. L'operazione di sfiato viene condotta sotto battente d'acqua;
- I primi 2 giorni di prova, si effettua il campionamento prelevando da entrambe le bottiglie 50 mL di miscela, ed alimentandone altrettanti di acqua deionizzata; L'operazione di campionamento alimentazione è molto delicata e viene condotta mediante l'uso di siringhe in plastica. Le bottiglie non vengono alimentate con lattosio poiché si ha una produzione di biogas endogena. Le bottiglie vengono estratte dal termostato e immerse in un recipiente pieno d'acqua calda (alla temperatura di circa 35°C). Campionamento e alimentazione vengono fatti in modo rapido e mantenendo le bottiglie immerse per evitare che vadano in depressione richiamando aria dall'esterno;
- Successivamente i reattori vengono alimentati con una soluzione di lattosio e nutrienti con la stessa modalità. In particolare la soluzione di nutrienti contiene sali di fosforo e azoto, e carbonato di sodio. La concentrazione dell'alimento in termini di COD viene decisa giorno per giorno in funzione della concentrazione di COD solubile del sistema e della rapidità con cui viene degradato l'alimento del giorno precedente, dedotta dalla produzione di biogas. Se l'alimento viene degradato in breve tempo e l'efficienza di rimozione del COD è elevata, la concentrazione dell'alimento viene incrementata del 10% e in corrispondenza del weekend del 20% o del 30%. Se la degradazione dell'alimento è più lenta rispetto a quella del giorno precedente, la concentrazione dell'alimento viene mantenuta costante;
- Si procede in questo modo sino al raggiungimento della concentrazione di alimento obiettivo;
- Raggiunta la concentrazione desiderata si continua ad alimentare ogni giorno una soluzione di lattosio e nutrienti alla medesima concentrazione, sino ad arrivare alle condizioni di regime (

- Tab. 20);

Tab. 20 Piano di carico per entrambi i reattori OxiTop. Alimento costituito da una soluzione di lattosio di concentrazione definita in tabella, e nutrienti.

Giorno di prova	Concentrazione alimento
n	g COD/L_{alimento}
1	12,16
7	15,81
9	17,39
10	22,61
15	22,61
16	24,87
17	27,35
20	30,09
21	30,09
22	33,10
23	36,41
24	40,05
27	40,05
28	40,05
29	40,05

La concentrazione di lattosio è stata incrementata molto lentamente nel corso della prova in modo da permettere una crescita batterica ottimale, evitando fenomeni di inibizione dovuti all'eccessivo carico alimentato.

Nel caso si verificano comunque problematiche di questo tipo, è necessario alimentare il sistema con acqua e nutrienti, al fine di dilavare il sistema e ridurre la concentrazione di VFA all'interno del sistema, fornendo sempre nutrienti e alcalinità. Eventualmente è inoltre possibile far sedimentare la biomassa, e rimuovere la maggior parte della componente solubile, sostituendola con acqua, in modo da dilavare ulteriormente il sistema, senza ridurre la concentrazione di biomassa. Successivamente, per riavviare il sistema è opportuno evitare di campionare, sempre per non far diminuire la concentrazione di solidi del sistema, ed effettuare aggiunte impulsive di acetato di sodio.

Inoltre nel corso della prova, è necessario monitorare la soda e quando questa risulta essere esausta sostituirla. Pertanto si sconnette il sistema facendo in modo che nella bottiglia che costituisce il reattore biologico vero e proprio non entri ossigeno, dopodiché si sostituisce con nuova soda 3 M. La bottiglia contenente la trappola soda viene insufflata con azoto e in seguito viene riconnessa al primo reattore. L'intero sistema viene nuovamente insufflato con azoto per alcuni minuti.

ANALISI DI MONITORAGGIO

Ogni giorno, si effettua la lettura della sovrappressione generata mediante l'apposito telecomando OxiTop e la misura del pH.

I primi 25 giorni di prova, sull'aliquota campionata si è misurato unicamente il pH.

In seguito si è misurato:

- Sovrappressione generata;
- pH;
- COD solubile;
- ST, SV;
- SST, SSV;
- Alcalinità.

2.4.5 DARK FERMENTATION + DIGESTIONE ANAEROBICA

ALLESTIMENTO PROVA

Concettualmente si tratta di effettuare una prova di BHP seguita da una di BMP.

In entrambi i casi si utilizza lo strumento AMPTS. La temperatura del bagno termostato viene mantenuta pari a 35°C per tutta la durata della prova.

La prima parte della sperimentazione consiste nell'effettuare una prova di BHP con rapporto F/M pari a 4.0 gCOD/gSV e con una concentrazione di solidi volatili all'interno della bottiglia di 2.3 gSV·L⁻¹. Si preparano quindi 3 bottiglie, due delle quali con tale rapporto tra substrato e microrganismi, e una che funge da bianco.

La preparazione è la medesima di una qualsiasi prova di BHP. La miscela impiegata è la seguente:

- Inoculo: fango di digestione anaerobica pre-trattato termicamente (2.1.2.1);
- Substrato: lattosio;
- Soluzione di macro-nutrienti (0);
- Acqua declorata;
- Soluzione tampone di MES 1M (0).

Nel caso del bianco, il substrato non viene addizionato.

Nel corso della prova si ha produzione di biogas ricco di idrogeno e contestualmente produzione di acidi grassi volatili, soprattutto acido acetico e butirrico.

Terminata la prova di BHP, la miscela delle tre bottiglie viene filtrata al fine di rimuovere la componente particolata più grossolana, mediante imbuto di buchner.

Il filtrato fungerà da substrato per la successiva prova di BMP. La miscela impiegata per questa seconda prova è la seguente:

- Inoculo: fango di digestione anaerobica tal quale (2.1.2.1);
- Substrato: Filtrato della prova di BHP;
- Soluzione di macro-nutrienti (0);
- Acqua declorata;

Per le prove di BMP, il rapporto F/M viene fissato a 0.6 gCOD/gSV e la concentrazione di solidi volatili in bottiglia a 2.3 gSV/L.

CONDUZIONE PROVA

Per la prova di BHP si è proceduto come già descritto nel paragrafo 2.4.3.

Il valore di F/M scelto è stato di $4.0 \text{ gCOD}_{\text{substrato}} \cdot \text{gSV}_{\text{inoculo}}^{-1}$, e la concentrazione di solidi volatili all'interno del reattore di 2.3 g ST/L.

Le quantità impiegate nella singola bottiglia sono le seguenti:

- 303mL di inoculo. In particolare si è utilizzato fango di digestione anaerobica pretrattato termicamente C;
- 50mL di soluzione di macro-nutrienti;
- 4.7g di lattosio in polvere;
- 30mL di MES 1M;
- 421mL di acqua declorata.

Al termine della prova, le bottiglie vengono smontate e la miscela filtrata in modo grossolano utilizzando l'imbuto di buchner con un filtro di carta, al fine di rimuovere la componente particolata più grossolana.

Il filtrato, ricco di acidi grassi volatili, verrà impiegato come alimento per la prova di BMP.

Per la prova di BMP si è proceduto come spiegato nel paragrafo 2.4.2.

Il valore di F/M scelto è stato di $0.6 \text{ gCOD}_{\text{substrato}} \cdot \text{gSV}_{\text{inoculo}}^{-1}$, e la concentrazione di solidi volatili all'interno del reattore di 2.3 g ST/L.

Le quantità impiegate per ciascuna bottiglia sono:

- 88mL di inoculo, ossia fango di digestione anaerobica tal quale;
- 50mL di soluzione di macro-nutrienti;
- 94mL di substrato;
- 310mL di acqua dechlorata.

Oltre alle bottiglie di prova è stata preparata una terza bottiglia, in cui non è stato addizionato il substrato, in modo da poterla utilizzare come bianco.

La durata di tale sperimentazione è inferiore alle comuni prove di BMP, ed è di circa una settimana.

Di seguito si riporta uno schema, per chiarire meglio come si è operato e le analisi effettuate (Fig. 19).

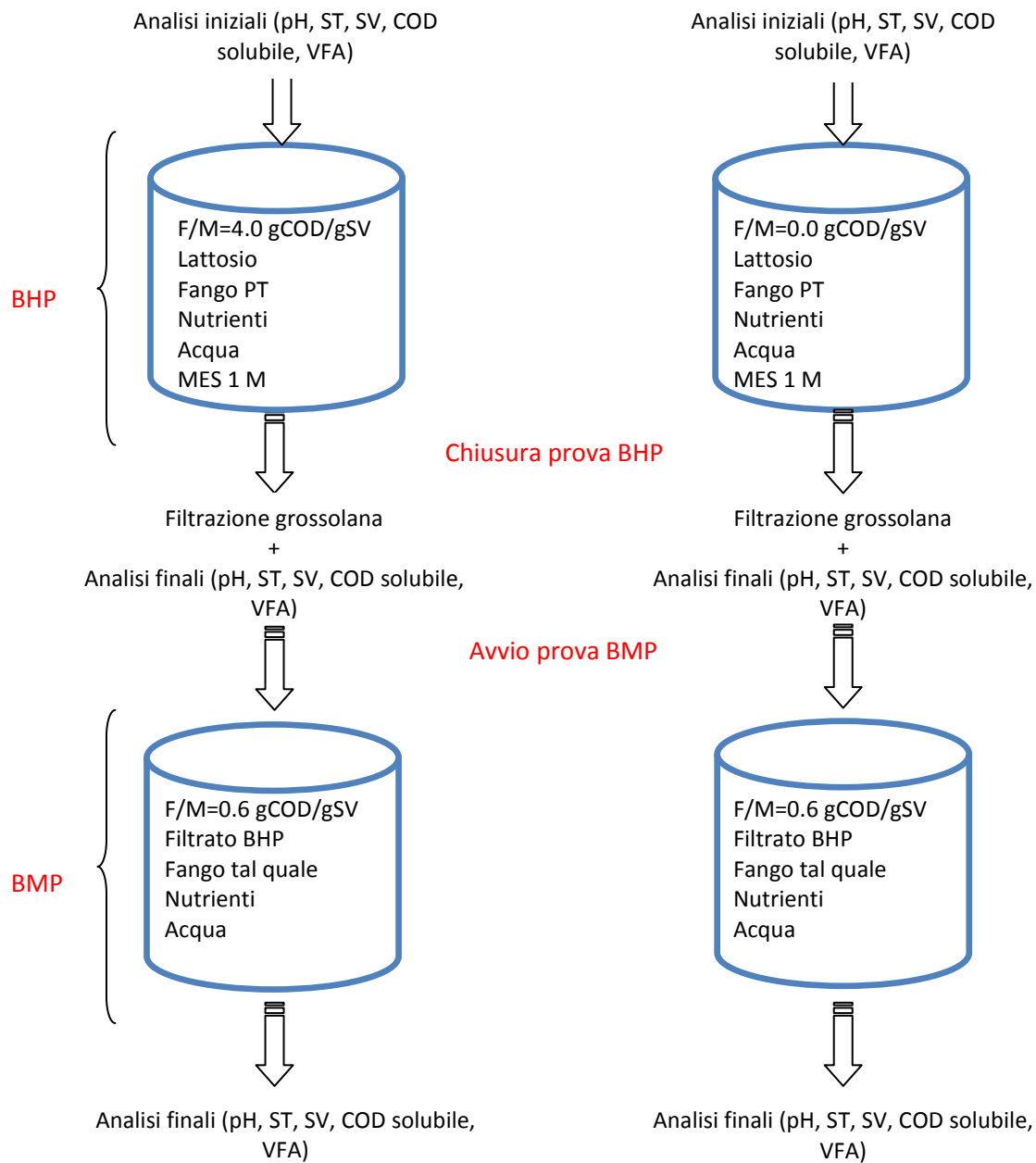


Fig. 19 Schema esemplificativo della modalità di preparazione della prova sia per le bottiglie di prova sia per il bianco e delle analisi effettuate.

ANALISI INIZIALI E FINALI

Per quanto riguarda la prova di BHP le analisi effettuate sia a inizio sia a fine prova sono le seguenti:

- pH;
- ST, SV;

- COD sul filtrato;
- VFA.

Per le prove di BMP non sono state fatte analisi iniziali sulla miscela. A fine prova sono state effettuate le medesime analisi delle prove di BHP.

2.4.6 ELABORAZIONE DEI DATI

2.4.6.1 DIGESTIONE ANAEROBICA

La produzione volumetrica di metano attesa viene calcolata mediante il seguente bilancio di massa:

$$V_{CH_4,t+1} = (M_{COD,in,t} + M_{COD,out,t} - M_{COD,out,t+1}) \cdot 0.35$$

(Eq. 16)

- $V_{CH_4,t+1}$: è il volume di metano atteso all'istante temporale t+1 [L];
- $M_{COD,in,t}$: è la massa di COD alimentata al tempo t [g COD];
- $M_{COD,out,t}$: è la massa di COD misurata in uscita al tempo t [g COD];
- $M_{COD,out,t+1}$: è la massa di COD misurata in uscita al tempo t+1 [g COD];
- 0.35 esprime stechiometricamente il volume di metano prodotto per unità di massa di COD consumata [NL/g COD].

Confrontando tale valore con il volume effettivamente prodotto è possibile se si sta sovrastimando o sottostimando questo parametro.

Nel primo caso, la sovrastima potrebbe essere dovuta a eventuale presenza di idrogeno, non totale assorbimento della CO₂ dalla trappola di soda, presenza di ossigeno o solubilizzazione del COD. Nel secondo caso, una sottostima può essere dovuta da perdite di biogas da parte del sistema.

2.4.6.2 PROVE DI BHP

Le quantità delle singole matrici di ogni prova AMPTS sono funzione dell'obiettivo della prova stessa. In particolare, il volume dell'inoculo si calcola a partire dalla concentrazione di solidi volatili nel reattore, mediante la seguente formula:

$$V_{inoculo} = \frac{V_{mix} \cdot SV_{mix}}{SV_{inoculo}}$$

(Eq. 17)

Dove:

- $V_{inoculo}$: è il volume di inoculo incognito [L];
- $SV_{inoculo}$: è la concentrazione di solidi volatili dell'inoculo utilizzato [g SV/L];
- V_{mix} : è il volume complessivo di miscela. Comprende sia il volume di prova sia quello utilizzato per le analisi [L];
- SV_{mix} : è la concentrazione di solidi volatili che si desidera ottenere nel reattore [g SV/L].

Il rapporto F/M è così definito:

$$\frac{F}{M} = \frac{c_{COD,sub} \cdot V_{sub}}{SV_{inoculo} \cdot V_{inoculo}} = \frac{M_{COD,sub}}{SV_{inoculo} \cdot V_{inoculo}}$$

(Eq. 18)

Dove:

- $\frac{F}{M}$: esprime il rapporto tra substrato e biomassa [g COD/g SV];
- $c_{COD,sub}$: è la concentrazione del substrato alimentato in termini di COD [g COD/L];
- V_{sub} : volume di substrato da alimentare incognito [L];
- $M_{COD,sub}$: massa di substrato alimentato in termini di COD [g COD];
- $SV_{inoculo}$: concentrazione di Sv dell'inoculo [g SV/L];
- $V_{inoculo}$: volume di inoculo alimentato [L].

Attraverso la formula inversa dell'(Eq. 18, è quindi possibile ricavare il volume di inoculo da alimentare.

Il volume di MES da aggiungere viene definito in base alla concentrazione finale della miscela che si vuole ottenere con una formula analoga all'(Eq. 17.

Il volume di acqua dechlorata viene definito nel modo seguente:

$$V_{acqua} = V_{tot} - (V_{inoculo} + V_{sub} + V_{MES} + V_{nutrienti})$$

(Eq. 19)

Dove:

- V_{acqua} : è il volume di acqua dechlorata da aggiungere [L];

- V_{tot} : è il volume complessivo che si intende preparare e comprende sia il volume di prova sia quello impiegato per le analisi [L];
- $V_{inoculo}$: volume dell'inoculo [L];
- V_{sub} : volume del substrato [L];
- V_{MES} : volume di MES [L];
- $V_{nutrienti}$: volume di soluzione di macro-nutrienti.

Il massimo BHP percentuale è definito come segue:

$$\max BHP (\%) = \frac{HY}{a}$$

(Eq. 20)

Dove:

- $\max BHP$: massimo rendimento di produzione potenziale di idrogeno [%];
- HY : Volume di idrogeno prodotto per unità di massa di COD alimentato [NL/g COD].
- a : è un coefficiente che indica il massimo volume di idrogeno potenzialmente producibile per unità di massa di COD alimentato, e vale 0.23 NL/g COD.

In particolare il valore di a viene determinato stechiometricamente

Se si considera il processo di dark fermentation di lattosio, la massima resa di idrogeno è pari a 8 mol H_2 /mol_{lattosio} nel caso si ottenga unicamente acido acetico come ulteriore prodotto di reazione.

Se il processo segue la via fermentativa che porta alla produzione di butirrato, la massima resa è pari alla metà, ossia 4 mol H_2 /mol_{lattosio}. Se si considera tale reazione il valore della costante considerata è stato così calcolato:

$$a = \frac{4 \text{ mol } H_2}{COD_{lattosio}} \cdot \frac{22.414 \text{ NL } H_2}{1 \text{ mol } H_2}$$

(Eq. 21)

In cui, il COD del lattosio è pari a 384 gCOD.

2.4.6.3 PROVA BHP+BMP

Per quanto concerne il dimensionamento della prova di dark fermentation si procede come illustrato nel paragrafo 2.4.3.

La determinazione della quantità di substrato da alimentare alla prova di digestione anaerobica è stata definita nel modo seguente:

$$M_{COD,in,BMP} = M_{COD,in,BHP} - M_{COD,H_2}$$

(Eq. 22)

Dove:

- $M_{COD,in,BMP}$: è la massa in termini di COD alimentata al reattore per la prova di digestione anaerobica incognita [g COD];
- $M_{COD,in,BHP}$: è la massa in termini di COD alimentata al reattore per la prova di dark fermentation nota [g COD];
- M_{COD,H_2} : è la massa in termini di COD consumata a seguito della produzione di idrogeno nel corso della prova di dark fermentation [g COD].

La massa di COD rimossa nel corso della prova di dark fermentation per la produzione di idrogeno M_{COD,H_2} , può essere determinata in questo modo:

$$M_{COD,H_2} = k \cdot V_{H_2}$$

(Eq. 23)

Dove:

- k : è una costante, ed è pari a 0.714 g COD consumati per NL di idrogeno prodotto;
- V_{H_2} : è il volume di idrogeno prodotto e misurato nel corso della prova di dark fermentation.

3 DISCUSSIONE DEI RISULTATI

3.1 CARATTERIZZAZIONE SIERO DI LATTE

ANALISI CHIMICHE FISICHE E BIOLOGICHE

La Tab. 21 mostra la concentrazione dei parametri chimico-fisici in fase di caratterizzazione del siero di latte utilizzato.

Tab. 21 La tabella riporta il nome dell'elemento di cui è stata misurata la concentrazione, l'unità di misura e il valore. n.r.: parametro non rilevato.

Parametro	unità di misura	valore	Parametro	unità di misura	valore
ST	g/L	149	Fosforo totale	mg P/L	1040
SV	g/L	135	Calcio	mg/L	975
COD	g/L	152,2-161,6	Magnesio	mg/L	218
TOC	mg C/L	42000	Sodio	mg/L	1190
BOD ₂₀	mg O ₂ /L	144100	Potassio	mg/L	4100
BOD ₅	mg O ₂ /L	114400	Litio	mg/L	<5
TKN	mg/L	700	Cloruri	mg/L	2600
N-NO ₂ ⁻	mg/L	0,2	Solfiti	mg/L	<2
N-NO ₃ ⁻	mg/L	22,7	Ferro	mg/L	<0,9
N-NH ₄ ⁺	mg/L	27	Manganese	µg/L	<40
N tot	mg/L	769	Rame	mg/L	243
S ²⁻	mg/L	n.r.	Zinco	mg/L	1260
Alcalinità	mg CaCO ₃ /L	1500	Nichel	ug/L	<35
Conducibilità	µS/cm 20°C	10000	Selenio	mg/L	<5
Fosfati	mg P/L	820			

Si ricorda che il siero utilizzato è stato precedentemente trattato e sottoposto a deproteinizzazione e successiva concentrazione mediante osmosi inversa.

E' infatti possibile osservare che la concentrazione di COD risulta essere superiore rispetto all'intervallo definito da Prazeres et al., di 50-102 g COD/L. Mentre la concentrazione di azoto totale risulta essere inferiore rispetto a quanto definito da Ercoli et al. (Tab.1, paragrafo 1.1.2.1), proprio per via del trattamento di deproteinizzazione effettuato mediante ultra filtrazione.

La contaminazione organica è elevata. Infatti il rapporto BOD₂₀/COD risulta essere pari al 95%, e il rapporto BOD₅/COD pari a 0.71 è maggiore rispetto a quello riscontrato in letteratura di 0.5 (Prazeres, et al., 2012).

Il rapporto tra BOD₅ e BOD₂₀ è pari al 79%, perciò la contaminazione organica è rapidamente biodegradabile.

I rapporti TKN/TOC e P/TOC danno entrambi un valore pari a 0.02, superiore a quello riscontrato in letteratura, rispettivamente pari a 0.17 e 0.005 (Prazeres, et al., 2012).

Il pH iniziale del siero di latte misurato è di 6.16, si tratta perciò di siero dolce, poiché ha pH>5.6 (Prazeres, et al., 2012). Il siero conservato in frigorifero alla temperatura di 4°C per una settimana risulta essere stabile, poiché non si osservano importanti variazioni né di pH né della concentrazione degli acidi grassi volatili (Tab. 22).

Tab. 22 Prova di stabilità del siero di latte alla temperatura di 4°C. I dati di concentrazione dei VFA totali sono stati misurati presso il laboratorio DICA.

tempo	pH	VFA totali
d	–	mg CH ₃ COOH/L
0	6,16	2700
1	6,17	2600
2	6,18	2900
7	6,14	2600

BMP

La prova di BMP è stata effettuata in doppio ed durata 30 giorni, al termine dei quali è stato possibile scaricare i dati misurati dallo strumento.

Nota il volume prodotto dalle prove d'interesse, è necessario sottrarre il valore di metano prodotto dal bianco, in modo da ottenere la produzione di metano netta, ossia specifica per il substrato alimentato.

Il volume cumulato di metano prodotto netto è riportato in Fig. 20 .

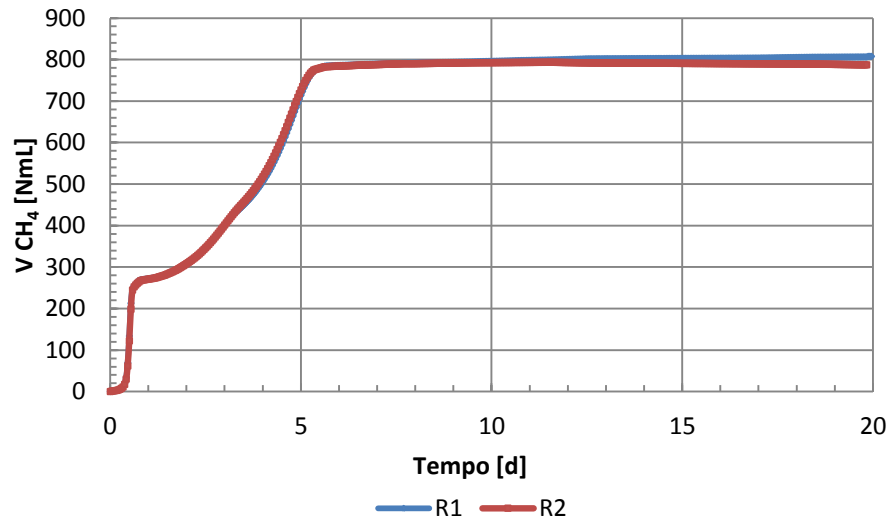


Fig. 20 Volume cumulato netto di metano prodotto dai due reattori alimentati con siero di latte deproteizzato e concentrato.

Dalle Fig. 20 e Fig. 21 è possibile osservare che la prova è riproducibile, in quanto, l'andamento di produzione dei reattori R1 e R2 è molto simile.

Il substrato risulta essere biodegradabile in condizioni anaerobiche, con degradabilità percentuale definita come il rapporto tra il COD trasformato in metano e il COD iniziale, pari a $86\% \pm 1\%$. Inoltre, la produzione di metano raggiunge lo stato stazionario dopo soli 5 giorni di prova, ciò conferma quanto osservato dal rapporto BOD_5/BOD_{20} , ossia che il substrato è rapidamente biodegradabile.

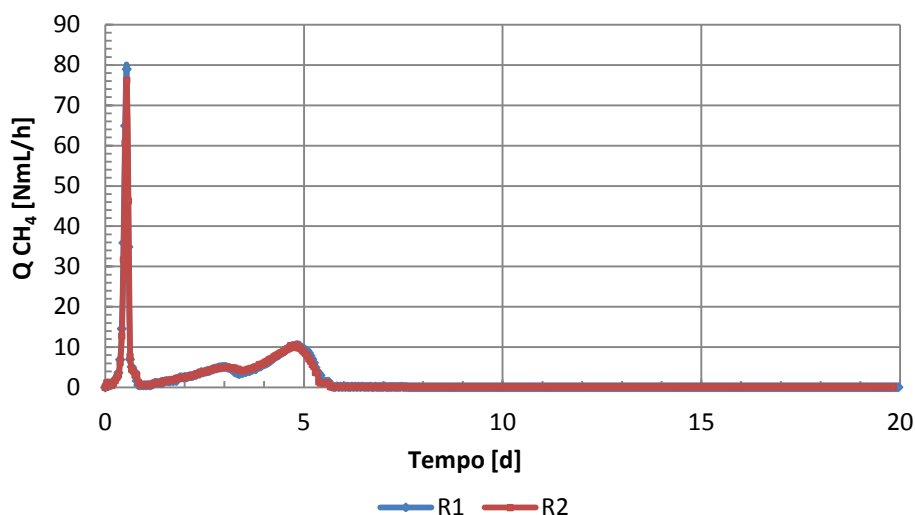


Fig. 21 Portata di metano prodotto nell'unità di tempo.

Il BMP quantifica quanto metano si produce per unità di COD alimentato, ed è definito come il rapporto tra il massimo volume di metano netto prodotto dal singolo reattore e la massa di SV dell'alimento di quel reattore.

Il valore di BMP finale è dato dalla media dei BMP calcolati per le singole prove, ed è pari a 348.8 ± 4.4 NmLCH₄/g SV.

Contemporaneamente alla prova di BMP del siero di latte pretrattato, il laboratorio DICA ha effettuato una prova di BMP nelle medesime condizioni operative e con la stessa modalità, impiegando come substrato del siero di latte liofilizzato in polvere. L'andamento della produzione è analogo a quello osservato con il siero deproteinizzato e concentrato, e i valori di BMP sono confrontabili, in particolare il BMP ottenuto con questo substrato è stato di 363.1 ± 8.5 mLCH₄/g SV.

3.2 CARATTERIZZAZIONE INOCULO

3.2.1 FANGO DI DIGESTIONE ANAEROBICA TAL QUALE.

Il fango di digestione anaerobica è stato prelevato dall'impianto di trattamento delle acque reflue di Peschiera Borromeo (Mi) in tre momenti successivi, perciò per meglio identificare ogni campione, si è associata una lettera dell'alfabeto: A, B, C.

Le caratteristiche dei campioni non pre-trattati sono riportate in Tab. 23.

Tab. 23 Caratteristiche del fango di digestione anaerobica prelevato a Peschiera Borromeo. Le lettere A,B,C contraddistinguono tre differenti prelievi.

	data di campionamento	pH	ST	SV	SST	SSV	SV/ST
	–	–	g/L	g/L	g/L	g/L	%
A	03/12/2012	7,7	17	10	n.d	n.d	59%
B	28/01/2013	8,2	21	14	n.d	n.d	67%
C	15/04/2013	7,2	21	13	19	12	61%

3.2.2 FANGO DI DIGESTIONE ANAEROBICA PRE-TRATTATO TERMICAMENTE

I tra campioni di fango di digestione anaerobica A, B, C, sono stati successivamente pretrattati termicamente. Il numero di pretrattamenti eseguiti, la data di questi e le caratteristiche dell'inoculo ottenuto sono riportati in Tab. 24.

Tab. 24 Caratteristiche del fango tal quale A,B,C per ogni pretrattamento termico eseguito; i parametri sono stati misurati a fine trattamento. PT: pretrattamento termico; n.d: non disponibile.

	numero PT	data PT	pH	ST	SV	SST	SSV
	–	–	–	g/L	g/L	g/L	g/L
A	1	03/12/2012	8,8	19	11	n.d	n.d
	2	10/12/2012	7,6	19	11	n.d	n.d
B	1	28/01/2013	8,5	25	16	n.d	n.d
	2	14/02/2013	8,3	14	9,3	n.d	n.d
	3	01/03/2013	9,2	20	12	16	9,2
	4	08/03/2013	8,8	26	17	22	13
C	1	22/05/2013	8,7	29	18	25	14

3.3 RISULTATI DELLE PROVE DI BHP

Nel corso della sperimentazione si è variata la concentrazione iniziale del substrato alimentato, con una conseguente modifica del rapporto F/M di prova; per quanto riguarda questo aspetto, in seguito si farà unicamente riferimento al rapporto F/M, tuttavia non si è in grado di definire con chiarezza se i risultati ottenuti siano influenzati dalla concentrazione del substrato, dal rapporto F/M o da entrambi i fattori.

Le prove di BHP effettuate sono state complessivamente 34.

Ciascuna prova è stata caratterizzata da un numero identificativo, il quale permette di riassumere le caratteristiche della prova stessa, in termini di tipologia del substrato, F/M, inoculo, MES ed eventuale assenza di soda.

L'obiettivo principale delle prove di BHP è stato quello di verificare l'effetto che differenti rapporti F/M hanno sulla produzione di idrogeno da dark fermentation. In realtà, nel corso della sperimentazione si è modificata la concentrazione del substrato alimentato,

Perseguendo tale si è indagato anche sull'utilizzo di differenti substrati e inoculi, e sulla variazione della concentrazione della soluzione tampone (MES).

Per ciascuna prova sono stati misurati pH, COD solubile, ST ed SV a inizio e fine prova. In più lo strumento AMPTS ha fornito i dati relativi a volume e portata di idrogeno nel tempo.

Di seguito si descriveranno i risultati sperimentali una singola prova di BHP, in modo da chiarire la modalità di elaborazione dei dati sperimentali ottenuti, il medesimo procedimento è stato poi impiegato per tutte le altre prove.

In seguito si tratterà della riproducibilità del metodo di sperimentazione e si analizzeranno alcuni degli aspetti significativi per la produzione di idrogeno, quali:

- L'influenza del rapporto F/M;
- L'influenza della tipologia di substrato alimentato (confronto tra lattosio puro e siero di latte deproteinizzato e concentrato);
- L'influenza della concentrazione di soluzione tampone, in funzione del rapporto F/M applicato.

Oltre a ciò si mostreranno i risultati di concentrazione dei VFA e alcuni prodotti solubili di interesse per le prove per cui sono disponibili.

Le tabelle complessive e i grafici relativi alle singole prove sono riportati a titolo di completezza in appendice.

3.3.1 ELABORAZIONE DEI RISULTATI SPERIMENTALI

Nel paragrafo seguente si descriverà la prova il cui codice identificativo è il numero 12.

Le caratteristiche di prova sono riassunte in Tab. 25.

Tab. 25 Caratteristiche della prova numero 12.

ID prova	Inizio	Fine	substrato	Inoculo	n PT	MES	SODA	COD in	SV in	F/M
			tipologia	(A,B,...)	(1,2,..)	M	si/no	g COD/L	g SV/L	gCOD/g SV
12	6/3/13	8/3/13	siero	B	3	1	si	12,75	2,3	5,6

La Fig. 22 mostra il tipico andamento del volume cumulado di idrogeno prodotto dal reattore e del rateo di produzione di idrogeno nel corso della prova.

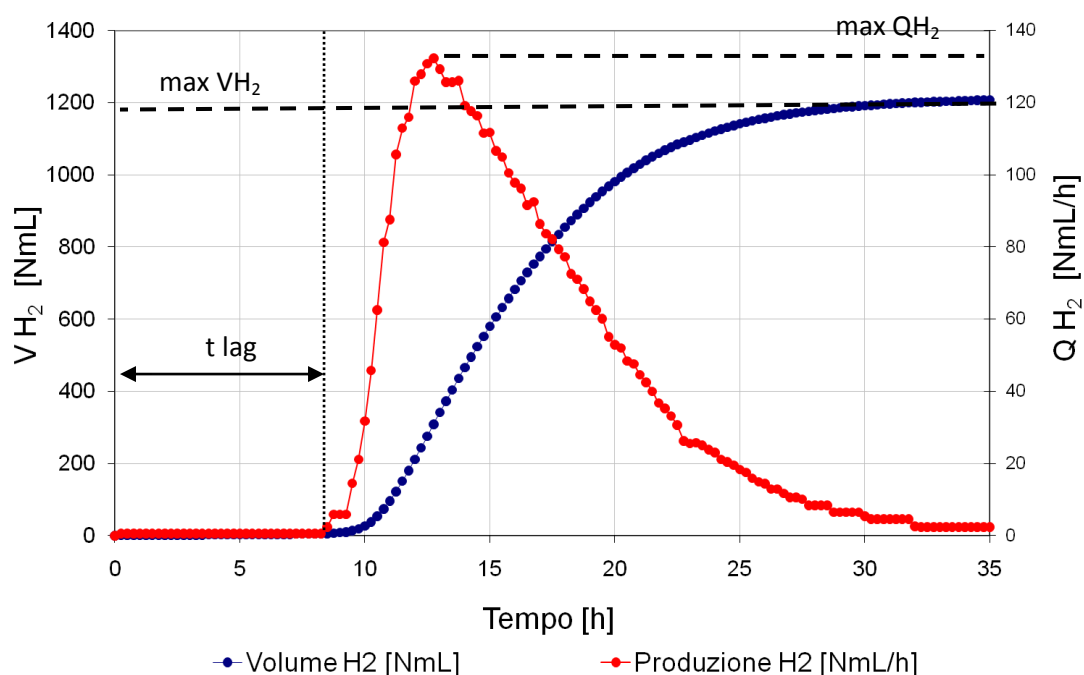


Fig. 22 Volume cumulado di idrogeno nel tempo, e la portata di produzione nel tempo.

L'andamento del volume cumulado di idrogeno prodotto nell'unità di tempo è simile con quanto riscontrato in letteratura (Logan, et al., 2002). La curva riportata (Fig. 22) potrebbe essere associata a una cinetica del primo ordine, tuttavia non tutte le prove esaminate presentano un andamento così pulito.

La prova è durata 35.5h, al termine delle quali il reattore è stato aperto e un'aliquota della miscela è stata impiegata per effettuare le analisi di fine prova (Tab. 26).

Tab. 26 Parametri significativi delle prove di BHP.

pH		COD		SV		tempi		H ₂	
pH in	pH out	COD in	COD out	SV in	SV out	durata	tempo di Lag	max V H ₂	max Q H ₂

-	-	mg/L	mg/L	g/L	g/L	h	h	NmL H ₂	NmL H ₂ /h
6,16	4,78	18080,00	13140,00	17,34	10,76	35,50	9,50	1208,6	132,3

La durata effettiva di prova e il tempo di ritardo iniziale vengono dedotti dai dati di volume registrati dallo strumento AMPTS.

In particolare, la durata della prova è pari all'istante di tempo in cui lo strumento AMPTS smette di registrare dati di produzione, coincidente con il raggiungimento dell'asintoto relativo alla curva di volume cumulato di idrogeno nel tempo, mentre il ritardo iniziale corrisponde all'istante temporale in cui lo strumento AMPTS registra un volume cumulato di biogas prodotto superiore a 10NmL.

A partire dalle misure di pH a inizio e fine prova è stato possibile calcolare la variazione assoluta di tale parametro, per le misure di COD e SV è stata calcolata unicamente la variazione percentuale. Per convenzione si è assunto che un valore di variazione percentuale negativo indichi una riduzione rispetto alla misura del parametro a inizio prova, viceversa, se si ottiene una variazione positiva si ha un incremento del parametro rispetto alle condizioni di partenza.

Inoltre si è calcolata la distanza temporale tra prelievo dell'inoculo e pre-trattamento termico, e tra pre-trattamento e avvio della prova.

A partire dal massimo volume di biogas prodotto, si è definita la resa di produzione specifica (HY_s), mediante la seguente formula:

$$HY_s = \frac{\max V_{H_2}}{M_{COD_{in}}}$$

(Eq. 24)

Dove:

- HY_s : resa di produzione di idrogeno specifica [NmLH₂/g COD];
- $\max V_{H_2}$: massimo volume di idrogeno prodotto [NmLH₂];
- $M_{COD_{in}}$: massa di substrato alimentata al reattore in termini di COD [g COD];

Il massimo valore di potenziale biochimico di idrogeno percentuale è definito come segue:

$$\max \% BHP = \frac{HY_s}{k}$$

(Eq. 25)

Dove:

- $\max \% BHP$: massimo potenziale biochimico di idrogeno percentuale [%];
- HY_s : resa di produzione di idrogeno specifica [NLH₂/g COD];
- k : vale 0.23 NLH₂/g COD ed è la massima resa di produzione specifica di idrogeno [NLH₂/g COD];

Ulteriori parametri calcolati, sono stati: produzione specifica di idrogeno per unità di biomassa inoculata al reattore [NmLH₂/g SV_{in}], e massimo tasso di produzione di idrogeno (HPR) definito come il rapporto tra la massima portata oraria di idrogeno prodotto e la massa di SV dell'inoculo presente nel reattore [NmLH₂ gSV_{inoculo}⁻¹h⁻¹].

I risultati ottenuti sono mostrati nella tabella seguente (Tab. 27).

Tab. 27 Risultati ottenuti dall'elaborazione dei dati sperimentali.

pH	COD	SV	TEMPI		HY			HPR
Δ pH	Degrad. COD	Andam. SV	prova- PT	prelievo- PT	max BHP _s		max %BHP	max HPR
-	%	%	d	d	NmL/ g SV _{in}	NmL/ g COD _{in}	%	NmL/ (hx gSV _{inoculo})
-1,38	-27,32	-37,95	5	32	978	175	76%	107

Per questa e per altre prove significative, sono state misurate le concentrazioni di alcuni prodotti di interesse sulla miscela finale. Nello specifico si sono misurate le concentrazioni di lattosio, galattosio, etanolo e dei VFA principali (acido acetico, acido butirrico, acido propionico, acido valerico, acido formico, acido lattico, acido iso-butyrico, acido iso-propionico, acido iso-valerico). I risultati ottenuti sono riportati nella tabella seguente (

Tab. 28).

Tab. 28 Concentrazione di VFA e prodotti solubili sulla miscela a fine prova. n.r.: non rilevato.

PRODOTTI SOLUBILI	concentrazione	
	mg/L	mol/mol _{lattosio in}
Lattosio	n.r	n.r
Galattosio	47	0,0062
Etanolo	n.r	n.r
VFA	concentrazione	
	mg/L	mol/mol _{lattosio in}
Acido formico	520	0,27
Acetato di sodio	1890	0,74
Acido lattico	300	0,08
Acido butirrico	3210	0,86
Acido isobutirrico	n.r	n.r
Acido propionico	n.r	n.r
Acido valerico	n.r	n.r
Acido isovalerico	n.r	n.r

Innanzitutto si è individuato il prodotto presente con la massima concentrazione. In seguito si sono calcolate le concentrazioni molarali di ciascun prodotto e queste sono state poi rapportate alla concentrazione molare di lattosio alimentato al sistema.

Si è poi calcolato il rapporto Bu/Ac facendo il rapporto tra la concentrazione molarali di acido butirrico e acetato di sodio.

In questo caso specifico si osserva che non è stato misurato lattosio, perciò la degradazione del substrato è stata pressoché completa.

I VFA maggiormente presenti sono acido butirrico e acido acetico. Le concentrazioni misurate sono in linea con quanto osservato in letteratura (Lin, et al., 2006); inoltre basandosi su quanto assunto da Kim et al., (2008) tali concentrazioni non sono inibenti per il processo fermentativo.

Il rapporto Bu/Ac risulta essere pari a 1.17. L'elevata concentrazione di acido butirrico indica che si è trattato di un processo fermentativo più orientato verso la produzione di

acido butirrico piuttosto che acido acetico, ciò è dovuto al fatto che la reazione di produzione di acido butirrico è termodinamicamente favorita.

Infine, per ciascuna sperimentazione i valori di concentrazione misurati sono stati rappresentati su grafici, confrontati tra loro e messi in relazione con il massimo BHP percentuale specifico di prova.

3.3.2 RIPRODUCIBILITA' DI PROVA

Per verificare la riproducibilità del metodo adottato sono state effettuate più prove, a parità di condizioni, con il medesimo rapporto F/M.

Complessivamente sono state fatte 7 prove, 4 delle quali (prove numero 22, 23, 24, 25) sono state preparate in replicato, e avviate contemporaneamente, la prova numero 18 è stata effettuata precedentemente impiegando le stesse matrici, mentre le prove 8 e 11 sono state preparate con inoculi differenti.

Le tabelle seguenti (Tab. 29, Tab. 30) mostrano le statistiche, quali massimo, minimo, intervallo, media e deviazione standard, calcolate facendo riferimento a tutte e sette le prove.

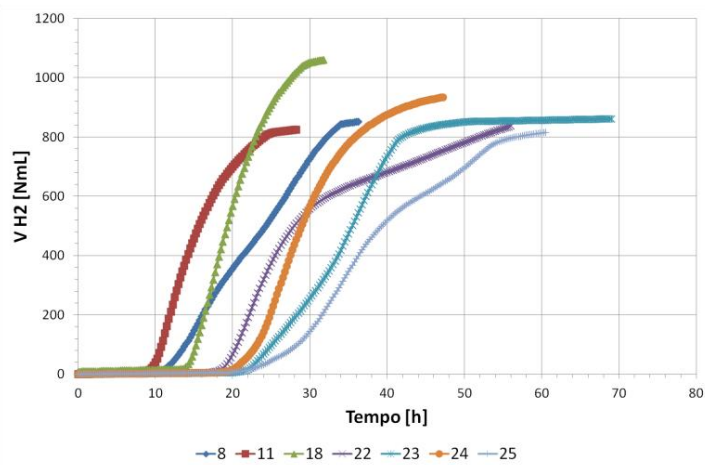
Tab. 29 Statistiche dei parametri misurati per le 7 prove. Max: massimo; Min: minimo; Range: differenza tra valore massimo e minimo; Media: è la media dei parametri di tutte le prove; Dev.st: deviazione standard.

	pH		COD		SV		tempi		H ₂	
	pH in	pH out	COD in	COD out	SV in	SV out	durata	tempo di Lag	V	Q
			mg/L	mg/L	g/L	g/L	h	h	NmL H ₂	NmL H ₂ /h
MAX	6,43	6,11	16670	15850	24	10	69,0	17,0	1059	105
MIN	6,25	4,95	11760	10400	13	6,9	28,3	9,0	815	45
RANGE	0,18	1,16	4910	5450	11	3,4	40,8	14,8	244	60
MEDIA	6,35	5,27	15771	14289	15	8,4	47,0	12,2	883	72
DEV. ST	0,09	0,42	1827	2150	3,8	1,2	15,5	5,3	87	24

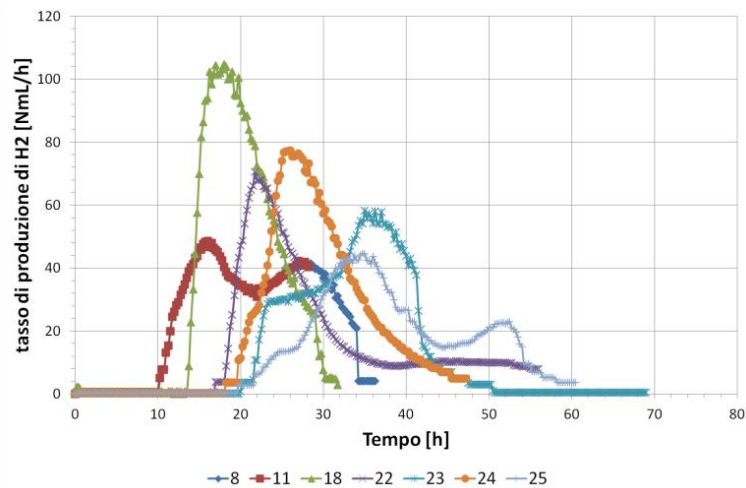
Tab. 30 Statistiche dei parametri calcolati.

	pH	COD	SV	TEMPI	H ₂		HPR	
	ΔpH	Degrad. COD	Andam. SV	prova- PT	max %BHP	max BHP sp.		max HPR
	-	%	%	d	%	NmL/ g SV in	NmL/ g COD in	NmL/ (hx gSV inoculo)
MAX	1,48	-4,8	-29,5	34	92%	850	212	84
MIN	0,23	-21,5	-66,5	2	72%	657	164	36
RANGE	1,25	16,8	37,0	32	21%	192	48	48
MEDIA	1,08	-9,6	-43,2	23	78%	710	178	58
DEV. ST	0,43	5,8	13,3	15	8%	69	17	19

Nei grafici seguenti si mostra l'andamento della produzione cumulata di idrogeno nel tempo e la portata di produzione per unità di tempo di ciascuna prova (Fig.23).



a)



b)

Fig. 23 Volume cumulato di idrogeno nel tempo (a) e tasso di produzione di idrogeno nel tempo (b).

Dalla Fig. 23 si osserva che, nonostante si tratti di prove con uguale rapporto F/M preparate adottando lo stesso metodo, l'andamento di produzione di idrogeno è differente. In particolare il tempo di ritardo iniziale, l'andamento di produzione durante la fase transitoria e la durata del processo variano da prova a prova. A una prima analisi sembrerebbe che le prove non siano riproducibili durante la fase di transitorio, tuttavia, tale differenza potrebbe essere dovuta al fatto di aver impiegato inoculi differenti (prelevati comunque dallo stesso impianti ma in periodi differenti, e conservati per tempi diversi).

Analizzando i dati di massimo tasso di produzione di idrogeno (HPR) di ogni prova, si nota che tale valore varia tra 84 e 36 $\text{NmLH}_2 \text{ gSV}_{\text{inoculo}}^{-1} \text{h}^{-1}$. Prove effettuate contemporaneamente utilizzando il medesimo inoculo (prove dalla numero 22 alla numero 25) danno valori di HPR che variano tra 36 a 62 $\text{NmLH}_2 \text{ gSV}_{\text{inoculo}}^{-1} \text{h}^{-1}$, perciò la variazione non è funzione dei diversi inoculi impiegati (Fig. 24).

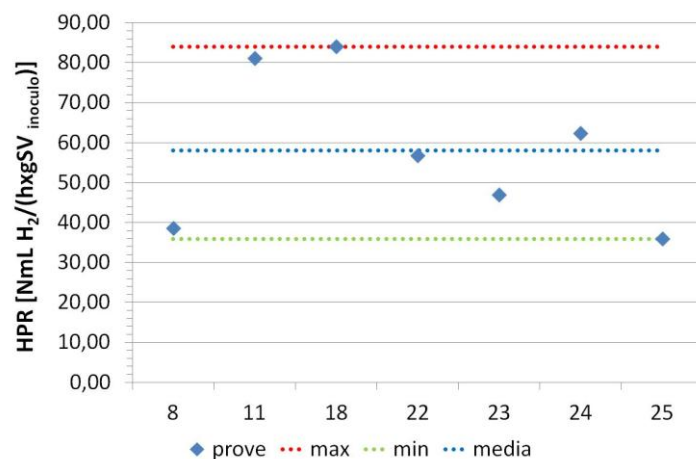


Fig. 24 Massimo HPR in funzione della prova. La linea rossa tratteggiata indica il valore medio calcolato impiegando tutti i valori di HPR, le linee viola indicano invece il valore minimo e massimo del parametro..

Anche durata e ritardo iniziale sono molto disuguali tra loro (Fig. 25). La durata delle prove varia tra 28 e 70 ore. Il valore medio è pari a 47 ore. La durata delle prove 22, 23, 24 e 25 risulta essere superiore a quella delle prove precedenti (tra 50 e 70 ore).

Il tempo di ritardo iniziale è compreso tra le 2 e le 18 ore ed è funzione del tipo di inoculo impiegato e delle condizioni operative. Dalla Fig. 25 si può osservare come la prova 18 rispetto alle prove 22-25 abbia un ritardo iniziale inferiore, nonostante l'inoculo impiegato sia il medesimo (C PT1), questa disparità è probabilmente dovuta all'invecchiamento dell'inoculo che determina maggiori ritardi in fase di avvio del processo fermentativo.

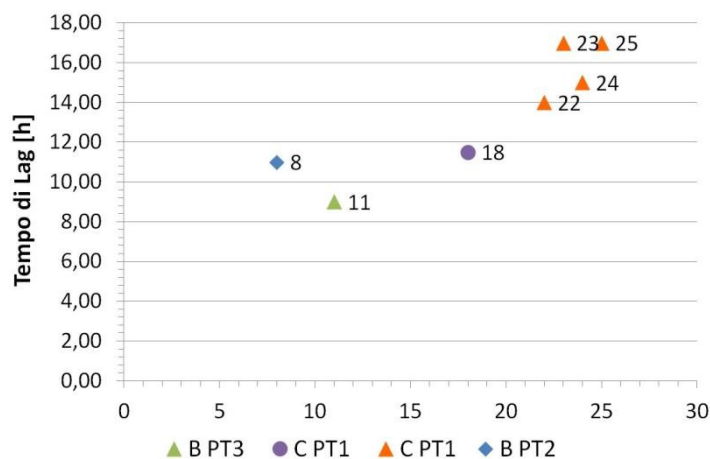
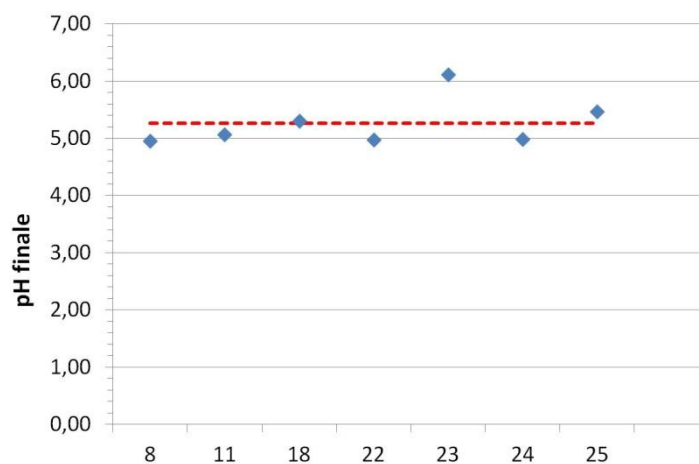


Fig. 25 Tempo di ritardo iniziale di ciascuna prova, in funzione del tipo di inoculo e pretrattamento termico effettuato sull'inoculo. Le etichette riportano il numero di prova.

La differenza di pH tra inizio e fine prova è estremamente variabile (Fig. 26,b), tuttavia il pH finale tende a essere piuttosto costante e compreso tra 4.98 e 6.11, con un valore medio pari a 5.27 (Fig. 26,a). Il valore medio osservato si discosta di poco, dal valore reputato ottimale per la crescita dei batteri del genere Clostridium da Li net al., (2006).

a)



b)

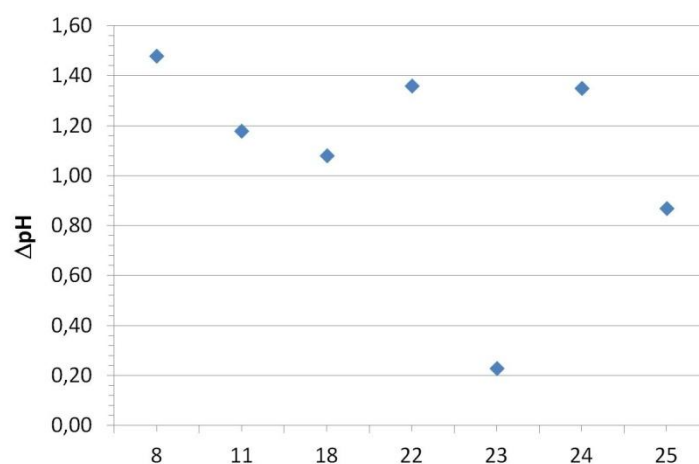


Fig. 26 pH finale di prova. La linea rossa tratteggiata indica il pH finale medio calcolato come valor medio di tutte le prove (da 1 a 7)(a); variazione di pH per ogni prova (b).

Per quanto riguarda la variazione della concentrazione del COD e dei solidi volatili, non si osserva un andamento significativo.

Mentre, per la produzione finale di idrogeno, se si trascura la prova 11, il massimo volume prodotto a regime e la resa di produzione sono comparabili tra loro e pressoché costanti (Fig. 27)

Fig. 27.

Il massimo volume di idrogeno prodotto varia tra 815 e 1060 NmL di idrogeno, le corrispondenti rese di produzione percentuale variano tra il 72% e il 92% .

Considerando tutte le prove, se si calcola la distanza percentuale media dei valori di BHP, intesa come il rapporto tra la deviazione standard e la media dei valori di BHP, si ottiene un valore pari al 10.3%, escludendo invece la prova numero 11, si ottiene 5.3%. Tale differenza è dovuta a condizioni di prova leggermente diverse, infatti la prova 11 è stata condotta con miscelazione del reattore leggermente superiore a quella delle altre prove, favorendo una maggior produzione di idrogeno.

In conclusione, le prove non sono confrontabili tra loro durante la fase di transitorio, ma risultano essere riproducibili durante la fase di regime.

3.3.3 EFFETTO DI DIFFERENTI SUBSTRATI

E' interessante confrontare l'effetto di differenti substrati sul processo di dark fermentation, in termini di produzione volumetrica di idrogeno, di massimo BHP percentuale, di HPR, di variazione di pH, COD e solidi volatili.

I substrati confrontati sono siero di latte deproteinizzato e concentrato e lattosio in polvere. La metodica applicata per la preparazione e le analisi a inizio e fine prove per entrambi i substrati sono descritte nel capitolo materiali e metodi.

I rapporti F/M teorici indagati sono stati: 2.5, 4.0 e 5.5 gCOD/gSV. Per ciascun rapporto di F/M è stata effettuata una prova con siero e una con lattosio.

Durante il corso di ciascuna prova si osserva come l'andamento di produzione di idrogeno sia differente e funzione del substrato alimentato. I reattori alimentati con siero di latte presentano ritardi iniziali inferiori rispetto a quelli alimentati con lattosio, e hanno tassi di produzione orari superiori (Fig. 27).

Tuttavia, a regime il volume complessivamente prodotto dai reattori alimentati è confrontabile, infatti la differenza percentuale in termini di volume prodotto utilizzando i due substrati è pari a 0.9%, 3.3% e 3.8% rispettivamente per F/M pari a 2.5, 4.0 e 5.5 gCOD/gSV..

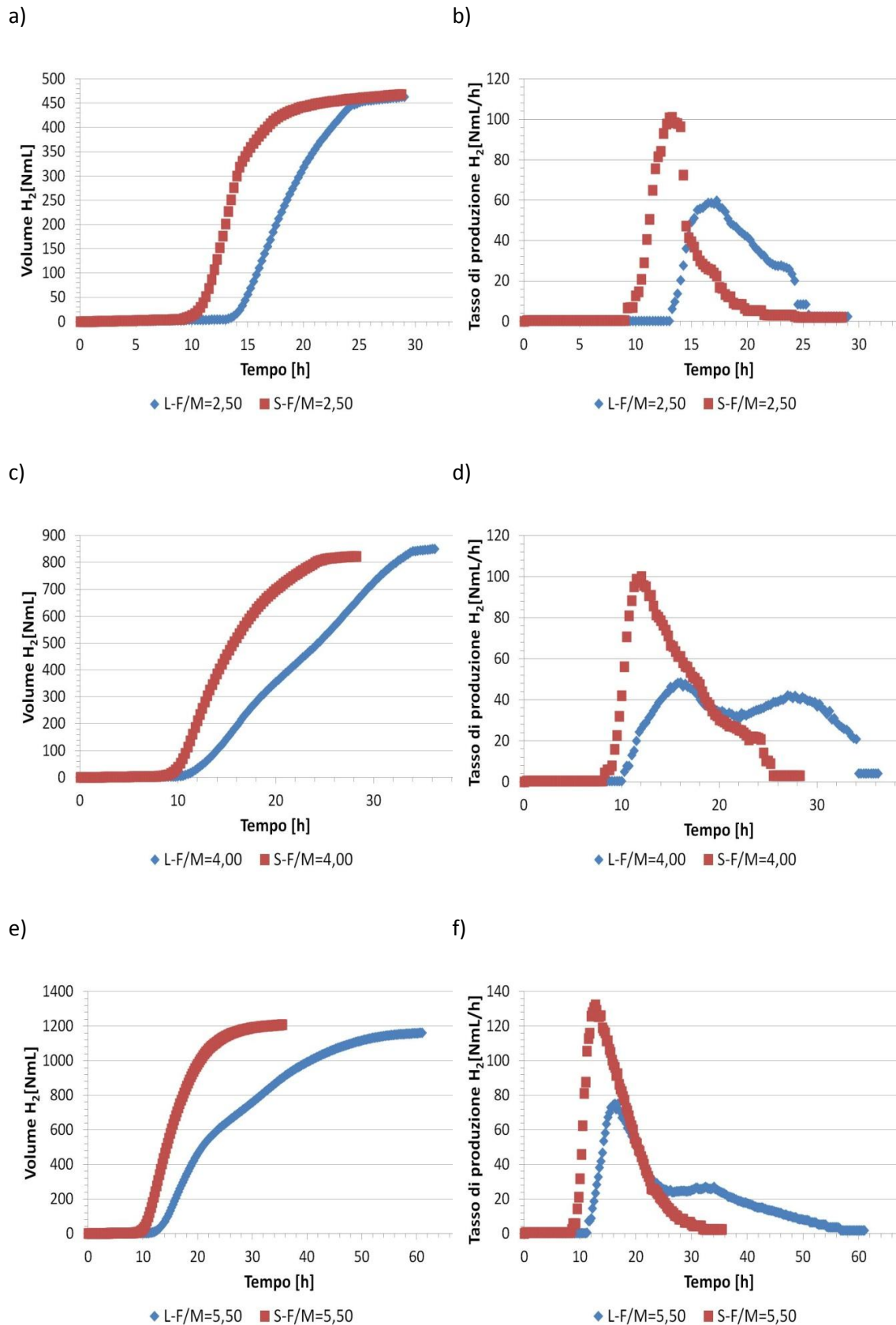
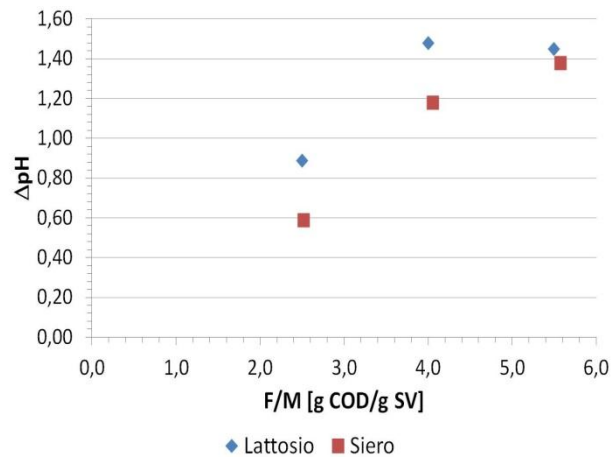


Fig. 27 Volume cumulato di idrogeno nel tempo (a,c,e) e portata di idrogeno prodotto nel tempo (b, d, f). In ogni grafico, la curva blu rappresenta i reattori alimentati con lattosio (L), mentre quella rossa i reattori alimentati con siero (S). Per ogni grafico è riportato il rapporto F/M adottato.

Per quanto riguarda il pH, si osserva che la variazione di tale parametro nel corso della prova cresce all'aumentare del rapporto F/M applicato (Fig. 28,a). Il pH finale di prova è compreso tra 4.78 e 5.80, e presenta un trend decrescente rispetto al rapporto F/M.

E' interessante notare come, prove con differenti substrati tendano a riportarsi a un valore di pH finale coincidente (Fig. 28,b).

a)



b)

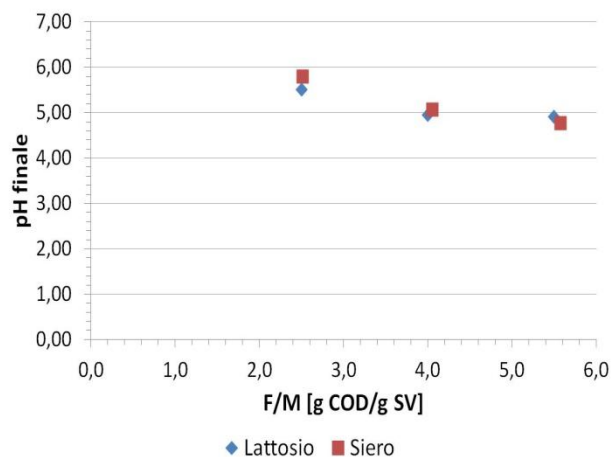


Fig. 28 Variazione del pH durante il corso della prova in funzione del substrato e del rapporto F/M (a); pH finale di prova in funzione del substrato e del rapporto F/M (b).

Per quanto riguarda il ritardo iniziale di produzione e la durata di processo è possibile fare le seguenti considerazioni:

- la durata delle prove aumenta all'aumentare del rapporto F/M sia con lattosio sia con siero di latte. Tuttavia per F/M pari a 2.5 gCOD/gSV la durata delle prove con lattosio e siero è la stessa (circa 29 ore), aumentando il valore di F/M la durata di

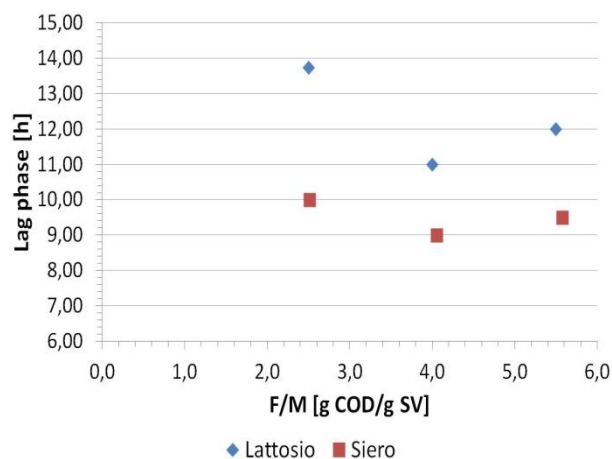
prova con lattosio risulta essere via via sempre maggiore rispetto alle prove con siero di latte (36 e 61 ore con lattosio e 28 e 36 ore con siero)(Fig. 29,b);

- le prove con lattosio hanno tempi di lag sempre superiori rispetto alle prove con siero, infatti il ritardo iniziale per le prove con siero è di 9-10 ore, mentre con lattosio varia tra 11 e 14 ore (Fig. 29,a).

Probabilmente il siero di latte fornisce nutrienti più facilmente disponibili alle spore batteriche, ponendole in condizioni ottimali per la loro germinazione e per una più rapida produzione di idrogeno, mentre con lattosio, le spore necessitano di un periodo iniziale maggiore per germinare e produrre biogas.

Sarebbe quindi interessante ed utile, confrontare le concentrazioni di macro-nutrienti nelle prove con lattosio e con siero, ed effettuare ulteriori prove variando la soluzione di macro-nutrienti addizionata.

a)



b)

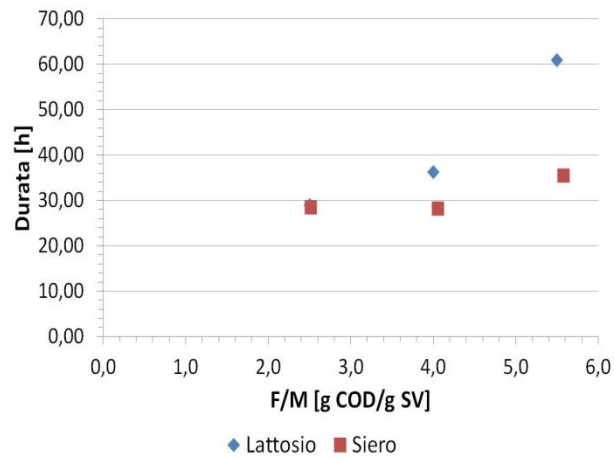
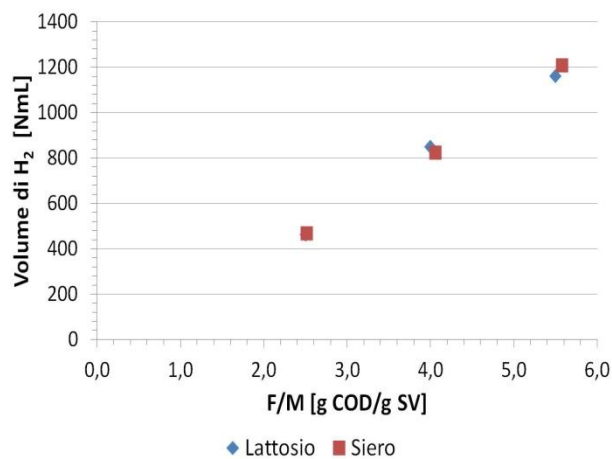


Fig. 29 Ritardo iniziale in funzione del substrato e del rapporto F/M (a); Durata complessiva della prova in funzione di substrato e rapporto F/M (b).

Il volume complessivamente prodotto presenta un incremento lineare rispetto all'F/M applicato, ed è il medesimo, a parità di F/M (Fig. 30,a). La portata di idrogeno prodotto per unità di tempo è maggiore per prove alimentate con siero (Fig. 30,b), confermando quanto detto in precedenza, ossia, che nelle prove alimentate con siero, le sostanze necessarie per la germinazione e lo sviluppo delle spore risultano essere più facilmente disponibili, permettendo una produzione di idrogeno più rapida con una portata maggiore.

a)



b)

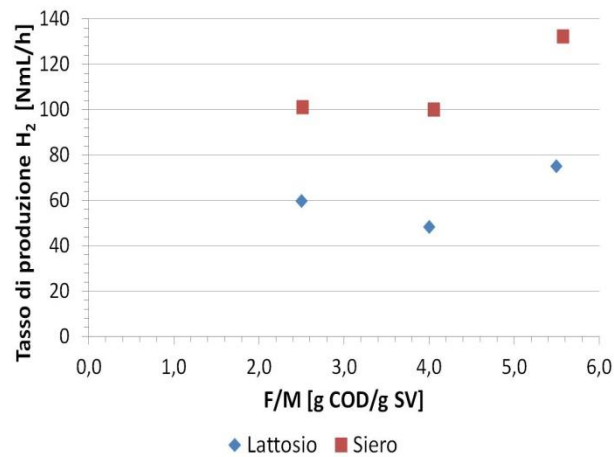


Fig. 30 Massimo volume cumulato di idrogeno in funzione di substrato e rapporto F/M (a); Massima portata di idrogeno prodotto in funzione di substrato e rapporto F/M (b).

Per F/M pari a 2.5 gCOD/gSV il valore di BHP è rispettivamente di 64% per la prova con lattosio e 66% per la prova con siero; per F/M pari a 4.0 gCOD/gSV il valore di BHP è rispettivamente di 74% per la prova con lattosio e 72% per la prova con siero e per F/M pari a 5.5 gCOD/gSV il valore di BHP è rispettivamente di 73% per la prova con lattosio e 76% per la prova con siero (Fig. 31).

Se ne deduce che incrementando il rapporto F/M, il massimo BHP percentuale aumenta per entrambi i substrati alimentati. Tale aumento è maggiore passando da F/M 2.5 a 4.0gCOD/gSV.

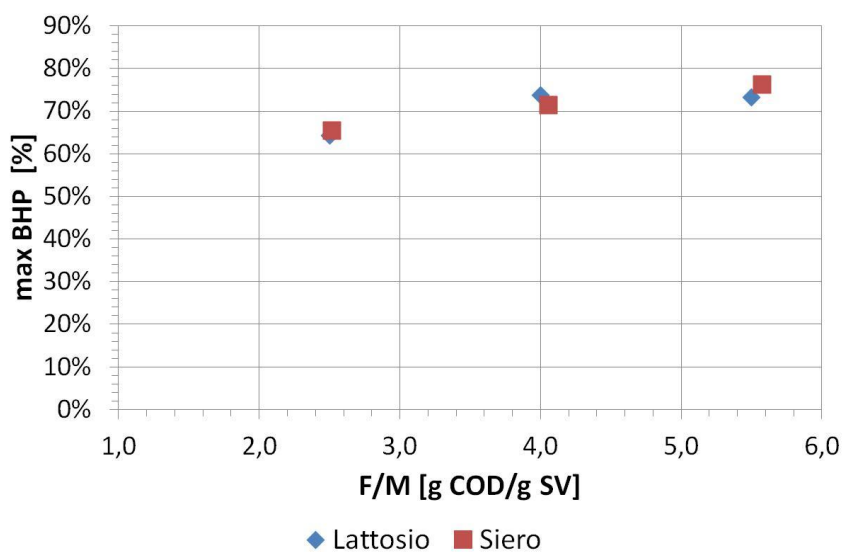


Fig. 31 Massimo BHP percentuale in funzione del substrato e del rapporto F/M.

E' possibile concludere che, i due substrati durante la fase di transitorio non si comportano nello stesso modo, mentre a regime si osserva lo stesso andamento, perciò nelle prove successive, per semplicità, si farà ricorso a un unico substrato, il lattosio, poiché più facilmente disponibile.

Il lattosio è stato ampiamente impiegato come substrato per il processo di dark fermentation, con buoni risultati. Da letteratura, è noto che substrati ricchi di carboidrati sono ideali per questo processo fermentativo. Dai risultati ottenuti si evince che il siero di latte opportunamente pretrattato non comporta svantaggi dal punto di vista produttivo del processo indagato, anzi in termini di velocità di conversione e di massimo BHP risulta essere il substrato migliore.

Inoltre utilizzare siero di latte comporterebbe ulteriori vantaggi ambientali, quali, lo smaltimento di un refluò dell'attività lattiero casearia associato alla produzione di energia. In più utilizzare siero al posto di lattosio permette di risparmiare substrati puri, quali lattosio e glucosio.

3.3.4 EFFETTO DI DIFFERENTI RAPPORTI F/M

Il paragrafo seguente ha l'obiettivo di confrontare tutte le prove effettuate utilizzando come inoculo una coltura mista, in differenti condizioni operative. In particolare lo scopo è quello di definire l'effetto che il rapporto F/M ha sul processo di dark fermentation.

Dal grafico seguente (Fig. 32) è possibile osservare che:

- il valore di BHP è funzione del rapporto F/M applicato;
- Osservando unicamente i dati relativi a prove in cui si è utilizzato MES 1M, si nota che l'efficienza di produzione di idrogeno aumenta sino a valori compresi tra 70% e 92% per F/M pari a 4 gCOD/gSV, tende poi a stabilizzarsi all'interno di tale intervallo sino a rapporto F/M di 5.5 gCOD/gSV. Superato tale valore di F/M il BHP percentuale diminuisce, fino a portarsi a valori di 30-40% per F/M pari a 9.4 gCOD/gSV. Andamento analogo è stato riscontrato da Nasr et al. (2013);
- Le prove effettuate senza l'aggiunta di MES hanno portato a basse produzioni, dimostrando che è necessaria una misura di controllo del pH durante il corso della prova;
- Aumentando il rapporto F/M è necessario dosare soluzioni di MES più concentrate, poiché si aumenta la concentrazione del substrato, si ha una maggior produzione di VFA con conseguente acidificazione del mezzo di reazione, che se non viene

tamponata in maniera adeguata porta all'inibizione dell'intero processo. Per questo motivo per F/M pari a 7 gCOD/gSV si è impiegato MES 2M e per F/M pari a 9.4 gCOD/gSV si è aggiunto MES 3M. Per rapporti F/M inferiori è sufficiente MES 1M;

- Si osservano dei valori di BHP percentuale anomali in corrispondenza di F/M pari a 6.7 e 7 gCOD/gSV, pari a 45% e 40%, probabilmente dovuti a errori dell'operatore nel corso della preparazione o malfunzionamento dello strumento in corso di prova.

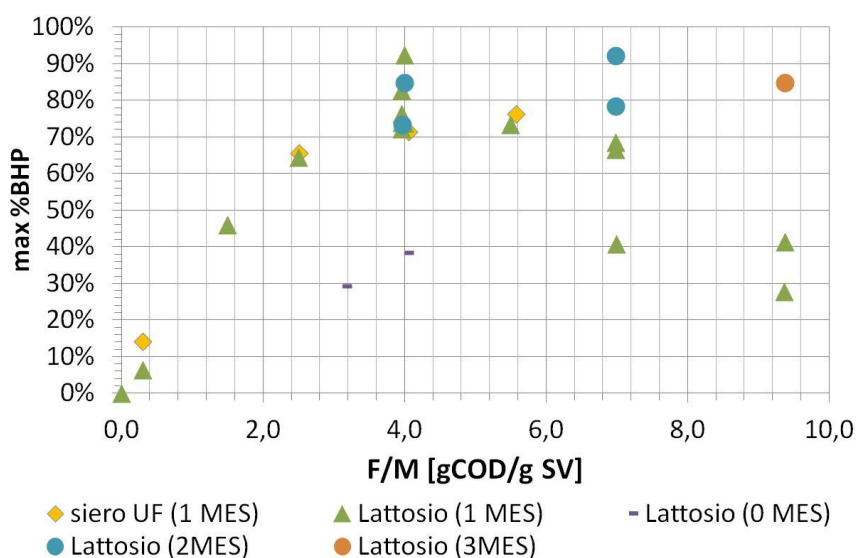


Fig. 32 Massimo BHP percentuale in funzione del rapporto F/M applicato, del tipo di substrato e della concentrazione della soluzione di MES.

La produzione di idrogeno specifica per unità di biomassa alimentata aumenta con il rapporto F/M. Per F/M maggiori di 5.5 gCOD/gSV, in assenza di un adeguato sistema tampone, si osserva un'inibizione dell'attività batterica. Questo concetto sarà chiarito in seguito, nel paragrafo .

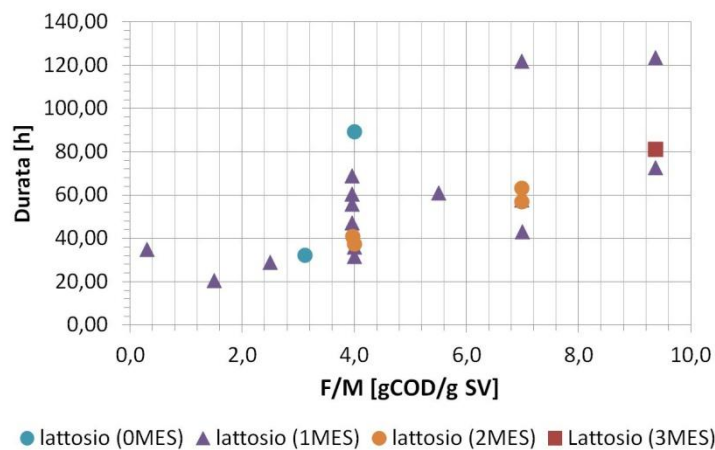
Per quanto riguarda la durata di prova e il ritardo iniziale di produzione, facendo riferimento alle sole prove alimentate con lattosio, è possibile osservare che:

- La durata aumenta all'aumentare di F/M poiché aumenta la massa di substrato da degradare (Fig. 33,a);
- Il ritardo iniziale varia tra le 10 e le 22 ore, in funzione delle caratteristiche dell'inoculo impiegato (Fig. 33**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**,b);

La durata di alcune prove per F/M pari a 7 e 9.4 gCOD/gSV risulta essere pari a 120 ore, di molto superiore a quella riscontrata per altre prove a parità di concentrazione del substrato, tuttavia non si è in grado di determinare il motivo di tale disparità.

Anche nel caso della fase di Lag si osservano delle prove con ritardi di produzione iniziale, a parità di F/M, superiori a quelli medi, ciò è funzione dell'inoculo impiegato.

a)



b)

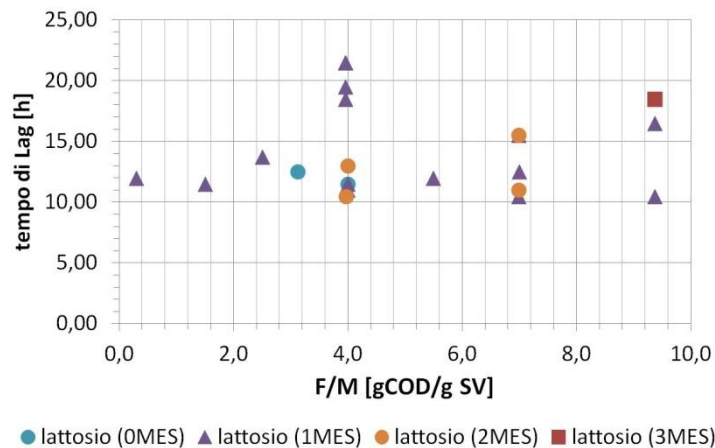


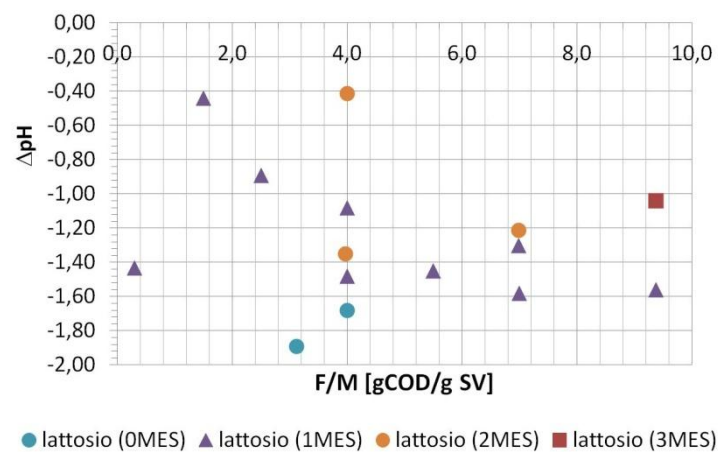
Fig. 33 Durata delle prove in funzione del rapporto F/M (a); Ritardo iniziale in funzione del rapporto F/M (b).

Aumentando il rapporto F/M aumenta la variazione di pH del mezzo di reazione, di conseguenza si ha una riduzione del pH finale. Nelle varie prove, il pH finale, a parità di F/M, tende a riportarsi sui medesimi valori (Fig. 34).

In particolare per F/M minori di 2 gCOD/gSV si hanno pH finali pari a 4.95-5.1, aumentando il rapporto sino a 2.5 gCOD/gSV, il pH finale aumenta portandosi su valori compresi tra 5.5-6.0, dopodiché tende a diminuire, indipendentemente alla concentrazione del MES, sino a valori di poco inferiori a 5.

I valori di pH osservati sono coerenti con quanto riportato in letteratura (Lin, et al., 2006); Sono stati riscontrati anche valori di pH finale minori di 5.0, addirittura Li, et al. (2008) ottennero valori di pH a fine prova compresi tra 4.65 e 4.85 partendo da pH iniziale compreso tra 5.0 e 7.0.

a)



b)

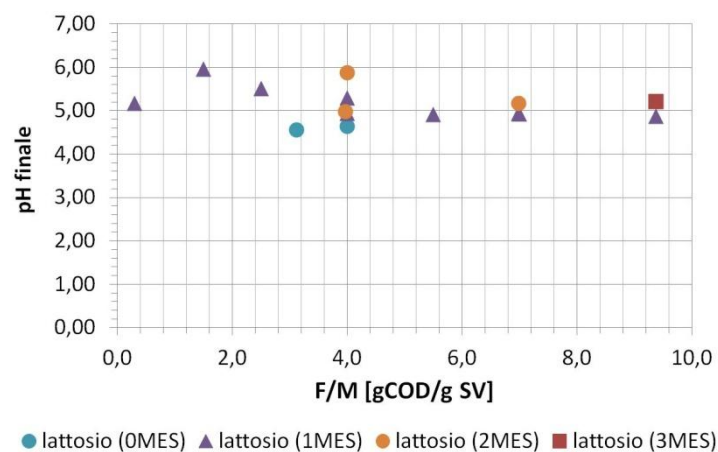
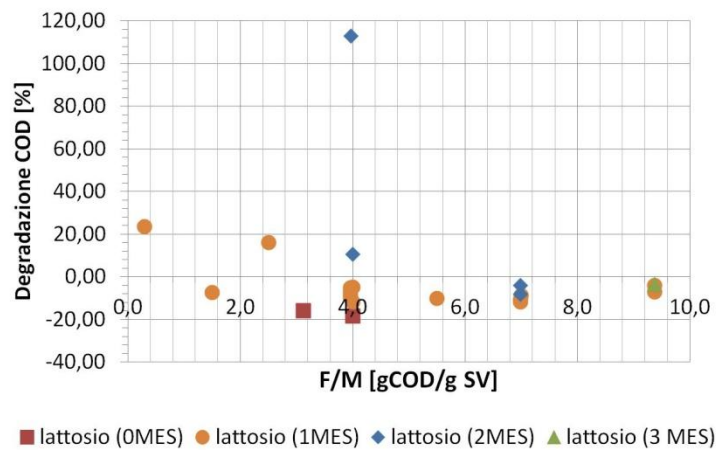


Fig. 34 Variazione percentuale del pH in funzione del rapporto F/M (a); pH finale in funzione del rapporto F/M (b).

Per quanto riguarda la concentrazione di COD è possibile osservare una riduzione percentuale fino ad un massimo pari al -27%. Tuttavia in alcune prove si sono ottenute concentrazioni di COD finale maggiori rispetto a quelle iniziali dovute a eventuali errori di misura e all'incertezza del metodo di misura. L'effetto del processo su tale parametro è però da chiarire.

Anche nel caso della concentrazione di SV si osserva una riduzione (Fig. 35). L'eccessiva riduzione della concentrazione di solidi volatili potrebbe essere dovuta al metodo sperimentale di misura. Poiché la concentrazione di acidi grassi volatili è elevata potrebbe risultare opportuno misurare la concentrazione di solidi volatili ad esempio mediante liofilizzatore, in modo da non perdere il contributo degli acidi organici e effettuare una misura più accurata.

a)



b)

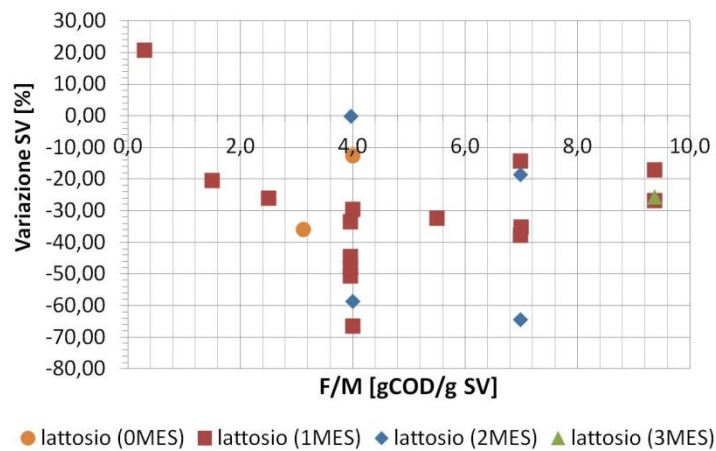


Fig. 35 Degradazione percentuale del COD in funzione del rapporto F/M (a); Variazione percentuale degli SV totali misurati in funzione del rapporto F/M (b).

3.3.5 INOCULO PT

L'obiettivo di questo paragrafo è quello di chiarire l'effetto che inoculi prelevati e pretrattati con lo stesso processo ma in periodi differenti hanno sul processo di dark fermentation in termini di: produzione di idrogeno, pH finale, degradazione di COD, durata e ritardo iniziale.

In tutte le prove impiegate per fare questa analisi è stato addizionato MES 1M ed è stata impiegata la trappola di soda.

Il rapporto F/M delle prove analizzate varia da 0.3 a 9.4 gCOD/gSV, e il substrato alimentato è prevalentemente lattosio, a eccezione delle prove 2, 10, 11, 12 in cui è stato alimentato siero di latte. Tuttavia, siero e lattosio si comportano ugualmente solo in condizione di regime, i parametri di transitorio in cui si hanno notevoli differenze verranno discussi riferendosi alle sole prove con lattosio.

Gli inoculi confrontati sono tutti fanghi di digestione civile prelevati presso l'impianto di trattamento acque reflue di Peschiera Borromeo, in periodi differenti, e successivamente pretrattati termicamente. In particolare si fa riferimento a:

- inoculo B che ha subito il pretrattamento 1 (B PT1). Le prove considerate sono :1, 2;
- inoculo B che ha subito il pretrattamento 2 (B PT2). Le prove considerate sono: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9;
- inoculo B che ha subito il pretrattamento 3 (B PT3). Le prove considerate sono : 10, 11, 12;
- inoculo C che ha subito il pretrattamento 1 (C PT1). Le prove considerate sono : 17, 18, 22, 23, 24, 25, 26 e 28.

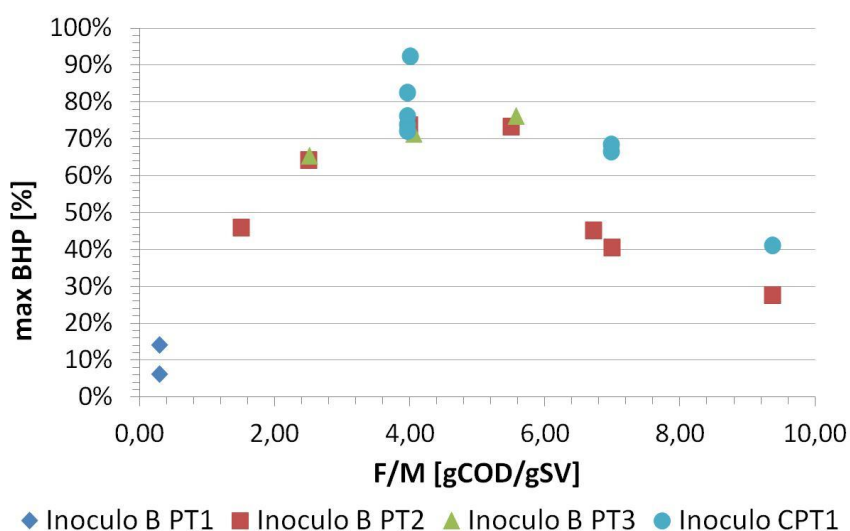


Fig. 36 Massimo BHP percentuale in funzione di F/M e dell'inoculo impiegato.

Il primo aspetto esaminato è stato quello dell'andamento del massimo BHP percentuale in funzione del rapporto F/M applicato (Fig. 36). I risultati ottenuti sono elencati di seguito:

- Osservando il solo inoculo B (che copre un ampio intervallo di F/M) si nota un trend crescente fino a F/M pari a 5,5 gCOD/gSV con una rapida riduzione del BHP% in corrispondenza di F/M maggiori. Il trend decrescente è evidenziato anche dai risultati ottenuti con inoculo C PT1 (Fig. 36);
- Con inoculo C PT1 si osservano BHP% superiori a quelli ottenuti con inoculo B, soprattutto per F/M superiori a 5,5 gCOD/g SV, nonostante la concentrazione di SV nei due inoculi sia simile. Confrontando inoculo C e B PT2 per le prove con F/M pari a 4 e 7 gCOD/g SV, si notano importanti differenze nel valore di BHP. Entrambi gli inoculi impiegati erano però piuttosto freschi, e in entrambi i casi, il pretrattamento è avvenuto tra i 6 e i 9 giorni prima dell'avvio della prova, perciò, l'inoculo non si è deteriorato. Il motivo di tale disparità potrebbe essere imputabile a una maggior attività biologica dell'inoculo C. Sarebbe stato opportuno analizzare la concentrazione dei VFA a fine prova, in modo da capire meglio qual'era stato l'andamento del processo;
- Inoltre per F/M pari a 2,5, 4, 5,5 gCOD/gSV si hanno prove effettuate sia con inoculo B PT2 sia con inoculo B PT3. Nonostante il PT sia avvenuto a 2 settimane di distanza i risultati ottenuti sono molto simili e indicano una riproducibilità della prova nel tempo (tra PT e prova in entrambi i casi sono trascorsi almeno 6 giorni). Quindi il rendimento è indipendente dal tempo che intercorre tra prelievo-pretrattamento-prova.

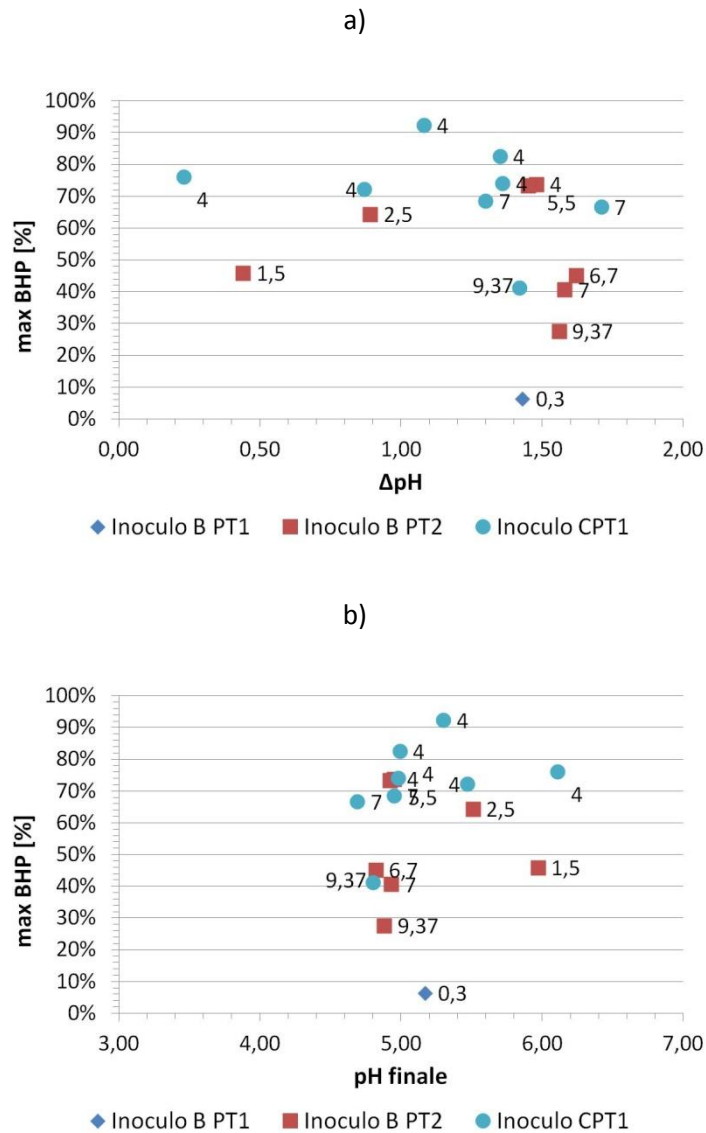
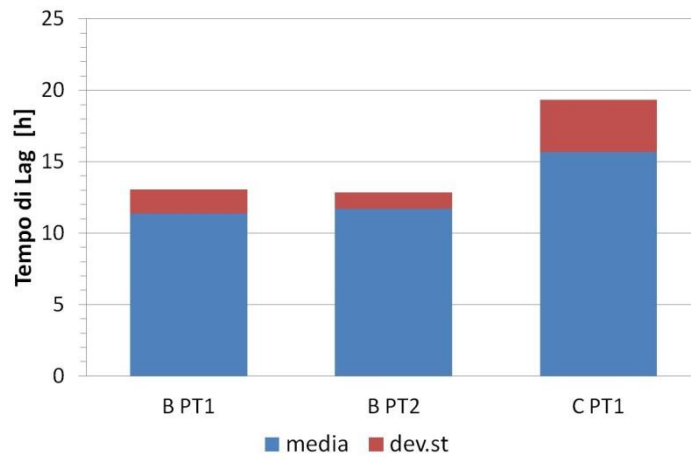


Fig. 37 Massimo BHP percentuale in funzione della variazione di pH (a) e del pH finale (b). Le etichette associate alle serie riportano il rapporto F/M. Le prove considerate sono state alimentate unicamente con lattosio.

Osservando i grafici precedenti (Fig. 37 a,b) è possibile dedurre che Per bassi rapporti F/M si ha un minor BHP percentuale. Il pH finale di prova risulta però essere superiore a 5.2, perciò non è da considerarsi inibente per il processo fermentativo. La bassa efficienza è probabilmente dovuta al basso carico di COD e conferma il trend osservato nel grafico %BHP-F/M (Fig. 36);

Complessivamente, non sembra vi sia una correlazione tra inoculo e andamento del pH di prova.

a)



b)

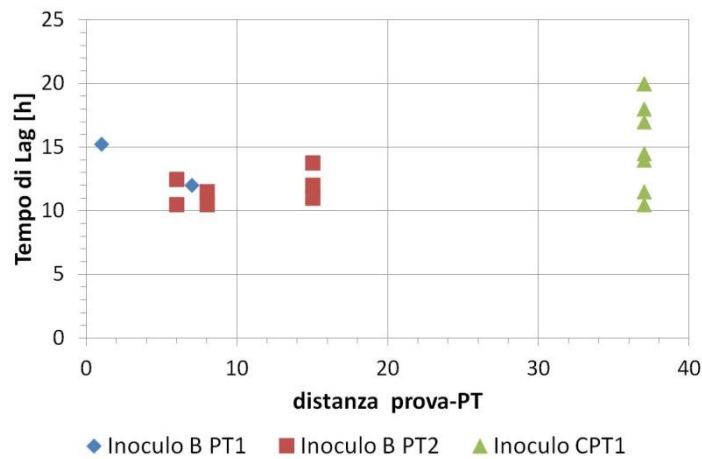


Fig. 38 Ritardo iniziale in funzione del rapporto F/M e del tipo di inoculo (a); Durata di prova in funzione del rapporto F/M e del tipo di inoculo (b).

Per quanto riguarda il ritardo iniziale si è osservato che:

- La fase di Lag è funzione dell'inoculo e del pretrattamento effettuato: l'inoculo B PT2 presenta valori compresi tra 10 e 14h, e vi è un leggero calo del ritardo all'aumentare del carico di substrato alimentato per unità di biomassa. Inoculo B PT3 è stato utilizzato per le prove con siero di latte, e rispetto alle prove speculari con lattosio presenta un ritardo iniziale inferiore, dovuto al diverso substrato utilizzato (Fig. 38,a);
- L'inoculo C PT1 ha valori di ritardo iniziale che variano tra 2 e 20 ore. Per F/M pari a 7 gCOD/gSV, si ha un tempo di lag in linea con quanto osservato con inoculo B PT2, mentre per F/M pari a 4 gCOD/gSV si hanno lag pari a 2h o a 17-20h. Poiché sono state prove successive, la prova che ha dato lag pari a 2h ha avuto un ritardo iniziale

così basso probabilmente a causa dell'anomalia di funzionamento dell'ampts (ossia una miscelazione maggiore) (Fig. 38,a);

- Il ritardo di produzione iniziale non è funzione della distanza temporale che intercorre tra pretrattamento e prova; dipende invece dall'inoculo e dal tipo di trattamento a cui è stato sottoposto (Fig. 38,b).

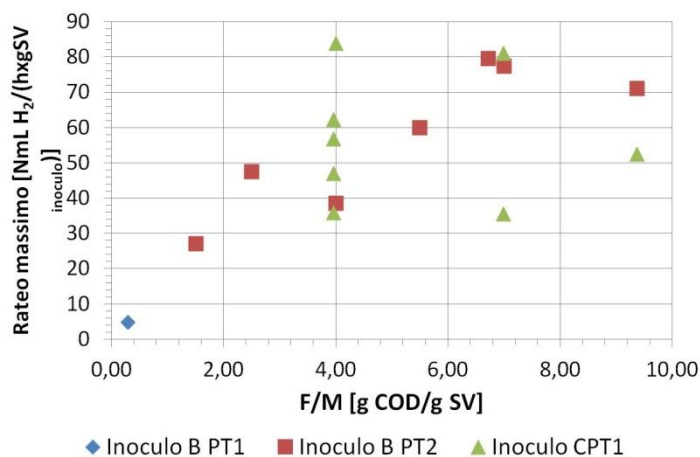


Fig. 39 Rateo massimo in funzione del rapporto F/M applicato e dell'inoculo impiegato, per le sole prove con lattosio..

Per quanto riguarda la durata di prova:

- La durata della prova aumenta con l'aumentare del valore di F/M, in funzione dell'inoculo, e ciò è ben visibile osservando l'andamento del rateo di produzione massimo dell'inoculo B PT2 (Fig. 39);
- L'inoculo C PT1 non presenta un andamento del rateo massimo significativo.

La degradazione percentuale di COD non presenta un trend significativo. I valori ottenuti variano principalmente tra -10% e -2%, indipendentemente dall'inoculo utilizzato.

In conclusione, l'inoculo e il pretrattamento influenzano principalmente la durata della prova e il ritardo iniziale. L'andamento del pH e il rendimento di produzione sono funzione di altri parametri, tra cui, principalmente il carico di substrato applicato per unità di biomassa.

3.3.6 INOCULO PURO

Lo scopo della prova è stato quello di confrontare la produzione di idrogeno ottenuta con culture miste rispetto a quella ottenuta con culture pure.

Le sperimentazioni in cui si è utilizzata una coltura mista sono le numero 8, 11 (alimentata con siero di latte), 18, 22, 23, 24 e 25, mentre le prove numero 31, 32, 33 e 34 hanno utilizzato culture pure. Tutte le prove sono state effettuate applicando un rapporto di F/M pari a 4.0 g COD/gSV, alimentando lattosio, e impiegando MES 1M e soda.

Le statistiche dei parametri misurati ed elaborati sono proposti nelle tabelle sottostanti, e sono suddivise in funzione del tipo di coltura impiegata (Tab. 31):

Tab. 31 Statistiche dei parametri misurati in funzione del tipo di coltura impiegata.

		pH		COD		SV		tempi		H ₂	
		pH in	pH out	COD in	COD out	SV in	SV out	durata	tempo di Lag	Max V	Max Q
				mg/L	mg/L	g/L	g/L	h	h	NmL H ₂	NmL H ₂ /h
coltura mista	MAX	6,62	6,11	16670	15850	24	10	69,00	17,00	1059,6	104,8
	MIN	6,25	4,95	11760	10400	13	6,9	28,25	2,25	815,3	44,6
	RANGE	0,37	1,16	4910	5450	11	3,4	40,75	14,75	244,3	60,2
	MEDIA	6,35	5,27	15771	14289	15	8,4	47,00	12,18	882,9	72,0
	DEV. ST	0,09	0,42	1827	2150	3,8	1,2	15,53	5,29	87,04	23,8
coltura pura	MAX	6,63	5,01	18825	19500	n.r	n.r	264,25	16,25	442,00	8,5
	MIN	6,62	4,77	18200	17750	n.r	n.r	142,50	12,25	118,8	4,4
	RANGE	0,01	0,24	625	1750	n.r	n.r	121,75	4,00	323,2	4,1
	MEDIA	6,63	4,88	18510	18681	n.r	n.r	202,63	14,38	233,5	6,4
	DEV. ST	0,01	0,10	361	792	n.r	n.r	61,27	1,75	149,4	2,0

Tab. 32 Statistiche dei parametri calcolati in funzione della coltura impiegata.

		pH	COD	SV	TEMPI	V H2		HPR	
		Δ pH	Variatz. COD	Andam. SV	distanza prova-PT	max %BHP	max BHP sp.		Rateo massimo
		-	%	%	d	%	NmL/ g SV in	NmL/ g COD in	NmL/ (hx gSV _{inoculo})
coltura mista	MAX	-0,23	-4,78	-29,50	34	92	849,7	212,5	84,0
	MIN	-1,48	-21,53	-66,46	2	72	657,4	164,5	36,0
	RANGE	1,25	16,75	36,96	32	21	192,3	48,0	48,1
	MEDIA	-1,08	-9,61	-43,24	23	78	710,4	178,3	58,0
	DEV. ST	0,43	5,81	13,30	15	8	68,9	17,3	19,2
coltura pura	MAX	-1,61	7,14	n.r	n.r	39	n.r	89,0	n.r
	MIN	-1,86	-2,66	n.r	n.r	10	n.r	23,9	n.r
	RANGE	0,25	9,80	n.r	n.r	28	n.r	65,1	n.r
	MEDIA	-1,75	0,94	n.r	n.r	20	n.r	47,0	n.r
	DEV. ST	0,10	4,61	n.r	n.r	13	n.r	30,1	n.r

Il grafico seguente mostra l'andamento di produzione di idrogeno nel tempo (Fig. 40).

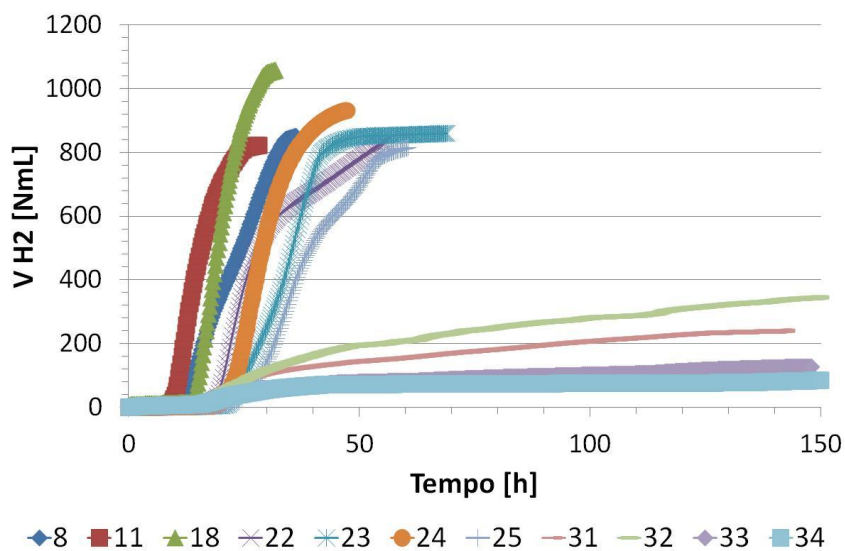
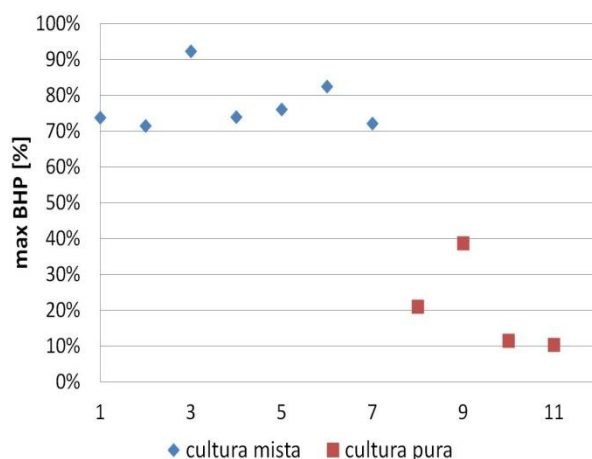


Fig. 40 Volume cumulato di idrogeno prodotto nel tempo per prove con inoculo misto e puro.

L'andamento delle prove nel tempo è molto diverso. Il volume complessivamente prodotto dalle prove in cui si sono utilizzati i due inoculi puri è notevolmente inferiore.

Ciò è dimostrato anche dai grafici seguenti. Per semplicità di rappresentazione grafica, il numero identificativo di ogni prova è stato sostituito con una numerazione progressiva da 1 a 11, perciò la prova 8 corrisponde alla 1, la prova 11 alla 2 e via dicendo.

a)



b)

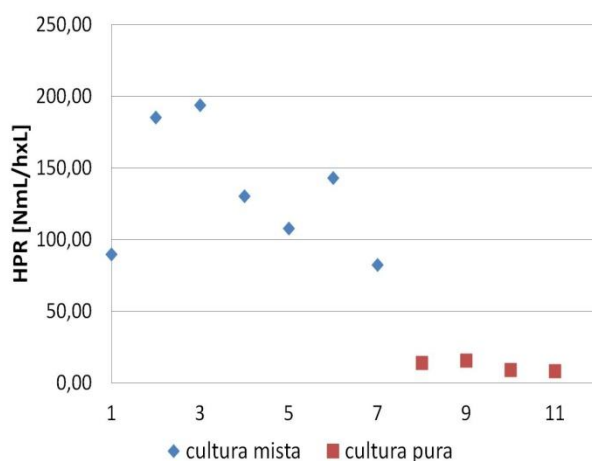


Fig. 41 Massimo BHP percentuale in funzione del tipo di coltura (a); Massimo HPR in funzione del tipo di coltura (b).

I grafici in Fig. 41 a e b mostrano quanto segue:

- le prove con i 2 inoculo selezionati, hanno dato produzioni molto inferiori rispetto a quelle con inoculo misto (dal 30 al 50% i meno). I valori di BHP delle prove con inoculo misto variano tra il 72% e il 92%. Con inoculo puro di tipo 792 (ID grafico 8 e

9) il valore di BHP varia tra 21% e 39%, mentre con inoculo 56 (ID grafico 10 e 11), il valore di BHP è più costante ed è pari a 10-12%. Complessivamente, sembrerebbe che utilizzando dei ceppi batterici selezionati il valore di BHP sia più stabile, tuttavia sarebbe opportuno effettuare ulteriori prove in modo da poter elaborare più dati;

- il valore di HPR delle prove con inoculo misto sono estremamente variabili (82-194 $\text{NmL h}^{-1}\text{L}_{\text{reattore}}^{-1}$), viceversa, le prove con inoculo puro hanno valori di HPR costanti a seconda del ceppo batterico selezionato.

I fattori che possono aver determinato tale disparità, e di conseguenza una bassa produzione di inoculo da parte delle culture batteriche pure sono due:

- la modalità di preparazione delle prove è stata la medesima per entrambe le tipologie. Nonostante la miscela finale venga insufflata con azoto per rendere l'ambiente di reazione anossico, durante la fase di preparazione, l'inoculo entra in contatto con l'aria ambiente e di conseguenza con ossigeno. L'inoculo misto, contenendo anche specie batteriche aerobiche non risente troppo di tale manipolazione, viceversa, la coltura pura, contenendo unicamente microrganismi selezionati anaerobi obbligati può essere inibita dalla presenza di ossigeno;
- con inoculo misto, i ceppi batterici hanno a disposizione una gran quantità di micro e macro nutrienti, che consente loro di svilupparsi e crescere. Nelle prove effettuate con ceppi batterici selezionati viene addizionata la soluzione di macro nutrienti descritta. Tali nutrienti favoriscono la germinazione delle spore, il ritardo iniziale è confrontabile con quello delle prove con inoculo misto, ma potrebbero non essere sufficienti per garantire la crescita batterica (Zoetemeyer et al., 1982);

Per quanto riguarda il ritardo iniziale e la durata delle prove, si può osservare che:

- Il ritardo iniziale delle prove con coltura pura varia tra 12 e 14 ore nel caso del ceppo batterico 792, e tra 15 e 16 ore nel caso del ceppo batterico 56. La fase di lag per inoculo C PT1 è compreso nell'intervallo temporale 14-17 ore, perciò è in linea con quanto osservato per i ceppi batterici selezionati. Tuttavia il ritardo osservato con due differenti ceppi batterici selezionati risulta essere meno variabile rispetto a quello osservato impiegando culture miste;
- La durata delle prove effettuate con culture miste varia tra le 31 e le 60 ore; mentre con inoculo puro le prove hanno avuto durata maggiore ed estremamente più variabile, tra le 142 e le 264 ore

Il ritardo di produzione di idrogeno in fase iniziale è funzione dell'inoculo utilizzato e della tipologia di pretrattamento applicato, perciò eventuali differenze possono essere proprio dovute alle culture batteriche impiegate.

L'elevata durata riscontrata con le prove con inoculo puro, insieme alla bassa produzione di idrogeno può essere stata causata da un eventuale inibizione dell'attività batterica, a sua volta dovuta o all'ambiente aerobico in cui è stata preparata la prova o alla minor disponibilità di nutrienti.

Ulteriori parametri analizzati, sono stati il pH finale di prova (Fig. 42) e la variazione percentuale di COD.

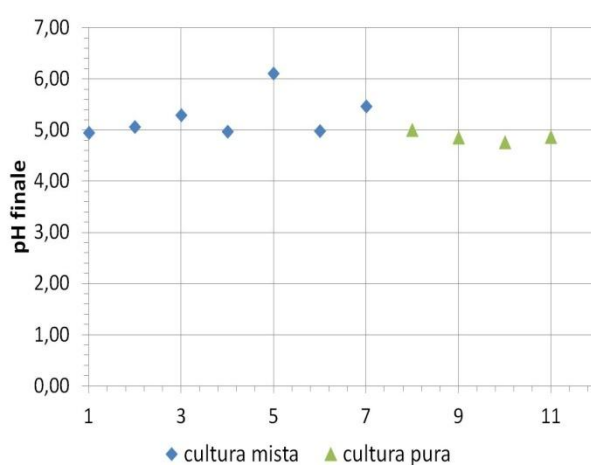


Fig. 42 pH finale di prova in funzione della prova e del tipo di coltura.

Il pH finale delle prove con culture selezionale è più costante rispetto a quello osservato per prove con inoculo misto, e varia tra 4.77 e 5.01.

La variazione percentuale di COD per le prove con inoculo puro, indica un incremento di COD solubile nel corso della prova.

Di seguito si riportano suggerimenti per eventuali prove future con culture batteriche selezionate:

- Preparazione della prova differente. In particolare sarebbe opportuno manipolare l'inoculo facendo in modo di non farlo entrare in contatto con ossigeno. Si potrebbe preparare la miscela contenente substrato, MES, nutrienti ed acqua, e versarla nel reattore. Dopo aver chiuso e insufflato il reattore con azoto, rendendo l'ambiente anossico, si potrebbe iniettare l'inoculo attraverso l'apposito rubinetto del reattore AMPTS. Infine, sarebbe opportuno insufflare nuovamente con azoto;

- Si potrebbe effettuare delle prove con differenti soluzioni di nutrienti, in modo da determinare quella più idonea.

3.3.7 EFFETTO DI DIFFERENTI CONCENTRAZIONI DI MES

L'obiettivo di tale sperimentazione è quello di capire quale effetto ha l'utilizzo di una soluzione tampone sul processo di dark fermentation. A questo scopo, sono state effettuate prove con differenti concentrazioni di MES, ed è stata confrontata la produzione di idrogeno a parità di rapporto F/M applicato e di condizioni di prova (le prove a cui si fa riferimento sono state effettuate tutte impiegando lattosio come substrato).

La tabella di seguito mostra le prove confrontate e la relativa concentrazione della soluzione di MES addizionata (Tab. 33).

Tab. 33 ID di prova e corrispondente concentrazione della soluzione di MES.

MES	M	0	1										2			3			
ID prova		20	11	8	18	22	23	24	25	4	17	26	6	11	16	21	15	27	29

Il massimo BHP percentuale in funzione del rapporto F/M applicato e della concentrazione di MES è rappresentato nel grafico seguente (Fig. 43).

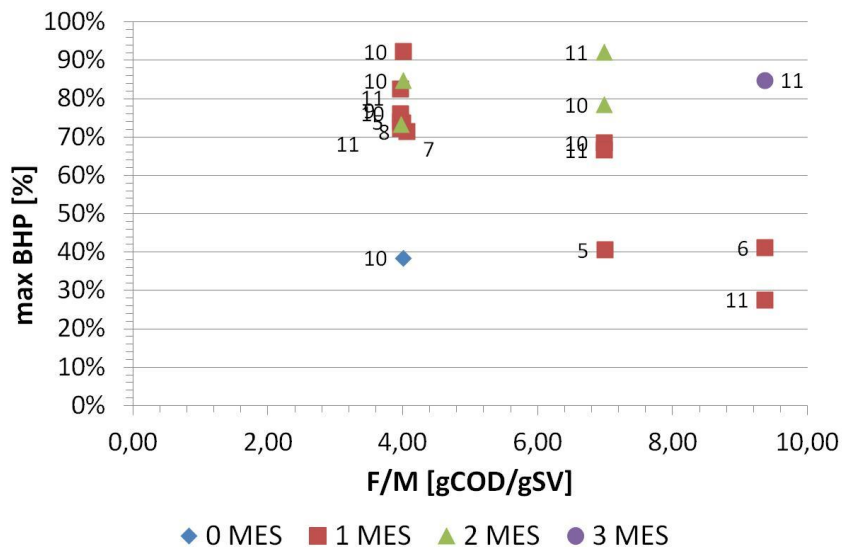


Fig. 43 Massimo BHP percentuale in funzione del rapporto F/M e della concentrazione di MES. Le etichette di ciascuna serie indicano il numero della sperimentazione di laboratorio, e non corrispondono al numero identificativo di prova. Etichette con lo stesso numero indicano prove che sono state effettuate contemporaneamente.

Sono stati osservati i seguenti aspetti:

- senza MES, ossia senza controllo del pH, si ha una produzione di idrogeno inferiore rispetto alle prove in cui è stato addizionata una soluzione tampone. In particolare per F/M pari a 4 gCOD/gSV, in assenza di MES, la prova da un valore di BHP che è tra il 34% e il 54% in meno rispetto alla prova con MES 1M, e tra 35% e il 46% in meno rispetto alla prova con MES 2M;
- per F/M=4gCOD/gSV l'efficienza di produzione non varia significativamente all'aumentare della concentrazione di MES. Probabilmente la soluzione di MES 1M è sufficiente per tamponare l'acidità generatasi a seguito della reazione di produzione di VFA e idrogeno. Lo si evince anche dal grafico F/M-pH finale in quanto, nella prova con MES 2M il pH finale è maggiore, ma la %BHP è simile(Fig. 44);
- per F/M=7 gCOD/gSV la %BHP è superiore del 10% con MES 2M rispetto alle prove con MES 1M (confrontando la prova 10);In questo caso è necessario aumentare la concentrazione di MES, in modo da aumentare il potere tampone della soluzione;
- Per F/M pari a 9.4gCOD/gSV si sono effettuate prove con MES 1M e 3M. Con MES 3M, si è ottenuto un BHP dal 44 al 57% superiore.

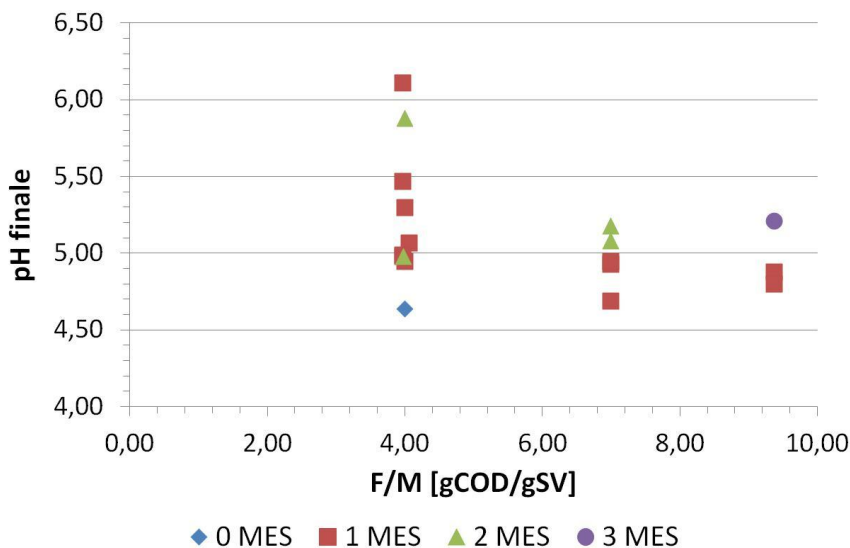


Fig. 44 pH finale di prova in funzione del rapporto F/M e della concentrazione della soluzione di MES addizionata.

Analizzando anche il pH finale è possibile osservare che la prova tende ad arrestarsi quando il pH tende a 5. Per basse concentrazione di MES addizionato, e di conseguenza della

capacità tampone del mezzo di reazione, il pH critico viene raggiunto più velocemente con una minor produzione di idrogeno. Infatti, osservando la Fig. 44 si è potuto notare che:

- il pH finale per la prova senza MES è inferiore a quello delle prove con MES, ed è pari a 4.64 rispetto al minimo pH ottenuto a $F/M=4\text{gCOD/gSV}$ con 1 MES pari a 4.95. La bassa capacità tampone e l'accumulo di VFA sono il motivo per il quale si ha un basso rendimento di produzione;
- il pH finale delle prove con MES 1M a $F/M=4\text{ gCOD/gSV}$ varia tra 4.98 e 5.30. La prova con pH finale 5,30 ha dato il massimo BHP% (92%), rispetto alle altre prove con i medesimi parametri (circa il 20% in più). Ciò potrebbe essere dovuto al fatto che il pH non è sceso troppo, tuttavia valori di pH finali maggiori non garantiscono BHP superiori;
- il pH finale con MES 2M per $F/M=4\text{ gCOD/gSV}$ è di 5.88. Un pH così alto non garantisce però un incremento di BHP. Infatti si ha un rendimento di produzione dell'85%, inferiore del 7% a quello ottenuto nel corso della stessa prova con MES 1M, ma superiore del 9% rispetto alla media delle altre prove;
- per $F/M=7\text{gCOD/gSV}$ con MES 2M si ha un incremento di BHP del 10% rispetto alla prova con MES 1M. Il pH finale è di 5.18 contro 4.93 con MES 1M. Le prove con $F/M=4$ con il medesimo pH finale (4.98), hanno dato rendimenti del 72-74%, ben il 32% in più. Questo brusco calo del rendimento potrebbe essere dovuto a un'elevata concentrazione del substrato che determina a un'elevata concentrazione di VFA;
- la prova effettuata con F/M pari a 9.4 gCOD/gSV con MES 3 M consente di ottenere un pH finale di prova pari a 5.21, rispetto alle prove con MES 1M che hanno dato pH finale di 4.80-4.88. Grazie all'aggiunta del MES più concentrato è possibile controllare meglio il pH evitando l'inibizione della biomassa a causa dell'acidità generata durante il processo.

Le osservazioni fatte sino ad ora, sono confermate dall'andamento che si ottiene confrontando il massimo valore di BHP con il rapporto tra le concentrazioni di lattosio e MES in ingresso al sistema (Fig. 45).

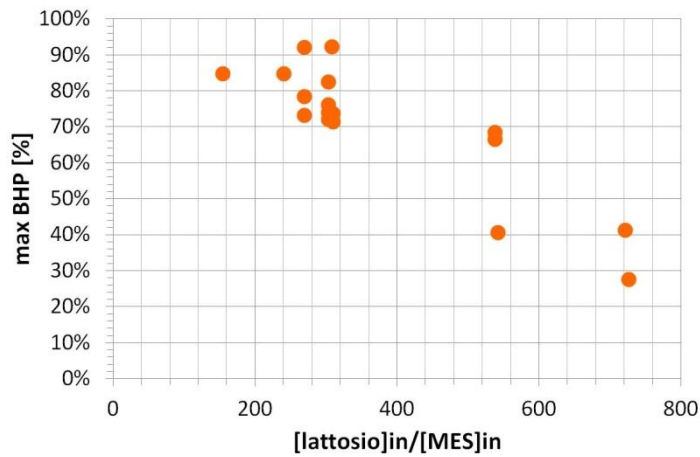
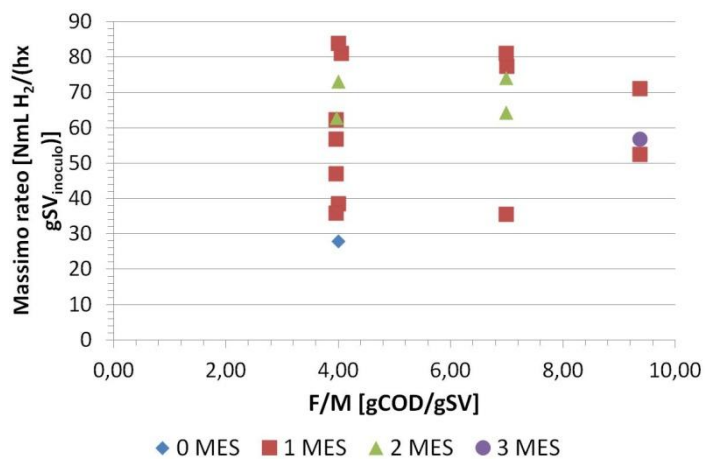


Fig. 45 Massimo BHP% in funzione del rapporto tra le concentrazioni di lattosio e MES addizionati al sistema.

Per rapporti di contrazione tra lattosio e MES in ingresso al sistema, inferiori a 230 si ottengono valori di BHP superiori al 70%, quindi una buona capacità tampone consente di ottenere produzioni di idrogeno maggiori.

Per quanto riguarda massimo rateo di prova e ritardo iniziale, non sembra esserci correlazione con la concentrazione di soluzione tampone addizionata (Fig. 46).

a)



b)

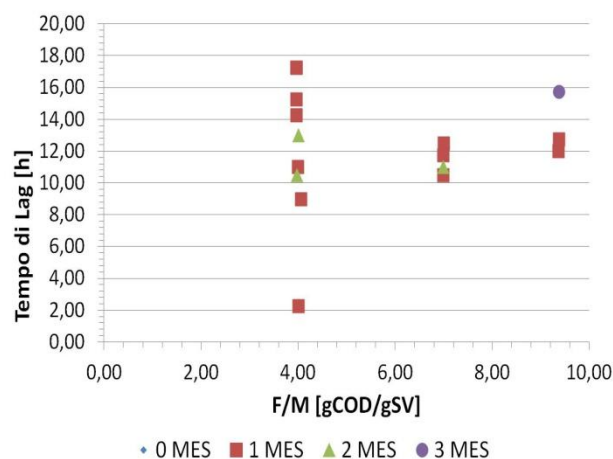


Fig. 46 Durata e ritardo iniziale di prova in funzione del rapporto F/M e della concentrazione di MES addizionata (a,b).

In conclusione:

- è necessario effettuare il controllo del pH, affinché la produzione di VFA e di conseguenza l'acidità prodotta, non inibiscano l'attività batterica;
- il controllo del pH può avvenire mediante un controllo in linea oppure attraverso l'aggiunta di una soluzione tampone;
- il MES risulta essere una soluzione tampone idonea per il processo di dark fermentation;
- aumentando il apporto F/M applicato, è necessario addizionare MES in concentrazione maggiore per tamponare l'acidità prodotta. Infatti con F/M pari a 9.4 gCOD/gSV è stato necessario utilizzare MES 3M.

3.3.8VFA

Per alcune delle prove si sono misurate le concentrazioni di VFA e prodotti solubili della miscela a fine prova. Le sperimentazioni analizzate sono state le seguenti: 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12. Si sono scelte prove con differente rapporto F/M, da un valore di 2.5 gCOD/gSV a un valore massimo di 9.4 gCOD/gSV, e con substrati diversi.

I risultati ottenuti sono esposti in Tab. 34.

Tab. 34 Concentrazione dei prodotti solubili e di alcuni VFA rilevati al termine delle prove. n.r.: non rilevato.

ID di prova	Lattosio	Galattosio	Acido lattico	Acido acetico	Acido butirrico	Acido propionico	Acido isobutirrico	Acido formico
	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
4	3420	30	n.r.	2103	3080	n.r.	n.r.	1160
6	5643	n.r.	n.r.	1930	2896	n.r.	n.r.	1044
7	n.r.	n.r.	n.r.	1212	1637	n.r.	48,2	438
8	449	n.r.	n.r.	1572	2418	n.r.	n.r.	573
9	189	175	n.r.	2058	3404	n.r.	n.r.	391
10	n.r.	n.r.	n.r.	1292	1439	n.r.	n.r.	0
11	n.r.	n.r.	n.r.	1465	2482	n.r.	n.r.	526
12	n.r.	47,3	300	1889	3212	n.r.	n.r.	518

A una prima analisi è possibile osservare che i VFA prevalenti sono acido butirrico e acido acetico (come acetato di sodio), e le concentrazioni di tali prodotti sono in linea con quelle osservate in letteratura (Lin, et al., 2006) e non sono troppo elevate da inibire il processo (Kim et al., 2008).

Etanolo, acido propionico, acido valerico ed isovalerico non sono stati rilevati.

Tuttavia, si è effettuato un bilancio di massa, al fine di determinare l'attendibilità dei dati sperimentali (Tab. 35).

Tab. 35 Errore percentuale sulla concentrazione di COD a fine prova.

ID prova	COD out,liq, stimato	COD out,liq,misurato	Errore%
	mg/L	mg/L	%
4	16470,75	18840,00	-14%
6	18649,65	24600,00	-32%
7	6224,54	8840,00	-42%
8	9257,09	10400,00	-12%
9	11129,49	13480,00	-21%
10	10770,05	10500,00	3%
11	12413,85	12100,00	3%
12	13428,00	13140,00	2%

L'errore percentuale sul COD a fine prova è stato determinato come segue:

$$Errore\% = \frac{COD_{out,liq,stimato} - COD_{out,liq,misurato}}{COD_{out,liq,stimato}} \cdot 100$$

(Eq. 26)

Dove:

- $COD_{out,liq,misurato}$: concentrazione di COD a fine prova misurata [mg/L];
- $COD_{out,liq,stimato}$: concentrazione di COD a fine prova stimata grazie ai valori di concentrazione dei VFA [mg/L]. In particolare tale parametro è stato calcolato sommando la massa di VFA espressa in termini di COD, a sua volta calcolata come il prodotto del singolo VFA per la corrispondente concentrazione in termini di COD espressa in gCOD/gVFA.

Valori dell'errore negativi indicano una sottostima della concentrazione di COD, valori positivi una sovrastima.

Valori dell'errore pari a $\pm 10\%$ rientrano nell'errore di misura, errori superiori possono essere dovuti all'attività sperimentale, ossia a eventuali errori dell'operatore nella preparazione e analisi dei campioni e degli strumenti impiegati.

Per quanto riguarda i valori di concentrazione di COD a fine prova misurato si è fatto un ulteriore bilancio di massa per verificarne le misure (Tab. 36).

Tab. 36 Errore percentuale sul bilancio di massa di COD in ingresso al sistema e in uscita.

ID prova	VH ₂	COD out, gas	COD out,liq,misurato	CODout, tot,misurato	CODin, misurato	Errore BM
	NmL	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	%
4	821	1079,5	18840	19919	20600	3%
6	748	983,5	24600	25584	26400	3%
7	464	609,95	8840	9450	7600	-24%
8	852	1119,6	10400	11520	11760	2%
9	1163	1528,5	13480	15009	14960	0%
10	468	615,5	10500	1116	12520	11%
11	824	1083,1	12100	13183	15420	15%
12	1209	1589,1	13140	14729	18080	19%

Si è calcolata la massa di COD associata alla produzione di idrogeno per unità di volume di ciascun reattore. Sommando tale valore con quello di COD misurato al termine della prova corrispondente si ottiene il COD totale associato alla produzione di prodotti solubili e di gas. Confrontando la concentrazione di COD totale e COD iniziale mediante l'Eq. 26 è possibile determinare l'errore percentuale del bilancio di massa.

Poiché i valori ottenuti sono per lo più inferiori o prossimi all'errore di misura, il bilancio di massa risulta essere corretto e dimostra che i dati sperimentali sono stati raccolti con precisione. Per quanto riguarda le prove 7 e 12 in cui l'errore è significativo possono esserci stati errori sperimentali.

Dopo aver controllato e validato i dati analitici si è proceduto con l'elaborazione dei dati di concentrazione di VFA e prodotti solubili (Tab. 37).

Tab. 37 Elaborazione dei dati di concentrazione di VFA e prodotti solubili a fine prova. Rapporto tra le concentrazioni di acido butirrico e acido acetico; degradazione percentuale del lattosio alimentato; percentuale di un VFA specifico rispetto alla concentrazione molare di VFA totale.

ID	Rapporto Bu/Ac	Degrad. lattosio	Acido acetico	Acido butirrico	Acido formico	Acido isobutirrico	Acido lattico	VFA tot
	–	%	%	%	%	%	%	%
4	1,01	78,96	36,63	36,83	26,55	0,00	0,00	100
6	1,03	74,08	36,47	37,59	25,93	0,00	0,00	100
7	0,93	100,00	41,16	38,16	19,56	1,12	0,00	100
8	1,06	95,16	39,44	41,67	18,89	0,00	0,00	100
9	1,14	98,52	41,92	47,61	10,47	0,00	0,00	100
10	0,76	100,00	56,67	43,33	0,00	0,00	0,00	100
11	1,16	100,00	37,93	44,15	17,91	0,00	0,00	100
12	1,17	100,00	37,96	44,32	13,67	0,00	4,05	100

E' possibile osservare che le specie principali sono proprio acido acetico e butirrico, in particolare l'acido butirrico costituisce il 36-47% rispetto alla concentrazione di VFA totali.

Il rapporto Bu/Ac (acido butirrico/acido acetico), può essere impiegato come parametro di efficienza di processo, in quanto indica la via metabolica intrapresa dalla biomassa.

Generalmente è compreso tra 0.64 e 3.69(Hawakes, et al., 2006).Valori di Bu/Ac maggiori di

1 indicano che il processo fermentativo è spostato verso la via fermentativa dell'acido butirrico, meno produttiva in termini di idrogeno rispetto a quella dell'acido acetico, viceversa valori inferiori a 1 indicano che la via fermentativa principale è quella di produzione di acido acetico.

Nel caso specifico, il processo fermentativo è rivolto principalmente alla produzione di acido butirrico, e questo è confermato dal rapporto Bu/Ac, il quale assume valori compresi tra 1.01 e 1.17, mentre per le prove 7 e 10 vale rispettivamente 0.93 e 0.76. Si potrebbe quindi pensare che al diminuire di tale rapporto la produzione di idrogeno aumenti, invece non c'è una correlazione diretta (Fig. 47).

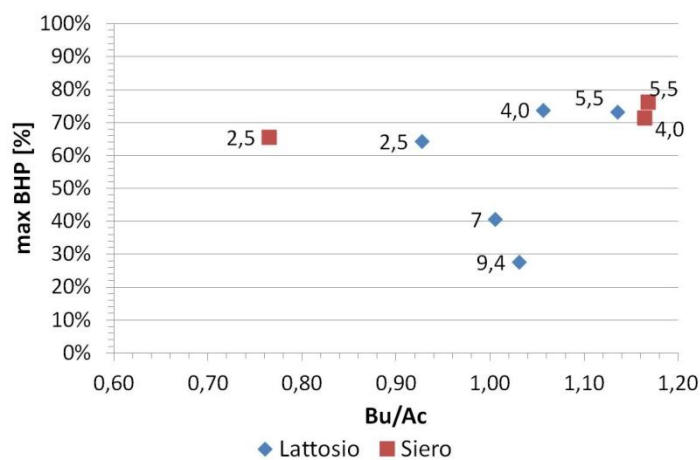


Fig. 47 Massimo BHP% in funzione del rapporto Bu/Ac, e del rapporto F/M.

Si osserva infatti che al diminuire del rapporto Bu/Ac non corrisponde un più elevato BHP%, ad esempio, la prova 10 (S-F/M=2.50) presenta un rapporto pari a 0.76 e un BHP pari al 66%, molto simile rispetto a quello osservato per la prova 7 (L-F/M=2.50) che presenta Bu/Ac di 0.93. Perciò il significato di tale parametro è ancora da chiarire meglio.

Il substrato alimentato viene degradato con efficienze comprese tra il 74% e il 100%. I valori di efficienza maggiori si riscontrano per le prove 7, 8 e 9 e variano tra il 95% e il 100%. Rendimenti inferiori si sono ottenuti nelle prove 4 e 6 e sono rispettivamente pari a 79% e 74.1%, probabilmente dovuti al fatto che tali prove presentano un rapporto F/M maggiore, e rispettivamente pari a 7 e 9.4 gCOD/gSV.

Confrontano complessivamente le prove si è riscontrato che:

- Nelle prime 2 prove (4 e 6) si osserva un rendimento di produzione piuttosto basso (BHP pari a 30-45%). Il basso rendimento potrebbe essere dovuto alla presenza di elevate concentrazioni di lattosio residuo (rispettivamente 3.4 e 5.6 g_{lattosio}/L); il

processo fermentativo potrebbe quindi essere stato inibito da un'alta concentrazione di substrato iniziale, tuttavia la concentrazione di COD in bottiglia per le due prove (rispettivamente pari a 16.26 e 21.77 gCOD/L), da letteratura, non risultano essere inibenti (Lin, et al., 2012, Kyazze, et al., 2005); perciò potrebbe essere dovuto al pH a fine prova;

Un'ulteriore ipotesi fatta è che una bassa resa potrebbe essere stata causata dall'elevata concentrazione di acido formico di circa 1 g/L formatosi durante entrambe le prove. Poiché nelle altre analizzate la concentrazione risulta essere inferiore a 0.6 g/L, si suppone che la formazione di tale VFA in concentrazione superiore abbia inibito il processo determinando un basso consumo di substrato e di conseguenza di idrogeno (Fig. 48,a);

- Nelle prove di confronto tra lattosio e siero di latte si osservano andamenti di concentrazione simili, associati a valori di BHP analoghi (Fig. 48,a). Inoltre si osserva che al crescere del rapporto F/M aumenta la produzione di acido butirrico e di conseguenza il rapporto Bu/Ac (Fig. 48,b);
- La prova 12 (S-F/M=5.50) determina il massimo BHP% (rispetto a tutte le prove di cui si dispongono analisi di VFA);
- Nella prova 12 si osserva anche produzione di acido lattico. La concentrazione di questo non risulta essere inibente.

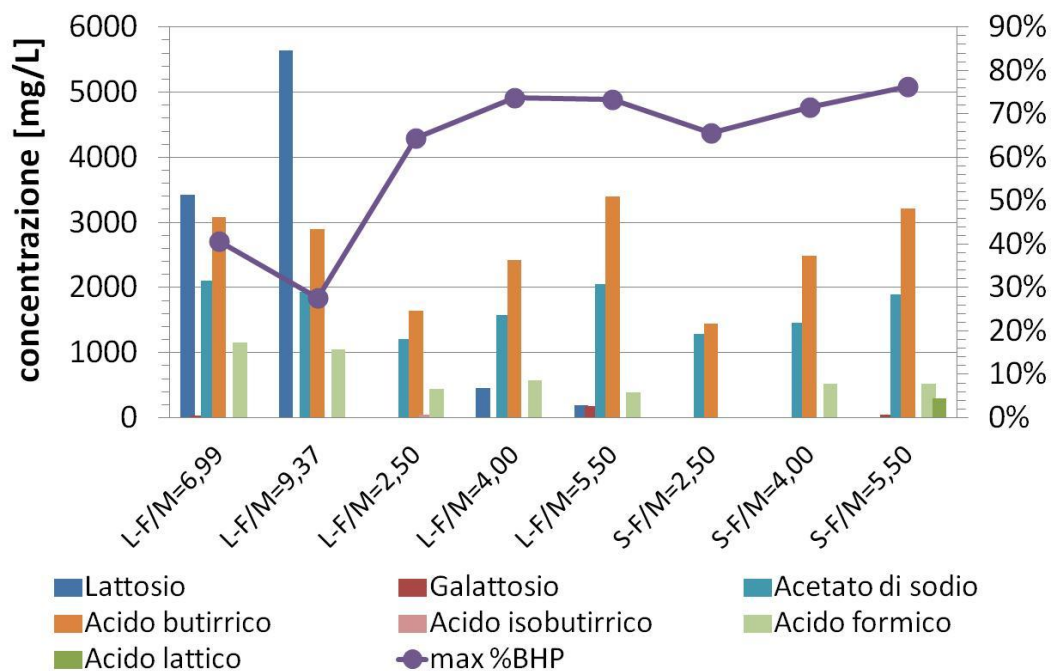


Fig. 48 Concentrazione dei prodotti solubili e VFA a fine prova in relazione al massimo BHP.

L'analisi è stata effettuata presso un laboratorio di microbiologia e non ha rilevato la presenza di etanolo in nessuno dei campioni analizzati, tuttavia, in ciascun campione è stata rilevata la presenza di un alcol, che non si è riusciti a caratterizzare. Tale sostanza potrebbe aver contribuito ai bassi rendimenti ottenuti dalle prove 4 e 6.

Da letteratura potrebbe trattarsi di butanolo, per sperimentazioni future sarebbe opportuno verificarne quindi la presenza.

Un ulteriore suggerimento per prove future è quello di effettuare l'analisi dei VFA e di ulteriori prodotti solubili di interesse sia all'avvio sia alla chiusura della prova, in modo da monitorarne l'andamento. E sarebbe molto interessante farlo per tutte le prove, in modo tale da poter spiegare meglio il processo fermentativo e per chiarire eventuali fenomeni di inibizione.

3.4 RISULTATI DELLA PROVA DI DIGESTIONE ANAEROBICA

L'obiettivo della prova è stato quello di avviare un sistema di digestione anaerobica utilizzando come inoculo del digestato di origine civile. Per perseguire tale scopo sono stati avviati due configurazioni reattoristiche identiche, al fine di verificare il funzionamento ottimale del sistema da noi costruito.

La prova è durata complessivamente 50 giorni, durante i quali si è alimentato lattosio in concentrazione via via crescente.

Si è trattato di una prova in modalità semi-batch. All'istante temporale t , l'operatore alimenta lattosio; in un intervallo di tempo Δt , la biomassa consuma il substrato producendo biogas. Al termine dell'intervallo temporale, ossia all'istante $t+1$, l'operatore misura il pH del mezzo di reazione, ST ed SV, e la concentrazione di COD solubile. In più, mediante il software OxiTop è in grado di ottenere i dati relativi alla produzione di volume di biogas nell'intervallo Δt .

I due sistemi implementati si sono comportati in maniera analoga (Fig. 49), infatti restituivano curve di volume cumulato di metano prodotto che discostavano in media di 40 NmL di metano, ossia il 15% del metano complessivamente prodotto. Una differenza di tale entità è piuttosto ridotta.

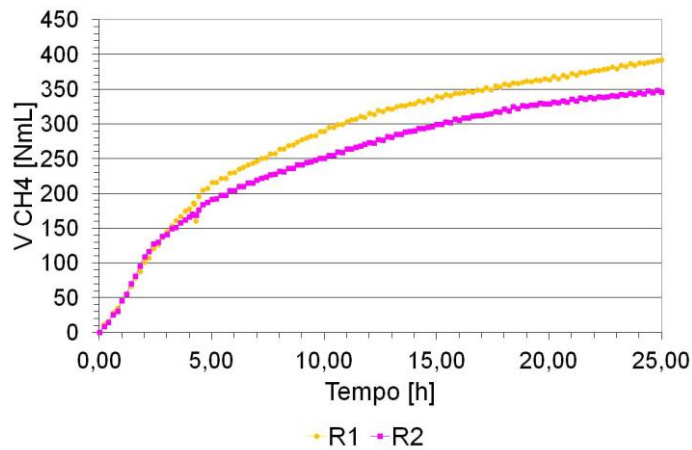


Fig. 49 Sovrapposizione netta misurata nei due reattori (R1 e R2) in seguito all'alimentazione effettuata il 22-esimo giorno di prova.

Durante la fase di crescita della biomassa si è osservato un incremento della produzione di metano e della velocità con il quale questo viene prodotto, grazie all'acclimatazione della biomassa.

La Fig. 50 rappresenta tale aspetto.

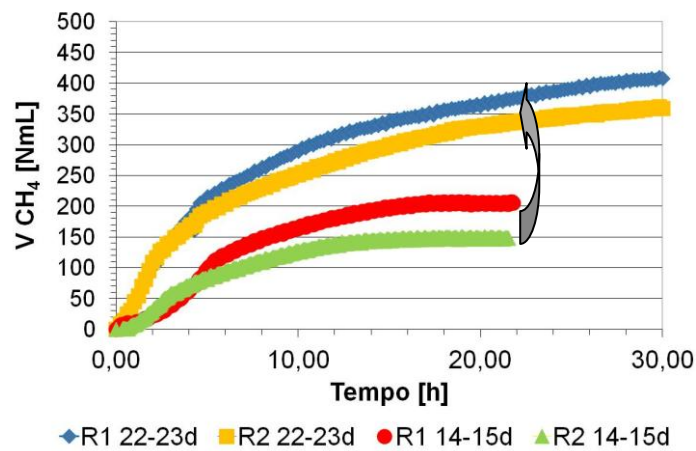


Fig. 50 Sovrapposizione generata dai due reattori in due intervalli temporali successivi, in particolare a seguito dall'alimentazione associata ai giorni 14 e 22.

Di seguito sono riportati i grafici dei parametri misurati nel corso dei 50 giorni di prova (Fig. 51).

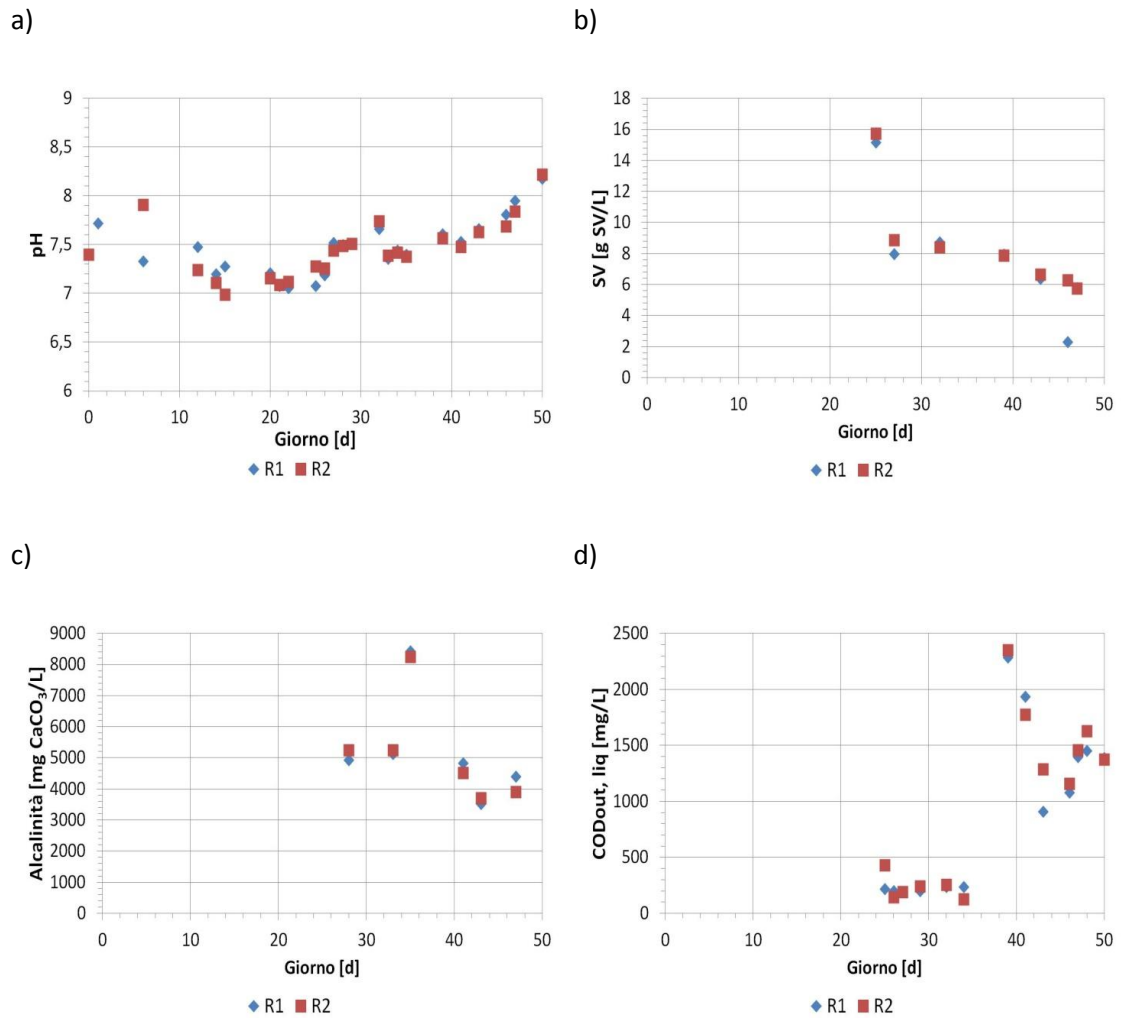


Fig. 51 I grafici rappresentano l'andamento nel tempo di: pH (a), concentrazione di SV(b), alcalinità totale (c) e concentrazione di COD solubile in uscita (d).

Si è osservato quanto segue:

- I dati ottenuti dalle due configurazioni presentano il medesimo andamento;
- Il valore del pH tende ad aumentare, restando all'interno di un intervallo ottimale per i batteri metanigeni;
- La concentrazione di biomassa espressa in termini di SV passa da 16 g/L a 2 g/L, valore inferiore rispetto a quello ipotizzato in fase di dimensionamento di 7 g/L;
- La concentrazione di COD solubile in uscita fino al trentanovesimo giorno risulta essere inferiore a 500 mg/L, successivamente si ha un forte incremento, con valori di concentrazione compresi tra 1000 e 2000 mg/L.

I dati ottenuti mostrano che le configurazioni funzionano in modo ottimale e che la prova è riproducibile. Inoltre, nonostante si sia operato alimentando il sistema in modo graduale, con concentrazione del substrato crescente, il sistema è stato sovraccaricato.

Poiché non si sono misurate le concentrazioni del VFA contestualmente alla prova, le sole misure di pH e alcalinità, non sono state sufficienti per capire che il sistema era stato inibito, in tempo utile per poter intervenire.

La produzione di metano ha fortemente risentito di tale inibizione e ciò è confermato dall'andamento della resa di metanizzazione (Fig. 52).

La resa di metanizzazione è definita come il rapporto tra volume di metano prodotto e volume di metano atteso. Quest'ultimo parametro è stato calcolato come il prodotto tra massa di COD alimentata al sistema per la produzione specifica di metano pari a 0.35 NL CH₄/g CODin.

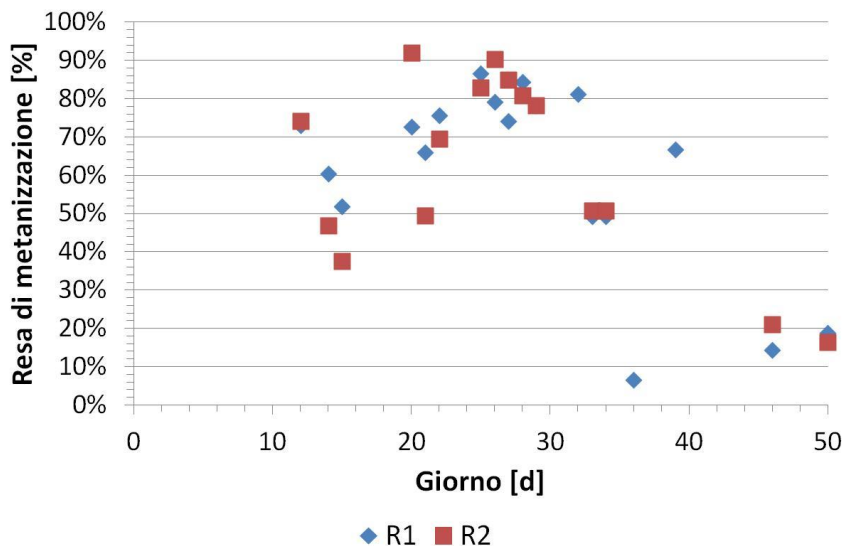


Fig. 52 Resa di metanizzazione in funzione del giorno di prova.

La Fig. 52 mostra un incremento iniziale della resa di metanizzazione, tra il giorno 26 e 28, si ha una stabilizzazione del parametro nell'intervallo tra 80% e 90%, in seguito si ha un brusco calo del rendimento sino a valori inferiori al 20%.

L'inibizione è stata probabilmente dovuta all'accumulo di VFA, la cui concentrazione all'interno del reattore ha appunto inibito la biomassa, riflettendosi sulla produzione di metano.

Per sperimentazioni future sarebbe opportuno effettuare la misura delle concentrazioni di VFA durante il corso della prova in modo da monitorare meglio il processo e da poter agire per tempo in caso di sovraccarico del sistema.

3.5 DARK FERMENTATION SEGUITA DA DIGESTIONE ANAEROBICA

Sono state effettuate due prove di BHP (numero 23 e 25). Entrambe le prove sono state alimentate con lattosio in modo da ottenere un rapporto F/M pari a 4.0 gCOD/gSV .

L'inoculo impiegato è il C PT1 e la concentrazione della soluzione di MES addizionata è stata di 1M.

Le tabelle seguenti mostrano rispettivamente media e deviazione standard di parametri misurati e calcolati (Tab. 38, Tab. 39).

Tab. 38 Media e deviazione standard dei parametri misurati.

	pH		COD		SV		tempi		H ₂	
	pH in	pH out	COD in	COD out	SV in	SV out	durata	tempo di Lag	V	Q
	–	–	mg/L	mg/L	g/L	g/L	h	h	NmL H ₂	NmL H ₂ /h
MEDIA	6,34	5,79	16670	15437,5	14,03	7,375	64,75	21,5	838	51,45
DEV.ST	0,00	0,45	0,00	194,45	0,00	0,62	6,01	0,00	32,10	9,69

Tab. 39 Media e deviazione standard dei parametri calcolati.

	pH	COD	SV	TEMPI		HY		HPR	
	ΔpH	Degradaz. COD	Andam. SV	Prova - PT	Prelievo - PT	max %BHP	max BHP specifico	Max rateo	
		–	%	%	d	d	%	NmL/ g SV in NmL/ g COD in	NmL/ (hx gSV _{inoculo})
MEDIA	0,55	-7,4	-47,4	34	37	74%	675,7	170,6	113,9
DEV.ST	0,45	1,2	4,4	0	0	3%	25,9	6,5	57,6

L'andamento della produzione di idrogeno per entrambe le prove è riportato di seguito (Fig. 53).

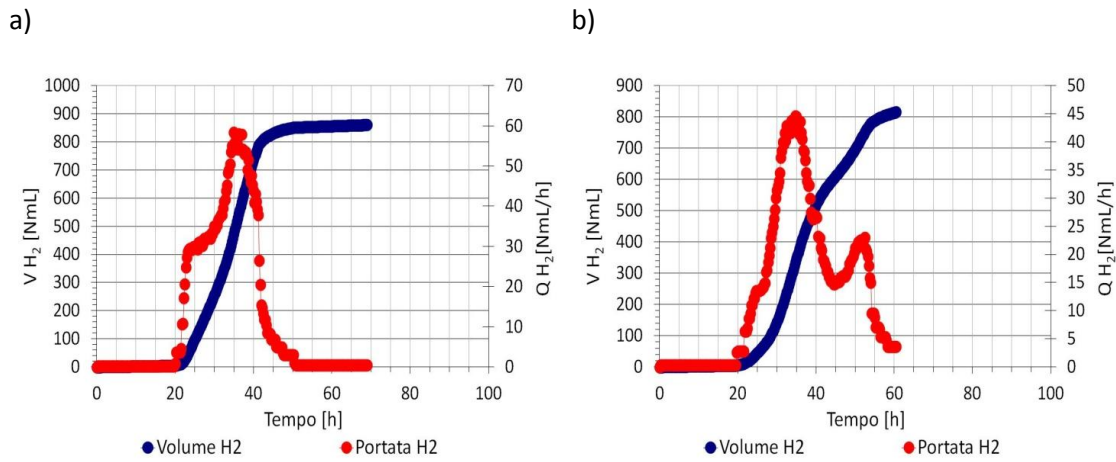


Fig. 53 Volume cumulato di idrogeno e portata di idrogeno prodotta nel tempo. Il grafico a fa riferimento alla prova 23 mentre il grafico b alla prova 25.

La miscela a fine prova, è stata filtrata e impiegata come substrato per la successiva prova di digestione anaerobica.

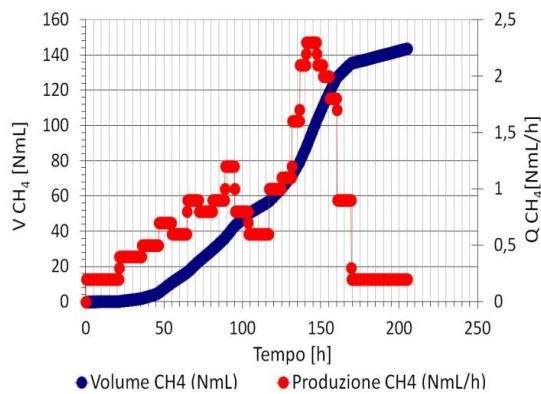
Il rapporto F/M adottato per la prova è stato di 0.6 gCOD/gSV.

I risultati ottenuti sono mostrati di seguito (Fig. 54, Tab. 40).

Tab. 40 Statistiche dei parametri misurati e calcolati per la prova di digestione anaerobica.

	pH in	pH out	COD out	SV out	durata	V	Q	BMP
			mg/L	g/L	h	NmL CH ₄	NmL CH ₄ /h	%
MEDIA	7,01	7,12	1617	3,585	210,25	145,55	0,75	55,85
DEV.ST	0,09	0,06	5,66	0,16	7,42	2,62	0,07	1,06

a)



b)

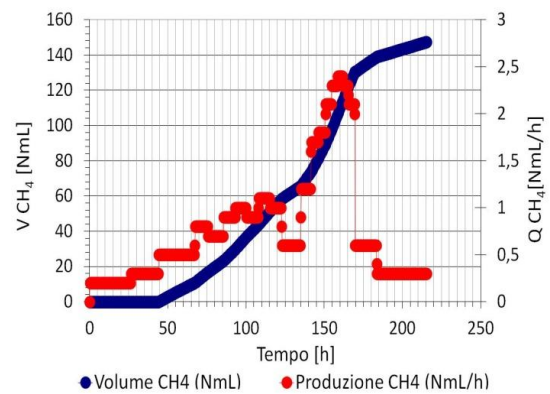


Fig. 54 Volume cumulato di metano netto e portata di produzione nel tempo per le prove 23 (a) e 25 (b).

Le prove si sono comportate in maniera analoga e il BMP ottenuto è pari a 195 NmL/gCOD (corrispondente al 55.85 ± 1.06 %).

Il processo di dark fermentation seguito da digestione anaerobica è applicabile a scala di laboratorio.

Le basse rese ottenute con il processo di digestione anaerobica sono dovute all'eccessivo rapporto F/M applicato all'avvio della prova che ha determinato lunghi tempi di avvio della produzione di metano e bassi volumi di metano prodotti. Nonostante il rapporto F/M applicato rientri nell'intervallo di valori generalmente adottati, è bene ricordare che il substrato alimentato era una miscela ricca di acidi volatili (principalmente acido acetico e butirrico), la cui elevata concentrazione può aver inibito la biomassa batterica per via dell'eccessivo sovraccarico.

4 CONCLUSIONI

L'attività di laboratorio si è focalizzata sulla caratterizzazione del siero di latte deproteinizzato e concentrato, sul processo di digestione anaerobica e dark fermentation ed infine sulla combinazione dei due processi.

Per quanto riguarda la caratterizzazione del siero, si è osservato che la matrice presenta un'elevata contaminazione organica, le concentrazioni di COD e BOD₂₀ sono rispettivamente pari a 152-162 gCOD/L e 144 gBOD/L.

Il rapporto tra BOD₅ e BOD₂₀ risulta essere pari al 79%, di conseguenza la sostanza organica presente nel refluo è rapidamente biodegradabile, e ciò è confermato anche dalla prova di BMP in cui è possibile osservare che la produzione di metano si verifica rapidamente e si conclude nei primi 5 giorni di prova, portando a valori di BMP pari a 348.8±4.4 mLCH₄/g SV.

Dai risultati ottenuti dalla prova di digestione anaerobica, si può concludere che la configurazione reattoristica adottata fosse idonea per il tipo di processo attuato. Non vi sono state infatti perdite di biogas e i dati ottenuti mostravano chiaramente che le due configurazioni consentivano di ottenere dati simili, la differenza media calcolata per i volumi cumulati di metano ottenuti con i due reattori è stata del 15%, a parità di concentrazione di substrato alimentato e di condizioni operative.

L'avvio del processo di digestione anaerobica ha però comportato un sovraccarico di alimento all'interno del sistema, il quale ha determinato un fenomeno di inibizione riscontrata nell'andamento della concentrazione di COD in uscita e nella resa di metanizzazione; in particolare la concentrazione di COD è aumentata rapidamente da concentrazioni inferiori a 500 mg/L sino a valori superiori a 2000mg/L e la resa di metanizzazione è passata da valori di 80-90% sino a valori inferiori al 20%.

Per sperimentazioni future si suggerisce di monitorare giornalmente la concentrazione di VFA nel sistema al fine di prevenire eventuali fenomeni di sovraccarico e inibizione.

Per quanto riguarda le prove di dark fermentation si è osservato che complessivamente al crescere di F/M il BHP percentuale aumenta, raggiungendo valori massimi per F/M pari a 4.0-5.5 gCOD/gSV . In particolare la prova che ha dato il massimo BHP percentuale del 92% aveva le seguenti caratteristiche: F/M pari a 4.0 gCOD/gSV, lattosio come substrato, digestato pretrattato termicamente come inoculo e soluzione di MES 1M.

Per F/M superiori a 5.5 gCOD/gSV il BHP% tende a diminuire, poiché una più elevata concentrazione del substrato comporta una maggior produzione di VFA che si ripercuote sul pH del mezzo di reazione, rendendolo più acido. L'acidificazione e l'incremento della concentrazione di VFA inibiscono l'attività batterica. E' dunque necessario utilizzare una soluzione per tamponare l'acidità prodotta. Il MES risulta essere un tampone idoneo, la concentrazione della soluzione deve tener conto del rapporto F/M applicato, infatti, per F/M sino a 5.5 gCOD/gSV è sufficiente che la concentrazione nel reattore sia pari a 0.04M, per F/M pari a 7 gCOD/gSV è necessario incrementare la concentrazione fino a 0.08M e per F/M superiori è opportuno incrementare ulteriormente la concentrazione sino a 0.13M.

In questo modo è possibile mantenere un elevato BHP% (80-90%).

Per quanto riguarda rateo massimo e ritardo iniziale, tali parametri sono funzione dell'inoculo impiegato e del pretrattamento a cui questo è stato sottoposto.

Complessivamente, all'aumentare del rapporto F/M si è osservato un incremento della durata di prova, mentre il ritardo iniziale varia unicamente in funzione dell'inoculo e del substrato adottato tra le 2h e le 25h.

Confrontando siero di latte e lattosio come substrati, a parità di condizioni operative, si è osservato che il siero di latte è un alimento idoneo per il processo di dark fermentation, e consente di ottenere BHP% maggiori o uguali a quelli ottenuti con lattosio puro.

L'impiego di inoculo puro non ha portato risultati soddisfacenti, dando BHP% dal 30% al 60% in meno rispetto a prove con inoculo misto effettuate nelle medesime condizioni. Tale disparità è probabilmente dovuta all'inibizione della biomassa selezionata a causa della presenza di ossigeno in fase di preparazione e manipolazione dell'inoculo.

Per sperimentazioni future sarebbe ottimale implementare una procedura specifica per la preparazione di tali prove in modo da non far entrare in contatto i ceppi batterici con l'ossigeno atmosferico.

Infine, la modalità sperimentale consente di ottenere risultati riproducibili in termini di produzione di idrogeno (BHP e HPR) durante la fase di regime, ma non durante il transitorio.

IVFA maggiormente presenti sono stati acido butirrico (1438.66-3403.72 mg/L) e acido acetico (1212.3-2013.46 mg/L). Tali concentrazioni rispecchiano quelle presenti in letteratura e non risultano essere inibenti.

Per sperimentazioni future sarebbe opportuno effettuare più prove a parità di condizioni e misurare la concentrazione di VFA per ciascuna prova in modo da capire meglio il processo di dark fermentation e le eventuali inibizioni.

5 Bibliografia

Angenent, Largus T., et al. 2004. *Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater.* 9 settembre 2004.

ANPA e ONR. 2011. *I rifiuti del comparto agroalimentare.* s.l. : ANPA, 2011.

Arasaratnam, V., Senthuran, A. e Balasubramaniam, K. 1996. *Supplementation of whey with glucose and different nitrogen source for lactic production by Lactobacillus delbrueckii.* 1996.

Baghchehsaraee, Bita, et al. 2008. *The effects of heat pretreatment temperature on fermentative hydrogen production using mixed cultures.* 8 gennaio 2008.

Blonskaja, V. e Vaalu, T. 2006. *Investigation of different schemes for anaerobic treatment of food industry wastes in Estonia.* 2006.

Bonomo, Luca. 2011. *Trattamenti delle acque reflue.* s.l. : McGraw-Hill, 2011. ISBN 978-88-386-6518-9.

C.Y. Lin, C.C. Wu, C.H. Hung. 2008. *Temperature effects on fermentative hydrogen production from xylose using mixed anaerobic cultures.* s.l. : Int. J. Hydrogen Energy 33, 43-50, 2008.

Chen, Wen-Ming, et al. 2005. *Fermentative hydrogen production with Clostridium butyricum CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge.* 2005.

Chiu-Yue Lin, Rong-Chong Chang. 2003. *Fermentative hydrogen production at ambient temperature.* s.l. : International journal of hydrogen energy 29 715-720, 2003.

Cordi, et al. 2007. *Intumescimento filamentoso no processo de lodos ativados aplicado ao tratamento de soro de queijo: Caracterização e uso de floculantes para melhorar a sedimentabilidade.* s.l. : Engenharia Ambiental-Espírito Santo do Pinhal, 2007.

D.F. Xing, N.Q. Ren, A.J. Wang, Q.B. Li, X.J. Feng, F. Ma. 2008. *Continuous hydrogen production of auto-aggregative Ethanoligenens harbinense YUAN-3 under non-sterile condition.* s.l. : Journal of hydrogen energy 33 1489-95, 2008.

Danko, Anthony, A.Abreu, Angela e Alves, M. Madalena. 2008. *Effect of arabinose concentration on dark fermentation hydrogen production using mixed cultures.* 2008.

- Davila-Vazquez, Gustavo, et al. 2008.** *Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: Influence of initial substrate concentration and pH.* 2008.
- Domingues, L., Lima, N. e Teixeira, J.A. 1999.** *Novas metodologias para a fermentação alcoólica do soro de queijo.* 1999.
- Ebrahimi, A., et al. 2010.** *Biological treatment of whey in an UASFF bioreactor following a three-stage RBC.* 2010.
- Effects of pH value and substrate concentration on hydrogen production from the anaerobic fermentation of glucose. Li, Zhi, et al. 2008.* 2008.
- Ercoli, Laura, Bonari, Enrico e Barresi, Francesca.** *Acque reflue dei casifici.*
- Erguder, T.H., et al. 2001.** *Anaerobic biotransformation and methane generation potential of cheese whey in batch and UASB reactors.* s.l. : Waste Manage., 2001.
- Ergüder, T.H., et al. 2001.** *Anaerobic biotransformation and methane generation potential of cheese whey in batch and UASB reactors.* s.l. : Waste Manage., 2001.
- F. Cecchi, P. Battistomi, et al. 2005.** *Digestione anaerobica della frazione organica dei rifiuti solidi. Aspetti fondamentali progettuali, gestionali, di impatto ambientale ed integrazione con la depurazione delle acque reflue. Manuale linee guide APAT 13/2005.* 2005.
- Ficara, E., Scaglione, D. e Caffaz, S.** *Test di laboratorio per valutare la producibilità di biogas.*
- G. Wang, Y. Mu, H.Q. Yu. 2005.** *Response surface analysis to evaluate the influence of pH, temperature and substrate concentration on the acidogenesis of sucrose-rich wastewater.* s.l. : Biochem Eng J 23, 175-84, 2005.
- . **2006.** *Response surface methodological analysis on biohydrogen production by enriched anaerobic cultures.* s.l. : Enzyme Microb Technol38, 905-13, 2006.
- G.N. Demirer, M. Duran, T.H. Ergüder, E. Güver, O. Ugurlu, U. Tezel. 2000.** *Anaerobic treatability and biogas production potential studies of different agro-industrial wastewaters in Turkey.* 2000.
- Gallo Stampino, Paola. 2012.** *Corso di chimica per l'energia e l'ambiente.* Milano : s.n., 2012.
- Gannoun, H., et al. 2008.** *Ecological clarification of cheese whey prior to anaerobic digestion in upflow anaerobic filter.* 2008.
- Ghaly, A.E. e El-Taweel, A.A. 1997.** *Kinetic modelling of continuous production of ethanol from cheese whey.* 1997.
- Giordano, Cantù e Spagni. 2011.** *Monitoring the biochemical hydrogen and methane potential of the two-stage dark-fermentative process.* s.l. : Bioresource technology 102, 4474-4479, 2011.

- Guo, Xin Mei, et al. 2010.** Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: review. [Online] 22 aprile 2010.
- H. Argun, F. Kargi. 2011.** *Bio-hydrogen production by different operational modes of dark and photo-fermentation: An overview.* s.l. : International journal of hydrogen energy 36, 7443-7459, 2011.
- H. Yokoyama, M. Waki, A. Ogino, H. Ohmori, Y. Tanaka, K. Haga. 2007.** *Effect of fermentation temperature on hydrogen production from cow waste slurry by using anaerobic microflora within the slurry.* s.l. : Appl. Microbiol. Biotechnol. 74, 474-83, 2007.
- H.H.P Fang, C.L. Li, T.Zhang. 2006.** *Acidophilic biohydrogen production from rice slurry.* s.l. : Int. J. Hydrogen energy 31, 683-92, 2006.
- Hawkes, F.R, et al. 2006.** *Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress.* Pontypridd : Int. J. Hydrogen energy 32, 172-184, 2006.
- Hawkes, F. R., et al. 2002.** *Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimisation.* 2002.
- Hu, B. e Chen, Si. 2007.** *Pretreatment of methanogenic granules for immobilized hydrogen fermentation.* 2007.
- Hussy I., Hawkes F.R., Dinsdale R., Hawkes D.L. 2003.** *Continuous fermentative hydrogen production from a wheat starch co-product by mixed microflora.* s.l. : Biotechnol. Bioeng. 84, 619-26, 2003.
- I. Valdez-Vazquez, E. Rios-Leal, F. Esparza-Garcia, F. Cecchi, H.M. Poggi-Varaldo. 2005.** *Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H₂ production from organic waste: mesophilic versus thermophilic regime.* s.l. : Int. J. Hydrogen Energy 30, 1383-91, 2005.
- IWA. 2002.** *Task group for mathematical modelling of anaerobic digestion processes, Anaerobic digestion model n. 1 (ADM1).* London : IWA Publishing, 2002.
- J.L. Wang, W. Wan. 2008.** *Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures.* s.l. : International journal of hydrogen energy 33 5392-7, 2008.
- Jianlong Wang, wei Wan. 2009.** *Factors influencing fermentative hydrogen production: A review.* s.l. : International journal of hydrogen energy 34 799-811, 2009.
- K.S. Lee, P.J. Lin, J.S. Chang. 2006.** *Temperature effects on biohydrogen production in a granular sludge bed induced by activated carbon carriers.* s.l. : Int. J. Hydrogen Energy 31, 465-72, 2006.
- K.S. Lee, Y.F. Hsu, Y.C. Lo, P.J. Lin, C.Y. Lin, J.S. Chang. 2008.** *Exploring optimal environmental factors for fermentative hydrogen production from starch using mixed anaerobic microflora.* s.l. : Int. J. Hydrogen Energy 33, 1565-72, 2008.
- Kan, Ensung. 2012.** *Effects of pretreatments of anaerobic sludge and culture conditions on hydrogen productivity in dark anaerobic fermentation.* 26 febbraio 2012.

- Kyazze, G., et al. 2005.** *Influence of substrate concentration on the stability and yield of continuous biohydrogen production.* 2005.
- Lee, Young Joon, Miyahara, Takashi e Noike, Tatsuya. 2002.** *Effect of pH on microbial hydrogen fermentation.* 2002.
- Levin, Pitt e Love. 2003.** 2003.
- Lin C.Y., Chang R-C. 1999.** *Hydrogen production during the anaerobic acidogenic conversion of glucose.* s.l. : J. Chem. Tech. Biotechnol. 74, 498-500, 1999.
- Lin, Chiu_Yue e Hung, Wen-Chin. 2008.** *Enhancement of fermentative hydrogen/ethanol production from cellulose using mixed anaerobic cultures.* 2008.
- Lin, Chiu-Yue e Cheng, Chao_Hui. 2006.** *Fermentative hydrogen production from xylose using anaerobic mixed microflora.* 2006.
- Lin, Chiu-Yue, et al. 2006.** *Effects of initial cultivation pH on fermentative hydrogen production from xylose using natural mixed cultures.* 2006.
- Lin, Chiu-Yue, et al. 2012.** *Fermentative hydrogen production from wastewaters: A review and prognosis.* 2012.
- Lin, Pei-Ying, et al. 2007.** *Biological hydrogen production of the genus Clostridium: Metabolic study and mathematical model simulation.* 2 febbraio 2007.
- Logan, Bruce E., et al. 2002.** *Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers.* 2002.
- Mizuno O., Dinsdale R., Hawakes F.R., Hawakes D.L., Noike T. 2000.** *Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging.* s.l. : Bioresource Technol. 73, 59-65, 2000.
- Mu Y., Yu H-Q. 2000.** *Biological hydrogen production in a UASB reactor with granules I: physicochemical characteristics of hydrogen-producing granules.* s.l. : Biotechnol. Bioeng. 94(5) 980-7, 2000.
- Noike, T., et al. 2002.** *Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria.* 2002.
- Prazeres, Ana R., Carvalho, Fatima e Rivas, Javier. 2012.** *Cheese whey management : A review .* s.l. : Journal of Environmental Management, 2012.
- Ren, Nanqui, et al. 2009.** *Bioconversion of lignocellulosic biomass to hydrogen: Potential and challenges.* 2009.
- Roukas, T. e Kotzekidou, P. 1991.** *Production of lactic acid from deproteinized whey by coimmobilized Lactobacillus casei and Lactococcus lactis cells.* 1991.
- S. O-Thong, P. Prasertsan, D. Karakashev, I. Angelidaki. 2008.** *Thermophilic fermentative hydrogen production by the newly isolated Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum PSU-2.* s.l. : Int. J. Hydrogen Energy 33, 1204-14, 2008.

- Saddoud, A., Hassairi, I. e Sayadi, S. 2007.** *Anaerobic membrane reactor with phase separation for the treatment of cheese whey.* 2007.
- Sansonetti, S., et al. 2009.** *Bio-ethanol production by fermentation of ricotta cheese whey as an effective alternative non-vegetable source.* 2009.
- Show, Kuan-Yeow, Lee, Duu-Jong e Changl, Jo-Shu. 2011.** *Bioreactor and process design for biohydrogen production.* 30 aprile 2011.
- Speence, R.E. 1996.** *Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewater.* Nahville, Tennessee : Archae Press, 1996.
- Sung, Shihwu. 2001.** *Biohydrogen production from renewable organic wastes.* s.l. : Ice grant No: 01-01 Iowa State university, 2001.
- T.A. Kotsopoulos, R.J. Zeng, I. Angelidaki. 2006.** *Biohydroge production in granular up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors with mixed cultures under hyper-thermophilic temperature (70°C).* s.l. : Wiley InterScience, 2006.
- T.H Ergüder, U Tezel, E Güven, G.N Demirer. 2001.** *Anaerobic biotransformation and methane generation potential of cheese whey in batch and UASB reactors.* 2001.
- Tango, M.S.A. e Ghaly, A.E. 1999.** *Effect of temperature on lactic acid production from cheese whey using Lactobacillus helveticus under batch conditions.* 1999.
- Tong Zhang, Hong Lui, Herbert H.P. Fang. 2003.** *Biohydrogen production from starch in wastewater under thermophilic condition.* s.l. : Journal of environmental management 69 149-156, 2003.
- Van Ginkel, Steven, Sung, Shihwu e Lay, Jiunn-Jyi. 2001.** *Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration.* 2001.
- Vismara, R. e Salvetti, R. 2011.** *Linee guida e parametri operativi per la gestione di impianto.* Cremona : s.n., 2011.
- Wang, Ching-Hsiung, Lin, Ping-Jei e Chang, Jo-Shu. 2006.** *Fermentative conversion of sucrose and pineapple waste into hydrogen gas in phosphate-buffered culture seeded with municipal sewage sludge.* 2006.
- Wang, Janlong e Wan, Wei. 2008.** *Comparison on different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from digested sludge.* 20 maggio 2008.
- Wang, Jianlong e Wan, Wei. 2009.** *Factors influencing fermentative hydrogen production: a review.* 2009.
- Yang Mu, Xian-Jun Zheng, Han-Qing Yu, Ren-Fa Zhu. 2006.** *Biological hydrogen production by anaerobic sludge at various temperatures.* s.l. : International journal of hydrogen energy 31 780-785, 2006.
- Zhang, Mao-Lin, et al. 2007.** *Enhanced biohydrogen production from cornstalk waste with acidification pretreatment by mixed anaerobic cultures.* 2007.

Zhang, Tong, Liu, Hong e Ferchichi, Herbert H.P. 2003. *Biohydrogen production from starch in wastewater under thermophilic condition.* 2003.

Zoetemeyer R.J., Arnoldy P., Cohen A. , Boelhouwer C. 1982. *Influence of temperature on the anaerobic acidification of glucose in a mixed culture forming part of a two stage digestion process.* s.l. : Water Res. 16, 313-21, 1982.

APPENDICE

Tab. 41 Caratteristiche di prova delle sperimentazioni di BHP

CARATTERISTICHE PROVA							SUBSTRATO		INOCULO		
ID prova	Inizio	Fine	F/M	MES	SOD A	V bott	substrato	COD sub. bott	Inoculo	n PT	Solidi inoculo bott
			gCOD/ g SV	M	si/no	L	-	g COD/L	-	-	g SV/Lbott
1	4/2/13	15/2/13	0,3	1	si	0,54	lattosio	1,2	B	1	4,20
2	29/1/13	12/2/13	0,3	1	si	0,54	siero	1,2	B	1	4,20
3	20/2/13	22/2/13	6,7	1	si	0,54	glucosio	15,60	B	2	2,32
4	20/2/13	22/2/13	7,0	1	si	0,54	lattosio	16,26	B	2	2,32
5	22/2/13	26/2/13	1,5	1	si	0,54	lattosio	3,48	B	2	2,32
6	22/2/13	26/2/13	9,4	1	si	0,54	lattosio	21,77	B	2	2,32
7	1/3/13	4/3/13	2,5	1	si	0,54	lattosio	5,81	B	2	2,32
8	1/3/13	4/3/13	4,0	1	si	0,54	lattosio	9,29	B	2	2,32
9	1/3/13	4/3/13	5,5	1	si	0,54	lattosio	12,77	B	2	2,32
10	6/3/13	8/3/13	2,5	1	si	0,54	siero	5,75	B	3	2,29
11	6/3/13	8/3/13	4,1	1	si	0,54	siero	9,28	B	3	2,29
12	6/3/13	8/3/13	5,6	1	si	0,54	siero	12,75	B	3	2,29
13	11/3/13	13/3/13	3,1	0	si	0,18	lattosio	12,63	B	4	4,05
14	11/3/13	13/3/13	3,1	1	no	0,18	lattosio	12,71	B	4	4,07
15	11/3/13	16/3/13	4,0	2	si	0,18	lattosio	16,17	B	4	4,07
16	24/5/13	28/5/13	7,0	2	si	0,54	lattosio	16,13	C	1	2,31
17	24/5/13	28/5/13	7,0	1	si	0,54	lattosio	16,13	C	1	2,31
18	24/5/13	28/5/13	4,0	1	si	0,54	lattosio	9,24	C	1	2,31
19	24/5/13	28/5/13	4,0	1	no	0,54	lattosio	9,24	C	1	2,31
20	24/5/13	28/5/13	4,0	0	si	0,54	lattosio	9,24	C	1	2,31
21	24/5/13	28/5/13	4,0	2	si	0,54	lattosio	9,24	C	1	2,31
22	25/6/13	1/7/13	4,0	1	si	0,54	lattosio	9,10	C	1	2,30
23	25/6/13	1/7/13	4,0	1	si	0,54	lattosio	9,10	C	1	2,30
24	25/6/13	1/7/13	4,0	1	si	0,54	lattosio	9,10	C	1	2,30
25	25/6/13	1/7/13	4,0	1	si	0,54	lattosio	9,10	C	1	2,30
26	25/6/13	1/7/13	7,0	1	si	0,54	lattosio	16,13	C	1	2,31
27	25/6/13	1/7/13	7,0	2	si	0,54	lattosio	16,13	C	1	2,31
28	25/6/13	1/7/13	9,4	1	si	0,54	lattosio	21,64	C	1	2,31
29	25/6/13	1/7/13	9,4	3	si	0,54	lattosio	21,64	C	1	2,31
30	25/6/13	1/7/13	0,0	1	si	0,54	lattosio	0,00	C	1	2,31
31	10/7/13	22/7/13	4,0	1,0	si	0,54	lattosio	9,20	D (792)	no	
32	10/7/13	22/7/13	4,0	1,0	si	0,54	lattosio	9,20	D (792)	no	
33	10/7/13	22/7/13	4,0	1,0	si	0,54	lattosio	9,20	E (56)	no	
34	10/7/13	22/7/13	4,0	1,0	si	0,54	lattosio	9,20	E (56)	no	

Tab. 42 Parametri misurati

ID	pH		COD		SV		tempi		H ₂	
	pH in	pH out	CODin	COD out	SV in	SV out	durata	tempo di Lag	max V	max Q
			mg/L	mg/L	g/L	g/L	h	h	NmL H ₂	NmL H ₂ /h
1	6,60	5,17	7320	9060	10,5	12,69	35,00	12,00	9,8	11
2	6,36	5,17	8240	7440	9,98	6,89	168,25	15,25	21,7	1,2
3	6,44	4,82	18680	18340	20,76	13,263	41,00	10,50	874,7	99,9
4	6,51	4,93	20600	18840	20,413	13,265	43,25	12,50	821	97,3
5	6,41	5,97	10540	9780	9,655	7,685	20,75	11,50	198,7	34,1
6	6,44	4,88	26400	24600	20,36	16,89	72,75	10,50	748	89,4
7	6,40	5,51	7600	8840	11,175	8,27	29,00	13,75	463,9	59,8
8	6,43	4,95	11760	10400	13	9,165	36,25	11,00	851,5	48,5
9	6,37	4,92	14960	13480	15,16	10,25	61,00	12,00	1162,5	75,3
10	6,39	5,80	12520	10500	13,74	9,3	28,50	10,00	468,1	101,1
11	6,25	5,07	15420	12100	14,8	10,29	28,25	9,00	823,8	100,2
12	6,16	4,78	18080	13140	17,34	10,76	35,50	9,50	1208,6	132,3
13	6,45	4,56	10840	9120	15,17	9,725	32,25	12,50	153,4	18,2
14	6,25	4,93	9180	14040	13,57	13,29	34,00	7,00	377,9	41
15	6,33	4,98	10800	23000	16,51	16,495	41,00	10,50	490,7	46,1
16	6,39	5,18	28640	26350	31,1	11,1	57,00	11,00	1571,6	92,4
17	6,25	4,95	21460	19180	24,45	20,99	57,75	10,50	1373	101,2
18	6,38	5,30	16540	15750	23,88	8,01	31,75	2,25	1059,6	104,8
19	6,06	5,24	15530	14390	23,3	18,37	31,00	0,00	1742,7	192,8
20	6,32	4,64	8680	7090	19,62	17,157	89,50	2,50	441,6	34,8
21	6,29	5,88	20230	22400	26,46	10,94	37,5	13	972,8	91,2
22	6,34	4,98	16670	15850	14,03	9,33	56,00	18,50	836,20	70,50
23	6,34	6,11	16670	15300	14,03	6,94	69,00	21,50	860,70	58,30
24	6,34	4,99	16670	15050	14,03	7,31	47,25	19,50	933,00	77,30
25	6,34	5,47	16670	15575	14,03	7,81	60,50	21,50	815,30	44,60
26	6,40	4,69	24720	21850	17,92	11,15	122,00	15,50	1334,90	44,40
27	6,37	5,08	31500	30300	15,55	12,68	63,25	15,50	1847,50	80,30
28	6,22	4,80	29200	28100	20,93	15,35	123,75	16,50	1108,40	65,50
29	6,25	5,21	48900	47300	23,72	17,67	81,25	18,50	2280,90	71,00
30	6,25	7,04	9550	10070	8,93	7,20	124,00	0,00	0,00	0,00
31	6,62	5,01	18825	19150	—	—	142,50	12,25	240,90	7,60
32	6,62	4,86	18825	18325	—	—	245,75	13,75	442,00	8,50
33	6,63	4,77	18200	17750	—	—	158,00	16,25	132,30	4,90
34	6,63	4,87	18200	19500	—	—	264,25	15,25	118,80	4,40

Tab. 43 Parametri calcolati

pH	COD	SV	TEMPI		HY		HPR	
Δ pH	degradazione COD	andamento SV	distanza prova-PT	distanza prelievo-PT	max %BHP	max BHP specifico		max rateo
-	%	%	d	d	%	NmL/g SV in	NmL/g COD in	NmL/(hx gSVinoculo)
-1,43	23,77	20,86	7	0	6%	4	15	4,85
-1,19	-9,71	-30,96	1	0	14%	10	32	0,53
-1,62	-1,82	-36,11	6	17	45%	697	104	79,60
-1,58	-8,54	-35,02	6	17	41%	654	94	77,53
-0,44	-7,21	-20,40	8	17	46%	158	106	27,17
-1,56	-6,82	-17,04	8	17	28%	596	64	71,23
-0,89	16,32	-26,00	15	17	64%	370	148	47,65
-1,48	-11,56	-29,50	15	17	74%	678	170	38,64
-1,45	-9,89	-32,39	15	17	73%	926	169	60,00
-0,59	-16,13	-32,31	5	32	66%	379	151	81,82
-1,18	-21,53	-30,47	5	32	72%	667	164	81,09
-1,38	-27,32	-37,95	5	32	76%	978	175	107,07
-1,89	-15,87	-35,89	3	39	29%	211	68	24,98
-1,32	52,94	-2,06	3	39	72%	516	165	55,94
-1,35	112,96	-0,09	3	39	73%	670	169	62,90
-1,21	-8,00	-64,31	2	37	78%	1260	180	74,10
-1,30	-10,62	-14,15	2	37	69%	1101	158	81,15
-1,08	-4,78	-66,46	2	37	92%	850	212	84,04
-0,82	-7,34	-21,16	2	37	152%	1397	349	154,61
-1,68	-18,32	-12,55	2	37	38%	354	89	27,91
-0,41	10,73	-58,65	2	37	85%	780	195	73,13
-1,36	-4,92	-33,49	34	37	74%	674	170	56,84
-0,23	-8,22	-50,53	34	37	76%	694	175	47,01
-1,35	-9,72	-47,90	34	37	83%	752	190	62,33
-0,87	-6,57	-44,33	34	37	72%	657	166	35,96
-1,71	-11,61	-37,78	34	37	67%	1070	153	35,60
-1,29	-3,81	-18,46	34	37	92%	1482	212	64,39
-1,42	-3,77	-26,66	34	37	41%	889	95	52,53
-1,04	-3,27	-25,51	34	37	85%	1829	195	56,94
0,79	5,45	-19,37	34	37	0%	0	0	0,00
-1,61	1,73	n.r	n.r	n.r	21%	n.r	48	n.r
-1,76	-2,66	n.r	n.r	n.r	39%	n.r	89	n.r
-1,86	-2,47	n.r	n.r	n.r	12%	n.r	27	n.r
-1,76	7,14	n.r	n.r	n.r	10%	n.r	24	n.r

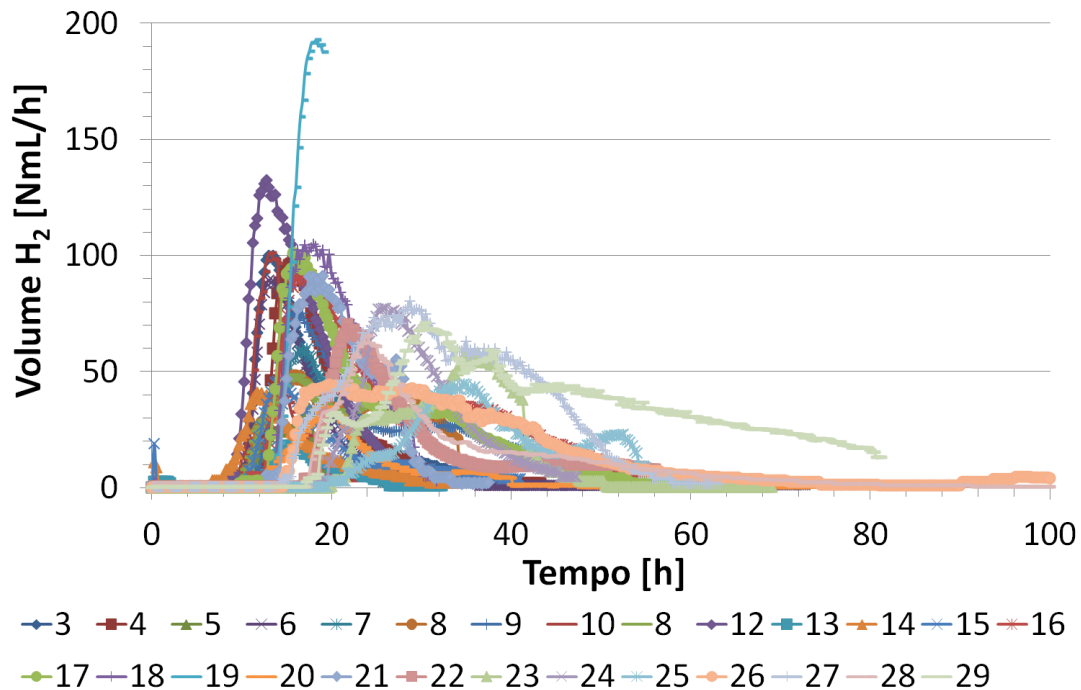


Fig. 55 Il grafico riporta il volume cumulato di idrogeno per unità di tempo misurato nel corso delle singole prove dallo strumento AMPTS. Le prove 1 e 2 non sono riportate poiché sono state alimentate con alimentazioni impulsive e hanno dato andamenti di produzione anomali.

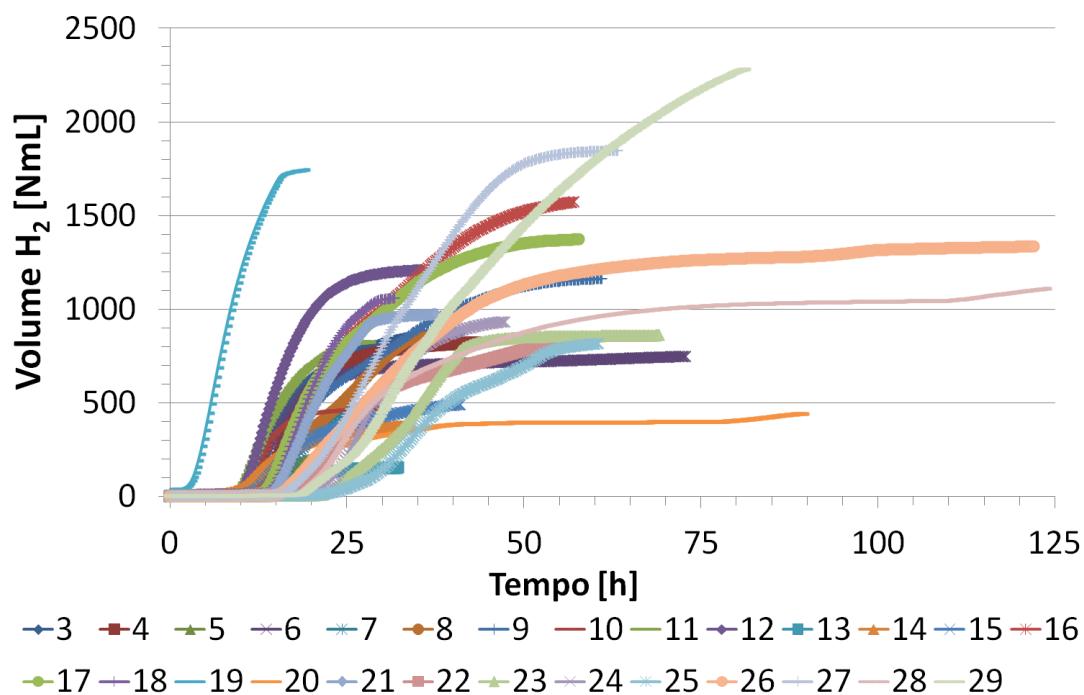


Fig. 56 Il grafico riporta il volume cumulato di idrogeno misurato nel corso delle singole prove dallo strumento AMPTS. Le prove 1 e 2 non sono riportate poiché sono state alimentate con alimentazioni impulsive e hanno dato andamenti di produzione anomali.

Tab. 44 Caratteristiche alimento, volume prelevato e alimentato, concentrazione dell'alimento e concentrazione finale in bottiglia.

N GIORNO	ALIMENTO											
	V spike		conc spike		V prelevato- alimentato		conc alimento		COD alimentato il giorno i-esimo		CODin tot	
	L		g COD/L alimento		L		g COD/L alimento		g/L _{bottiglia}		mg/L _{bottiglia}	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
0	0	0	0,0	0,0	0,05	0,05	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00
1	0	0	0,0	0,0	0,05	0,05	10,0	0,0	0,50	0,00	500,00	0,00
6	0	0	0,0	0,0	0,05	0,05	12,2	12,2	0,61	0,61	608,00	608,00
12	0	0	0,0	0,0	0,05	0,05	15,8	15,8	0,79	0,79	790,40	790,40
14	0	0	0,0	0,0	0,05	0,05	17,4	17,4	0,87	0,87	869,44	869,44
15	0	0	0,0	0,0	0,05	0,05	22,6	22,6	1,13	1,13	1130,27	1130,27
20	0	0	0,0	0,0	0,05	0,05	22,6	22,6	1,13	1,13	1130,27	1130,27
21	0	0	0,0	0,0	0,05	0,05	24,9	24,9	1,24	1,24	1243,30	1243,30
22	0	0	0,0	0,0	0,05	0,05	27,4	27,4	1,37	1,37	1367,63	1367,63
25	0	0	0,0	0,0	0,05	0,05	30,1	30,1	1,50	1,50	1584,88	1798,13
26	0	0	0,0	0,0	0,05	0,05	30,1	30,1	1,50	1,50	1705,39	1650,39
27	0	0	0,0	0,0	0,05	0,05	33,1	33,1	1,65	1,65	1694,89	1693,89
28	0	0	0,0	0,0	0,05	0,05	36,4	36,4	1,82	1,82	1654,83	1654,83
29	0	0	0,0	0,0	0,05	0,05	40,0	40,0	2,00	2,00	2022,31	2062,81
32	0	0	0,0	0,0	0,05	0,05	40,0	40,0	2,00	2,00	2239,85	2256,35
33	0	0	0,0	0,0	0,05	0,05	40,0	40,0	2,00	2,00	2002,35	2002,35
34	0	0	0,0	0,0	0,05	0,05	40,0	40,0	2,00	2,00	2239,40	2127,58
35	0	0	0,0	0,0	0,05	0,05	0,0	0,0	0,00	0,00	2002,35	2002,35
36	0	0	0,0	0,0	0,05	0,05	20,0	0,0	1,00	0,00	0,00	0,00
39	0	0	0,0	0,0	0,05	0,05	5,0	5,0	0,25	0,25	3285,00	2352,50
40	0	0	0,0	0,0	0,05	0,05	0,0	0,0	0,00	0,00	250,29	250,29
41	0	0	0,0	0,0	0,05	0,05	0,0	0,0	0,00	0,00	1936,00	1775,00
43	0	0	0,0	0,0	0,05	0,05	0,0	0,0	0,00	0,00	910,00	1286,00
46	0	0	0,0	0,0	0,05	0,05	20,0	20,0	1,00	1,00	1080,00	1160,00
47	0,01	0,01	1,6	1,6	0,05	0,05	0,0	0,0	0,02	0,02	2400,00	2460,00
48	0,01	0,01	6,2	6,2	0,5	0,6	0,0	0,0	0,06	0,06	1467,60	1645,60
50	0,01	0,01	50,0	50,0	0,05	0,05	0,0	0,0	0,50	0,50	1452,40	1437,40

Tab. 45 Parametri misurati nel corso della prova.

N GIORNO	PARAMETRI MISURATI															
	pH		CODout misurato		ST		SV		SST		SSV		Alcalinità tot		Volume biogas misurato	
	-		mg/L		g/L		g/L		g/L		g/L		mg CaCO ₃ /L		NmL	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
0	7,4	7,4														
1	7,72	-														
6	7,33	7,91														
12	7,48	7,24													202,1	205,3
14	7,2	7,11													184,0	142,5
15	7,28	6,99													205,3	148,3
20	7,21	7,16													287,2	363,8
21	7,08	7,09													286,8	214,9
22	7,06	7,12													361,7	332,9
25	7,08	7,28	217,25	430,5	17,28	17,858	15,18	15,7292							456,3	436,1
26	7,19	7,26	201	146					11,51	11,895	6,91	7,16			416,5	475,2
27	7,52	7,44	190,5	189,5	14,83	16,21	7,99	8,87							429,7	491,4
28	7,5	7,49											4925	5250	537,2	514,8
29	7,51	7,51	202	242,5					13,76	13,42	8,21	8			548,9	547,8
32	7,66	7,74	237,5	254	18,81	18,33	8,73	8,42							569,1	737,2
33	7,36	7,39											5130	5250	345,7	355,3
34	7,44	7,42	237,05	125,238					10,575	11,925	3,325	4,05			345,7	355,3
35	7,4	7,38											8425	8250	251,3	220,2
36															22,9	23,0
39	7,61	7,57	2285	2352,5	19,757	19,24	7,95	7,86							58,5	175,5
40															187,2	137,2
41	7,53	7,48	1936	1775					6,15	5,13	4,22	3,65	4825	4525	98,9	71,4
43	7,66	7,63	910	1286	16,47	16,85	6,39	6,64					3525	3700	107,4	63,8
46	7,81	7,69	1080	1160	10,08	15,65	2,3	6,287							50,0	73,4
47	7,95	7,84	1400	1460	15,097	14,72	5,797	5,75					4400	3900	125,5	114,9
48			1452	1630											90,4	109,6
50	8,18	8,22	1390	1375	20,32	21,96									33,0	28,7

Tab. 46 Resa di metanizzazione

N GIORNO	RESA DI METANIZZAZIONE					
	COD alimentato		V CH 4 atteso		Resa di metanizzazione	
	<i>mg</i>		<i>NmL</i>		<i>%</i>	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2
0	0,00	0,00	0,00	0,00		
1	500,00	0,00	175,00	0,00		
6	608,00	608,00	212,80	212,80		
12	790,40	790,40	276,64	276,64	73%	74%
14	869,44	869,44	304,30	304,30	60%	47%
15	1130,27	1130,27	395,60	395,60	52%	37%
20	1130,27	1130,27	395,60	395,60	73%	92%
21	1243,30	1243,30	435,15	435,15	66%	49%
22	1367,63	1367,63	478,67	478,67	76%	70%
25	1504,39	1504,39	526,54	526,54	87%	83%
26	1504,39	1504,39	526,54	526,54	79%	90%
27	1654,83	1654,83	579,19	579,19	74%	85%
28	1820,31	1820,31	637,11	637,11	84%	81%
29	2002,35	2002,35	700,82	700,82	78%	78%
32	2002,35	2002,35	700,82	700,82	81%	105%
33	2002,35	2002,35	700,82	700,82	49%	51%
34	2002,35	2002,35	700,82	700,82	49%	51%
35	0,00	0,00	0,00	0,00		
36	1000,00	0,00	350,00	0,00	7%	
39	250,29	250,29	87,60	87,60	67%	200%
40	0,00	0,00	0,00	0,00		
41	0,00	0,00	0,00	0,00		
43	0,00	0,00	0,00	0,00		
46	1000,00	1000,00	350,00	350,00	14%	21%
47	15,60	15,60	5,46	5,46		
48	62,40	62,40	21,84	21,84		
50	500,00	500,00	175,00	175,00	19%	16%