

# **POLITECNICO DI MILANO**

FACOLTA' DI INGEGNERIA CIVILE AMBIENTALE E TERRITORIALE

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



**PRODUZIONE DI BIOIDROGENO E BIOMETANO DA SIERO DI LATTE:  
STUDI PRELIMIARI PER L'AVVIO DI UN IMPIANTO PILOTA**

Anno Accademico 2014/2015

RELATORE: Prof.ssa Francesca Malpei

CORRELATORE: Ing. Aronne Teli

TESI DI LAUREA DI: Caterina Grilli

Numero di Matricola 801072



## **Indice**

Indice .....	3
Indice delle Tabelle.....	6
Indice delle Figure .....	8
Introduzione .....	11
Capitolo 1 – Stato dell’Arte .....	14
1.1    Il siero di latte e le sue strategie di valorizzazione.....	14
1.2    La Digestione Anaerobica.....	18
1.2.1    Generalità sul processo .....	19
1.2.2    Fasi del processo .....	20
1.2.3    Parametri di stabilità: temperatura, pH, presenza di inibenti tossici, composizione del substrato e produzione di biogas .....	22
1.2.4    Parametri operativi e tipologie impiantistiche .....	25
1.2.5    Digestione anaerobica di siero di latte e reflui dell’industria lattiero casearia 27	
1.2.6    MBR Anaerobici.....	31
1.2.7    Configurazioni reattoristiche, tipologie di membrane e parametri di funzionamento.....	32
1.2.8    Fouling anaerobico, SMP ed EPS .....	34
1.2.9    Sperimentazioni con siero in AnMbr .....	38
1.2.10    Criteri di avvio dei digestori anaerobici.....	39
1.2.11    Parametri da monitorare all’avvio di un digestore .....	41
1.3    BioH <sub>2</sub> e Dark Fermentation.....	42
1.3.1    Aspetti stechiometrici e pathway degradativi .....	46
.....	51
1.3.2    Tipologia di inoculo.....	51
1.3.3    Parametri di processo .....	53
1.3.4    Configurazione DA+DF in letteratura .....	55
1.3.5    DF siero di latte.....	57
Capitolo 2 – Materiali e metodi .....	59
2.1    Pianificazione dell’attività sperimentale.....	59
2.2    Matrici e soluzioni .....	61
2.2.1    Siero di latte .....	61
2.2.2    Biomassa di inoculo .....	62

2.2.3 Soluzione di macronutrienti .....	66
2.2.4 Soluzione tampone .....	67
2.2.5 Soluzione di acetato di sodio .....	67
2.3 Strumentazione .....	67
2.3.1 AMPTS (Automatic Methane Potential Test System) .....	67
2.3.2 Gas-cromatografo.....	69
2.3.3 Impianto Pilota ECO-SI.....	69
2.4 Prove di laboratorio.....	95
2.4.1 Test di produzione potenziale di metano (BMP) .....	95
2.4.2 Test di produzione potenziale di idrogeno (BHP).....	97
2.4.3 Test di attività metanogenica specifica (SMA).....	100
2.5 Descrizione del modello utilizzato per il calcolo della % di biomassa attiva.	104
2.6 Avvio dell'impianto pilota (filiera A).....	108
2.7 Determinazioni Analitiche .....	110
2.7.1 pH.....	111
2.7.2 Solidi Totali e Solidi Volatili .....	111
2.7.3 Solidi Sospesi Totali e Solidi Sospesi Volatili.....	112
2.7.4 Azoto totale ed Azoto ammoniacale .....	112
2.7.5 Acidi Grassi Volatili .....	112
2.7.6 Alcalinità.....	113
2.7.7 FOS/TAC .....	113
2.7.8 COD .....	114
2.7.9 Proteine e Carboidrati .....	114
Capitolo 3 – Risultati dell'attività sperimentale.....	118
3.1 Prove di BHP: valutazione delle rese di produzione di idrogeno di ceppi selezionati e fango pretrattato termicamente .....	118
3.2 Prove di Specific Methanogenic Activity (SMA) per la scelta del fango di inoculo.....	131
3.3 Prove di Biochemical Methane Potential (BMP): valutazione delle rese della filiera monostadio e doppio stadio .....	135
3.4 Fase di avvio e relativo monitoraggio del reattore di digestione anaerobica dell'impianto ECO-SI.....	140
Conclusioni .....	150
Bibliografia .....	152
Appendice 1 .....	158

Appendice 2 .....	165
Appendice 3 .....	166

## Indice delle Tabelle

Tabella 1.1 Caratteristiche chimiche del siero vaccino intero. 1 Mucchetti, 2001; 2 Scianalepore, 1998; 3 Corradini, 1995; 4 Robbins et al, 1996; 5 Radford et al, 1986; 6 Sharratt et al 1959 .....	15
Tabella 1.2 (Insabato, et al., 2014) Indicatori tecnici del siero di latte tal quale e del permeato di lattosio.....	18
Tabella 1.3 Composizione del biogas .....	19
Tabella 1.4 Frazione di ammoniaca indissociata in funzione di pH e temperatura .....	24
Tabella 1.5 (Erguder, et al., 2000) Configurazioni e parametri operativi, digestione anaerobica di siero di latte .....	28
Tabella 1.6 Proprietà di idrogeno e metano .....	43
Tabella 1.7 (Sinha P. and Pandey A. 2011) Effetto del pH sulla produzione di bioidrogeno per via fermentativa .....	54
Tabella 1.8 Resa di idrogeno per diverse specie di Clostridium.....	58
Tabella 2.1 Caratteristiche del siero di latte del caseificio PLAC ultrafiltrato .....	61
Tabella 2.2 Biomassa utilizzata per ciascuna prova.....	63
Tabella 2.3 Caratteristiche del fango granulare proveniente dalla Cartiera Giorgione.....	64
Tabella 2.4 Caratteristiche del digestato proveniente dall'impianto di trattamento dei reflui del caseificio PLAC .....	64
Tabella 2.5 Caratteristiche del fango pretrattato termicamente .....	66
Tabella 2.6 Composizione della soluzione di macronutrienti .....	66
Tabella 2.7 Dati relativi all'alimento utilizzati durante il dimensionamento dell'impianto .....	70
Tabella 2.8 Parametri ricavati da ADM1 e caratteristiche della biomassa .....	71
Tabella 2.9 Parametri di processo relativi alla DF e alla DA.....	71
Tabella 2.10 Parametri ricavati dal dimensionamento del processo biologico .....	72
Tabella 2.11 Parametri relativi al dimensionamento dell'impianto pilota: carichi, portate, volumi dei reattori, produzione di fango di supero e fabbisogno di nutrienti.....	73
Tabella 2.12 Caratteristiche delle membrane.....	74
Tabella 2.13 Dimensionamento del comparto MBR.....	75
Tabella 2.14 Parametri relativi al dimensionamento dell'impianto pilota nella configurazione monostadio DA: carichi, portate, volumi dei reattori, produzione di fango di supero e fabbisogno di nutrienti.....	76
Tabella 2.15 Dimensioni delle membrane installate nel PK-100.....	79
Tabella 2.16 Caratteristiche del serbatoio di accumulo iniziale .....	80
Tabella 2.17 Misure effettive del serbatoio e della camicia.....	81
Tabella 2.18 Caratteristiche del reattore di Dark Fermentation .....	83
Tabella 2.19 Caratteristiche del reattore di Digestione Anaerobica.....	86
Tabella 2.20 Caratteristiche del biogas prodotto .....	87
Tabella 2.21 Composizione del biogas .....	88
Tabella 2.22 Caratteristiche matrici ed inoculo per la prova BMP .....	96
Tabella 2.23 Allestimento della prova di BMP.....	96
Tabella 2.24 Carico organico associato al siero, alle sospensioni microbiologiche e concentrazione del tampone per le prove BHP .....	98

Tabella 2.25 Allestimento della prova di BHP con ceppi puri .....	98
Tabella 2.26 Caratteristiche del substrato e del fango di inoculo .....	100
Tabella 2.27 Allestimento della prova di BHP con fango pretrattato .....	100
Tabella 2.28 Allestimento della prova di SMA per la scelta del fango di inoculo .....	102
Tabella 2.29 Allestimento della SMA il giorno di inoculo del digestore .....	103
Tabella 2.30 Allestimento delle prove SMA nel corso della fase di avvio dell'impianto pilota .....	103
Tabella 2.31 Allestimento delle prove SMA .....	104
Tabella 2.32 Parametri monitorati durante la fase di avvio .....	109
Tabella 2.33 Scelta della diluizione del siero tal quale .....	110
Tabella 2.34 Concentrazioni ed assorbanza delle soluzioni a concentrazione di proteine note.....	115
Tabella 2.35 Concentrazioni ed assorbanza delle soluzioni a concentrazione di glucosio note.....	116
Tabella 3.1 Rese dei BHP con ceppi selezionati.....	122
Tabella 3.2 Rese medie dei BHP con ceppi selezionati .....	124
Tabella 3.3 Rese di ogni test e rese medie dei BHP con inoculo pretrattato termicamente .....	127
Tabella 3.4 Composizione del biogas prodotto dalle prove di BHP con inoculo pretrattato termicamente.....	129
Tabella 3.5 Risultati della prima prova di SMA .....	131
Tabella 3.6 Bilancio del COD per i test A1 A2 B1 B2 .....	133
Tabella 3.7 SMA sperimentale, SMA simulata e relativa percentuale di biomassa attiva .....	133
Tabella 3.8 SMA sperimentale, SMA simulata e relativa percentuale di biomassa attiva .....	134
Tabella 3.9 Valutazione comparativa della configurazione monostadio (DA) e doppio stadio (DF +DA) .....	138
Tabella 3.10 Densità e potere calorifico inferiore di metano e idrogeno.....	139
Tabella 3.11 Rese energetiche delle configurazioni monostadio (DA) e doppio stadio (DF+DA).....	139
Tabella 3.12 SMA sperimentale, SMA simulata e relativa percentuale di biomassa attiva .....	144
Tabella 3.13 Composizione del biogas prodotto dal digestore ECO-SI .....	147
Tabella 3.14 Analisi di proteine e carboidrati che costituiscono SMP ed EPS.....	148

## Indice delle Figure

Figura 1.1 Filiere di valorizzazione e destini dei prodotti ottenibili a partire dal siero di latte.....	17
Figura 1.2 Fasi della degradazione Anaerobica .....	20
Figura 1.3 Effetto della temperatura sulle cinetiche di degradazione anaerobica. Sono indicati con le linee tratteggiate gli intervalli ottimali di lavoro e in grigio gli intervalli in cui il processo non è ottimizzato.....	22
Figura 1.4 Configurazioni Reattoristiche MBR (Sheng Chang, et al., 2014) .....	33
Figura 1.5 (Stuckey, 2013) Modalità di Fouling.....	36
Figura 1.6 Fasi del processo di Dark Fermentation .....	45
Figura 1.7 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 d .....	49
Figura 1.8 Pathways che competono con la produzione di idrogeno, che devono essere bloccati vengono mostrati con le croci rosse. (Hallenbeck et al 2009).....	51
Figura 2.1 Filiera A Doppio stadio (DF+DA) Filiera B monostadio (DA).....	59
Figura 2.2 Campione di siero di latte del caseificio PLAC.....	61
Figura 2.3 Campione di fango granulare proveniente dalla Cartiera Giorgione .....	63
Figura 2.4 AMPTS (Automatic Methane Potential Test System).....	68
Figura 2.5 Schema di flusso Berghof BioPulse .....	74
Figura 2.6 Modulo di Ultra Filtrazione installato presso PLAC.....	79
Figura 2.7 Membrana di UF per la separazione delle sieroproteine installata nel PK-10079	
Figura 2.8 Sezione della membrana ceramica installata in combinazione ai reattori di DF e DA.....	83
Figura 2.9 Reattore di Digestione Anaerobica B-03 con unità di UF esterna.....	85
Figura 2.10 Interfaccia del software per il controllo e la gestione da remoto.....	88
Figura 2.11 Setto per il prelievo del gas nel corso della prova .....	99
Figura 2.12 Campioni di siero permeato e mixed liquor per le analisi .....	109
Figura 2.13 Strumento di misura del rapporto FOS/TAC.....	114
Figura 2.14. Procedura di estrazione delle soluzioni per la caratterizzazione di SMP ed EPS.....	114
Figura 2.15 Retta di calibrazione per la rilevazione della concentrazione di proteine ..	116
Figura 2.16 Retta di calibrazione per la rilevazione della concentrazione di proteine ..	117
Figura 3.1 Test BHP con ceppi selezionati .....	121
Figura 3.2 Rese di ciascun test e pH a fine prova .....	123
Figura 3.3 Rese medie BHP con ceppi selezionati .....	124
Figura 3.4 Composizione dei VFA prodotti dai test BHP con biomasse selezionate .....	125
Figura 3.5 Rapporto tra acido Butirrico e Acetico e rese di produzione.....	126
Figura 3.6 Test BHP con inoculo pretrattato termicamente.....	127
Figura 3.7 Rese medie BHP con inoculo pretrattato termicamente .....	128
Figura 3.8 Composizione dei VFA prodotti dai test BHP con inoculo pretrattato termicamente.....	130



Figura 3.9 Prima prova di SMA.....	132
Figura 3.10 Seconda prova di SMA.....	134
Figura 3.11 SMA sperimentale e SMA simulata e relativa percentuale di biomassa attiva .....	135
Figura 3.12 Metano prodotto nella prova di BMP con siero di latte UF con il permeato di un reattore pilota di Dark Fermentation .....	136
Figura 3.13 configurazione delle due filiere monostadio (DA) e doppio stadio (DF+DA) .....	137
Figura 3.14 Fattore di diluizione del siero UF in alimento al digestore.....	141
Figura 3.15 Prove di SMA simulata, SMA sperimentale, consumo di substrato e crescita della biomassa.....	142
Figura 3.16 SMA sperimentale SMA simulata e relativa percentuale di biomassa attiva .....	143
Figura 3.17 Temperatura e pH del mixed liquor durante la fase di monitoraggio .....	145
Figura 3.18 Tenore di solidi sospesi e volatili nel mixed liquor durante la fase di monitoraggio .....	145
Figura 3.19 COD in e COD out e relativi rendimenti di rimozione durante la fase di monitoraggio .....	146
Figura 3.20 FOS/TAC nel mixed liquor e nel permeato e misura dei VFA in kit sul permeato durante la fase di monitoraggio.....	147
Figura 3.21 Contenuto di proteine e carboidrati nel fango prelevato dal digestore anaerobico ECO-SI .....	149



## Introduzione

*“La Terra non appartiene all’uomo  
è l’uomo che appartiene alla terra”*

Attle Duwamish

Negli ultimi cent’anni il nostro pianeta ha vissuto un aumento della temperatura media mondiale di circa 1°C; la rapidità di questo cambiamento ha portato la comunità scientifica internazionale ad attribuire le cause di tale riscaldamento alle attività antropiche.

Sulla base di studi paleoclimatici, il noto climatologo della NASA James Hansen dimostra come l’ecosistema terrestre abbia saputo controbilanciare le forzanti climatiche naturali succedutesi nella lunga storia del nostro pianeta, facendo sì che ogni alterazione significativa della temperatura avvenisse in tempi molto lunghi. Al contrario, la rapidità del fenomeno attuale porta ad individuare le cause del *global warming*: l’uso di combustibili fossili, le relative emissioni di gas serra e la massiccia deforestazione ad opera umana.

Nel suo libro *“Le tempeste dei miei nipoti. La verità sull’imminente catastrofe climatica e la nostra ultima possibilità di salvare l’umanità”* Hansen pone, inoltre, un problema etico: di chi è la Terra? Di chi la vive nel presente o di chi la vivrà nel futuro? Cosa stiamo lasciando in eredità a chi verrà dopo di noi?

Adottare un criterio di equità intergenerazionale ci potrebbe portare ad affermare che tutte le generazioni debbano avere gli stessi diritti - alla stessa quota di emissioni o allo stesso livello di benessere - o perlomeno che il benessere delle generazioni future non debba essere inferiore a quello della generazione presente.

Ciò non è, tuttavia, più possibile, poiché gli effetti dei cambiamenti climatici sono già in atto e alcuni dei processi avviati sono irreversibili.

La politica internazionale ha affrontato il cambiamento climatico con il Protocollo di Kyoto, stipulato nel 1997, ma i problemi etici e politici legati al diverso sviluppo economico degli stati ha reso tortuosa la strada verso un accordo condiviso.

Per quanto riguarda i paesi europei, l’ultimo patto stipulato è il pacchetto 20 20 20, in cui sono previste alcune misure di intervento per raggiungere una riduzione del 20% delle emissioni di gas serra, un incremento del 20% dell’efficienza energetica ed un aumento al 20% della percentuale di energia prodotta da fonti rinnovabili entro il 2020.

In questo scenario si colloca un crescente interesse della comunità scientifica nell'ambito dello sviluppo di nuove tecnologie per la produzione di energia "pulita", ovvero prodotta da fonti rinnovabili.

Tra queste, la produzione di biogas dalla fermentazione di materie organiche di rifiuto è una delle alternative più promettenti sia perché costituisce una fonte di energia pulita, sia perché opera nel senso della valorizzazione del contenuto energetico di una matrice di scarto, al contrario dei biocombustibili derivanti dalla digestione di biomasse coltivate ad hoc.

La digestione anaerobica classica è il processo più utilizzato per la produzione di biogas: un gas composto principalmente da metano e anidride carbonica, in proporzioni variabili. La dark fermentation, un processo simile alla digestione anaerobica, ma mancante della fase di metanogenesi, consente invece la produzione di bioidrogeno.

L'idrogeno è, in primo luogo, un ottimo vettore energetico poiché possiede un contenuto energetico per unità di peso pari a 144 kJ/g (circa 2,75 volte maggiore rispetto al contenuto energetico dei combustibili fossili), in secondo luogo può essere utilizzato miscelato con il metano (in una miscela chiamata l'idrometano, composta fino al 30% da idrogeno). L'aggiunta dell'idrogeno alla miscela gassosa provoca l'accelerazione del fronte di fiamma, portando ad una più completa combustione e ad un miglioramento della qualità dell'emissione, poiché in grado di abbattere, fino al 50%, le emissioni di ossidi di azoto e CO<sub>2</sub>.

Il progetto di ricerca ECO-SI -Energia e COmponenti di pregio da Siero di latte- (Progetto ID 30116895 Bando Regione Lombardia/MIUR n.7128 del 29/07/2011) si colloca tra le ricerche per l'innovazione tecnologica e la produzione di energia pulita. In questo progetto viene sperimentata la produzione di bioidrogeno e biometano a partire dal principale scarto dell'industria casearia: il siero di latte.

Per la valorizzazione di tale matrice è prevista dal progetto ECO-SI una filiera di trattamento composta di tre unità:

- un'unità di ultrafiltrazione del siero tal quale per il recupero delle siero-proteine
- uno stadio di dark fermentation del siero ultrafiltrato (composto principalmente da lattosio) per la produzione di bioH<sub>2</sub>
- uno stadio di digestione anaerobica dei prodotti della dark fermentation (principalmente acidi grassi volatili) per la produzione di bioCH<sub>4</sub>.

Oltre alla valorizzazione del contenuto energetico di una matrice organica in questo caso si ottiene anche una riduzione dell'entità del trattamento che va effettuato per lo smaltimento del siero di latte.

## **Obiettivi della sperimentazione**

In questo elaborato è illustrato il lavoro svolto precedentemente all'avvio dell'impianto pilota ECO-SI.

In previsione dell'avvio del reattore di dark fermentation sono state valutate le rese di produzione di idrogeno di ceppi batterici selezionati e di un fango pretrattato termicamente.

La scelta del fango di inoculo del digestore è avvenuta a partire dal confronto dell'attività metanogenica specifica di due differenti digestati utilizzabili; in seguito è stata seguita la fase di avvio dell'impianto tramite il monitoraggio di alcuni parametri di interesse per valutare il processo biologico (temperatura, pH, rimozione del COD, concentrazione di alcalinità e VFA nel digestore, concentrazione di solidi sospesi totali e volatili). È stato inoltre valutato il carico alimentabile al digestore con prove di SMA sul fango campionato dal digestore durante il primo mese di funzionamento.

Una semplificazione del modello ADM1 per la simulazione delle prove di SMA ha permesso il calcolo della percentuale attiva all'interno del fango presente nel digestore.

L'elaborato è stato organizzato e suddiviso in tre capitoli. Nel primo sono trattati gli argomenti teorici per la comprensione dell'attività sperimentale: il processo di digestione anaerobica e quello di dark fermentation con una particolare attenzione agli esempi di applicazioni su siero di latte presenti in letteratura. È stata posta attenzione, inoltre, sui reattori anaerobici a membrana e sui criteri di avvio di impianti di digestione anaerobica.

Il secondo capitolo è dedicato ai materiali e i metodi utilizzati nello sviluppo del lavoro sperimentale e nell'analisi dei dati; nel terzo sono illustrati e commentati i risultati ottenuti dalle prove sperimentali svolte nel corso del lavoro.

## Capitolo 1 – Stato dell’Arte

### 1.1 Il siero di latte e le sue strategie di valorizzazione

Il settore lattiero caseario è il primo settore alimentare in Italia; in questo comparto produttivo si differenziano le piccole imprese o cooperative agricole, solitamente indirizzate alla fabbricazione di pochi prodotti tipici, e le grandi industrie, al cui interno avvengono lavorazioni molto diverse, che portano alla produzione di burro, creme, lattici fermentati, concentrati e formaggi.

Secondo il rapporto ISTAT 2000 in Italia si contano 2000 caseifici che trasformano oltre 9 milioni tonnellate di latte al giorno nei vari prodotti sopra citati. In Lombardia, dove si ha la più alta concentrazione di caseifici per la produzione di formaggi DOP e Grana Padano, la produzione annuale di siero di latte nel 2009 è stata stimata in 3322000 t (fonte CLAL 2009) di cui 680000 t, più del 20%, sono prodotte nella provincia di Cremona (stime Politecnico da dati ARPA 2009) .

Il principale sottoprodotto della filiera lattiero casearia è il siero: benché ricco di nutrienti, principalmente lattosio, proteine e sali minerali, la sua valorizzazione è ad oggi fortemente limitata per i costi che essa comporta: circa il 47% delle 115 milioni di tonnellate prodotte mondialmente all’anno sono smaltite nell’ambiente (Saddoud, et al., 2007) Ciò comporta una significativa perdita di risorse e causa seri problemi di inquinamento ambientale.

Il siero di latte è un liquido giallastro che rappresenta l’85-95% del volume iniziale di latte lavorato e contiene ancora circa il 55% dei nutrienti in esso contenuti originariamente. (Siso, 1996).

I nutrienti che permangono nel siero di latte sono quegli elementi che non partecipano alla fase di coagulazione, quali principalmente lattosio, proteine solubili, grassi, sali minerali (principalmente NaCl, KCl e Sali di calcio, per la maggior parte fosfati) acido lattico, acido citrico ed alcune vitamine.

Tra questi, le siero-proteine sono costituite principalmente da  $\beta$ -lactoglobulina (50%),  $\alpha$ -lactoalbumina (12%), immunoglobulina (10%), siero albumina (5%) e peptoni. Esse hanno un elevato valore alimentare, superiore a quello dell’uovo, ed un contenuto di amminoacidi essenziali più elevato di quello della caseina.

In Tabella1.1 sono riassunte le principali caratteristiche chimiche del siero di latte vaccino intero non scremato.

Tabella 1.1 Caratteristiche chimiche del siero vaccino intero. 1 Mucchetti, 2001; 2 Scianalepore, 1998; 3 Corradini, 1995; 4 Robbins et al, 1996; 5 Radford et al, 1986; 6 Sharratt et al 1959

		Fonte bibliografica					
Componente		1	2	3	4	5	6
Residuo secco	%	6,7	6,3-6,5	6,83-7,82	8	5,87	-
Grassi	%	0,2-10,0	0,4-0,5	0,15-0,7	-	-	-
Azoto totale	mg/kg	1065-1460	7000-8000	-	90-2200	1400	1200-1500
Lattosio	g/kg	38,2-46,6	42-48	43-55,3	-	39,4	-
Acido lattico	mg/kg	100-12000	1000-4000	-	-	-	-
Fosforo	mg/kg	600-950	-	-	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	300-150
Potassio	mg/kg	-	-	-	1000-1400	1480	1600-1800
Magnesio	mg/kg	-	-	-	90-120	90	50-60
Ceneri	mg/kg	-	-	5000-19600	-	8100	-

La caratterizzazione del siero dipende comunque da diversi fattori, tra cui la qualità del latte usato, l'alimentazione e la fase di lattazione dell'animale. Inoltre, a seconda della lavorazione adottata, si possono distinguere siero dolce, con pH=6-7, e siero acido, con pH<5. In Italia la maggioranza del siero prodotto è dolce, anche se spesso subisce fenomeni di acidificazione per azione dei batteri lattici. (Ercoli et al).

Il carico organico associato al siero di latte viene generalmente espresso in valori di BOD (Biological Oxygen Demand), COD (Chemical Oxygen Demand) e BOD<sub>5</sub>/COD, un indice di biodegradabilità. Tali valori per il siero di latte risultano, secondo Prazeres et al. (2012) tra 27 e 60 g/L il BOD; tra 50 e 102 g/L il COD (con valori medi compresi tra 70 e 80 g/L); intorno a 0,5 -valore che indica buona biodegradabilità del refluo- il rapporto BOD<sub>5</sub>/COD. Inoltre, più del 90% del BOD<sub>5</sub> del siero di latte è attribuibile al lattosio presente.

Il contenuto di solidi varia dal 5% al 7% (Labatut, et al., 2011) mentre la percentuale di volatili varia tra l'87 e il 91%; il contenuto di azoto (TKN) si assesta su valori pari all'1,7-1,9% dei solidi totali.

Secondo i bilanci di massa dei prodotti in ingresso e dei corrispondenti prodotti, sottoprodotti, rifiuti ed effluenti in uscita nel processo di trasformazione del latte, effettuati da diversi studi (Ercoli, et al., Siso, 1996) risulta che la quantità di siero prodotto rappresenta tra l'85 e il 90 % del peso del latte lavorato e quindi, per ogni kg di

formaggio prodotto, residuano tra i 7 e i 9 kg di siero a seconda della tipologia di lavorazione.

In passato gli effluenti dell'industria casearia venivano comunemente sversati senza pretrattamenti nei corsi d'acqua o diluiti con acque reflue municipali, e destinati agli impianti di trattamento civili.

Ad oggi la normativa prevede limiti di legge allo scarico onde evitare gli impatti ambientali associati allo sversamento del siero non trattato nell'ambiente; esso, infatti, può causare un eccessivo consumo di ossigeno e fenomeni di eutrofizzazione a causa del carico organico ad esso imputabile, assieme a fenomeni di impermeabilizzazione del suolo per l'elevato contenuto di solidi.

Negli ultimi cinquant'anni sono state prese in considerazione varie alternative di valorizzazione del siero di latte, che possono essere sostanzialmente raggruppate in due categorie: da una parte i trattamenti volti al recupero e alla valorizzazione di componenti di pregio, in particolare le siero-proteine, dall'altra quelli volti alla valorizzazione del contenuto energetico del siero tal quale; questi ultimi consentono, in molte situazioni, di ottenere dei benefici economici superiori a quelli derivanti dall'impiego diretto del siero tal quale nell'alimentazione zootecnica. Tra questi trattamenti atti alla valorizzazione del contenuto energetico si ritrovano la digestione anaerobica e la fermentazione alcolica.

In Figura 1.1 sono illustrate le possibili alternative di valorizzazione del siero, che può essere utilizzato tal quale o a valle di uno stadio di separazione di alcune componenti, quali lattosio e proteine; questa separazione avviene generalmente con trattamenti a membrana, in particolare attraverso il processo di ultrafiltrazione. A valle del trattamento di ultrafiltrazione si ottengono due flussi: uno permeato, contenente principalmente lattosio, ed uno concentrato, costituito dalle siero-proteine che la membrana è in grado di trattenere.



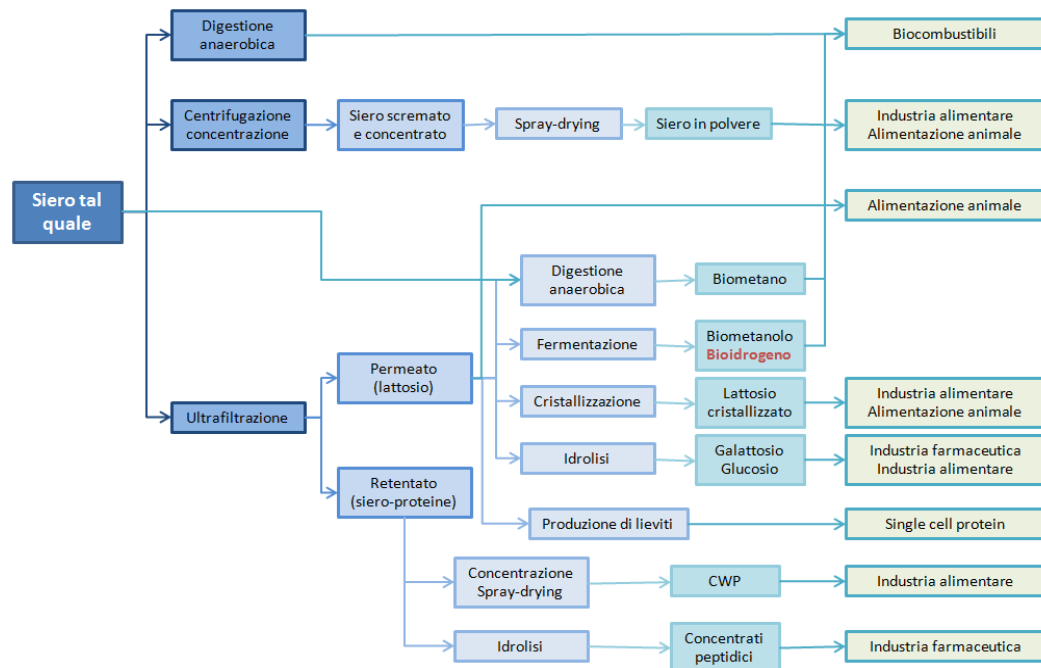


Figura 1.1 Filiere di valorizzazione e destini dei prodotti ottenibili a partire dal siero di latte

Mentre il concentrato di siero-proteine costituisce un flusso di interesse per l'industria alimentare e farmaceutica, la possibilità di recupero come materia nel caso del lattosio è ad oggi, in Italia, alquanto limitata (Insabato et al, 2014); proprio per questo motivo l'utilizzo del flusso di permeato per una sua valorizzazione energetica, mediante digestione anaerobica o fermentazione alcolica, costituisce un'attraente alternativa.

Attraverso l'ultrafiltrazione viene trattenuta una percentuale che varia tra il 70 e il 90% delle proteine contenute nel siero di latte, ottenendo così a valle, rispetto alla matrice originaria, una riduzione del carico organico e soprattutto del contenuto di azoto; ciò consente di ottenere una digestione più veloce e più stabile con minori concentrazioni residue di azoto nel digestato.

Per valutare la biodegradabilità anaerobica di una matrice organica, e valutare la produzione di metano che si osserverebbe dopo un tempo di degradazione infinito ed in condizioni ottimali (di miscelazione, temperatura, pH, oltre che in assenza di inibizione e con inoculo acclimatato) si effettuano prove sperimentali di BMP (Biochemical Methane Potential). La tecnica verrà descritta più approfonditamente nel Capitolo Materiali e Metodi.

Il BMP del siero di latte tal quale è stato stimato dal Politecnico di Milano conducendo prove in condizioni mesofile.

Il BMP del siero di latte valutato è pari a  $330 \text{ LCH}_4/\text{kg}_{\text{COD}}$  rimosso; valori simili sono stati ottenuti dagli studi di Gannoun et al. (2008) e Malaspina et al. (1996) che hanno

ottenuto rispettivamente una produzione massima di metano pari a 280 e 330 LCH<sub>4</sub>/kg<sub>COD</sub> corrispondenti ad una degradazione intorno al 98% in entrambi i casi.

Per quanto riguarda invece il permeato, contenente principalmente lattosio, la massima resa di metanazione ottenuta in una sperimentazione su un digestore in continuo da Wang et al (2009) è stata di 293 LCH<sub>4</sub>/kg<sub>COD</sub>, a fronte di una degradazione assunta cautelativamente intorno al 90%.

In Tabella 1.2 sono riassunti gli indicatori tecnici del siero di latte tal quale e del permeato di lattosio

*Tabella 1.2 (Insabato, et al., 2014) Indicatori tecnici del siero di latte tal quale e del permeato di lattosio*

<b>Parametro</b>		<b>Siero di latte</b>	<b>Permeato di lattosio</b>
Tenore di secco	<i>%tal quale</i>	5-7	2-5
Tenore di volatili	<i>%ST</i>	87-91	89-91
BMP	<i>LCH<sub>4</sub>/kgSV</i>	375-500	350-400
BMP riferito al prodotto tal quale	<i>LCH<sub>4</sub>/kgTQ</i>	23-31	14-18
Tenore di azoto	<i>%ST</i>	1,7-1,9	0,5-1

## **1.2 La Digestione Anaerobica**

L'industria lattiero casearia, come molte altre filiere agro-industriali, genera acque reflue caratterizzate da elevati BOD e COD, indici di un alto contenuto organico e di elevata biodegradabilità; pertanto la degradazione per via biologica costituisce la scelta di elezione e può essere operata per via aerobica o anaerobica.

Le caratteristiche dei reflui, generalmente caldi e caratterizzati da alti carichi, li predispongono per essere trattati anaerobicamente.

Con il trattamento anaerobico non avviene, però, la degradazione dell'azoto contenuto nel refluo; questo, utilizzato dai batteri solo per la crescita, e dunque in minima parte, può essere rimosso o a monte dello stadio di digestione, mediante l'ultrafiltrazione del siero tal quale, o a valle del processo di digestione anaerobica con uno stadio di trattamento aerobico.

Il processo anaerobico risulta inoltre vantaggioso poiché non comporta costi d'aerazione, presenta minori quantitativi di biomassa prodotti e consente una valorizzazione energetica del refluo grazie alla produzione di biogas.

### 1.2.1 Generalità sul processo

Nei processi anaerobici le sostanze organiche sono degradate da microrganismi che operano in assenza di ossigeno disciolto, libero, sotto forma di ossigeno molecolare, o legato ad altri elementi quali nitrati, nitriti, solfati ecc. In questi processi è la sostanza organica a fungere da accettore di elettroni, e, tramite successive ossidazioni e riduzioni, il carbonio viene convertito nel suo stato più ossidato  $CO_2$  e più ridotto  $CH_4$ .

Questo processo avviene grazie ad una catena di microrganismi batterici che vivono in associazione sintropica e portano alla degradazione delle sostanze organiche complesse e alla conseguente produzione di biogas, di composizione variabile tra il 50 e il 70% di metano e per la parte restante da anidride carbonica, vapore acqueo ed altre componenti minori. (Malpei & Gardoni, 2008)

Il potere calorifico inferiore di questa miscela, determinato dal tenore di metano in essa contenuto, è generalmente compreso tra 20000 e 24000  $KJ/m^3$ .

Nella Tabella 1.3 si riporta la composizione media, in volume, del biogas (Malpei & Gardoni, 2008).

Tabella 1.3 Composizione del biogas

Componente		% in volume
Metano	$CH_4$	55-60 (50-75)
Anidride carbonica	$CO_2$	35-40 (25-45)
Vapore acque	$H_2O$	2 (20°C) - 7 (40°C)
Idrogeno solforato	$H_2S$	0,2-2
Azoto	$N_2$	<2
Ossigeno	$O_2$	<2
Idrogeno solforato	$H_2$	<1

I ceppi batterici coinvolti nel processo di demolizione della sostanza organica hanno ruoli diversi e ben definiti: nessuno di essi, preso singolarmente, è in grado di condurre interamente il processo. All'interno del consorzio batterico si trovano batteri idrolitici, batteri acidogeni o fermentativi, batteri acetogeni ed infine batteri metanigeni.

Ciascun ceppo batterico opera una particolare fase del processo che, quindi, è composto di quattro fasi - come rappresentato nella Figura 1.2.

Il livello di degradazione della sostanza organica che viene alimentata ad un digestore anaerobico è generalmente compreso tra il 40% ed il 90%, in ragione della tipologia di substrato, della sua biodegradabilità e delle condizioni di processo. Vi sono però alcune eccezioni: sostanze organiche quali zuccheri semplici, alcoli e alcuni scarti dell'industria agroalimentari possono infatti essere degradate oltre il 90%, mentre matrici organiche

come la lignina, che si trova principalmente nella parete cellulare di alcune cellule vegetali, non possono essere degradate per via anaerobica.

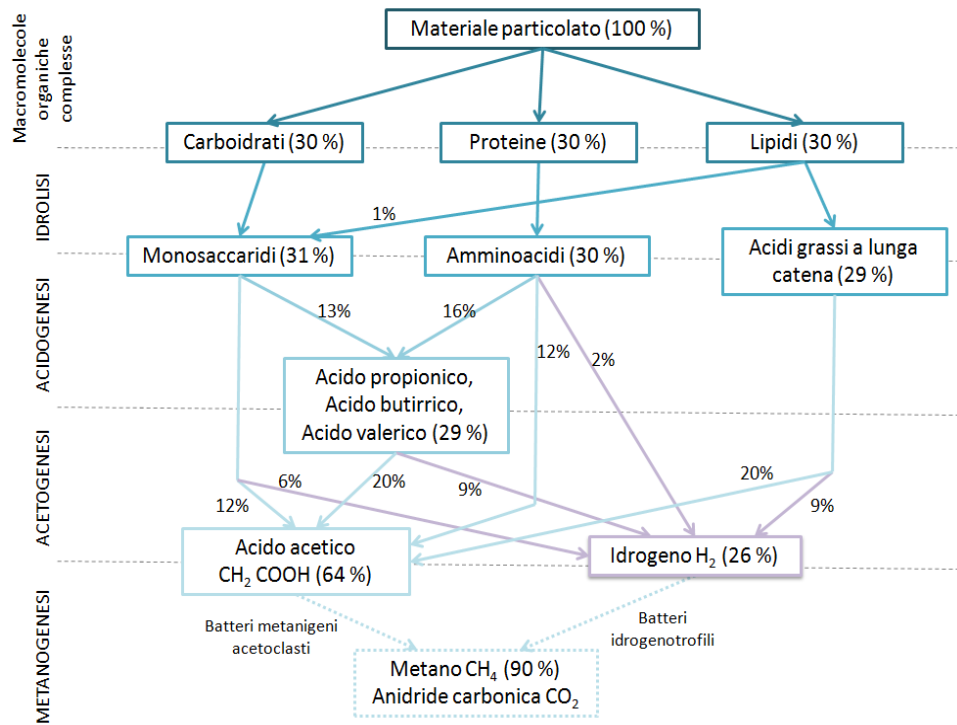


Figura 1.2 Fasi della degradazione Anaerobica

## 1.2.2 Fasi del processo

Durante la fase *idrolitica* il substrato, composto generalmente da polimeri (carboidrati) o molecole complesse (proteine e grassi), viene degradato a monomeri o a molecole più semplici (aminoacidi, acidi grassi a lunga catena e monosaccaridi). Questa semplificazione dei composti originari avviene per opera dei batteri idrolitici che agiscono prevalentemente mediante reazioni enzimatiche extracellulari.

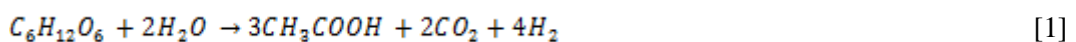
Alla fase idrolitica segue quella *acidogena*, in cui le molecole semplici prodotte dall'idrolisi vengono trasformate in acidi volatili a catena corta - prevalentemente acido acetico, propionico, butirrico e valerico, detti anche acidi grassi volatili (Volatile Fatty Acids). Gli enzimi che operano in questa fase e nelle successive sono intracellulari.

I batteri acetogeni convertono in seguito gli acidi grassi volatili in acido acetico (prevalentemente) ed acido formico; durante l'*acetogenesi* si ha, però, anche formazione di idrogeno e anidride carbonica.

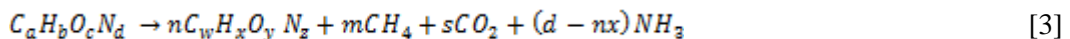
L'ultimo anello della catena di degradazione anaerobica che conduce alla formazione di CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> è la fase di *metanogenesi*, ad opera di batteri metanigeni.

Si parla di due distinte tipologie di metanogenesi: la metanogenesi acetoclastica, che converte l'acido acetico portando alla formazione di circa il 70% del metano finale, e quella idrogenotrofa, che converte, invece, l'idrogeno formatosi in concomitanza con l'acido acetico durante l'acetogenesi, producendo il restante 30% di metano. La metanogenesi acetoclastica avviene secondo una reazione di dismutazione (processo in cui la stessa sostanza in parte si ossida e in parte si riduce) dell'acido acetico, mentre quella idrogenotrofa deriva da una reazione di ossido-riduzione anaerobica.

In generale, la degradazione anaerobica di un substrato organico puro come il glucosio avviene secondo le reazioni 1 e 2.



Nel caso della digestione di un substrato complesso, invece, si può considerare di ottenere ulteriori prodotti oltre al metano e all'anidride carbonica tra cui, ad esempio, l'ammoniaca - che deriva dalla demolizione delle proteine. Nel caso della digestione di un substrato organico complesso con formula bruta  $C_aH_bO_cN_d$  può essere rappresentata dall'equazione di Buswell 3.



Con:

$$s = a - nw - m$$

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

Sempre in dipendenza dalla tipologia di substrato si individua, inoltre, la cinetica limitante su tutta la catena trofica: nel caso di diversi substrati, infatti, non tutte le fasi operano alla stessa velocità.

Lavorando con substrati complessi e difficilmente idrolizzabili, come ad esempio il materiale celluloso, si assume come cinetica limitante quella della fase idrolitica, mentre nel caso di substrati semplici e rapidamente biodegradabili la fase limitante è generalmente la metanogenesi. Quando la fase del processo con la cinetica limitante è la metanogenesi è opportuno fare particolare attenzione a non causare possibili sovraccarichi del sistema, poiché un accumulo di VFA può causare un'eccessiva diminuzione del pH e l'esaurirsi dell'effetto tampone, con conseguente inibizione dell'attività batterica.

### 1.2.3 Parametri di stabilità: temperatura, pH, presenza di inibenti tossici, composizione del substrato e produzione di biogas

Poiché il processo di digestione anaerobica avviene per opera di comunità batteriche, è necessario prestare attenzione alle condizioni ambientali per l'ottimizzazione del processo, sia dal punto di vista della produzione di biogas che da quello delle cinetiche di reazione.

I principali parametri che influiscono sul processo di digestione anaerobica sono pertanto: la temperatura, il pH, la presenza di inibenti o tossici e la composizione del substrato.

#### Temperatura

La temperatura di processo condiziona lo sviluppo della comunità batterica all'interno del digestore; come illustrato in Figura 1.3, a seconda della temperatura si individuano tre differenti intervalli operativi: tra i 4 e i 15 °C la degradazione avviene per opera di microrganismi psicrofili, tra i 20 e i 40 °C (con valore ottimale a 35°C) mesofili e tra i 45 e i 70 °C (con valore ottimale a 55°C) termofili.

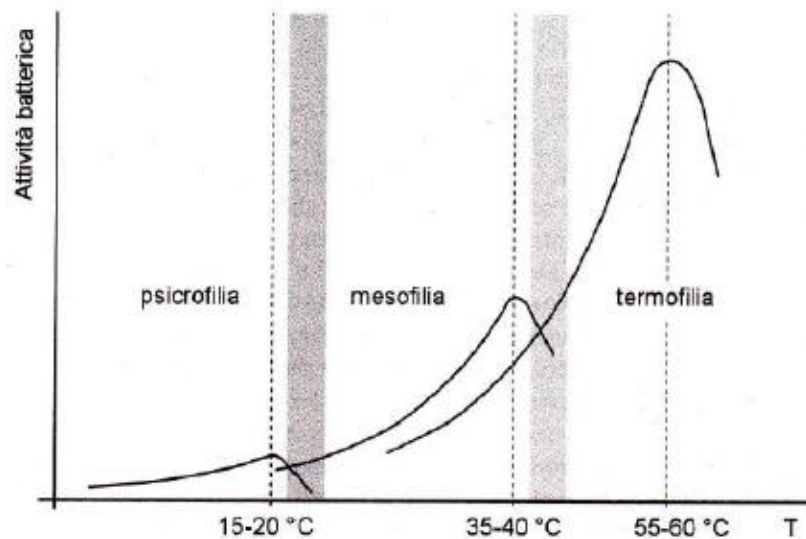


Figura 1.3 Effetto della temperatura sulle cinetiche di degradazione anaerobica. Sono indicati con le linee tratteggiate gli intervalli ottimali di lavoro e in grigio gli intervalli in cui il processo non è ottimizzato.

Nel caso di organismi psicrofili le cinetiche di reazione sono piuttosto lente, mentre quelle più rapide si osservano in campo termofilo. Anche in questo caso, comunque, i batteri anaerobici sono caratterizzati da tassi di crescita batterica molto inferiori rispetto a quelli aerobici, e da costanti di semisaturazione molto alte.

La velocità di crescita batterica aumenta proporzionalmente alla temperatura: per questo motivo le condizioni termofile sono caratterizzate da maggiori velocità di processo – a

differenza di quelle psicrofile che, a causa della lentezza del processo, sono ad oggi di limitata applicazione.

Per quanto riguarda le rese di degradazione non si osservano particolari differenze tra il processo di digestione anaerobica condotto in condizioni mesofile o termofile, mentre i ratei di reazione risultano molto più alti nel caso termofilo.

Oltre alla differenza tra i ratei di reazione, in campo mesofilo si osserva una maggiore stabilità del processo e una minore sensibilità a fronte di variazioni delle condizioni operative, mentre in termofilia si verificano:

- un aumento della frazione di ammoniaca non dissociata a pari contenuto di azoto ammoniacale totale. Di conseguenza aumenta il rischio di inibizione della metanogenesi nel trattamento di substrati ad elevato contenuto proteico;
- una minore solubilità di CO<sub>2</sub> (-36%) ed H<sub>2</sub>S (-31%) (Angelidaki, et al., 2004). Ha effetti sull'equilibrio dell'acido carbonico, su possibili inibizioni del processo da H<sub>2</sub>S e sulla composizione e presenza dei due composti nel biogas;
- una riduzione della viscosità del fango e dunque un miglioramento nella separabilità solido-liquido del digestato (Angelidaki, et al., 2004);
- un migliore abbattimento della carica microbiologica enterica (Escherichia Coli, Salmonella, ..)

I vantaggi dell'operare in termofilia sono ottenuti, però, a fronte di maggiori richieste energetiche per il riscaldamento e/o la coibentazione e la necessità di controllo della temperatura, essendo i batteri termofili più sensibili a variazioni della stessa.

## **pH**

Mentre la temperatura condiziona la tipologia del processo, il pH è uno dei parametri principali per quanto riguarda il controllo del corretto svolgimento e della stabilità del processo.

I diversi ceppi batterici hanno sensibilità differenti al pH dell'ambiente in cui vivono e le diverse fasi della digestione anaerobica sono favorite a differenti pH.

L'acidogenesi è favorita a pH acidi, mentre la fase metanogenica è favorita in un intervallo di pH tra 6,8 e 8,2 con valori ottimali tra 7 e 7,5. Per valori di pH inferiori l'attività batterica dei metanigeni rischia di essere compromessa provocando un blocco del sistema.

Esso comporta lunghi tempi di recupero pertanto è buona norma un controllo, nel digestore, non solo del pH, ma anche degli acidi grassi volatili e della capacità tampone del mezzo. Il pH, l'alcalinità e l'accumulo di acidi grassi volatili sono infatti strettamente

legati tra loro: un accumulo di VFA (sintomo di un sovraccarico del sistema) comporta un abbassamento del pH in funzione della capacità tampone del mezzo.

Nei processi a piena scala è pertanto utile monitorare il rapporto tra alcalinità ed acidi grassi volatili presenti, che fungono da campanello di allarme per possibili abbassamenti del pH e conseguenti blocchi del sistema.

### **Inibenti tossici**

Possibili blocchi o rallentamenti dell'attività batterica possono essere causati, oltre che da un pH al di fuori dell'intervallo ottimale, dalla presenza di composti tossici quali ammoniaca indissociata, acidi organici indissociati e idrogeno solforato in elevate concentrazioni, o anche dalla presenza di sostanze inibenti quali metalli e molecole organiche specifiche.

In particolare, l'ammoniaca in forma indissociata è in grado di superare la parete cellulare e bloccare l'attività metabolica dei microrganismi (Angelidaki e Ahring 1993).

La dissociazione dello ione ammonio in acqua è funzione di temperatura e pH: come si può vedere nella Tabella 1.4, all'aumentare della temperatura e del pH la frazione di ammoniaca indissociata aumenta.

*Tabella 1.4 Frazione di ammoniaca indissociata in funzione di pH e temperatura*

<b>pH</b>	<b>Temperatura</b>		
	25°C	35°C	55°C
6,5	0,002	0,004	0,012
7	0,006	0,011	0,036
7,5	0,017	0,034	0,107
8	0,053	0,099	0,274

Come presentato nello studio di (Malina & Pohland, 1992), si riscontrano inibizioni da ammoniaca indissociata a partire da concentrazioni di 200 mg/L.

Altre sostanze che possono essere inibenti per la biomassa coinvolta nel processo sono:

- il sodio, in letteratura è riscontrata un'inibizione passando da 3500-5000 ad 8000 mg/L
- il potassio, da 2500-4500 a 12000 mg/L
- il magnesio da 1000 a 3000 mg/L
- l'idrogeno solforato risulta inibente per concentrazioni superiori ai 200 mg/L.

I metalli pesanti, necessari come micronutrienti per i microrganismi in basse concentrazioni, diventano inibenti per concentrazioni maggiori: zinco rame e cromo risultano inibenti per concentrazioni intorno agli 1-2 mg/L. (Malina & Pohland, 1992)

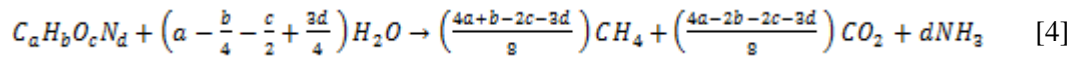
Infine, tra le sostanze organiche riportate come tossiche per i metanigeni rientrano solventi, sostanze alogenate, chetoni, esteri e pesticidi (Mata Alvarez e Macè, 2004).



### Composizione del substrato e produzione del biogas

La produzione di biogas è legata alla tipologia del substrato degradato e alla concentrazione a cui viene alimentato al reattore; i metodi per calcolare la quantità di metano potenzialmente generabile dalla degradazione anaerobica di un dato substrato si basano sulla stechiometria della reazione o sul bilancio energetico in termini di COD.

Nel primo caso, ci si rifà alla formula teorica di Buswell e Symons (Equazione 4), da cui si ricava il BMP (Biochemical Methane Potential) teorico.



Nel secondo caso, si considera il bilancio di massa in termini di COD (Chemical Oxygen Demand) (Henze et al., 1995) tenendo conto che il COD del substrato rimosso è trasferito interamente al biogas prodotto (assunto trascurabile il COD della biomassa batterica formata in ragione dei ridotti tassi di crescita) e nello specifico al metano in esso contenuto poiché l'anidride carbonica, stato più ossidato del carbonio, ha un COD nullo.

Quando il substrato da trattare contiene una frazione organica solida prevalente rispetto a quella liquida, la misura della sostanza organica viene effettuata in termini di kg Solidi Volatili (kgSV) piuttosto che di COD.

In letteratura sono ampiamente riportate le produzioni di biogas ottenibili in termini di  $m^3/(Kg_{sv}rimossi)$  a seconda della composizione chimica del substrato alimentato.

#### 1.2.4 Parametri operativi e tipologie impiantistiche

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), solidi totali volatili (SV), domanda chimica di ossigeno (COD), domanda biologica di ossigeno (BOD) o produzione potenziale biochimica di metano (BMP).

I parametri di gestione del reattore sono i seguenti:

- HRT (*Hydraulic Retention Time*), tempo medio di residenza idraulico; è definito come il rapporto tra il volume del reattore considerato e la portata di alimentazione al reattore;

- SRT (*Sludge Retention Time*), tempo medio di residenza dei fanghi; è definito dal rapporto tra la massa totale di solidi volatili presenti nel reattore e la portata di solidi estratta dal reattore;
- OLR (*Organic Loading Rate*), carico organico volumetrico di substrato alimentato al reattore; è definito come la quantità di substrato entrante nel reattore riferita all'unità di volume del reattore stesso e all'unità di tempo. L'OLR di un sistema è generalmente espresso in  $kgCOD/(m^3d)$ .
- Il rapporto F/M (*Food to Microorganisms Ratio*), definisce la massa di substrato alimentata per unità di biomassa presente nel reattore. Questo parametro, riguardante le prove in batch, viene espresso in  $gCOD/gSV$ ,  $gCOD/gCOD$  o  $gSV/gSV$ ; nei reattori funzionanti in continuo si definisce invece il Carico del fango, espresso in  $gCOD/(gSV d)$  o  $gSV/(gSV d)$ .
- Efficienza di rimozione del substrato  $\eta$ . Questo parametro è legato a ciò di cui si vuole monitorare la rimozione; se si parla di rimozione del carico organico di un dato processo ci si riferisce generalmente al COD. La percentuale di rimozione è data dall'equazione 5.

$$\eta = \frac{Q_{Sin} - Q_{out} S_{out}}{Q_{Sin} S_{in}} \quad [5]$$

Dove:

$\eta$  esprime la percentuale di COD rimosso

$Q_{in}$  è la portata influente, espressa in  $L/d$

$Q_{out}$  è la portata effluente, espressa in  $L/d$

$S_{in}$  è la concentrazione di substrato influente, espressa in  $gCOD/L$

$S_{out}$  è la concentrazione di substrato effluente, espressa in  $gCOD/L$

- 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  $m^3biogas/kgsubstrato$  alimentato. E' un parametro molto utilizzato per definire le rese dei processi di digestione anaerobica, ed è strettamente correlato alla biodegradabilità del substrato trattato.
- Velocità di produzione del biogas (GPR), definita come la portata di biogas prodotto rispetto al volume del reattore ed al tempo;

Nel trattamento anaerobico delle acque reflue è necessario che il tempo di residenza cellulare SRT sia svincolato dal tempo di residenza idraulico HRT a causa dei ridotti tassi di crescita che caratterizzano la biomassa coinvolta nel processo. Tale obiettivo non è

raggiungibile tramite sedimentazione e ricircoli, come nel caso aerobico, a causa delle alte concentrazioni di solidi che sono mantenute all'interno dei reattori.

In particolare, le tipologie reattoristiche in uso per la digestione anaerobica dei reflui sono:

- **Reattori a biomassa adesa**, in cui le colonie batteriche crescono e si sviluppano sotto forma di biofilm che aderiscono a supporti, fissi o mobili, installati all'interno dei reattori. La concentrazione di biomassa nell'effluente è quindi molto bassa e legata solamente a fenomeni di distacco causati dal decadimento batterico o dal regime idraulico.
- **Reattori ad alto carico**, UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket reactor), EGSB (Expanded Granular Sludge Bed) e IC (Internal Circulation), in cui le condizioni fluidodinamiche all'interno del reattore selezionano la biomassa capace di granulazione ad alta densità. Tale biomassa non viene trascinata via con l'effluente ed è caratterizzata da un'elevata sedimentabilità ( $SVI < 20 \text{ mL/gSS}$ )
- **Reattori a membrana anaerobici**, in cui la tecnologia MBR, sperimentata principalmente nel trattamento aerobico dei reflui, viene accoppiata al digestore anaerobico. Non si hanno perdite di biomassa nell'effluente a meno che non si verifichi una rottura della membrana.

### 1.2.5 Digestione anaerobica di siero di latte e reflui dell'industria lattiero casearia

Nonostante la digestione anaerobica del siero del latte sia un processo relativamente nuovo nel panorama dei trattamenti applicati ai reflui dell'industria casearia, in letteratura esistono alcuni esempi di impianti pilota a scala di laboratorio e a piena scala, in configurazioni impiantistiche differenti.

Queste si differenziano per modalità di funzionamento (batch, semi-continuo o continuo), per substrato alimentato (siero tal quale, siero UF, reflui dell'industria casearia, quindi comprensivi anche delle acque di lavaggio dei macchinari e delle linee di produzione) per schemi impiantistici.

A questa distinzione si aggiunge, inoltre, quella relativa agli obiettivi degli studi, talvolta atti a valutare il potenziale di rimozione del carico organico del sistema, talvolta a valutare le quantità di biometano prodotto dallo stesso.

In Demirel, et al, (2005) si fa riferimento a schemi d'impianto di tipo "classico" per il trattamento anaerobico dei reflui dell'industria casearia (siero e acque di lavaggio dei macchinari e delle linee di produzione). Tra essi si trovano: il digestore convenzionale (o

a fase unica), quello che separa la fase acidogenica da quella metanogenica (o a doppia fase) e il trattamento doppio stadio combinato anaerobico-aerobico.

Nel digestore anaerobico a fase unica tutte le fasi della digestione anaerobica (*idrolisi, acidogenesi, acetogenesi e metanogenesi*) avvengono all'interno dello stesso reattore.

La Tabella 1.5 (Erguder, et al., 2001) è un esempio della variabilità dei sistemi di trattamento anaerobico del siero di latte sperimentati dai team di ricerca di diverse università riguardo questo obiettivo.

Come si può notare sono svariati gli schemi impiantistici adottati e le condizioni operative a cui ciascun sistema opera.

Tabella 1.5 (Erguder, et al., 2000) Configurazioni e parametri operativi, digestione anaerobica di siero di latte

Tipologia di reattore	HRT	COD in	OLR	Efficienza di rimozione	Studio di riferimento
	<i>d</i>	<i>g/L</i>	<i>gCOD/(L d)</i>	<i>%</i>	
UFFLR	5	79	14	95	Wildenauer et al. 1985
DSFFR	5	13	2,6	88	De Haast et al. 1985
FBR	0,4	7	7,7	90	Boening et al. 1982
FBR	0,1-0,4	0,8-10	14763	63-87	Denac et al. 1988
AAFEB	0,6-0,7	mag-15	8,2-22	61-92	Switzenbaum et al. 1982
SDFA	-	69,8	16,1	99	Barford et al. 1986
UASB	1,5	11	7,1	94	Schroder et al 1989
UASB	5	5-28,7	0,9-6	97-99	Yan et al. 1989
DUHR	7	68	10	97	Malaspina et al. 1995
AP	8	4,4	0,55	63	Monroy et al. 1995
TSUAD	10	69,6	7	32,5	Ghaly et al. 1996
TSUAD	20	69,6	3,5	39,5	Ghaly et al. 1996
UASB	2,3-11,6	5-77	1-28,5	995-99	Kalyuzhnyi et al 1997
UASB	5,4-6,8	47-55	7-9,5	90-94	Kalyuzhnyi et al 1997

**UFFLR** (Upflow Fixed-Film Loop Reactor), **DSFFR** (Downflow Stationary Fixed-Bed Reactor), **FBR** (Fluidized-Bed Reactor), **AAFEB** (Anaerobic Attached-Film Expanded-Bed Reactor), **SDFA** (Semicontinuous Digester With Flocculant Addition), **UASB** (Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor), **DUHR** (Downflow-Upflow Hybrid Reactor), **AP** (anaerobic Pond), **TSUAD** (Two-Stage Unmixed Anaerobic Digester).

Erguder et al. (2001), hanno invece valutato la trattabilità per via anaerobica e il potenziale di biometanazione del siero di latte dapprima in prove batch e a seguire in reattori UASB, a singola e doppia fase, a scala di laboratorio. Gli autori di questo studio hanno ottenuto un BMP di 424 NmlCH<sub>4</sub>/gCOD, corrispondenti a 23,4 LCH<sub>4</sub>/Lsiero alimentato con efficienze di rimozione del COD tra il 95 e il 97% lavorando a bassi HRT (2-3 giorni).

Valori di BMP più bassi (compresi tra 280 e 380 NmLCH<sub>4</sub>/g<sub>COD</sub>) sono ottenuti in un altro studio (Gannoun, et al., 2008) su un reattore UAF (Upflow Anaerobic Filter) alimentato con siero tal quale e operante in condizioni mesofile (35°C) al variare dell'OLR e dell'HRT. Facendo variare l'HRT tra 4 e 2 giorni gli autori ottengono rimozioni del COD del 90,2% e 77,2% rispettivamente. Portando, poi, l'HRT ad 1 giorno la produzione di metano decresce (110 NmLCH<sub>4</sub>/g<sub>COD</sub>) a causa di una parziale inibizione per accumulo di VFA nel reattore.

Dal punto di vista dei carichi mantenibili all'interno del reattore e delle relative efficienze di rimozione del carico organico, Demirel et al. (2005) hanno condotto uno studio su un digestore a letto fisso ottenendo rimozioni del COD tra il 78% e il 92% con tempi di residenza idraulici di 4 giorni. Inserendo poi all'interno del letto fisso materiale di riempimento poroso gli autori hanno rilevato che il sistema raggiunge una maggiore stabilità a fronte di carichi volumetrici più elevati: il sistema poroso presenta stabilità fino a valori di 21 kg COD/(m<sup>3</sup>d) contro i 4 kg di COD/(m<sup>3</sup>d) che compromettono la stabilità del sistema non poroso.

Altre configurazioni impiantistiche a singola fase sono i reattori UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket reactor) e i reattori ASBR. Nello studio di Gavala et al. (1999) viene impiegato, a scala di laboratorio, un reattore ad alto carico UASB in cui si ottengono, per reflui in ingresso a concentrazioni tra i 12 e i 60 gCOD/L, tassi di rimozione tra l'85 e il 99% con HRT di 6 giorni e carichi volumetrici tra i 2 e i 7 kgCOD/(m<sup>3</sup>d).

La configurazione impiantistica a doppia fase, che prevede la separazione tra la fase acidogenica e quella metanogenica, è invece particolarmente indicata per reflui con alte concentrazioni di solidi sospesi e di grassi, generalmente poco biodegradabili e largamente presenti nei reflui della lavorazione casearia.

La separazione consente, inoltre, di proteggere i batteri metanigeni dal possibile accumulo di VFA prodotti nel primo reattore, e quindi da possibili cali del pH e conseguenti inibizioni del sistema. In tal modo, il pH può essere monitorato ed aggiustato nella prima fase, così come viene descritto nello studio svolto su un impianto di trattamento ibrido (reattore UASB combinato con reattore a letto fisso) a piena scala (Strydom, et al., 1995). Un ulteriore vantaggio consentito dalla separazione delle fasi consiste nella possibilità di regolare separatamente i parametri di progetto per ogni fase - e quindi di mantenere in ciascun reattore le condizioni più adatte, in termini di pH, HRT e carico alimentato, per la singola fase del processo.

Un esempio di digestione anaerobica di siero di latte in fasi separate è lo studio di Yilmazer e Yenigun (1999) in cui sono valutate le performance di un reattore CSTR per la fase acidogenica e di un reattore UFAF (Upflow anaerobic filter) per la fase metanogenica. Gli autori fanno variare il tempo di ritenzione idraulica del reattore e ottengono la maggior produzione di acidi grassi volatili per un HRT di 24 ore. L'effluente dal reattore CSTR viene usato poi come alimento per il filtro anaerobico, dove la migliore efficienza di rimozione del COD, pari al 90%, viene ottenuta con un tempo di ritenzione idraulica di 4 giorni e con una relativa produzione di metano di 550 LCH<sub>4</sub>/kg<sub>COD</sub> rimosso. Possibili inibizioni non sono solo derivanti dall'accumulo di acidi grassi; la digestione del siero tal quale, senza la rimozione delle proteine mediante uno stadio di ultrafiltrazione a monte, può portare ad un'inibizione della fase metanogenica. I principali prodotti della biodegradazione delle proteine in condizioni anaerobiche sono infatti alcuni amminoacidi, ma soprattutto l'ammoniaca. Quest'ultima, come illustrato precedentemente riguardo agli inibenti tossici, si ritrova in forma indissociata (la forma che risulta inibente per lo stadio di metanogenesi) in funzione di temperatura e pH. Vidal et al. (2000) riportano nel loro studio che concentrazioni superiori ai 200 mg/L possono risultare tossiche per i metanigeni.

Il trattamento aerobico combinato all'anaerobico, invece, è stato studiato per rispettare i limiti allo scarico per gli effluenti agro-industriali, pertanto sono raramente riportate le rese in termini di biogas ottenuto. Malaspina et al. (1996) hanno studiato questa combinazione di processi al fine di sviluppare una tecnologia che potesse ben adattarsi ai piccoli caseifici, che devono sopportare alti costi di smaltimento senza potersi permettere tecnologie di valorizzazione del refluo (come il recupero di proteine o lattosio).

A tal fine gli autori hanno progettato un reattore ibrido a flusso verticale-orizzontale (DUHR Downflow-Upflow Hybrid Reactor) che permettesse una stabilità di processo a fronte di alti carichi; lo scarico di questo reattore andava poi ad alimentare un secondo trattamento (aerobico) in configurazione SBR dove veniva smaltito il carico organico effluente dalla fase anaerobica, e vi fosse il trattamento di azoto e fosforo. A scala di laboratorio questa configurazione ha permesso agli autori dello studio di conseguire rimozioni complessive superiori al 90% in termini sia di COD che di azoto e di ottenere una resa in termini di biogas di 400 L<sub>BIOGAS</sub>/Kg<sub>COD</sub> rimosso. Non è riportata, però, la percentuale di metano contenuto nel biogas.

Lo studio di Monroy et al. (2000) documenta invece un'applicazione a piena scala della configurazione di trattamento anaerobico-aerobico con un reattore UASB seguito da una

vasca di aerazione; i tassi di rimozione ottenuti in termini di BOD<sub>5</sub>, COD, SST, oli e grassi sono rispettivamente del 98, 96, 98 e 99,8% (Teli, et al., 2014)

### 1.2.6 MBR Anaerobici

Di più recente sviluppo è invece la tecnologia anaerobica accoppiata all'uso di membrane; sebbene infatti le prime sperimentazioni a riguardo risalgano ad oltre 30 anni fa (Grethlein, 1978), lo studio venne in seguito accantonato per la maggior complessità del processo anaerobico e le maggiori difficoltà nel controllo del fouling di membrana rispetto all'applicazione in campo aerobico, favorendo in tal modo lo sviluppo delle altre tecnologie di trattamento anaerobico sopra citate.

Negli ultimi anni l'interesse della comunità scientifica è notevolmente cresciuto: in merito a questa tecnologia molti studi sono volti alla comprensione dei fenomeni che caratterizzano il fouling di membrana e alle varie configurazioni reattoristiche in cui può essere implementato l'uso stesso delle membrane.

Rispetto alle tipologie impiantistiche sopra citate i bioreattori a membrana hanno un grande potenziale di applicazione poiché consentono di raggiungere più obiettivi contemporaneamente: oltre al recupero del contenuto energetico del refluo consentono infatti di controllare con estrema precisione l'SRT del sistema, e di ritenere all'interno del reattore la biomassa indipendentemente dalle caratteristiche dei reflui, dalle proprietà del fango, e dall'assetto del reattore stesso.

La ritenzione completa della biomassa mediante membrana ed il ricircolo della stessa nel reattore consente di selezionare le specie microbiche più adatte sia come capacità degradativa che come eventuale resistenza alla presenza di composti tossici, indipendentemente dalle capacità di aggregazione in fiocchi o granuli (Rozzi, et al. 1996).

La tecnologia AnMBR consente inoltre di trattare acque con più elevate concentrazioni di solidi sospesi, che, nel caso di reattori UASB o di biomasse adese interferiscono col sistema, e di ottenere, a valle della membrana, un effluente privo di patogeni e di migliore qualità.

Lin et al. (2013) hanno proposto in una review sui bioreattori a membrana anaerobici una classificazione dei reflui in base al contenuto di solidi, concentrazione di COD e criticità del refluo, in termini di salinità, pH o temperatura estremi, caratteristiche che possono rendere l'effluente difficilmente trattabile.

In base a questa classificazione si ottengono otto categorie di reflui, tra i quali gli autori individuano una sola categoria preferibilmente non trattabile con AnMBR, quella dei reflui con alto carico di COD, basso contenuto di solidi e assenza di criticità, poiché

questi risultano particolarmente adatti per il trattamento con reattori UASB e derivati, tuttavia in caso di limiti allo scarico stringenti o necessità di controllo di cariche patogene, si possono adottare anche in questo caso reattori AnMBR (Teli, et al. 2014)

### 1.2.7 Configurazioni reattoristiche, tipologie di membrane e parametri di funzionamento

Nei processi a membrana si individuano tre flussi: il flusso da depurare, che viene alimentato al sistema, il flusso di permeato, ovvero quello che attraversa la membrana, depurato in ragione della dimensione dei pori della membrana e il retentato, ovvero il flusso in cui si concentrano gli inquinanti che la membrana è in grado di trattenere.

Il flusso che attraversa la membrana per unità di superficie e di tempo è detto *flusso di permeato*  $J$  ed è misurato in  $L/(m^2h)$  (o anche LMH). Il flusso specifico di permeato è funzione della qualità del refluo alimentato, delle caratteristiche della membrana e dei parametri operativi del sistema.

Per caratteristiche della membrana si intendono i parametri che la caratterizzano quando è pulita, generalmente forniti dal costruttore; tra questi si distinguono la porosità, la permeabilità e la resistenza della membrana.

La porosità della membrana, definita anche MWCO (*Molecular Weight Cut-Off*) si riferisce alla dimensione delle particelle che la membrana è in grado di trattenere, ed in particolare, rappresenta il peso molecolare della molecola più piccola ritenuta dalla membrana.

La permeabilità  $K$  o flusso specifico  $J_s$  indica la portata di permeato, per unità di superficie della membrana, che si ottiene applicando un gradiente di pressione unitario. È data dal rapporto tra il flusso e la TMP e si misura in  $L/(m^2 h bar)$ .

La resistenza della membrana pulita, indicata con  $R_m$  è inversamente proporzionale alla permeabilità e direttamente proporzionale allo spessore della membrana. È generalmente fornita dal costruttore e si misura con prove di filtrazione eseguite con acqua del rubinetto.

Nei processi a membrana la filtrazione può avvenire a flusso costante o a pressione costante; nel secondo caso il parametro che non varia è la TMP (*Transmembrane Pressure*).

L'energia necessaria per il funzionamento dei processi a membrana viene fornita da una pompa, che consente il passaggio attraverso la superficie filtrante e la circolazione del liquido all'interno del modulo. A causa della resistenza della membrana si verifica una



differenza di pressione tra i due lati (upstream e downstream), questa è definita pressione transmembrana TMP, che rappresenta la forza motrice del sistema e si misura in bar.

L'espressione per il calcolo della TMP è diversa a seconda della modalità di filtrazione; nel caso di filtrazione cross-flow la TMP è calcolata tramite l'equazione 6.

$$TMP = \left( \frac{P_{alimento} + P_{concentrato}}{2} \right) - P_{permeato} \quad [6]$$

La filtrazione con membrane può essere integrata ai bioreattori anaerobici in tre differenti configurazioni come rappresentato in Figura 1.4:

- Filtrazione con membrane immerse poste internamente al reattore (a)
- Filtrazione con membrane immerse poste esternamente al reattore (b)
- Filtrazione crossflow con membrane poste esternamente al reattore (c)

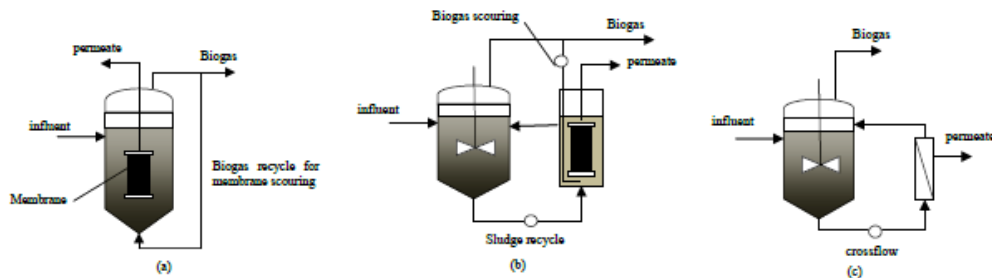


Figura 1.4 Configurazioni Reattoristiche MBR (Sheng Chang, et al., 2014)

Si differenziano quindi, al di là della configurazione in cui sono inserite, due tipologie di moduli di ultrafiltrazione e microfiltrazione che possono essere utilizzati in accoppiamento con il processo anaerobico: le membrane immerse, tipicamente a fibre cave, e quelle esterne a flusso tangenziale, di tipo tubolare, realizzate in materiale inorganico o polimerico.

Queste ultime, a fronte di maggiori costi di investimento e di esercizio, consentono di raggiungere flussi specifici maggiori, dell'ordine di 60 LMH, contro i 5-10 LMH raggiunti nelle configurazioni a membrane immerse, con velocità di crossflow di 2-4 m/s e pressioni transmembrana di alcuni bar (Teli, et al., 2014).

Tali condizioni, unitamente alla possibilità di operare lavaggi chimici a pH estremi senza interferire con l'attività batterica, rendono la configurazione impiantistica che prevede la filtrazione cross flow vantaggiosa per quanto riguarda il controllo dello sporco della membrana.

Un aspetto critico riscontrabile in questa configurazione è legato agli sforzi di taglio a cui è sottoposta la biomassa quando passava attraverso le pompe, per garantire il ricircolo nel sistema.

L'influenza che gli sforzi di taglio hanno sulla biomassa sono stati studiati sotto diversi punti di vista: essi possono infatti riflettersi in un'alterazione della dimensione dei fiocchi (Brockmann & Seyfried, 1996), nel rilascio di enzimi intra o extracellulari, che a loro volta hanno effetti sullo sporcamento della membrana, e sulla filtrabilità del fango.

Yang et al. (2011) hanno studiato l'effetto degli sforzi di taglio esercitati dalla pompa sulla dimensione dei fiocchi nel fango, ed una conseguente riduzione nell'efficienza di rimozione del carico organico, al contrario di quanto osservato da Choo & Lee (1998) nel cui studio non erano occorse riduzioni delle prestazioni depurative a seguito della riduzione della dimensione dei fiocchi.

Kim et al. (2001) hanno verificato come variano le azioni di taglio in ragione della tipologia della pompa utilizzata, dimostrando che le pompe rotative provocano maggiori sforzi di taglio rispetto alle pompe centrifughe.

Nelle configurazioni a membrane immerse interne al reattore non è necessario l'ausilio di una pompa per la circolazione attraverso la membrana, per quelle poste esternamente al reattore è necessario una pompa per la circolazione da un reattore all'altro, ma il consumo energetico richiesto è comunque molto minore poiché il flusso non è necessario che circoli in pressione attraverso la membrana.

Configurazioni impiantistiche alternative a quelle classiche (Figura 1.4) sono reattori a fasi separate con membrane esterne operanti la filtrazione crossflow; i vantaggi della separazione delle fasi sono stati elencati nel capitolo riguardante i digestori anaerobici classici.

### 1.2.8 Fouling anaerobico, SMP ed EPS

Lo sporcamento della membrana, detto anche fouling, è un fenomeno complesso ed è, ad oggi, il fattore che limita l'uso di membrane in accoppiamento al trattamento anaerobico dei reflui.

Il fouling di membrana è un meccanismo complesso che ha luogo sulla superficie della membrana o all'interno dei pori della stessa e provoca una riduzione della permeabilità che la caratterizza ed una conseguente riduzione del flusso di permeato attraverso di essa.

Le particelle che hanno un effetto sulla capacità filtrante sono classificabili come:

- solidi sospesi, principalmente aggregati batterici sospesi
- particelle colloidali, presenti nel refluo o derivanti da lisi cellulare

- molecole organiche solubili, principalmente molecole ad elevato peso molecolare derivanti dal metabolismo e dalla lisi cellulare
- sostanze inorganiche precipitabili

A seconda della modalità con cui queste particelle intervengono nello sporcamento della membrana si individuano tre tipologie di fouling. Le molecole organiche solubili, le sostanze inorganiche precipitabili e i colloidali fini vengono adsorbiti sulla membrana o all'interno dei pori: questo fenomeno prende il nome di *gel layer* nel primo caso e di *fouling interno* nel secondo. I solidi sospesi, gli aggregati batterici e i colloidali di dimensioni maggiori determinano la formazione di un deposito sulla superficie della membrana, che prende il nome di *membrana dinamica* o *cake layer*.

Lo sporcamento della membrana comporta una maggiore resistenza alla filtrazione, che si manifesta come riduzione del flusso specifico, nel caso della filtrazione a TMP costante, o incremento della TMP, nella filtrazione a flusso costante.

Il flusso di permeato è descritto dall'equazione 7, dove TMP è la pressione transmembrana,  $R_T$  può essere visto come la somma di tre contributi:  $R_m$  la resistenza della membrana pulita,  $R_C$  la resistenza dovuta alla membrana dinamica e  $R_F$  quella da attribuire all'adsorbimento delle macromolecole sulla superficie della membrana (*gel layer*) o all'interno dei pori (*fouling interno*).

$$J = \frac{TMP}{\mu(R_T)} = \frac{TMP}{\mu(R_m + R_C + R_F)} \quad [7]$$

A seconda poi della modalità di lavaggio in grado di rimuoverlo, il fouling può essere classificato come *reversibile*, eliminabile tramite lavaggi fisici, o *irreversibile* o *permanente*, eliminabile con lavaggi chimici con acidi, basi o ossidanti, o *non recuperabile*.

Il fouling irreversibile e non recuperabile è principalmente collegato alla formazione del *gel layer* e del *fouling interno*.

Data la complessità del fenomeno del fouling, esso è influenzato, direttamente o indirettamente, da diversi fattori, come illustrato nella Figura 1.5 proposta da Stuckey (2013).

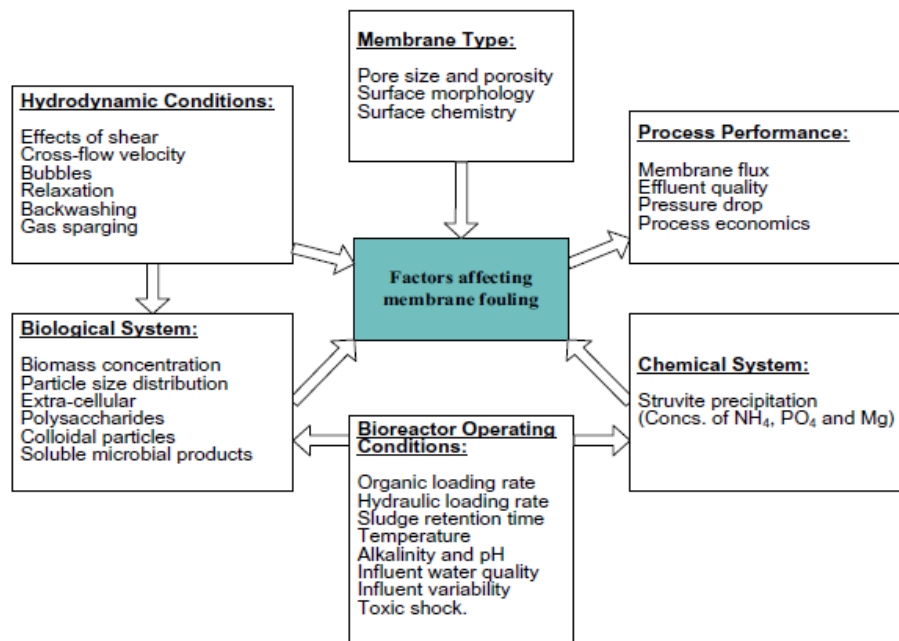


Figura 1.5 (Stuckey, 2013) Modalità di Fouling

Tra questi, le caratteristiche intrinseche della membrana hanno un ruolo principale all'inizio della filtrazione, quando le membrane sono sostanzialmente "pulite".

In seguito intervengono nella determinazione dei meccanismi di sporcamento:

- le caratteristiche del refluo in ingresso
- le caratteristiche della biomassa
- le condizioni operative del sistema
- le condizioni idrodinamiche del reattore

Le caratteristiche del refluo in ingresso e quelle della biomassa presente all'interno del reattore esercitano un'influenza diretta sia sulla tipologia che sull'entità del fenomeno di sporcamento; ad esse si fa riferimento in termini di concentrazione della biomassa (SSV/SST), dimensione dei fiocchi, viscosità e idrofobicità del fango e concentrazione di polimeri extracellulari di origine batterica (Extracellular Polymeric Substances EPS, Soluble Microbial Products SMP).

Gli EPS sono la matrice organica che permette l'aggregazione dei batteri in fiocchi o biofilm; con il termine EPS sono classificate in realtà diverse categorie di macromolecole: polisaccaridi, proteine, acidi nucleici, ed altri composti polimerici che si ritrovano sulla superficie cellulare o negli spazi intracellulari degli aggregati batterici (Le Chech, 2006). Diversi studi riconoscono negli EPS il fattore che maggiormente influisce sullo sporcamento delle membrane: essi infatti causano la formazione di un gel acquoso nel quale sono immersi i batteri. Questo gel da una parte forma una barriera che oppone resistenza al flusso di permeato attraverso la membrana, dall'altra fornisce nutrimento

alla biomassa che vi si trova immersa, consentendone la crescita in biofilm sulla superficie stessa della membrana (Flemming, et al., 2001).

Generalmente si opera una distinzione tra EPS estratti artificialmente dai fiocchi di fango (eEPS) ed EPS solubili presenti nel surnatante e non associati a cellule batteriche, definiti SMP, Soluble Microbial Products.

Gli SMP sono composti organici solubili rilasciati per lisi cellulare, diffusi attraverso la membrana durante la sintesi cellulare o escreti dai batteri durante alcuni processi metabolici.

A titolo di esempio, in uno studio condotto su un impianto MBR a Singapore (Ng, et al., 2005) veniva rilevata una maggiore resistenza alla filtrazione quando il flusso era privo di biomassa che quando la biomassa era presente in concentrazione pari a 4 g/L. Ciò indica chiaramente che la composizione e la concentrazione delle molecole organiche presenti nel surnatante (SMP) possono avere un effetto marcato sulla performance del sistema MBR.

Durante la filtrazione, infatti, gli SMP che si adsorbono sulla superficie della membrana, oltre ad ostruirne le porosità, costituiscono una possibile risorsa di nutrimento per la crescita del biofilm, la cui formazione porta ad un aumento della resistenza della membrana al flusso di permeato.

Gli studi che analizzano gli effetti di EPS ed SMP nel fango si basano su diversi metodi di estrazione delle sostanze polimeriche extracellulari dalla matrice. Per l'estrazione degli EPS in letteratura sono riportati l'utilizzo di resine a scambio ionico (Frolund, et al., 1996), trattamenti termici (Morgan, et al., 1990) e per centrifugazione dei campioni di fango, semplice o assistita con formaldeide. Nel confronto tra i diversi metodi quello più efficace in termini di capacità di estrazione della maggior concentrazione di EPS è risultato essere la centrifugazione con aggiunta di formaldeide, tuttavia per la sua semplicità è spesso scelto il trattamento termico. I metodi per la separazione degli SMP, sono la filtrazione con filtri di carta (12  $\mu\text{m}$ ), la centrifugazione e la sedimentazione.

Le soluzioni che contengono SMP ed EPS sono caratterizzate principalmente da carboidrati e proteine, la cui concentrazione è facilmente misurabile grazie ai metodi fotometrici studiati rispettivamente da Dubois et al (1956) e Lowry et al (1951).

Le-Clech et al (2006) riportano i valori di concentrazione di proteine e carboidrati negli EPS ottenuti in diversi studi con vari set-up MBR: nella maggior parte dei casi la concentrazione delle proteine –con un massimo di 120 mg/gSS– è superiore di quella dei carboidrati –che raggiunge un massimo di 40 mg/gSS.

Per quanto riguarda l'applicazione MBR in campo anaerobico, gli autori riportano un intervallo (dai 20 ai 130 mg/gSS) entro il quale la resistenza specifica della membrana aumenta linearmente con la concentrazione degli EPS; viene riportata una correlazione lineare anche tra il calo della performance del sistema e la concentrazione di SMP.

Oltre al fouling organico sulle membrane si ritrova il fouling inorganico, che dipende fortemente dalla composizione chimica del refluo trattato. Il precipitato più comune che si trova sulla superficie della membrana è la struvite,  $MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$  (Doyle & Parsons, 2002), ma si possono ritrovare anche altri fosfati e sali di calcio, specialmente sulle membrane inorganiche (Kang, et al., 2002).

Tuttavia fouling organico ed inorganico non sono da considerarsi totalmente indipendenti l'uno dall'altro: Wang et al. (2008), hanno condotto uno studio su un bioreattore aerobico a membrane immerse, notando un'interazione tra inquinanti organici e precipitati inorganici, che favorisce la formazione del gel layer. Stuckey (2012) sostiene che nel caso anaerobico questa interazione risulti maggiormente favorita dalle alte concentrazioni di ioni ammonio e carbonati presenti, dovute agli alti carichi alimentati ed all'idrolisi delle proteine che avviene nel processo di digestione anaerobica.

### 1.2.9 Sperimentazioni con siero in AnMbr

La digestione anaerobica dei reflui caseari offre una soluzione conveniente sia dal punto di vista della valorizzazione economica dello scarto, sia da quello del controllo dell'inquinamento.

L'utilizzo di membrane di ultrafiltrazione, a monte della digestione anaerobica, risulta una tecnologia particolarmente interessante poiché consente la rimozione delle sieroproteine, e dunque la contestuale rimozione del contenuto di azoto del siero di latte, che non viene rimosso per via anaerobica.

Come già visto in precedenza, gli esempi di digestione anaerobica di reflui agroindustriali, ed in particolare di siero di latte, non mancano in letteratura, e si riferiscono alle più svariate configurazioni reattoristiche.

Negli ultimi anni, con l'aumento dell'interesse per la tecnologia MBR applicata in campo anaerobico, è aumentato anche il numero degli studi in cui l'uso di membrane consente di svincolare HRT ed SRT nel trattamento anaerobico.

Per quanto riguarda il trattamento del siero di latte, lo studio di Saddoud et al. (2007) fa riferimento ad una configurazione reattoristica a fasi separate, costituita da un primo reattore CSTR dove avviene la fase di acidogenesi, ed un secondo MBR per la fase di metanogenesi.

Il reattore lavora ad una velocità di cross-flow di 5 m/s ed una concentrazione della biomassa pari a 8,5 g/L; per l'ottimizzazione del processo gli autori fanno variare la TMP tra 1,25 e 2,25 bar. Il flusso di permeato aumenta con l'incremento della pressione transmembrana fino ad 1,75 bar, raggiungendo un valore di 139,5 LMH, e decresce tra 1,75 e 2,25 bar raggiungendo un valore di 136,5 LMH.

La diminuzione del flusso è attribuibile al cake layer che si forma sulla superficie della membrana, e all'occlusione dei pori della stessa ad opera del particolato.

La resa di metano ottenuta nello studio è mediamente di 0,3 LCH<sub>4</sub>/gCOD<sub>rimosso</sub> e risulta aumentare proporzionalmente con l'aumento del carico organico volumetrico fino a 19.78 g COD/L d; la percentuale di metano nel biogas prodotto ammonta al 70%, indice di una buona performance del sistema.

### 1.2.10 Criteri di avvio dei digestori anaerobici

L'avvio di un'impianto di digestione anaerobica è una fase delicata e molto importante per il funzionamento futuro del digestore. La messa a regime del reattore richiede tempi relativamente lunghi e proprio durante questa fase è necessario monitorare diversi parametri per ottenere le condizioni ottimali di funzionamento.

Durante l'avvio è importante riuscire a stabilire all'interno del reattore un appropriato consorzio batterico, per lo svolgimento di tutte le fasi della digestione anaerobica, raggiungere le condizioni operative e la produzione di biogas di progetto, ed evitare l'instaurarsi di problemi in grado di inibire il processo; è importante monitorare con particolare attenzione la fase di avvio di un digestore onde evitare possibili blocchi del sistema, che comportano grosse difficoltà e lunghi tempi di recupero.

L'efficienza dell'avvio dipende da numerosi fattori tra cui la scelta del fango di inoculo, il carico organico iniziale e il suo progressivo aumento in rapporto all'inoculo presente, il tempo di ritenzione idraulica (HRT) e l'età del fango (SRT).

L'avvio di un impianto è una fase dinamica durante la quale viene aumentato gradualmente il carico organico in ragione della capacità di biodegradazione del consorzio batterico, monitorando possibili accumuli di acidi grassi volatili in grado di causare blocchi del sistema.

Il monitoraggio consiste in frequenti misurazioni di alcuni parametri in grado di indicare il buon funzionamento dell'intero processo, quali: la temperatura, il pH, l'alcalinità, il rapporto SST/SSV e la concentrazione di VFA all'interno del digestore e la concentrazione dell'ammoniaca, oltre che la portata e la composizione del biogas prodotto.

Per la scelta del fango di inoculo è opportuno scegliere un fango che provenga da digestori che operano alla stessa temperatura e che trattino, ove possibile, un substrato simile a quello utilizzato.

Per l'avvio di un digestore si possono seguire varie strategie, tra cui:

- Inoculo parziale e progressivo aumento del carico secondo il modello della biomassa attiva (Angelidaki, et al., 2006)
- Inoculo totale e aumento progressivo del carico con controllo sulla SMA e sui VFA (Ince, et al., 1995)

Il primo criterio è basato sul *concetto di attivazione* e segue la crescita della biomassa anaerobica. Questa teoria prevede un OLR ( $\text{gSV}_{\text{alimentati}}/\text{gSV}_{\text{biomassa}}/\text{d}$ ), giorno per giorno, pari al 5-10% di quello degradabile dalla biomassa attiva nel reattore, la cui percentuale all'interno del fango, nel caso del corretto funzionamento del processo, cresce con il tempo.

La biomassa attiva iniziale nel reattore è quella fornita dall'inoculo, successivamente si assume che il substrato si converta a biomassa attiva in un periodo di 7 giorni secondo definite percentuali. Il calcolo della biomassa attiva può essere implementato secondo la seguente equazione

$$AB_n = AB_{n-1} + \sum_{i=1}^7 F_{n-1} a_i$$

Dove  $AB$  è la biomassa attiva,  $F$  il carico giornaliero,  $n$  il numero del giorno e  $a_i$  la percentuale di conversione.

La teoria della biomassa attiva porta ad avere un carico esponenzialmente crescente, che però può essere modificato sulla base delle analisi dei VFA.

Una volta terminata la fase di avvio e riempito il reattore è possibile procedere all'alimentazione ed estrazione di fango di supero quotidiana, raggiungendo il carico organico di progetto

L'applicazione di questo metodo consente misure meno frequenti di VFA poiché il metodo in sé è cautelativo nei confronti di questo aspetto.

La scelta, invece, di un inoculo totale basa l'aumento del carico sul controllo con i test SMA che parallelamente vanno effettuati in laboratorio.

Il test SMA (*Specific Methanogenic Activity*) consente una verifica in batch della massima produzione specifica di metano del fango, dosando acetato di sodio in concentrazioni comprese tra i 1000 e i 4000 mg/L. Così viene valutata la capacità metanigena dei soli batteri acetoclasti, che rappresentano circa il 70% della biomassa.



La prova di SMA fornisce la produzione potenziale di metano (PMP) espressa in  $\text{mLCH}_4/(\text{gSVd})$ . Questo valore può essere confrontato con la reale produzione di metano nel reattore (AMP) ed in base al rapporto tra questi due parametri (AMP/PMP) è possibile verificare le condizioni operative all'interno del reattore. Valori intorno a 0,6 indicano condizioni stabili ed un'eccellente rimozione del COD, valori compresi tra 0,6 e 1 indicano bassa rimozione del COD e stabilità dipendente dall'alcalinità disponibile, valori maggiori di 1 indicano un eccessivo carico organico alimentato al reattore ed un possibile rischio di squilibrio nel sistema.

La SMA inoltre può servire come parametro di controllo del carico alimentato al reattore, rappresentando, se opportunamente trasformata in  $\text{gCOD}/(\text{gSVd})$  e moltiplicata per la concentrazione della biomassa all'interno del reattore, il carico organico massimo alimentabile.

Proporzionalmente alla crescita del valore della SMA il reattore può essere alimentato con un carico via via crescente.

### 1.2.11 Parametri da monitorare all'avvio di un digestore

I parametri che devono essere monitorati durante la fase di avvio di un digestore anaerobico, come già accennato nel precedente capitolo, sono i seguenti.

#### **Acidi grassi volatili (VFA)**

Il monitoraggio degli acidi grassi volatili è di notevole importanza poiché è indice di possibili squilibri del sistema prima che essi portino a condizioni irreversibili, soprattutto in impianti di digestione anaerobica di matrici la cui fase limitante del processo è la metanogenesi.

Una sovrapproduzione di VFA che non vengono immediatamente consumati dalla biomassa metanigena, può comportare un abbassamento del pH, che va ulteriormente ad inibire i batteri metanigeni causando un blocco del sistema.

Monitorando la concentrazione dei VFA all'interno del reattore si può intervenire sul reattore prima che consumino tutta la capacità tampone del mezzo; qualora venisse monitorato solo il pH del sistema, si noterebbe lo squilibrio in ritardo rispetto a un possibile intervento.

Gli acidi grassi possono essere monitorati in kit, quando è di interesse la concentrazione in termini di acido acetico, o con il gas cromatografo quando è d'interesse anche la composizione.

### **Alcalinità**

Il monitoraggio dell'alcalinità del mezzo è legato al monitoraggio del pH del sistema e degli acidi grassi. Monitorando la capacità tampone infatti siamo in grado di capire quando un sistema può restare in equilibrio a fronte di possibili sovrapproduzioni di acidi grassi, evitando l'abbassamento del pH e quindi possibili blocchi del sistema.

L'alcalinità del mezzo si esprime in  $\text{gCaCO}_3/\text{L}$ , e può essere misurata in kit.

### **FOS/TAC**

Le sigle FOS e TAC stanno rispettivamente per *Flüchtige Organische Säure* (acidi grassi volatili) e *Totales*

*Anorganisches Carbonat* (Alcalinità totale). Il valore del rapporto FOS/TAC indica la quantità di acidi grassi volatili in relazione alla capacità tampone del mezzo (alcalinità). Valori di FOS/TAC che indicano stabilità si trovano nell'intervallo 0,2-0,3; valori superiori a 0,3 stanno a significare che l'alcalinità del mezzo è stata consumata dall'accumulo di acidi grassi volatili e si va incontro ad un possibile abbassamento del pH; valori inferiori a 0,2 testimoniano invece che il carico alimentato al reattore potrebbe essere troppo basso.

La misura del FOS/TAC è molto semplice poiché entrambi i parametri (FOS e TAC) sono facilmente misurabili per titolazione; tuttavia il monitoraggio del digestore non si può limitare solamente a questo rapporto poiché un solo parametro non è in grado di determinare lo stato di un processo complicato come la digestione anaerobica.

### **Rese di rimozione e produzione di biogas**

La rimozione della componente organica è un buon indice di funzionamento del processo, pertanto è opportuno monitorare anche nella fase di avvio, le rese di rimozione in termini di COD e  $N_{\text{tot}}$ .

Il COD degradato viene trasformato in nuova biomassa e biogas, pertanto, verificare anche la produzione e la composizione del biogas prodotto è un ulteriore controllo sul corretto svolgimento di tutte le fasi della catena metabolica.

Inoltre la produzione di biogas, e la sua composizione, è opportuno che sia monitorata se durante l'avvio del digestore deve essere rapportata alla produzione potenziale ottenuta con la prova di SMA.

## **1.3 BioH<sub>2</sub> e Dark Fermentation**

A fronte del continuo aumento della domanda mondiale di energia, della scarsità dei combustibili fossili e dei comprovati effetti negativi che il loro uso comporta per

l'ambiente, molti ricercatori, negli ultimi anni, hanno valutato nuove forme di energia pulita: ridurre il rischio dei cambiamenti climatici nel medio termine e garantire l'approvvigionamento energetico rappresenta la sfida tecnologica del nuovo secolo.

A tal proposito l'idrogeno è considerato il combustibile del futuro: possiede il più alto contenuto energetico per unità di peso (142 KJ/g), e non contribuisce all'effetto serra, poiché la sua combustione non comporta emissioni di CO<sub>2</sub> SO<sub>x</sub> ed NO<sub>x</sub> in atmosfera, e gli unici sottoprodotti generati sono acqua e calore. (Gallo Stampino, 2012)

*Tabella 1.6 Proprietà di idrogeno e metano*

		<b>H<sub>2</sub></b>	<b>CH<sub>4</sub></b>
Peso Molecolare	<i>g/mol</i>	2,016	16,043
Temperatura critica	<i>°C</i>	-240	-82,7
Pressione critica	<i>bar</i>	12,98	45,96
Calore latente di evaporazione (1 atm)	<i>kJ/kg</i>	454,3	510
Densità gas (1 atm, 15 °C)	<i>kg/m<sup>3</sup></i>	0,085	0,68
Densità liquido (1 atm, ebollizione)	<i>kg/m<sup>3</sup></i>	70,98	422,62
Potere calorifico (LHV)	<i>MJ/kg</i>	120	50
Limite di infiammabilità in aria	<i>%vol</i>	4,0-75,0	5,0-15,0
Indice di Wobbe	<i>Mj/Nm<sup>3</sup></i>	40-48	48-53

Pur essendo l'elemento chimico più abbondante sulla Terra, l'idrogeno non è considerabile una fonte energetica poiché in natura non ne esistono giacimenti; l'idrogeno molecolare infatti è molto raro a causa della sua estrema volatilità, ma, al contrario, è molto diffuso sottoforma di composti (acqua, idrocarburi, sostanze minerali, organismi animali e vegetali).

Quando si parla di idrogeno come fonte energetica ci si riferisce pertanto ad un "vettore energetico", un mezzo, cioè, per trasferire energia da una forma all'altra; deve essere, infatti, prodotto a partire da altri composti, come acqua o metano, con dispendio di energia a monte di tale processo.

L'idrogeno, come combustibile è adatto per essere utilizzato sia in motori a combustione interna, sia in pile a combustibile, per generare elettricità.

Attualmente le vie di produzione industriale dell'idrogeno sono principalmente lo steam reforming del metano, e l'elettrolisi dell'acqua. Entrambi i processi, però, presentano delle controindicazioni dal punto di vista ambientale: il primo, che consiste nella reazione a caldo del metano con vapore a 800°C, non è considerabile un processo pulito, poiché nell'ossidazione del carbonio si libera CO<sub>2</sub>; il secondo, invece, non risulta particolarmente vantaggioso dal punto di vista energetico.

I processi biologici di produzione dell'idrogeno (bioidrogeno) rappresentano una valida alternativa ai metodi classici; tra questi i più studiati sono:

- la biofotolisi, diretta o indiretta, che si basa sulla scissione dell'acqua in ossigeno e idrogeno, operata da microalghe (diretta) o cianobatteri (indiretta)
- i processi fermentativi quali la photo-fermentation, fermentazione in presenza di luce, e la dark-fermentation, fermentazione al buio.

I processi biologici, che sfruttano per la produzione di idrogeno le capacità metaboliche di alcuni microrganismi, risultano particolarmente attraenti: costituiscono una via pulita di produzione di idrogeno, richiedono bassi input energetici, poichè operano a temperature modeste e a pressione ambiente, e possono utilizzare come substrato di alimento materiali di scarto: zuccheri semplici, quali glucosio, saccarosio e lattosio, rapidamente biodegradabili, sono i substrati migliori per la produzione di idrogeno e sono contenuti in molti scarti dell'industria agricola ed alimentare.

Tra i due processi la via fermentativa in assenza di luce presenta alcuni vantaggi tra cui: tassi di produzione di idrogeno molto elevati, buoni tassi di crescita dei microrganismi e produzione continua a prescindere dalla presenza di luce solare. (Das, et al.,2001)

La dark fermentation, o fermentazione al buio, consiste nella conversione di un substrato organico in bioidrogeno per opera di una biomassa specifica; è un processo complesso condotto da una catena trofica di microrganismi batterici che operano in serie, come nella digestione anaerobica, ma a differenza di quest'ultima, poiché l'obiettivo è la produzione di idrogeno, devono verificarsi solo le prime due fasi: quella idrolitica e quella acidogena, come mostrato in Figura 1.6.

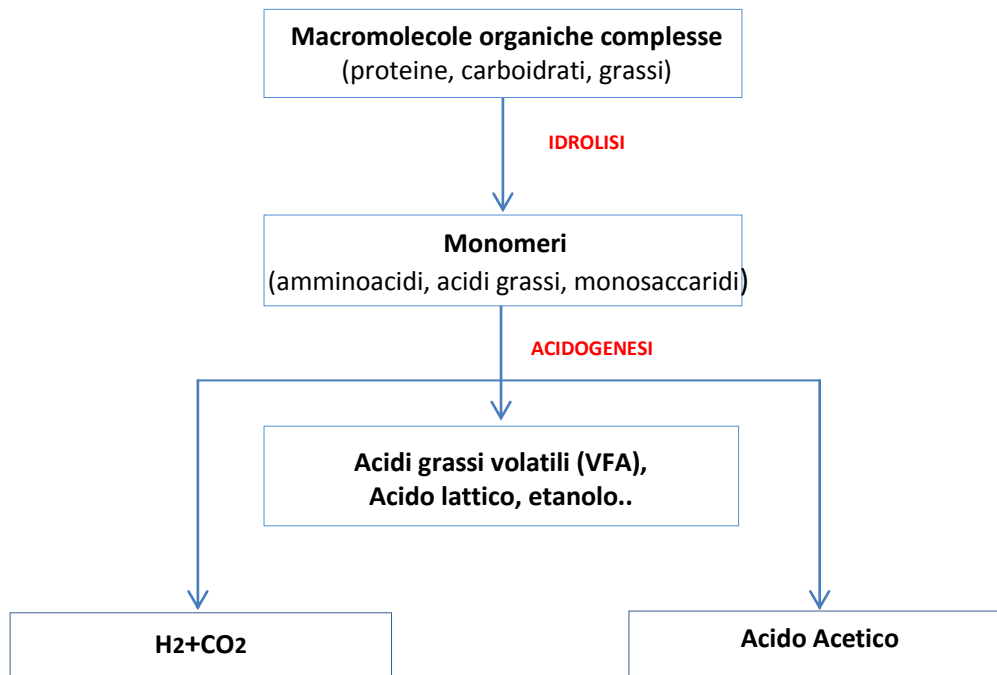


Figura 1.6 Fasi del processo di Dark Fermentation

Al contrario di ciò che avviene per la digestione anaerobica, non sono documentati per la dark fermentation, casi in cui la temperatura di processo sia inferiore ai 25 °C; la dark fermentation può avvenire pertanto in condizioni mesofile (25-40°C), termofile (40-65°C), estremamente termofile (65-80°C) o ipertermofile (> 80°C) (Levin, et al., 2003).

Anche le condizioni all'interno del reattore, nel caso di DF o DA sono diverse: un buon funzionamento della fase acidogenica è infatti favorito a bassi pH e bassi tempi di ritenzione idraulica, laddove queste condizioni sono inibenti per la crescita dei metanigeni. (Ince, 1998)

In letteratura sono numerosi gli studi sulla digestione anaerobica a doppia fase, dove cioè la fase acidogenica e quella metanigena avvengono in reattori differenti (Gosh & Pohland, 1971); in tutti questi casi vengono, però, osservate le condizioni che favoriscono l'acidogenesi, e non la produzione di idrogeno.

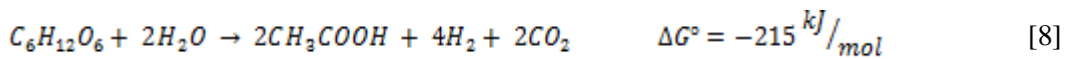
Al contrario le condizioni che ottimizzano la produzione di idrogeno sono state studiate da Hawkes et al (2002), come descritto più avanti nel capitolo “configurazione doppia fase DF+DA.”

La configurazione impiantistica in cui il primo stadio è volto a favorire la produzione di H<sub>2</sub> ed il secondo consiste nella digestione dei prodotti della DF, quindi acidi grassi a catena corta principalmente, dà vita ad una miscela di metano arricchito con idrogeno (H<sub>2</sub> -CH<sub>4</sub>) che costituisce un carburante di maggiore valore rispetto al solo CH<sub>4</sub>: il biohythane (BHy).

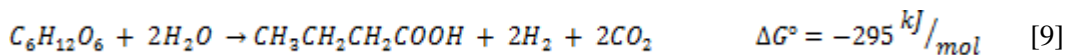
Le concentrazioni di metano idrogeno ed anidride carbonica di questo combustibile sono rispettivamente del 60%, 10% e 30%; questo gas si presta efficacemente all'uso in motori a combustione interna (Bauer and Forest 2001, Karim et al 1995) ed è caratterizzato da un'efficienza maggiore, rese paragonabili al metano e da minori emissioni in atmosfera.

### 1.3.1 Aspetti stechiometrici e pathway degradativi

La degradazione di una mole di glucosio in condizioni anaerobiche avviene complessivamente secondo la reazione 8 e porta alla produzione di idrogeno e altri prodotti metabolici, principalmente acidi grassi volatili (acetico, propionico butirrico e valerico), acido lattico e alcoli (butanolo ed etanolo) a seconda delle specie microbiche presenti e dell condizioni di processo.



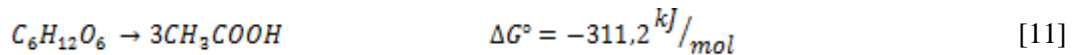
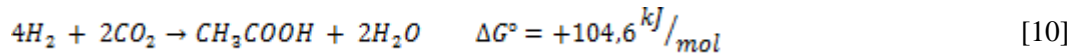
La resa di idrogeno è correlata stechiometricamente con i prodotti metabolici che si ottengono, la massima produzione teorica di idrogeno a partire da substrati organici ricchi di carboidrati è pari a 4 moli di idrogeno per mole di glucosio consumata, nel caso in cui come prodotto di reazione si abbia esclusivamente acido acetico (come evidenziato nella reazione 8; tale resa scende a 2 moli di idrogeno per mole di glucosio nel caso si abbia come prodotto di reazione l'acido butirrico, come illustrato nella reazione 9 (Hawkes et al 2002).



In linea generale le rese di conversione dei glucidi in idrogeno sono comprese tra valori intermedi alle due trasformazioni teoriche sopracitate, o inferiori nel caso in cui i prodotti di reazione siano acido lattico, propionico o alcoli, come l' etanolo o il butanolo (Levin et al 2004)

Al fine di massimizzare la produzione di idrogeno è pertanto necessario che la reazione che comporta la produzione di acetato sia predominante (Angenent et al 2004).

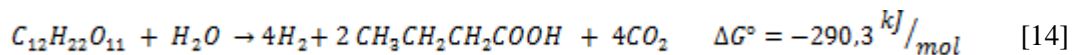
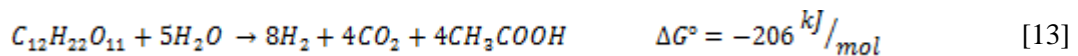
Tuttavia l'accumulo di acetato non è univocamente correlato con una massima produzione di idrogeno: all'interno del consorzio batterico si trovano infatti alcune specie microbiche, alcuni tipi di Clostridia, ad esempio *C. aceticum*, in grado di convertire idrogeno e anidride carbonica in acido acetico e acqua secondo la reazione 10 (Hawkes et al. 2007) o anche direttamente il glucosio in solo acido acetico, reazione 11, sfruttando il processo di omoacetogenesi.



Esistono inoltre altre vie fermentative che portano alla produzione di acido lattico, propionico ed etanolo, associate generalmente ad una produzione di idrogeno inferiore a 2 moli di H<sub>2</sub> per mole di glucosio degradata (Angenent 2004); in particolare la via di produzione di acido propionico porta ad un consumo di idrogeno, come si può vedere nell'equazione 12.



Quando si utilizza invece del glucosio il lattosio, la cui molecola è composta di una di galattosio e una di glucosio, le reazioni che avvengono nel processo di fermentazione portano, nel caso in cui si abbia solo produzione di acido acetico, alla formazione di 8 mol H<sub>2</sub>/mol lattosio consumata e, nel caso in cui si abbia produzione di acido acetico e butirrico, alla formazione di 4 H<sub>2</sub>/mol lattosio consumata, come si può vedere nelle reazioni 13 e 14.



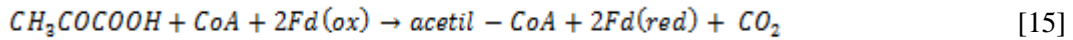
Rispetto alle teoria nella pratica le rese in termini di moli di idrogeno prodotte sono inferiori poiché parte dei carboidrati vengono convertiti in biomassa e oltre all'acido acetico, normalmente, si formano anche acido butirrico, lattico ecc.

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 (Guo, et al., 2010; Hawakes, et al., 2007).

La produzione di idrogeno via dark fermentation è guidata dal metabolismo del piruvato che si forma durante il catabolismo di vari substrati.

La glicolisi è il processo mediante il quale, in condizioni anaerobiche, una molecola di esoso, composta da sei atomi di carbonio, viene scissa in due molecole di piruvato (CH<sub>3</sub>COCOOH), a tre atomi di carbonio.

Il piruvato, prodotto del catabolismo del glucosio, è in seguito convertito ad Acetil Coenzima A, producendo ferredoxina ridotta ed NADH, come illustrato in Figura 16, secondo la reazione 15.



La ferredoxina ridotta e NADH vengono trasformate dai batteri strettamente anaerobi nelle loro forme ridotte  $Fd_{ox}$  e  $NAD^+$ , producendo idrogeno secondo la reazione 16.



Questo processo non avviene ad opera di un solo enzima, bensì di un complesso trienzimatico detto piruvato deidrogenasi.

Le idrogenasi sono proteine eterodimeriche costituite da una subunità piccola (S) e una grande (L); la subunità S contiene tre cluster ferro-zolfo mentre la subunità L contiene il sito attivo.

La idrogeno deidrogenasi  $NAD^+$  e  $NADH^+$  sono gli enzimi in grado di catalizzare le reazioni, 17 e 18.



Queste reazioni sono però sfavorite dal punto di vista termodinamico. Logan et al. (2002) hanno studiato i problemi legati all'inibizione del processo per accumulo di idrogeno nello spazio di testa del reattore, e conseguente innalzamento della pressione parziale. Gli autori, confrontando prove in batch condotte con metodo di rilascio del gas prodotto periodico e continuo, hanno riscontrato una riduzione della produzione di bioidrogeno pari al 43% quando il gas si accumula nello spazio di testa del reattore, causando una sovrappressione massima pari a 254 kPa.

In particolare, la produzione di idrogeno risulta essere termodinamicamente favorevole per valori di pressione parziali  $P_{H_2, max}$  inferiori a

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

Dove  $E_x^{sf}$  è il potenziale redox del donatore di elettroni, ossia la ferredossina ( $E_{Fd}^{sf} = -400 \text{ mV}$ ) o NADH ( $E_{NADH}^{sf} = -320 \text{ mV}$ ),  $F$  è la costante di Faraday,  $R$  e  $T$  sono rispettivamente la costante dei gas ideali e la temperatura assoluta.

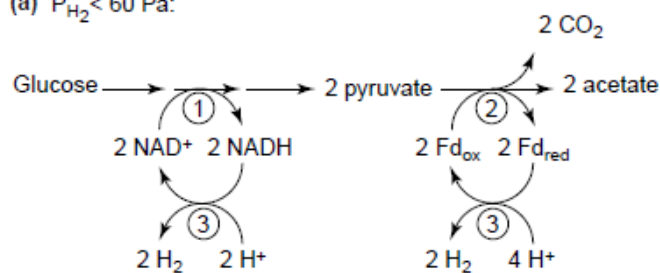


Per la ferredossina, la produzione di idrogeno può continuare sino al raggiungimento di un valore di pressione parziale di circa 0.3 atm ( $3 \times 10^{-4}$  Pa); mentre per NADH, la pressione parziale deve essere inferiore a  $6 \times 10^{-4}$  atm (60 Pa).

Dal punto di vista termodinamico, la reazione che coinvolge NADH è pertanto 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, Figura 1.7 (a).

Tuttavia, la maggior parte della NADH viene probabilmente ossidata secondo altri percorsi fermentativi, come la produzione di butirrato, come illustrato in Figura 1.7 (b).

(a)  $P_{H_2} < 60$  Pa:



(b)  $P_{H_2} > 60$  Pa:

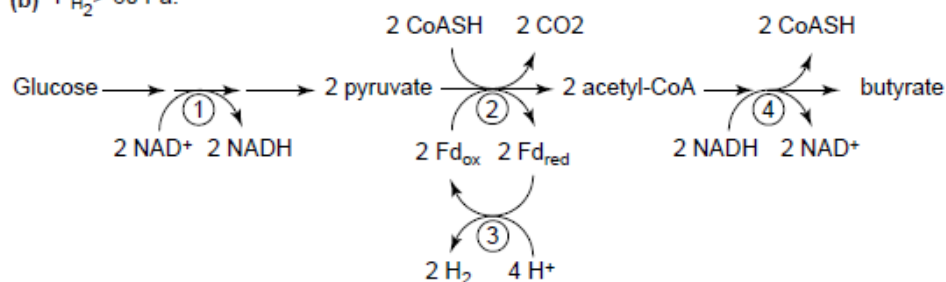


Figura 1.7 Effetto della pressione parziale di idrogeno. (a) Ossidazione di NADH con produzione di idrogeno termodinamicamente favorevole solo quando la pressione parziale di idrogeno è inferiore a 60 Pa; (b) Pressione parziale di idrogeno maggiore, e formazioni d

La produzione di etanolo e butanolo implica uno shift metabolico da produzione acida a produzione di alcoli che avviene in un ambiente riducente in cui la ferredossina non è più in grado di trasferire elettroni alle idrogenasi per la produzione di  $\text{H}_2$ .

La produzione di idrogeno è fondamentalmente dipendente dalla presenza delle idrogenasi poiché è proprio questo enzima in grado di catalizzare la reazione di ossidazione reversibile dell'idrogeno molecolare  $\text{H}_2$ , come illustrato dalle reazioni 19 e 20, dove A è l'accettore di elettroni e D in donatore.

Il consumo di idrogeno è accoppiato alla riduzione di accettori di elettroni, quali ossigeno, nitrato, solfato, anidride carbonica e fumarato; la produzione di idrogeno si ha

invece quando avviene l'ossidazione dei donatori di elettroni, quali ad esempio la ferredoxina.



Basse rese e bassa produttività rappresentano il maggiore ostacolo nella produzione di bioidrogeno; infatti, come già accennato, la produzione mista di acetato e butirato è limitata da rese intorno alle 2 mol H<sub>2</sub>/mol glucosio: la produzione di sottoprodotti di fermentazione ridotti causano la riossidazione del cofattore NADH consumando idrogeno.

Le strade che l'ingegneria genetica può affrontare per aumentare le rese di produzione di idrogeno che possono essere raggiunte dalla biomassa batterica sono essenzialmente due:

- Il miglioramento d'efficienza delle vie metaboliche
- L'introduzione di vie metaboliche estranee al microorganismo

Il risultato è teoricamente ottenibile mediante lo "spegnimento" di quelle vie metaboliche antagoniste alla produzione d'idrogeno oppure incrementando l'espressione omologa della via metabolica che porta alla sua produzione.

Diversi studi hanno posto l'attenzione su *E. coli* poiché il suo genoma è stato completamente sequenziato, è di facile manipolazione ed inoltre è in grado di degradare una buona varietà di zuccheri.

Le modifiche alla via metabolica naturale hanno aumentato le rese di produzione H<sub>2</sub> fino al massimo di 2H<sub>2</sub>/glucosio (Hallenbeck, et al., 2009).

Nella Figura 1.8 sono illustrate le diverse vie metaboliche che vanno inibite per maggiori rese in termini di produzione di H<sub>2</sub>.

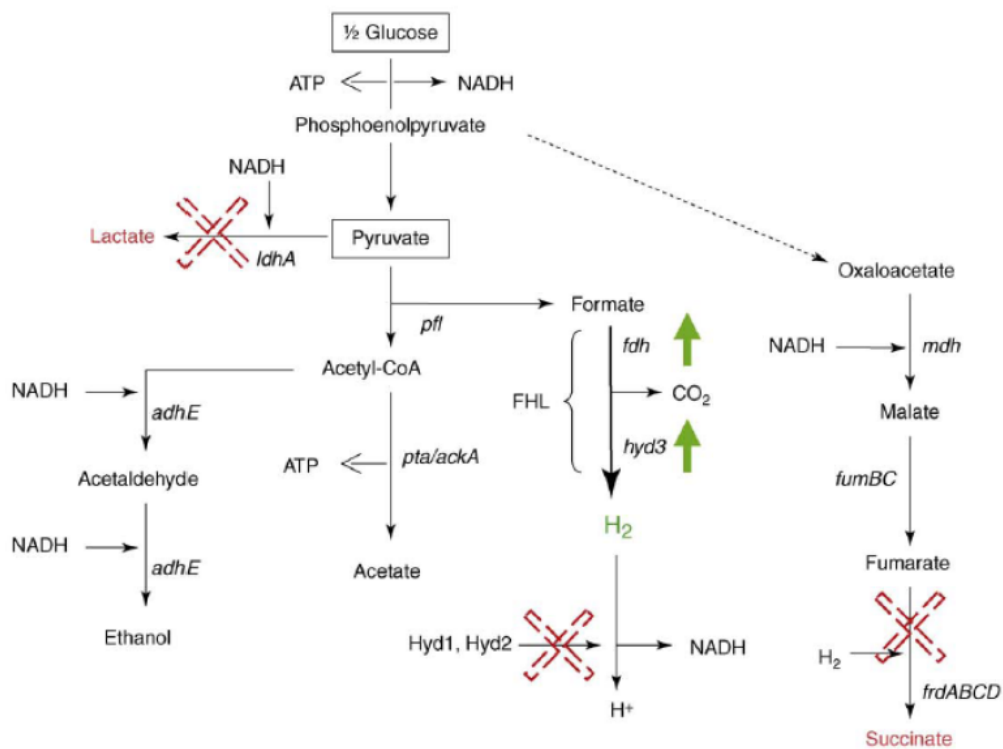


Figura 1.8 Pathways che competono con la produzione di idrogeno, che devono essere bloccati vengono mostrati con le croci rosse. (Hallenbeck et al 2009)

### 1.3.2 Tipologia di inoculo

La resa del processo di dark fermentation è strettamente correlata, oltre che alla tipologia dei prodotti metabolici, alla presenza o meno di microrganismi idrogeno-consumatori (per esempio metanigeni o omoacetogeni). Pertanto è necessario in questo caso, diversamente da come avviene per la digestione anaerobica, selezionare il consorzio batterico di inoculo.

Questo obiettivo può essere raggiunto per due vie: scegliendo ceppi batterici selezionati o pretrattando il fango di inoculo.

Le specie batteriche, appartenenti a gruppi tassonomici e fisiologici differenti, in grado di produrre idrogeno in condizioni anaerobiche da biomassa e rifiuti sono numerose. Tra queste abbiamo generi anaerobi obbligati di *Clostridia* (*C. pasteurianum*, *C. butyricum*, *C. tyrobutyricum*, *C. butylicum*, *C. acetobutylicum*, *C. acidosoli*, *C. beijerinckii*, *C. roseum*, *C. kluyvery*, *C. thermocellum*, *C. thermosuccinogenes*, *C. cellulosi*, *C. thermobutyricum*, *C. thermolacticum*.) e anaerobi facoltativi di *Escherichia Coli*, *Enterobacter* e *Citrobacter*.

Questi ultimi, a seconda o meno della presenza di ossigeno sono in grado di compiere la respirazione aerobica o la fermentazione anaerobica; ciò comporta un notevole vantaggio

poiché nel caso di intrusione di ossigeno nel reattore non si ha inibizione della biomassa batterica, bensì il ripristino delle condizioni anaerobiche. Tuttavia queste specie risultano avere rese in termini di produzione di idrogeno, inferiori a quelle dei batteri anaerobi obbligati, per i quali però, la presenza di ossigeno risulta estremamente tossica.

Fang et al (2002) hanno analizzato la comunità microbica presente in un reattore CSTR mantenuto a pH 5,5, tempo di ritenzione idraulica 6,6 giorni, inoculato con fango di provenienza civile e alimentato a glucosio. Lo studio ha portato ai seguenti risultati: nel reattore è stato trovato che il 64,4% delle specie presenti appartenevano alla famiglia delle Clostridiaceae, con in prevalenza (12,8%) *C. cellulosi*, e a seguire (8,3%) *C. acetobutylicum* e (8,3%) *C. tyrobutyricum*.

Nello stesso studio è stato in seguito variato il tempo di ritenzione idraulica; con un HRT di 10 giorni nel reattore sono stati ritrovati ancora solo batteri afferenti alla famiglia delle *Clostridiaceae*, batteri anaerobi obbligati, operando ad un HRT di 30 giorni, invece, la popolazione era più differenziata, includendo le famiglie *Bacillaceae* ed *Enterbacteriaceae*.

Un'alternativa all'uso di ceppi batterici selezionati, è l'utilizzo di colture microbiche miste, pretrattate termicamente, ad alte temperature, o a pH estremi; il pretrattamento consente infatti di sfruttare la proprietà di alcuni batteri di generare spore se sottoposti a condizioni estreme, e di selezionare dunque all'interno del consorzio microbico solo queste specie, eliminando i batteri metanigeni che, invece, non sono sporigeni. Lin e Chou (2004) hanno studiato, per la produzione di idrogeno il pretrattamento acido di un fango di origine civile, portato a pH 3-4 con HCl per 24 ore; in uno studio successivo (2006) gli stessi autori suggeriscono il trattamento basico con soda 1M per 24 ore.

Il pretrattamento termico, più comune a scala di laboratorio, è infatti tecnicamente di più difficile uso in applicazioni a piena scala (Hawkes 2006), in ogni caso è opportuno valutare caso per caso il pretrattamento più idoneo.

Dallo studio di Chong et al (2009) è risultato come l'utilizzo di colture miste possa portare a rese maggiori (in termini di molH<sub>2</sub> prodotto/mol glucosio consumato), tuttavia c'è il rischio che sopravvivano dei batteri idrogeno consumatori in grado di abbassare le rese di produzione, o addirittura di produrre metano.

Nel processo di Dark Fermentation risulta pertanto molto importante la scelta dell'inoculo, poiché, a parità di condizioni ambientali si possono ottenere rese molto diverse, ma non è detto che i batteri con le rese migliori vadano scelti per ogni implementazione del processo poiché solitamente sono anche quelli più soggetti ad inibizioni da ossigeno.

### 1.3.3 Parametri di processo

Come già descritto in precedenza, la dark fermentation è un processo fortemente condizionato dalla biomassa presente e dalle vie metaboliche che vengono utilizzate dalla stessa nella degradazione del substrato alimentato.

Influenzano però il processo dal punto di vista chimico-fisico parametri operativi quali la temperatura, il pH, la pressione parziale dell'idrogeno all'interno del reattore, il tempo di residenza idraulico o il tempo di residenza cellulare (nel caso di reattori a membrana) e la quantità di sostanza organica alimentata al reattore.

La temperatura costituisce uno dei principali parametri di selezione della biomassa; nello studio di Iyer et al (2004) gli autori riportano uno shift della popolazione microbica nel passaggio dalla temperatura di 30°C a quella di 37°C da una popolazione prevalentemente costituita da *C. Acidisoli* ad una prevalente di *C. acetobutylicum*. Oltre alla selezione della biomassa, la temperatura assume un ruolo sempre di primo piano nei processi microbiologici, poiché influenza diversi aspetti del processo, come già descritto nel caso della digestione anaerobica.

Anche il pH, come la temperatura, è un parametro di importanza cruciale nei processi biologici; nel caso della dark fermentation il pH influisce sui percorsi metabolici che i batteri “scelgono” nella degradazione della sostanza organica, portando alla formazione di metaboliti differenti e differenti rese di produzione di idrogeno. Il pH durante il processo di dark fermentation va idealmente mantenuto tra 5 e 6 (Bičakova e Straka, 2012) e a questo scopo è solitamente previsto il monitoraggio del pH all'interno del reattore e la possibilità di aggiungere soluzioni acide o basiche per correggere possibili anomalie.

Nella Tabella 1.7 (Sinha P. and Pandey A. 2011) sono presentati i vari intervalli di pH studiati per diverse colture, pure e miste, e i corrispondenti valori ottimali in relazione alle rese in termini di idrogeno prodotto per mole di substrato consumato o g di COD rimosso.

Tabella 1.7 (Sinha P. and Pandey A. 2011) Effetto del pH sulla produzione di bioidrogeno per via fermentativa

Inoculo	Substrato	pH		Y	
		Range studiato	pH ottimo		
Compost	saccarosio	4,5-6,5	4,5	214	ml/gCOD
Fango Anaerobico	amido	5,0-7,0	5	1,1	mol/mol esoso
<i>Clostridium Butyricum</i> CGS5	saccarosio	5,0-6,5	5,5	2,78	mol/mol saccarosio
Fango attivo	reflui industria alimentare	4,0-8,5	6	4,71	mmol/gCOD
<i>Thermoanaerobacterium</i> <i>thermosaccharolyticum</i> PSU-2	saccarosio	4,0-8,5	6,2	2,53	mol/mol esoso
<i>Citrobacter Y-19</i>	glucosio	4,0-9,0	7	11,7	mmol/g cell
<i>Citrobacter CDN-1</i>	glucosio	4,5-6,5	5	2,1	mol/mol glucosio
<i>Enterobacter clocae IIT-BT-08</i>	saccarosio	4,5-7,5	6	6	mol/mol glucosio
Ceppi misti	saccarosio	3,4-6,3	4,2	1,61	mol/mol glucosio
Fango Anaerobico	rice slurry	4,0-7,0	4,5	346	ml/g amido

La pressione parziale dell'idrogeno ( $p_{H_2}$ ) un è un fattore estremamente importante poiché la produzione di idrogeno viene inibita dall'accumulo dei prodotti di reazione; quando la pressione parziale sale, il metabolismo devia verso la produzione di lattato, etanolo, acetone e alanina (Levin et al 2004). Con l'aumento della temperatura il sistema risulta più inibito dalla presenza di  $H_2$  a 60°C la pressione per un corretto sviluppo di  $H_2$  la  $p_{H_2}$  deve risultare inferiore ai 50 kPa (Lee et al 1988), a 70°C inferiore a 20 kPa (Van Niel et al 2002) e a 98°C inferiore a 2 kPa (Adams 1990).

Il tempo di residenza idraulico (HRT), o cellulare (SRT) nel caso di reattori anaerobici in cui vi si trovi accoppiato l'uso di membrane, può essere visto come un ulteriore parametro di selezione della biomassa all'interno del reattore, poiché si è ingegneristicamente in grado di sfruttare le diverse velocità di crescita della biomassa idrolitica e acidogena, e di quella metanigena. Quest'ultima è infatti caratterizzata da velocità 4 volte inferiori rispetto ai batteri idrogenogeni; una così marcata differenza delle velocità di crescita può quindi essere sfruttata per la selezione del processo, prestando attenzione a che l'HRT o SRT del sistema sia però maggiore del tasso di crescita specifico della biomassa che produce idrogeno onde evitarne il wash out (Kongjan et al 2010).

Naturalmente, oltre ai parametri di processo sopraelencati, la concentrazione del substrato in alimento è di fondamentale importanza per valutare le rese del processo. Come varia la produzione di idrogeno al variare della concentrazione del substrato in alimento è uno temi più affrontati in letteratura.

Nello studio di Van Ginkel et al. (2005) gli autori studiano le rese in termini di H<sub>2</sub> prodotto per mole di substrato consumato alimentando un reattore CSTR a temperatura fissa pari a 30°C e pH 5,5. Nel reattore viene fatta variare la concentrazioni del glucosio alimentato tra i 2,5 e i 10 gCOD/L ed il tempo di ritenzione idraulica HRT tra 1 e 10 ore. Gli autori di questo studio hanno osservato un rendimento crescente per concentrazioni di glucosio decrescenti (facendo decrescere l'organic loading rate da da 18,9 a 0,5 g glucosio/h la resa di idrogeno è cresciuta da 1,7 a 2,8 molH<sub>2</sub>/mol glucosio consumato), al contrario dell'HRT che sembra avere un'influenza ridotta sulla resa del sistema. Le rese in termini di COD rimosso risultano sempre superiori al 90% e superiori al 97% quando il glucosio è alimentato in concentrazione 2,5 gCOD/L. Al contrario degli studi precedenti (Lin e Chang 1999; Majizat ei al 1997) dove erano considerate concentrazioni di glucosio in alimento molto superiori, Van Ginkel et al (2005) pertanto suggeriscono HRT del sistema possibilmente bassi e concentrazioni di substrato alimentato il più basse possibile. Questi risultati sono confermati anche dallo studio di Kyazze et al (2005) dove viene alimentato un reattore CSTR a temperatura costante di 35°C e pH controllato tra 5,2 e 5,3 con concentrazioni di saccarosio pari a 10, 20, 40 e 50 g/L e si riscontra una diminuzione della resa di idrogeno all'aumentare del carico in ingresso (da 1,7 mol H<sub>2</sub>/mol saccarosio consumato per concentrazioni del substrato pari a 10 g/L a 0,8 mol H<sub>2</sub>/mol saccarosio consumato per concentrazioni di 50 g/L).

Nonostante non siano stati adottati gli stessi parametri di processo e substrati in alimento, si può riscontrare in entrambi gli studi come alte concentrazioni di substrato alimentato portino ad un sovraccarico del sistema con conseguente decrescita delle rese ed instabilità del processo.

#### 1.3.4 Configurazione DA+DF in letteratura

A causa della incompleta conversione a H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> il processo di dark fermentation monostadio non è sostenibile in un impianto a larga scala, mentre costituisce un primo step vantaggioso all'interno di un processo a due stadi.

A seguire la DF si possono collocare processi in grado di trasformare gli acidi grassi prodotti: la photo fermentation, pile a combustibile microbiologiche o la digestione anaerobica.

Fang et al (2006) hanno condotto il primo studio sfruttando questa la configurazione dark fermentation + photo fermentation per convertire acido acetico e butirrico in  $H_2$  usando biomassa fotofermentativa: un doppio stadio così configurato è in grado di incrementare la resa molare teorica da 4 a 12 mol  $H_2$ /mol esoso consumato; gli studi di questa configurazione sono però ancora agli albori.

Le pile a combustibile microbiologiche (*MFC Microbial Fuel Cell*) sono sistemi bio-elettrochimici che utilizzano l'acido acetico e butirrico prodotti in DF per la generazione di corrente.

Tuttavia più frequentemente la dark fermentation è seguita da un digestore anaerobico: il sistema così si configura come un digestore anaerobico a fasi separate, dove si ha, pertanto, un primo reattore dove avviene la fase acidogenica ed un secondo dove avviene quella metanogenica.

Il digestore anaerobico doppia fase è stato molto studiato, ma spesso solo dal punto di vista dell'ottimizzazione della fase acidogenica e non da quello della resa di idrogeno, tuttavia esistono alcuni studi recenti, in letteratura, focalizzati sul doppio stadio DF+DA.

Kyazze et al (2006) hanno condotto uno studio sulla configurazione doppio stadio analizzando il processo nel suo complesso. Lo studio è stato condotto alimentando a saccarosio (in concentrazione variabile tra i 10 e i 30 g/L) un primo reattore CSTR ( $T=35^\circ C$ , pH controllato tra 5,2 e 5,3, SRT=12 ore) per la produzione di idrogeno, inoculato con biomassa proveniente da un impianto di trattamento di reflui civili pretrattata termicamente, seguito da un digestore ad alto carico UASB. Gli autori hanno ottenuto alimentando alla concentrazione di 10 g/L le maggiori rese di idrogeno e di metano (1,62 mol $H_2$ /mol esoso alimentato e a 323 mL $CH_4$ /g COD alimentato).

Anche Venetsaneas et al (2009) hanno studiato la configurazione del doppio stadio dark fermentation seguita dal digestore anaerobico valutando la potenziale produzione di idrogeno e di metano in una configurazione composta da un reattore CSTR alimentato a siero di latte operante in condizioni mesofile ( $35^\circ C$ ), con un HRT pari a 24 h per la produzione di idrogeno e da un reattore PABR nelle stesse condizioni di temperatura e a tre condizioni diverse di HRT (20, 10 e 4,4 giorni) per la produzione di metano. In questo caso il reattore non è stato inoculato ma è stata sfruttata la biomassa già presente nel siero di latte; le rese osservate sono pari a 0,9 mol  $H_2$  prodotto/mol di glucosio consumato corrispondenti a 24,85 kJ/L di siero di latte alimentato; nella seguente fase di digestione anaerobica i massimi valori riportati sono di 22,23 L  $CH_4$ /L influente, con un contenuto di metano nel biogas variabile tra il 71,4 e il 74,9% contestualmente ad una rimozione del COD mediamente pari al 95.3%.



### 1.3.5 DF siero di latte

Il siero di latte, come già descritto in precedenza, costituisce un abbondante refluo dell'industria casearia, e, per questo motivo, è stato indagato come possibile alimento sia di classici digestori anaerobici che di reattori per la produzione di idrogeno.

Nel caso della fermentazione al buio di siero di latte e rese di  $H_2$  vengono solitamente riferite alle moli di lattosio consumato, e confrontate con la resa teorica di  $4\text{mol}H_2/\text{mol}$  lattosio, ottenibile quando i sottoprodotti sono principalmente acido acetico e butirrico, in rapporto 1:1.

Nello studio di Davila-Vasquez et al (2008), volto a confrontare le rese di produzione dello stesso reattore, inoculato con fango anaerobico granulare pretrattato termicamente, per la digestione di lattosio, siero di latte in polvere e glucosio, gli autori riscontrano produzioni pari a  $3,6\text{ mol}H_2/\text{mol}$  lattosio alimentato,  $3,1\text{ mol}H_2/\text{mol}$  siero di latte in polvere alimentato e di  $1,46\text{ mol}H_2/\text{mol}$  glucosio alimentato.

Circa gli stessi risultati sono ottenuti da Teli et al (2014); questo studio viene condotto su 15 prove in batch, il substrato viene alimentato a concentrazione variabile aggiungendo una soluzione tampone di MES (ethanesulfonic acid monohydrate) per mantenere il pH stabilmente intorno a 5-5,5 ; le maggiori rese di produzione di idrogeno, tra 2,8 e  $3,6\text{ mol}H_2/\text{mol}$  lattosio consumato, sono ottenute alimentando il substrato in un range di concentrazione che varia tra i 9 i  $15\text{ g}_{\text{COD}}/\text{L}$ ; il rapporto tra acido acetico e butirrico nel mixed liquor a fine prova è di circa 1:1 e il contenuto di  $H_2$  nel biogas è di circa il 47%.

Anche lo studio di Davila-Vasquez et al. (2009) conferma la stessa resa in termini di  $\text{mol}H_2/\text{mol}$  lattosio consumato. Alimentando un reattore UASB con siero di latte ad un OLR pari a  $138,6\text{ g lattosio}/(\text{Ld})$  gli autori ottengono una resa di  $2,8\text{ mol}H_2/\text{mol}$  lattosio consumato.

Le specie batteriche presenti all'interno del reattore vengono analizzate dagli autori, al variare dell'SRT del sistema: per tempi di residenza tra le 6 e le 10 ore viene rilevata una predominanza netta della specie dei Clostridia, quando invece si scende verso le 4 ore questa popolazione non riesce a crescere e nel reattore si trovano principalmente Streptococchi.

Ferchichi et al. (2005) hanno invece analizzato l'influenza del pH sulla resa di produzione di  $H_2$  da siero di latte per mezzo di un ceppo batterico selezionato, il *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*. Questo ceppo è stato scelto dagli autori per l'ampio range di zuccheri che può digerire, tra cui il lattosio, lo zucchero di cui è principalmente composto il siero di latte. Questo studio conferma un picco nella produzione ad un pH pari a 6 e la successiva decrescita della resa all'aumentare del pH.

Nella Tabella 1.8 (da Collet et al. 2004) sono riassunte le rese di H<sub>2</sub> di diverse specie di Clostridium, termofile e mesofile, nella digestione di glucosio o lattosio.

Tabella 1.8 Resa di idrogeno per diverse specie di Clostridium

<b>Microrganismo</b>	<b>Substrato</b>	<b>Resa H<sub>2</sub></b> <i>mol/mol</i>
<b>Specie termofile</b>		
<i>C. thermolacticum</i>	lattosio	1,5
<i>C. thermoalcaliphilum</i>	glucosio	1,6
<i>C. thermobutyricum</i>	glucosio	1,9
<i>C. thermohydrosulfuricum</i>	glucosio	0,55
<i>C. thermosaccharolyticum</i>	glucosio	1,72 (pH 5,4)
	glucosio	1,22 (pH 7,0)
<i>C. thermosuccinogenes</i>	glucosio	0,25
<i>C. thermosulfurigenes</i>	glucosio	0,95
<b>Specie mesofile</b>		
<i>C. acetobutylicum</i>	glucosio	1,97
	glicerolo-glucosio	0,42
<i>C. butyricum</i>	glucosio	-
	glucosio-polipeptone	1,4-2,0
<i>C. paraputrificum M-21</i>	glucosio	1,4
	acetilglucosammina	2,4
<i>C. beijerincki AM21B</i>	glucosio	1,8-2,0
<i>C. cellobioparum</i>	glucosio	2,73
<i>C. pasterianum</i>	glucosio	1,5
<i>Clostridium sp.</i>	glucosio	0,85

## Capitolo 2 – Materiali e metodi

In questo capitolo verranno riportate le indicazioni relative alle procedure operative, ai metodi di analisi, ai materiali e alle attrezzature utilizzate.

L'attività sperimentale è stata condotta in vista dell'avvio dell'impianto a scala pilota installato presso PLAC (nell'ambito del progetto ECO-SI) descritto approfonditamente nel paragrafo 2.3.2.

Nel paragrafo 2.4.1 sono illustrate le prove di BMP condotte su siero di latte e sul permeato di un reattore a scala pilota, installato presso il laboratorio DICA del Politecnico di Milano

Nel paragrafo 2.4.2 sono illustrate le prove di BHP per il confronto tra le rese di produzione di idrogeno di ceppi batterici selezionati e di un fango pretrattato termicamente.

Nel paragrafo 2.4.3 sono esposte le prove di SMA effettuate sia per la scelta del fango di inoculo del digestore anaerobico presso PLAC, sia per il monitoraggio del carico alimentabile nella fase di avvio di suddetto digestore.

### 2.1 Pianificazione dell'attività sperimentale

Le prove sperimentali svolte in laboratorio sono state finalizzate alla scelta delle condizioni di avvio dell'impianto, relativamente alle due filiere di trattamento rappresentate in Figura 2.1: quella completa (A), costituita da un'unità di ultrafiltrazione del siero, un'unità di dark fermentation (DF) per la produzione di bioidrogeno ed una di digestione anaerobica per la produzione di biometano, e quella "di avvio" in cui il processo di dark fermentation viene bypassato (B).

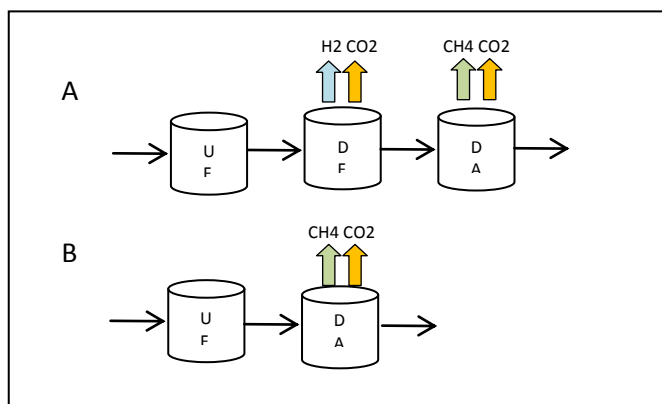


Figura 2.1 Filiera A Doppio stadio (DF+DA) Filiera B monostadio (DA)

Le prove di BHP sono svolte per valutare le rese di produzione di idrogeno e le possibilità di inoculo del reattore di dark fermentation. A tal proposito sono state testate le rese di ceppi selezionati, nel caso di inoculo del singolo ceppo o di varie combinazioni, e quelle della biomassa selezionata tramite pretrattamento del fango.

Per la scelta dell'inoculo del reattore di digestione anaerobica è invece stata valutata l'attività metanogenica specifica di due fanghi provenienti da impianti di trattamenti differenti: il primo proveniente da un digestore di reflui suini e acque di lavorazione del caseificio, il secondo da un digestore ad alto carico (IC) di reflui di cartiera. In seguito, grazie alla messa a punto di una semplificazione del modello ADM1, è stata simulata la prova di SMA e ricavata la % di biomassa attiva presente nel fango.

La valutazione, a scala di laboratorio, delle rese teoriche delle filiere A e B è stata svolta eseguendo in parallelo una prova di BMP su siero di latte ed una sul permeato di un reattore MBR di dark fermentation installato presso il laboratorio del DICA del Politecnico di Milano. In questo reattore avviene il processo di dark fermentation operante in continuo, pertanto il permeato che è stato prelevato ed utilizzato come matrice di alimento per la prova di BMP ha caratteristiche simili (in termini di concentrazione di acidi grassi volatili, pH e rimozione del COD avvenuta nello stadio di DF) e a quello che si potrebbe ottenere una volta avviato lo stadio di DF del pilota ECO-SI.

Dalla prova di BMP si ricavano le rese del processo di digestione anaerobica per entrambe le filiere; la resa complessiva (in termini di biogas prodotto) della filiera A è stata poi valutata considerando tre possibili rese (ottenute dalle prove di BHP) dello stadio di dark fermentation.

Una volta avviato l'impianto ECO-SI, secondo la filiera di trattamento B, è stato seguito il monitoraggio della fase di avvio, focalizzato sulla crescita della percentuale di biomassa attiva, valutata mediante prove di SMA eseguite con cadenza settimanale, sulla rimozione del COD e sul controllo del rapporto tra acidi grassi volatili ed alcalinità all'interno del digestore. Inoltre, sempre a seconda della crescita della percentuale di biomassa attiva nel fango, è stato valutato, in fase di preparazione del carico da alimentare al digestore, il fattore di diluizione in modo da garantire un carico in ingresso in ragione della capacità degradativa complessiva.

## 2.2 Matrici e soluzioni

### 2.2.1 Siero di latte

Il siero di latte utilizzato per le prove di BMP (Figura 2.2) proviene dal caseificio PLAC, che produce Grana Padano, Provolone e burro.



Figura 2.2 Campione di siero di latte del caseificio PLAC

Il caseificio presenta al suo interno un'unità di ultrafiltrazione per il recupero delle sieroproteine.

Per le prove in laboratorio è stato utilizzato il siero deproteinizzato, prelevato da PLAC e conservato in frigorifero alla temperatura di 4°C.

Le caratteristiche del siero utilizzato sono riassunte in Tabella 2.1

Tabella 2.1 Caratteristiche del siero di latte del caseificio PLAC ultrafiltrato

Parametro	unità di misura	valore
<b>Nutrienti</b>		
COD <sub>tot</sub> (k)	gO <sub>2</sub> /L	62,5
TOC	mgC/L	
Fosforo totale (k)	mgP/L	422
Fosfati (k)	mgP/L	342
N <sub>tot</sub> (k)	mgN/L	217
Alcalinità (pot)	mgCaCO <sub>3</sub> /L	872,5

<b>Metalli totali</b>		
Magnesio (AA)	<i>mg/L</i>	66
Calcio (ICP-MS)	<i>mg/L</i>	291
Sodio (ICP-MS)	<i>mg/L</i>	381
Potassio (ICP-MS)	<i>mg/L</i>	
Litio (ICP-MS)	<i>µg/L</i>	<0,1
Ferro (ICP-MS)	<i>µg/L</i>	<0,05
Manganese (ICP-MS)	<i>µg/L</i>	5,7
Rame (ICP-MS)	<i>mg/L</i>	0,07
Zinco (ICP-MS)	<i>mg/L</i>	<0,3
Nichel (ICP-MS)	<i>µg/L</i>	5,5
Selenio (ICP-MS)	<i>µg/L</i>	1,2
Solfati (IC)	<i>mg/L</i>	117
Solfiti (IC)	<i>mg/L</i>	<0,5
Cloruri (IC)	<i>mg/L</i>	945

Per lo svolgimento di alcune prove è stato utilizzato come alimento il siero di latte proveniente dall'unità di ultrafiltrazione del caseificio, deproteinizzato e concentrato; il suo COD iniziale è pertanto più elevato, e pari a 150 g/L.

Il siero in alimento all'impianto pilota ECO-SI ha invece caratteristiche differenti: proviene dall'unità di ultrafiltrazione installata per l'impianto stesso e, prima di essere alimentato al reattore, viene diluito in ragione della complessiva capacità degradativa del sistema.

Durante l'avvio dell'impianto la diluizione è stata variata di giorno in giorno, come è illustrato nel paragrafo 2.5 relativo al monitoraggio dell'avvio dell'impianto pilota.

### 2.2.2 Biomassa di inoculo

Nelle prove svolte durante tutta l'attività sperimentale, sono state utilizzate biomasse differenti, Tabella 2.2 sono illustrate le diverse tipologie di inoculo valutate per ogni prova.

Tabella 2.2 Biomassa utilizzata per ciascuna prova

	Ceppi puri selezionati da UCSC	Fango pretrattato termicamente	Digestato impianto di trattamento reflui suini e caseari	Digestato reflui di cartiera	Fango digestore ECO-SI
BHP	X	X			
BMP				X	
SMA per la scelta dell'inoculo al digestore ECO-SI			X	X	
SMA monitoraggio fase di avvio					X

Di seguito sono illustrate le peculiarità di ciascuna biomassa utilizzata durante le prove

### Digestati utilizzati per le prove di BMP SMA

Il digestato in Figura 2.3 proviene dalla Cartiera Giorgione (Castelfranco Veneto, TV), che dispone di un impianto di trattamento dei reflui prodotti in situ.

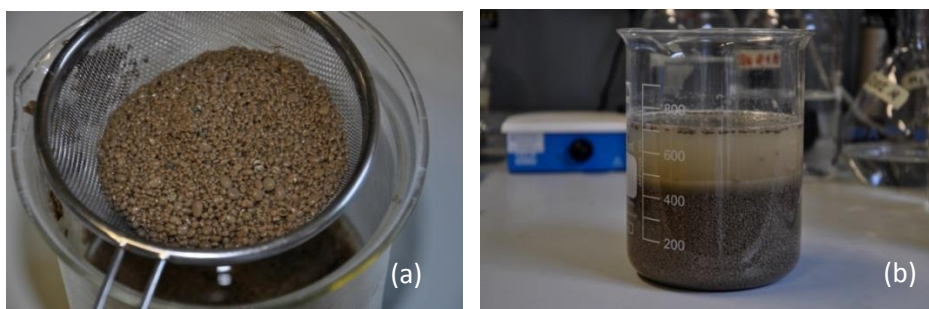


Figura 2.3 Campione di fango granulare proveniente dalla Cartiera Giorgione

L'impianto di trattamento installato presso la Cartiera Giorgione è costituito da un reattore ad alto carico IC (*Internal Circulation*), dove la biomassa è selezionata in base alla capacità di formare granuli solidi e compatti, come si può vedere in Figura 2.3 (a), che non sfuggono con l'effluente, garantendo alti SRT.

Le condizioni relative al funzionamento del digestore sono le seguenti:

- COD in ingresso al digestore: variabile tra i 3200 e i 3800 mg/L
- BOD<sub>5</sub> in uscita pari a 500 mg/L
- SST: tra 150 e 180 ppm
- pH mantenuto tra 6,8 e 7,2
- portata in alimento: circa 100 m<sup>3</sup>/h
- volume occupato da fango: circa 3 m<sup>3</sup>

Il fango granulare, prelevato presso la Cartiera Giorgione, è stato caratterizzato in laboratorio per quanto riguarda ST ed SV, riferendo questi parametri alla massa di

campione tal quale sgocciolato, poiché il fango granulare è caratterizzato da un'elevata velocità di sedimentazione: come si può osservare in Figura 2.3(b) il campione non è omogeneo, si riconoscono infatti, già dopo pochi secondi, due zone, una liquida priva di granuli, ed una densa, ad alta concentrazione batterica. Le caratteristiche di questo fango sono illustrate in Tabella 2.3

Tabella 2.3 Caratteristiche del fango granulare proveniente dalla Cartiera Giorgione

	<i>g/kg TQ sgocciolato</i>
<b>ST</b>	101,78
<b>SV</b>	96,93
<b>SV/ST</b>	95,24%

Il fango proveniente dalla Cartiera Giorgione è stato utilizzato come inoculo nelle prove di BMP sul siero di latte e sul permeato del reattore MBR di dark fermentation.

Per effettuare la scelta dell'inoculo del digestore anaerobico ECO-SI sono stati confrontati dal punto di vista dell'attività della biomassa il digestato di Cartiera Giorgione ed un digestato proveniente dall'impianto di trattamento dove attualmente vengono trattati i reflui caseari di PLAC uniti a reflui suinicoli provenienti da aziende zootecniche circostanti

Quest'ultimo è alimentato con i reflui suinicoli provenienti da aziende zootecniche circostanti; le caratteristiche di questo fango sono illustrate in Tabella 2.4

Tabella 2.4 Caratteristiche del digestato proveniente dall'impianto di trattamento dei reflui del caseificio PLAC

	<i>g/L</i>
<b>ST</b>	31,89
<b>SV</b>	22,24
<b>SV/ST</b>	69,74%

Nel paragrafo 2.4.3 vengono descritte le prove di *Specific Methanogenic Activity* (SMA) effettuate per confrontare i due campioni per la scelta dell'inoculo dell'impianto pilote ECO-SI.

**Biomasse utilizzate per le prove di BHP: ceppi batterici selezionati e fango pretrattato termicamente**

Per valutare l'inoculo del reattore di dark fermentation, sono state valutate le rese di ceppi batterici puri selezionati dal centro di ricerche biotecnologiche dell'Università Cattolica e quelle di una coltura mista selezionata grazie al pretrattamento termico del fango.



Per le prove di BHP con colture pure sono stati utilizzati i seguenti quattro differenti ceppi batterici del genere *Clostridium*, utilizzati nelle bottiglie di prova singolarmente o in mix:

- *C. Acetobutylicum DSM 792*
- *C. Butyricu*
- *C. Tyrobutyrricum*
- *C. Acetobutylicum Mu56*

Tutti i batteri utilizzati appartengono alla famiglia delle Clostridiaceae; i *Clostridium Acetobutylicum* e *Butyricum* testati sono i type strain, di tali microrganismi.

Il type strain è generalmente il ceppo microbico di riferimento, quello più studiato e caratterizzato, che serve come riferimento per la classificazione ed identificazione tassonomica di altri ceppi microbici a lui simili per caratteristiche genetiche e fenotipiche.

I *C. Acetobutylicum* e *Butyricum* sono in grado di degradare il lattosio, la cui idrolisi è intracellulare, e seguono metabolismi preferenziali per la produzione di acido acetico e butirrico; la produzione di butanolo ed acetone è generalmente limitata.

Il *Clostridium Tyrobutyrricum*, a differenza degli altri due, non possiede l'enzima in grado di catalizzare la reazione di idrolisi del lattosio, ma è comunque in grado di degradare glucosio ed acido lattico: per questa ragione in questo studio, dove è stata valutata la degradazione di siero di latte UF, non è mai stato testato singolarmente.

Poiché in letteratura il *C. Tyrobutyrricum* è caratterizzato da rese di produzione di idrogeno, nella degradazione del glucosio, maggiori rispetto agli altri ceppi, è stato valutato se in associazione sintropica con gli altri ceppi fosse in grado di migliorarne le rese.

Inoltre, il *C. Tyrobutyrricum* non produce né butanolo né acetone, ed è caratterizzato da prodotti metabolici quali prevalentemente acido acetico e butirrico.

Il ceppo Mu56 è un mutante spontaneo ricavato dal type strain 792; essendo stato privato del megaplasmide che contiene i geni responsabili della produzione di butanolo ed acetone (Oh et al 2009, Nolling 2001) non è in grado di produrlo.

A differenza dei classici inoculi con digestato, l'inoculo di tali batteri non è caratterizzato grazie a misure di solidi totali e volatili; la concentrazione dei microrganismi nell'inoculo è stata valutata dal laboratorio che ne ha effettuato la selezione tramite la misura della densità ottica e valutazione delle Unità formanti colonie, utilizzando come terreno di crescita il terreno RCM (Reinforced *Clostridium* Medium) a 37°C in cappa anaerobica.

Poiché i microrganismi batterici descritti sono estremamente sensibili alla presenza di ossigeno (Basei 2013), sono state valutate le rese di produzione di idrogeno anche del fango prelevato dal reattore di DA dell'impianto pilota, dove la biomassa è stata selezionata grazie ad un pretrattamento termico.

Il pretrattamento consiste nel riscaldamento del fango su piastra: il campione viene mantenuto alla temperatura di 90°C per circa 45 minuti.

Con il pre-trattamento termico si opera la selezione dei batteri non sporigeni: una volta eliminati tramite l'innalzamento della temperatura gli organismi batterici che non sono in grado di produrre spore non si ritrovano più nel fango.

Questo procedimento consente pertanto di eliminare la biomassa metanigena dal consorzio batterico poiché non in grado di produrre spore.

Durante il pretrattamento termico si verifica anche un'evaporazione parziale dell'acqua contenuta nel fango, che viene ri-caratterizzato in seguito.

Le prove BHP con biomassa pre-trattata termicamente sono state svolte in due momenti differenti, rispettivamente dopo due settimane e un mese dall'avvio del reattore di digestione anaerobica ECO-SI.

La caratterizzazione del fango pretrattato è illustrata in Tabella 2.5.

*Tabella 2.5 Caratteristiche del fango pretrattato termicamente*

	<b>ST</b>	<b>SV</b>	<b>SV/ST</b>
prova 1	20,95	18,75	89,50%
prova 2	11,16	9,85	88,26%

### 2.2.3 Soluzione di macronutrienti

La soluzione di macro-nutrienti utilizzata per le prove di BMP è stata preparata seguendo la metodica OECD, con i reagenti e le relative quantità riportate in Tabella 2.6.

*Tabella 2.6 Composizione della soluzione di macronutrienti*

Diidrogenofosfato di potassio anidro	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	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	$\text{NH}_4\text{Cl}$	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

## 2.2.4 Soluzione tampone

Onde evitare di raggiungere pH troppo acidi durante le prove di BHP, al volume iniziale è stata aggiunta una soluzione di MES ( $C_6H_{12}NNaO_4S$ ), acido 2-(N-morfolino)-etansulfonico.

Il MES è un tampone organico, poco tossico per le cellule, ed impiegato in un intervallo di pH tra 5,5 e 6,7.

La sua costante di dissociazione acida è pari a 6,1 alla temperatura di 25°C.

Durante le prove di BHP è stata inserita una quantità di MES tale da mantenere il rapporto gMES/gCOD intorno al valore ottimale di 1,3, valore ottenuto da studi precedenti (Teli et al, 2014)

## 2.2.5 Soluzione di acetato di sodio

La soluzione di acetato di sodio è stata preparata ed usata per le prove di SMA (*Specific Methanogenic Activity*), nell'ambito delle quali viene usata come substrato per caratterizzare l'attività metanogenica specifica, misurata in mLCH<sub>4</sub> prodotto nell'unità di tempo, per unità di SV dell'inoculo (gCOD/gSV/d).

La soluzione di acetato di sodio è stata preparata in modo tale da ottenere una soluzione con un COD pari a 10 g/L; il COD della soluzione è stato verificato per ogni prova con i kit per la determinazione del COD solubile.

## 2.3 Strumentazione

### 2.3.1 AMPTS (Automatic Methane Potential Test System)

L'AMPTS (Automatic Methane Potential Test System) è uno strumento che permette di determinare in modo semplice il BMP di una matrice organica e di osservare nel tempo l'andamento della degradazione.

La quantificazione del gas prodotto avviene per via volumetrica; in questo modo si misura direttamente il volume di gas prodotto in reattori mantenuti a pressione costante (ambiente).

La strumentazione AMPTS Bioprocess Control è costituita da quindici digestori in miniatura, ognuno della capacità di mezzo litro, completamente miscelati per mezzo di un agitatore meccanico e mantenuti a temperatura costante, grazie ad un bagno termostatico.

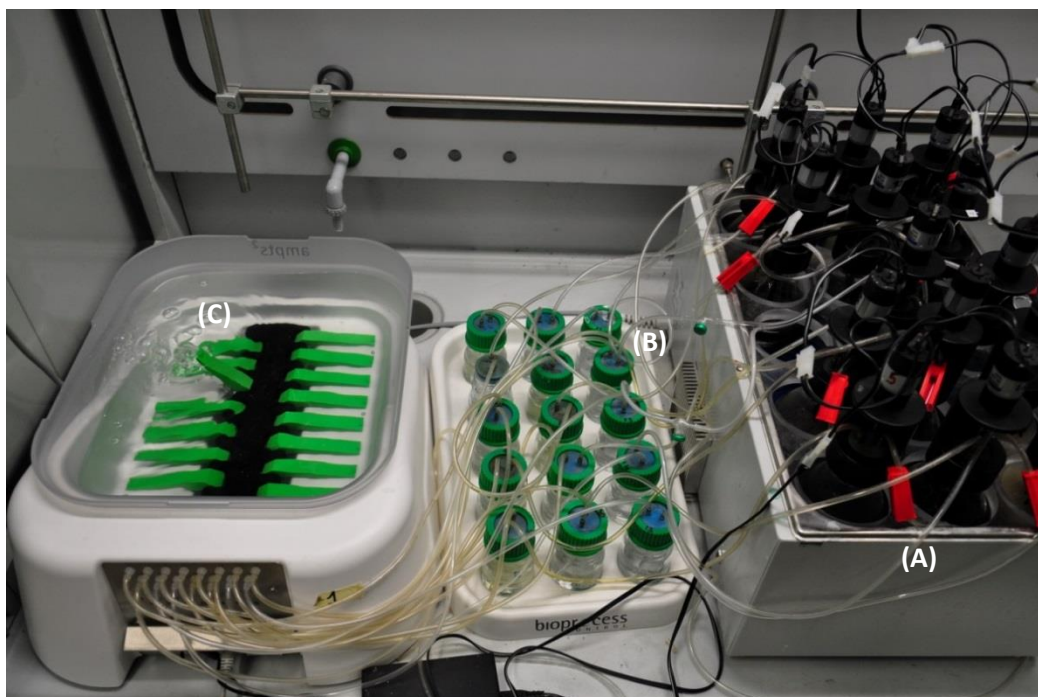


Figura 2.4 AMPTS (Automatic Methane Potential Test System)

Come si può osservare in *Figura 2.4*, l'AMPTS è composto di tre unità:

- L'unità A, costituita dai 15 digestori mantenuti nel bagno termostatico
- L'unità B, costituita dalle trappole di soda per la rimozione della  $\text{CO}_2$
- L'unità C, per la misurazione volumetrica del gas prodotto

Il biogas prodotto in continuo fluisce dalla testa dei digestori, senza creare sovrappressioni all'interno del reattore, e viene fatto passare attraverso un'unità di cattura dei gas acidi presenti in esso, principalmente  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{S}$ ; l'unità B consiste in quindici bottigliette di vetro riempite con una soluzione concentrata di  $\text{NaOH}$  3M. Questo passaggio può essere evitato collegando direttamente i digestori all'unità di misura volumetrica nel caso si voglia valutare la produzione complessiva di biogas, e non del solo metano.

Il volume di metano viene misurato grazie ad un dispositivo di misurazione che produce un impulso digitale ogni 10 ml di gas accumulato. I dati vengono poi registrati da un data logger che integra ogni dato discreto e in tempo reale visualizza tramite un'interfaccia di rete LAN il totale di metano effettivamente prodotto.

Questa strumentazione è stata studiata e sviluppata in Svezia dal team di ricerca dell'Università di Lund e commercializzata dalla Bioprocess control.

In questo studio lo strumento AMPTS è stato utilizzato sia per la determinazione del potenziale di produzione biochimico sia di metano che di idrogeno che per la conduzione delle prove SMA.

Nel caso delle prove BHP con fango pretrattato è stato inserito un setto nel tubo che collega il digestore alla trappola di soda, al fine di analizzare la percentuale di idrogeno presente nel gas prodotto.

### 2.3.2 Gas-cromatografo

La composizione del biogas e dei VFA prodotti nelle prove in batch è stata analizzata usando due gas cromatografi differenti, il primo analizza matrici gassose, il secondo liquide.

Il gas-cromatografo utilizzato per le matrici gassose possiede un detector a conducibilità termica TCD con due colonne analitiche (Colonne Hayesep Q e Molesieve 5) una a setacci per analizzare N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub> l'altra polimerica per analizzare CO<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>O; la temperatura operativa è pari a 40°C, il gas carrier l'elio.

Il gas-cromatografo utilizzato per l'analisi dei VFA possiede un Detector a termionizzazione di fiamma FID (Flame Ionization Detector) con colonna capillare Nukol fused silica.; la rampa di temperatura va dai 100 ai 190 °C; il gas carrier è l'azoto.

### 2.3.3 Impianto Pilota ECO-SI

Nel seguente paragrafo sono illustrati i criteri di dimensionamento, e il dimensionamento stesso delle due configurazioni del pilota ECO-SI: monostadio DA e doppio stadio DF+DA. Inoltre vengono descritte per ogni unità la realizzazione, e la strumentazione installata sull'impianto. Infine è dedicato un paragrafo ai criteri di individuazione degli ambienti per la possibile formazione di atmosfere esplosive, secondo la direttiva ATEX. Per la descrizione delle fasi di precommissioning e start-up si rimanda all'Appendice 1.

#### 2.3.3.1. Dimensionamento

Il dimensionamento dell'impianto pilota di digestione anaerobica è stato eseguito secondo la metodologia indicata dal manuale "Wastewater engineering - Treatment and reuse" (Metcalf and Eddy, 2003).

In fase di dimensionamento sono state considerate due configurazioni: la prima prevede lo schema doppio stadio composto da un reattore di dark fermentation e da un secondo di digestione anaerobica, la seconda composta dal solo stadio di digestione anaerobica funzionante nel caso in cui venga bypassato il primo reattore.

## Dimensionamento configurazione doppio stadio DF+DA

L'alimento dello stadio di dark fermentation è il siero ultrafiltrato; le caratteristiche di tale alimento prese in considerazione durante il dimensionamento sono elencate in Tabella 2.7; dove è indicato "dato calcolato" il valore è stato ricavato dalla relazione 19 e la percentuale di reiezione è stata ricavata dallo studio di Prazeres et al. (2012).

$$COD = 1,42 \times Proteine + 1,12 \times Lattosio + 2,5 \times Grassi \quad [19]$$

Tabella 2.7 Dati relativi all'alimento utilizzati durante il dimensionamento dell'impianto

		siero	% reiezione	siero UF	note
Proteine	g/L	9	100%	-	dati di reiezione relativi al lattosio da Prazeres et al. (2012) dati di reiezione su proteine e grassi indicati da SEPRA srl
Lattosio	g/L	50	70%	47	
Grassi	g/L	1	100%	-	
COD	g/L	71	-	52	dato calcolato
%COD bio		-	-	95%	dato ipotizzato
TKN	g/L	-	-	0,250	Dato misurato su campione fornito da SEPRA srl
P tot	g/L	-	-	0,360	Dato misurato su campione fornito da SEPRA srl
Alcalinità	g/L	-	-	0,870	Dato misurato su campione fornito da SEPRA srl

All'approccio del manuale Metcalf and Eddy sono state coniugate le costanti dei processi biologici indicate dalla modellizzazione ADM1 (IWA 2002).

La portata di siero ultrafiltrato alimentata allo stadio di DF considerata nel dimensionamento è di 1000 L/d, il COD in ingresso è stato considerato completamente biodegradabile, trattandosi sostanzialmente di lattosio e è stata considerata una concentrazione di solidi sospesi non volatili nulla nel refluo in ingresso.

Il substrato alimentato alla fase di digestione anaerobica è caratterizzato al termine del dimensionamento del primo stadio, a valle del calcolo della rimozione del COD.

I parametri relativi all'attività biologica ricavati dall'ADM1 e quelli relativi alle caratteristiche della biomassa sono illustrati in Tabella 2.8. I valori che non sono stati estratti dalla modellizzazione ADM1 bensì dal manuale seguito sono indicati a lato con "Metcalf"

Tabella 2.8 Parametri ricavati da ADMI e caratteristiche della biomassa

	DF	DA	
vmax	42,6	11,36	gS/ gSSV/d
Ks	500	150	mg/L
Y	0,07	0,035	-
kd	0,02	0,03	1/d
% debris	0,15	0,15	metcalf
SSV/SST	85%		metcalf
%N cellula	12,4	12,4	-
%P cellula	2,4	2,4	metcalf

I parametri di processo assunti teoricamente sono illustrati in Tabella 2.9.

Tabella 2.9 Parametri di processo relativi alla DF e alla DA

	DF	DA	
T	35	35	° C
pH	5,5	7	-
SRT th	10	20	d
FS (fattore di sicurezza su SRT)	1	1,5	-
SRT calcolo	10	30	d
HRT	2	3,5	d

La concentrazione del substrato in uscita è stata calcolata mediante la relazione 20 in cui sono stati utilizzati i parametri illustrati nella Tabella precedente. Nell'equazione 20 è stato utilizzato un tempo di ritenzione della biomassa SRT pari a 10 giorni, valore teorico assunto.

$$S = \frac{K_s[1+kdSRT]}{SRT(v_m - kd) - 1} \quad [20]$$

La produzione di biomassa è data dalla relazione XX, dove la % di SSV rispetto agli SST è dell'85% come illustrato in Tabella 2.8.

$$P = \frac{YQ(S_0 - S)}{1 + kdSRT} \quad [21]$$

In seguito è stato calcolato il rapporto F/M tramite la relazione 22 dove X è la concentrazione di SSV, calcolata come descritto in precedenza, e V è il volume utile del reattore calcolato a partire dall'HRT fissato e dalla portata alimentata.

$$\frac{F}{M} = \frac{QS_0}{XV} \quad [22]$$

I valori ottenuti dal dimensionamento del processo biologico sono illustrati in Tabella 2.10

*Tabella 2.10 Parametri ricavati dal dimensionamento del processo biologico*

	<b>DF</b>	<b>DA</b>	
F/M	1,66	1,59	<i>kgCOD/kg SSV/d</i>
OLR	26,23	11,24	<i>kg COD/m<sup>3</sup>/d</i>
OLR	52,45	31,48	<i>kg COD/d</i>
% rimozione COD	0,25	1,00	<i>%</i>

La portata di gas prodotto è stata calcolata a partire dai valori stechiometrici di idrogeno e metano prodotti per unità di COD rimosso. Per quanto riguarda la produzione di idrogeno sono stati considerati i percorsi metabolici che portano alla formazione di acetato ed etanolo. La portata di gas prodotto e le relative percentuali di idrogeno, metano e anidride carbonica sono illustrate in Tabella 2.11.

Inoltre è stato calcolato il fabbisogno di nutrienti e di alcalinità da dosare per il corretto svolgimento del processo biologico. Se la concentrazione di azoto nel siero di latte può talvolta risultare inibente, il siero ultrafiltrato, poichè privo di proteine, non possiede la concentrazione di azoto necessaria ai microrganismi per esplicare le funzioni vitali. Questo deficit di azoto viene rimediato mediante l'aggiunta di ammoniaca a monte del processo. I fabbisogni di azoto, fosforo e alcalinità di entrambi gli stadi sono illustrati in Tabella 2.11, insieme a tutti i parametri, quali carichi, portate e volumi dei reattori citati nel dimensionamento.



Tabella 2.11 Parametri relativi al dimensionamento dell'impianto pilota: carichi, portate, volumi dei reattori, produzione di fango di supero e fabbisogno di nutrienti

		DF	DA	
Carichi	Carico alimentato	52,5	31,5	kgCOD / d
	Rimozione %	0,25	0,999	-
Portate	Portata in DA	1000	800	L/d
	Portata spurgo	200	93	L/d
	Portata out DA (qout)	800	707	L/d
Volume digestore e concentrazione biomassa	V	200	2800	L
	SSV	15,8	7,1	g SSV / L
	SST	18,6	8,3	g SST / L
Produzione di biomassa e fabbisogno	Fango di supero	3,7	0,8	kg TSS/d
	Fango di supero	0,28	0,02	kg TSS/kg CODrim
N/P/Alk	N fabbisogno	393	103	mg N / L in refluo in
	N da fornire	186,1	62	g N / d
	P fabbisogno	111	20	mg P / L in refluo in
	P da fornire	(*)	(*)	g P / d
	Alk fabbisogno	171	4059	mg NaHCO3 / L in refluo in
	Alk da fornire	97,3	3	kg NaHCO3 / d
%CH4 - % CO2 %H2-%CO2		50-50	63-37	-
Produzione e caratteristiche biogas	Produzione CH4 o H2	11,05	16,7	Nm3 CH4 / d
	Produzione energia e. CHP (resa=38%)	12,9	34,9	kWh / d
	Potenza CHP	0,5	1,3	kWe

Per svincolare il tempo di ritenzione idraulica da quello di ritenzione cellulare è stata adottata un'unità MBR. Le caratteristiche delle membrane che sono state utilizzate (membrane tubolari Berghof HyMem I8 LE, modulo di alloggiamento Berghof HyperFlux MO P13U (1m) I8 LE, configurazione MBR Berghof BioPulse) sono descritte in Tabella 2.12.

Il  $\Delta$  di pressione tra monte e valle della membrana viene calcolato come differenza tra pressione del flusso in alimento al modulo di filtrazione e la pressione del flusso di permeato.

Tabella 2.12 Caratteristiche delle membrane

Parametro		Valori di riferimento	Fonte
Materiale membrane tubolari	-	PVDF	specifiche Berghof HyMem I8 LE
Diametro interno membrane tubolari	mm	8	specifiche Berghof HyMem I8 LE
Lunghezza membrane tubolari	m	1	comunicazione SEPRa srl
Cut-off membrane tubolari	nm	30	specifiche Berghof HyMem I8 LE
Superficie filtrante	m <sup>2</sup>	2,56	specifiche Berghof HyperFlux MO P13U (1m) I8 LE
Flusso specifico	LMH	1,56	comunicazione SEPRa srl
Velocità crossflow	m/s	1,0 ÷ 5,0	comunicazione SEPRa srl
Portata alimentata al modulo	m <sup>3</sup> /h	2,4 × v	specifiche Berghof HyperFlux MO P13U (1m) I8 LE
Max temperatura e Δpressione		40° C (600 kPa) 60° C (400 kPa)	specifiche Berghof HyperFlux MO P13U (1m) I8 LE
Min-max di pH	range	2 ÷ 10	specifiche Berghof HyMem I8 LE
solidi sospesi	g/L	20 ÷ 40	comunicazione SEPRa srl
Controlavaggio: frequenza	min	5 ÷ 60	specifiche Berghof BioPulse
Controlavaggio: durata	sec	5 ÷ 15	specifiche Berghof BioPulse

Lo schema di flusso Berghof BioPulse semplificato è illustrato in Figura 2.5

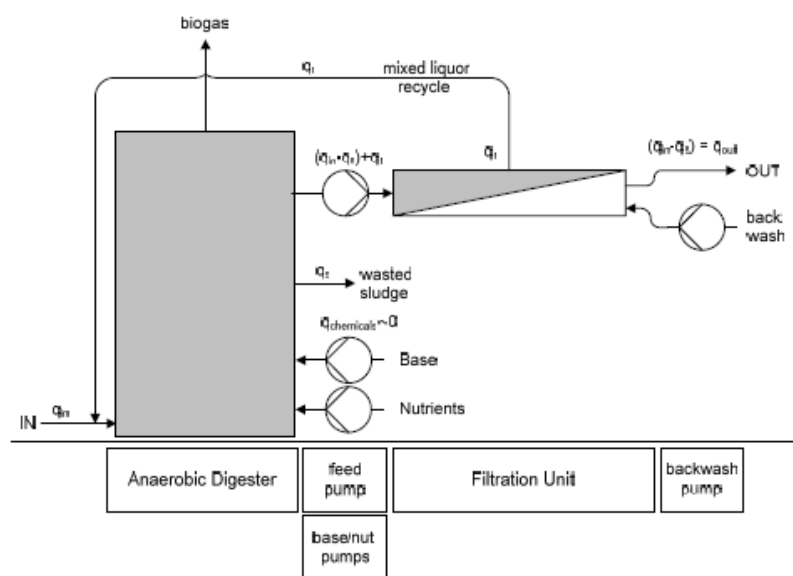


Figura 2.5 Schema di flusso Berghof BioPulse

Il dimensionamento della superficie filtrante avviene a partire dal flusso specifico indicato dal fornitore e dai dati del funzionamento del controlavaggio (durata e frequenza) specifici delle membrane adottate e dalla portata di permeato che deve essere estratta per mantenere il livello costante all'interno del reattore.

Il dimensionamento del comparto membrane per il pilota ECO-SI è illustrato in Tabella 2.13.

*Tabella 2.13 Dimensionamento del comparto MBR*

J media	9,37	8,75	LMH
J attiva	9,53	8,90	LMH
Frequenza controlavaggio	14,75	14,75	min
Durata controlavaggio	15,00	15,00	sec
Qout	800,00	706,67	L/d
Q out fase attiva	813,56	718,64	L/d
Q out fase attiva	33,90	29,94	L/h
S filtrante	3,56	3,37	m <sup>2</sup>
S membrana tubolare	4,00	4,00	m <sup>2</sup>
N membrane tubolari	0,89	0,84	-

#### **Dimensionamento configurazione monostadio DA**

Per il dimensionamento della configurazione monostadio il procedimento adottato è il medesimo di quello illustrato per la configurazione doppio stadio.

I parametri di processo (T, pH, HRT SRT), il volume del reattore e i parametri di dimensionamento del comparto membrane sono gli stessi ottenuti per il reattore di digestione anaerobica dimensionato in precedenza poiché la configurazione monostadio funziona grazie al bypass reattore di dark fermentation.

I valori ottenuti dal dimensionamento della digestione anaerobica in configurazione monostadio sono illustrati in Tabella 2.14

Tabella 2.14 Parametri relativi al dimensionamento dell'impianto pilota nella configurazione monostadio  
DA: carichi, portate, volumi dei reattori, produzione di fango di supero e fabbisogno di nutrienti

<b>DA singolo stadio</b>			
Carichi	Carico alimentato	52,5	kgCOD / d
	Rimozione %	100%	-
Portate	Portata in	1000	L/d
	Portata spurgo	117	L/d
	Portata out DA	883	L/d
Volume digestore e concentrazione biomassa	V	3500	L
	SSV	31,3	g SSV / L
	SST	36,8	g SST / L
Produzione di biomassa e fabbisogno	Fango di supero	4,3	kg TSS/d
	Fango di supero	0,08	kg TSS/kg CODrim
N/P/Alk	N fabbisogno	453	mg N / L in refluo in
	N da fornire	243,3	g N / d
	P fabbisogno	88	mg P / L in refluo in
	P da fornire	(*)	g P / d
	Alk fabbisogno	5413,5	mg NaHCO <sub>3</sub> / L in refluo in
	Alk da fornire	5	kg NaHCO <sub>3</sub> / d
Produzione e caratteristiche biogas	%CH <sub>4</sub> - % CO <sub>2</sub> %	50-50	-
	Produzione CH <sub>4</sub>	15,3	Nm <sup>3</sup> CH <sub>4</sub> / d
	Produzione energia e. CHP (resa=38%)	51,2	kWh / d
	Potenza CHP	1,9	kWe

### 2.3.3.2. Realizzazione dell'impianto

Il progetto ECO-SI ha coinvolto sette partner per la realizzazione dell'impianto. Il Politecnico di Milano ha curato la parte di dimensionamento ed è responsabile del monitoraggio dell'impianto, l'università Cattolica del Sacro Cuore ha svolto la parte di ricerca riguardante i microrganismi batterici idrogeno produttori; Seam Engineering S.r.l., copofila del progetto, ha curato la parte di progettazione e sviluppo del prototipo dell'impianto. Inoltre sono stati coinvolti tre partner tecnologici

- Seam Engineering S.r.l. ha curato la parte di studio della configurazione ottimale e la progettazione dell'impianto pilota
- Sepra S.r.l. si è occupata delle unità di ultrafiltrazione installate una a monte del processo per la separazione delle sieroproteine e due in concomitanza dei reattori di dark fermentation e digestione anaerobica
- I.N.T. S.r.l. ha fornito la strumentazione necessaria

- Simar Costruzioni Meccaniche S.r.l. ha curato la parte di montaggio dell'impianto pilota e fornito il software per il controllo da remoto

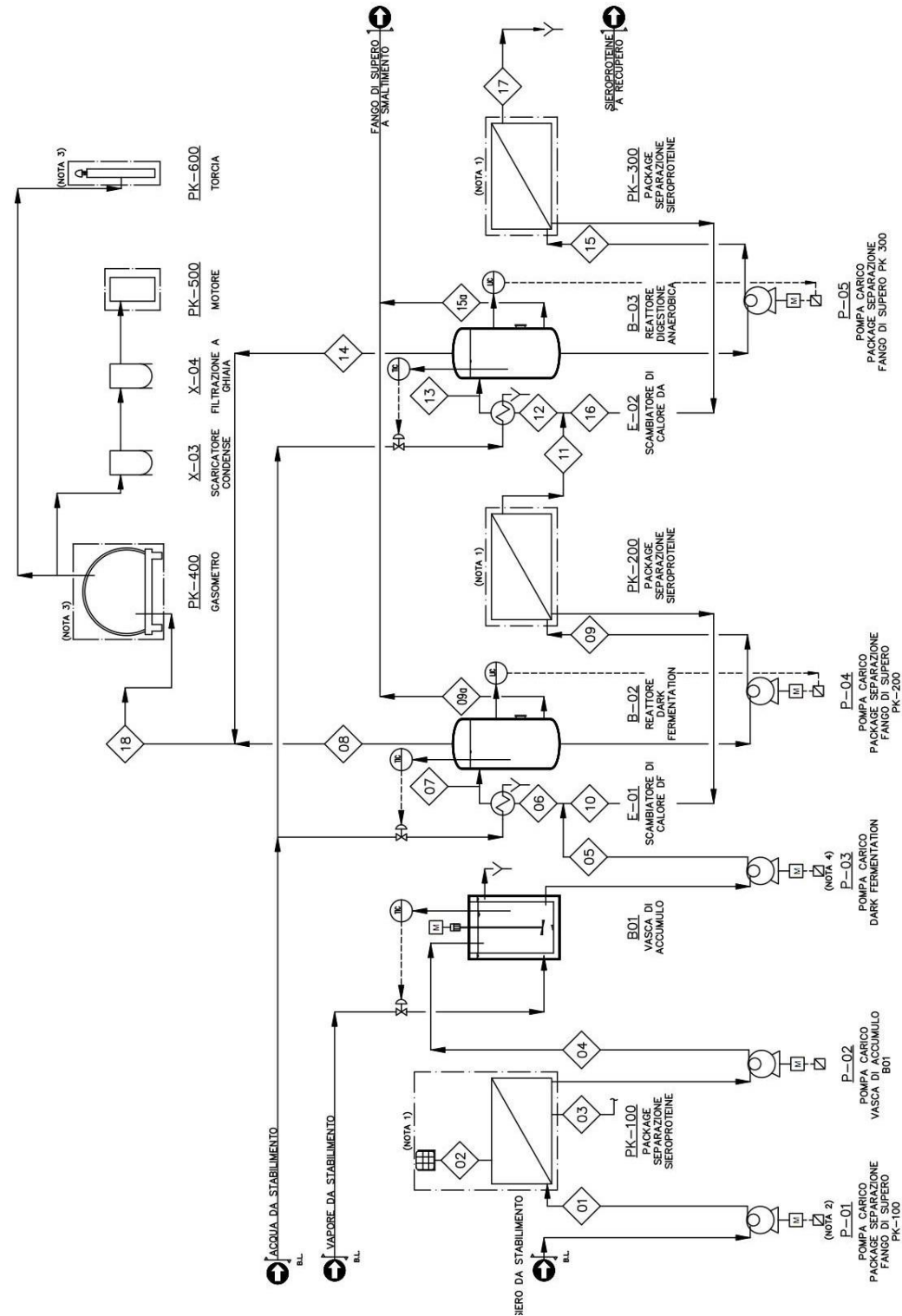
L'impianto in oggetto è installato presso PLAC, "End user" del progetto ECO-SI.

In questo paragrafo sono descritte le 13 unità di cui è costituito, e per ogni unità sono illustrati i relativi parametri di progetto.

Le unità che costituiscono l'impianto sono:

1. Modulo di ultrafiltrazione per la separazione delle siero-proteine
2. Serbatoio di accumulo del siero ultrafiltrato e mantenuto a 70°C
3. Scambiatore di calore per il raffreddamento del siero in ingresso al reattore di dark fermentation
4. Reattore di dark fermentation
5. Unità di ultrafiltrazione per la separazione del fango di supero proveniente dalla dark fermentation
6. Scambiatore di calore per il raffreddamento del siero per la digestione anaerobica
7. Reattore di digestione anaerobica
8. Unità di ultrafiltrazione per la separazione del fango di supero proveniente dalla digestione anaerobica
9. Dosaggio di soda per il controllo del pH all'interno dei reattori di dark fermentation e digestione anaerobica
10. Dosaggio ammoniacca per il fabbisogno di azoto all'interno del serbatoio di stoccaggio del siero
11. Inertizzazione di sicurezza reattori di dark fermentation e digestione anaerobica tramite azoto
12. Accumulo fango di supero nei all'interno dei serbatoi B-06 e B-07;
13. Linea gas, gasometro a membrana ed utilizzo del biogas prodotto

Nella figura seguente è illustrato il diagramma di flusso dell'impianto pilota ECO-SI, dove sono evidenziate le 13 unità.



### Modulo di Ultrafiltrazione per la separazione delle siero-proteine

Il modulo di ultrafiltrazione per il recupero delle siero proteine e l'invio del flusso di permeato al reattore di accumulo è mostrato in Figura 2.6.



Figura 2.6 Modulo di Ultra Filtrazione installato presso PLAC

Il flusso di siero tal quale raggiunge il modulo di ultra filtrazione dalla tubatura segnata in giallo in Figura 2.6 e, passando attraverso l'unità filtrante si separa in due flussi: il primo in cui si concentrano le proteine, che viene allontanato, ed il secondo, permeato, che viene diretto verso il serbatoio di accumulo; il percorso di quest'ultimo è evidenziato in figura in rosso.

Il modulo di ultrafiltrazione installato è Dairy Ultra UF 6338C Sanitary Ultrafiltraion, moduli esclusivamente utilizzati pe processi collegati all'industria alimentare, i quali richiedono stringenti procedure sanitarie.

Il modulo installato è rappresentato in Figura 2.7; le misure A B e C sono specificati in Tabella 2.15

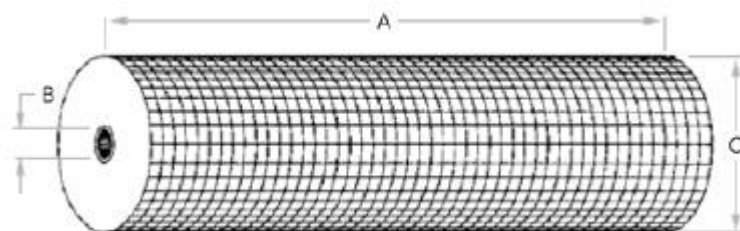


Figura 2.7 Membrana di UF per la separazione delle sieroproteine installata nel PK-100

Tabella 2.15 Dimensioni delle membrane installate nel PK-100

Modello	Dimensioni (cm)		
	A	B	C
DAIRY ULTRA uf 6338C-30D	96,5	2,89	16,1

### Accumulo iniziale

La realizzazione della vasca iniziale di accumulo risulta necessaria al fine di preservare inalterate le caratteristiche del siero ultrafiltrato in attesa dell'invio alle successive fasi. Il dimensionamento è stato effettuato in base alle seguenti criteri:

- portata di siero a digestione: 1 m<sup>3</sup>/d (≈ 42 l/h);
- alimento del siero ultrafiltrato alle fasi successive in due cicli giornalieri da 1 ora ciascuno a 12 ore di distanza l'uno dall'altro, corrispondente ad una portata effettiva di carico dalla precedente sezione di ultrafiltrazione di 0,5 m<sup>3</sup>/h;
- autonomia dell'accumulo di 1,5 giorni, in modo da poter sopperire alla mancata alimentazione del siero per un'intera giornata lavorativa;

In Tabella 2.16 si riportano i principali parametri realizzativi della vasca di accumulo

Tabella 2.16 Caratteristiche del serbatoio di accumulo iniziale

<b>Vasca d'accumulo B-01</b>		
Q siero a digestione	1	m <sup>3</sup> /d
Autonomia dell'accumulo	1,5	d
Volume utile minimo di stoccaggio	1,5	m <sup>3</sup>
Lato utile di base (pianta quadrata)	1,5	m
Altezza utile	0,75	m
Volume utile effettivo di stoccaggio	≈1,7	m <sup>3</sup>
Franco superiore	0,2	
Franco inferiore	0,2	m
Altezza effettiva	1,15	m
Lato di base effettivo 1,50 m	1,5	m
Volume effettivo	≈2,6	m <sup>3</sup>

Per mantenere inalterate le caratteristiche del siero in attesa di essere inviato alle fasi successive e per impedire la crescita batterica all'interno dell'accumulo, il siero viene mantenuto ad una temperatura di circa 70°C. A tale fine all'interno della vasca di accumulo è realizzata una camicia esterna di 20 cm in cui viene mantenuta acqua riscaldata tramite condensazione di vapore, finalizzata al riscaldamento/mantenimento della temperatura del siero stoccato. Tale camicia è presente su tutte le facce del serbatoio ad eccezione di quella superiore poiché è scoperchiabile. Le dimensioni esterne risulteranno dunque maggiorate di 20 cm da ogni lato rispetto a quanto riportato in Tabella 2.16, ad eccezione della faccia superiore.

In Tabella 2.17 sono riportate le misure effettive del serbatoio e della camicia.



*Tabella 2.17 Misure effettive del serbatoio e della camicia*

Altezza effettiva	1,35	m
Lato di base effettivo	1,9	m
Volume apparente	≈4,9	m <sup>3</sup>
Volume effettivo camicia	≈2,3	m <sup>3</sup>

Inoltre il serbatoio è dotato di un mixer che mantiene le condizioni di miscelazione che garantiscono una temperatura uniforme ed evitano la formazione di depositi.

Una pompa peristaltica (P-03) dotata di inverter provvede all'invio del siero alle fasi successive a portata costante.

Il serbatoio è stato realizzato in acciaio AISI 304/316 con uno spessore di 3 mm come gli altri due serbatoi e tutte le tubature dell'impianto pilota.

#### **Scambiatore di calore per il raffreddamento del siero in ingresso al reattore di DF e dell'alimento in ingresso alla DA**

Gli scambiatori di calore sono installati sull'ingresso dei reattori di dark fermentation digestione anaerobica per regolare la temperatura del flusso in ingresso evitando shock termici alla popolazione batterica presente all'interno dei reattori.

La temperatura ottimale di esercizio della Dark Fermentation è pari a 37 °C mentre il siero in uscita dalla vasca di accumulo è ad una temperatura di circa 70 °C. Risulta dunque necessario raffreddare il siero in ingresso alla Dark Fermentation fino ad una temperatura adeguata al mantenimento dei 37°C all'interno del reattore (coibentato). A tal fine il flusso di alimentazione proveniente dalla vasca di accumulo viene inizialmente miscelato al flusso di ricircolo della Dark Fermentation e quindi raffreddato attraverso lo scambiatore E-01. Un'apposita valvola di controllo (TCV-03) permette di regolare la quantità d'acqua di raffreddamento in ingresso allo scambiatore di calore e portare quindi il flusso in uscita alle condizioni necessarie al mantenimento della corretta temperatura all'interno del reattore di Dark Fermentation.

La temperatura di esercizio prevista per la Digestione Anaerobica è prevista pari a 33-35 °C mentre il siero in uscita dal package PK-200 è ad una temperatura di circa 37 °C. Potrebbe risultare necessario raffreddare il flusso in ingresso alla Digestione Anaerobica fino ad una temperatura adeguata al mantenimento dei 35°C, ma poiché il reattore non è stato coibentato in fase di montaggio la temperatura di processo è mantenuta grazie all'alimento caldo.

Lo scambiatore di calore E-02 entrerà in funzione solo nel caso in cui il reattori verrà coibentato. È stata prevista un'apposita valvola di controllo (TCV-07) che permette di

regolare la quantità d'acqua di raffreddamento in ingresso allo scambiatore di calore analogamente a quanto illustrato per da DF.

### **Reattore di dark fermentation**

Il reattore di dark fermentation è dedicato alla produzione di biogas contenente H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> grazie all'attività batterica di una biomassa selezionata.

Il dimensionamento è stato predisposto in base alle seguenti considerazioni:

- portata di siero in ingresso: 1 m<sup>3</sup>/d (≈ 42 l/h);
- arrivo del siero dalla vasca di accumulo B-01 con continuità ad una temperatura di 70°C;
- HRT pari a 1 giorno;
- temperatura di esercizio 37 °C.

Per la regolazione della temperatura è prevista una valvola ON-OFF (XV-04) che, qualora si registrino temperature troppo elevate all'interno del reattore, alimenta acqua di rete al suo interno, in modo da regolarne la temperatura ed impedire shock termici che potrebbero danneggiare la popolazione batterica presente nel reattore.

Per la regolazione del livello all'interno della vasca è previsto un sistema di controllo (implementato tramite LIC-X01 a DCS) che regola la portata estratta dalla pompa P-204 al fine di mantenere il livello desiderato all'interno del reattore. Tale livello viene misurato attraverso un misuratore di pressione differenziale (due trasmettitori di pressione), che misura la differenza di pressione tra la parte alta e la parte bassa del serbatoio. La differenza di pressione tra i due punti, fornisce il livello presente nel reattore. E' inoltre previsto come protezione ulteriore un trasmettitore di livello (LT-05) i cui segnali sono elaborati al fine di avviare/arrestare le pompe di carico/scarico della vasca.

Per quanto riguarda la pressione del gas presente in testa al reattore (che in condizioni di normale funzionamento è di poche decine di mbar) sono state considerate le possibilità che si registrino inaspettate depressioni o sovrappressioni. Per tutelare il sistema da eventuali depressioni è prevista una valvola ON-OFF (XV-05) che, in caso la pressione scenda sotto un valore prestabilito, provvede ad immettere azoto all'interno del reattore. È inoltre prevista una valvola rompi-vuoto che si apre qualora vengano raggiunte per pressioni nel serbatoio molto basse (sotto la soglia di apertura della valvola di immissione azoto). Per quanto riguarda la protezione per possibili sovrappressioni è prevista una valvola di sicurezza (PSV-16).

Per i dettagli riguardo alla strumentazione dell'impianto si rimanda al paragrafo 2.3.3.3.

I parametri di progetto del reattore B-02 sono illustrate in Tabella 2.18

*Tabella 2.18 Caratteristiche del reattore di Dark Fermentation*

Q siero	1	<i>m<sup>3</sup>/d</i>
HRT	1	<i>d</i>
Diametro	0,9	<i>m</i>
Altezza totale	2,1	<i>m</i>
Altezza zona occupata da siero e biomassa	1,6	<i>m</i>
Altezza zona occupata dal biogas	0,5	<i>m</i>
Rapporto H mixed liquor/Diametro	1,78	-
Volume reattore	≈1,34	<i>m<sup>3</sup></i>

### **Unità di ultrafiltrazione per la separazione del fango di supero installata per i reattori di DF e DA**

L'unità di separazione MBR è basata sul principio della filtrazione cross-flow. La portata alimentata all'unità di filtrazione si divide, a valle di essa, in due flussi, il permeato, che attraversa la membrana, ed il concentrato.. Esso è costituito dalle sostanze con dimensioni maggiori del diametro dei pori (sostanzialmente aggregati batterici) che vengono riciclate all'interno del reattore.

La separazione è resa possibile dal regime di moto turbolento all'interno degli elementi a membrana, che fa sì che questa sia mantenuta pulita dall'alimentazione stessa.

Le membrane utilizzate sono unità tubolari di 8 mm in materiale polimerico, installate in un unico contenitore di vetroresina, come illustrato in Figura 2.8.



*Figura 2.8 Sezione della membrana ceramica installata in combinazione ai reattori di DF e DA*

L'unità di ultrafiltrazione è installata sia per il reattore di Dark Fermentation, sia per quello di Digestione Anaerobica, ma risultano bypassabili nel caso in cui non sia necessario mantenere alti SRT, e dunque convertire il reattore a CSTR.

Questa possibilità può essere valutata nel caso della dark fermentation, un processo nuovo di cui si stanno ancora studiando le caratteristiche ottimali per il processo; nel caso della digestione anaerobica, invece, la possibilità di bypassare le membrane per operare in CSTR non è considerata d'interesse.

L'alimentazione all'impianto deve essere collegata al serbatoio di testa per mezzo di una tubazione in acciaio inossidabile, assicurando nel serbatoio di testa adeguato battente per garantire alimentazione di liquido alla pompa di alimento (P-04,P05).

L'uscita del permeato è collegata alla vasca di raccolta del permeato o al serbatoio di lavaggio (B-201,B301) mentre il concentrato, aspirato dal sistema per mezzo di una derivazione nel circuito a valle della membrana, viene reimpresso nel serbatoio di testa (B-02, B-03),

viene inviato ad un serbatoio di accumulo (B-02), il permeato alimenta il serbatoio B-03.

Per il controllo del fouling è previsto un tempo di relaxation, un tempo di lavaggio ed un controlavaggio della membrana.

Normalmente, dopo alcuni cicli di produzione, si utilizza un lavaggio alcalino per eliminare i residui organici.

La soluzione di lavaggio viene preparata manualmente; quando le pompe di lavaggio (P-202,P-302) entrano in funzione è necessario verificare il pH della soluzione all'interno del serbatoio: nel caso di lavaggio alcalino è opportuno non salire sopra pH 11, in caso di lavaggio acido non si deve scendere sotto pH 2.

#### **Reattore di digestione anaerobica**

Il reattore di digestione anaerobica (Figura 2.9) è dedicato alla produzione di biogas contenente CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> grazie all'attività batterica di una biomassa selezionata.

Il dimensionamento è stato predisposto in base alle seguenti considerazioni:

- Portata di siero in ingresso: 1 m<sup>3</sup>/d (≈ 42 l/h);
- Arrivo del siero dalla Dark Fermentation B-02 con continuità ad una temperatura di 37°C;
- HRT pari a 3,5 giorni;
- Temperatura di esercizio 35 °C



*Figura 2.9 Reattore di Digestione Anaerobica B-03 con unità di UF esterna*

Per garantire l'SRT del sistema è stata installata un'unità di filtrazione descritta nel precedente paragrafo che, in Figura 2.9 si può notare installata verticalmente.

Per la regolazione della temperatura è prevista una valvola ON-OFF (XV-06) che, qualora si registrino temperature troppo elevate all'interno del reattore, alimenta acqua di rete al suo interno, in modo da regolare la temperatura ed impedire shock termici che potrebbero danneggiare la popolazione batterica presente nel reattore.

Per la regolazione del livello all'interno della vasca è previsto un sistema di controllo (implementato tramite LIC-X02 a DCS) che regola la portata estratta dalla pompa P-304 al fine di mantenere il livello desiderato all'interno del reattore. Tale livello viene misurato attraverso un misuratore di pressione differenziale (due trasmettitori di pressione), che misura la differenza di pressione tra la parte alta e la parte bassa del serbatoio. La differenza di pressione tra i due punti, fornisce il livello presente nel reattore. E' inoltre previsto come protezione ulteriore un trasmettitore di livello (LT-07) i cui segnali sono elaborati al fine di avviare/arrestare le pompe di carico/scarico della vasca.

Per quanto riguarda la pressione del gas presente in testa al reattore (che in condizioni di normale funzionamento è di poche decine di mbar) sono state considerate le possibilità che si registrino inaspettate depressioni o sovrappressioni. Per tutelare il sistema da eventuali depressioni è prevista una valvola ON-OFF (XV-09) che, in caso la pressione

scenda sotto un valore prestabilito, provvede ad immettere azoto all'interno del reattore. È inoltre prevista una valvola rompi-vuoto che si apre qualora vengano raggiunte per pressioni nel serbatoio molto basse (sotto la soglia di apertura della valvola di immissione azoto). Per quanto riguarda la protezione per possibili sovrapressioni è prevista una valvola di sicurezza (PSV-18).

I parametri di progetto del reattore B-03 sono illustrati in Tabella 2.19.

*Tabella 2.19 Caratteristiche del reattore di Digestione Anaerobica*

Q siero	1	<i>m<sup>3</sup>/d</i>
HRT	3,5	<i>d</i>
Diametro	1,40	<i>m</i>
Altezza totale	2,75	<i>m</i>
Altezza zona occupata da siero e biomassa	2,30	<i>m</i>
Altezza zona occupata dal biogas	0,45	<i>m</i>
Rapporto H mixed liquor/Diametro	1,65	-
Volume reattore	≈4,25	<i>m<sup>3</sup></i>

#### **Dosaggio di soda per il controllo del pH all'interno dei reattori di dark fermentation e digestione anaerobica**

All'interno dei reattori B-02 e B-03 possono verificarsi fenomeni di iperacidità, per evitare il verificarsi di tale situazione è prevista una sezione di dosaggio soda.

Tramite strumenti di controllo dei valori di pH presenti all'interno dei reattori le portate delle pompe P-06 e P-07 possono essere regolate al fine di ottenere il pH desiderato.

#### **Dosaggio ammoniacca per il fabbisogno di azoto all'interno del serbatoio di stoccaggio del siero**

Per soddisfare il fabbisogno batterico di nutrienti, in particolare azoto, per il corretto svoglimento del processo nelle fasi di dark fermentation digestione anaerobica, è prevista una stazione di dosaggio di ammoniacca con pompa dosatrice regolabile manualmente, che dosa i quantitativi necessari direttamente all'interno della vasca di accumulo B-01.

#### **Inertizzazione di sicurezza reattori di dark fermentation e digestione anaerobica tramite azoto**

All'interno del package PK-700 (Bombola di N<sub>2</sub>) è presente uno stoccaggio di azoto gassoso e una valvola di controllo che riduce la pressione dell' azoto stesso da pressioni elevate a quelle definite per l'utilizzo (circa 0,5 bar). Il sistema di riduzione della

pressione è dotato anche di una valvola di sicurezza che in caso di mal funzionamento del riduttore di pressione scaricherà l'azoto in atmosfera (area sicura).

### **Serbatoi di accumulo del permeato e del fango di supero**

L'estrazione del permeato è prevista ad intervalli temporizzati ed è regolata in modo da tale da mantenere in livello di set point all'interno del reattore. Il permeato viene convogliato in un serbatoio di accumulo ed in seguito smaltito.

Anche l'estrazione di fango di supero, non prevista nella fase di avvio del digestore, si verifica ad intervalli regolari per mantenere all'interno del reattore l'SRT di progetto; nella fase di avvio del digestore l'SRT è infinito.

Il fango di supero proveniente dai reattori B-02 e B-03 viene stoccato nei serbatoi B-06 e B-07. Il riempimento del serbatoio è regolato tramite apposita valvola che ad intervalli temporizzati permette al fluido pompato rispettivamente dalla pompa P-04 e P-05 di essere accumulato nel serbatoio. Lo svuotamento del serbatoio avviene tramite trasmettitore di livello, i cui segnali saranno elaborati al fine di aprire/chiedere la valvola di scarico del serbatoio e permettere lo svuotamento per gravità in fogna.

### **Linea Gas, accumulo ed utilizzo del biogas prodotto**

Il gas prodotto nei reattori di dark fermentation e digestione anaerobica viene convogliato tramite la linea gas e stoccato in un apposito gasometro a membrana.

È disposto un analizzatore di gas in grado di quantificare le percentuali in termini di CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> e di H<sub>2</sub> prodotto dei singoli flussi separati, prodotti da ciascun reattore.

È previsto, a regime, anche l'uso di un motore per la conversione del biogas prodotto in energia elettrica.

Nel periodo precedente l'installazione del motore il gas prodotto è bruciato in torcia.

Il biogas prodotto ha, da progetto, le caratteristiche elencate nelle Tabelle 2.20 e 2.21.

*Tabella 2.20 Caratteristiche del biogas prodotto*

<b>Caratteristiche biogas</b>		<b>DF</b>	<b>DA</b>	<b>MISTO</b>
Densità	<i>kg/Nm<sup>3</sup></i>	1,03	1,19	1,11
Peso Molecolare	<i>g/mol</i>	23	27	25
Produzione biogas	<i>kg/d</i>	24,2	26,1	50,2
Produzione biogas	<i>Nm<sup>3</sup>/d</i>	23	22	45

Tabella 2.21 Composizione del biogas

Composizione biogas	DF	DA	MISTO
CH4	% -	63	30
H2	% 50	-	26
CO2	% 50	37	44

### Controllo da remoto

Il funzionamento dell'impianto è completamente automatizzato e gestibile anche da remoto. Il software, realizzato dal partner tecnologico SEAM si presenta con l'interfaccia grafica mostrata in Figura 2.10

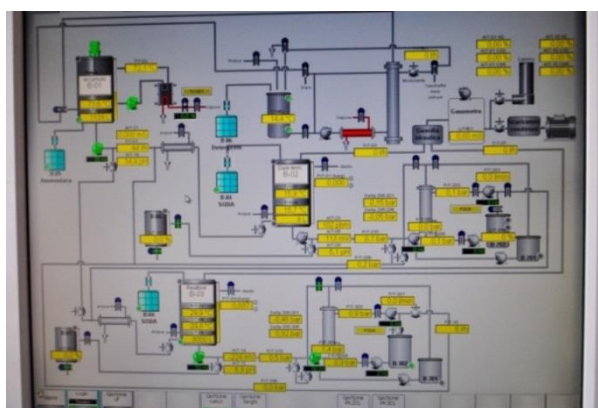


Figura 2.10 Interfaccia del software per il controllo e la gestione da remoto

Il software permette di registrare i parametri di interesse e, sulla base delle impostazioni predefinite dall'operatore, consente l'automazione di alcuni processi:

- il sistema di riscaldamento siero UF; set point 70°C
- il sistema di carico del siero UF; setpoint 3100 L
- il sistema controllo pH in B-03, setpoint 7
- il sistema di controllo pressione in B-03, setpoint 0.000 bar (se valore scende sotto lo zero viene iniettato N2 in pressione fino al set point 0.030 bar)
- il sistema di controllo temperatura in B-03, set point 35 °C. Se la temperatura sale entra in funzione il raffreddamento con acqua di rete a circa 12°
- il sistema di estrazione permeato, set point per quanto riguarda il livello di B-03 a 3000 L

Inoltre permette il controllo da remoto di tutti quei valori che sono monitorati da strumentazione dotata di trasmettitore, quali i misuratori del volume all'interno del reattore, i misuratori di portata, di temperatura, di pressione, di pH e conducibilità.



### 2.3.3.3. Strumentazione installata sull'impianto

L'impianto pilota oggetto di studio in questo lavoro è dotato di strumentazione per la misurazione di portate, livelli pressioni e temperatura, di analizzatori del gas e di valvole. La strumentazione installata è illustrata nelle Tabelle mostrate in questo paragrafo.

Le sigle sono così interpretabili: la prima lettera è riferita alla tipologia di strumento, F indica un misuratore di portata "Flow", L un indicatore di livello "Level", P un misuratore di pressione "Pression", T un misuratore di temperatura "Temperature", A un analizzatore "Analyzer". Le lettere seguenti indicano se il valore misurato è semplicemente indicato dallo strumento, I, oppure trasmesso e quindi leggibile dal software, T, o se entrambi, IT. Le valvole sono indicate per tipologia con una lettera posta prima della V "Valve" che può essere X per la valvola ON-OFF, TC per valvole di controllo, PV per le valvole rompivuoto e PS per le valvole di sicurezza.

<b>Misuratori di portata</b>					
SIGLA	P&ID	POSIZIONE	FLUIDO	TEMPERATURA	MIN - NOMALE - MAX
FI	BIOH2SE50-003	LINEA 1/2"-SL-008-XX-N	Siero di latte	65-80 °C	(0,021 - 0,042 - 0,084) m <sup>3</sup> /h
FI	BIOH2SE50-004	LINEA 1"-FSF-011-XX-N	Fango DF	10-65 °C	(1,12 - 1,33 - 1,6) m <sup>3</sup> /h
FIT	BIOH2SE50-004	LINEA XX"-HY-034-XX-N	Biogas DF	10-65 °C	
FI	BIOH2SE50-004	LINEA 1"-FSF-013-XX-N	Fango DF	10-65 °C	(1,12 - 1,33 - 1,6) m <sup>3</sup> /h
FI	BIOH2SE50-006	LINEA 1"-SL-018-RL-N	Fango DA	10-65 °C	(2,00 - 2,33 - 2,80) m <sup>3</sup> /h
FIT	BIOH2SE50-006	LINEA XX"-BG-036-RL-N	Biogas DA	10-65 °C	
FI	BIOH2SE50-006	LINEA 1"-FSD-020-XX-N	Fango DA	10-65 °C	(2,00 - 2,33 - 2,80) m <sup>3</sup> /h
FI	BIOH2SE50-007	LINEA 1/2"-SL-042-XX-N	Siero di latte	10-65 °C	(0,021 - 0,042 - 0,084) m <sup>3</sup> /h
FT	BIOH2SE50-002				
FC	BIOH2SE50-002				
FT	BIOH2SE50-002				
FI	BIOH2SE50-002				
FC	BIOH2SE50-002				
FC	BIOH2SE50-002				
FT	BIOH2SE50-005	F-201	permeato DF		0-100 l/h
FT	BIOH2SE50-005		controlavaggio DF		
FT	BIOH2SE50-005	F-202	permeato DF		0-100 l/h
FT	BIOH2SE50-007	F-301	permeato DA		0-100 l/h
FT	BIOH2SE50-007		controlavaggio DF		
FT	BIOH2SE50-007	F-302	permeato DA		0-100 l/h

## Misuratori di livello

SIGLA	P&ID	POSIZIONE	FLUIDO	PRESSIONE OPERATIVA MIN-MAX	TEMPERATURA
LG	BIOH2SE50-003	B-01	Siero di latte	1000	60-80 °C
LT	BIOH2SE50-003	B-02	Siero di latte	0,0 / 0,18 barg	60-80 °C
LT	BIOH2SE50-003	B-03	Siero di latte	0,0 / 0,18 barg	60-80 °C
LG	BIOH2SE50-004	B-02	Fango DF	-0,3 / 0,5 barg	10-65 °C
LT	BIOH2SE50-004	B-03	Fango DF	-0,3 / 0,5 barg	10-65 °C
LG	BIOH2SE50-006	B-03	Fango DA	-0,3 / 0,5 barg	10-65 °C
LT	BIOH2SE50-005	B-04	Fango DA	-0,3 / 0,5 barg	10-65 °C
LSL	BIOH2SE50-009	B-05	Soda		
LSL	BIOH2SE50-009	B-06	Ammoniaca		
LG	BIOH2SE50-004	Guardia idraulica X-01	Acqua		
LG	BIOH2SE50-006	Guardia idraulica X-02	Acqua		
LT	BIOH2SE50-011	DF B-06	Fango DF	0 / 0,135	
LT	BIOH2SE50-011	B-07	Fango DA	0 / 0,135	
LSHH	BIOH2SE50-011	B-06	Fango DF	0 / 0,135	
LSHH	BIOH2SE50-011	B-07	Fango DA	0 / 0,135	
LG	BIOH2SE50-003	B-01	Acqua da condensa		
LT	BIOH2SE50-002	B-101			
LT	BIOH2SE50-005	B-201			
LSLL	BIOH2SE50-005	B-201			
LSHH	BIOH2SE50-005	B-201			
LT	BIOH2SE50-005	B-202			
LSL	BIOH2SE50-005	B-202			
LSHH	BIOH2SE50-005	B-202			
LT	BIOH2SE50-007	B-301			
LSLL	BIOH2SE50-007	B-301			
LSHH	BIOH2SE50-007	B-301			
LG	BIOH2SE50-007	B-302			
LIT	BIOH2SE50-008	Gasometro			

## Misuratori di pressione

SIGLA	P&ID	POSIZIONE	FLUIDO	PRESSIONE OPERATIVA MIN-MAX
PIT	BIOH2SE50-004	B-02	Biogas DF	(-0,4) / 0,05 / 1,00
PT	BIOH2SE50-004	B-03	Biogas DF	(-0,4) / 0,05 / 1,00
PT	BIOH2SE50-004	B-04	Fango DF	(-0,4) / 0,05 / 1,00
PIT	BIOH2SE50-006	B-03	Biogas DA	(-0,4) / 0,05 / 1,00
PT	BIOH2SE50-006	B-04	Biogas DA	(-0,4) / 0,05 / 1,00

PT	BIOH2SE50-006	B-05	Fango DA	(-0,4) / 0,05 / 1,00
PI	BIOH2SE50-002			
PT	BIOH2SE50-002			
PI	BIOH2SE50-002			
PT	BIOH2SE50-005			0 - 6
PI	BIOH2SE50-004			0 - 6
PT	BIOH2SE50-005	F-201		(-1) - 4
PI	BIOH2SE50-005			(-1) - 5
PT	BIOH2SE50-005	F-201		(-1) - 6
PT	BIOH2SE50-005			0 - 6
PT	BIOH2SE50-005	F-202		(-1) - 4
PT	BIOH2SE50-005	F-202		(-1) - 4
PI	BIOH2SE50-005	F-202		(-1) - 4
PT	BIOH2SE50-005			0 - 6
PISL	BIOH2SE50-005			0 - 6
PI	BIOH2SE50-005			0 - 4
PIS	BIOH2SE50-005			(-1) - 4
PT	BIOH2SE50-007			0 - 6
PI	BIOH2SE50-007			0 - 6
PT	BIOH2SE50-007	F-301		(-1) - 4
PI	BIOH2SE50-007			(-1) - 4
PT	BIOH2SE50-007	F-301		(-1) - 4
PT	BIOH2SE50-007			0 - 6
PT	BIOH2SE50-007	F-302		(-1) - 4
PT	BIOH2SE50-007	F-302		(-1) - 4
PI	BIOH2SE50-007	F-302		(-1) - 4
PT	BIOH2SE50-007			0 - 6
PISL	BIOH2SE50-007			0 - 6
PI	BIOH2SE50-007			0 - 4
PIS	BIOH2SE50-007			(-1) - 4
PI	BIOH2SE50-008	Gasometro		
PIT	BIOH2SE50-010	Package azoto		
PIC	BIOH2SE50-010	Package azoto		

### Misuratori di Temperatura

SIGLA	P&ID	POSIZIONE	FLUIDO	TEMPERATURA OPERATIVA MIN-MAX
TIT	BIOH2SE50-003	B-01	Siero di latte	60 - 70 - 80 °C
TIT	BIOH2SE50-003	B-02	Acqua da condensa	60 - 75 - 85 °C
TI	BIOH2SE50-004	LINEA 1"-SL-010-RL-N	Siero di latte	10- 37 - 65 °C

TIT	BIOH2SE50-004	B-02	Fango DF	10- 37 - 65 °C
TIT	BIOH2SE50-004	B-03	Fango DF	10- 37 - 65 °C
TI	BIOH2SE50-006	LINEA XX"-SL-017-RL-N	Siero di latte	10- 34 - 65 °C
TIT	BIOH2SE50-006	B-03	Fango DF	10- 34 - 65 °C
TIT	BIOH2SE50-006	B-04	Fango DF	10- 34 - 65 °C
TT	BIOH2SE50-002	B-101		
TT	BIOH2SE50-002			
TT	BIOH2SE50-002			
TT	BIOH2SE50-005			
TT	BIOH2SE50-007			

### Analizzatori

SIGLA	P&ID	POSIZIONE	TIPOLOGIA	FLUIDO	T esercizio	note
AIT	BIOH2SE50-004	LINEA XX"-HY-034-XX-N	H2	Biogas DF	15 - 50°C	Misuratore % VOL H <sub>2</sub> (previsto 0-60%) e, se possibile, di CO <sub>2</sub> (previsto 30-70%) e CH <sub>4</sub> (<20%). Precisione misura 0,50%
AIT	BIOH2SE50-004	LINEA 1"-FSF-013-XX-N	pH	Fango DF	15 - 50°C	Intervallo di misura 4 - 8. Precisione 0,01.
AIT	BIOH2SE50-004	LINEA 1"-FSF-013-XX-N	RedOx	Fango DF	15 - 50°C	Intervallo di misura (-400)/100 mV. Precisione 1 mV. Misuratore % VOL CH <sub>4</sub> (previsto 20-80%) e, se possibile, di CO <sub>2</sub> (previsto 30-70%) e H <sub>2</sub> (<10%). Precisione misura 0,50%.
AIT	BIOH2SE50-006	LINEA XX"-BG-036-XX-N	CH4			
AIT	BIOH2SE50-006	LINEA 1"-FSD-020-XX-N	pH	Fango supero DA	15 - 50°C	Intervallo di misura 4 - 8. Precisione 0,01.
AIT	BIOH2SE50-006	LINEA 1"-FSD-020-XX-N	RedOx	Fango supero DA	15 - 50°C	Intervallo di misura (-400)/100 mV. Precisione 1 mV.
AIT	BIOH2SE50-003	LINEA 1"-FSD-020-XX-N	pH	Siero di latte	15 - 80°C	Intervallo di misura 4 - 8. Precisione 0,01.
AIT	BIOH2SE50-003	LINEA 1/2"-SL-008-XX-N	Cond.	Siero di latte	15 - 80°C	
AIT	BIOH2SE50-004	LINEA 1/2"-SL-013-XX-N	O <sub>2</sub>	Fango supero DF	15 - 50°C	

#### 2.3.3.4. Direttiva ATEX

La sicurezza nei luoghi con pericolo di esplosione è attualmente regolamentata da due direttive europee (comunemente denominate direttive ATEX):

- la direttiva 94/9/CE contenente disposizioni in materia di apparecchi e sistemi di protezione destinati ad essere utilizzati in atmosfera potenzialmente esplosiva.
- la direttiva 99/92/CE relativa alle prescrizioni minime per il miglioramento della tutela della sicurezza e della salute dei lavoratori che possono essere esposti al rischio di atmosfere esplosive;

La direttiva 94/9/CE è stata recepita in Italia dal DPR 126/98.

La direttiva 99/92/CE è stata recepita in Italia dal DLgs 233/03 che ha modificato il D. Lgs. 626/94, introducendo il Titolo VIII-bis che comprende gli articoli da 88-bis a 88-undicies. Con l'entrata in vigore del D. Lgs 9 aprile 2008 n. 81, il D. Lgs. 626/94 è stato abrogato ed il relativo Titolo VIII-bis è stato integrato all'interno del Titolo XI del D. Lgs 9 aprile 2008 n. 81.

Poiché all'interno dell'impianto pilota ECO-SI viene prodotto biogas è stato necessario affidare ad uno studio specializzato la classificazione degli ambienti per la possibile formazione di atmosfere esplosive.

Lo scopo dello studio a riguardo è l'individuazione dei luoghi pericolosi, la loro classificazione e la determinazione della loro estensione, al fine di determinare la corretta scelta ed installazione delle apparecchiature da impiegare con sicurezza in tali luoghi.

Nella maggior parte delle situazioni pratiche in cui si è in presenza di sostanze infiammabili è difficile garantire che non vi possa mai essere la presenza di atmosfera esplosiva., inoltre è difficile garantire che una apparecchiatura non sia mai una sorgente di accensione. Perciò in situazioni in cui vi sia un'alta probabilità di presenza di atmosfera esplosiva ci si affida all'uso di apparecchiature che hanno una bassa probabilità di essere sorgenti di accensione. Per contro, dove la probabilità che vi sia un'atmosfera esplosiva è ridotta, si possono impiegare apparecchiature realizzate secondo criteri meno severi. Al fine della determinazione del tipo di zona pericolosa che si può generare e della sua estensione, è necessario uno studio dettagliato degli impianti.

Solo dopo aver determinato la tipologia di sostanze pericolose presenti, le possibili sorgenti di emissione, la frequenza e la durata dell'emissione (e quindi il grado delle emissioni), la portata, la concentrazione, la velocità di emissione, la ventilazione e gli altri fattori che influenzano il tipo e/o l'estensione delle zone, si dispone di una solida base per stabilire la possibile presenza di un'atmosfera esplosiva. Non sempre d'altra parte è possibile un'esatta conoscenza dei fattori sopra, per cui si deve necessariamente far ricorso a valori stimati che siano il più possibile aderenti alla realtà.

All'interno dell'impianto ECO-SI viene prodotto del biogas, il quale si presume sia così composto:

- Idrogeno (H<sub>2</sub>): 26%
- Metano (CH<sub>4</sub>): 30%
- Anidride carbonica (CO<sub>2</sub>): 44%

Tra i componenti del biogas, quelli con caratteristiche di infiammabilità sono l'idrogeno ed il metano. A causa delle caratteristiche di esplosività dell'idrogeno, più pericoloso del

metano ci si riferisce ad esso per la classificazione delle aree pericolose. Ad ulteriore vantaggio della sicurezza, si ipotizza poi che il biogas sia composto solo da idrogeno.

Di seguito sono illustrate le caratteristiche principali dell'idrogeno:

- densità relativa all'aria: 0,07
- densità:  $\rho_{\text{gas}} = 0,0843 \text{ kg/m}^3$
- massa molare:  $M = 2,016 \text{ kg/Kmol}$
- rapporto tra i calori specifici:  $\gamma = 1,41$
- limite inferiore di esplosibilità:  $\text{LEL } \% = 4 \% = 0,003355 \text{ kg/ m}^3$
- temperatura di accensione:  $500 \text{ }^\circ\text{C}$
- temperatura di infiammabilità:  $< 0 \text{ }^\circ\text{C}$
- coefficiente di diffusione del gas:  $cd = 0,148 \text{ m}^2/\text{h}$
- temperatura di ebollizione:  $-252,7 \text{ }^\circ\text{C}$
- gruppo delle costruzioni elettriche: II C
- classe di temperatura: T1

La metodologia per l'individuazione degli ambienti prevede i seguenti passaggi:

- Individuazione delle sostanze infiammabili presenti e delle loro caratteristiche significative
- Esame di tutti i componenti dell'impianto che contengono sostanze infiammabili ed individuazione delle sorgenti di emissione
- Per ciascuna sorgente di emissione, definizione del grado o gradi di emissione
- Analisi delle influenze di tutte le emissioni sulla classificazione del luogo
- Per ogni sorgente di emissione e grado di emissione, definizione dei valori cautelativi dei parametri che influenzano il tipo e l'estensione delle zone (es. portata di emissione, velocità di emissione, ecc.).
- Definizione della temperatura ambiente di riferimento e delle caratteristiche della ventilazione (grado e disponibilità)
- Per ogni sorgente di emissione e grado di emissione, individuazione dei tipi di zone
- Per ogni sorgente di emissione e grado di emissione, determinazione dell'estensione delle singole zone
- Esecuzione dell'involuppo delle zone per ottenere la classificazione del luogo o dei luoghi con pericolo di esplosione
- Nell'eseguire l'involuppo delle zone si deve ricordare di distinguerle in relazione al "gruppo per le costruzioni" (es. IIB) e "classe di temperatura" (es. T3).

In Appendice 2 viene riportata la pianta con riferimento alla classificazione degli ambienti a rischio di esplosione individuata dai calcoli tecnici effettuati.

## 2.4 Prove di laboratorio

### 2.4.1 Test di produzione potenziale di metano (BMP)

Valutare la biodegradabilità anaerobica (BMP) di una matrice organica significa quantificarne la produzione in termini di metano in condizioni ottimali e di conseguenza valutare la fattibilità dell'utilizzo della via anaerobica per la biodegradazione.

Per la valutazione del BMP si possono adottare metodi di stima indiretti o metodi di misura diretti.

I metodi di stima indiretti consistono nell'uso di formule empiriche che calcolano, sull'analisi chimico-fisica della matrice, la quantità di metano attesa nella biodegradazione.

I metodi di misura diretti sono invece basati su prove sperimentali di biodegradazione anaerobica, la cui durata può variare, a seconda della matrice utilizzata, da pochi giorni (nel caso di substrati rapidamente biodegradabili) a molte decine di giorni (nel caso di matrici refrattarie).

La misura di BMP fornisce, dunque, una quantità massima di metano che può essere prodotta, riferita all'unità di massa della matrice, e la rapidità con cui il substrato viene convertito a metano, questo valore risulta di largo interesse sia in fase di dimensionamento che di gestione di un impianto a larga scala.

Unità di misura tipiche del BMP rapportano il volume di metano prodotto durante la prova alla massa di solidi volatili alimentati o degradati ( $LCH_4/kgSV_{in\ o\ degr}$ ) oppure all'unità di COD alimentato o degradato ( $LCH_4/kgCOD_{in\ o\ degr}$ ).

Il substrato di prova deve essere caratterizzato per lo meno in termini di umidità, tenore di volatili e carico organico associato, in modo da riuscire a riferire il quantitativo di metano prodotto al contenuto di sostanza organica inizialmente presente, o a quella degradata.

Per tali caratterizzazioni ci si può riferire alle indicazioni presenti nel paragrafo 2.2.

In questo studio è stata condotta una prova di misura del BMP del siero di latte ultrafiltrato proveniente dal caseificio PLAC e del permeato di un impianto pilota di dark fermentation installato presso il DICA del Politecnico di Milano, per valutare le filiere A e B dell'impianto ECO-SI.

Normalmente in una prova di BMP è da prevedere l'utilizzo di un inoculo; nella prova di BMP è stato utilizzato il fango granulare precedentemente caratterizzato come inoculo.

Il carico organico associato a tali matrici e la caratterizzazione del fango in termini di solidi volatili sono riportate in Tabella 2.22.

Tabella 2.22 Caratteristiche matrici ed inoculo per la prova BMP

<b>Siero di latte</b>	150	<i>gCOD/L</i>
<b>Permeato del reattore di DF</b>	20	<i>gCOD/L</i>
<b>SV inoculo</b>	0,18	<i>gSV/g TQ sgocciolato</i>

### Allestimento e conduzione della prova

I test BMP nello studio in esame sono stati effettuati con l'AMPTS in doppio, prevedendo cioè, a lato del test, un bianco di prova.

Il bianco consiste in un test condotto con il solo fango di inoculo, alle medesime condizioni di temperatura, miscelazione, quantità di soluzione di nutrienti ecc, ma senza aggiunta del substrato da testare.

Le bottiglie di prova sono state preparate secondo i quantitativi illustrati in Tabella 2.23

Tabella 2.23 Allestimento della prova di BMP

		<b>Bianco</b>	<b>Test 1 siero</b>	<b>Test 2 siero</b>	<b>Test 1 permeato</b>	<b>Test 2 permeato</b>
Vtot	<i>mL</i>	500	500	500	500	500
Soluzione nutrienti	<i>mL</i>	50	50	50	50	50
Inoculo	<i>g TQ sgocciolati</i>	25	25	25	25	25
Feed	<i>mL</i>	0	15	15	25	25
Acqua dechlorata	<i>mL</i>	450	435	435	425	425
COD	<i>g/L</i>	0	4,5	4,5	1	1
Biomassa	<i>g/L</i>	9	9	9	9	9
F/M	<i>gCOD/gSV</i>	0	0,5	0,5	0,11	0,11

Il rapporto F/M (*Food to Microorganism ratio*) rappresenta la quantità di sostanza organica dosata rispetto alla quantità di inoculo inserito nella bottiglia; rappresenta uno degli aspetti più rilevanti di una prova poiché è correlabile a:

- rateo di produzione di metano per unità di volume di prova, che risulta crescente all'aumentare di F/M, a parità di altre condizioni
- durata della prova, che risulta crescente all'aumentare di F/M, a parità di altre condizioni
- concentrazione iniziale di substrato nel reattore, che risulta crescente all'aumentare di F/M, a parità di altre condizioni
- rischio di accumulo di acidi grassi volatili, che risulta crescente all'aumentare di F/M, a parità di altre condizioni
- rischio di inibizione per effetto di sostanze presenti nel substrato, che risulta crescente all'aumentare di F/M, a parità di altre condizioni



Una volta preparate, le bottiglie di prova vengono poste nel bagno termostatico dell'AMPTS, collegate all'apparecchiatura e degasate con N<sub>2</sub> per evitare che parte del substrato venga consumato in condizioni aerobiche dalla biomassa facoltativa.

Nel corso della prova le bottiglie vengono mantenute a temperatura costante, pari a 37°C, grazie ad un bagno termostatico, e a miscelazione intervallata ogni 5 minuti; la prova è durata circa 6 giorni.

Al termine della prova è stato misurato il pH del contenuto delle bottiglie per verificare che il processo biologico fosse avvenuto correttamente e che non si fossero verificate intrusioni di soda proveniente dalle trappole della CO<sub>2</sub>.

#### 2.4.2 Test di produzione potenziale di idrogeno (BHP)

I test di BHP (*Biochemica Hydrogen Potential*) sono stati effettuati per valutare il futuro inoculo del reattore di Dark Fermentation (B-02) dell'impianto pilota.

Sono state dunque valutate le rese in termini di idrogeno prodotto/mole di lattosio alimentato sia di ceppi puri selezionati dal laboratorio di ricerche biotecnologiche dell'UCSC, sia del fango prelevato dal reattore di DA dell'impianto pilota, pre-trattato termicamente, entrambi descritti nel paragrafo 2.2.2

##### **BHP con ceppi batterici selezionati**

I ceppi puri utilizzati per le prove sono stati testati sia singolarmente sia in diverse combinazioni per valutare gli effetti sintropici tra diversi ceppi batterici e le rese ad essi associati, come descritto nel paragrafo 2.2.2; tutte le prove sono avvenute in triplo.

##### **Allestimento e conduzione della prova**

I test BHP nello studio in esame sono stati effettuati con l'AMPTS. Lo strumento misura l'idrogeno prodotto per via volumetrica. Il gas prodotto all'interno dei digestori, composto sostanzialmente da idrogeno e anidride carbonica, passa attraverso l'unità di cattura dei gas acidi in grado di sottrarre la CO<sub>2</sub>. Il gas misurato è pertanto solamente idrogeno.

Per ogni mix di prova sono state previste tre bottiglie e non è stata preparata una prova di bianco poiché la produzione in assenza di substrato da parte di biomasse selezionate è prossima allo zero.

Le bottiglie sono state preparate aggiungendo una soluzione tampone di MES, come descritto nel paragrafo 2.2.4, per evitare abbassamenti del pH che potessero inibire la biomassa.

Una volta preparate, le bottiglie di prova sono state mantenute dodici ore in cappa anaerobica per consumare tutto l'ossigeno presente. Non vi è infatti, all'interno della bottiglia di prova, una biomassa facoltativa, in grado di consumare velocemente l'ossigeno residuo in condizioni aerobiche. Pertanto in questo caso, anche se in basse concentrazioni, la presenza di questo gas può risultare altamente inibente nei confronti del processo.

Il carico organico associato al siero utilizzato come substrato e alle biomasse inoculate e la concentrazione di MES è riportato in Tabella 2.24.

*Tabella 2.24 Carico organico associato al siero, alle sospensioni microbiologiche e concentrazione del tamponamento per le prove BHP*

<b>Siero di latte</b>	150	<i>gCOD/L</i>
<b>Sospensioni microbiche</b>	50,1	<i>gCOD/L</i>
<b>MES in acqua dechlorata</b>	20	<i>gMES/L</i>

Le bottiglie di prova sono state preparate tutte secondo i quantitativi illustrati in Tabella 2.25. Si noti come l'inoculo sia fornito in termini volumetrica a prescindere dalle misure di ST ed SV che solitamente lo accompagnano. La concentrazione di tali inoculi è infatti avvenuta per conta totale al microscopio (conta diretta al microscopio a contrasto di fase utilizzando la camera di Toma-Zeiss) da parte del laboratorio che ha effettuato la selezione dei ceppi batterici utilizzati.

*Tabella 2.25 Allestimento della prova di BHP con ceppi puri*

Volume di prova	100	<i>mL</i>
Soluzione di MES	90	<i>mL</i>
Siero di latte UF	8	<i>mL</i>
Sospensione microbica	3	<i>mL</i>
COD iniziale	1,25	<i>g</i>
COD iniziale	13	<i>g/L</i>
MES iniziale	2	<i>g</i>
Rapporto MES/COD	1,44	<i>gMES/gCOD</i>

Al termine delle prove è stato misurato il pH all'interno di ciascuna bottiglia in modo tale da verificare l'andamento della prova e poter in seguito mettere in relazione a tale parametro le rese di produzione.

A fine prova, è stata filtrata (con filtro in acetato di cellulosa 0,45 µm), per ogni bottiglia, un'aliquota di mixed liquor, sulla quale è stata fatta l'analisi degli acidi grassi volatili prodotti. A partire dall'analisi della tipologia dei metaboliti prodotti sono state fatte le considerazioni sui percorsi metabolici intrapresi dalla biomassa batterica.

### **BHP con ceppi fango pretrattato termicamente**

I test di BHP con fango pretrattato termicamente sono stati effettuati sempre con l'AMPTS. Il fango è stato pretrattato per selezionare la biomassa, eliminando i batteri responsabili della formazione del metano, come descritto nel paragrafo 2.2.2.

A differenza dei BHP con i ceppi batterici puri, in questo caso i test sono stati effettuati in doppio e le bottiglie non sono state inoculate in cappa anaerobica bensì semplicemente degasate con N<sub>2</sub>, come previsto per i BMP.

Le prove sono state condotte in due momenti: a due settimane (avvio della prova in data 2 marzo) e ad un mese (avvio della prova 13 marzo) dalla messa in funzione del reattore da cui è stato prelevato il fango. (Per messa in funzione non si intende la data di avvio della fase di monitoraggio, il 27 febbraio -data stabilita in base ad una minima stabilità di processo raggiunta- bensì il 16 febbraio, a partire da cui la biomassa è stata alimentata con siero di latte ultrafiltrato in modo continuativo).

Durante la prova sono state fatte due analisi del gas con la tecnica cromatografica, prelevando 1 mL di gas da un setto (Figura 2.11) posto, prima dell'inizio della prova, tra il digestore e la trappola di cattura dei gas acidi.

Queste prove sono state effettuate solo sulle prove BHP con biomassa pretrattata per verificare la buona riuscita del pretrattamento. L'analisi così condotta non è infatti quantitativamente significativa per quanto riguarda le percentuali di H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> del biogas prodotto, poiché il gas che si ritrova presente in percentuale maggiore è l'azoto, con cui viene flussato il digestore per creare all'interno condizioni anaerobiche. L'utilità di tali analisi risiede invece nella conferma della buona riuscita del pretrattamento termico effettuato qualora non venga reperito metano nel gas prelevato.



*Figura 2.11 Setto per il prelievo del gas nel corso della prova*

Il carico organico associato al siero utilizzato come substrato e la concentrazione di solidi volatili nel fango pretrattato, rispettivamente per le prove 1 e 2, sono illustrati in Tabella 2.26.

Tabella 2.26 Caratteristiche del substrato e del fango di inoculo

<b>Siero di latte UF</b>	62	gCOD/L
<b>Solidi volatili prova 1</b>	18,75	gSSV/L
<b>Solidi volatili prova 2</b>	9,85	gSSV/L

Le bottiglie di prova sono state preparate secondo i quantitativi illustrati in Tabella 2.27

Tabella 2.27 Allestimento della prova di BHP con fango pretrattato

		<b>Test 1 e 2 prima prova</b>	<b>Test 1 e 2 seconda prova</b>
Vtot	mL	200	200
Acqua dechlorata	mL	85	85
Siero di latte UF	mL	40	40
Sospensione microbica	mL	75	100
COD iniziale	g	2,46	2,46
COD iniziale	g/L	12,3	12,3
MES iniziale	g	3,5	3,5
SSV	g/L	7,03	5
MES/COD	gMES/gCOD	1,42	1,42

Al termine delle prove è stato misurato il pH all'interno di ciascuna bottiglia in modo tale da poter verificare l'andamento della prova e poter in seguito mettere in relazione le rese di produzione a tale parametro.

Inoltre è stata filtrata per ogni bottiglia a fine prova (con filtro in acetato di cellulosa 0,45 µm) un'aliquota di mixed liquor, sulla quale è stata fatta l'analisi degli acidi grassi volatili prodotti, a partire dai quali sono state fatte le considerazioni sui percorsi metabolici della biomassa batterica.

### 2.4.3 Test di attività metanogenica specifica (SMA)

Come già visto nel Capitolo 1.2.2, la fase limitante del processo di digestione anaerobica può essere l'idrolisi, nel caso di substrati lentamente biodegradabili, o la metanogenesi nel caso di substrati rapidamente biodegradabili. Nel caso della digestione anaerobica di siero di latte, una matrice organica già idrolizzata, la fase limitante del processo risulta quindi essere la metanogenesi.

Per un buon equilibrio di processo è importante perciò che non si accumulino acidi grassi volatili, e che il sistema non risulti sovraccaricato.

Al fine di determinare la massima velocità della fase limitante, si possono effettuare in batch prove di attività specifica.

L'attività di un microrganismo quantifica la velocità con cui esso è in grado di compiere la propria attività metabolica, degradando il substrato nei vari sottoprodotti metabolici.

Nel caso della metanogenesi, le prove di attività specifica sono dette SMA (*Specific Methanogenic Activity*) e sono misurate in metano prodotto dall'unità di biomassa nell'unità di tempo (ad esempio in  $NmLCH_4/gSV/h$ ).

Le prove di SMA possono essere condotte per identificare il fango più adatto per essere inoculato per una prova di BMP, per monitorare la stabilità di un digestore a valle di cambiamenti nelle modalità di alimentazione o gestione, o per valutare il massimo carico applicabile in un reattore durante la fase di avvio.

In questo studio sono state effettuate prove SMA sia per la scelta del fango di inoculo per il reattore di digestione anaerobica dell'impianto pilota, sia per la scelta del carico alimentabile durante la fase di avvio.

Nel caso della prova di attività metanogenica specifica si dosa una soluzione di acetato, poiché è il prodotto della fase acetogenica, e l'alimento per quella metanogenica, in un processo di digestione completo.

L'acetato dosato nelle prove di SMA effettuate è l'acetato di sodio ( $C_2H_3NaO_2$ ), di cui è stata preparata una soluzione caratterizzata da 10 gCOD/L. Per le prove di SMA viene solitamente scelto l'acetato di sodio, per la sua capacità di mantenere costante il pH, per la sua leggera basicità dovuta ad idrolisi basica.

Le prove di SMA per la scelta del fango di inoculo sono state eseguite sul primo fango testato (proveniente dall'impianto di trattamento dei reflui di PLAC) in doppio e per due concentrazioni di biomassa differenti (circa 5 e circa 10 gSSV/L); la prova effettuata sul fango granulare di Cartiera Giorgione sono invece state effettuate solo alla concentrazione di 5 g/L, come illustrato in Tabella 2.28.

Tabella 2.28 Allestimento della prova di SMA per la scelta del fango di inoculo

		Digestato PLAC				Digestato Cartiera Giorgione	
		Bianco 1	Test 1	Bianco 2	Test 2	Bianco	Test
Vtot	<i>mL</i>	500	500	500	500	500	500
Soluzione nutrienti	<i>mL</i>	50	50	50	50	50	50
Inoculo	<i>mL</i>	110	110	220	220	25	25
Soluzione di acetato di sodio	<i>mL</i>	0	50	0	50	0	50
Acqua dechlorata	<i>mL</i>	340	290	230	180	450	400
COD	<i>g/L</i>	0	1	0	1	0	1
Biomassa	<i>g/L</i>	4,89	4,89	9,79	9,79	5,25	5,25
F/M	<i>gCOD/gSV</i>	0	0,20	0	0,10	0	0,19
F/M	<i>gCOD/gCOD</i>	0	0,15	0	0,08	0	0,14

A fine prova viene misurato il pH per verificare che la prova si sia svolta correttamente, senza intrusioni di soda nel reattore che possono verificarsi se si crea depressione nello spazio di testa del reattore.

Le prove di SMA per la valutazione del carico massimo applicabile al digestore, sono state effettuate con cadenza circa bisettimanale (quando non sono occorsi problemi al funzionamento) e a condizioni di concentrazione di biomassa per quanto più possibile simili tra una prova e l'altra, il quantitativo di soluzione di acetato a 10gCOD/L è rimasto sempre invariato.

Le prove sono state allestite come illustrato nelle Tabella 2.29, 2.30 e 2.31; per ogni prova è stato previsto un bianco.

Tabella 2.29 Allestimento della SMA il giorno di inoculo del digestore

<b>data</b>		<b>09/02/15</b>	
		Test	Bianco
Vtot	<i>mL</i>	500	500
Soluzione nutrienti	<i>mL</i>	50	50
Inoculo	<i>g TQ sgocciolato</i>	25	25
Soluzione di acetato di sodio	<i>mL</i>	50	0
Acqua declorata	<i>mL</i>	400	450
COD	<i>g/L</i>	1	0
Biomassa	<i>g/L</i>	4,8	4,8
F/M	<i>gCOD/gSV</i>	0,2	0
F/M	<i>gCOD/gCOD</i>	0,15	0
Concentrazione SV	<i>gSV/g TQ sgocciolato</i>	0,1	

Tabella 2.30 Allestimento delle prove SMA nel corso della fase di avvio dell'impianto pilota

<b>data</b>		<b>19/02/2015</b>		<b>24/02/2015</b>		<b>02/03/2015</b>		<b>06/03/2015</b>	
		Test	Bianco	Test	Bianco	Test	Bianco	Test	Bianco
Vtot	<i>mL</i>	500	500	500	500	500	500	500	500
Soluzione nutrienti	<i>mL</i>	50	50	50	50	50	50	50	50
Inoculo	<i>mL</i>	110	110	200	200	220	220	240	240
Soluzione di acetato di sodio	<i>mL</i>	50	0	50	0	50	0	50	0
Acqua declorata	<i>mL</i>	290	340	200	250	180	230	160	210
COD	<i>g/L</i>	1	0	1	0	1	0	1	0
Biomassa	<i>g/L</i>	7,3	7,3	3,6	3,6	3,6	3,6	3,9	3,9
F/M	<i>gCOD/gSV</i>	0,1	0	0,3	0	0,3	0	0,3	0
F/M	<i>gCOD/gCOD</i>	0,10	0	0,21	0	0,20	0	0,19	0
Conc. SSV	<i>gSSV/L</i>	33,3		9,0		8,3		8,2	

Tabella 2.31 Allestimento delle prove SMA

data		19/02/2015		24/02/2015		02/03/2015		06/03/2015	
		Test	Bianco	Test	Bianco	Test	Bianco	Test	Bianco
Vtot	<i>mL</i>	500	500	500	500	500	500	500	500
Soluzione nutrienti	<i>mL</i>	50	50	50	50	50	50	50	50
Inoculo	<i>mL</i>	220	220	240	240	240	240	240	240
Soluzione di acetato di sodio	<i>mL</i>	50		50		50		50	
Acqua dechlorata	<i>mL</i>	180	230	160	210	160	210	160	210
COD	<i>g/L</i>	1	0	1	0	1	0	1	0
Biomassa	<i>g/L</i>	3,7	3,7	3,7	3,7	3,9	3,9	4,0	4,0
F/M	<i>gCOD/gSV</i>	0,3	0	0,3	0	0,3	0	0,3	0
F/M	<i>gCOD/gCOD</i>	0,20	0	0,20	0	0,19	0	0,19	0
Conc. SSV	<i>gSSV/L</i>	8,4		7,8		8,1		8,3	

Al termine delle prove viene controllato il valore del pH nel mixed liquor per controllare che il processo sia avvenuto correttamente.

## 2.5 Descrizione del modello utilizzato per il calcolo della % di biomassa attiva

Il modello a cui si è fatto riferimento in questo studio per il calcolo della percentuale di biomassa attiva all'interno del fango è una semplificazione del modello ADM1 (IWA 2002).

Poiché il sistema obiettivo della modellizzazione sono le prove di SMA, in cui la biomassa è alimentata con una matrice "ideale", quale l'acetato di sodio, già disponibile per la fase di metanogenesi, i meccanismi considerati dal modello sono semplicemente la crescita della biomassa metanigena acetoclastica, che avviene in concomitanza del consumo di substrato, e il decadimento batterico.

Due sono pertanto le velocità che caratterizzano il processo nel suo complesso:

- la velocità di crescita netta della biomassa
- la velocità di degradazione del substrato

La velocità di crescita netta dei microrganismi, che tiene conto del decadimento endogeno (dato dal prodotto  $k_d X$ ), è data dalla espressione generale (Malpei et al., 2007)

$$\frac{dX}{dt} = Y \frac{dS}{dt} - k_d X \quad [23]$$



Dove:  $\frac{dX}{dt}$  è la velocità di crescita dei microrganismi, [massa volume<sup>-1</sup> tempo<sup>-1</sup>];

Y è il coefficiente di rendimento di crescita, [massa microrganismi formati massa substrato utilizzato<sup>-1</sup>];

$\frac{dS}{dt}$  è la velocità di utilizzazione del substrato da parte dei microrganismi, [massa volume<sup>-1</sup> tempo<sup>-1</sup>];

$k_d$  è il coefficiente di decadimento dei microrganismi, [tempo<sup>-1</sup>];

X è la concentrazione di microrganismi, [massa volume<sup>-1</sup>].

La degradazione del substrato, in un percorso fermentativo, è descritta da modello cinetico di Michaelis-Menten o di Monod (l'uno derivato teoricamente sulla base di alcune assunzioni inerenti le cinetiche enzimatiche e l'altro osservato sperimentalmente); l'andamento della degradazione è ben rappresentato da una cinetica a saturazione, esprimibile analiticamente attraverso la relazione 24.

$$\frac{dS}{dt} = K_M X \frac{S}{k_s + S} \quad [24]$$

dove:  $\frac{dS}{dt}$  è la velocità di consumo del substrato da parte dei microrganismi, [massa volume<sup>-1</sup> tempo<sup>-1</sup>];

$K_M$  è la massima velocità di utilizzo del substrato per unità di massa di microrganismi, [tempo<sup>-1</sup>];

X è la concentrazione di microrganismi, [massa volume<sup>-1</sup>];

S è la concentrazione del substrato a contatto con i microrganismi, [massa volume<sup>-1</sup>];

$K_s$ , coefficiente di semisaturazione, corrispondente alla concentrazione di substrato S alla quale la velocità di utilizzo del substrato per unità di massa di microrganismi è pari alla metà della velocità massima, [massa volume<sup>-1</sup>].

Data l'espressione matematica della cinetica si può osservare che la velocità tende al suo massimo per valori di concentrazione del substrato S grandi o per valori di Ks piccoli.

Dalla combinazione delle due equazioni cinetiche di crescita dei microrganismi e di utilizzo del substrato esposte si riceve l'equazione seguente

$$\mu = \mu_{MAX} \frac{S}{K_S + S} - K_d \quad [25]$$

dove:  $\frac{1}{x} \frac{dX}{dt}$  è la velocità di crescita dei microrganismi per una data concentrazione di substrato S, [tempo<sup>-1</sup>];

$\mu_{MAX}=K_M Y$  è la massima velocità di crescita dei microrganismi, [tempo<sup>-1</sup>];

S, concentrazione del substrato a contatto con i microrganismi, [massa volume<sup>-1</sup>];

$K_s$  è il coefficiente di semisaturazione, corrispondente alla concentrazione di substrato S alla quale la velocità di utilizzo del substrato per unità di massa di microrganismi è pari alla metà della velocità massima, [massa volume<sup>-1</sup>];

$k_d$  è il coefficiente di decadimento dei microrganismi, [tempo<sup>-1</sup>].

Il modello ADM1 suddivide le reazioni coinvolte nella digestione anaerobica in due gruppi: i processi biochimici (ossia reazioni enzimatiche di tipo extra- ed intracellulare protratte da biomassa batterica) e i processi chimico-fisici.

Tra i processi biochimici il modello considera le reazioni extracellulari di disintegrazione ed idrolisi ed intracellulari di acidogenesi, acetogenesi e metanogenesi. La disintegrazione include sia il processo di solubilizzazione di un substrato solido, sia il processo di decadimento cellulare in seguito alla morte dei microrganismi. L'idrolisi segue la disintegrazione e coinvolge il substrato solubilizzato sotto forma di molecole complesse.

Questi processi extracellulari vengono definiti con cinetiche di primo ordine: viene utilizzata una cinetica di tipo Monod per l'assorbimento e l'utilizzo dei composti coinvolti nelle reazioni intracellulari. La crescita cellulare è inclusa nelle cinetiche di Monod, mentre la morte cellulare viene rappresentata da una cinetica di primo ordine. Sono incluse anche funzioni per descrivere gli effetti inibitori del pH, dell'idrogeno e dell'ammoniaca libera. Il modello inoltre include anche cinetiche di Monod secondarie per i processi che utilizzano azoto inorganico, e per i processi che utilizzano il acido valerico ed il acido butirrico. Le espressioni delle cinetiche biochimiche sono presentate in Appendice, dove è riportata la matrice Peterson creata secondo il formato di Henze et. Al (1986).

Per processi "chimico-fisici" si intendono invece quelle trasformazioni non mediate dai microrganismi che avvengono comunemente nei digestori anaerobici. In questa categoria vengono incluse: trasformazioni di tipo liquidoliquido (dissociazioni/associazioni ioniche) e fenomeni di diffusione tra la fase gassosa e la fase liquida. Le trasformazioni che coinvolgono la fase solida (precipitazione, solubilizzazione) non sono incluse nel modello. Il modello utilizza equazioni di tipo algebrico per descrivere i processi chimico-fisici, che vengono implementati a seconda delle condizioni che devono essere simulate. Il modello ADM1 quindi, utilizza una vasta gamma di equazioni algebrico differenziali

più o meno complesse ed interconnesse, la cui risoluzione non è fattibile con un semplice foglio di calcolo.

In questo studio è stata utilizzata un'estrema semplificazione del modello ADM1 poiché il processo che si intende simulare è la digestione di una matrice ottimale per la biodegradazione e già disponibile sotto forma di acetato.

Inoltre le prove sono condotte in condizioni ottimali di temperatura e pH pertanto non sono considerate inibizioni.

La semplificazione di ADM1 considerata permette la simulazione discreta della concentrazione del substrato grazie al calcolo, per ogni intervallo di tempo, della velocità effettiva di consumo del substrato, della concentrazione della biomassa, e dunque della crescita della stessa, del metano prodotto per ogni intervallo di tempo e del metano cumulato.

Il modello necessita come input dei seguenti parametri riguardo le condizioni di prova

- concentrazione del COD in ingresso, espresso in mg/L
- volume di prova
- concentrazione dei solidi sospesi volatili nella bottiglia di prova

e dei dati sperimentali orari della prova di SMA effettuata.

Le costanti cinetiche considerate sono quelle riportate dal modello ADM1:

- la velocità massima di consumo del substrato da parte della biomassa attiva, pari ad 11,36 gCOD/gSSV/d;
- la costante di semisaturazione  $k_s$  pari a 150 mgCOD/L;
- la costante di decadimento batterico (pari a 0,02)

Il calcolo della velocità effettiva di consumo di substrato è eseguito mediante la relazione 26;  $S$  e  $K_s$  sono espressi in gCOD/L, la velocità massima in gCOD/gSSV/d

$$v_{eff} = v_{max} \frac{S}{K_s + S} \quad [26]$$

La concentrazione del substrato al tempo  $t+1$  è data dall'equazione 27, dove  $X$  è la concentrazione di biomassa nella prova al tempo

$$S_{t+1} = S_t - v_{eff} X_t \Delta_t \quad [27]$$

La concentrazione di biomassa  $X$  al tempo  $t+1$  è data dall'equazione 28

$$X_{t+1} = X_t + (Y v_{eff} - k_d) \Delta_t \quad [28]$$

Il metano prodotto per ogni intervallo di tempo è calcolato tramite la relazione 29, dove  $V$  è il volume della prova e 0,35 è il fattore di conversione di  $\text{CH}_4$  prodotto per COD consumato ( $\text{LCH}_4/\text{gCOD}$ )

$$(\text{CH}_4 \text{ prodotto})_t = (1 - Y)v_{eff}X_tV \times 0,35 \quad [29]$$

La curva simulata di metano prodotto che si ottiene è disegnata per punti tramite il calcolo, per ogni  $\Delta t$ , del metano cumulato, calcolato secondo l'espressione 30.

$$(\text{CH}_4 \text{ cumulato})_t = \text{CH}_4 + (\text{CH}_4 \text{ prodotto})_{t+1}\Delta t \quad [30]$$

La curva di metano cumulato simulata viene “fittata” su quella ottenuta sperimentalmente variando la percentuale di biomassa attiva presente nel fango, poiché è la sola che realmente opera la degradazione della matrice organica.

Il parametro di ottimizzazione del processo è la somma degli scarti quadratici tra la curva simulata e quella sperimentale, che viene portata a 0 variando la % di biomassa attiva.

Le simulazioni effettuate sono illustrate nel successivo capitolo.

## 2.6 Avvio dell'impianto pilota (filiera A)

Il reattore di digestione anaerobica dell'impianto pilota ECO-SI è stato inoculato con 2,4  $\text{m}^3$  di fango granulare proveniente dalla Cartiera Giorgione (caratterizzato nel paragrafo 2.2.2) il 9 Febbraio 2015. Il digestato proveniente dall'impianto di trattamento dei reflui di cartiera è stato scelto in seguito alle prove di SMA effettuate sui due fanghi possibili per l'inoculo del digestore ECO-SI.

Il reattore è stato inoculato al 100% ed è stato mantenuto all'interno un SRT infinito (non vi è stata estrazione di fango) durante tutta la fase di avvio.

In seguito all'inoculo si è verificato l'impaccamento dell'unità di ultrafiltrazione causata dalla sgranulazione del fango: si è pertanto eseguito un parziale svuotamento del reattore fino a che è stata ottenuta all'interno una concentrazione di SST pari a circa 10 g/L. Per questo motivo il reale avvio dell'impianto è stato considerato in data 27 febbraio.

Quotidianamente sono stati prelevati campioni di siero in ingresso (ultrafiltrato e diluito, e dunque a concentrazione di COD variabile) di mixed liquor e di permeato (Figura 2.12) e portati in laboratorio per le analisi illustrate in Tabella 2.32.

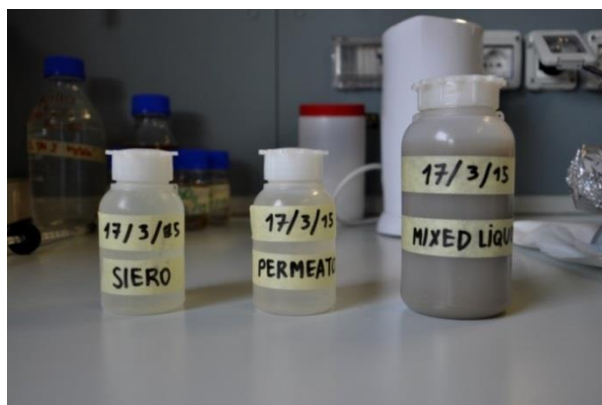


Figura 2.12 Campioni di siero permeato e mixed liquor per le analisi

Tabella 2.32 Parametri monitorati durante la fase di avvio

	Siero	Permeato	Mixed liquor
pH	X	X	X
COD	X	X	
N <sub>tot</sub>	X	X	
N-NH <sub>4</sub>	X	X	
VFA			X
ALK			X
FOS/TAC			X
SST			X
SSV			X
proteine			x
carboidrati			x

Di tutti i parametri è stato controllato quotidianamente il pH; su siero e permeato, rappresentando rispettivamente l'ingresso e l'uscita dal digestore, sono stati verificati tre volte a settimana il COD, l'Azoto totale e l'Azoto Ammoniacale; sul permeato ed il mixed liquor sono stati verificati, invece, i parametri di interesse per il controllo della stabilità del processo, pertanto, l'alcalinità, la concentrazione di acidi grassi volatili (tre volte a settimana) ed il valore del FOS/TAC (quotidianamente).

Sul mixed liquor è stata fatta tre volte a settimana l'analisi dei solidi sospesi totali e volatili in doppio e, con cadenza settimanale, un'analisi di buona miscelazione prelevando tre campioni a tre altezze diverse del reattore.

Inoltre per la scelta del carico in ingresso al reattore sono state effettuate prove SMA, come illustrato nel paragrafo precedente.

In base al massimo carico applicabile e alla concentrazione di solidi nel reattore è stata scelta la diluizione da operare sul siero tal quale in alimento; a tal proposito si è scelto un

fattore di sicurezza pari a 0,75. Un esempio del procedimento seguito è illustrato in Tabella 2.33.

*Tabella 2.33 Scelta della diluizione del siero tal quale*

Data in cui applicare la diluizione	04/03/2015	
Data analisi solidi	27/02/2015	
SST	8,1	kg/m <sup>3</sup>
SSV	7,5	kg/m <sup>3</sup>
Data ultima SMA	24/02/2015	
SMA	2,01	NmLCH <sub>4</sub> /g SSV/h
SMA	5,75	gCOD/g SSV/h
COD siero UF tal quale	60	kg/m <sup>3</sup>
Vol reattore	3	m <sup>3</sup>
Qd siero diluito	1	m <sup>3</sup> /d
COD carico max	3,1	kgCOD/d
COD concentrazione max	3,1	kgCOD/m <sup>3</sup>
FS	0,75	
COD concentrazione applicabile	2,33	kgCOD/m <sup>3</sup>
<b>Diluizione</b>	<b>3,88%</b>	

Inoltre, per mantenere il rapporto N:COD= 5:300 (Metcalf&Eddy 2002) ottimale per la crescita batterica è stata manualmente dosata ammoniaca nel reattore di stoccaggio del siero, B-01

Per il futuro monitoraggio del fouling di membrana è stato analizzato il contenuto di proteine e carboidrati del fango, principali componenti di SMP ed EPS, come descritto nel paragrafo 2.7.9.

La qualità del gas è stata analizzata una sola volta con l'analizzatore di gas portatile DG2 commercializzato da Eco-Control srl.

## 2.7 Determinazioni Analitiche

In questo capitolo vengono descritti gli indicatori e i parametri considerati nello studio in oggetto. Per tutti i campioni è stato analizzato il pH, per i campioni di fango è stato quantificato, di volta in volta, il tenore di sostanza secca e la frazione di solidi volatili rispetto ai totali. Durante la fase di monitoraggio dell'avvio dell'impianto pilota sono stati misurati il COD solubile, l'azoto totale e l'azoto ammoniacale in ingresso e in uscita, la concentrazione di acidi grassi volatili e l'alcalinità all'interno del reattore e nel permeato, la concentrazione ed il rapporto tra solidi totali e solidi volatili nel mixed liquor.

Inoltre è stato analizzato il contenuto di carboidrati e proteine caratterizzanti SMP ed EPS, per definire lo stato iniziale di queste caratteristiche nel fango di inoculo e nel fango presente nel digestore ad un mese dall'avvio.

Al termine delle prove di BHP sono state effettuate analisi di pH e di concentrazione e tipologia dei VFA prodotti durante la prova al fine di interpretare i percorsi metabolici seguiti dalla biomassa.

Un'analisi del COD solubile è stata effettuata come verifica del COD effettivamente alimentato alle prove di SMA.

Di seguito vengono riportate le metodologie e la strumentazione utilizzata per le determinazioni analitiche sopra elencate; nel capitolo seguente verranno descritti gli strumenti utilizzati in laboratorio per le prove, e l'impianto pilota installato presso PLAC.

### 2.7.1 pH

Il pH di una soluzione viene determinato per via potenziometrica utilizzando, una sonda costituita da un elettrodo a vetro collegata ad un dispositivo elettronico che raccoglie il segnale della sonda, calcola il valore di pH corrispondente e lo rappresenta su un display.

Lo strumento viene tarato con due soluzioni tampone a pH noto.

Le determinazioni di pH effettuate in questo studio sono state tutte effettuate con un pHmetro.

### 2.7.2 Solidi Totali e Solidi Volatili

La misura dei solidi totali presenti in un campione viene effettuata mediante l'evaporazione in stufa a 105°C della fase liquida. I solidi totali rappresentano ciò che rimane all'interno del crogiuolo dopo tale evaporazione; se si lavora con matrici particolarmente liquide è necessario un pretrattamento del campione su piastra a 100°C per ridurre il contenuto di umidità.

I solidi volatili, sono invece i solidi che evaporano una volta posto il campione in muffola a 550°C per circa due ore. Vengono calcolati come la differenza tra i solidi totali e ciò che rimane all'interno del crogiuolo al termine del trattamento in muffola (solidi non volatili).

I solidi volatili sono una misura del contenuto organico all'interno del campione. La sostanza organica infatti ad alte temperature si ossida e viene allontanata sotto forma di CO<sub>2</sub>; in questo caso bisogna prestare attenzione al fatto che anche alcuni composti inorganici, come ad esempio i carbonati, volatilizzano ad alte temperature.

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

### 2.7.3 Solidi Sospesi Totali e Solidi Sospesi Volatili

Con il termine “Solidi Sospesi Totali” si indicano tutte le sostanze indissolte che si trovano nel campione da analizzare. L’analisi dei solidi sospesi (totali e volatili) viene condotta, previa filtrazione, con le stesse modalità di quella di ST e SV, l’unica differenza è che ad essere inserito prima in stufa e poi in muffola non è un crogiuolo riempito del campione ma lo stesso filtro.

Nel caso interessi solo l’analisi degli SST si possono usare filtri con i pori del diametro di 0,45 µm in acetato di cellulosa; nel caso invece si voglia effettuare anche l’analisi degli SSV è necessario utilizzare filtri GFC, in fibra di vetro (dimensioni dei pori di 1,2 µm) poiché l’acetato di cellulosa è un materiale organico che ad alte temperature volatilizza. La misura dei solidi sospesi viene sempre riferita all’aliquota di campione filtrato; tipicamente di esprimono in g/L.

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

### 2.7.4 Azoto totale ed Azoto ammoniacale

Le misure di Azoto Totale  $N_{tot}$  ed Azoto Ammoniacale  $N-NH_4$  sono state effettuate mediante l’uso dei test in cuvetta pronti all’uso della Hach Lange.

I kit impiegati permettono di analizzare la concentrazione di Azoto Totale in un range da 20 a 100  $mgN_{tot}/L$  e di azoto ammoniacale tra 2 e 47  $mg N-NH_4/L$

In alcuni casi sono state utilizzate diluizioni per rientrare nel range del test.

### 2.7.5 Acidi Grassi Volatili

Gli acidi grassi volatili sono stati misurati durante la fase di monitoraggio dell’avvio del digestore e al termine delle prove di BHP.

Nel primo caso l’analisi è stata effettuata con i kit pronti all’uso della Hach Lange, poiché era di interesse il monitoraggio della concentrazione dei VFA per la verifica della stabilità del processo. La concentrazione dei VFA ottenuta con l’uso dei kit è espressa in  $mgCH_3COOH/L$ , per cui non è possibile rilevare la distinzione tra i vari acidi grassi volatili presenti nel sistema.

Poiché l’analisi in kit necessita di un campione limpido, le misure sono state effettuate sul campione di fango prelevato dal digestore preventivamente filtrato con filtro GFC.



La misura degli acidi grassi volatili espressi in  $\text{mgCH}_3\text{COOH/L}$  effettuata in kit è stata confrontata con i valori ottenuti con lo strumento che calcola il rapporto FOS/TAC, rapporto tra gli acidi grassi volatili (FOS) e l'alcalinità totale (TAC), risultando sempre inferiore.

Nel caso invece dei VFA prodotti durante le prove in batch di BHP è di grande interesse la distinzione tra i VFA prodotti; a seconda del percorso metabolico intrapreso dalla biomassa si ottengono infatti prodotti differenti, principalmente acido acetico, butirrico, propionico ed etanolo, a cui sono associate rese di produzione in termini di idrogeno molto diverse. Se infatti la sola produzione di acido acetico porterebbe ad una produzione di idrogeno pari a  $4 \text{ molH}_2/\text{mol}$  glucosio consumato, la produzione mista di acido acetico e butirrico in proporzione 2:3 fa calare la resa a  $2,5 \text{ molH}_2/\text{mol}$  glucosio consumato.

Per queste motivazioni le analisi dei VFA prodotti dalle prove BHP sono state effettuate mediante l'uso di un gas cromatografo in grado, a differenza delle analisi effettuate in kit, di distinguere i differenti VFA prodotti. Le analisi sono state condotte dal centro di ricerche biotecnologiche dell'Università Cattolica del Sacro Cuore di Cremona.

### 2.7.6 Alcalinità

La misura dell'alcalinità, espressa in  $\text{gCaCO}_3/\text{L}$ , è stata determinata mediante l'uso di kit pronti all'uso della Hach Lange.

Il potere tampone del mixed liquor è stato valutato sia su un campione dello stesso filtrato, sia sul permeato, risultando quest'ultimo leggermente inferiore, probabilmente a causa dell'alterazione dell'equilibrio dei carbonati durante la filtrazione in pressione attraverso la membrana.

La misura dell'alcalinità effettuata in kit è stata confrontata con i valori ottenuti con lo strumento che calcola il rapporto FOS/TAC, rapporto tra gli acidi grassi volatili (FOS) e l'alcalinità totale (TAC), risultando, durante la fase di avvio del digestore, sempre paragonabile.

### 2.7.7 FOS/TAC

Il rapporto tra acidi grassi volatili ed alcalinità totale è stato monitorato quotidianamente durante la fase di avvio del digestore; come riportato nel capitolo 1.2.11, valori di FOS/TAC nell'intervallo tra 0,2 e 0,3 indicano stabilità del sistema.

Tale rapporto viene calcolato per titolazione grazie allo strumento in Figura 2.13 *Strumento di misura del rapporto FOS/TAC*, che fornisce sia i valori di VFA e alcalinità separati (e i volumi di acido solforico dosati) sia il loro rapporto.



Figura 2.13 Strumento di misura del rapporto FOS/TAC

## 2.7.8 COD

Il COD (Chemical Oxygen Demand) rappresenta la quantità di ossigeno necessaria per ossidare chimicamente i composti organici ed inorganici presenti in un campione d'acqua; è espresso in  $\text{mgO}_2/\text{L}$ .

Le determinazioni di COD svolte in questo studio sono state condotte secondo lo standard internazionale ISO 15705:2002, utilizzando dei test in cuvetta della Hach Lange (range 100-2000  $\text{mgO}_2/\text{L}$ ), poiché di interesse la misura del solo COD solubile.

## 2.7.9 Proteine e Carboidrati

L'analisi degli SMP (Soluble Microbial Product) e degli EPS (Extracellular Polymeric Substance) viene condotta a partire dall'analisi di proteine e carboidrati, di cui principalmente sono costituiti.

Prima di procedere all'analisi di proteine e carboidrati il campione viene sottoposto ad un ciclo di centrifughe e filtrazioni, come illustrato in Figura 2.14.

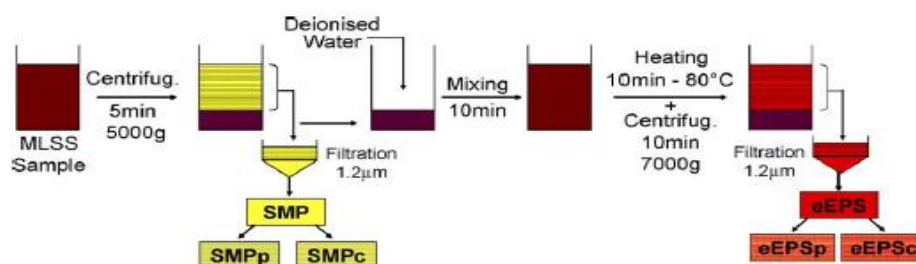


Figura 2.14. Procedura di estrazione delle soluzioni per la caratterizzazione di SMP ed EPS

Dopo la prima centrifuga il surnatante viene filtrato con un filtro di cellulosa (diametro dei pori 0,45  $\mu\text{m}$ ); il liquido che si ottiene contiene SMP, costituiti da proteine e carboidrati ma anche da possibili residui di substrato organico.

Ciò che rimane invece separato dal surnatante viene risospeso con acqua deionizzata e riportato al volume originale di 80 ml, mantenuto a 80 °C per circa 10 minuti e in seguito ricentrifugato. L'aumento di temperatura scioglie i legami con cui sono legati gli aggregati batterici; per questo sul surnatante estratto e filtrato possono essere fatte le analisi caratterizzanti gli EPS, costituiti da soli carboidrati e proteine.

La misurazione del contenuto di proteine e carboidrati è un parametro di interesse per il monitoraggio del fouling di membrana.

Per la determinazione del contenuto proteico del campione è stato utilizzato il kit SIGMA TP0300.

Prima di procedere alla misurazione del contenuto di proteine di un campione viene costruita una curva a partire da concentrazioni di proteine note, come mostrato in Tabella 2.34. Le diverse concentrazioni di proteine sono legate ad un'assorbanza rilevata dallo spettrofotometro alla lunghezza d'onda  $\lambda=750$  nm.

*Tabella 2.34 Concentrazioni ed assorbanza delle soluzioni a concentrazione di proteine note*

<b>Concentrazione</b>	<b>Assorbanza</b>
<i>mg/L</i>	<i>750 nm</i>
0	0,055
50	0,351
100	0,568
300	1,074
400	1,276

Una volta determinata l'equazione della curva (Figura 2.15) si procede all'analisi del campione secondo la procedura illustrata dal kit; la cuvetta viene quindi inserita nello spettrofotometro, viene letta l'assorbanza, sottratta l'assorbanza del bianco e ricavato di conseguenza la concentrazione di proteine nel campione.

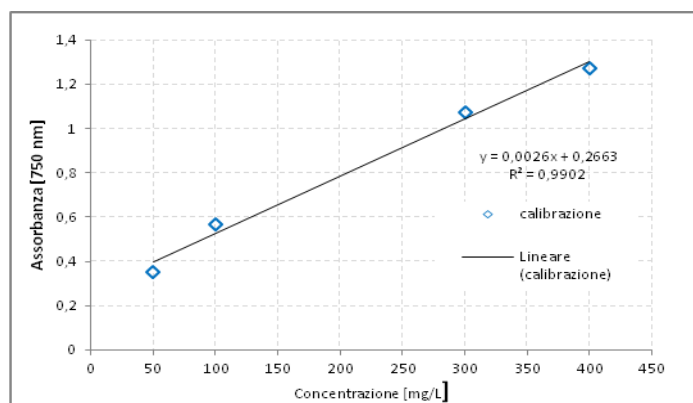


Figura 2.15 Retta di calibrazione per la rilevazione della concentrazione di proteine

La determinazione del contenuto di carboidrati è stata svolta secondo il metodo di Dubois modificato (75% dei volumi originali). La procedura prevede l'aggiunta al campione di fenolo al 5% e di acido solforico. Come per le proteine è necessario, costruire una curva con concentrazioni di carboidrati note, prima di procedere alla misurazione del contenuto di carboidrati di un campione. Il carboidrato di prova utilizzato è il glucosio.

Alle varie concentrazioni di glucosio viene associata una determinata assorbanza, Tabella 2.35, ottenuta durante la calibrazione, e misurata dallo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda  $\lambda=490$  nm.

Tabella 2.35 Concentrazioni ed assorbanza delle soluzioni a concentrazione di glucosio note

<b>Concentrazione</b>	<b>Assorbanza</b>
<i>mg/L</i>	<i>490 nm</i>
0	0,024
10	0,742
50	1,187
200	2,269
300	2,924
400	2,997

Una volta costruita la curva di calibrazione e determinata l'equazione ad essa associata (Figura 2.16) si procede all'analisi del campione secondo il metodo di Dubois.

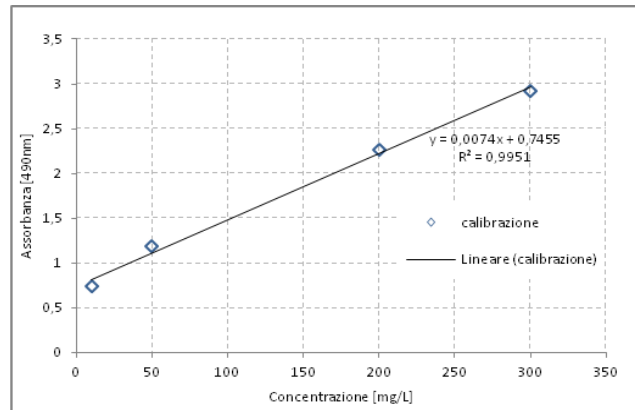


Figura 2.16 Retta di calibrazione per la rilevazione della concentrazione di proteine

## Capitolo 3 – Risultati dell'attività sperimentale

Nel capitolo che segue sono illustrati i risultati ottenuti durante l'attività sperimentale di ricerca svolta nel periodo precedente l'avvio dell'impianto pilota realizzato all'interno del progetto ECO-SI. Tutte le prove condotte in laboratorio durante questo studio sono state finalizzate alla scelta delle condizioni di avvio dell'impianto.

Nel paragrafo 3.1 vengono illustrate e valutate le rese di produzione di idrogeno ottenute dalle prove di BHP, in cui sono state testate differenti colture (pure e miste) nella degradazione di siero di latte ultrafiltrato. I ceppi batterici di cui si sono valutate le rese sono stati descritti nel precedente capitolo.

Nel paragrafo 3.2 sono esposte le prove di SMA finalizzate alla scelta del fango di inoculo per il digestore anaerobico dell'impianto pilota ECO-SI.

Nel paragrafo 3.3 sono esposti i risultati delle prove di BMP finalizzate alla valutazione delle rese delle due filiere illustrate nel paragrafo 2.1: quella completa doppio stadio DF+DA (A) e quella monostadio DA (B)

Nelle prove di BMP è stata valutata la biodegradabilità di due matrici: la prima, il siero di latte ultrafiltrato, è l'alimento del reattore di digestione anaerobica qualora esso operi in fase singola o del reattore di dark fermentation qualora sia previsto il funzionamento in doppio stadio (DF+DA); la seconda è il permeato di un reattore MBR installato presso il laboratorio del DICA - Politecnico di Milano con cui è stato studiato il processo di dark fermentation a scala pilota. Tale matrice è di interesse poiché a monte del digestore anaerobico ECO-SI è previsto l'avvio dello stadio di dark fermentation per la produzione di idrogeno.

Nell'ultimo paragrafo è descritta l'attività di monitoraggio della fase di avvio del reattore di digestione anaerobica, alimentato con siero di latte ultrafiltrato. In particolare si è posta attenzione alla crescita della biomassa attiva all'interno del reattore, utilizzando la semplificazione del modello ADM1 (IWA) illustrata nel capitolo precedente.

### **3.1 Prove di BHP: valutazione delle rese di produzione di idrogeno di ceppi selezionati e fango pretrattato termicamente**

Le prove di BHP condotte per valutare la tipologia di biomassa da inoculare nel reattore di dark fermentation dell'impianto pilota ECO-SI sono state complessivamente 28.

Le valutazioni hanno riguardato le rese di colture selezionate, testate sia singolarmente che in varie combinazioni, e della biomassa presente nel fango prelevato dal reattore di

digestione anaerobica dell'impianto. La biomassa è stata pretrattata termicamente, come illustrato nel 2.2.2, per selezionarne i batteri non metanigeni.

Nel primo caso si parla di colture pure “*pure colture*”, nel secondo di colture miste “*mixed colture*”.

L'allestimento delle prove è illustrato nel paragrafo 2.4.2 sia per quanto riguarda la procedura seguita, sia per quanto riguarda i volumi di inoculo di prova, la concentrazione della soluzione tampone, l’F/M e il rapporto MES/COD; per ogni prova sono stati misurati il pH ad inizio e fine prova e la composizione dei VFA prodotti dal processo.

I ceppi batterici selezionati dal centro di ricerca dell'Università Cattolica del Sacro Cuore, illustrati nel paragrafo 2.2.2, sono tutti appartenenti alla famiglia delle Clostridiaceae e sono, nello specifico, i type strain del *Clostridium Acetobutilycum* 792 (d'ora in avanti 792) e del *Clostridium Butyricum* (d'ora in avanti B), il mutante spontaneo *Mu56* del *Clostridium Acetobutilycum* 792 (d'ora in avanti Mu56) e il *Clostridium Tyrobutiricum* (d'ora in avanti T).

A partire dai ceppi batterici sopraelencati sono state valutate otto combinazioni; tre prove in batch hanno previsto l'inoculo di un ceppo singolo, tre di due ceppi, una di tre e una di tutti e quattro.

L'unico a non venire testato singolarmente è il *Clostridium Tyrobutyricum* poiché, sebbene sia il ceppo con le maggiori rese di produzione, non è in grado di compiere l'idrolisi del lattosio.

Le combinazioni sperimentate sono le seguenti:

- 792
- B
- Mu 56
- 792 + B
- 792 + T
- B + T
- 792 + B + T
- Mix

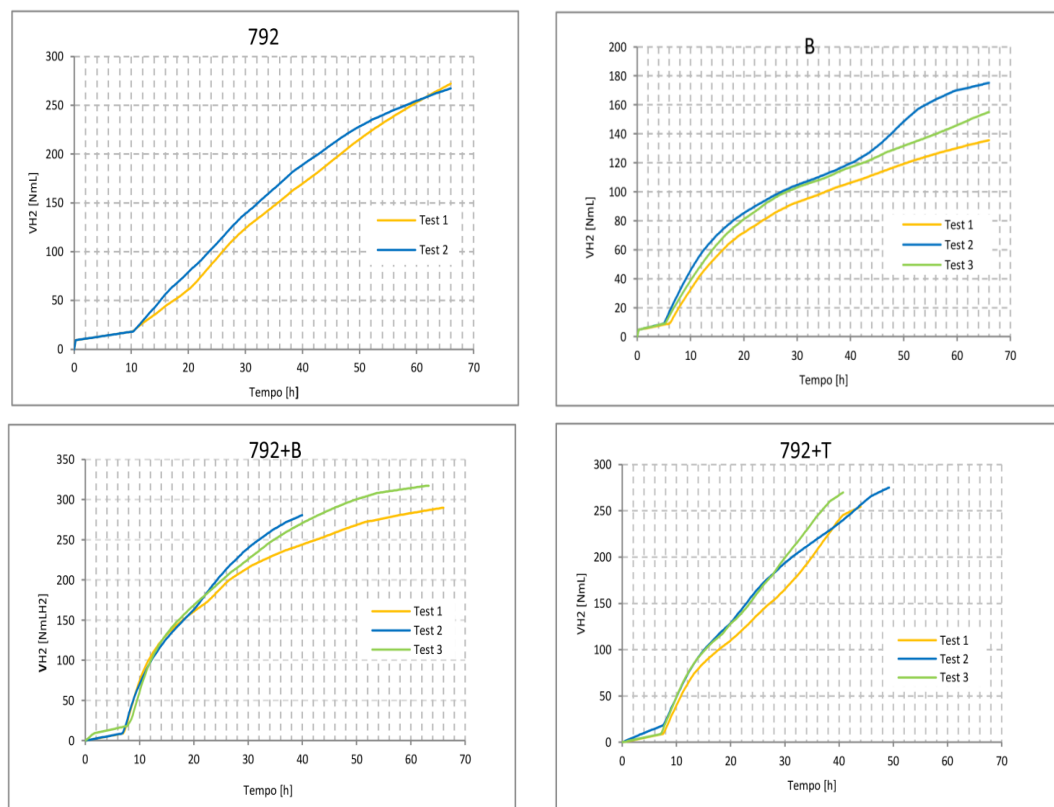
La combinazione di più ceppi in una stessa prova comporta vari vantaggi: in primis, consente al ricercatore di effettuare una valutazione sulle variazioni della resa di produzione; in secondo luogo l'inoculo di più ceppi risulta importante perché, qualora non si instaurino meccanismi di competizione tra i diversi ceppi batterici, è in grado di garantire una maggiore stabilità al sistema. Infatti, mentre a scala di laboratorio è difficile

osservare infezioni da batteriofagi in grado di causare la lisi cellulare e dunque la morte dei batteri, a larga scala il rischio è molto più alto. In questo caso, quindi, la biodiversità che caratterizza una cultura mista impedisce un blocco di processo.

I grafici in Figura 3.1 mostrano l'andamento delle prove nel tempo. Come si può vedere dalle immagini, le prove sono state condotte tutte in triplo; solo nel caso del 792 si hanno soltanto due curve, a causa di un problema strumentale occorso durante la prova.

Per queste prove non è mai stato previsto un bianco poiché, da sperimentazioni precedenti (Teli et al, 2014), la produzione di gas sia per consumo endogeno sia per residua attività metanogenica è risultata prossima allo zero.

Come descritto nel paragrafo relativo alla procedura di allestimento delle prove, l'inoculo è avvenuto in cappa anaerobica, poiché questi ceppi batterici sono altamente sensibili alla presenza di ossigeno - se pur presente in basse concentrazioni. Un esempio di probabile inibizione di ossigeno è il Test 3 delle prove con Mu56, in cui ritroviamo due replicati molto simili tra loro e il terzo a cui è invece associata una produzione di idrogeno molto minore.





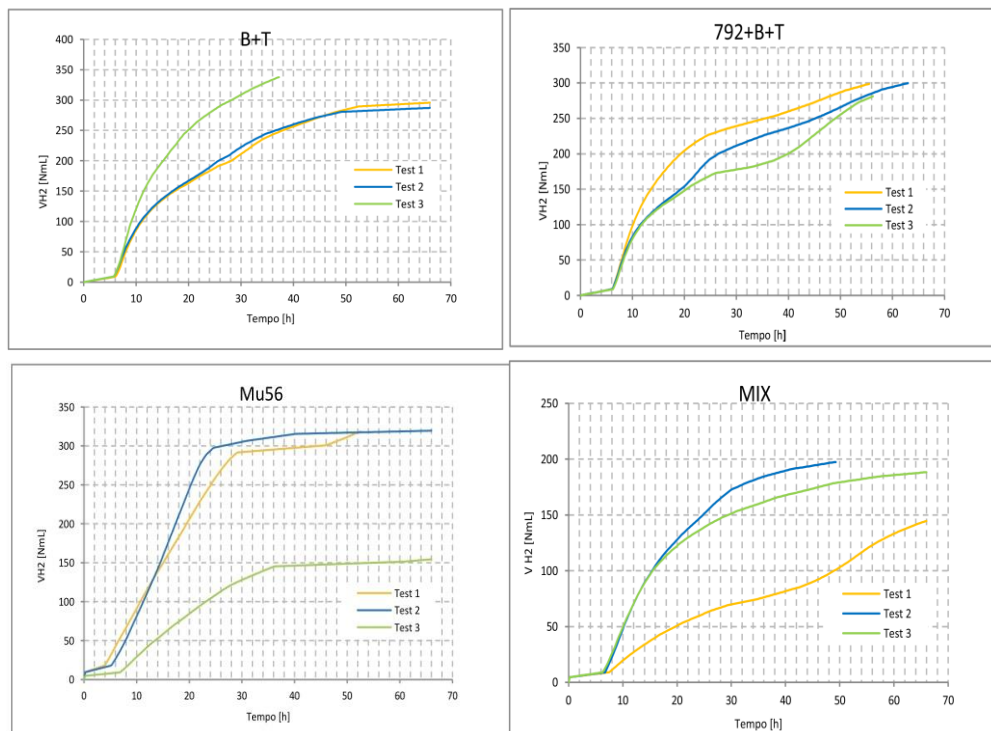


Figura 3.1 Test BHP con ceppi selezionati

La durata effettiva delle prove, viene dedotta dai volumi registrati dallo strumento AMPTS; in particolare, la durata della prova è l'intervallo di tempo in cui lo strumento misura produzioni di gas superiori ai 10 NmL.

A partire dal volume cumulato di idrogeno prodotto è stata calcolata la produzione di idrogeno specifica, riferita al COD in ingresso, mediante la relazione 31

$$HY = \frac{VH_2}{M_{COD\ in}} \quad [31]$$

La produzione specifica relativa al COD è stata in seguito riportata alle moli di lattosio alimentato, conoscendo il COD che caratterizza una mole di lattosio (384 gCOD/mol lattosio).

Le rese di produzione di idrogeno ottenute per ogni test, illustrate in Tabella 3.1 sono relative al lattosio alimentato

Tabella 3.1 Rese dei BHP con ceppi selezionati

	<b>Y</b> <i>mol H<sub>2</sub>/mol lattosio</i>	<b>pH</b> <b>finale</b>
792	3,01	5,12
792	3,93	4,97
792	3,72	5,04
B	2,14	5,04
B	2,49	4,89
B	2,59	5,16
792+B	3,97	5,16
792+B	3,83	5,23
792+B	4,35	5
792+T	3,48	4,88
792+T	3,76	5,04
792+T	3,68	4,98
B+T	4,09	4,87
B+T	3,93	4,93
B+T	4,62	5,06
792+B+T	4,08	5,11
792+B+T	4,1	4,99
792+B+T	3,85	5,01
Mu56	4,36	5,45
Mu56	4,45	5,49
Mu56	2,4	5,66
Mix+PACL	2,21	4,91
Mix+PACL	2,7	5,11
Mix+PACL	2,61	5,13

Tutti gli inoculi testati tranne il *C. Butyricum* e il MIX raggiungono, e in alcuni casi superano, la resa teorica di 4 molH<sub>2</sub>/mol lattosio quando i metaboliti sono l'acido acetico e quello butirrico.

Nell'eseguire la resa media nel caso di Mu56 è stato eliminato il triplicato in cui è stata notata un'inibizione massiccia rispetto agli altri due test (resa del Test 3 pari al 55% di quella ottenuta mediamente dai Test 1 e 2).

Le rese ottenute in questo studio sono aumentate rispetto a quelle effettuate prima dell'utilizzo della cappa anaerobica (Basei 2013), a dimostrazione del fatto che la resa di produzione dei Clostridi è largamente influenzata dalle condizioni ambientali e soprattutto dalla presenza di ossigeno.

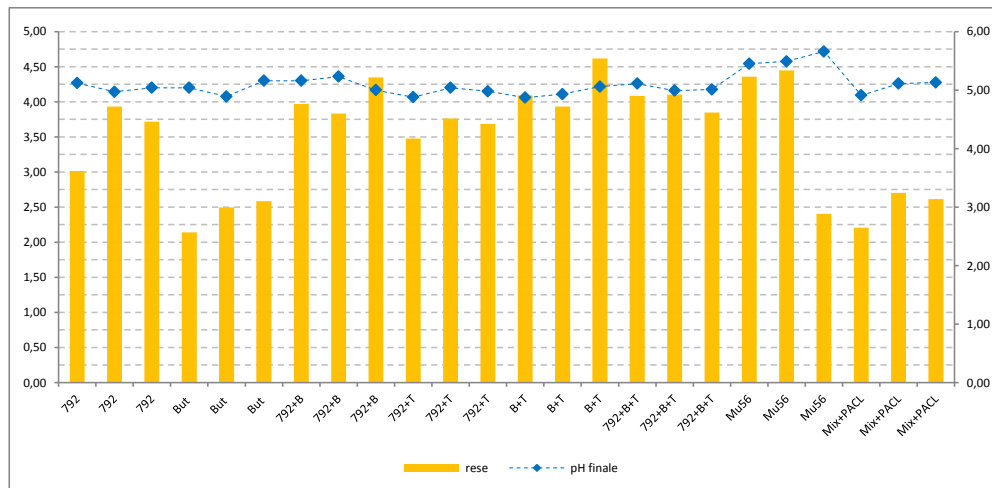


Figura 3.2 Rese di ciascun test e pH a fine prova

La resa di produzione è inoltre generalmente associabile al pH misurato nella bottiglia a fine prova: ad alti pH sono associate produzioni di idrogeno inferiori o più lente nel tempo.

Nelle prove effettuate si sono misurati a fine prova pH che variano tra 4,87 e 5,66; sebbene tali valori rientrino nell'intervallo dei valori attesi e non si possa pertanto associare ai risultati delle chiare inibizioni per pH osservati troppo alti, si può osservare come all'interno dei triplicati sia talvolta possibile incrociare il dato della resa e quello del pH a fine prova.

Nel secondo test in cui il ceppo inoculato è il 792 e nel terzo test dove l'inoculo è costituito dai ceppi 792 e B, ad esempio, un pH minore è associato ad una resa di produzione di idrogeno superiore rispetto agli altri due test; ugualmente nel terzo test in cui il ceppo produttore di idrogeno testato è il mutante spontaneo del *C. Acetobutylicum* 792, ad una resa dimezzata è associato un pH superiore.

Il fatto che il pH non sia sceso mai al di sotto di 4,8 conferma ulteriormente che il rapporto tra COD e soluzione tampone (MES) adottato in base a studi precedenti (Bassi 2013) sia ottimale tra 1,1 e 1,6.

In Tabella 3.2 e in Figura 3.3 sono rappresentate le rese medie, e le relative deviazioni standard ottenute nelle prove descritte. Non avendo a disposizione programmi di statistica avanzata si è utilizzato per la Figura 3.3 la funzione del grafico con box plot di excel nonostante il box plot sia costituito solamente da 3 dati. Per tanto nella lettura del grafico sono di interesse i relativi errori, quanto alla resa media ottenuta si può fare riferimento ai valori in Tabella 3.2.

Tabella 3.2 Rese medie dei BHP con ceppi selezionati

	Y mol H <sub>2</sub> /mol lattosio	pH finale
B	2,41	5,0
Mix+PACL	2,51	5,1
792	3,56	5,0
792+T	3,64	5,0
792+B+T	4,01	5,0
792+B	4,05	5,1
B+T	4,21	5,0
Mu56	4,4	5,5

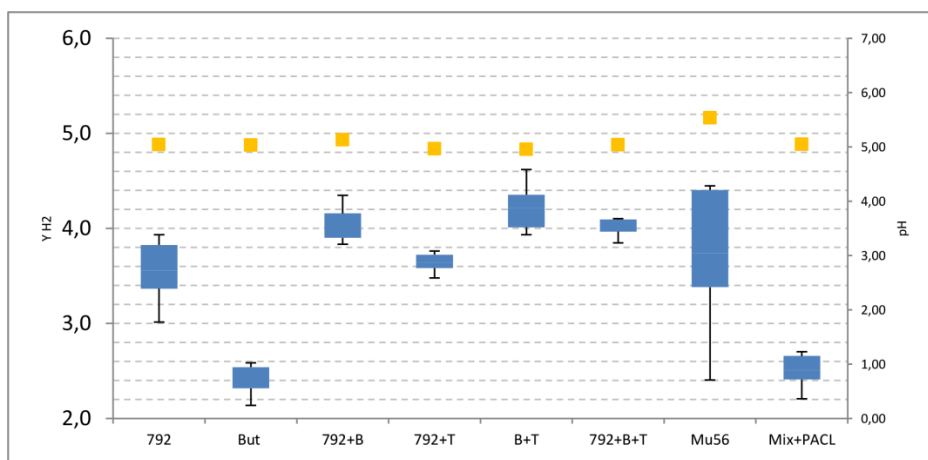


Figura 3.3 Rese medie BHP con ceppi selezionati

Come illustrato nel paragrafo 1.3.1, le rese di produzione di idrogeno sono strettamente legate alla quantità e alla tipologia degli acidi grassi volatili prodotti, poiché essi indicano la via metabolica intrapresa dalla biomassa. A fine prova sono pertanto stati analizzati i VFA prodotti da ciascun test.

I prodotti metabolici attesi sono in prevalenza acido acetico e butirrico e - in quantità molto basse - etanolo, butanolo e acetone; nel caso del mutante non è prevista la produzione di questi ultimi poiché il percorso metabolico che porta alla loro produzione è stato inibito tramite la mutazione.

Nella Figura 3.4 è illustrata la composizione degli acidi grassi volatili rilevata per ciascuna prova, espressa in di g/L.

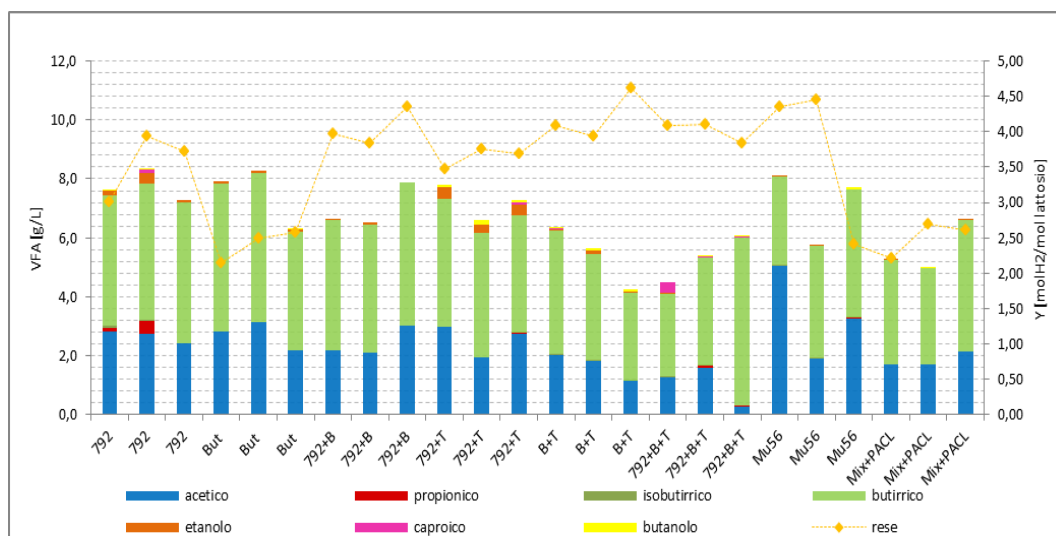


Figura 3.4 Composizione dei VFA prodotti dai test BHP con biomasse selezionate

Dalla Figura 3.4, in cui sono riportate le concentrazioni di VFA a fine prova, si può notare come le previsioni siano state rispettate.

I prodotti metabolici rilevati sono in prevalenza acido acetico e butirrico in concentrazioni in linea con quanto osservato in letteratura (Lin et al, 2006) e non inibenti per il processo fermentativo (Kim, et al, 2008).

La massima concentrazione di acido propionico e caproico riscontrata è di 0,4 g/L; la produzione di etanolo e butanolo sono state minori del 5%, qualora siano state riscontrate. Ugualmente a quanto osservato per quanto riguarda la relazione tra il pH a fine prova e la resa di produzione ottenuta, anche nel caso dei VFA prodotti è difficile associare, per quanto riguarda i test effettuati, una legge generale che associ a rese maggiori basse concentrazioni di acido propionico, caproico, etanolo e butanolo.

Se ciò non è osservabile sull'intero campione dei 24 test effettuati, all'interno dei triplicati è riscontrabile come a maggiori concentrazioni di acido propionico, caproico, butanolo ed etanolo siano associate a rese inferiori.

Nel terzo test in cui l'inoculo è costituito dai ceppi 792 e B una resa di produzione maggiore è associata ad un'assenza di produzione di etanolo; nel secondo test in cui i produttori di idrogeno sono i ceppi 792 e T, ad una produzione inferiore di etanolo e butanolo è associata una resa di produzione maggiore. Inoltre, nel terzo test con inoculo misto 792+ B + T si nota una sovrapproduzione di acido butirrico rispetto agli altri due test in cui il rapporto è coerente con il resto delle prove. A questa deviazione del percorso metabolico è associata una resa di produzione inferiore rispetto a quando il metabolita principale è l'acido acetico. Ciò conferma quello che è teoricamente atteso, ovvero un

calo della resa in corrispondenza della produzione di acido acetico e butirrico, rispetto a quella attesa nel caso di produzione del solo acido acetico.

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.

Nella Figura 3.5, è stato rappresentato il rapporto tra acido butirrico e acetico, e sottolineato con una linea il valore di 1,5 che porterebbe a produzioni inferiori a 2,5 molH<sub>2</sub>/mol esoso; nel caso di studio presente il rapporto Bu/Ac è quasi sempre (tranne in un solo caso) superiore o pari a 1,5 e associato a rese superiori alle 2,5 molH<sub>2</sub>/mol esoso; inoltre non si riscontra una relazione tra rese di produzione maggiori e rapporti Bu/Ac più bassi.

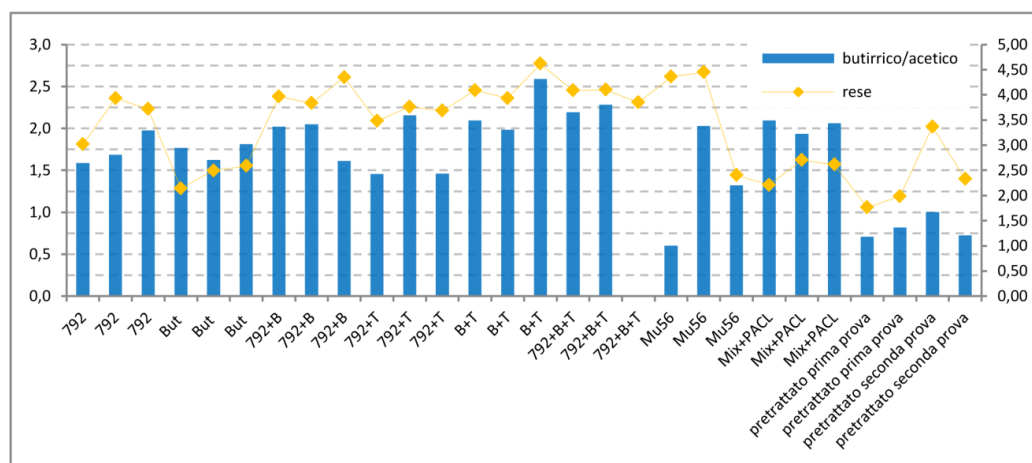


Figura 3.5 Rapporto tra acido Butirrico e Acetico e rese di produzione

Le rese di produzione di idrogeno della biomassa selezionata tramite pretrattamento termico del fango prelevato dal digestore anaerobico ECO-SI sono state valutate in due momenti differenti: la prima prova di BHP è stata effettuata a due settimane dall'inoculo del reattore di digestione anaerobica, la seconda ad un mese di distanza.

Il digestore anaerobico da cui è stato prelevato il fango è stato inoculato con un fango proveniente da un impianto di trattamento di reflui di cartiera, di natura prevalentemente cellulosa.

Questi due fattori hanno influenzato le rese ottenute dalle prove sperimentali: il consorzio batterico all'interno del digestore, infatti, si è adattato alla digestione del siero di latte

risultando in una produzione di idrogeno maggiore nella prova effettuata a distanza di un mese dall'inoculo.

I test di BHP sono stati condotti in doppio e l'inoculo non è avvenuto in cappa anaerobica, le bottiglie di prova sono state degasate con N<sub>2</sub>, come normalmente previsto dalla procedura dei BMP.

I grafici in Figura 3.6 illustrano l'andamento nel tempo delle prove di BHP con la biomassa pretrattata termicamente, il primo grafico si riferisce alla prova effettuata in data 2 marzo, il secondo a quella in data 13 marzo.

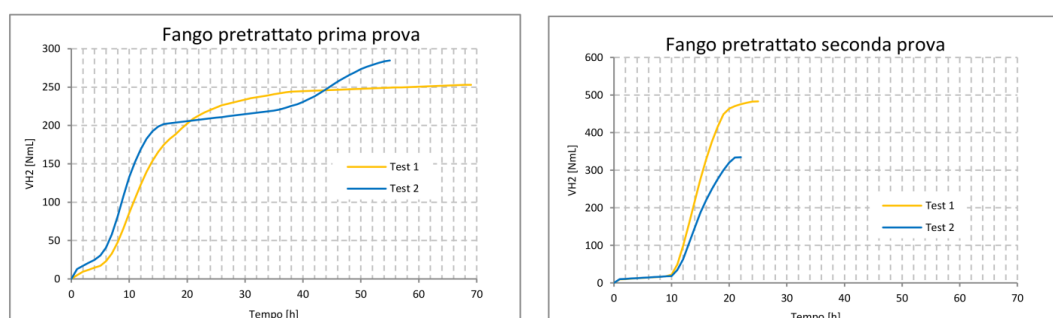


Figura 3.6 Test BHP con inoculo pretrattato termicamente

Nel caso in cui l'inoculo della prova di BHP sia un fango pretrattato termicamente, a differenza del precedente in cui era costituito da ceppi selezionati, è più probabile ottenere curve di produzione paragonabili alla curva di crescita diauxica (Test 2 prima prova), caratterizzate da una successione di due fasi di crescita esponenziale intervallate da un periodo di stasi. A differenza della curva diauxica classica, dove la crescita esponenziale è relativa allo stesso microrganismo che utilizza due substrati differenti, in questo caso è probabile che la seconda fase di crescita esponenziale (e la relativa produzione di idrogeno) sia relativa alla crescita di un ceppo batterico differente, in grado di utilizzare come substrato i metaboliti di quello cresciuto nella prima fase di crescita.

Le rese relative ad ogni test e le relative rese medie sono illustrate in Tabella 3.3 e in Figura 3.7.

Tabella 3.3 Rese di ogni test e rese medie dei BHP con inoculo pretrattato termicamente

		prima prova		seconda prova	
		Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
<b>Y</b>	<i>mol H<sub>2</sub>/mol lattosio</i>	1,76	1,98	3,37	2,33
<b>Y media</b>	<i>mol H<sub>2</sub>/mol lattosio</i>	1,87		2,85	

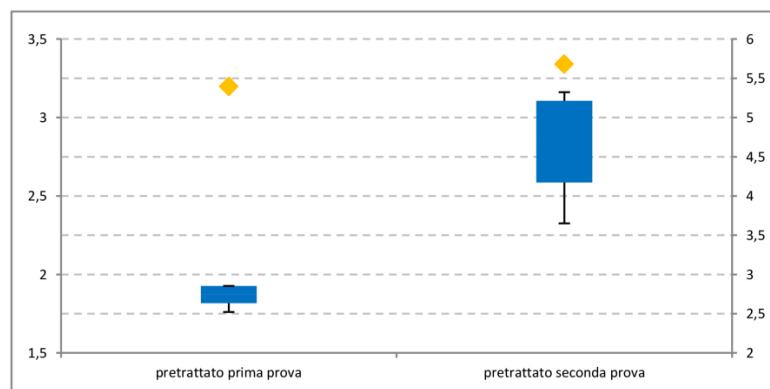


Figura 3.7 Rese medie BHP con inoculo pretrattato termicamente

La prima prova è avvenuta a ridosso dell'inoculo del digestore con fango prelevato dall'impianto di trattamento dei reflui di cartiera. Nella seconda, invece, il fango prelevato per il secondo test di BHP è stato alimentato con siero di latte all'interno del digestore per due settimane in più, e ha pertanto sviluppato una biomassa più consona per la digestione di tale matrice.

La resa media delle due prove cresce del 34% tra la prima e la seconda; tale aumento è imputabile, da un lato, ad un miglioramento generale delle condizioni della biomassa (il fango trasportato e inoculato nel digestore ECO-SI non è stato alimentato per due giorni; in seguito si è verificato l'impaccamento delle membrane e l'alimento è stato interrotto nuovamente), che viene alimentata in modo continuativo e ha raggiunto la temperatura di processo (35°C) nel periodo subito antecedente alla seconda prova, al contrario di ciò che succede nel periodo che precede la prima, durante il quale l'alimento è discontinuo e la temperatura tocca i 27,9 °C. Dall'altro lato un miglioramento delle rese può anche essere dovuto ad una migliore selezione dei Clostridi in grado di effettuare l'idrolisi del lattosio dopo essere stati alimentati più a lungo con siero di latte ultrafiltrato (Cappa 2015).

Dal confronto dei grafici si può inoltre notare come la seconda prova si concluda compendosi interamente in 15 ore, a differenza della prima in cui, sempre probabilmente a causa del minor tempo di adattamento alla digestione di siero di latte concesso all'inoculo, il consumo del substrato avviene in più di 30 ore.

Nel grafico relativo alla seconda prova si può osservare molto bene il classico "tempo di lag" associato alle prove di BHP con inoculo pretrattato termicamente.

All'inizio della prova, infatti, la biomassa non è ancora attiva: al tempo di lag è associata la fase di germinazione delle spore prodotte dai batteri durante il pretrattamento termico.

Le rese di produzione ottenute nei due test della seconda prova sono tuttavia molto diverse tra loro (il Test 1 ha portato ad una resa di circa il 31% superiore rispetto a quella del Test 2); tale differenza può essere attribuita a fenomeni di inibizione da ossigeno (per



esempio un cattivo degasamento del Test 2) o a errori nel corso della preparazione delle bottiglie di prova (aggiunta di un volume maggiore di substrato nel Test 1).

È da escludere, invece, un aumento delle rese per produzione di metano, invece che di idrogeno, poiché il gas è stato analizzato per mezzo del gas cromatografo e in nessuno dei due casi è stato reperito CH<sub>4</sub>.

I risultati dell'analisi della composizione del gas, analizzata due volte nel corso e al termine della prima prova, e una al termine della seconda, sono illustrati in Tabella 3.4

*Tabella 3.4 Composizione del biogas prodotto dalle prove di BHP con inoculo pretrattato termicamente*

	Prima prova, analisi 1		Prima prova, analisi 2		Seconda prova, analisi 2	
	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
H <sub>2</sub>	15,8%	16,9%	18,9%	18,0%	18,5%	12,5%
CO <sub>2</sub>	29,6%	4,0%	7,9%	38,5%	3,6%	8,5%
O <sub>2</sub>	0,6%	1,8%	2,3%	0,6%	10,3%	8,5%
N <sub>2</sub>	54,0%	77,4%	70,9%	43,0%	67,5%	70,7%

L'analisi del gas è stata effettuata prelevando il gas con una siringa dal setto interposto tra la bottiglia di prova e la trappola di soda per la cattura dei gas acidi. L'analisi risulta utile per verificare l'efficacia del pretrattamento termico, mentre non è particolarmente significativa rispetto alla composizione del gas poiché è dipendente dal momento in cui viene svolta.

Nell'analisi riguardante la seconda prova è stata rilevata una percentuale di ossigeno che non è coerente con il corretto sviluppo di un processo in condizioni di anaerobiosi, per questo motivo tali percentuali sono da imputarsi ad errori manuali commessi nel momento del prelievo dal setto, probabilmente dovuti alla presenza di aria nella siringa usata per il prelievo del gas.

A fine prova, inoltre, è stata svolta l'analisi dei VFA, illustrata in Figura 3.8. Essa ha rilevato la presenza di acido acetico e butirrico in prevalenza, e propionico nei campioni relativi alla prima prova.

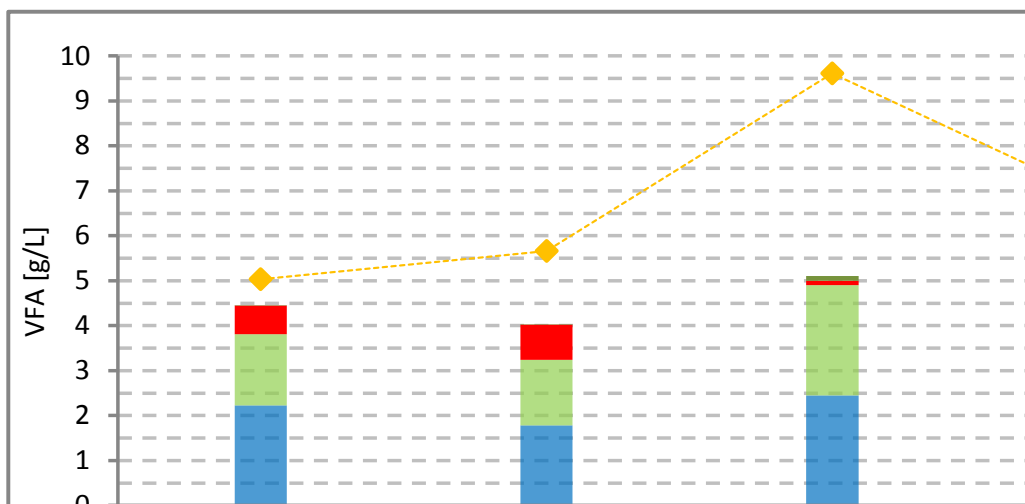
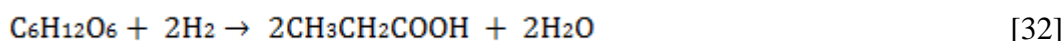


Figura 3.8 Composizione dei VFA prodotti dai test BHP con inoculo pretrattato termicamente

La presenza dell'acido propionico associato ad un calo della resa è sintomo di contaminazione batterica con il *Clostridium propionicum*, il quale consuma  $H_2$  per produrre acido propionico (Levin et al., 2004; Hawkes et al., 2007) secondo la reazione:



In questo caso si può osservare come nei test relativi alla seconda prova sia stata rilevata una concentrazione di acido propionico decisamente inferiore a quella presente nei test relativi alla prima prova; anche questo fattore può giustificare il miglioramento delle rese verificatosi, poiché il percorso metabolico che porta alla formazione di acido propionico comporta un consumo di idrogeno (come illustrato nella relazione 32).

Dal confronto tra le prove effettuate con inoculi puri selezionati dal centro di ricerche biotecnologiche dell'USCS e quelle condotte con fango pretrattato termicamente si è osservato che:

- le rese di produzione di idrogeno sono maggiori nel caso di ceppi selezionati in laboratorio rispetto a quelle di ceppi selezionati dal pretrattamento termico del fango;
- per quanto riguarda le prova in batch si sono ottenute rese di produzione elevate, mediamente prossime alla resa teorica di  $4 \text{ molH}_2$  prodotto/mol lattosio. Le massime rese sono state ottenute dal mutante ( $4,4 \text{ molH}_2$ /mol lattosio) e dai mix B+T, 792+B e 792+B+T (rispettivamente pari a  $4,21$   $4,05$  e  $4,01 \text{ molH}_2$ /mol lattosio)
- i ceppi selezionati sono più sensibili del fango pretrattato rispetto alla sensibilità dei ceppi selezionati rispetto alla presenza di ossigeno, e l'inibizione ne subiscono una forte inibizione;

Inoltre, è stato osservato che non è possibile mettere in relazione dal punto di vista di rese, pH e VFA prodotti tutti i ceppi batterici testati poiché sarebbe necessario un campione statistico più numeroso, a causa dell'estrema variabilità che caratterizza i percorsi metabolici dei clostridi e dunque le rese di produzione che si è in grado di ottenere.

La biodiversità del consorzio microbico che, da teoria, garantisce maggiore stabilità al processo è confermata dalla minore variabilità dei dati ottenuti in concomitanza con inoculi misti, anche se, di nuovo, il campione non risulta abbastanza numeroso per un'analisi statistica dei dati a sostegno di tale osservazione.

Dato l'aumento della resa di produzione ottenuta dal fango pretrattato termicamente tra una prova e l'altra, risulta opportuno, in concomitanza con l'inoculo del reattore di DF, effettuare una terza prova di BHP su fango pretrattato, per valutare la resa teorica ottenibile in batch con cui confrontare il processo in continuo.

### 3.2 Prove di Specific Methanogenic Activity (SMA) per la scelta del fango di inoculo

Per valutare l'attività della biomassa metanigena all'interno di un fango anaerobico si possono effettuare prove di attività specifica quali le prove di SMA, descritte nel paragrafo 2.4.3.

In questo studio sono state condotte due prove di SMA per la scelta del fango di inoculo al digestore anaerobico dell'impianto pilota ECO-SI. Il primo test è stato eseguito sul fango proveniente dal digestore dell'impianto di trattamento dei reflui zootecnici, alimentato con reflui suini e reflui caseari. Il secondo sul fango granulare proveniente dall'impianto di trattamento dei reflui di cartiera installato presso la Cartiera Giorgione.

Le prove sono state allestite e condotte come illustrato nel paragrafo 2.4.3. Nella prima prova sono stati valutati due differenti valori di F/M mentre in quella successiva è stato adottato il valore di F/M relativo al miglior rendimento. In Tabella 3.5 sono illustrati i valori F/M testati e i valori di SMA ottenuti sul fango proveniente dall'impianto di trattamento dei reflui suinicoli.

*Tabella 3.5 Risultati della prima prova di SMA*

	Test A1	Test A2	Test B1	Test B1	
F/M	0,2	0,2	0,1	0,1	<i>gCOD/gsv</i>
Velocità massima	1,58	1,88	2,66	2,51	<i>mL CH<sub>4</sub>/h</i>
SMA	0,642	0,761	0,539	0,51	<i>mLCH<sub>4</sub>/gSV/h</i>

L'attività metanogenica specifica è stata calcolata per ciascuna prova tramite l'interpolazione lineare della curva della produzione di metano nel tempo, nell'intervallo di massima pendenza, come mostrato nella Figura 3.9. Il coefficiente angolare della retta corrisponde alla massima velocità di conversione del substrato nei metaboliti finali e dipende dalla percentuale di biomassa attiva presente nel fango.

Come si può osservare dai grafici, in tutte le prove la fase di metanogenesi non ha inizio prima di 40 ore dall'avvio della prova: tale ritardo non è attribuibile allo svolgimento delle fasi di idrolisi acidogenesi ed acetogenesi: infatti, il substrato di prova (acetato di sodio) è direttamente utilizzabile dalla biomassa metanigena, di cui si vuole testare l'attività.

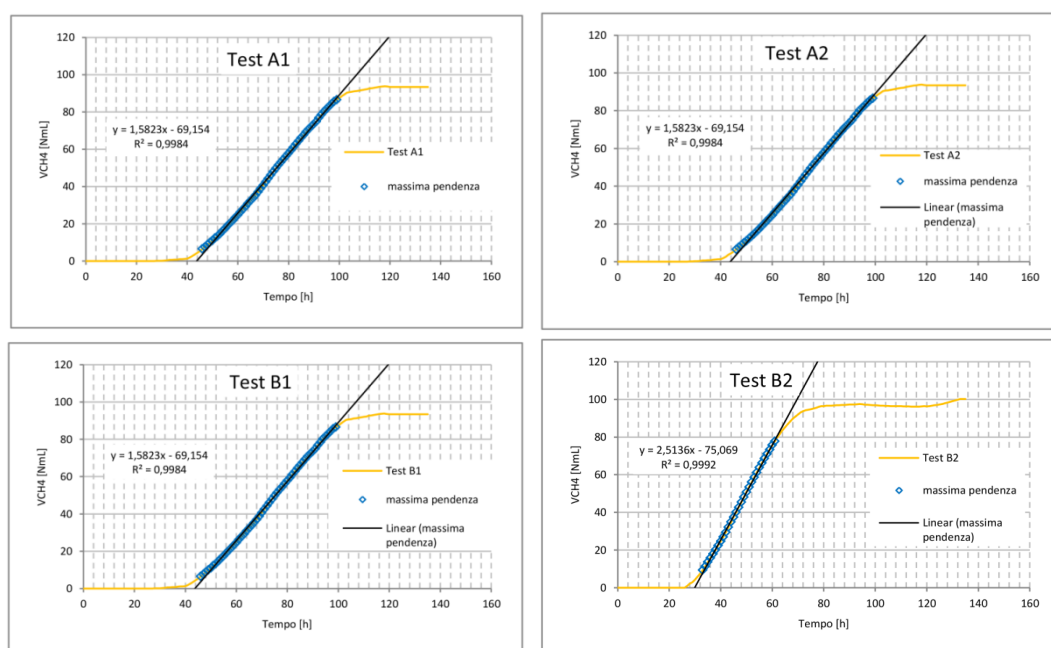


Figura 3.9 Prima prova di SMA

Un ritardo così grande non può nemmeno essere attribuita al solo raggiungimento della temperatura di processo, che solitamente avviene entro una/due ore dal momento in cui la bottiglia viene posta nel bagno termostatico dell'AMPTS.

E' stata quindi considerata l'ipotesi che nel fango fosse presente dell'ossigeno disciolto che abbia permesso ai ceppi facoltativi di degradare COD in condizioni aerobiche, e dunque senza produzione di metano.

Questa analisi è stata condotta a partire dal bilancio del COD e dalla conversione teorica di COD in metano. In Tabella 3.6 sono mostrati i risultati: nella seconda riga è riportato il volume di metano ottenibile a partire dai 500 mg COD iniziali alimentati a ciascuna prova, considerando una Y di crescita della biomassa pari a 0,05 (ADM1). Nella terza riga è riportato il volume di metano ottenuto dai tests sperimentali, a partire da quale è

stato calcolato il COD consumato per produrre tale volume. Come si può notare il COD consumato risulta inferiore a quello in ingresso, perciò si può dedurre che parte del COD sia stato degradato per via aerobica.

*Tabella 3.6 Bilancio del COD per i test A1 A2 B1 B2*

		<b>A1</b>	<b>A2</b>	<b>B1</b>	<b>B2</b>
COD in	<i>mgCODin</i>	500,0	500,0	500,0	500,0
BMP atteso	<i>mLCH4</i>	145,3	145,3	145,3	145,3
BMP sperimentale	<i>mLCH4</i>	93,4	99,9	102,6	100,2
COD consumato per produrre CH4	<i>mgCOD</i>	280,9	300,5	308,6	301,4
COD consumato aerobicamente	<i>mgCOD</i>	219,1	199,5	191,4	198,6

In seguito, grazie alla semplificazione del modello ADM1 illustrato nel capitolo precedente, le prove di SMA sono state simulate ed è stata ricavata la percentuale di biomassa attiva presente nel fango. Le simulazioni si trovano in appendice, i valori della SMA e la percentuale di biomassa attiva sono illustrati in Tabella 3.7.

*Tabella 3.7 SMA sperimentale, SMA simulata e relativa percentuale di biomassa attiva*

		<b>digestato PLAC</b>			
		<b>A1</b>	<b>A2</b>	<b>B1</b>	<b>B2</b>
% biomassa attiva	%	0,570%	0,594%	0,487%	0,474%
SMA simulata	<i>gCOD/gSV/d</i>	0,065	0,067	0,055	0,054
SMA sperimentale	<i>gCOD/gSV/d</i>	0,044	0,052	0,037	0,035

In questo caso, a differenza di tutte le altre prove effettuate in questo lavoro, la differenza tra la SMA simulata e quella sperimentale risulta molto alta, proprio a causa dei problemi riscontrati nella conduzione di queste prove, legati alla presenza di ossigeno disciolto all'interno del fango.

I valori di SMA ottenuti mostrano un'attività specifica della biomassa metanogenica presente nel fango piuttosto bassa; per questo motivo si è scelto di testare, sotto lo stesso aspetto, un fango differente.

Il fango utilizzato per la seconda prova è granulare, proveniente da un digestore ad alto carico che tratta reflui di cartiera.

La seconda prova di SMA è stata condotta nelle stesse condizioni della prima:

- soluzione di acetato di sodio in concentrazione 10 gCOD/L
- rapporto F/M pari a 0,2 (quello risultato migliore nella prima prova)
- uguale volume di soluzione di nutrienti

La SMA sperimentale è stata ottenuta, come illustrato per la prima prova, tramite l'interpolazione lineare della curva di produzione di metano nell'intervallo di massima pendenza, come è mostrato dai grafici in Figura 3.10.

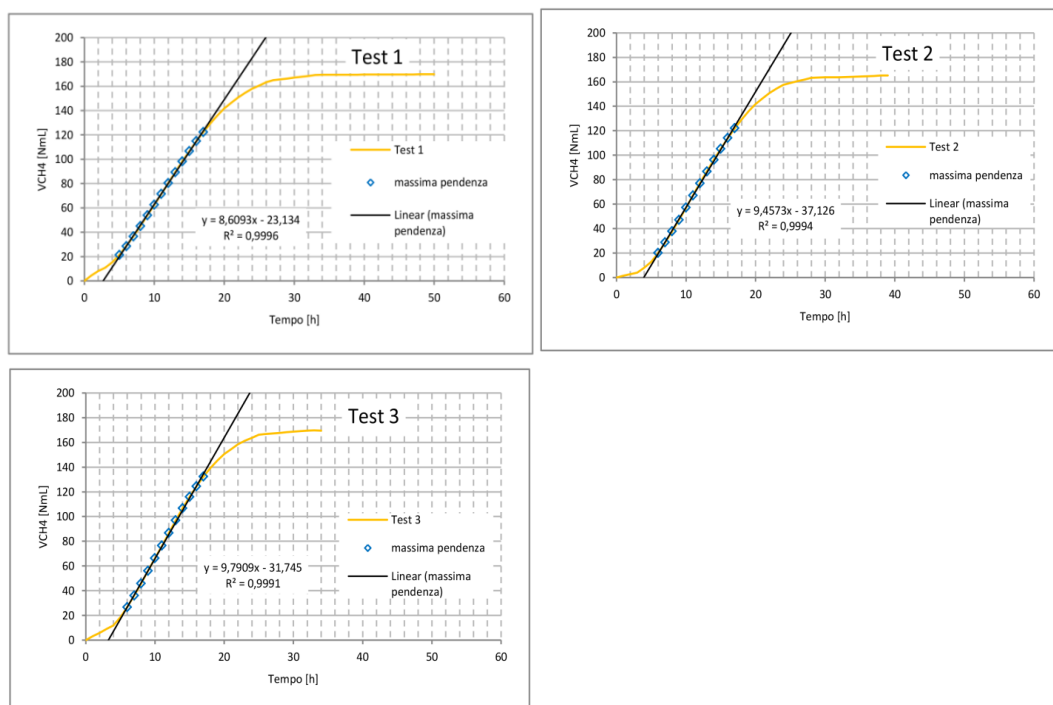


Figura 3.10 Seconda prova di SMA

Ugualmente a quanto svolto nella prima prova, è stata utilizzata la modellizzazione per il calcolo della SMA simulata e della relativa percentuale di biomassa attiva, illustrati in Tabella 3.8. Le simulazioni si possono osservare in Appendice 3.

Tabella 3.8 SMA sperimentale, SMA simulata e relativa percentuale di biomassa attiva

		digestato cartiera		
		Test 1	Test 2	Test 3
% biomassa attiva	%	2,131%	2,278%	1,809%
SMA simulata	$gCOD/gSV/d$	0,242	0,259	0,205
SMA sperimentale	$gCOD/gSV/d$	0,225	0,247	0,256

In queste prove si può osservare come i valori di SMA simulata e di SMA sperimentale siano molto prossimi tra loro, a differenza delle prove precedenti in cui si erano verificati problemi a causa dell'ossigeno disciolto.

Nella Figura 3.11 è mostrato il confronto tra la SMA simulata e quella ottenuta sperimentalmente negli 8 test eseguiti; è inoltre evidenziata la percentuale di biomassa attiva calcolata dal modello per ciascun caso.

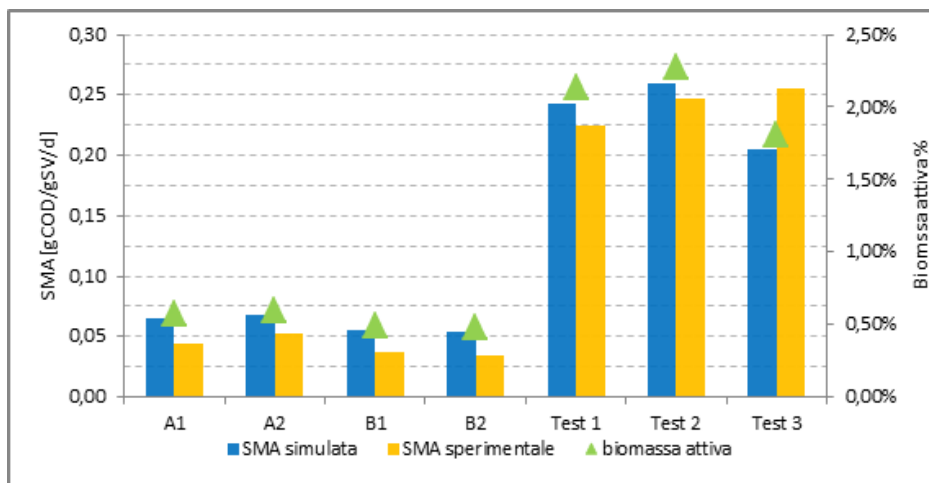


Figura 3.11 SMA sperimentale e SMA simulata e relativa percentuale di biomassa attiva

Dal confronto delle attività dei due fanghi e dalle percentuali di biomassa attiva si è potuto osservare che:

- la SMA sperimentale del fango granulare proveniente dalla cartiera è un ordine di grandezza superiore rispetto a quella ottenuta sul fango del digestore del caseificio;
- la percentuale di biomassa attiva ricavata facendo combaciare la curva prodotta dal modello secondo le cinetiche di reazione conferma quanto ottenuto dalla prova sperimentale: in media, le primo e nel secondo fango testato essa risulta, rispettivamente, pari a 0,5 e 2,1%.

Poiché le osservazioni sui due parametri risultano concordanti, è stato scelto come inoculo per il digestore anaerobico di ECO-SI il fango proveniente dall'impianto di trattamento dei reflui della Cartiera Giorgione.

### 3.3 Prove di Biochemical Methane Potential (BMP): valutazione delle rese della filiera monostadio e doppio stadio

Il percorso di ricerca ha previsto la realizzazione di due prove di BMP su due matrici differenti: il siero di latte ultrafiltrato e il permeato di un reattore MBR a scala pilota di dark fermentation.

Il BMP è un valore che caratterizza di per sé la matrice e può essere ottenuto per via teorica (secondo la relazione 33) o per via sperimentale.

$$BMP_{teorico} = M_{CODin} [mgCOD] \times (1 - Y) \times 0,35 \left[ \frac{mL CH_4}{mgCOD} \right] \quad [33]$$

Dove 0,35 è il volume (mL) teorico di metano producibile per g COD rimosso, e (1-Y) rappresenta la quota parte del COD rimosso utilizzato dai batteri per sintetizzare nuova biomassa. Nel caso della digestione di siero di latte Y è pari a 0,17, per quanto riguarda

invece la digestione dell'uscita del reattore di DF Y risulta pari a 0,08 (Entrambi i valori sono ricavati dal modello ADM1).

Dal confronto tra il BMP teorico e quello ottenuto sperimentalmente siamo in grado di valutare la reale biodegradabilità del substrato.

La prova BMP sul siero di latte ultrafiltrato è di interesse per valutare la generale biodegradabilità della matrice utilizzata come alimento per il digestore anaerobico dell'impianto pilota ECO-SI.

La prova BMP sul permeato del reattore di dark fermentation (alimentato anch'esso a siero di latte) è d'interesse nella valutazione del metano producibile nel secondo stadio di digestione anaerobica, qualora preceduto da uno stadio di dark fermentation. Nel caso della prova sul permeato è necessario tener presente che la matrice alimentata al reattore ha già subito le prime due fasi della digestione anaerobica (che costituiscono di fatto il processo di dark fermentation) ed è, quindi, principalmente costituita da acidi grassi volatili - prevalentemente acido acetico e butirrico.

Entrambe le prove sono state eseguite in doppio ed è stato previsto un bianco di prova per valutare il potenziale biochimico al netto della produzione endogena. L'allestimento delle prove è illustrato nel paragrafo 2.4.1.

Nella Figura 3.12 si osserva l'andamento delle prove nel tempo in termini di volume di metano prodotto cumulato, fornito dal software AMPTS al termine della prova; le produzioni volumetriche delle due prove, sono molto diverse in ragione del COD alimentato, pari a 2,5 e 0,5 g rispettivamente nel primo e nel secondo test

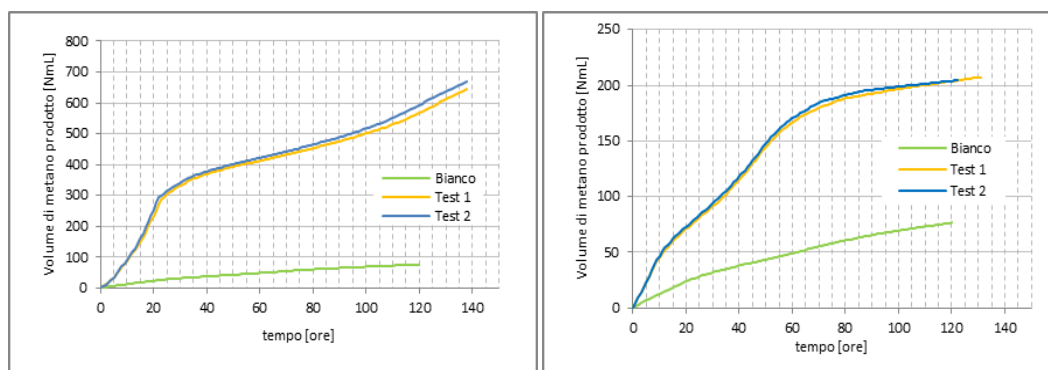


Figura 3.12 Metano prodotto nella prova di BMP con siero di latte UF con il permeato di un reattore pilota di Dark Fermentation

Dai grafici in Figura 3.12, è possibile osservare come i test di BMP siano ripetibili, poiché entrambe le prove sono caratterizzate dalla medesima curva, producono lo stesso volume di metano e sono caratterizzate da uguale durata.



Inoltre entrambe le prove raggiungono lo stato stazionario dopo circa 6 giorni, durata che indica un rapida biodegradabilità della matrice, ciò conferma il rapporto BOD5/BODultimo intorno a 0,8 presente in letteratura.

La prova di BMP su siero è durata 138 ore in entrambi i test; il valore di BMP medio ottenuto è pari a  $258 \text{ NmLCH}_4/\text{g}_{\text{COD}}$  in rispetto al COD in ingresso, e  $263 \text{ NmLCH}_4/\text{g}_{\text{CODrimosso}}$  rispetto al COD rimosso, contestualmente ad una rimozione del COD del 96 %.

La prova sul permeato del reattore di dark fermentation è durata 131 e 122 ore rispettivamente per i test 1 e 2 e, rispetto a quella effettuata sul siero, è caratterizzata da una maggiore velocità di consumo iniziale del substrato. Questo aspetto provoca una produzione di metano più rapida durante le prime 20 ore poichè le prime fasi della digestione anaerobica, l'idrolisi e l'acidogenesi, sono già avvenute nello stadio che precede la prova, ovvero nel reattore di DF. Per questo l'alimento è costituito principalmente da acidi grassi volatili e risulta quindi "pronto" per l'acetogenesi, conversione di tutti i VFA ad acido acetico, e la consecutiva metanogenesi.

Il BMP di questa matrice si assesta a fine prova su un valore pari a circa  $259 \text{ mLCH}_4/\text{g}_{\text{COD}}$  in rispetto al COD in ingresso e a  $275 \text{ NmLCH}_4/\text{g}_{\text{CODrimosso}}$  rispetto al COD rimosso, contestualmente ad un'efficienza di rimozione del processo pari al 89 %.

La differenza tra la biodegradabilità e la rimozione del COD che si osserva nella degradazione del siero di latte può essere stato condotto un errore nell'assunzione del coefficiente Y relativo alla crescita della biomassa.

Per entrambe le matrici la biodegradabilità, calcolata come il rapporto tra il volume di metano prodotto atteso (calcolato tramite la relazione 33, illustrata precedentemente) e quello ottenuto sperimentalmente, si assesta per entrambe le matrici intorno all'89 %.

È stata inoltre condotta una valutazione teorica per il confronto dei due processi: monostadio (DA) e doppio stadio (DF+DA), in Figura 3.13

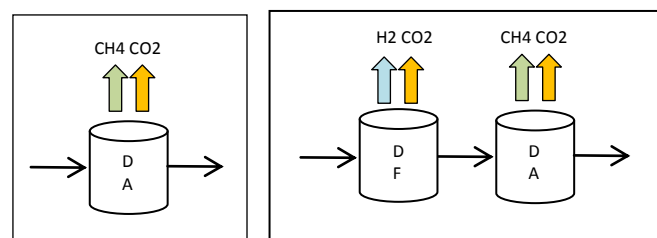


Figura 3.13 configurazione delle due filiere monostadio (DA) e doppio stadio (DF+DA)

La resa in termini di produzione di metano giornaliera del processo monostadio è stata calcolata considerando in alimento il COD del siero UF ed il BMP ottenuto sperimentalmente è, dunque, calcolata a partire dalla relazione 34 dove il BMP è espresso

in mLCH<sub>4</sub>/gCODalimentato, la concentrazione del siero in alimento in gCOD/L e la portata in L/d.

$$CH_4 = BMP \times Conc.siero\ in \times Q \quad [34]$$

Per valutare invece la resa del processo doppio stadio (DF+DA) sono state utilizzate tre rese di produzione di idrogeno (esprese in molH<sub>2</sub> prodotte/mol di lattosio alimentato) ottenute dalle prove di BHP. In particolare sono state scelte:

- la resa del type strain 792, la cui media nelle prove in batch è stata pari a 3,6 molH<sub>2</sub>/mol lattosio;
- la resa della coltura mista 792+B+T, la cui media nelle prove in batch è stata pari a 4,0 molH<sub>2</sub>/mol lattosio;
- la resa del fango pretrattato termicamente della seconda prova condotta, pari a 2,8 molH<sub>2</sub>/mol lattosio.

A partire da queste tre rese di produzione è stata considerata un'efficienza di rimozione del COD, nello stadio di dark fermentation, pari a quella ottenuta dal reattore a scala pilota installato presso il DICA, nel periodo in cui è stato prelevato il permeato per la prova di BMP qui descritta.

Al contrario, per quanto riguarda la concentrazione di COD alimentato è stato considerato il valore del siero UF in ingresso all'impianto pilota ECO-SI, e pari a 62 gCOD/L.

Con i dati descritti nel paragrafo 2.3.3, relativi ai volumi e alle portate di progetto del pilota ECO-SI, sono state valutate le tre possibili rese del processo doppio stadio, come illustrato in Tabella 3.9

Tabella 3.9 Valutazione comparativa della configurazione monostadio (DA) e doppio stadio (DF +DA)

<b>processo singolo stadio DA</b>		<b>processo doppio stadio DF+DA</b>			
<b>Volume CH<sub>4</sub> prodotto</b>	<b>ceppo</b>	<b>resa</b>	<b>H<sub>2</sub> prodotto</b>	<b>Volume H<sub>2</sub> prodotto</b>	<b>Volume CH<sub>4</sub> prodotto dallo stadio di DA</b>
<i>m<sup>3</sup>/d</i>		<i>molH<sub>2</sub>/mol lattosio</i>	<i>molH<sub>2</sub>/d</i>	<i>m<sup>3</sup>/d</i>	<i>m<sup>3</sup>/d</i>
	792	3,6	579	6,6	
15,3	792+B+T	4	653	7,5	12,9
	pretrattato	2,8	463	5,3	

Per confrontare le rese ottenute in termini di energia producibile è stata valutata l'energia che verrebbe prodotta quotidianamente dalle due configurazioni. Le caratteristiche di

metano e idrogeno sono illustrate in Tabella 3.10 *Densità e potere calorifico inferiore di metano e idrogeno*.

Tabella 3.10 *Densità e potere calorifico inferiore di metano e idrogeno*

	CH4	H2
densità kg/m <sup>3</sup>	0,68	0,085
PCI MJ/kg	50,0	120,0
PCI MJ/m <sup>3</sup>	31,7	11,1

I volumi di metano e idrogeno prodotti sono stati convertiti in energia per confrontare i risultati ottenibili dalla configurazione monostadio e da quella doppio stadio. I valori ottenuti sono illustrati in Tabella 3.11.

Tabella 3.11 *Rese energetiche delle configurazioni monostadio (DA) e doppio stadio (DF+DA)*

<b>configurazione DA monostadio</b>		
Energia prodotta	484,1	MJ/d
<b>configurazione DF+DA doppio stadio</b>		
	<b>DF</b>	
Energia prodotta dal primo stadio con resa H <sub>2</sub> da ceppo 792	73,4	MJ/d
Energia prodotta dal primo stadio con resa H <sub>2</sub> da ceppo 792+B+T	82,8	MJ/d
Energia prodotta dal primo stadio con resa H <sub>2</sub> da fango pretrattato	58,8	MJ/d
	<b>DA</b>	
Energia prodotta dal secondo stadio	408,5	MJ/d
	<b>DF+D</b>	
	<b>A</b>	
Energia prodotta complessiva dal sistema doppio stadio con resa H <sub>2</sub> da ceppo 792	481,9	MJ/d
Energia prodotta complessiva dal sistema doppio stadio con resa H <sub>2</sub> da ceppi 792+B+T	491,3	MJ/d
Energia prodotta complessiva dal sistema doppio stadio con resa H <sub>2</sub> da fango pretrattato	467,2	MJ/d

Dai valori ottenuti risulta che l'energia ottenibile dalla configurazione monostadio di digestione anaerobica è superiore a quella ottenibile dal doppio stadio DF+DA sebbene siano state considerate rese in termini di idrogeno piuttosto ottimistiche. Queste infatti sono state ottenute da prove in batch in cui il controllo della crescita dei batteri lattici, in grado di compromettere la produzione di idrogeno, è controllata naturalmente dalla breve durata della prova, al contrario di ciò che avviene in reattori alimentati in continuo.

Ma il vantaggio imputato all'aggiunta della dark fermentation non è solamente relativo al volume di gas prodotto: l'utilizzo delle miscele idrogeno-metano nel settore dell'autotrazione è incentivata dalla comunità europea (EC 79/2009) soprattutto per i vantaggi ambientali che derivano dal loro impiego.

Infatti studi effettuati sui motori a combustione interna hanno evidenziato che la miscelazione dell'idrogeno al gas naturale comporta non solo una maggiore efficienza del

propulsore ma anche una diminuzione delle emissioni di inquinanti. Ciò avviene poiché la presenza di idrogeno permette un aumento della velocità di propagazione del fronte di fiamma all'interno della camera di combustione e, di conseguenza, consente il completamento delle reazioni di combustione.

### **3.4 Fase di avvio e relativo monitoraggio del reattore di digestione anaerobica dell'impianto ECO-SI**

Una volta effettuata la scelta del fango di inoculo per il digestore sulla base delle prove di SMA, è stata scelta la strategia di avvio.

Rispetto ai due criteri illustrati nel primo capitolo, per l'avvio del digestore ECO-SI è stato utilizzato un approccio ibrido: il reattore è stato totalmente inoculato e l'aumento del carico è avvenuto in maniera progressiva basandosi su prove di SMA (effettuate con cadenza mono o bisettimanale) attraverso cui è stata valutata la percentuale di biomassa attiva presente nel fango, e il relativo carico alimentabile.

L'avvio del digestore ha avuto luogo il giorno 9 febbraio: circa 2,4 m<sup>3</sup> di fango granulare sono stati trasferiti all'interno del digestore.

La portata di siero UF alimentata è quella di progetto (pari a 40 L/h) con HRT costante e pari a 3 giorni, mantenuto grazie all'estrazione di permeato ogni 15 minuti circa; il tempo di ritenzione della biomassa è invece stato mantenuto pari a infinito (non è stata prevista estrazione di fango di supero) durante tutto il primo mese di funzionamento .

A causa di alcuni problemi tecnici come l'impaccamento dell'unità di ultrafiltrazione e il mal funzionamento della pompa P-03 dell'alimento, l'impianto è stato effettivamente avviato in data 27 febbraio.

L'interruzione dell'alimento (determinata dalla rottura della pompa p-03) non porta in questo caso solo ad un blocco momentaneo del processo, ma anche ad una perdita di temperatura all'interno del reattore. Ciò accade poiché i reattori non sono stati coibentati durante la fase di montaggio dell'impianto e, quindi, la temperatura viene garantita esclusivamente dall'alimento caldo (70°C).

L'oscillazione della temperatura verificatasi durante la fase di avvio, con ripetuti cali al di sotto del valore di set point (34°C) ha impedito all'interno del digestore anaerobico lo svolgimento continuativo del processo di degradazione. Per questa ragione sono stati alimentati al digestore carichi bassi, applicando la diluizione del siero UF in ingresso.

Il carico alimentato al digestore durante la fase avvio è stato deciso sulla base di una prova di SMA effettuata circa una/due volte la settimana. Essa fornisce una velocità

specifica massima, che può essere convertita nel massimo carico (OLR) alimentabile al reattore tramite la seguente relazione (35):

$$OLR_{max} = SMA \left[ \frac{mL CH_4}{gSSV d} \right] \times \frac{1}{0,35} \left[ \frac{mgCOD}{mLCH_4} \right] \times Biomassa_{nel\ reattore} [gSSV] \quad [35]$$

Il carico in alimento è stato variato modificando, in fase di preparazione del carico, la diluizione del siero UF. Il primo carico effettuato è stato di 0,38 kgCOD/m<sup>3</sup>/d, pari al 43 % dell'OLR massimo alimentabile (calcolato sulla base della SMA e della concentrazione di solidi all'interno del reattore).

A partire dal 27 febbraio ogni due giorni è stato preparato un nuovo carico con una diluizione via via crescente, corrispondente ad una concentrazione in alimento sempre maggiore (a meno del verificarsi di problemi tecnici a fronte dei quali sono state prese misure cautelative). La diluizione adottata di volta in volta è illustrata dal grafico in Figura 3.14.

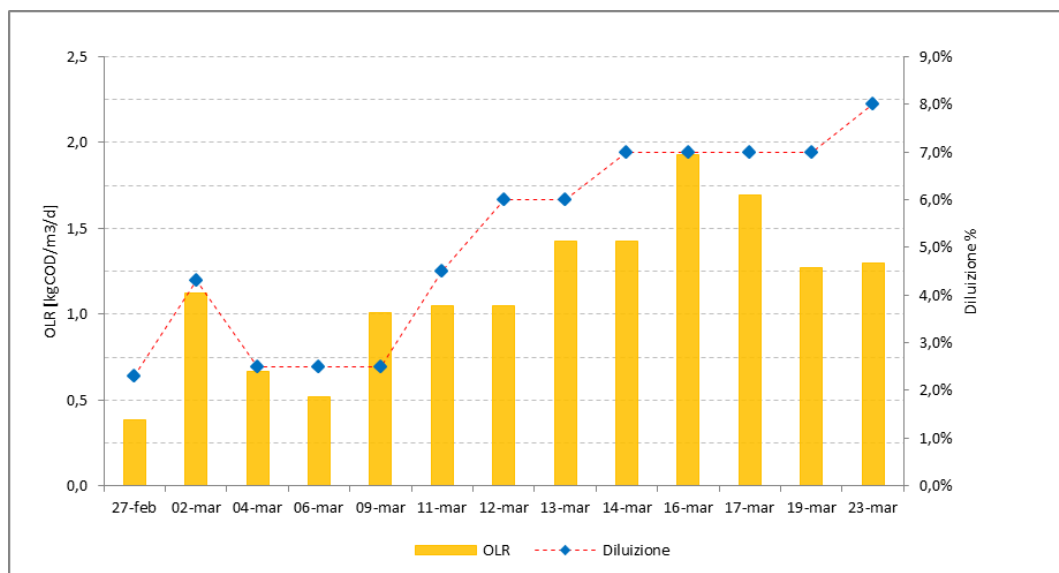


Figura 3.14 Fattore di diluizione del siero UF in alimento al digestore

Le prove di SMA effettuate per valutare il massimo carico alimentabile, e di conseguenza il fattore di diluizione da applicare sono state allestite come illustrato nel paragrafo 2.4.3.

Il fango di cui si vuole testare l'attività è stato prelevato dalla presa campione posta sul digestore e utilizzato lo stesso giorno per l'avvio della prova.

Nella Figura 3.15 è rappresentato l'andamento delle prove di SMA nel tempo: in verde è rappresentata la curva ottenuta sperimentalmente e in blu quella simulata dal modello. Quest'ultima viene "fittata" sulla curva sperimentale al variare della percentuale di biomassa attiva; il parametro di ottimizzazione utilizzato è la somma degli scarti

quadratici tra tra curva simulata, che varia al variare della % di biomassa attiva, e quella sperimentale.

I grafici sono posti temporalmente a partire dalla prima prova effettuata il 9 febbraio, all'ultima, il 19 marzo.

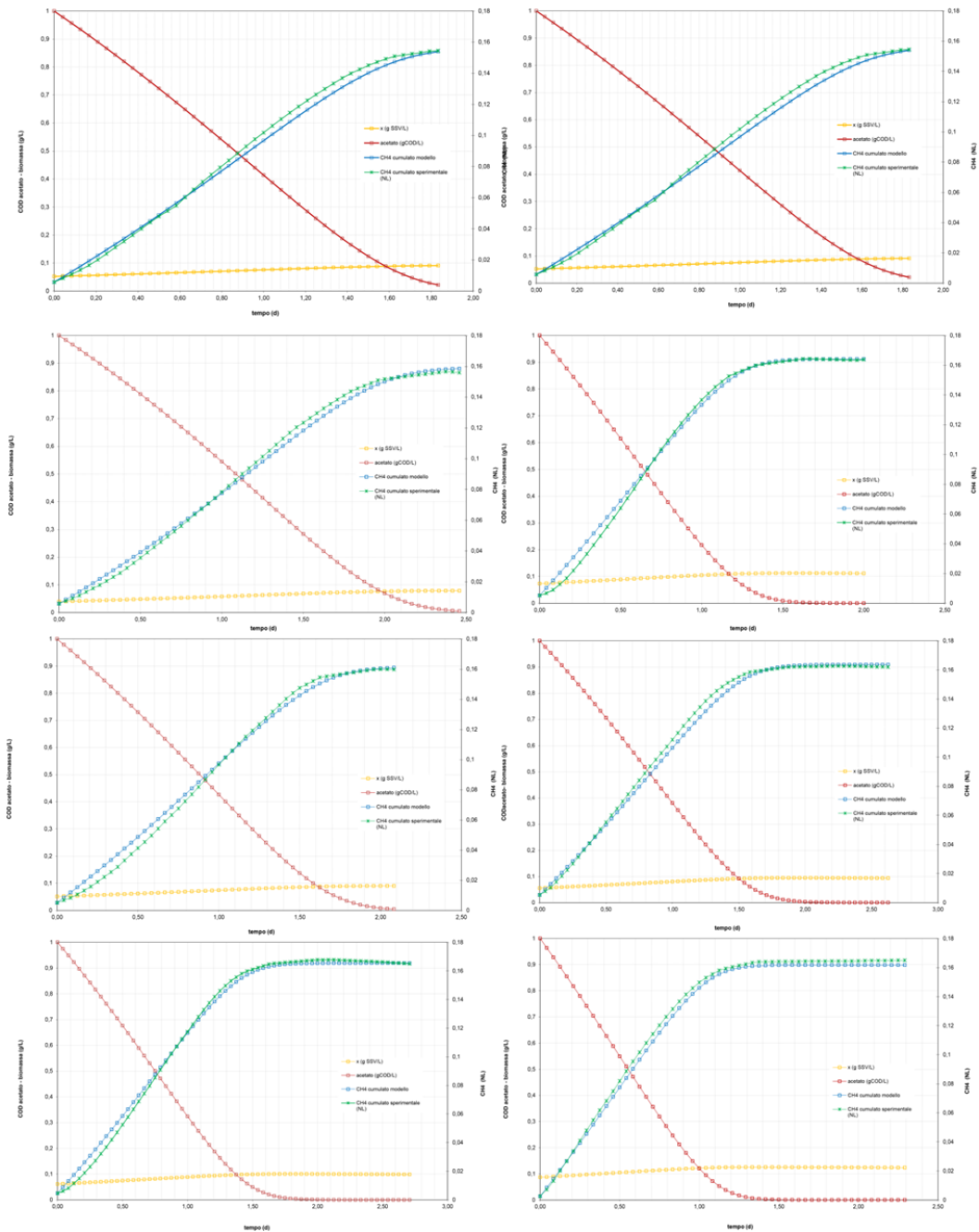


Figura 3.15 Prove di SMA simulata, SMA sperimentale, consumo di substrato e crescita della biomassa

Il valore di partenza della SMA effettuata il giorno dell'inoculo avrebbe dovuto corrispondere a quello ottenuto nella prova svolta per la scelta del fango. I due valori tuttavia non corrispondono perché tra il prelievo del fango per la prova illustrata nel paragrafo precedente (avvenuto il 2 dicembre) e il prelievo avvenuto il giorno

dell'inoculo del digestore (9 febbraio) è stata compiuta la manutenzione annuale dell'impianto, che è rimasto non alimentato per alcune settimane. Per questa ragione si osserva una perdita di attività della biomassa.

Come illustrato in Figura 3.16, il valore della prova di SMA effettuata durante la fase di avvio (compresa tra il 27 febbraio e il 23 marzo) cresce nel tempo, poiché cresce la percentuale di biomassa attiva. Questa rappresenta la quota parte degli SSV che effettivamente agiscono nella degradazione del substrato alimentato.

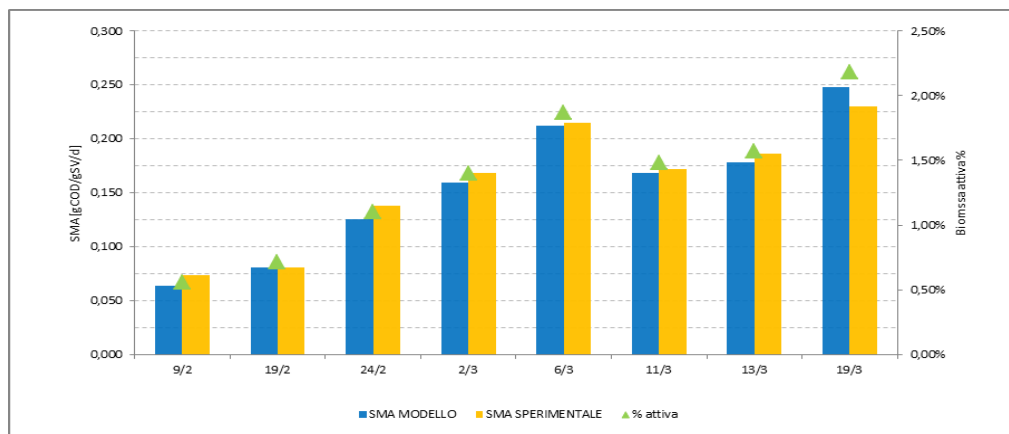


Figura 3.16 SMA sperimentale SMA simulata e relativa percentuale di biomassa attiva

Solamente tra il 6 e l'11 marzo il valore della SMA decresce: tra le due prove infatti si è verificata la rottura della pompa P-03 che controlla l'alimento causando continue oscillazioni della temperatura all'interno del digestore. Questa condizione non risulta chiaramente ottimale per la crescita della biomassa attiva.

Per ogni prova la percentuale di biomassa attiva presente nel fango è stata calcolata secondo la modellizzazione semplice illustrata nel paragrafo 2.6: essa rispecchia l'andamento della SMA, crescendo lungo tutto il periodo della fase di avvio eccetto che tra il 6 e l'11 marzo.

In Tabella 3.12 sono illustrati i valori di SMA ottenuti sperimentalmente, quelli simulati e le relative percentuali di biomassa attiva nel fango.

Tabella 3.12 SMA sperimentale, SMA simulata e relativa percentuale di biomassa attiva

data		9/2	19/2	24/2	2/3	6/3	11/3	13/3	19/3
% biomassa attiva	%	0,56	0,71	1,10	1,40	1,87	1,48	1,57	2,18
SMA simulata	$gCOD/gSV/d$	0,063	0,081	0,125	0,159	0,212	0,168	0,179	0,248
SMA sperimentale	$gCOD/gSV/d$	0,074	0,08	0,138	0,168	0,215	0,172	0,186	0,23

Durante la fase di avvio sono stati prelevati quotidianamente dall'impianto ECO-SI tre campioni:

- il siero diluito in ingresso al reattore di DA
- il mixed liquor del reattore di DA
- il permeato dell'unità di ultrafiltrazione associata alla DA

I parametri monitorati sono stati:

- il pH, in tutti e tre i campioni
- la concentrazione di SST ed SSV nel mixed liquor
- il rapporto tra acidi grassi volatili e alcalinità nel mixed liquor e nel permeato
- il COD in ingresso (siero diluito) e in uscita (permeato)
- l'Azoto Totale e l'Azoto ammoniacale in ingresso (siero diluito) e in uscita (permeato)
- la TMP e il contenuto di proteine e carboidrati di SMP ed EPS

Il pH di set point è pari a 7; il mantenimento di tale valore all'interno del reattore è garantito tramite il dosaggio di soda.

La temperatura di processo, come illustrato in precedenza, è mantenuta dall'alimento caldo, pertanto quando occorrono problemi tecnici, come interruzioni di corrente o malfunzionamenti della pompa in alimento, si verifica il calo di questo parametro. In Figura 3.17 è mostrato l'andamento di temperatura e pH durante la fase di monitoraggio.



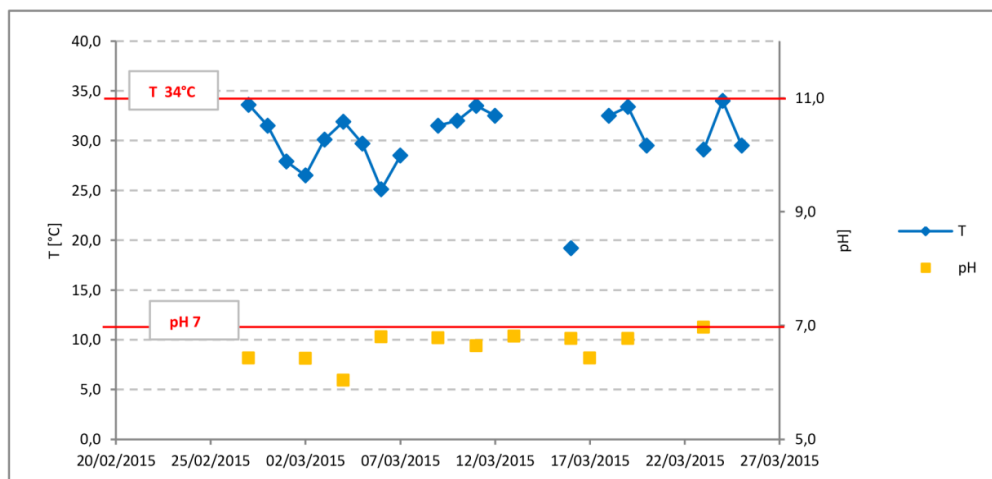


Figura 3.17 Temperatura e pH del mixed liquor durante la fase di monitoraggio

A qualche giorno dall'inoculo, nel fango granulare, a causa dei ripetuti passaggi attraverso l'unità di filtrazione, si è verificata la rottura dei granuli che ha portato all'impaccamento delle membrane.

A seguito della pulizia e di un un parziale svuotamento del reattore è stata raggiunta e mantenuta la concentrazione di 10 gSST/L.

Il tenore di solidi sospesi e volatili è stato monitorato tre volte la settimana, i valori ottenuti sono illustrati nel grafico in Figura 3.18. Una volta alla settimana è stata condotta una verifica di buona miscelazione del fango analizzando le concentrazioni di solidi sospesi totali e volatili di tre campioni prelevati da tre diverse prese campione poste una sul fondo, una a metà altezza e una nella parte alta del digestore.

La verifica di buona miscelazione, a seguito della sgranulazione del fango, ha sempre portato a un esito positivo.

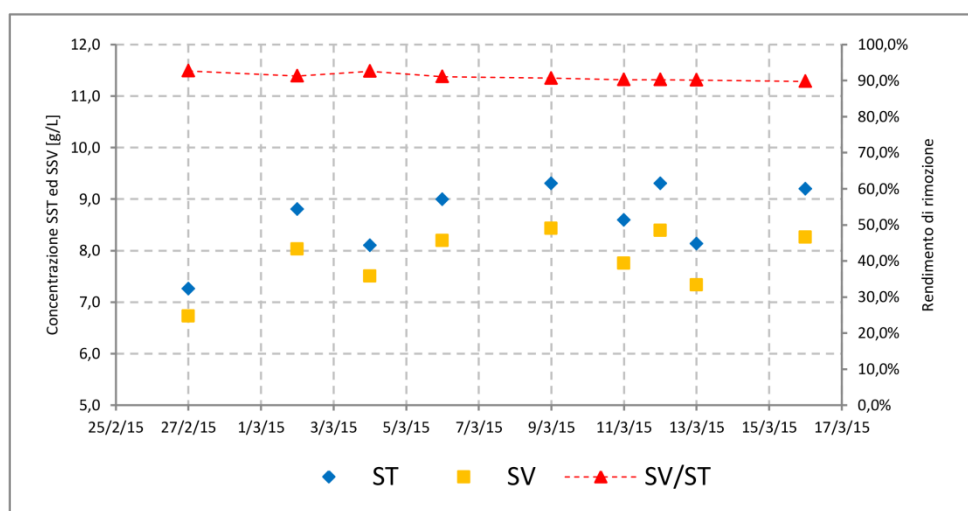


Figura 3.18 Tenore di solidi sospesi e volatili nel mixed liquor durante la fase di monitoraggio

La concentrazione del COD in ingresso e in uscita è stata monitorata effettuando test del COD solubile in kit sui campioni di siero diluito e di permeato, che rappresentano l'ingresso e l'uscita dell'impianto.

La concentrazione di COD in ingresso è stata valutata per monitorare la buona riuscita della diluizione iniziale del siero, oltre che per monitorare l'effettivo rendimento di rimozione del COD.

Esso, anche se sempre relativamente a carichi applicati molto bassi, è risultato sempre superiore all'87 %, nonostante le continue discontinuità del processo.

Il monitoraggio della concentrazione di COD in ingresso e in uscita è rappresentato in Figura 3.19; si tenga presente che nel grafico in Figura 3.19 il COD out è stato moltiplicato per un fattore 10 per rendere leggibile il valore.

Parallelamente al monitoraggio del COD è stato controllato anche il contenuto di azoto totale e ammoniacale: anche se l'azoto non risulta presente nel siero in ingresso, infatti, esso viene aggiunto mediante dosaggio di ammoniaca per soddisfare il fabbisogno batterico di tale nutriente.

Il monitoraggio dell'azoto totale e di quello ammoniacale ha mostrato come tutto l'azoto presente fosse presente sotto forma di  $N-NH_4$ .

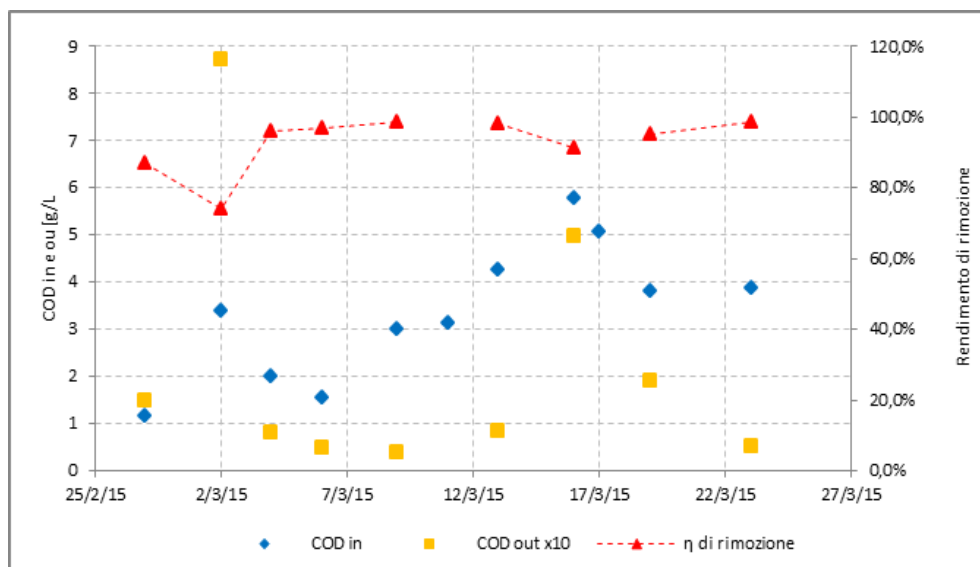


Figura 3.19 COD in e COD out e relativi rendimenti di rimozione durante la fase di monitoraggio

Il monitoraggio dell'alcalinità e degli acidi grassi volatili è avvenuto sia sul mixed liquor che sul permeato, per mezzo di uno strumento che misura per titolazione la concentrazione degli acidi grassi volatili in  $mgCH_3COOH/L$  (FOS) e dell'alcalinità totale in  $mgCaCO_3/L$  (TAC).

Nel Grafico in Figura 3.20 (a) è rappresentato il rapporto FOS/TAC ottenuto dalle analisi nel corso del monitoraggio, i valori segnati in rosso corrispondono a giorni di malfunzionamento del processo.

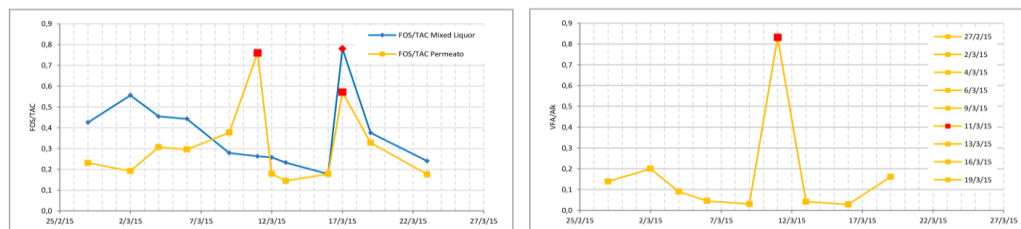


Figura 3.20 FOS/TAC nel mixed liquor e nel permeato e misura dei VFA in kit sul permeato durante la fase di monitoraggio

In letteratura, valori di FOS/TAC compresi tra 0,2 e 0,3 sono indice di un buon funzionamento del processo, valori superiori di possibili squilibri per consumo dell'alcalinità nel mezzo e valori inferiori di un carico troppo basso in alimento.

Il valore del FOS/TAC non è sempre attendibile, per questa ragione è stato confrontato con l'analisi dei VFA e dell'Alcalinità effettuata in kit, sia sul permeato che sul mixed liquor (previa filtrazione).

Per quanto riguarda l'alcalinità l'analisi effettuata in kit risulta combaciare con il valore di TAC; al contrario la concentrazione dei VFA ottenuta mediante questa seconda analisi è risultata sempre inferiore al valore di FOS.

Il fatto che i valori di uno strumento rudimentale come quello che misura il FOS/TAC siano incrociati con le più precise analisi in kit ha consentito un'accurata verifica del funzionamento del processo, anche nel caso in cui il digestore è stato erroneamente caricato con un OLR superiore a quello massimo. La concentrazione dei VFA ottenuta dalle analisi in kit sul permeato è illustrata nel grafico in Figura 3.20 (b).

In queste condizioni di carico ridotto, la portata di gas prodotta non è misurabile poiché inferiore  $0,5 \text{ m}^3/\text{d}$ ; è stata però effettuata un'analisi della composizione del gas con un analizzatore di gas portatile. La composizione del biogas rilevata è illustrata in Tabella 3.13.

Tabella 3.13 Composizione del biogas prodotto dal digestore ECO-SI

composizione del biogas		
CH <sub>4</sub>	58,6	%
CO <sub>2</sub>	38,6	%
O <sub>2</sub>	2,8	%
H <sub>2</sub> S	8	ppm

Gli incrementi della pressione transmembrana TMP nell'unità di ultrafiltrazione vengono monitorati dalla lettura della pressione a monte e a valle del processo. Il lavaggio delle membrane è stato effettuato in data 5 marzo e la TMP ad oggi è rimasta stabile e pari 0,1 bar.

Il fango è stato caratterizzato dal punto di vista della concentrazione di SMP ed EPS al momento dell'inoculo e i data 11 marzo (nel pieno della fase di monitoraggio dell'impianto).

I campioni sono stati estratti secondo la metodologia illustrata nel paragrafo 2.6.9.

La caratterizzazione di SMP ed EPS è fatta a partire dal contenuto di proteine e carboidrati di cui sono principalmente composti, poiché SMP ed EPS sono i principali responsabili dello sporco delle membrane.

Le concentrazioni rilevate sono illustrate in Tabella 3.14; la caratterizzazione del campione di fango prelevato dal digestore è rappresentata in Figura 3.21.

Nell'osservazione dei risultati ottenuti bisogna considerare che la concentrazione di solidi all'interno del reattore è scesa da un valore di circa 33 g/L, misurato sul fango sgranulato dai primi passaggi attraverso le membrane, ad un valore di circa 10 g/L a causa di un parziale svuotamento del reattore per l'impaccamento dell'unità di ultrafiltrazione che è avvenuto a pochi giorni. Perciò se le concentrazioni di SMP ed EPS fossero rimaste costanti si dovrebbero osservare, nella seconda analisi, concentrazioni pari ad un terzo di quelle osservate nella prima.

Questa osservazione risulta verificata per quanto riguarda i carboidrati che compongono SMP ed EPS, ma non per quanto riguarda le proteine. Nel caso degli EPS si può notare un calo di circa il 39%; per quanto riguarda le proteine costituenti gli SMP si osserva invece una concentrazione prossima a quella rilevata nell'analisi in concomitanza dell'avvio.

In Figura 3.21 si può notare come la maggior parte degli agenti sporcanti siano costituiti, per il fango presente nel digestore ECO-SI, da proteine.

*Tabella 3.14 Analisi di proteine e carboidrati che costituiscono SMP ed EPS*

	<b>SMP</b>	<b>EPS</b>	
<b>Analisi 1 - 9 febbraio 2015, avvio pilota</b>			
proteine	288,46	895,38	<i>mg/L</i>
carboidrati	258,78	416,62	<i>mg/L</i>
<b>Analisi 2 - 11 marzo 2015</b>			
proteine	250	545,38	<i>mg/L</i>
carboidrati	81,76	98,11	<i>mg/L</i>

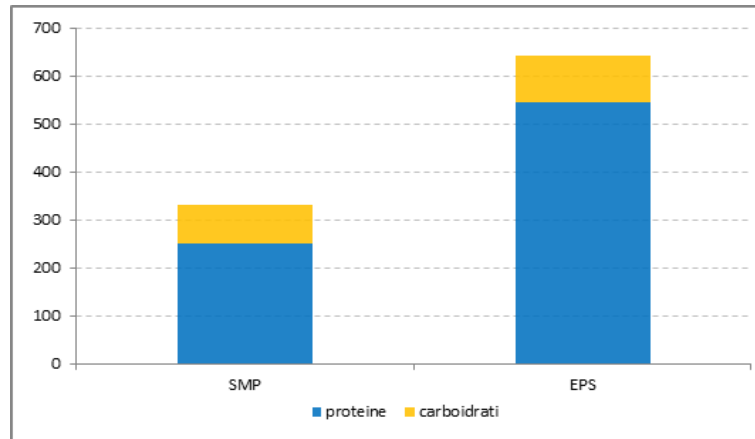


Figura 3.21 Contenuto di proteine e carboidrati nel fango prelevato dal digestore anaerobico ECO-SI

## Conclusioni

Le prove di BHP sono state effettuate in batch su ceppi selezionati dal centro di ricerche biotecnologiche (UCSC) e su biomassa pretrattata termicamente alimentati con siero di latte UF.

I ceppi selezionati sono stati testati singolarmente o in combinazione all'interno delle bottiglie di prova per valutarne le rese ottenibili in termini di idrogeno prodotto per mole di lattosio consumato: queste sono risultate prossime alle teoriche, con valori massimi ottenuti con il *C. Acetobutylicum 792 Mutante 56* (4,4 molH<sub>2</sub>/mol lattosio) e dai mix *C. Butyricum e Tyrobutiricum*, *C. Acetobutylicum 792 e Butyricum*, *C. Acetobutylicum 792 Butyricum e Tyrobutiricum* (rispettivamente pari a 4,21 4,05 e 4,01 molH<sub>2</sub>/mol lattosio). L'inoculo di tali ceppi, avvenuto in cappa anaerobica, ha portato a rese più elevate rispetto a studi precedenti. I fenomeni di inibizione da ossigeno comunque verificatisi mostrano l'estrema sensibilità di tali microrganismi alla presenza di questo gas; ciò fa difficilmente pensare ad un loro prossimo utilizzo a larga scala.

Le rese dei ceppi selezionati mediante il pretrattamento termico del fango hanno mostrato invece una minore sensibilità alla presenza di ossigeno (l'inoculo non è avvenuto in cappa anaerobica) a fronte, però, di rese di produzione inferiori (2,85 molH<sub>2</sub>/mol lattosio). Le prove BHP svolte con fango pretrattato termicamente hanno mostrato un aumento di resa tra una prova e l'altra dovuto all'adattamento del consorzio microbico alla digestione del siero di latte avvenuta all'interno del digestore ECO-SI.

Le prove in batch hanno mostrato rese superiori rispetto a quelle ottenute da studi precedenti in continuo poiché l'alimento viene consumato in massimo 70 ore, tempo non sufficiente per lo sviluppo dei batteri lattici in grado di abbassare notevolmente le rese di produzione di idrogeno in favore della produzione di acido lattico.

Le prove di BMP sono state effettuate su due matrici di interesse per la filiera ECO-SI (il siero di latte e il permeato di un reattore MBR a scala pilota di dark fermentation) al fine di valutarne la biodegradabilità. Questa, calcolata come il rapporto tra il volume di metano prodotto atteso, e quello ottenuto sperimentalmente nel caso del siero di latte si assesta intorno all'88,5 % nel caso del permeato di DF intorno all'80,2%.

Con prove di SMA sono stati confrontati, dal punto di vista dell'attività metanogenica specifica, due digestati: il primo proveniente da un impianto alimentato con reflui suinicoli e il secondo da un impianto alimentato con reflui di cartiera.

I digestati hanno presentato una massima velocità di degradazione dell'acetato di sodio (utilizzato come alimento per test di SMA) pari a 0,7015 mLCH<sub>4</sub>/gSSV/h e 3,5 mLCH<sub>4</sub>/gSSV/h.

Le prove hanno pertanto portato alla scelta del fango granulare proveniente dal reattore ad alto carico (IC) di trattamento di reflui di cartiera per l'inoculo del digestore anaerobico di ECO-SI.

La fase di avvio del digestore ha previsto il monitoraggio di alcuni parametri per valutare il corretto svolgimento del processo biologico.

La rimozione del COD media ottenuta è stata del 93%, ma in corrispondenza di periodi stabili di T=35°C e pH=7 si sono ottenuti rendimenti pari al 98,7%. La concentrazione di solidi nel reattore è stata mantenuta prossima a 10 g/L senza estrazione di fango di supero, con un rapporto tra SSV ed SST pari mediamente al 92%. Non si sono verificati squilibri derivanti dall'accumulo di VFA e al consumo di alcalinità.

La scelta del carico da alimentare basandosi su prove di SMA per la valutazione della capacità degradativa complessiva del digestore.

Dalle simulazioni delle prove, ottenute con una semplificazione del modello ADM1, è stata ricavata la crescita della percentuale di biomassa attiva nel fango.

Le prove di SMA effettuate durante il monitoraggio hanno mostrato una crescente capacità degradativa del processo biologico (da 1,10 mLCH<sub>4</sub>/gSSV/h a 3,36 mLCH<sub>4</sub>/gSSV/h), dovuta alla crescente percentuale di biomassa attiva nel fango campionato da digestore (dallo 0,56% al 2,18 %).

L'impianto ha mostrato alcuni problemi tecnici (malfunzionamento della pompa dell'alimento e consecutiva difficoltà nel mantenere il processo alla temperatura di 35°C) che non hanno permesso di valutarne il funzionamento in concomitanza con un carico alimentato prossimo a quello di progetto; in ogni caso si riscontrato un buon funzionamento del processo biologico di digestione anaerobica.

Le rese in termini di produzione di biogas e percentuale di metano saranno verificabili solo dopo una stabilizzazione dei parametri di funzionamento, che permettano di verificare il processo in continuo. L'unica analisi del biogas effettuata con un analizzatore del gas portatile ha riscontrato un contenuto di CO<sub>2</sub> pari al 60% e di metano pari al 39%.

## Bibliografia

- Adams M. W.** “The metabolism of hydrogen by extremely thermophilic, sulfur-dependent bacteria.” *FEMS Microbiology Reviews*, 6(2-3) (1990), 219-237.
- Angelidaki I., Chen X., Cui J., Kaparaju P. and Ellegaard, L.** “Thermophilic anaerobic digestion of source-sorted organic fraction of household municipal solid waste: start-up procedure for continuously stirred tank reactor.” *Water research*, 40(14) (2006), 2621-2628.
- Angelidaki, I., and Sanders, W.** “Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants” *Re/Views in Environmental Science & Bio/Technology*, 3(2) (2004), 117-129.
- Angelidaki, I., and Ahring B. K.** “Thermophilic anaerobic digestion of livestock waste: the effect of ammonia.” *Applied Microbiology and biotechnology* 38.4 (1993): 560-564.
- Angenent L. T., Karim K., Al-Dahhan M. H., Wrenn B. A. and Domínguez-Espinosa R.** “Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater.” *TRENDS in Biotechnology*, 22(9) (2004), 477-485.
- Basei D.** “Valorizzazione del siero di latte: produzione di idrogeno e metano” Tesi di Laurea, 2013
- Bauer C. G. and Forest T. W.** “Effect of hydrogen addition on the performance of methane-fueled vehicles. Part I: effect on SI engine performance.” *International Journal of Hydrogen Energy* 26.1 (2001): 55-70.
- Bičáková O. and Straka P.** “Production of hydrogen from renewable resources and its effectiveness.” *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(16) (2012), 11563-11578.
- Bonomo L.** “Trattamento delle acque di rifiuto” McGraw Hill (2012)
- Brockman M., Seyfried C.F.** “Sludge activity and cross-flow microfiltration-a non-beneficial relationship.” *Wat. Sci. Technol.* 34 (9) (1996), 205
- Cappa F.** Consultazione privata con argomento le prove di BHP effettuate per la scelta dell'inoculo del reattore di dark fermentation (2015)
- Chang S.** “Anaerobic Membrane Bioreactors (AnMBR) for Wastewater Treatment.” *Advances in Chemical Engineering and Science*, 2014 (2013).
- Chong M. L., Sabaratnam V., Shirai Y. and Hassan M. A.** “Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation.” *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(8) (2009), 3277-3287.
- Choo K.H., Kang I.J., Yoon S.H., Park H., Kim J.H., Adly S. and Lee C.H.** “Approaches to membrane fouling control in anaerobic membrane bioreactors.” *Water Sci. Technol.*, 41(10-11) (2000), 363.
- Collet C., Adler N., Schwitzguébel J. P. and Péringer P.** “Hydrogen production by *Clostridium thermolacticum* during continuous fermentation of lactose.” *International Journal of Hydrogen Energy*, 29(14) (2004), 1479-1485.



**Das D. and Veziroğlu T. N.** “Hydrogen production by biological processes: a survey of literature.” *International Journal of Hydrogen Energy*, 26(1) (2001), 13-28.

**Davila-Vazquez G., Alatrliste-Mondragón F., De León-Rodríguez A. and Razo-Flores E.** “Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: influence of initial substrate concentration and pH.” *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(19) (2008), 4989-4997.

**Davila-Vazquez G., Cota-Navarro C. B., Rosales-Colunga L. M., De León-Rodríguez A. and Razo-Flores E.** “Continuous biohydrogen production using cheese whey: improving the hydrogen production rate.” *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(10) (2009), 4296-4304.

**Demirel B., Yenigun, O. and Onay, T. T..** “Anaerobic treatment of dairy wastewaters: a review.” *Process Biochemistry*, 40(8) (2005): 2583-2595.

**Deublein D. and Steinhauser A.** “Biogas from waste and renewable resources” Second revised and expanded edition Wiley-VCH (2012)

**Doyle J.D., Parsons S.A.** “Struvite formation, control and recovery.” *Wat. Res.*, 36 (16) (2002), 3925–3940.

**Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith P.** “Colorimetric method for determination of sugars and related substances” *Anal. Chem.* 28 (1956) 350–356.

**Ercoli L., Bonari E. and Barresi F.** “Acque reflue dei caseifici”

**Ergüder T. H., Tezel U., Güven E. and Demirer, G. N.** “Anaerobic biotransformation and methane generation potential of cheese whey in batch and UASB reactors.” *Waste management*, 21(7) (2001): 643-650.

**Fang H. H. and Liu H.** “Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture.” *Bioresource technology*, 82(1) (2002), 87-93.

**Fang H. H., Li C. and Zhang T.** “Acidophilic biohydrogen production from rice slurry.” *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(6) (2006), 683-692.

**Ferchichi M., Crabbe E., Gil G. H., Hintz W. and Almadidy A.** “Influence of initial pH on hydrogen production from cheese whey.” *Journal of Biotechnology*, 120(4) (2005), 402-409.

**Flemming H.C., Wingender J.** “Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs).” Part I. Structural and ecological aspects, *Water Sci. Technol.* 43 (2001) 1–8.

**Frolund B., Palmgren R., Keiding K., Nielsen P.H.** “Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin” *Water Res.* 30 (1996) 1749–1758.

**Gallo Stampino P.** Corso di chimica per l’energia e l’ambiente. (2012).

**Gannoun H., Khelifi E., Boullagui H., Touhami Y. and Hamdi M.** “Ecological clarification of cheese whey prior to anaerobic digestion in upflow anaerobic filter.” *Bioresource technology* 99.14 (2008): 6105-6111

- Gavala H. N., Kopsinis H., Skiadas I. V., Stamatelatou K. and Lyberatos G.** "Treatment of dairy wastewater using an upflow anaerobic sludge blanket reactor". *Journal of agricultural engineering research*, 73(1) (1999): 59-63.
- Ghosh S. and Pohland F. G.** "Kinetics of assimilation of multiple substrates in dispersed growth systems." *Water Research* 6.1 (1972): 99-115.
- González Siso M. I.** "The biotechnological utilization of cheese whey: a review." *Bioresource Technology* 57.1 (1996): 1-11.
- Grethlein H. E.** "Anaerobic Digestion and Membrane Separation of Domestic Wastewater" *Journal Water Pollution Control Federation* 50(3) (1978): 754-763
- Group for Mathematical Modelling of Anaerobic Digestion Processes** "Anaerobic digestion model no. 1 (ADM1)" 2002 IWA Publishing, London.
- Guo X. M., Trably E., Latrille E., Carrère H. and Steyer J. P.** "Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: a review." *International journal of hydrogen energy*, 35(19) (2010), 10660-10673.
- Hallenbeck P. C. and Benemann J. R.** "Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes." *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11) (2002), 1185-1193.
- Hawkes F. R., Dinsdale R., Hawkes, D. L. and Hussy, I.** "Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimisation." *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11) (2002), 1339-1347.
- Hawkes F. R., Hussy I., Kyazze G., Dinsdale R. and Hawkes D. L.** "Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: principles and progress." *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(2) (2007), 172-184
- Hawkes F. R., Hussy I., Kyazze G., Dinsdale R. and Hawkes D. L.** "Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: principles and progress." *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(2) (2007), 172-184.
- Henze M.** "Wastewater treatment: biological and chemical processes". *Springer Science & Business Media*, 2002.
- Ince O.** "Performance of a two-phase anaerobic digestion system when treating dairy wastewater." *Water research* 32.9 (1998): 2707-2713.
- Ince O., Anderson G. K. and Kasapgil B.** "Control of organic loading rate using the specific methanogenic activity test during start-up of an anaerobic digestion system." *Water Research* 29.1 (1995): 349-355.
- Insabato G. Malpei F and Scaglione D.** "Aspetti tecnici e normativi dell'utilizzo di sottoprodotti in impianti di biogas" (2014)
- Iyer P., Bruns M. A., Zhang H., Van Ginkel S. and Logan B. E.** "H<sub>2</sub>-producing bacterial communities from a heat-treated soil inoculum." *Applied microbiology and biotechnology*, 66(2) (2004), 166-173.
- Kang I.J., Yoon S.H., Lee C.H.** "Comparison of the filtration characteristics of organic and inorganic membranes in a membrane coupled anaerobic bioreactor" *Wat. Res.*, 36 (7) (2002), 1803-1813.

- Karim G. A., Wierzba I. and Al-Alousi Y.** "Methane-hydrogen mixtures as fuels." *International Journal of Hydrogen Energy* 21.7 (1996): 625-631.
- Kim J.S., Lee C.H., Chang I.S.** "Effect of pump shear on the performance of a crossflow membrane bioreactor." *Wat. Res.* 35 (2001), 2137–2144.
- Kyazze G., Dinsdale R., Guwy A. J., Hawkes F. R., Premier G. C. and Hawkes D. L.** "Performance characteristics of a two-stage dark fermentative system producing hydrogen and methane continuously." *Biotechnology and bioengineering*, 97(4) (2007), 759-770.
- Kyazze G., Martinez-Perez N., Dinsdale R., Premier G. C., Hawkes F. R., Guwy A. J. and Hawkes D. L.** "Influence of substrate concentration on the stability and yield of continuous biohydrogen production." *Biotechnology and bioengineering*, 93(5) (2006), 971-979.
- Labatut, R. A., Angenent, L. T. and Scott, N. R.** "Biochemical methane potential and biodegradability of complex organic substrates" *Bioresource technology*, 102(3) (2011): 2255-2264.
- Le-Clech P., Chen V., Fane A.G.** "Fouling in membrane bioreactors used in wastewater treatment." *Journal of Membrane Science*, 284 (2006), 17-53.
- Lee M. J. and Zinder S. H.** "Hydrogen partial pressures in a thermophilic acetate-oxidizing methanogenic coculture." *Applied and Environmental Microbiology*, 54(6) (1988), 1457-1461.
- Levin D. B., Pitt L. and Love M.** "Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application." *International journal of hydrogen energy*, 29(2) (2004), 173-185.
- Lin C. Y. and Chang R. C.** "Hydrogen production during the anaerobic acidogenic conversion of glucose." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 74(6) (1999), 498-500.
- Lin H., Peng W., Zhang M., Chen J., Hong H. and Zhang Y.** "A review on anaerobic membrane bioreactors: applications, membrane fouling and future perspectives." *Desalination*, 314 (2013), 169-188.
- Logan B. E., Oh S. E., Kim I. S. and Van Ginkel S.** "Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers." *Environmental science & technology*, 36(11) (2002), 2530-2535.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.R., Randall R.J.** "Protein measurement with the folin phenol reagent" *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- Majizat A., Mitsunori Y., Mitsunori W., Michimasa N. and Jun'ichiro M.** "Hydrogen gas production from glucose and its microbial kinetics in anaerobic systems." *Water Science and technology*, 36(6) (1997), 279-286.
- Malaspina F., Cellamare C. M., Stante L. and Tilche A.** (1996). Anaerobic treatment of cheese whey with a downflow-upflow hybrid reactor. *Bioresource Technology*, 55(2), 131-139.
- Malaspina, F., Cellamare, C. M., Stante, L. and Tilche, A.** "Anaerobic treatment of cheese whey with a downflow-upflow hybrid reactor". *Bioresource Technology*, 55(2) (1996): 131-139.

**Malina, J. F. and Pohland F. G.** “Anaerobic sludge digestion.” *Design of anaerobic processes for the treatment of industrial and municipal wastes* 7 (1992): 214.

**Malpei F. and Gardoni D.** “Biogas da rifiuti solidi urbani - La digestione anaerobica: i principi del processo biologico e i criteri di dimensionamento [Book]. - [s.l.] : Dario Flaccovio Editore, 2007.

**Metcalf and Eddy** “Wastewater engineering - Treatment and reuse” (4 ed.) McGraw-Hill (2004), New York.

**Monroy O., Famá G., Meraz M., Montoya L. and Macarie, H.** “Anaerobic digestion for wastewater treatment in Mexico: state of the technology.” *Water Research*, 34(6) (2000): 1803-1816.

**Morgan J.W., Forster C.F., Evison L.** “A comparative study of the nature of biopolymers extracted from anaerobic and activated sludges” *Water Res.* 24 (1990) 743–750.

**Ng C.A., Sun D., Zhang J., Chua H.C., Bing W., Tay S., Fane A.** “Strategies to improve the sustainable operation of membrane bioreactors” *Proceedings of the International Desalination Association Conference*, Singapore, 2005.

**Obaja, D., Mace S, and Mata-Alvarez J.** “Biological nutrient removal by a sequencing batch reactor (SBR) using an internal organic carbon source in digested piggery wastewater.” *Bioresource technology* 96.1 (2005): 7-14.

**Rozzi A., Malpei F.** (1996). Recenti tendenze nella depurazione delle acque reflue: innovazioni tecnologiche di processo. Atti XLIV Corso di aggiornamento in Ingegneria Sanitaria Ambientale.

**Saddoud A., Hassairi I. and Sayadi S.** “Anaerobic membrane reactor with phase separation for the treatment of cheese whey.” *Bioresource Technology* 98.11 (2007): 2102-2108.

**Sinha P. and Pandey A.** “An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production.” *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(13) (2011), 7460-7478.

**Strydom J. P., Mostert J. F. and Britz, T. J.** “Anaerobic treatment of a synthetic dairy effluent using a hybrid digester.” *Water SA*, 21(2) (1995): 125-130.

**Stuckey D.C.** “Recent developments in anaerobic membrane reactors.” *Bioresource Technology*, 122(2013), 137–148

**Teli A. Corbellini V. Malpei F.** “MBR anaerobici: stato dell’arte, applicazioni impiantistiche ed esperienze sperimentali” (2014)

**Teli A., Ficara E. and Malpei F.** “Bio-Hydrogen Production from Cheese Whey by Dark Fermentation.” *chemical engineering* 37 (2014).

**Van Ginkel S. and Logan B. E.** “Inhibition of biohydrogen production by undissociated acetic and butyric acids.” *Environmental science & technology*, 39(23) (2005), 9351-9356.

**Van Niel E. W. J., Budde M. A. W., De Haas G. G., Van Der Wal F. J., Claassen P. A. M. and Stams A. J. M.** “Distinctive properties of high hydrogen producing extreme

thermophiles, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and *Thermotoga elfii*.” *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11) (2002), 1391-1398.

**Vidal G., Carvalho A., Mendez R. and Lema J. M.** “Influence of the content in fats and proteins on the anaerobic biodegradability of dairy wastewaters.” *Bioresource Technology*, 74(3) (2000), 231-239.

**W.T.M., Siegrist H., Vavilin V.A.** “Anaerobic Digestion Model No. 1 (ADM1)”, IWA Task

**Wang S., Rao N. C., Qiu R. and Moletta R.** “Performance and kinetic evaluation of anaerobic moving bed biofilm reactor for treating milk permeate from dairy industry.” *Bioresource technology*, 100(23) (2009), 5641-5647.

**Wang Z.W., Wu Z.C., Yin X.** “Membrane fouling in a submerged membrane bioreactor (MBR) under sub-critical flux operation: membrane foulant and gel layer characterization.” *J. Memb. Sci.*, 325 (1) (2008), 238–244.

**Yang J., Spanjers H., van Lier J.B.** “Pulse shear stress for anaerobic membrane bioreactor fouling control”. *Wat. Sci. Technol.* 64 (2), (2011) 355–360.

**Yilmazer G., and Yenigün O.** “Two-phase anaerobic treatment of cheese whey.” *Water Science and Technology* 40.1 (1999): 289-295.

**Venetsaneas N., Antonopoulou G., Stamatelatou K., Kornaros M., and Lyberatos, G.** “Using cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with alternative pH controlling approaches.” *Bioresource technology*, 100(15) (2009), 3713-3717.

## **Appendice 1**

### **Fase di precommissioning**

Prima di procedere con le prove ad acqua è necessario testare la tenuta di due principali serbatoi di processo (B-02 e B-03) con aria compressa.

Operazioni previste:

- a) Riempire di acqua la guardia idraulica X-01 e successivamente chiudere il rubinetto di alimentazione dell'acqua;
- b) Chiudere tutte le valvole attorno ai serbatoi ad eccezione delle valvole connesse alla guardia idraulica che devono rimanere aperte;
- c) Mettere in pressione i serbatoi con aria compressa prestando attenzione a non eccedere i 0,05 bar;
- d) Attendere un'ora che la pressione non cali poi, per maggiore garanzia, chiudere anche le valvole di connessione alla guardia idraulica e incrementare la pressione fino a un massimo di 0,5 bar;
- e) Riposizionare tutte le valvole dell'impianto in posizione aperta/chiusa come previsto da P&ID.

### **Prova di tenuta ad acqua serbatoio**

Prima di procedere con le prove delle singole sezioni è necessario testare la tenuta dei serbatoi non testati con aria compressa. In particolare devono essere testati i serbatoi B-01, B-06, B-07, B-101, B-201, B-202, B-301, B-302.

Operazioni previste:

- a) Chiudere tutte le valvole attorno ai serbatoi;
- b) Riempire con acqua di rete i serbatoi;
- c) Verificare che non ci siano perdite dai serbatoi;
- d) Riposizionare tutte le valvole dell'impianto in posizione aperta/chiusa come previsto da P&ID.

### **Vasca di accumulo**

Il test della vasca di accumulo comprende il test delle seguenti apparecchiature e delle relative connessioni:

- B-01*    *Vasca di accumulo*
- P-03*    *Pompa di carico dark fermentation*
- PK-800* *Plate Cool*

Durante il test è necessario verificare il corretto funzionamento dei seguenti strumenti:

*LIT-02 Level Indicator Transmitter*

Operazioni previste:

- a) Chiudere la valvola manuale di collegamento al reattore B-02 (valvola V-0004);
- b) Collegare l'alimentazione dell'acqua di rete al bocchello 24 (valvola V-0021);
- c) Aprire la valvola manuale del bocchello 24 (valvola V-0021);
- d) Aprire la valvola manuale V-0002 del bocchello 15, che sarà utilizzato per la verifica di LIT-02;
- e) Iniziare il riempimento della vasca. Quando l'acqua inizia a trabordare dal bocchello 15 interrompere l'alimentazione e controllare che lo strumento LIT-02 indichi la corretta quota del livello idrostatico;
- f) Chiudere la valvola manuale V-0002 del bocchello 15;
- g) Riempire d'acqua la vasca di accumulo fino al livello LAH1-02, visualizzato sullo strumento LIT-02;
- h) Chiudere la valvola manuale del bocchello 24 (valvola V-0021);
- i) Azionare il mixer MX-01 secondo le indicazioni fornite da SIMAR (manuale equipment);
- j) Azionare il sistema Plate Cool PK-800 secondo le indicazioni fornite da SIMAR (manuale equipment);
- k) Aprire la valvola prevista per il drenaggio in fognatura della linea 008 (valvola 010, linea 008);
- l) Chiudere la valvola V0011 e V0012 (linea 008 e 0012);
- m) Aprire la valvola di connessione B-01 P-03 (V-004);
- n) Azionare manualmente la pompa P-03 alla portata di progetto prevista;
- o) Verificare il corretto funzionamento delle apparecchiature azionate;
- p) Verificare il raggiungimento delle temperature previste per il package PK-800 tramite TIT-03;
- q) Verificare il raggiungimento delle temperature di progetto previste all'interno della vasca B-01 tramite TIT-01;
- r) Spegner la pompa P-03 e seguire le indicazioni fornite da SIMAR in relazione al mixer MX-01 e al sistema Plate Cool;
- s) Riaprire la valvola manuale del bocchello 24 (valvola V-0021) e riempire nuovamente la vasca di accumulo fino al livello LAH1-02;

- t) Chiudere la valvola manuale del bocchello 24 (valvola V-0021) e scollegare l'alimentazione dell'acqua di rete;
- u) Riaprire la valvola manuale di collegamento al reattore B-02 (valvola V-0004);
- v) Richiudere la valvola prevista per il drenaggio in fognatura della linea 008 (valvola V-0011);
- w) Controllare che tutte le valvole dell'impianto siano in posizione aperta/chiusa come previsto da P&ID.

### **Dark Fermentation**

Il test della Dark Fermentation comprende il test delle seguenti apparecchiature e delle relative connessioni:

- B-02 Dark Fermentation*
- P-04 Pompa di carico PK-200*
- PK-200 Separazione fango di supero DF*
- E-01 Scambiatore di calore DF*

Lo scambiatore di calore E-01, il cui funzionamento è idraulicamente connesso al funzionamento delle apparecchiature relative alla vasca di accumulo B-01, sarà testato durante la fase di test generale dell'impianto.

Durante il test è necessario verificare il corretto funzionamento dei seguenti strumenti:

- LIT-05 Level Indicator Transmitter*

Prima di iniziare il test deve essere verificata la corretta messa in funzione del package di Separazione fango di supero DF PK-200

Operazioni previste:

- a) Chiudere la valvola manuale di collegamento al package PK-200 (valvola V0011 e V0012, linea 008, P&ID BIOH2SE50-003);
- b) Chiudere la valvola manuale di collegamento alla pompa P-04 (valvola V0036, linea 012, P&ID BIOH2SE50-004);
- c) Verificare che tutte le valvole della linea gas siano aperte (V0022; V0023; V0025);
- d) Collegare l'alimentazione dell'acqua di rete al bocchello 8;
- e) Aprire la valvola manuale del bocchello 8 (valvola V-0029);
- f) Aprire la valvola manuale del bocchello 6 (valvola V-0030), che sarà utilizzato per la verifica di LIT-05;



- g) Aprire la valvola manuale bocchello 5 (valvola V-0028), in modo da effettuare le operazioni di commissioning con il serbatoio ventato (in alternativa aprire la presa campione gas PeID 008 V0025);
- h) Iniziare il riempimento della vasca. Quando l'acqua inizia a trabordare dal bocchello 6 (valvola V-0030) interrompere l'alimentazione e controllare che lo strumento LIT-05 indichi la corretta quota del livello idrostatico;
- i) Chiudere la valvola manuale del bocchello 6 (valvola V-0030);
- j) Riempire d'acqua la vasca di accumulo fino al livello di normale funzionamento previsto (NLL) visualizzato sullo strumento LIT-05;
- k) Chiudere la valvola manuale del bocchello 8 (valvola V-0029);
- l) Aprire il sistema di drenaggio in fognatura della linea 009 mediante le seguenti operazioni:
  - Chiudere la valvola V0011 P&ID BIOH2SE50-004;
  - Aprire la valvola V0012, linea 009, P&ID BIOH2SE50-004;
  - Aprire la valvola di drenaggio V0051. linea 009, P&ID BIOH2SE50-006;
- m) Aprire valvola V0004 (P&ID BIOH2SE50-004);
- n) Azionare manualmente la pompa P-04 alla portata di progetto prevista;
- o) Verificare il corretto funzionamento delle apparecchiature azionate;
- p) Spegnerla pompa P-04;
- q) Chiudere il sistema di drenaggio in fognatura della linea 013, chiudendo la valvola V-0042. Spegnerla pompa P-04 e seguire le indicazioni fornite da SEPRA in relazione al package PK-200 come descritto nel paragrafo **Error! Reference source not found.:**
  - Aprire la valvola V0011 P&ID BIOH2SE50-004;
  - Chiudere la valvola V0012, linea 009, P&ID BIOH2SE50-004;
  - Chiudere la valvola V0051. linea 009, P&ID BIOH2SE50-006;
- r) Riaprire la valvola manuale di collegamento al package PK-200 (valvola V-0011);
- s) Controllare che tutte le valvole dell'impianto siano in posizione aperta/chiusa come previsto da P&ID.

### **Digestione Anaerobica**

Il test della Digestione Anaerobica comprende il test delle seguenti apparecchiature e delle relative connessioni:

- B-03 Digestione anaerobica*
- P-05 Pompa di carico PK-300*
- PK-300 Separazione fango di supero DF*
- E-02 Scambiatore di calore*

Lo scambiatore di calore E-02, il cui funzionamento è idraulicamente connesso al funzionamento delle apparecchiature relative alla Digestione Anaerobica B-03, sarà testato durante la fase di test generale dell'impianto.

Durante il test è necessario verificare il corretto funzionamento dei seguenti strumenti:

- LIT-08 Level Indicator Trasmitter*

Prima di iniziare il test deve essere verificata la corretta messa in funzione del package di Separazione fango di supero DF PK-300.

Operazioni previste:

- a) Verificare che tutte le valvole della linea gas siano aperte (V0060; V0061; V0090);
- b) Chiudere la valvola manuale di collegamento al reattore B-02 (valvola V0049 e V-0050, linea 016 e 009);
- c) Collegare l'alimentazione dell'acqua di rete al bocchello 8;
- d) Aprire la valvola manuale del bocchello 8 (valvola V-0067);
- e) Aprire la valvola manuale del bocchello 6 (valvola V-0068), che sarà utilizzato per la verifica di LIT-08;
- f) Aprire la valvola manuale bocchello 5 (valvola V-0066), in modo da effettuare le operazioni di commissioning con il serbatoio ventato (in alternativa aprire la presa campione gas PeID 008 V0063);
- g) Chiudere la valvola V-0073 sulla linea 19 per isolare la pompa P-05;
- h) Iniziare il riempimento della vasca. Quando l'acqua inizia a trabordare dal bocchello 6 interrompere l'alimentazione e controllare che lo strumento LIT-08 indichi la corretta quota del livello idrostatico;
- i) Chiudere la valvola manuale del bocchello 8 (valvola V-0068);
- j) Riempire d'acqua la vasca di accumulo fino al livello di normale funzionamento previsto (NLL) visualizzato sullo strumento LIT-08;
- k) Aprire il sistema di drenaggio in fognatura della linea 020, aprendo la valvola V-0080;
- l) Chiudere la valvola manuale del bocchello 8 (valvola V-0067);

- m) Aprire la valvola V-0073 sulla linea 19 per connettere la pompa P-05;
- n) Aprire valvola V3025 (dreno su PeID 007);
- o) Chiudere le valvole V-0075 (linea fanghi) e V0082 ricircolo;
- p) Azionare manualmente la pompa P-05 alla portata di progetto prevista;
- q) Verificare il corretto funzionamento delle apparecchiature azionate;
- r) Spegnerne la pompa P-05;
- s) Chiudere il sistema di drenaggio in fognatura della linea 020, chiudendo la valvola V-0080;
- t) Controllare che tutte le valvole dell'impianto siano in posizione aperta/chiusa come previsto da P&ID.

### **Test intero impianti BioH2**

Dopo aver effettuato tutte le operazioni descritte nei precedenti paragrafi è necessario procedere con la prova ad acqua dell'intero impianto. Tale test prevede la verifica con acqua di rete di tutte le apparecchiature installate.

Operazioni previste:

- a) Riempire con acqua di rete i serbatoi B-04 e B-05;
- b) Verificare che tutte le valvole dell'impianto siano in posizione aperta/chiusa come da P&ID;
- c) Aprire le valvole dei vent (bocchello 5, valvole V-0028 V-0066) o in alternativa le prese campione sulla linea gas V-0025 e v-0063 PeID 008; dei serbatoi B-02 e B-03 in modo da effettuare il test ad acqua di rete sull'intero impianto con tutti i serbatoi ventati;
- d) Chiudere le valvole V-0088 e V-0090 PeID 008;
- e) Avviare tutte le apparecchiature in modalità automatica tramite controllo remoto;
- f) Verificare il corretto funzionamento del sistema;
- g) Aprire le valvole V-0088 e V-0090 PeID 008;
- h) Riempire la guardia idraulica X-01 regolando l'alimentazione di acqua;
- i) Chiudere le valvole dei vent bocchello 5, valvole V-0028 V-0066) o in alternativa le prese campione sulla linea gas V-0025 e v-0063 PeID 008; dei serbatoi B-02 e B-03 al fine di effettuare il test ad acqua di rete anche con i serbatoi non ventati;
- j) Verificare il corretto funzionamento del sistema;
- k) Riempire la guardia idraulica X-01 regolando l'alimentazione di acqua.

### **Start up dell'impianto**

Lo start up dell'impianto viene effettuato con acqua di rete per verificare il corretto funzionamento di tutti i sistemi e la strumentazione. Successivamente si passa all'alimentazione tramite fluidi di processo (siero).

Durante la fase di test con acqua di rete, si effettua anche un controllo di tenuta di pressione dei reattori tramite l'iniezione di gas inerte (Azoto compresso) proveniente dal PK-700 per la verifica delle tubazioni gas.

La fase di transizione, da acqua a siero, prevede per prima cosa l'attivazione e la messa a regime del reattore di digestione anaerobica (B-03) tramite inoculo di specifica biomassa.

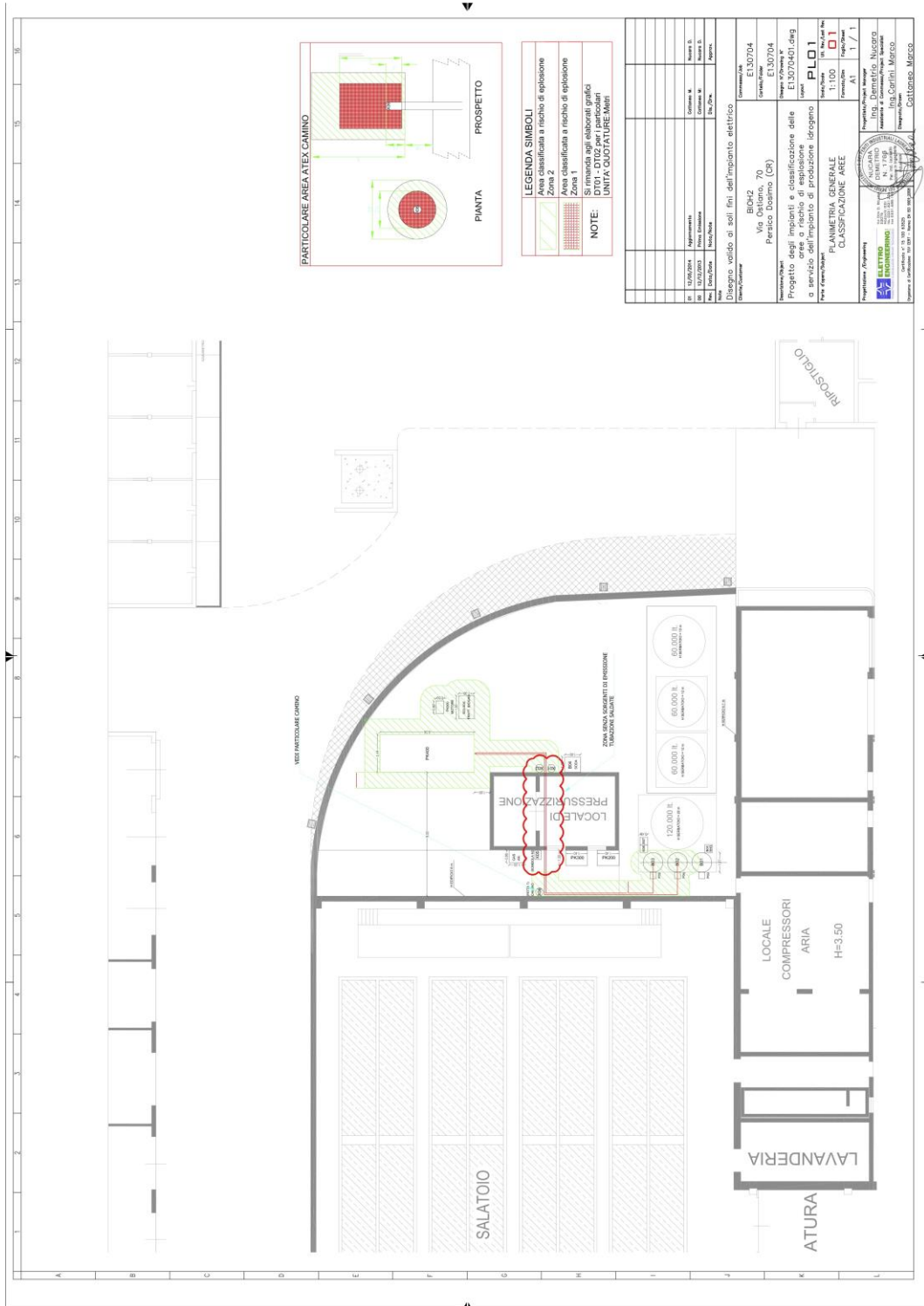
Successivamente si passa all'attivazione e la messa a regime del reattore di dark fermentation (B-02) tramite ulteriore inoculo di altra specifica biomassa.

A tal fine sono necessarie le seguenti operazioni:

- a) Riempire il serbatoio B-04 con soda al 30%;
- b) Riempire il serbatoio B-05 con ammoniaca commerciale al 25%;
- c) Verificare che tutte le valvole dell'impianto siano in posizione aperta/chiusa come da P&ID;
- d) Avviare l'alimentazione con siero del package PK-100 secondo le modalità descritte nella documentazione fornita da SEPR/INT.

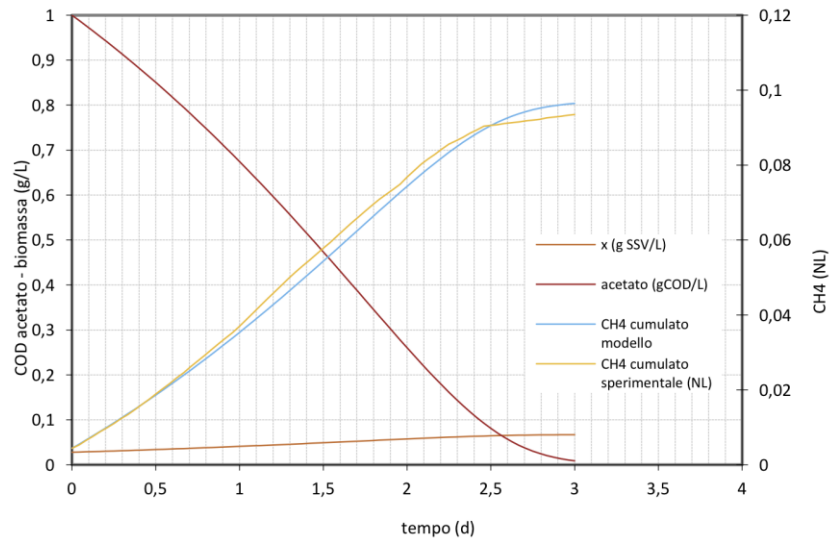
Il funzionamento del sistema in questione passa in modo graduale da alimentazione ad acqua di rete ad alimentazione a siero. Il tempo di transizione da funzionamento ad acqua a funzionamento completo a siero è pari a circa 1-2 settimane.

# Appendice 2

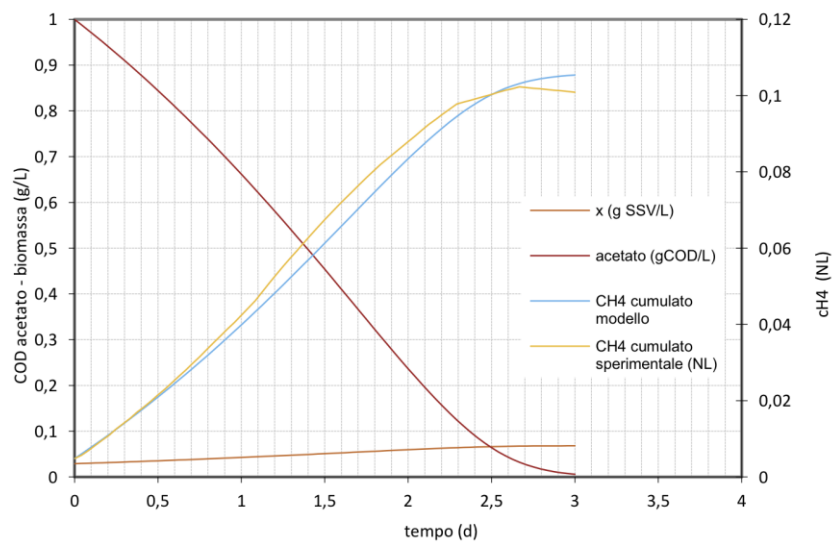


### Appendice 3

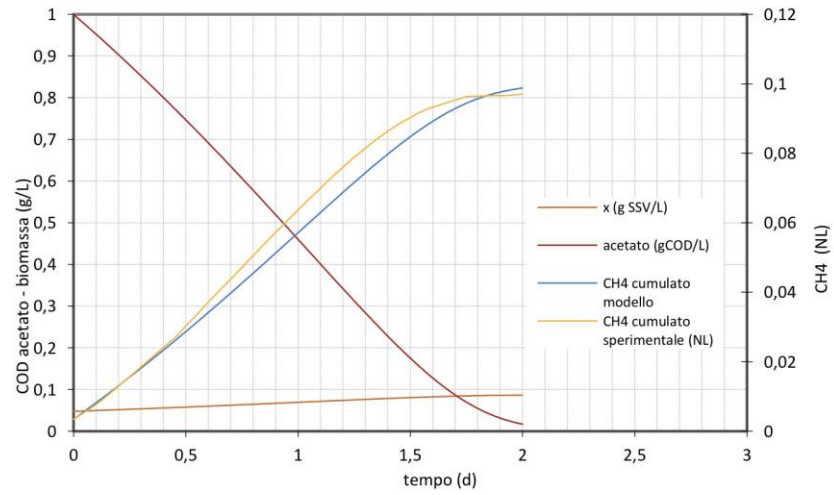
Test SMA A1 (Fango da impianto di trattamento reflui zootecnici)



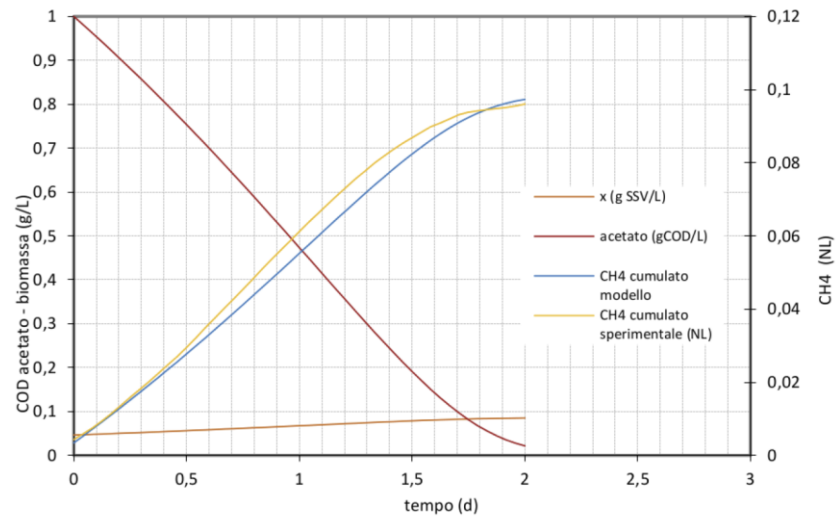
Test SMA A2 (Fango da impianto di trattamento reflui zootecnici)



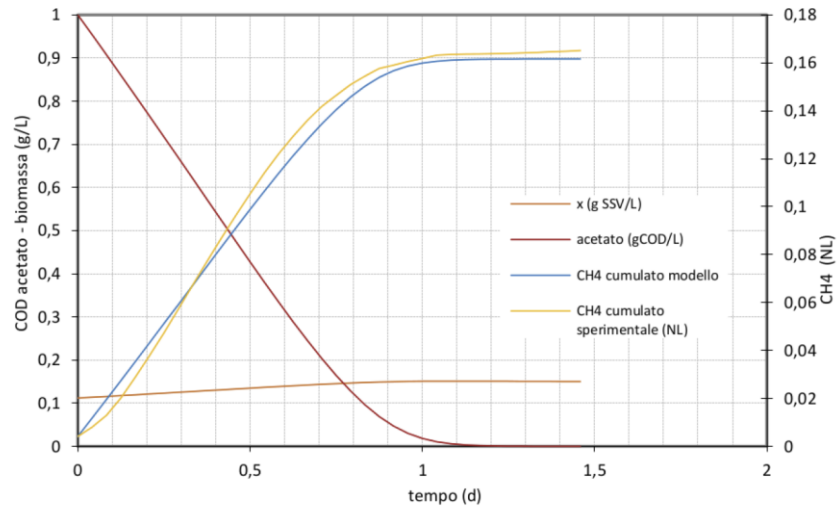
### Test SMA B1 (Fango da impianto di trattamento reflui zootecnici)



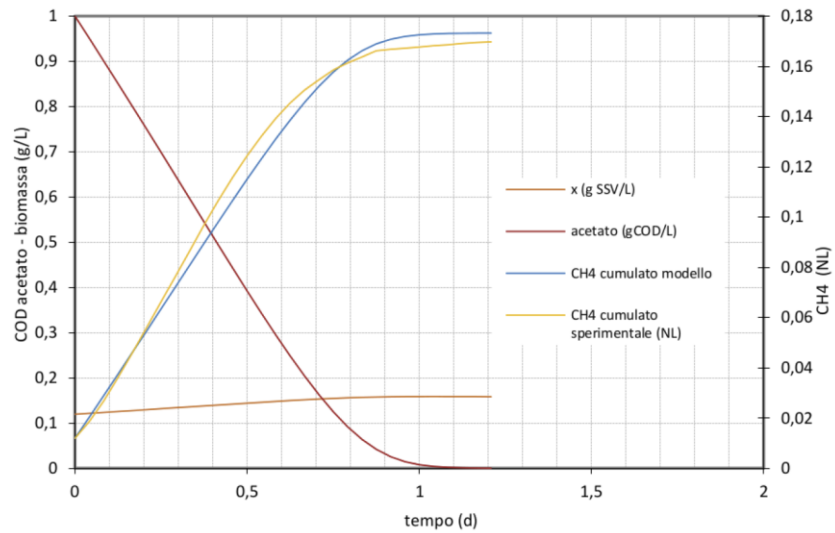
### Test SMA B2 (Fango da impianto di trattamento reflui zootecnici)



Test SMA 1 (Fango da impianto di trattamento reflui di cartiera)



Test SMA 2 (Fango da impianto di trattamento reflui di cartiera)





Test SMA 3(Fango da impianto di trattamento reflui di cartiera)

