

POLITECNICO DI MILANO

SCUOLA DI INGEGNERIA CIVILE, AMBIENTALE E TERRITORIALE

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



**EFFETTO DELL'HRT E DELLA
CONCENTRAZIONE IN ALIMENTO SULLA
PRODUZIONE DI IDROGENO PER DARK
FERMETATION IN REATTORE CONTINUO**

Relatore: Prof.ssa Francesca Malpei

Correlatore: Dott. Tugui Yuan

Tesi di Laurea Magistrale di:
Ruben LUONGO
Matricola 837062

Anno Accademico 2015/2016

Ringraziamenti

Desidero ricordare tutti coloro che mi hanno aiutato nella stesura del presente elaborato: a loro va la mia gratitudine, tuttavia compete a me la responsabilità per gli eventuali errori contenuti in questa tesi.

Ringrazio anzitutto la professoressa Francesca Malpei, Relatrice, ed il Dottor Tugui Yuan, Correlatore: senza il loro supporto e la loro guida sapiente questa tesi non esisterebbe.

Proseguo con il personale del laboratorio del DICA (Dipartimento di Ingegneria Civile e Ambientale) per la collaborazione dimostratami e la messa a disposizione delle apparecchiature.

Indice

Indice	1
Indice delle figure	3
Indice delle tabelle	7
CAPITOLO 1 INTRODUZIONE	9
CAPITOLO 2 L'IDROGENO	11
2.1 Introduzione	11
2.2 Caratteristiche chimico-fisiche dell'idrogeno	12
2.3 Alternative di produzione di idrogeno per via biologica	14
2.3.1 Biofotolisi	15
2.3.2 Fotofermentazione	18
2.3.3 Celle di elettrolisi microbica (<i>Microbial electrolysis cells</i>)	19
CAPITOLO 3 DARK FERMENTATION	21
3.1 Introduzione	21
3.2 Microbiologia e percorsi biochimici della dark fermentation	22
3.2.1 Percorsi biochimici	22
3.2.2 Microrganismi	25
3.2.3 Metodi di arricchimento dell'inoculo	27
3.3 Substrati per produrre idrogeno attraverso dark fermentation	31
3.3.1 Potenziali fonti per la dark fermentation	31
3.3.2 Siero di latte	34
3.4 Configurazione del bioreattore	37
3.5 Parametri di processo	42
3.5.1 Tempo di ritenzione idraulica (HRT)	42
3.5.2 pH e temperatura	43
3.5.3 Pressione parziale dell'idrogeno	47
3.5.4 Organic loading rate (OLR)	48
3.5.5 Nutrienti e oligoelementi	48
3.6 Prospetti futuri	51
3.6.1 Solid state dark fermentation (SSDF)	51
3.6.2 Utilizzo dei sottoprodotti	51

3.6.3 Produzione di <i>biohythane</i>	55
3.7 Conclusioni	56
CAPITOLO 4 MATERIALI E METODI	57
4.1 Impostazione e design	57
4.1.1 Pianificazione dell'attività sperimentale	57
4.1.2 Monitoraggio del fermentatore	60
4.2 Materiali	62
4.2.1 L'impianto	62
4.2.2 Siero di latte	67
4.2.3 Nutrienti	68
4.2.4 Soluzione con NaOH	68
4.3 Metodi	69
4.3.1 Procedura di avvio	69
4.3.2 Misura della portata di biogas	70
4.3.3 Analisi	71
4.3.4 Preparazione dell'alimento	74
CAPITOLO 5 RISULTATI	75
5.1 Monitoraggio della fase 1: 27/5/2016 - 11/7/2016	75
5.2 Monitoraggio della fase 2A: 11/7/2016 - 12/8/2016	81
5.3 Monitoraggio della fase 2B: 22/8/2016 - 26/10/2016	91
5.4 Monitoraggio della fase 3A: 2/11/2016 - 23/12/2016	102
5.4.1 Test sulla miscelazione: 28/11/2016, 29/11/2016, 30/11/2016	114
5.5 Monitoraggio della fase 3B: 11/1/2017 - 24/3/2017	118
5.6 Confronto tra le fasi	128
CAPITOLO 6 CONCLUSIONI	135
Bibliografia	139

Indice delle figure

<i>Figura 2.1 – Possibili vie di produzione biologica di idrogeno. (Ghimire et al., 2015)</i>	14
<i>Figura 2.2 – Rappresentazione schematico del processo di biofotolisi diretta. (Hallenbeck et al., 2002)</i>	15
<i>Figura 2.3 – Rappresentazione schematica del processo di biofotolisi indiretta. (Hallenbeck et al., 2002)</i>	17
<i>Figura 2.4 – Rappresentazione schematica della fotofermentazione. (Hallenbeck et al., 2009)</i>	18
<i>Figura 2.5 – Diagramma schematico di due camere MEC separate da una membrana che permette lo scambio di protoni. (Liu et al., 2005)</i>	19
<i>Figura 3.1 – Schema del processo di digestione anaerobica. La dark fermentation si ferma allo stadio idrogenico, mentre la digestione anaerobica si compone di stadio idrogenico, seguito da stadio metanogenico. (Sacchi, 2014)</i>	21
<i>Figura 3.2 – Processo di omoacetogenesi. (Saady, 2013)</i>	28
<i>Figura 3.3 – Componenti del siero di latte (la zona a righe rappresenta il valore minimo, mentre la zona colorata di nero si riferisce al massimo valore percentuale). (Prazeres et al., 2012)</i>	35
<i>Figura 4.1 – Impianto pilota utilizzato per eseguire il processo di dark fermentation.</i>	62
<i>Figura 4.2 – Schermata principale del software Diaferm. Si possono distinguere a sinistra il pompaggio dell'aria e il sistema di sicurezza, al centro il reattore, e a destra le pompe peristaltiche (solo la 1 e la 4 sono state mantenute in funzione).</i>	63
<i>Figura 4.3 – Quadro elettrico.</i>	64
<i>Figura 4.4 – Reattore CSTR, fornito dalla casa produttrice svizzera Diachrom.</i>	65
<i>Figura 4.5 – Esempio di andamento della pressione, in blu, nel tempo (sulle ascisse si può visualizzare il tempo, mentre sulle ordinate i valori della pressione in mbar). La distanza tra un picco e il successivo fornisce un'indicazione sulla produzione del reattore: più i picchi sono vicini migliore è la produzione. La linea rossa descrive invece l'andamento della temperatura.</i>	70
<i>Figura 4.6 – Gascromatografo MICROGC 3000A, utilizzato per l'analisi della composizione del biogas, a destra si possono notare le bombole contenenti i gas carrier (una contenente argon, l'altra elio).</i>	72
<i>Figura 4.7 – Spettrofotometro di massa Lange Xion 500. Questo strumento permette di quantificare le analisi svolte attraverso l'utilizzo degli appositi kit.</i>	74
<i>Figura 5.1 - Confronto tra l'andamento della produzione di idrogeno e la composizione del biogas.</i>	76
<i>Figura 5.2 – Resa di produzione di idrogeno durante la fase 1.</i>	76

<i>Figura 5.3 – Andamento del COD all'interno del mixed liquor e della sua rimozione in percentuale.</i>	77
<i>Figura 5.4 – Andamento dei solidi sospesi totali (TSS) e volatili (VSS) nel tempo.</i>	78
<i>Figura 5.5 – Rimozione del COD all'interno del reattore, contestualmente alla produzione di VSS.</i>	79
<i>Figura 5.6 – Rimozione dell'azoto all'interno del reattore, contestualmente alla produzione di VSS.</i>	80
<i>Figura 5.7 – Andamento della crescita batterica Y, contestualmente all'andamento del rapporto tra azoto rimosso e VSS formati.</i>	80
<i>Figura 5.8 – Resa di produzione dell'idrogeno.</i>	82
<i>Figura 5.9 – Confronto tra l'andamento della produzione di idrogeno e la composizione del biogas.</i>	83
<i>Figura 5.10 – Confronto tra portata di idrogeno e concentrazione di VFA.</i>	84
<i>Figura 5.11 – Andamento del COD in (assunto costante e pari a 20 g/L), del COD out e della quota parte di COD out relativa ai VFA.</i>	84
<i>Figura 5.12 – Andamento del COD all'interno del mixed liquor e della sua rimozione in percentuale.</i>	85
<i>Figura 5.13 – Andamento dell'azoto totale, dell'azoto ammoniacale e dell'azoto organico all'interno del mixed liquor.</i>	86
<i>Figura 5.14 – Andamento dei solidi sospesi totali (TSS) e volatili (VSS) nel tempo.</i>	87
<i>Figura 5.15 – Rimozione del COD all'interno del reattore, contestualmente alla produzione di VSS.</i>	88
<i>Figura 5.16 – Rimozione dell'azoto all'interno del reattore, contestualmente alla produzione di VSS.</i>	88
<i>Figura 5.17 – Andamento della crescita batterica Y, contestualmente all'andamento del rapporto tra azoto rimosso e VSS formati.</i>	89
<i>Figura 5.18 – Composizione percentuale del COD.</i>	90
<i>Figura 5.19 – Resa di produzione dell'idrogeno.</i>	92
<i>Figura 5.20 – Confronto tra l'andamento della produzione di idrogeno e la composizione del biogas.</i>	93
<i>Figura 5.21 – Confronto tra portata di idrogeno [L_{H_2}/d] e concentrazione di VFA [mg_{AA}/L].</i>	94
<i>Figura 5.22 – Andamento del COD in (assunto costante e pari a 20 g/L), del COD out e della quota parte di COD out relativa ai VFA.</i>	95
<i>Figura 5.23 – Confronto tra l'andamento dei VFA [mg_{AA}/L] del mixed liquor e il consumo di NaOH [mL_{NaOH}/d].</i>	96

<i>Figura 5.24 – Andamento del COD all'interno del mixed liquor (in blu) e della sua rimozione in percentuale (in rosso).</i>	97
<i>Figura 5.25 – Andamento dell'azoto totale, dell'azoto ammoniacale e dell'azoto organico all'interno del mixed liquor.</i>	98
<i>Figura 5.26 – Andamento dei solidi sospesi totali (TSS) e volatili (VSS) nel tempo.</i>	99
<i>Figura 5.27 – Rimozione del COD all'interno del reattore, contestualmente alla produzione di VSS.</i>	100
<i>Figura 5.28 – Rimozione dell'azoto all'interno del reattore, contestualmente alla produzione di VSS.</i>	101
<i>Figura 5.29 – Andamento della crescita batterica Y, contestualmente all'andamento del rapporto tra azoto rimosso e VSS formati.</i>	101
<i>Figura 5.30 – Composizione percentuale del COD.</i>	101
<i>Figura 5.31 – Resa di produzione dell'idrogeno.</i>	104
<i>Figura 5.32 – Confronto tra l'andamento della produzione di idrogeno e la composizione del biogas.</i>	104
<i>Figura 5.33 – Confronto tra portata di idrogeno e concentrazione di VFA.</i>	106
<i>Figura 5.34 – Andamento del COD in, del COD out e della quota parte di COD out relativa ai VFA.</i>	106
<i>Figura 5.35 – Confronto tra l'andamento dei VFA nel mixed liquor e il consumo di NaOH.</i>	107
<i>Figura 5.36 – Andamento del COD all'interno del mixed liquor (in blu) e della sua rimozione in percentuale (in rosso).</i>	108
<i>Figura 5.37 – Andamento dell'azoto totale, dell'azoto ammoniacale e dell'azoto organico all'interno del mixed liquor.</i>	109
<i>Figura 5.38 – Andamento dei solidi sospesi totali (TSS) e volatili (VSS) nel tempo.</i>	110
<i>Figura 5.39 – Rimozione del COD, in percentuale, all'interno del reattore, contestualmente alla produzione di VSS.</i>	111
<i>Figura 5.40 – Rimozione dell'azoto, in percentuale, all'interno del reattore, contestualmente alla produzione di VSS.</i>	111
<i>Figura 5.41 – Andamento della crescita batterica Y, contestualmente all'andamento del rapporto tra azoto rimosso e VSS formati.</i>	112
<i>Figura 5.42 – Composizione percentuale del COD.</i>	112
<i>Figura 5.43 – Andamento della pressione registrato dal manometro Keller durante il giorno 26 dalle ore 13:00.</i>	114
<i>Figura 5.44 – Andamento della pressione registrato dal manometro Keller durante il test del giorno 27.</i>	116
<i>Figura 5.45 – Andamento della pressione registrato dal manometro Keller durante il giorno 27, successivamente al test sulla miscelazione.</i>	116

<i>Figura 5.46 - Andamento della pressione registrato dal manometro Keller durante il giorno 28, dalle ore 9:15 alle ore 14:00.</i>	117
<i>Figura 5.47 - Andamento della pressione registrato dal manometro Keller durante il giorno 1.</i>	118
<i>Figura 5.48 - Resa di produzione dell'idrogeno.</i>	120
<i>Figura 5.49 - Confronto tra l'andamento della produzione di idrogeno e la composizione del biogas.</i>	121
<i>Figura 5.50 - Andamento del COD all'interno del mixed liquor e della sua rimozione in percentuale.</i>	122
<i>Figura 5.51 - Andamento dell'azoto totale, dell'azoto ammoniacale e dell'azoto organico all'interno del mixed liquor.</i>	123
<i>Figura 5.52 - Andamento dei solidi sospesi totali (TSS) e volatili (VSS) nel tempo.</i>	124
<i>Figura 5.53 - Rimozione del COD all'interno del reattore, contestualmente alla produzione di VSS.</i>	125
<i>Figura 5.54 - Rimozione dell'azoto all'interno del reattore, contestualmente alla produzione di VSS.</i>	126
<i>Figura 5.55 - Andamento della crescita batterica Y, contestualmente all'andamento del rapporto tra azoto rimosso e VSS formati.</i>	126
<i>Figura 5.56 - Composizione percentuale del COD.</i>	127
<i>Figura 5.57 - Confronto tra le rese di idrogeno conseguite nel corso delle diverse fasi.</i>	128
<i>Figura 5.58 - Confronto tra i contenuti percentuali di H₂, CO₂ e CH₄, conseguiti nel corso delle diverse fasi.</i>	129
<i>Figura 5.59 - Andamento della rimozione del COD nel corso delle diverse fasi.</i>	130
<i>Figura 5.60 - Andamento della concentrazione di VFA durante le fasi 2A, 2B e 3A.</i>	131
<i>Figura 5.61 - Andamento di TSS e VSS nel corso delle diverse fasi.</i>	131
<i>Figura 5.62 - Composizione percentuale del COD.</i>	133

Indice delle tabelle

<i>Tabella 2.1 – Principali proprietà dell'idrogeno.</i>	12
<i>Tabella 2.2 – Confronto tra differenti combustibili in termini di energia, emissioni di carbonio e potere calorifico inferiore (LHV). (Saratale, Cheng, 2008)</i>	13
<i>Tabella 3.1 – Studi riguardanti la fermentazione del siero di latte per produrre idrogeno. (Prazeres et al., 2012)</i>	24
<i>Tabella 3.2 – Studi riguardanti la dark fermentation con colture pure. (Sinha, Pandey, 2011)</i>	25
<i>Tabella 3.3 – Valutazione dei metodi di pretrattamento volti all'arricchimento dell'inoculo, per migliorare la dark fermentation. (Ghimire et al., 2015)</i>	30
<i>Tabella 3.4 – BHP delle differenti fonti di substrato per la dark fermentation, sotto diverse condizioni operative. (Ghimire et al., 2015)</i>	32
<i>Tabella 3.5 – Esempi di studi conseguiti utilizzando differenti bioreattori per dark fermentation in continuo. I valori riportati nella tabella indicano come un reattore CSTR comporti una più elevata resa di produzione di H₂ da reflui caseari e un più elevato VHPR rispetto ad altri bioreattori. (Karadag et al., 2014)</i>	37
<i>Tabella 3.6 – Effetti della temperatura e del pH di processo sulla produzione di idrogeno attraverso fermentazione. (Ghimire et al., 2015)</i>	44
<i>Tabella 3.7 – Effetto della temperatura sulla produzione fermentativa di idrogeno. (Sinha, Pandey, 2011)</i>	47
<i>Tabella 3.8 – Esempi di condizioni operative e di prestazioni in sistemi integranti la dark fermentation con altri processi. (Ghimire et al., 2015)</i>	52
<i>Tabella 4.1 – Principali parametri durante il processo in continuo.</i>	58
<i>Tabella 4.2 – Fasi dell'attività sperimentale.</i>	58
<i>Tabella 4.3 – Parametri variabili tra le fasi.</i>	60
<i>Tabella 4.4 – Piano di lavoro settimanale.</i>	61
<i>Tabella 4.5 – Intervalli di concentrazione all'interno dei quali si sono collocati i risultati delle analisi concernenti il siero di latte.</i>	67
<i>Tabella 4.6 – Sostanze chimiche, e rispettive concentrazioni in g/L_{alimento}, che compongono la Soluzione 1.</i>	68
<i>Tabella 4.7 – Concentrazione di KH₂PO₄ necessaria per preparare 1 L di alimento.</i>	68
<i>Tabella 4.8 – Caratteristiche del gascromatografo.</i>	72
<i>Tabella 4.9 – Metodo, numero di misurazioni e range relativi alle analisi di ciascun parametro.</i>	73
<i>Tabella 5.1 – Condizioni operative della fase 1.</i>	75
<i>Tabella 5.2 - Concentrazioni medie di solidi sospesi durante la fase 1.</i>	79

<i>Tabella 5.3 – Condizioni operative della fase 2.</i>	81
<i>Tabella 5.4 – Valori minimo e massimo della produzione di idrogeno e della resa di produzione di idrogeno.</i>	83
<i>Tabella 5.5 – Condizioni operative della fase 2.</i>	91
<i>Tabella 5.6 – Valori minimo e massimo della produzione di idrogeno e della resa di produzione di idrogeno.</i>	94
<i>Tabella 5.7 – Condizioni operative della fase 3.</i>	102
<i>Tabella 5.8 – Valori minimo e massimo della portata giornaliera di idrogeno e della resa di produzione di idrogeno.</i>	105
<i>Tabella 5.9 – Concentrazioni di acido acetico, acido butirrico, acido propionico ed etanolo relative ai campioni di mixed liquor inviati a Cremona.</i>	113
<i>Tabella 5.10 – Condizioni operative della fase 3.</i>	118
<i>Tabella 5.11 – Valori minimo e massimo della produzione di idrogeno e della resa di produzione di idrogeno.</i>	122
<i>Tabella 5.12 – Parametri variabili tra le fasi.</i>	128
<i>Tabella 5.13 – Valori medi dei principali parametri monitorati nel corso delle fasi.</i>	133

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

L'attuale richiesta energetica globale è ancora dipendente dalle riserve di combustibili fossili, in via di esaurimento, e, connessi all'impiego di tali combustibili, vi sono poi gravi problemi di inquinamento atmosferico e di cambiamenti climatici.

Perciò, da diversi anni, sono allo studio diverse vie per generare energia attraverso fonti rinnovabili e con minore produzione di inquinanti, quali la digestione anaerobica della sostanza organica e dei rifiuti.

L'idrogeno è da molte fonti considerato il combustibile del futuro, grazie al suo elevato contenuto energetico ed al fatto che dalla sua combustione si genera solo acqua, risultando quindi una combustione "pulita", priva di emissioni di particolato, VOC (*Volatile Organic Compounds*) e incombusti. Oltre che come combustibile l'idrogeno ha molti altri usi, quali: la sintesi dell'ammoniaca e l'idrogenazione dell'olio da cucina, dell'olio di scisto, del petrolio e del carbone.

La sfida principale nell'uso di questo promettente vettore energetico risiede nel trovare modalità di produzione e stoccaggio sostenibili sia dal punto di vista ambientale che economico. In applicazioni commerciali, l'idrogeno è stato prodotto da gas naturale (48%) e da petrolio (30%), attraverso processi di reforming, ma anche attraverso altre tecnologie, quali la gassificazione del carbone (18%) e l'elettrolisi dell'acqua (4%). [27]

Questi processi presentano però richieste energetiche elevate e usano fonti di energia non rinnovabile, e sono quindi non adeguate dal punto di vista ambientale.

Per poter arrivare ad un uso sostenibile dell'idrogeno, esso deve quindi essere prodotto da fonti rinnovabili; tra queste, negli ultimi anni, hanno avuto notevole interesse i processi biologici, tra i quali la dark fermentation. Pur risultando ancora gli studi limitati alla scala pilota o semidimostrativa, tra i vantaggi dei processi biologici vi sono i bassi costi e la possibilità di utilizzare come materia prima i reflui.

L'oggetto della presente tesi, sviluppata all'interno del più ampio progetto ECO – SI (Energia e COmponenti di pregio da Siero di latte), finanziato da Regione Lombardia e dal Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca (Progetto ID 30116895 Bando Regione Lombardia/MIUR n.7128 del 29/07/2011), è lo studio della produzione di idrogeno attraverso la fermentazione batterica anaerobica del siero di latte e della sua ottimizzazione, all'interno di un reattore CSTR, su scala pilota.

La produzione è stata monitorata al variare di alcuni parametri di processo, quali il tempo di ritenzione idraulica (HRT) e la concentrazione di COD nell'alimento al reattore, con l'obiettivo di ottenere delle condizioni stabili e di determinare le migliori condizioni operative relativamente a questa tipologia di processo.

La tesi è stata organizzata nei seguenti capitoli:

- Capitolo 1: introduzione;
- Capitolo 2: idrogeno e sue caratteristiche;
- Capitolo 3: processo di dark fermentation e parametri da cui esso dipende;
- Capitolo 4: materiali e metodi utilizzati durante la sperimentazione;
- Capitolo 5: risultati conseguiti e discussione;
- Capitolo 6: conclusioni.

CAPITOLO 2

L'IDROGENO

2.1 Introduzione

L'idrogeno (dal greco ὕδωρ, *hýdor*, “acqua”; la radice γεν-, *ghen-*, significa “generare”, quindi “generatore d'acqua”), scoperto nel 1766 dal chimico britannico Henry Cavendish (il nome di idrogeno gli fu però attribuito nel 1783 dal chimico francese Laurent Lavoisier), è il primo elemento chimico della tavola periodica, è il più leggero, ha numero atomico 1 e simbolo H. In natura esistono 3 isotopi principali di idrogeno: prozio, deuterio e trizio. Il più comune, il prozio, consiste di un protone e di un elettrone (non vi sono neutroni), e costituisce oltre il 99,9 % dell'idrogeno presente.

L'idrogeno è l'elemento più abbondante dell'universo osservabile, anche se è quasi assente allo stato libero e molecolare. È presente nell'acqua (11,19%) e in tutti i composti organici e organismi viventi. Forma composti con la maggior parte degli elementi, spesso anche per sintesi diretta.

Essendo scarsamente presente allo stato libero e molecolare, l'idrogeno deve quindi essere prodotto per i suoi vari usi. Secondo il DOE (*United States Department of Energy*) americano, la produzione di idrogeno ammonta a 9 milioni di tonnellate all'anno, per il 95 % prodotti tramite il reforming di metano con vapor d'acqua.

L'idrogeno è in particolare usato nella produzione di ammoniaca, nell'idrogenazione degli oli vegetali, in aeronautica (in passato nei dirigibili), come combustibile alternativo e, di recente, come riserva di energia nelle pile a combustibile. Nell'industria chimica e petrolchimica si richiedono grandi quantità di H₂: i processi fondamentali che consumano H₂ in un impianto petrolchimico sono l'idrodealchilazione, l'idrodesolfurazione e l'idrocracking. [102] L'H₂ è utilizzato anche come agente idrogenante, particolarmente per aumentare il grado di saturazione dei grassi e degli oli insaturi (per ottenere prodotti come la margarina), e per la

produzione del metanolo. Viene utilizzato anche nella sintesi dell'acido cloridrico e per realizzare l'idrogenolisi.

2.2 Caratteristiche chimico-fisiche dell'idrogeno

A pressione atmosferica e a temperatura ambiente (298 K), l'idrogeno si trova sotto forma di un gas biatomico avente formula H_2 . Tale gas è incolore, inodore, insapore ed altamente infiammabile, con un punto di ebollizione di soli 20,27 K e un punto di fusione di 14,02 K (vedi Tabella 2.1).

Tabella 2.1 – Principali proprietà dell'idrogeno.

PROPRIETÀ DELL'IDROGENO	
Stato di aggregazione	gassoso
Punto di fusione	14,025 K (-258,89 °C); 1,013 bar
Punto di ebollizione	20,268 K (-252,78 °C); 1,013 bar
Punto critico	33,1 K (-239,9 °C); 12,98 bar
Densità del liquido al punto di ebollizione	70,973 kg/m ³
Densità del gas al punto di ebollizione	1,312 kg/m ³
Densità al punto critico	30,09 kg/m ³
Densità del liquido in condizioni standard	0,0838 kg/m ³
Volume molare	11,42 · 10 ⁻³ m ³ /mol
Massa molecolare	2,01588 g/mol
Potere calorifico superiore	141,8 kJ/g
Potere calorifico inferiore	120,1 kJ/g
Entalpia di vaporizzazione	0,44936 kJ/mol
Entalpia di fusione	0,05868 kJ/mol
Pressione del vapore	209 Pa a 23 K
Velocità del suono	1270 m/s a 298,15 K
Elettronegatività	2,2 (scala Pauling)
Capacità calorica specifica	14304 J/(kg·K)
Conducibilità elettrica	NA
Conducibilità termica	0,1815 W/(m·K)
Prima energia di ionizzazione	1312,06 kJ/mol

Tra tutti i combustibili e carburanti, l'idrogeno possiede la massima densità energetica (119MJ/kg): 1 kg di H₂ contiene la stessa energia di 2,1 kg di gas naturale e 2,8 kg di benzina. Dalla reazione di idrogeno con ossigeno risulta teoricamente solo acqua demineralizzata e quindi la sua combustione in motori e in turbine a gas produce emissioni inquinanti in quantità minime e trascurabili. Stante l'attuale sviluppo tecnologico, l'idrogeno può essere effettivamente utilizzato a fini energetici come combustibile nei motori a combustione interna. Le pile a combustibile, attualmente in via di sviluppo, sono poi un modo alternativo per ottenere energia sotto forma di elettricità dall'ossidazione dell'idrogeno con una maggiore efficienza. Secondo i sostenitori della cosiddetta economia all'idrogeno queste due tecnologie ad idrogeno, oltre a risolvere il problema energetico, sarebbero quindi anche in grado di offrire un'alternativa pulita agli attuali motori a combustione interna alimentati da fonti fossili (vedi Tabella 2.2). [102]

Tabella 2.2 – Confronto tra differenti combustibili in termini di energia, emissioni di carbonio e potere calorifico inferiore (LHV). (Saratale, Cheng, 2008)

Sr No.	Fuel type	Energy /unit mass, MJ/kg	Energy/Vol MJ/l	Carbon emission kg C/kg fuel	LHV MJ/kg
1	Hydrogen gas	120	2	0	120.1
2	Hydrogen liquid	120	8.5	0	120.1
3	Coal (anthracite)	15–19	—	0.5	33.3
4	Natural gas	33–50	9	0.46	38.1
5	Gasoline	42–45	38	0.84	42.5
6	Diesel	42.8	35	0.9	43.0
7	Petrol (naphtha)	40–43	31.5	0.86	44.9
8	Bio-diesel	37	33	0.5	—
9	Ethanol	21	23	0.5	27.0

Il problema vero, sollevato da più parti, è però a monte: l'idrogeno atomico e molecolare è assai scarso in natura, ovvero l'elemento in sé si trova combinato assieme ad altri elementi in vari composti sulla crosta terrestre; esso dunque non è una fonte primaria di energia come lo sono gas naturale, petrolio e carbone, in quanto deve essere prodotto artificialmente spendendo energia a partire da fonti energetiche primarie. Per essere sostenibile, l'idrogeno non può essere prodotto da metano o attraverso fonti non rinnovabili e, inoltre, il consumo energetico associato alla sua produzione deve essere molto basso e/o proveniente da fonti energetiche rinnovabili (sole, onde, vento, biogas, etc.). L'unico modo di usare in maniera efficiente l'idrogeno come fonte di energia sarebbe ottenerlo come bioidrogeno a spese di alghe e batteri. Attualmente l'idrogeno ottenuto da fonti solari, biologiche o elettriche ha un costo di produzione, in termini energetici, molto più elevato di quello della sua combustione per ottenere energia. Infine i costi per la realizzazione delle infrastrutture necessarie per

effettuare una completa conversione ad un'economia dell'idrogeno sarebbero sostanzialmente elevati. Altri problemi rilevanti riguardano lo stoccaggio ed il trasporto dell'idrogeno. Il trasporto può avvenire in bombole di gas compresso, liquefatto oppure attraverso reti dedicate come avviene attualmente per il metano. Si può avere stoccaggio sotto pressione in bombole da 200 bar fino a 700 bar (ancora in via di omologazione) in forma liquida richiede invece temperature di $-253\text{ }^{\circ}\text{C}$ in bombole perfettamente isolate. Un'altra forma di stoccaggio consiste nella reazione chimica reversibile con diverse sostanze formando idruri metallici, oppure allo stato liquido sotto forma di ammoniaca NH_3 alla temperatura di $-33,4\text{ }^{\circ}\text{C}$. [102]

2.3 Alternative di produzione di idrogeno per via biologica

Il bioidrogeno può essere prodotto sia attraverso l'azione di microrganismi autotrofi sia attraverso quella degli eterotrofi. Nelle trasformazioni autotrofe (biofotolisi diretta o indiretta), l'energia solare viene direttamente convertita in idrogeno, attraverso reazioni di fotosintesi mediate da microrganismi fotosintetici, quali le *microalgae*, i protisti e i batteri fotosintetici.

In caso di condizioni eterotrofe, i substrati organici sono trasformati in composti organici più semplici, con simultanea produzione di idrogeno molecolare. Ci sono due tipologie di conversione eterotrofa: foto-fermentazione, attuata dai batteri fotosintetici, e la dark fermentation, attuata da batteri anaerobici che convertono i carboidrati in bioidrogeno. Tra i processi biologici, la dark fermentation, trattata nel capitolo 3, presenta minori dispendi energetici e maggiore sostenibilità ambientale, e anche la possibilità di produrre H_2 attraverso materie prime differenti.

Nella Figura 2.1 sono indicate le principali vie biologiche per la produzione di idrogeno.

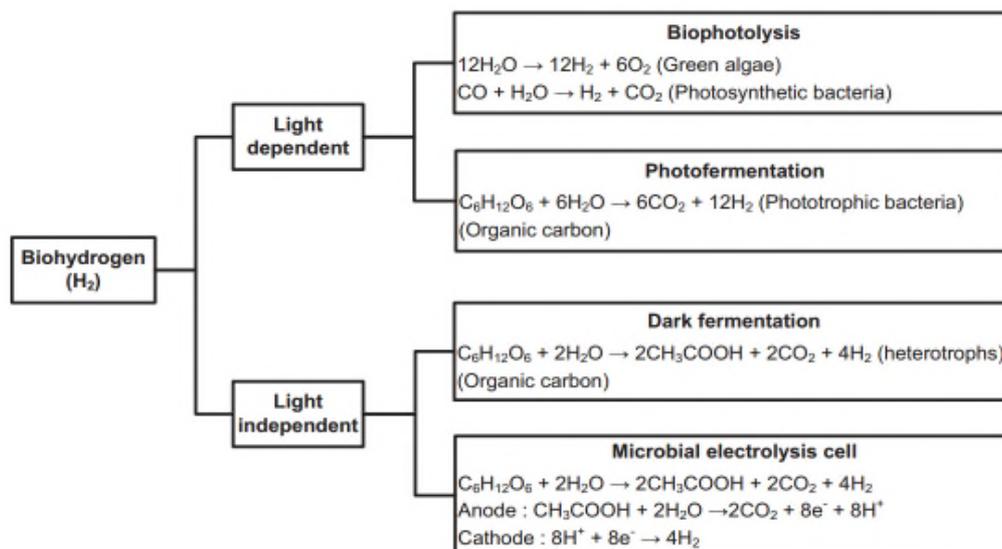


Figura 2.1 – Possibili vie di produzione biologica di idrogeno. (Ghimire et al., 2015)

2.3.1 Biofotolisi

Biofotolisi diretta

Nella biofotolisi diretta, l'apparato fotosintetico cattura la luce e l'energia recuperata viene utilizzata per associare alla scissione dell'acqua la generazione di un riducente a basso potenziale, che può essere utilizzato per ridurre un enzima idrogenasi (Figura 2.2).

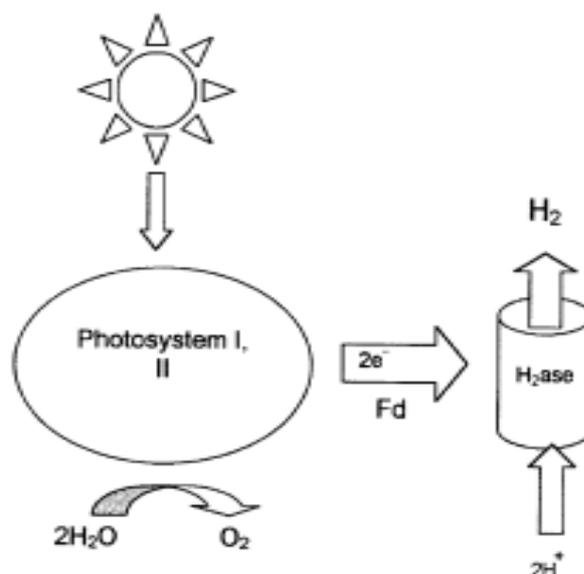


Figura 2.2 – Rappresentazione schematico del processo di biofotolisi diretta. (Hallenbeck et al., 2002)

Si tratta di un processo attraente, in quanto l'energia solare viene usata per convertire un substrato prontamente disponibile, l'acqua, in ossigeno e idrogeno: $2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{H}_2 + \text{O}_2$.

Alcune alghe verdi in natura possiedono l'enzima Fe-idrogenasi e potrebbero essere utilizzate in uno schema di biofotolisi diretta. È necessario lavorare sotto speciali condizioni, poiché l'attività della Fe-idrogenasi è estremamente sensibile all'ossigeno: per poter ottenere una produzione simultanea di H_2 e O_2 , la pressione parziale dell'ossigeno deve essere inferiore a 0,1 %. [31] Non sarebbe possibile, però, mantenere una così bassa pressione parziale in ciascun processo pratico di biofotolisi diretta, a causa della grande quantità di gas diluente e di input di potenza richiesti per il trasferimento del gas. Un processo di biofotolisi diretta deve, quindi, per forza funzionare ad una pressione parziale in prossimità di una atmosfera di O_2 , che è mille volte maggiore di quella massima teoricamente tollerabile. Quindi, la sensibilità all'ossigeno, da parte della reazione dell'idrogenasi, rimane il problema cruciale.

Alcuni approcci volti a superare questo problema hanno incluso l'uso di materiali assorbenti O_2 , sia irreversibili (glucosio/glucosio ossidasi, ditionito) sia reversibili (emoglobina). Comunque, l'uso di assorbenti irreversibili o la rigenerazione di quelli reversibili non sarebbe pratico in nessun processo su grande scala e, inoltre, sicuramente, essi comporterebbero una riduzione dell'efficienza netta di ciascun processo.

Un approccio che inizialmente sembra offrire una soluzione al problema consiste nell'uso di eterocisti *Cyanobacteria*. In questi organismi, composti da due differenti tipologie cellulari, l'attività di produzione di idrogeno (catalizzata dalla nitrogenasi) e ossigeno sono separate nello spazio. Comunque vi sono anche diversi fattori limitanti, sia pratici che teorici: limitazioni inerenti la nitrogenasi, sensibilità all'ossigeno, richieste per l'ATP, costi energetici per differenziare e mantenere gli eterocisti, etc.

Infine, la biofotolisi diretta richiede grandi fotobioreattori e un sistema di separazione di H_2 e O_2 . [31]

Biofotolisi indiretta

Nella biofotolisi indiretta, i problemi legati alla sensibilità del processo di produzione dell'idrogeno sono potenzialmente aggirati, attraverso la separazione temporale e/o spaziale della formazione dell'ossigeno da quella dell'idrogeno (Figura 2.3).

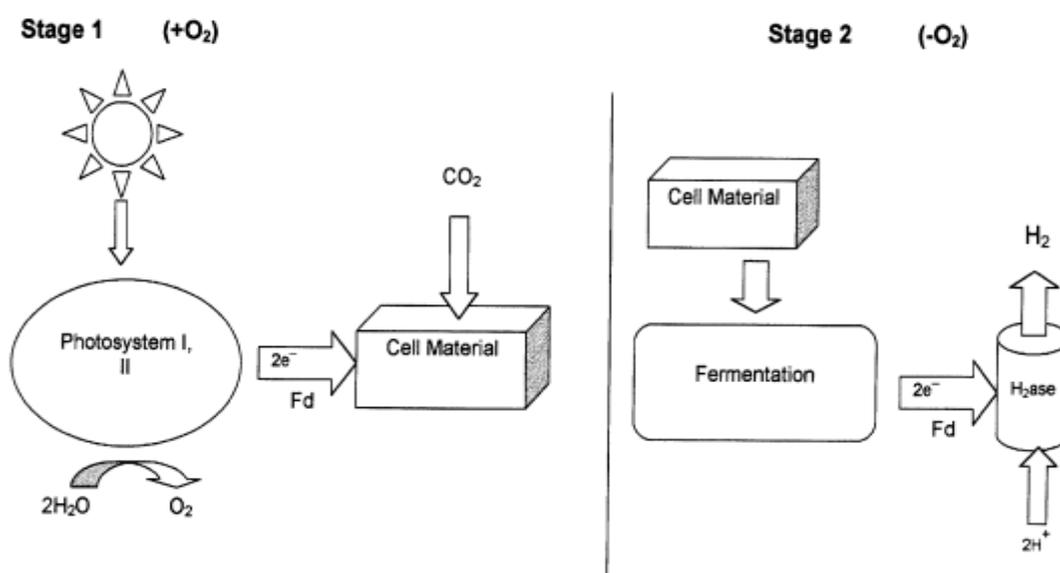


Figura 2.3 – Rappresentazione schematica del processo di biofotolisi indiretta. (Hallenbeck et al., 2002)

I processi di biofotolisi indiretta consistono quindi di due stadi separati in cui avviene la formazione dell'ossigeno e dell'idrogeno, accoppiata con quella della CO₂.

Il processo può essere descritto attraverso quattro passaggi:

1. produzione in vasche aperte di una biomassa ricca di carboidrati, a un'efficienza solare del 10%;
2. concentrazione della biomassa dalle vasche in una vasca di sedimentazione;
3. dark fermentation anaerobica, con una resa di 4 H₂ per mole di glucosio immagazzinato nelle cellule algali, più 2 acetati;
4. un fotobioreattore in cui le cellule algali convertirebbero i 2 acetati in 8 moli di H₂.

Dopo quest'ultima fase, la biomassa algale verrebbe reinserita nelle vasche, per ripetere il ciclo. Sistemi di supporto includerebbero la digestione anaerobica di ciascuna biomassa di rifiuto (10% per ogni ciclo), un sistema per produrre un inoculo fornitore di biomassa e un sistema di trattamento e separazione del gas (per ricircolare la CO₂). [31]

2.3.2 Fotofermentazione

In condizioni anaerobiche, i *Purple non sulfur bacteria* fotosintetici usano l'energia della luce catturata per produrre ATP ed elettroni ad alta energia, attraverso un flusso inverso di elettroni che riduce la ferredoxina (Figura 2.4). Dopodiché, l'ATP e la ferredoxina ridotta generano la riduzione dei protoni in idrogeno, tramite la nitrogenasi.

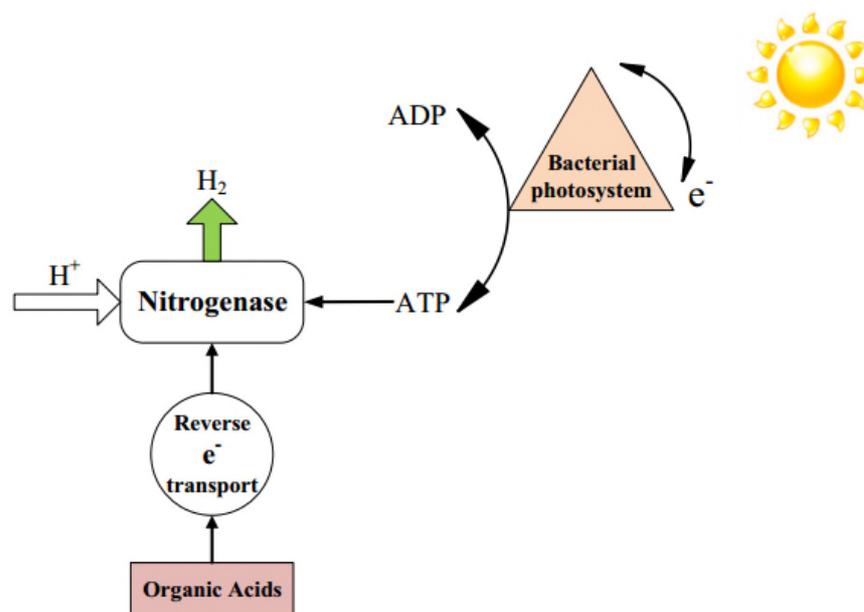
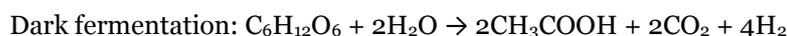


Figura 2.4 – Rappresentazione schematica della fotofermentazione. (Hallenbeck et al., 2009)

Il seguente è un esempio di conversione dell'acido acetico in bioidrogeno, tramite l'integrazione della dark fermentation con la fotofermentazione:



Purple non sulfur bacteria, quali *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter capsulatus* e *Rhodopseudomonas faecalis*, sono stati ampiamente utilizzati durante gli studi di fotofermentazione per produrre idrogeno, ma ci sono anche alcuni studi effettuati attraverso l'uso di colture miste isolate dal fango delle acque reflue. [27]

La ricerca rivolta a questi organismi si sta incrementando, per via del loro più elevato potenziale di resa di produzione di idrogeno e per la maggiore abilità nell'utilizzo della luce, in quanto essi possono assorbire e utilizzare sia la luce visibile (400-700 nm) sia le bande

vicine di infrarossi (700-900 nm). Inoltre, essi possono degradare un'ampia varietà di substrati.

Sebbene siano state conseguite delle buone rese di produzione di idrogeno, la fotofermentazione comporta diversi svantaggi: 1) l'uso dell'enzima nitrogenasi, con la sua inerente domanda energetica elevata; 2) la scarsa efficienza di conversione dell'energia solare; 3) la necessità di elaborati bioreattori anaerobici, coprenti aree vaste. [31]

In conclusione, i tassi e le efficienze di produzione di idrogeno attraverso sistemi di fotofermentazione, così come per altri sistemi che coinvolgono direttamente la fotosintesi per produrre H_2 , sono molto distanti dal raggiungere una plausibile fattibilità economica.

2.3.3 Celle di elettrolisi microbica (Microbial electrolysis cells)

La produzione di bioidrogeno è anche possibile attraverso un'emergente tecnologia chiamata elettroidrogenesi o elettrolisi biocatalizzata o elettrolisi microbica. Celle a combustibile microbiche elettrochimicamente assistite (MFC), celle a elettrolisi microbica (MEC) e sistemi bioelettrochimici (BES) usano i microrganismi per catalizzare le reazioni biochimiche all'anodo e/o al catodo, producendo protoni ed elettroni tramite l'ossidazione di materia organica.

Le MEC consistono in un reattore di elettrolisi che produce idrogeno, mentre una MFC è una cella a combustibile che produce elettricità. Nelle MEC, ossidando l'acetato sotto condizioni biologiche standard (25 °C, pressione di 1 bar e pH 7), l'idrogeno può essere prodotto al catodo, attraverso l'applicazione di un piccolo circuito di voltaggio (Figura 2.5).

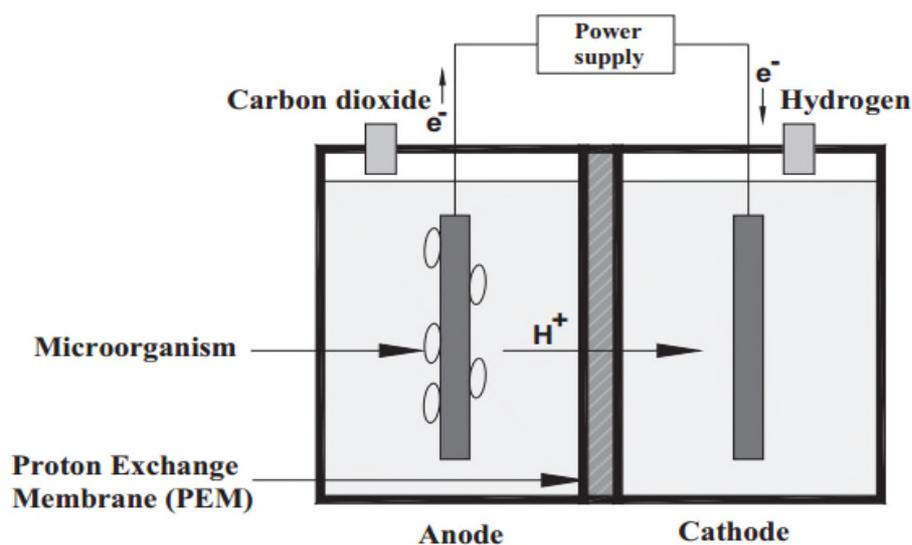
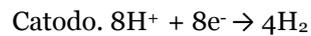
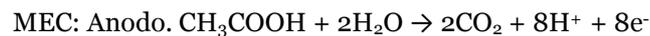
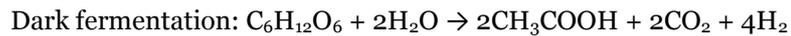


Figura 2.5 – Diagramma schematico di due camere MEC separate da una membrana che permette lo scambio di protoni. (Liu et al., 2005)

Alcuni microrganismi esoelettrogenici, che sono capaci di trasferire un elettrone a uno degli elettrodi (l'anodo), comprendono i generi *Geobacter*, *Shewanella* e *Pseudomonas*; mentre non sono note la funzione e la composizione della comunità batterica al catodo.

Le seguenti reazioni rappresentano la produzione dell'idrogeno in sistemi BES (dark fermentation+MEC):



Un minimo voltaggio teorico, richiesto per produrre idrogeno a pH 7, consiste di -410 mV. Questo voltaggio applicato è considerevolmente inferiore ai -1210 mV, il voltaggio teorico richiesto per produrre idrogeno attraverso l'elettrolisi dell'acqua, in condizioni di pH neutro. [27]

I sistemi MEC sono ancora sottoposti a ricerche e sviluppi. Una delle sfide riguardanti le MEC consiste nella soppressione dell'attività metanogenica durante l'elettroidrogenesi con colture miste, rafforzando la produzione di H₂.

CAPITOLO 3

DARK FERMENTATION

3.1 Introduzione

La dark fermentation (DF) consiste in un processo anaerobico che prevede la conversione di un substrato organico ricco di carboidrati in idrogeno, attraverso una serie di reazioni enzimatiche e senza che vi sia quindi necessità di luce solare per catalizzare il processo fermentativo. La dark fermentation consiste nell'attuazione del solo stadio idrogenico del processo di digestione anaerobica, come è mostrato nella Figura 3.1.

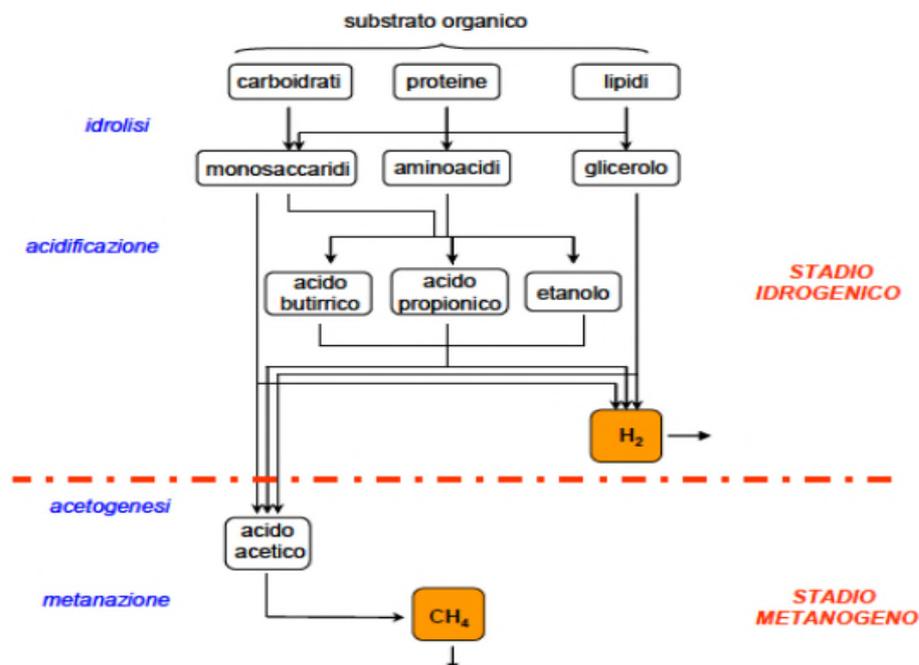


Figura 3.1 – Schema del processo di digestione anaerobica. La dark fermentation si ferma allo stadio idrogenico, mentre la digestione anaerobica si compone di stadio idrogenico, seguito da stadio metanogenico. (Sacchi, 2014)

3.2 Microbiologia e percorsi biochimici della dark fermentation

3.2.1 Percorsi biochimici

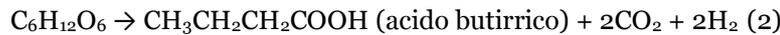
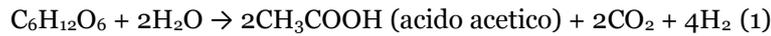
In condizioni anaerobiche *dark*, la produzione fermentativa di idrogeno avviene molto spesso, in quanto utilizzata da molte specie batteriche come meccanismo di autoregolazione della carica elettrica interna. Le reazioni di degradazione della sostanza organica che caratterizzano il metabolismo anaerobico comportano infatti sia il rilascio di energia, prontamente immagazzinata sotto forma di ATP (adenosina trifosfato), sia di protoni ed elettroni che devono essere smaltiti. Uno di questi meccanismi di smaltimento, ad opera di enzimi, è per l'appunto la riduzione dei protoni a idrogeno molecolare ($2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$).

Le specie batteriche che possiedono questa capacità includono sia batteri anaerobici obbligati (Clostridi, Metilotrofi, Ruminanti, Archeobatteri) che facoltativi (*Escherichia Coli*, Enterobatteri, Citrobatteri). Tra questi le tipologie di batteri più studiate sono i Clostridi e gli Enterobatteri, in ambiente mesofilo (30-39°C). I reattori di dark fermentation possono essere inoculati sia con colture pure dei microrganismi elencati, sia con colture miste; ciascuna opzione presenta vantaggi e svantaggi come riportato al paragrafo 3.2.2.

Chiaramente la scelta dell'inoculo batterico ha un'influenza importante sulla formazione di sottoprodotti e di conseguenza sulla resa e produzione di idrogeno. Dal punto di vista ingegneristico, per la conduzione di impianti su larga scala, risulta più praticabile il metodo delle colture miste; ciononostante l'utilizzo di colture pure in laboratorio è ampiamente studiato. All'interno del processo di dark fermentation, il primo step della fase di fermentazione consiste nella glicolisi, quasi sempre secondo il pathway EmbdenMeyerhof-Parnas (EMP). In questa fase una mole di glucosio viene decomposta formando 2 moli di piruvato e rilasciando energia, che viene immagazzinata rigenerando ATP. Gli elettroni rilasciati vengono intercettati da co-enzimi (electron carrier), che hanno il ruolo di captarli e renderli disponibili per altre reazioni ($2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$). Il piruvato è successivamente ossidato ad acetil coenzima A (acetil-CoA), diossido di carbonio (CO_2) e H_2 , attraverso l'azione del piruvato ferredoxina ossidoreduttasi e dell'idrogenasi. In base al tipo di microrganismo e alle condizioni ambientali, il piruvato potrebbe anche essere trasformato in acetil-CoA e formiato, i quali possono essere a loro volta convertiti, successivamente, in H_2 e CO_2 . [27]

La produzione di idrogeno a seguito della degradazione del glucosio da parte di un consorzio microbico misto non avviene dalla semplice reazione di ossidazione di glucosio in CO_2 e idrogeno, ma procede di pari passo con la formazione di alcuni coprodotti quali l'acido

acetico, l'acido butirrico, l'acido lattico. Quando il percorso metabolico è tale da favorire la produzione di acido acetico, la resa stechiometrica di H_2 è di 4 moli per ogni mole di glucosio (cioè $544 \text{ mL}_{H_2}/\text{g}_{\text{esoso}}$, a 25°C), che coincide con la resa massima teorica (equazione (1)). Mentre la resa di H_2 consiste in 2 moli per mole di glucosio ($272 \text{ mL}_{H_2}/\text{g}_{\text{esoso}}$, a 25°C) quando il prodotto finale è rappresentato dall'acido butirrico (equazione (2)). Una tra le specie di *Clostridia* ampiamente studiate, *Clostridium butyricum*, è responsabile della produzione di acido butirrico come maggiore prodotto della fermentazione, insieme con acetato e idrogeno.



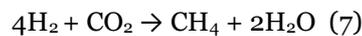
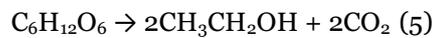
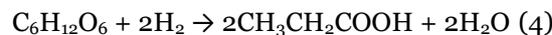
Sotto alcune condizioni, i percorsi metabolici conducono alla produzione di etanolo e acetato, abbassando la resa stechiometrica di H_2 a 2 moli di H_2 per mole di glucosio ($272 \text{ mL}_{H_2}/\text{g}_{\text{esoso}}$, a 25°C), come rappresentato nell'equazione (3).



Un'altra reazione fermentativa consiste nella produzione di propionato da parte di *Clostridium articum*, consumando idrogeno (equazione (4)).

Analogamente, *Clostridium barkeri* origina delle reazioni metaboliche che conducono alla formazione dei soli etanolo e acido lattico, senza produrre idrogeno, ma senza nemmeno consumarne (equazioni (5) e (6)).

Un consumo di idrogeno, invece, può essere riscontrato in caso di presenza di batteri metanigeni che, sotto le condizioni ottimali per il loro metabolismo, operano la metanogenesi idrogenotrofa (equazione (7)).



Alcuni omoacetogeni appartenenti al genere *Clostridium* (come il *Clostridium acetium*) possono peggiorare la resa di H_2 , riconvertendo H_2 e CO_2 in acetato o convertendo l'esoso direttamente in acetato (equazione (8)).



Hawkes et al. [34] hanno proposto il rapporto molare di acido butirrico rispetto all'acido acetico (rapporto B/A) come un indicatore quantitativo della resa di produzione di bioidrogeno associata ai percorsi metabolici batterici. Kim et al. [41] hanno scoperto che i rapporti B/A fossero direttamente proporzionali alle rese di H_2 (mol_{H_2}/mol_{esoso}), durante la dark fermentazione del saccarosio in reattori CSTR, operanti ad un OLR (*organic loading rate*) di 10-60 g_{COD}/L , a un pH di 5,5 e ad un tempo di ritenzione idraulica (HRT) di 12 h. Essi hanno anche affermato che un rapporto B/A superiore a 2,6 indichi un'efficiente produzione di H_2 da parte di batteri anaerobici. In processi di dark fermentation con colture miste, generalmente si osserva un rapporto B/A di 3/2, risultando in una resa di produzione di H_2 di 2,5 moli di H_2 per mole di esoso fermentato (come descritto nell'equazione (9), dove vengono prodotti contestualmente acido acetico e acido butirrico).



D'altra parte, Guo et al. [30] hanno mostrato nei loro studi, effettuati utilizzando substrati lignocellulosici, come questo rapporto possa non fornire una buona indicazione, specialmente durante i test in batch, dove l'attività degli omoacetogeni prevale.

La Tabella 3.1 riassume alcuni studi riguardanti la dark fermentation del siero di latte.

Tabella 3.1 – Studi riguardanti la fermentazione del siero di latte per produrre idrogeno.
(Prazeres et al., 2012)

Experimental conditions						Results						Residual concentration	Reference
Substrate	Reactor type	COD_0 ($kg\ m^{-3}$)	pH	T ($^{\circ}C$)	HRT (day)	Loading ($kg\ m^{-3}\ d^{-1}$)	Gas production ($m^3\ d^{-1}\ m^{-3}$)	% CH_4	CH_4 yield ($m^3\ kg^{-1}\ COD$)	COD removal (%)	COD		
SCW	AUFFLR	79	6.7	35	5	14	5.6	79	0.4	95	3.9	Wildenauer and Winter (1985)	
CW	ASDFA	70	–	–	–	16.1	–	–	–	99	0.7	Barford et al. (1986)	
Diluted CW	UASB	4.5–38.1	–	–	5	–	–	–	–	97	–	Yan et al. (1989)	
CW	AUFFLR	70	7.0	37	2	35	6.7	72	–	81	13.4	Patel et al. (1995)	
CW	DUHR	68.8	6.5–7.5	mesophilic	9	10	10	53	0.33 $nL\ g^{-1}\ COD$	98	1.4	Malaspina et al. (1996)	
CW	TSUAD	72.22	7.0	35	20	10 $L\ d^{-1}$	125.6 $L\ d^{-1}$	70.9	0.23 COD	36	33	Ghaly (1996)	
Diluted CW	Vertical ARBC	30	7	37	3	–	3.3	73	0.33 $m^3\ kg^{-1}\ TS\ d^{-1}$	78	6.6	Patel and Madamwar (1997)	
Diluted CW	Horizontal ARBC	30	7	37	3	–	3	73	0.30 $m^3\ kg^{-1}\ TS\ d^{-1}$	77	6.9	Patel and Madamwar (1997)	
Diluted CW	UASB	55.7–58.4	4–7	35	2.06–2.46	22.6–24.6	23.4 $LCH_4\ L^{-1}$	77	0.424	95–97	1.7–2.7	Ergüder et al. (2001)	
CW	CP	60.3–66.7	–	36	7	4.3–18.3	5.5–20 $L\ d^{-1}$	76	(0.28–0.59) $\times 10^{-3}$	83	4.7	Blonskaja and Vaalu (2006)	
CW	UASB	–	6.5–7.5	36	2.5	0.5–9.0	0.2–18.5 $L\ d^{-1}$	78	–	98	4.6	Blonskaja and Vaalu (2006)	
CW powder solution	ASBR	0.5–4.0	7.6–8.4	30	–	0.6–4.8	–	–	–	>90	0.1–0.6	Mockaitis et al. (2006)	
CW	TSMAMD	68.6	6.5	37	5	19.78	10	>70	0.3	98.5	1.03	Saddoud et al. (2007)	
Pre-treated CW ^a	UAF	5–20	7.2	35	2–5	4	1.3 $LCH_4\ L^{-1}\ d^{-1}$	–	0.28	98	–	Gannoun et al. (2008)	
Pre-treated CW ^a	UAF	15	7.2	35	2–5	3	3.2 $L\ d^{-1}$	–	0.28–0.38	95	0.75	Gannoun et al. (2008)	

^a Lactic fermentation of diluted CW and lime neutralization.

3.2.2. Microrganismi

La diversità microbica e le specie batteriche dominanti sono fattori chiave riguardo la performance di sistemi di produzione di H₂, in quanto sia i prodotti metabolici, sia il volume di H₂ prodotto sono dipendenti da esse.

Sebbene nella maggior parte dei bioreattori si sia usufruito di un inoculo esterno, alcuni ricercatori hanno utilizzato batteri indigeni dal refluo caseario: si è osservato che ogni refluo caseario contiene numerosi microrganismi che producono H₂ e sviluppa rapidamente una diversa comunità dentro a un bioreattore, con promettenti rese di produzione di H₂. L'uso di microrganismi indigeni non richiede l'aggiunta di energia esterna e permette una produzione di H₂ a basso costo, poiché esistono differenti strategie per l'attivazione dei microrganismi indigeni in sistemi in continuo. In caso di bioreattori CSTR, solitamente, dapprima si opera in batch, in condizioni anaerobiche, per 24 h e a una temperatura di 35 °C; l'inoculo fermenta naturalmente attraverso il contatto con l'atmosfera per 3 giorni. [83]

Comunque, normalmente, i reattori vengono inoculati con colture pure o con colture miste. Diversi studi che hanno utilizzato colture pure (utilizzando soprattutto varie specie di *Clostridia* ed *Enterobacter*) sono stati effettuati utilizzando diversi substrati (in particolare il glucosio), operando soprattutto in batch (vedi Tabella 3.2).

Tabella 3.2 – Studi riguardanti la dark fermentation con colture pure. (Sinha, Pandey, 2011)

Inoculum	Substrate	Reactor type	Maximum H ₂ yield
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Glucose	Batch	2 mol/mol of glucose
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC824	Glucose	Continuous	1.08 mol/mol of glucose
<i>Clostridium acetobutylicum</i> CGS 5	Xylose	Batch	0.73 mol/mol xylose
<i>Clostridium acetobutylicum</i> CGS 2	Starch	Batch	9.95 mmol/COD
<i>Clostridium pasteurianum</i> CH ₄	Sucrose	Batch	2.07 mol/mol hexose
<i>Clostridium thermolacticum</i>	Lactose	Continuous	3.0 mol/mol lactose
<i>Clostridium paraputrificum</i> M-21	Chitinous waste	Batch	2.2 mol/mol substrate
<i>Clostridium thermocellum</i> 27405	Cellulosic biomass	Batch	2.3 mol/mol glucose
<i>Enterobacter aerogens</i> HO-39	Glucose	Batch	1.0 mol/mol glucose
<i>Enterobacter aerogens</i> NBRC 13534	Glucose	Batch	0.05 mol/L medium
<i>Enterobacter aerogens</i> HU-101	Glycerol	Batch	0.6 mol/mol glucose
<i>Enterobacter aerogens</i>	Starch	Batch	1.09 mol/mol glycerol
<i>Enterobacter aerogens</i> E 82005	Molasses	Continuous	3.5 mol/mol sugar
<i>Enterobacter cloacae</i> IIT-BT-08	Glucose	Continuous	2.2 mol/mol glucose
<i>Enterobacter cloacae</i> IIT-BT-08	Sucrose	Batch	6 mol/mol sucrose
<i>Enterobacter cloacae</i> IIT-BT-08	Cellobiose	Batch	5.4 mol/mol cellobiose
<i>Escherichia coli</i>	Glucose	Continuous	2.0 mol/mol glucose
<i>Escherichia coli</i> MC 13-4	Glucose	Batch	1.2 mol/mol glucose
<i>Escherichia coli</i>	Glucose	Batch	2.0 mol/mol glucose
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	Glucose	Batch	2.4 mol/mol glucose
<i>Citrobacter amalonaticus</i> Y-19	Glucose	Batch	2.49 mol/mol glucose
<i>Citrobacter</i> CDN-1	Glucose	Batch	2.1 mol/mol glucose
<i>Enterobacter cloacae</i> DM11	Glucose	Batch	3.31 mol/mol glucose
<i>Ethanoligenens harbinense</i> B4	Glucose	Batch	2.26 mol/mol glucose
<i>Rhodospseudomonas palustris</i> P-4	CO	Batch	20.7 mmol/g cell h

A scala di laboratorio utilizzare una coltura pura permette di conoscere meglio la selettività verso i substrati e di avere una maggiore padronanza sul metabolismo del microrganismo, qualora si decidesse di alterarne le condizioni di crescita. Inoltre, si ha un maggiore controllo sulla formazione di sottoprodotti, migliorando di conseguenza le rese di idrogeno. Lo svantaggio principale risiede nella sensibilità del sistema alle contaminazioni, comportando elevati costi di asepsi. Una coltura mista di produttori di idrogeno viene generalmente preferita rispetto a una coltura pura, per via delle sua praticità in applicazioni di ingegneria ambientale, dei benefici economici durante la fase operativa (minori costi di asepsi), della facilità nel controllo basato su cinetiche differenziali dei sottogruppi microbici e dell'ampia scelta di materie prime.

I *Clostridia* sono stati identificati come i microrganismi produttori di idrogeno dominanti in un processo di dark fermentation in cui si lavora con colture miste mesofile e con un pH di 5,5; mentre i ceppi di *Thermoanaerobacterium* potrebbero facilmente adattarsi a temperature termofile e sopravvivere in un ambiente difficile creato da condizioni mutevoli. Tra i produttori di idrogeno si possono citare anche gli *Enterobacteria*. Queste specie hanno la capacità di produrre in maniera efficiente idrogeno, da differenti tipi di substrato. [37]

Comunque, Rafrati et al. [71] hanno recentemente riportato che le specie sottodominanti, a discapito della loro scarsa abbondanza, possano anche avere un impatto sostanziale sulle performance di produzione di H_2 . La presenza di alcune specie, quali gli *Escherichia coli*, potrebbero comportare un aumento delle rese di H_2 , deviando i percorsi metabolici produttori acetato e butirato verso reazioni di produzione di idrogeno (equazione (9)), mentre altre specie, quali *Bacillus* spp. e *Lactobacillus* spp., potrebbero ridurre la resa di H_2 , deviandone la produzione verso la reazione di accumulo di lattato (equazione (6)).

La problematica principale dell'utilizzo di colture miste è dunque la presenza di batteri che non producono o che consumano idrogeno. Castello et al. [15] hanno affermato che la bassa resa di produzione di H_2 potrebbe essere dovuta alla presenza di batteri che producono propionato, come *Megasphaera* e *Pectinatus*, e di altri batteri fermentativi, quali *Prevotella*, *Olsenella*, *Bulleidia*, *Mitsoukella* e *Selenomonas*, i quali non sono in grado di produrre H_2 ma competono per il substrato.

La produzione di idrogeno attraverso un processo di dark fermentation con colture miste consiste dunque in un complesso sistema batterico, influenzato da diversi parametri, quali il tipo di substrato, il pretrattamento del substrato, il tipo di inoculo, il metodo di arricchimento dell'inoculo, la struttura del bioreattore e il suo funzionamento.

3.2.3 Metodi di arricchimento dell'inoculo

Batteri consumatori di idrogeno

Tra i problemi legati alla produzione di idrogeno tramite dark fermentation, vi è sicuramente lo svilupparsi di reazioni che consumano H_2 , in particolar modo nel caso in cui si decida di utilizzare un consorzio microbico proveniente da un fango di digestione anaerobica, all'interno del quale sono presenti numerosi microrganismi idrogenotrofi, tra cui gli omoacetogeni, i metanigeni ed i batteri lattici.

Tra le principali difficoltà che si riscontrano nella conduzione del processo di dark fermentation vi è sicuramente l'inibizione della metanogenesi, ossia della fase finale del processo di digestione anaerobica, la cui attivazione risulta pressoché spontanea in ambienti in cui ci sia assenza di ossigeno. In sistemi in continuo, operare con bioreattori a basso HRT rappresenta il metodo più pratico ed efficace per eliminare i batteri metanigeni, poiché essi sono caratterizzati da una crescita lenta. È stato osservato che l'HRT ottimale per eliminare i metanigeni e massimizzare la produzione di H_2 è compreso tra 8 e 14 h. [37] Alcuni ricercatori, comunque, hanno riscontrato che i metanigeni potrebbero sopravvivere sulle pareti del bioreattore anche in caso di basso HRT e potrebbero ridurre la produzione di H_2 se all'interno del bioreattore le condizioni di pH e temperatura fossero favorevoli per i metanigeni. Mohan et al. [59] hanno indicato che i metanigeni potrebbero essere eliminati operando con un pH intorno a 6. Inoltre, i pretrattamenti possono essere efficaci nel contrastare la metanogenesi, in quanto, mentre i batteri produttori H_2 (come il *Clostridium*) possono sopravvivere in condizioni ambientali avverse attraverso la formazione di spore, i batteri metanigeni non possiedono questa capacità.

L'omoacetogenesi è un altro processo che concorre al consumo di idrogeno durante la produzione di quest'ultimo tramite dark fermentation. È necessario distinguere tra l'acetogenesi e l'omoacetogenesi: la prima corrisponde alla produzione di acetato da parte di microrganismi eterotrofi attraverso l'ossidazione di alcoli e di acidi organici quali propionico, butirrico, valerico; tramite la seconda, l'acetato è prodotto dal metabolismo autotrofo di alcuni microrganismi (omoacetogeni) tramite la riduzione della CO_2 utilizzando H_2 (come si può vedere in Figura 3.2). Solamente agendo opportunamente sui parametri di controllo del processo si può inibire l'omoacetogenesi. [97]

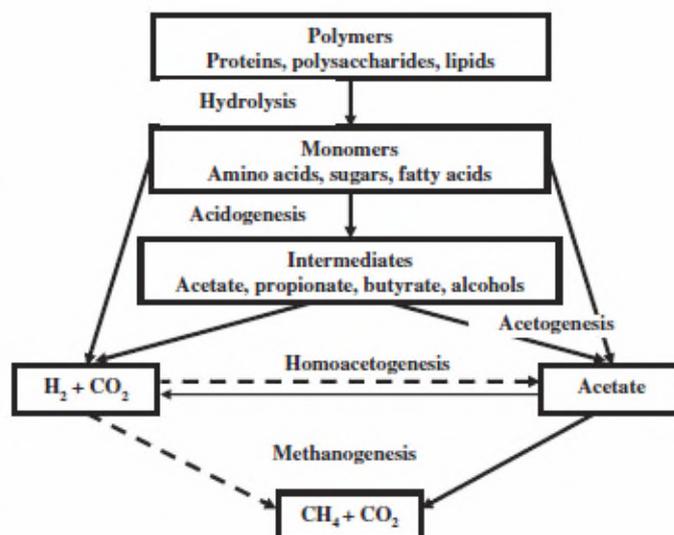


Figura 3.2 – Processo di omoacetogenesi. (Saady, 2013)

Riguardo, invece, all'effetto dei batteri produttori di acido lattico (*Lactobacillus*) sulla produzione di H_2 , sono stati realizzati dei report tra loro contrastanti. Yang et al. [103] hanno dichiarato che *Lactobacillus* potrebbe produrre H_2 da siero; ma, comunque, Castello et al. [15] hanno provato che la presenza di *Lactobacillus* non sia correlata con la produzione di H_2 . Analogamente, Karadag et al. [38] hanno riscontrato che *Lactobacillus* sia responsabile di minori rese di produzione di H_2 , sia in condizioni mesofile sia in condizioni termofile. La spiegazione a questo è che non è tanto la presenza di acido lattico ad inibire l'attività della biomassa idrogenogena, quanto piuttosto l'attività dei microrganismi produttori di acido lattico: ad inibire l'attività della biomassa produttrice di idrogeno sono alcuni battericidi secreti dai batteri lattici durante il proprio metabolismo. Per poter eliminare questi batteri, Azbar et al. [10] hanno raccomandato l'applicazione di un trattamento termico a $105\text{ }^\circ\text{C}$ per 5 minuti.

Infine, i batteri solfato-riduttori (SRB) possono consumare metaboliti quali idrogeno, CO_2 e VFA, in condizioni di elevate concentrazioni di solfato, producendo acido solforico. La loro azione può essere drasticamente inibita operando a valori di pH intorno a 6. [27]

Pretrattamenti

Un arricchimento delle colture miste diventa spesso necessario per migliorare la produzione di H_2 , da un lato, e per inibire i consumatori di idrogeno (come i metanigeni e gli omoacetogeni), spesso presenti in caso di questi inoculi misti, dall'altro lato.

Il pretrattamento dell'inoculo, volto ad ottenere un arricchimento di H_2 produttori, si basa sulla caratteristica dei produttori di idrogeno di formare spore. Questi organismi presentano

una maggiore chance di sopravvivenza durante le condizioni difficili, determinate dal pretrattamento dell'inoculo, rispetto ai batteri, come i metanigeni, che non sono in grado di formare spore.

Lee et al. [48] hanno proposto alcune possibili strategie volte a inibire in maniera efficiente l'azione dei metanigeni, come il trattamento termico dopo la disintegrazione dei granuli di fango anaerobico; trattamenti termici di asciugamento più lunghi, a 105 °C per 1,5-2 h; trattamento termico per 2 h seguito da un'incubazione acida, per 24 h a valori di pH di 2-3; ed ebollizione del fango per 5 h.

Il trattamento termico delle colture miste consiste in un semplice, economico ed efficiente metodo di arricchimento, tuttavia, il suo effetto potrebbe variare, in dipendenza dalla fonte di inoculo (come il fango attivo o il fango anaerobico). Infatti, alcuni studi hanno riportato un'inferiore resa di produzione di H₂ in caso di utilizzo di un inoculo sottoposto a uno shock termico, rispetto a quella ottenuta attraverso altri generi di pretrattamento. La ragione potrebbe essere l'inibizione che subirebbero alcuni batteri produttori di idrogeno che non sono in grado di formare spore.

Un trattamento acido o basico si basa sulla nozione che l'attività dei metanigeni diminuisca significativamente a pH inferiori a 6,3 o superiori a 7,8; mentre l'attività dei *Clostridia* e di altri batteri idrogeno produttori non è affetta dalle condizioni di pH acido (pH inferiore a 6). [37] Lee et al. [48] hanno confrontato l'effetto del pretrattamento tramite acidi forti, quali HCl, HNO₃, e H₂SO₄, sull'arricchimento di batteri produttori H₂. L'HNO₃ inibisce gravemente i batteri H₂ produttori, mentre la più elevata produzione di H₂ è stata conseguita a seguito d un pretrattamento con HCl: il volume di bioidrogeno prodotto a pH 2, utilizzando un pretrattamento con HCl, è risultato 3,2 volte maggiore rispetto a quello ottenuto senza pretrattamento acido. L'HCl causa una considerevole inattività delle cellule batteriche nel fango e le specie di *Clostridium* riescono a sopravvivere al pretrattamento, mentre la quantità di microrganismi che producono H₂ cresce significativamente quando la produzione di H₂ inizia.

Altri metodi di pretrattamento, come il pretrattamento chimico e l'aerazione, hanno come obiettivo l'inibizione selettiva dei metanigeni presenti nel fango anaerobico, i quali oltre ad essere strettamente anaerobi, sono sensibili a molti agenti chimici. Wang e Wan [98] hanno aerato l'inoculo di fango con aria, per 24 h, in modo da inibirne l'attività. Allo stesso modo, per inibire i metanigeni possono essere utilizzati alcuni inibitori chimici, quali l'acido 2-bromoetano sulfonico (BESA), il cloroformio, lo iodopropano e l'acetilene. Il BESA contrasta l'attività metanigena, inibendo l'attività del coenzima M-riduttasi, il quale rappresenta un coenzima fondamentale nella metanogenesi.

Inoltre sono stati condotti diversi studi in cui si è optato per la combinazione di differenti metodi di pretrattamento. Ad esempio, Mohan et al. [59] hanno provato alcuni pretrattamenti individualmente e in combinazione tra loro: pretrattamento acido a pH 5 con

uso di acido ortofosforico per 24 h, pretrattamento chimico in una soluzione con sodio 2-bromoetanosulfonato (0,2 g/L) per 24 h, e shock termico a 100 °C per 1 h. Individualmente, il pretrattamento chimico ha fornito un miglioramento della resa di produzione di H₂ di 18 volte superiore, mentre il pretrattamento acido ha mostrato il minore aumento della resa (miglioramento di 4 volte). Nel caso della combinazione degli esperimenti, l'integrazione di pretrattamento acido e chimico ha mostrato la più alta produzione di H₂ (miglioramento di 16,1 volte). Similmente, Srikanth et al. [84] hanno sperimentato una combinazione di shock termico (98 °C per 1 h), trattamento chimico (2% di acido 2-bromoetano sulfonico per 24 h), e trattamento acido (a pH 3 per 24 h). Il risultato è stata una più alta produzione di H₂ con una minore degradazione di substrato.

Comunque, la selezione di un metodo di pretrattamento dell'inoculo per sistemi su grande scala richiede la considerazione di svariati parametri, quali i costi operativi, la fattibilità o la complessità dei metodi, il tempo necessario per l'arricchimento, l'uso dei residui dalla dark fermentation in processi di post-trattamento, il tipo di inoculo. Ad esempio, la scelta di un metodo di trattamento chimico, come l'uso del BESA, può presentare dei problemi riguardo la possibilità di riutilizzare i residui dalla dark fermentation in una digestione anaerobica. Inoltre, l'utilizzo del BESA non è sostenibile dal punto di vista ambientale ed è costoso se usato su larga scala industriale. Allo stesso modo, lo shock termico richiede un grande input energetico, il che lo rende meno attraente per applicazioni su larga scala. Il pretrattamento acido e lo shock termico possono essere applicati su larga scala per selezionare inoculi produttori idrogeno, in caso non vi siano preoccupazioni concernenti l'energia netta. [27] La Tabella 3.3 mostra una semplice valutazione dei metodi di pretrattamento dell'inoculo comunemente applicati, basandosi su informazioni reperite dai ricercatori.

Tabella 3.3 – Valutazione dei metodi di pretrattamento volti all'arricchimento dell'inoculo, per migliorare la dark fermentation. (Ghimire et al., 2015)

Pretreatment method	Energy requirement	Chemical requirement	Economic cost	Scale-up application
Heat shock treatment	+++	+	+++	++
Acid treatment	+	+++	++	+++
Chemical treatment	+	+++	+++	++
Aeration	+++	+	++	+++
Load shock treatment	++	++	+	+++

+ Less intensive; ++ Moderately intensive; +++ Very intensive.

3.3 Substrati per produrre idrogeno attraverso dark fermentation

3.3.1 Potenziali fonti per la dark fermentation

Il substrato gioca un ruolo importante per quanto concerne la resa di produzione di H₂, il tasso di produzione di H₂ e l'economia dell'intero processo. Questi parametri dipendono soprattutto dal contenuto di carboidrati nel substrato, dalla biodisponibilità e dal tasso di biodegradazione.

I substrati ad alto tasso di carboidrati sono stati ampiamente utilizzati negli studi di dark fermentation, in particolare il glucosio puro, il saccarosio e le miscele di amidi. La produzione di bioidrogeno rinnovabile, però, necessita che il substrato o la materia prima derivi da risorse rinnovabili. Dunque, le fonti di biomassa di seconda generazione possono supportare la fornitura di substrati rinnovabili per la dark fermentation. In questo caso, oltre alla produzione di bioidrogeno e di acidi grassi volatili (VFA) come sottoprodotti, la dark fermentation offrirebbe un trattamento biologico dei rifiuti organici.

In studi più recenti sulla dark fermentation, sono stati considerati anche dei substrati complessi, quali la frazione organica dei rifiuti comunali (OFMSW), residui agricoli come le biomasse lignocellulosiche (scarti del riso, del grano e del granturco), rifiuti agro-industriali come quelli provenienti da industrie di processamento del cibo (tra cui i reflui provenienti da frantoi e il siero di latte), effluenti da allevamenti di bestiame e piante acquatiche.

Basandosi sulla loro disponibilità, nuove fonti low-cost di substrato necessitano di essere individuate e valutate per il loro BHP (*biohydrogen potential*). Nella Tabella 3.4 sono mostrati i BHP relativi alle diverse biomasse organiche nei processi di dark fermentation.

Tabella 3.4 – BHP delle differenti fonti di substrato per la dark fermentation, sotto diverse condizioni operative. (Ghimire et al., 2015)

Substrate type	Microbial inoculum source	Reactor type	Temperature (°C)	pH	Maximum H ₂ yield (mL H ₂ /g VS _{added})	Maximum H ₂ production rate	H ₂ in biogas (%)
Food waste	Heat shock treated anaerobic sludge	Leaching bed reactor	37	5.5-7	310	151.25 mL H ₂ /L/h	10-55
Food waste	Thermophilic acidogenic culture	Batch	55	4.5	46.3	3 mL H ₂ /g VSS/h	23
Vegetable kitchen waste	Kitchen waste compost	Intermittent-CSTR	55	6.0	38 ^a	1.0 L H ₂ /L/d	40
Food waste and sewage sludge	Anaerobic digester sludge	Batch	35	5.0-6.0	122.9 ^a	111.2 mL H ₂ /g VSS/h	-
OFMSW	Anaerobic digestate	Semi-continuous CSTR	55	6.4	360 ^b	-	58
OFMSW	Non-anaerobic inocula (soil, pig excreta)	Packed bed reactor	38	5.6	99 ^b	-	47
Wheat straw	Cow dung compost	Batch	36	6.5	68.1	10.14 mL H ₂ /g VS/h	52
Rice straw	Wastewater treatment plant sludge	Batch CSTR	55	6.5 (initial)	24.8 ^c	-	-
Corn stalk wastes with acidification pre-treatment	Enriched cow dung composts	Batch CSTR	50	7 (initial)	149.69	7.6 mL H ₂ /h	45-56
Rice slurry	Anaerobic digester sludge	Batch	37	4.5 (initial)	346 ^d	2.1 L/g VSS/d	45-56
Cheese whey	Adapted anaerobic sludge	Batch	55	7 (initial)	111 ^e	3.46 mL H ₂ /L/h	-
Pig slurry	Mesophilic methanogenic sludge	CSTR	70	6.7 (feed)	3.65	-	-
Untreated de-oiled algae cake	Anaerobic digester sludge	Batch	29	6 (initial)	66 ^f	0.08 mL/h	-
Potato and pumpkin mixture	BESA treated anaerobic sludge	Batch	35	7.4 (initial)	171.1	-	-

^a mL H₂/g COD.

^b mL H₂/g VS_{removed}.

^c mL/g TS.

^d mL H₂/g carbohydrate.

^e mL H₂/g total sugar.

^f mL H₂/g algal biomass.

Residui agricoli

I residui agricoli, soprattutto i rifiuti lignocellulosici, rappresentano una fonte economicamente sostenibile e rinnovabile di biocarburanti di carbonio di seconda generazione. La cellulosa e l'emicellulosa di questi rifiuti possono essere idrolizzate in carboidrati, i quali verrebbero successivamente convertiti biologicamente in acidi organici e in bioidrogeno, durante i processi di dark fermentation.

La principale limitazione, concernente l'uso di queste risorse, è rappresentata dalla struttura complessa dei materiali lignocellulosici: un legame tra polisaccaridi (cellulosa ed emicellulosa) e lignina, attraverso legami di eteri ed esteri, i quali riducono la loro biodegradabilità. Perciò, prima di essere sottoposte alla dark fermentation, queste biomasse

sono spesso soggette a un pretrattamento fisico, chimico e biologico, con l'obiettivo di migliorarne la digeribilità.

Magnusson et al. [56] hanno investigato sulla produzione di H_2 da diverse fonti lignocellulosiche: residui essiccati da distilleria (DDGs), crusca d'orzo (BH) e crusca d'orzo contaminato da filariosi (CBH). Hanno ottenuto rispettivamente le rese di 1,27 $mmol_{H_2}/equivalente$ di glucosio, 1,18 $mmol_{H_2}/equivalente$ di glucosio e 1,24 $mmol_{H_2}/equivalente$ di glucosio.

Rifiuti da allevamento di bestiame

I rifiuti da allevamento, che includono il letame, residui di foraggio e reflui costituiti da urina e feci, costituiscono potenziali substrati per la dark fermentation, ma necessitano di trattamenti fisici e chimici per inibire l'attività metanogenica. Un altro problema, in cui si potrebbe incorrere durante l'uso di questo tipo di materia prima, consiste nell'inibizione della produzione di bioidrogeno da parte dell'ammoniaca, a causa dell'elevato contenuto di azoto nel letame: il letame presenta un basso rapporto C/N (in caso di letame derivante da allevamento di maiali, il rapporto C/N è di 12,8) e alti livelli di azoto ammoniacale (1,04-1,9 g/L in caso di liquame bovino, 7-12,8 g/L in caso di letame derivante da allevamento di polli). Una soluzione potrebbe essere l'utilizzo del letame come substrato per la fornitura di azoto in altri residui agricoli, in modo da mantenere un idoneo rapporto carbonio-azoto. [27] Wu et al. [100] hanno conseguito una resa di H_2 compresa tra 1,18 e 1,63 $mol_{H_2}/mol_{glucosio}$, attraverso una fermentazione di letame da allevamento di maiali con aggiunta di glucosio.

Rifiuti industriali

I rifiuti agro-industriali, quali i reflui provenienti da frantoi di olio di palma e d'oliva (OMWW), e i rifiuti da industrie alimentari, come le birrerie e le industrie casearie, costituiscono un'elevata quantità di rifiuti non tossici ad alto contenuto di carboidrati, sia in forma di rifiuti solidi sia in forma di acque reflue. Quindi, potrebbero rappresentare dei potenziali substrati per la produzione di idrogeno attraverso dark fermentation. Ren et al. [72] hanno dimostrato che la melassa di rifiuto sia un eccellente substrato in caso di un impianto pilota, operante in condizioni mesofile (35 °C). Essi hanno ottenuto degli ottimi risultati in termini di tasso di produzione di H_2 (232 $mL_{H_2}/L/h$) e di resa (26,13 $mol/kg_{CODrimosso}$).

Analogamente, il siero di latte, che consiste in un sottoprodotto di rifiuto generato nelle industrie di produzione del formaggio e caratterizzato da elevati carichi organici, comprendenti principalmente carboidrati (lattosio), proteine e lipidi, rappresenta un ottimo substrato per la produzione di bioidrogeno.

3.3.2 Siero di latte

Il siero di latte consiste in un liquido verde-giallastro (il colore giallastro è dovuto alla presenza di riboflavina, cioè la vitamina B2), ottenuto attraverso la precipitazione e la rimozione della caseina del latte durante i processi di produzione del formaggio. La sua composizione chimica è estremamente variabile e dipende da alcuni fattori quali il genere animale di provenienza del latte (bovini o ovini), la razza allevata, l'alimentazione seguita, la stagione di prelievo, ma anche dal processo lavorativo seguito per la caseificazione, oltre che dal formaggio da cui è ottenuto. [21]

La maggior parte del lattosio presente nel latte (in un intervallo piuttosto ampio di circa 39-60 kg/m³) rimane nel siero di latte, costituendo la principale componente (90 %) del carico organico. Anche grassi e proteine sono presenti, con valori nei range di 0,99-10,58 kg/m³ e di 1,4-8 kg/m³, rispettivamente. [70] Il BOD (Domanda Biologica di Ossigeno) e il COD del siero di latte sono solitamente compresi tra 27-60 kg/m³ e tra 50-102 kg/m³, rispettivamente; il rapporto BOD₅/COD è comunemente superiore a 0,5. Perciò, questo substrato è idoneo per essere trattato attraverso processi biologici, per via dell'alta biodegradabilità. [70] La frazione inorganica del siero di latte è correlata alla presenza di sali minerali (soprattutto fosfati), i quali possono essere presenti nel latte o aggiunti durante la produzione di formaggio. La presenza di NaCl è dovuta soprattutto alla produzione del formaggio.

Sono stati effettuati studi riguardanti la produzione di idrogeno tramite l'utilizzo di reali reflui caseari, reflui artificiali, con siero di latte in polvere/latte sgrassato e reflui di siero sterilizzato. In questi studi si è riscontrato come la produzione di H₂ sia più efficace qualora il siero sia ricco di carboidrati. Anche la presenza di ammoniaca migliora la produzione di H₂, ma più alte concentrazioni di ammoniaca potrebbero inibire la formazione di H₂.

D'altra parte, il refluo caseario contiene elevate concentrazioni di grassi e oli e il loro accumulo nei bioreattori riduce la velocità di assimilazione del substrato, limitando il trasporto dei substrati solubili alle cellule batteriche. Inoltre, una grande quantità di queste sostanze causa lo sviluppo di batteri filamentosi, la flottazione del fango caratterizzato da scarsa attività, intasamenti e odori sgradevoli. [70] Analogamente ad altre industrie alimentari, l'effluente da industrie casearie potrebbe contenere concentrazioni variabili di detersivi, tensioattivi e sali. Inoltre, il siero di latte potrebbe comportare considerevoli rischi di eutrofizzazione, legati ai contenuti di azoto (0,2-1,76 kg/m³) e di fosforo (0,124-0,54 kg/m³). [70]

Riferendoci a queste considerazioni, è ovvio che il siero di latte non possa essere direttamente sversato in ambiente, senza aver subito un adeguato trattamento e/o una valorizzazione. Nel caso di una valorizzazione, il vantaggio è attribuibile al fatto che il siero di latte sia ricco di nutrienti. Il siero di latte è costituito per il 93-94% da acqua e dai seguenti

nutrienti, derivanti dal latte in origine: lattosio, proteine solubili, minerali, acido lattico e grassi (Figura 3.3). In aggiunta, quantità significative di altre componenti, quali l'acido citrico, composti di azoto non proteico (urea e acido urico), vitamine (del gruppo B), etc., sono annoverate tra le componenti del siero di latte. Casal et al. [14] hanno individuato nel siero di latte b-lattoglobulina, a-lattoglobulina, immunoglobuline, lattoferrina e albumina sierica.

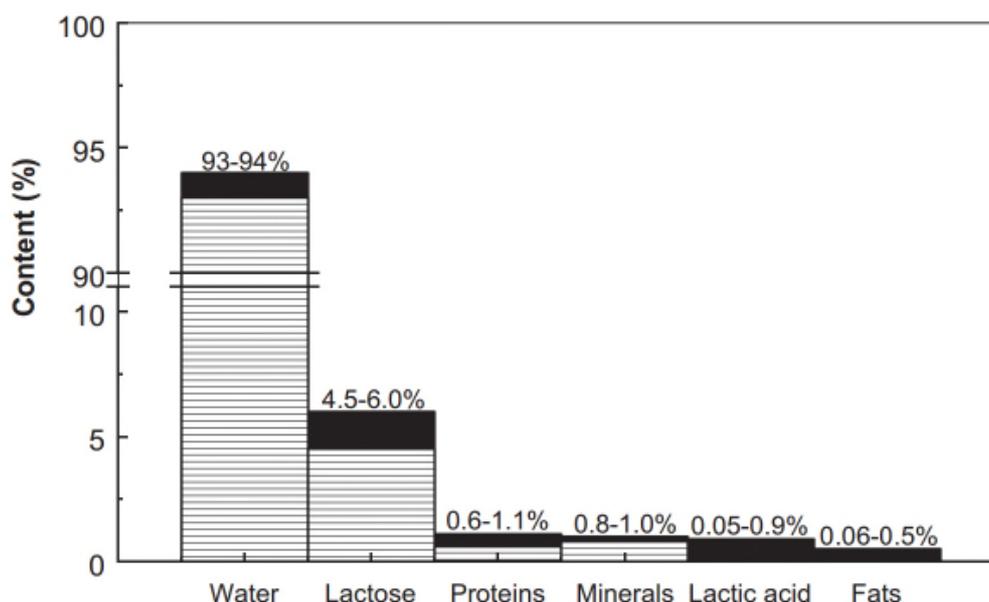


Figura 3.3 – Componenti del siero di latte (la zona a righe rappresenta il valore minimo, mentre la zona colorata di nero si riferisce al massimo valore percentuale). (Prazeres et al., 2012)

Si possono considerare tre diverse possibilità nella gestione di reflui caseari. La prima consiste nell'applicazione di tecniche di valorizzazione. Queste tecniche hanno l'obiettivo di recuperare componenti di un certo interesse, quali le proteine e il lattosio. Ogni litro di siero di latte contiene circa 50 g di lattosio e 10 g di proteine con un elevato valore nutrizionale e funzionale. Attualmente, i processi di valorizzazione applicati al siero di latte costituiscono l'opzione preferenziale di trattamento di questo prodotto, superata soltanto dalla produzione di siero di latte in polvere. Un'altra via di valorizzazione del siero, da effettuarsi eventualmente a valle del più consolidato recupero delle sieroproteine, è quella che ne prevede la valorizzazione energetica, con la produzione di biogas, costituito principalmente da metano e idrogeno, sfruttando processi biologici fermentativi. [70]

La seconda possibilità è volta all'applicazione di trattamenti biologici, che possono anche fungere da tecniche di valorizzazione. Per esempio, l'idrolisi del lattosio e delle proteine porta alla generazione di monosaccaridi del lattosio (glucosio e galattosio), peptidi e/o amminoacidi. Processi di fermentazione controllata sono stati considerati nella produzione

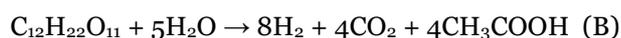
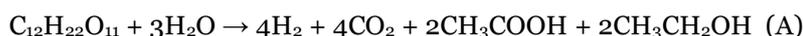
di acido lattico, acido butirrico, butanolo, acido acetico, glicerolo, acetone, etanolo, idrogeno, proteine unicellulari, etc.

La terza possibilità è volta alla depurazione con trattamenti fisico-chimici, quali la coagulazione-flocculazione, l'ozonizzazione, processi Fenton, la precipitazione termica e isoelettrica, la precipitazione termocalcica, la precipitazione acida, la precipitazione alcalina, l'ossidazione elettrochimica, la gassificazione alcalina dell'acqua, etc.

L'Italia occupa una posizione preminente nel panorama mondiale della produzione di latte vaccino, con quantità annue pari mediamente a 10700607 t (94,6 % della produzione totale di latte nazionale), corrispondenti a circa il 10% della produzione della Unione Europea. A ciò si aggiunge il latte prodotto da altre specie lattifere, quali ovini (383836 t, 3,4 % del totale), caprini (27489 t, 0,3 % del totale) e bufalini (194892 t, 1,7 % del totale) che hanno un notevole peso nel contesto produttivo italiano. [101]

Degradazione del lattosio a produrre idrogeno

Il lattosio ($C_{12}H_{22}O_{11}$) è uno zucchero disaccaride costituito da una molecola di beta-D-galattosio e da una di D-glucosio uniti da un legame beta (1→4) glicosidico. Dopo essersi diffuso all'interno dei batteri, il lattosio viene spaccato in glucosio e galattosio dalla β-galattosidasi. La conversione di 1 mol di lattosio può corrispondere a 2 mol di glucosio, dato che il bilancio di massa e di energia degli step ossidativi dei due monosaccaridi (glucosio e galattosio) a dare piruvato sono equivalenti. Quindi, 1 mol di lattosio può essere ossidata a 4 mol di piruvato, che a sua volta può essere convertito a 4 mol di lattato o 4 mol di propionato. Il piruvato può inoltre seguire un altro pathway metabolico, venendo convertito ad acetyl-CoA. Questa via può portare a 4 mol di acido acetico o 4 mol di etanolo (equazione (A)). Se non viene prodotto etanolo, la resa teorica di idrogeno che può essere raggiunta con la formazione di acido acetico è 8 mol_{H₂}/mol_{lattosio} (equazione (B)). Alternativamente alla via metabolica che porta alla produzione di acido acetico, la fermentazione del lattosio può seguire quella che dà origine ad acido butirrico, con una resa teorica massima di 4 mol_{H₂}/mol_{lattosio} (equazione (C)). La massima produzione di idrogeno si ottiene quando il prodotto finale di fermentazione risulta essere l'acido acetico ($\Delta G = -206$ kJ/mol), ma dal punto di vista termodinamico, la produzione di acido butirrico è favorita ($\Delta G = -290,3$ kJ/mol). [42]



3.4 Configurazione del bioreattore

Il design di un sistema di dark fermentation dipende principalmente dai substrati, i quali determinano le condizioni operative dei bioreattori, come la temperatura (mesofila o termofila), la configurazione del reattore (la tipologia di reattore: condizioni umide, semi-secche o secche) e la modalità di alimento (monosubstrato o co-substrati).

Gli studi riguardo la produzione di H_2 sono stati effettuati con la medesima configurazione del bioreattore usata nei sistemi di produzione di CH_4 , ma in condizioni ambientali ottimali per i batteri produttori H_2 . Diverse configurazioni di bioreattori per dark fermentation sono state utilizzate in studi di laboratorio, per un ampio range di substrati (Tabella 3.5).

Tabella 3.5 – Esempi di studi conseguiti utilizzando differenti bioreattori per dark fermentation in continuo. I valori riportati nella tabella indicano come un reattore CSTR comporti una più elevata resa di produzione di H_2 da reflui caseari e un più elevato VHPR rispetto ad altri bioreattori. (Karadag et al., 2014)

Wastewater	Reactor type	Inoculum	Temp. (°C)	pH	HRT(h)	OLR (kg COD $m^{-3}d^{-1}$)	VHPR (L $H_2L^{-1}d^{-1}$)	H_2 yield ($m^3H_2 kg^{-1}COD$)
Whey wastewater	CSTR	Indigenous microorganism	35	5.2	24	60	2.9	0.016
Whey wastewater	CSTR	Indigenous microorganism	35	5.2	24	61	2.51	0.041
Whey powder solution	CSTR	Anaerobic digester sludge	35–38	4.0–5.0	24	10,12	0.29	0.040–0.052
Whey wastewater	CSTR	Heat-treated anaerobic granular sludge	55	5.5	24–120	21,35,47	0.3–7.9	0.117–0.493
Whey powder solution	CSTR	Heat-treated anaerobic granular sludge	37	5.9	4–10	63–208	2.47–25.2	0.020–0.056
Whey powder solution	UASB	Heat treated anaerobic sludge	35	5.8	24	20–35	0.30–0.96	0.016–0.035
Whey wastewater	UASB	Asidogenic lab-scale reactor sludge	30	5.0	12, 24	10,20	0.122	0.061
Whey powder solution	UASB	Heat treated anaerobic granular sludge	22–25	5.9	6-24	5-20	0.5	NA
Dairy wastewater	AnSBR	Heat and acid treated	28	6.0	24	2.4, 3.5, 4.7	0.7–2.1	0.156
Whey powder solution	Packed bed	Indigenous microorganism	30	4.8–6.2	24	22,33,37	0.06–1.0	0.064
Whey powder solution	Packed bed	Biosolid pellets from the wastewater treatment	35	4.5–5.5	24, 48	6.3–18.8	NA	0.018–0.025
Whey powder solution	AFBR	Heat-treated anaerobic sludge	30	4.0–4.5	1-4	30–120	0.23–0.74	0.014–0.038

Sono state applicate differenti strategie di avvio per lo sviluppo della comunità batterica e per incrementare la performance del bioreattore. Generalmente, in un primo momento si opera

in modalità batch per diverse durate, in modo da permettere l'acclimatazione dei microrganismi al substrato e alle condizioni ambientali. Per esempio, Navarro et al. [64] hanno iniziato a operare in continuo con un reattore CSTR dopo 12 h in modalità batch, mentre Rosa et al. [75] hanno lavorato in batch per 76 h con un reattore AFBR, e Fernandez et al. [24] hanno lavorato in modalità batch per due giorni con un reattore a letto fisso. I bioreattori sono stati poi impiegati per lavorare in continuo e le condizioni ambientali sono state ottimizzate per poter ottenere la migliore performance.

I sistemi di produzione di H₂ in continuo sono classificati come reattori a biomassa sospesa (tra cui CSTR e UASB) e a biofilm, in accordo con la distribuzione dei microrganismi H₂ produttori all'interno del bioreattore.

Il CSTR (*continuously stirred tank reactor*) è un bioreattore a biomassa sospesa ampiamente utilizzato e possiede il vantaggio di semplicità di costruzione e funzionamento per produrre H₂. Il continuo miscelamento rafforza il trasferimento di massa, ma la biomassa sospesa contenuta in un CSTR potrebbe essere facilmente allontanata quando si opera con bassi tempi di residenza. Davila-Vazquez et al. [18] hanno osservato che la produzione di H₂ da siero possa essere migliorata in maniera significativa operando in un CSTR con appropriati valori di HRT e di OLR (*organic loading rate*). Gli autori hanno ottenuto come più alta produzione di H₂ 0,020-0,056 m³H₂/kg_{COD}, operando con un HRT di 6 h e un OLR compreso tra 63–208 kg_{COD}/(m³·d); mentre essa era diminuita in caso di un carico organico maggiore. Dunque, hanno sostenuto che esista una soglia dell'OLR per la massima produzione di H₂, oltre a questa soglia l'OLR cambierebbe il percorso metabolico dal produrre H₂ a una produzione di acido propionico. Risultati analoghi sono stati riscontrati da Wang e Zhao [98] riguardo alla produzione di H₂ da rifiuti alimentari. Essi hanno affermato che operare a più elevati OLR favorirebbe la generazione di acidi propionico e lattico, che sono la causa principale della diminuzione delle rese di produzione di H₂. Visto che le specie di *Clostridium* potrebbero essere facilmente allontanate se il bioreattore fosse caratterizzato da HRT inferiori a 6 h, hanno raccomandato di operare con HRT superiori a 6 h e riducendo l'HRT lentamente, attraverso step di mezz'ora, in modo da evitare l'allontanamento dei batteri e da permetterne lo sviluppo. Yang et al. [103] hanno invece affermato che un HRT inferiore alle 24 h non favorisca la fermentazione di H₂ da siero di latte in polvere, per via della sua lenta idrolisi, rispetto a quella di un siero solubile. Il loro esperimento si è basato sull'utilizzo di permeato di siero essiccato in polvere con l'aggiunta di minerali, per produrre H₂ in un reattore CSTR con un HRT di 24 h. La più alta resa di produzione di H₂ ottenuta è stata di 0,052 m³H₂/kg_{COD}, con un OLR di 14 kg_{COD}/(m³·d) e con un valore di pH pari a 5, mentre la performance del reattore si è ridotta operando a pH 4. I ricercatori hanno anche affermato che un maggiore OLR potrebbe influire positivamente sulla produzione di H₂ se i batteri non fossero inibiti da un'elevata concentrazione di substrato.

I reattori UASB (*Up-flow Anaerobic Sludge Blanket*) sono stati largamente impiegati per la degradazione anaerobica di reflui da industrie alimentari, grazie al buon contatto tra substrato e microrganismi, insieme con una più elevata efficienza di trattamento in caso di elevati carichi organici. Infatti, un elevato carico organico per unità di biomassa e un basso HRT favoriscono la produzione di idrogeno in reattori UASB, mentre i granuli giocano un ruolo importante nel successo del processo. [37] Il fango granulare contiene una maggiore quantità di microrganismi rispetto a un biofilm, e questo sarebbe un vantaggio nella produzione di H_2 in continuo, ma, comunque, i reattori UASB necessitano di un lungo periodo di avvio per favorire lo sviluppo di granuli produttori H_2 . Jung et al. [36] hanno raccomandato una strategia per ridurre il periodo di avvio e sviluppare una maggiore quantità di batteri H_2 produttori: la formazione della comunità batterica e del substrato è inizialmente condotta in un CSTR e, seguendo lo svilupparsi di un'auto-flocculazione, il mixed liquor viene trasferito in un reattore UASB. Reyes et al. [73] hanno confrontato due differenti strategie di avvio e fonti di inoculo per produrre H_2 da siero a 22-25 °C in reattori UASB. Nella prima strategia è stato incrementato l'OLR da 5 a 20 $kg_{COD}/(m^3 \cdot d)$, ad HRT costante; mentre nella seconda strategia l'OLR è stato mantenuto a 20 $kg_{COD}/(m^3 \cdot d)$, riducendo l'HRT da 24 h a 6 h. Essi hanno concluso che la strategia di avvio abbia un effetto sulla produzione di H_2 , sul percorso metabolico e sulla comunità batterica dei reattori UASB caratterizzati da fango granulare, ma, d'altra parte, la diversità microbica è stata influenzata soprattutto dalla durata del processo, piuttosto che dalla strategia di avvio. In particolare, hanno osservato che mantenere l'OLR costante e ridurre l'HRT gradualmente fosse una strategia più idonea allo sviluppo di una comunità batterica produttrice H_2 nei reattori UASB. Castello et al. [15] hanno utilizzato un reattore UASB per produrre idrogeno da siero a 30 °C e hanno riscontrato che il mantenimento del bioreattore a un pH idoneo sia insufficiente nel prevenire la formazione di CH_4 , poiché i metanigeni potrebbero adattarsi a condizioni di bassi valori di pH nei reattori UASB. La più alta resa conseguita è stata di 0,0061 $m^3_{H_2}/kg_{COD}$, decisamente inferiore rispetto a quella ottenuta da Yang et al. [103] in un reattore CSTR (0,052 $m^3_{H_2}/kg_{COD}$).

Gavala et al. [26] hanno comparato le performance di reattori UASB e CSTR per produrre H_2 a temperature mesofile, e hanno osservato dei più elevati tassi di produzione di idrogeno in un reattore UASB (che possiede la ritenzione della biomassa granulare) piuttosto che in un CSTR, in caso di bassi tempi di ritenzione idraulica (19,05 e 8,42 $mmol_{H_2}/h/L$, rispettivamente, ad un HRT di 2 h). Tuttavia, nel CSTR si sono conseguite rese di idrogeno maggiori a qualsiasi HRT. Questo suggerisce come un compromesso dovrebbe essere cercato tra l'efficienza tecnica (basata sulle rese di H_2) e l'efficienza economica (basata sul tasso di produzione di H_2), qualora venisse scelto uno tra questi due sistemi.

L'incompatibilità tra l'uso di elevati tassi di carico organico (OLR) e la rapida crescita batterica ha reso i sistemi a biofilm meno attraenti rispetto ai sistemi con granuli. In uno

studio, Zhang et al. [105] hanno confrontato la potenziale produzione di bioidrogeno da parte di un sistema a biofilm e di un reattore con fango granulare, concludendo che il sistema con granuli fosse vantaggioso, in quanto ha permesso migliori risultati in termini di ritenzione della biomassa, senza imbattersi in dilavamenti dei supporti della biomassa.

Tuttavia, i bioreattori a biofilm hanno una migliore capacità di protezione della biomassa batterica dall'inibizione di agenti chimici tossici e forniscono una buona resistenza alle variazioni delle condizioni ambientali. [27] Perna et al. [69] hanno utilizzato polietilene a bassa densità riciclato come materiale di supporto in un bioreattore anaerobico a letto fisso, per produrre H_2 da siero a 30 °C. Il bioreattore operava ad un HRT costante di 24 h e l'OLR è stato incrementato da 22 a 37 $kg_{COD}/(m^3 \cdot d)$. L'efficienza di rimozione del COD era compresa tra 14-32 % e la massima rimozione è stata di 25 $kg_{COD}/(m^3 \cdot d)$. In ogni condizione il contenuto di H_2 è rimasto al di sotto del 10 % e la massima resa è stata di 0,064 $m^3_{H_2}/kg_{COD}$, cioè circa la metà del valore della resa ottenuto con un UASB, ma, comunque, la prestazione del reattore è rimasta stabile, con la tendenza ad aumentare in caso di carichi maggiori. Inoltre, l'aumento del carico organico ha portato a un miglioramento della conversione del lattosio: essa è aumentata da 92 % a 99 % (anche se è stata superiore al 99 % utilizzando un reattore UASB, a prescindere dall'OLR applicato), incrementando l'OLR da 22 a 37 $kg_{COD}/(m^3 \cdot d)$. Non sono stati riscontrati problemi operativi correlati all'intasamento del letto o alla produzione di metano. Nel bioreattore, il 18,4% della biomassa è sopravvissuto attaccato alla matrice di supporto. La concentrazione media di solidi volatili nel reattore è stata misurata di 27,6 g_{SV}/L , e l'OLR applicato alla biomassa è stato di 1,3 $g_{COD}/(g_{VS} \cdot d)$. La comunità batterica mostrava una composizione che differiva in diverse zone del reattore: mentre gli organismi produttori di acido butirrico erano i predominanti tra la biomassa sospesa, i batteri produttori di acido lattico abbondavano nella camera mista. All'interno del bioreattore, soltanto *Clostridium* e *Klebsiella* possedevano la capacità di produrre idrogeno, mentre gli altri microrganismi competevano per il substrato e, dunque, peggioravano la produzione di H_2 . Sebbene la maggior parte dei sistemi a biofilm utilizzassero un mezzo sintetico come supporto, Moreno-Davila et al. [61] hanno sviluppato un sistema a biofilm con supporto di *Opuntia imbricata*. Una coltura batterica mista, dopo essere stata sottoposta a pretrattamento termico e con acido, è stata inoculata nel bioreattore e il siero è stato convertito in H_2 a 18 °C. I ricercatori hanno affermato che l'HRT avesse una forte influenza sulla produzione di H_2 e la riduzione dell'HRT da 0,8 a 0,4 h incrementasse la resa in maniera significativa. Loro hanno anche aggiunto che la formazione del biofilm migliorasse la produzione di H_2 e che la comunità batterica conseguisse una migliore produzione in condizioni ambientali estreme.

Rosa et al. [75] hanno utilizzato due reattori AFBR (*anaerobic fluidized bed reactor*) identici, a una temperatura di 30 °C e con polistirene come supporto per la biomassa. L'inoculo usato proveniva da fonti differenti, sottoposte a trattamento termico, e come substrato è stato

adoperato il siero in polvere con l'aggiunta di micronutrienti. Inizialmente hanno lavorato in batch, per 72 h, in modo da sviluppare il biofilm, prima di passare alla modalità in continuo. La più alta resa di produzione di H_2 ottenuta è stata di $0,038 \text{ m}^3_{H_2}/\text{kg}_{COD}$, ed essa è diminuita con la riduzione dell'HRT. L'etanolo consisteva nel metabolita predominante in caso di HRT più alti, mentre operando ad un HRT di 1 h nel reattore si accumulava acido propionico. La composizione della comunità batterica variava al variare delle condizioni operative. Show et al. [82] hanno confrontato la performance di un CSTR e di un AFBR per produrre bioidrogeno usando differenti strategie di crescita della biomassa, con glucosio come substrato. Le diverse configurazioni del bioreattore adoperate nelle loro ricerche sono state: sistema CSTR a fango sospeso, sistema CSTR a fango granulare, sistema AFBR a fango granulare e sistema AFBR a biofilm. Le massime rese di produzione di H_2 ottenute con il loro CSTR a fango sospeso, con il reattore con granuli e con il sistema a biofilm, sono state rispettivamente di $1,92 \text{ mol}_{H_2}/\text{mol}_{glucosio}$ ad un HRT di 6-12 h, $1,83 \text{ mol}_{H_2}/\text{mol}_{glucosio}$ ad un HRT di 0,5 h, e $1,81 \text{ mol}_{H_2}/\text{mol}_{glucosio}$ ad un HRT di 0,5 h.

Mohan et al. [59] hanno affermato che il pH pari a 6 fosse ottimale per una resa di produzione di H_2 efficiente e che l'integrazione di un reattore UASB con un AnSBR (*anaerobic sequencing batch reactor*) fosse un'ottima soluzione per produrre H_2 da refluo caseario in condizioni mesofile. Un reattore AnSBR è relativamente facile da utilizzare ed è caratterizzato da costi non elevati, mentre le sue prestazioni dipendono soprattutto dal carico organico. L'HRT dell'AnSBR è stato mantenuto costante a 24 h ed è stata conseguita una riduzione dell'efficienza di rimozione del COD da 64,7% a 51% quando l'OLR è stato ridotto da 4,7 a 2,4 $\text{kg}_{COD}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})$. La resa di produzione dell'idrogeno conseguita è stata di $0,156 \text{ m}^3_{H_2}/\text{kg}_{COD}$.

Riassumendo, al di là dei vantaggi specifici di ciascuno dei differenti sistemi, i maggiori svantaggi sono rappresentati dal dilavamento dei batteri idrogeno produttori in caso di bassi HRT in sistemi CSTR, dai bassi tassi di conversione nei sistemi con fango granulare e dal rapido sviluppo di biofilm, che comporta frammentazione e separazione dai materiali di supporto in sistemi a biofilm.

Infine, ricerche recenti si sono focalizzate sulle applicazioni di processi ad alto contenuto di solidi, come la dark fermentation semi-secca (10-20 % TS) e quella secca (>20 % TS), per produrre bioidrogeno, visto che gli interessi nella conversione di biomassa lignocellulosica di seconda generazione (principalmente composta dai residui agro-industriali) stanno crescendo.

3.5 Parametri di processo

La dark fermentation attraverso colture miste è un sistema complesso in cui i fattori ambientali e le condizioni operative del bioreattore, quali la temperatura, il pH e la pressione parziale dell'idrogeno, regolano i percorsi metabolici dei microrganismi idrogeno produttori. Inoltre, le tipologie di substrato e i loro metodi di pretrattamento, le configurazioni del bioreattore, le fonti di inoculo e i loro arricchimenti, sono altri elementi che influenzano la produzione di idrogeno.

3.5.1 Tempo di ritenzione idraulica (HRT)

L'HRT può influenzare l'idrolisi del substrato e, quindi, la produzione di prodotti intermedi e finali, influenzando così sulla produzione di H_2 . Per questo, l'HRT ottimale dipende dal tipo di substrato usato, in quanto il tasso di idrolisi dipende dalla biodegradabilità dei substrati. [27] L'HRT può anche essere utilizzato come un parametro di controllo dell'attività metanogenica, in quanto si è scoperto come un basso HRT favorisca la produzione di idrogeno, poiché i metanigeni verrebbero dilavati: la produzione di idrogeno aumenta con il diminuire dell'HRT. Infatti, maggiori rese di H_2 ($>245 \text{ mL/g}_{\text{COD}}$) e tassi di produzione di H_2 ($>3 \text{ L/L/d}$) si sono osservati ad HRT inferiori ($<10 \text{ h}$). Tuttavia, Azbar et al. [10], utilizzando reflui di siero di latte ($47 \text{ g}_{\text{COD/L}}$) in un CSTR, in uno studio sull'effetto di variazioni di HRT e OLR, hanno conseguito una resa elevata ($22 \text{ mmol/g}_{\text{COD}} = 539 \text{ mL/g}_{\text{COD}}$) ad un HRT maggiore (3,5 d). La resa media di produzione di H_2 ottenuta è stata di $0,117 \text{ m}^3_{\text{H}_2}/\text{kg}_{\text{COD}}$ e la performance del processo si è ridotta quando il bioreattore operava con HRT inferiore a 2 giorni. D'altra parte, l'OLR non aveva causato un cambiamento significativo del tasso di produzione di H_2 , anche se il contenuto di H_2 nel biogas era aumentato da 37 % a 55 %, riducendo l'OLR da 47 a 21 $\text{kg}_{\text{COD}}/(\text{m}^3\cdot\text{d})$.

A ogni modo, l'utilizzo di HRT superiori alle 24 h potrebbero causare la crescita di batteri metanigeni, e, per questo motivo, i valori maggiormente utilizzati all'interno dei casi di studio presenti in letteratura ricadono nel range 6÷24 h. Comunque, il controllo sull'HRT non può da solo eliminare totalmente l'attività metanogenica; tuttavia una combinazione di pH e HRT sono in grado di favorire la produzione di idrogeno. Liu [52] ha investigato gli effetti del pH e dell'HRT sulla produzione di idrogeno, operando con un CSTR ipertermofilo ($70 \text{ }^\circ\text{C}$), con rifiuti solidi domestici come substrato. È stato investigato l'effetto dell'HRT (1, 2, 3, 4 e 6 giorni) a un pH costante di 7 e l'effetto del pH (5, 5,5, 6, 6,5 e 7) a un HRT costante di 3 giorni. I risultati degli esperimenti a differenti HRT e pH costante hanno mostrato una produzione di H_2 instabile, con attività metanogenica verso la fine. Comunque, la

combinazione di un valore di pH pari a 5,5 e un HRT di 3 giorni ha rappresentato le condizioni ottimali di produzione di bioidrogeno.

3.5.2 pH e temperatura

Il pH

Il pH del processo, insieme alla temperatura, è uno dei principali parametri che regolano il pathway degradativo del substrato, siccome può influenzare direttamente l'attività dell'enzima idrogenasi. Il pH risulta essere un parametro importante anche nel controllo dei processi consumatori di idrogeno che possono avvenire simultaneamente. In linea generale, il pH a cui si osserva la produzione di bioidrogeno ottima dipende dal substrato impiegato, dalla tipologia di coltura e dalle altre condizioni operative; ciononostante la maggior parte degli studi lo attesta tra 4,5 e 6. In questo range infatti predominano i pathway dell'acido acetico e dell'acido butirrico, associati ad una maggiore produzione di idrogeno. Valori di pH superiori a 6, oltre che a favorire la crescita dei metanigeni (colture miste), inducono vie metaboliche legate alla produzione di acido lattico, propionico ed etanolo. Nonostante pH inferiori a 4,5 inibiscano l'omoacetogenesi, causano uno shift metabolico verso la produzione di solventi (propanolo, butanolo, etanolo) riducendo la resa complessiva in termini di idrogeno. A pH bassi tendono infatti ad accumularsi le forme indissociate degli acidi organici che possono attraversare la membrana cellulare dei microorganismi e dissociarsi al loro interno. Il meccanismo di risposta è di conseguenza lo shift metabolico verso i solventi, utilizzato dal microorganismo per smaltire l'eccesso di acidità. [34] Inoltre, un pH inferiore a 5 favorirebbe la produzione di butanolo ed acetone, in caso di dark fermentation del glucosio da parte di *Clostridium pasteurianum*. [95] A fronte dell'elevato grado di dipendenza dalle altre condizioni di processo, determinare delle condizioni favorevoli generali risulta molto complesso, alcuni studi condotti in continuo con range di pH diversi riportano però il range 5,2-5,8 come ottimale su un'ampia gamma sia di tempi di ritenzione idraulica (6-32 h), che di substrati (saccarosio, amido e reflui della birrificazione). [34] Calli et al. [12] hanno concluso che il valore ottimale di pH per la produzione di H₂ da lattosio sia pari a 5,3 e hanno sottolineato l'importanza di un controllo online del pH.

Il pH nel bioreattore può essere mantenuto utilizzando un appropriato sistema di controllo tramite alcalinità o sostanze chimiche acide. Stamatelatou et al. [85] hanno osservato come un bioreattore dotato di sistema di controllo del pH producesse il doppio rispetto ad altri bioreattori dotati di fornitura di alcalinità nell'alimento. Inoltre, la percentuale di H₂ nel biogas è inferiore in caso di bioreattori con controllo tramite alcalinità, poiché l'aggiunta di NaHCO₃ nell'alimento produrrebbe elevate quantità di CO₂.

La Tabella 3.6 fornisce i range ottimali del pH (correlati a una certa temperatura), relativi ai diversi studi effettuati.

Tabella 3.6 – Effetti della temperatura e del pH di processo sulla produzione di idrogeno attraverso fermentazione. (Ghimire et al., 2015)

Substrate type	Microbial inoculum	Optimum pH	Optimum temperature (°C)	Reactor type	HRT (days)	Maximum H ₂ yield (mL H ₂ /g VS)	Major acid type produced
Food waste	Heat shock treated anaerobic sludge	6.3	35	Leaching bed reactor	25	310	Acetate
Cassava stillage	Heat treated UASB sludge	7	60	Batch CSTR	3.5	53.8	Butyrate
Cassava stillage	Heat treated UASB sludge	5	60	Batch CSTR	3.5	66.3	Butyrate
OFMSW	Untreated anaerobic digestate	5.5	37	Semi-continuous CSTR	21	165 ^a	Butyrate
OFMSW	Untreated anaerobic digestate	6.4	55	Semi-continuous CSTR	21	360 ^a	Acetate
Wheat straw	Cow dung compost	7.0	36	Batch CSTR	6.25	68.1	Acetate and butyrate
Vegetable kitchen waste	Enriched from kitchen waste compost	7.0	55	Batch CSTR	7.0	12.8 ^b	Butyrate and lactate
Cattle wastewater	Mixed wastewater sludge, cow dung compost, chicken manure compost, river sludge	5.5	45	Batch CSTR	1.25	319 ^c	Butyrate
Rice straw	Heat treated wastewater sludge	6.5	55	Batch CSTR	6.5	24.8 ^d	Acetate

^a mL H₂/g VS_{removed}.

^b mL H₂/g COD.

^c mL H₂/g COD_{consumed}.

^d mL/g TS.

La Tabella 3.6 mostra come un pH neutro favorisca la formazione dell'acetato, mentre un pH acido comporti la produzione di butirato.

Luo et al. [55], durante una dark fermentation con un supporto di manioca, hanno individuato l'acetato quale principale prodotto metabolico a pH 7, mentre il butirato era dominante ad un pH iniziale di 5,5, sotto condizioni mesofile (37 °C) e utilizzando un inoculo pretrattato con acido. Inoltre, hanno osservato l'inibizione da parte di omoacetogeni, in caso di un valore di pH di 5,5 e di condizioni termofile (55 °C).

In uno studio del 2014 riguardante la dark fermentation attraverso siero di latte, proveniente da produzione di mozzarella, a differenti valori di pH (5,5-7) e a una temperatura di 39 °C, De Gioannis et al. [19] hanno individuato il valore di pH pari a 6 come ottimale, ed hanno osservato come i livelli di acetato fossero più elevati in ogni test, tranne nel caso di pH di 6,5, quando i livelli di butirato e propionato hanno ecceduto quelli di acetato.

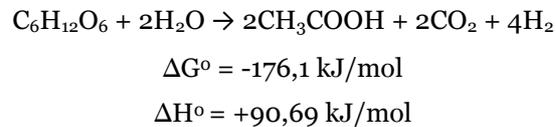
Dunque, è importante determinare il valore ottimale del pH durante la dark fermentation, tenendo conto del tipo di substrato scelto, del tasso di carico organico e della temperatura operativa.

Molti studi sono stati condotti in batch, senza controllo del pH, investigando solamente l'effetto del pH iniziale sulla produzione di H₂. In modalità batch, il pH iniziale influenza l'estensione della fase di lag nella produzione di H₂: in alcune sperimentazioni si è osservato come un basso pH iniziale (nel range di 4-4,5) comporti fasi di lag più estese, rispetto a valori di pH situati intorno a 9. Comunque, si è anche osservato come la resa di produzione di H₂

diminuisca se il pH iniziale è elevato: in caso di pH iniziale maggiore, si ha una rapida produzione di H₂, ma anche una veloce produzione di acido, fino a livelli inibitori, che distruggono simultaneamente la capacità tampone. Come risultato, i batteri non riescono ad adattarsi ad un rapido cambiamento dell'ambiente e si impoveriscono. Invece, in caso di pH iniziale inferiore, i batteri producono H₂ gradualmente, con un tasso moderato, per una lunga durata. I livelli di acido prodotto non sono sufficienti per causare una drastica riduzione della produzione: gli H₂ produttori potrebbero resistere più a lungo in un ambiente caratterizzato da un valore di pH di circa 5,5. [83]

Temperatura

La temperatura influenza la crescita microbica, i percorsi metabolici e l'attività enzimatica, e, per questo, è considerata come uno dei più importanti parametri che possono influire sia sulla resa di produzione di H₂ sia sul metabolismo microbico in colture miste. L'effetto della temperatura sulla produzione di idrogeno può essere spiegato termodinamicamente, considerando i cambiamenti nell'energia libera di Gibb (ΔG°) e nell'entalpia standard (ΔH°) durante la conversione di glucosio in acetato e assumendo una resa teorica di 4 mol_{H₂}/mol_{glucosio}.



Le variazioni nell'energia libera di Gibb e nell'entalpia della reazione indicano che la reazione si verificherebbe spontaneamente in natura ($\Delta G^\circ < 0$) e che essa sia endotermica ($\Delta H^\circ > 0$). L'equazione di Van't Hoff può essere adoperata per spiegare l'effetto della temperatura sulla costante di equilibrio.

$$\ln\left(\frac{K_1}{K_2}\right) = \frac{-\Delta H^\circ}{R \cdot \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}$$

$$\frac{K_1}{K_2} = \frac{[\text{H}_2]_1^4 \cdot [\text{CO}_2]_1^2 \cdot [\text{CH}_3\text{COOH}]_1^2}{[\text{H}_2]_2^4 \cdot [\text{CO}_2]_2^2 \cdot [\text{CH}_3\text{COOH}]_2^2}$$

Con l'aumento della temperatura, la costante di equilibrio cinetico aumenta, poiché la reazione è endotermica. Quindi, incrementando la temperatura della fermentazione del

glucosio, e mantenendo costante la concentrazione del reagente, teoricamente la produzione di H₂ si rafforzerebbe. [83]

Differenti range di temperatura (mesofilo, cioè 25-40 °C, termofilo, cioè 40-65 °C, e termofilo estremo, >65 °C) sono stati studiati, in modo da determinarne gli effetti sulla produzione di bioidrogeno. In realtà alcuni batteri potrebbero adattarsi e sopravvivere a temperature inferiori: alcuni ricercatori hanno scoperto che H₂ potrebbe essere prodotto tramite siero in condizioni psicrofile (20 °C), ma, comunque, la bassa resa di produzione di H₂ ne riduce l'applicazione su larga scala.

Le rese di H₂ dipendono dalla temperatura, poiché essa influenza il tasso di idrolisi. La differenza tra le temperature operative ottimali è dovuta alla differente dimensione della frazione di composti facilmente biodegradabili, presenti nel substrato in alimento, e ai diversi tipi di inoculo utilizzati. [27] Biomasse, quali i residui agricoli, richiedono un'elevata temperatura per poter conseguire delle più alte rese di produzione di H₂, poiché è necessaria una migliore idrolisi dei composti lignocellulosici. Analogamente, le temperature termofile sono preferibili in caso di dark fermentation di rifiuti alimentari. Invece, nel caso di substrati facilmente biodegradabili, un'ottimale resa di H₂ è conseguibile in condizioni mesofile. [27] Infatti, Azbar et al. [9] hanno investigato l'effetto della temperatura sulla produzione di H₂ da siero e hanno rilevato che le rese di produzione di biogas e di H₂ siano migliori nel caso di condizioni mesofile (36 °C), piuttosto che in condizioni termofile (55 °C), poiché in condizioni termofile l'acido propionico viene prodotto in quantità molto maggiore. In un altro studio, Wang e Wan [98] hanno conseguito la massima efficienza di degradazione del substrato e i massimi tasso e resa di produzione di H₂ a 37,8 °C, durante una dark fermentation tramite glucosio.

Hawkes et al. [34] hanno investigato sulla dark fermentation in condizioni mesofile, trovando che in caso di mesofilia occorre lavorare con un pH compreso tra 4,5 e 6,7 e con un HRT che va da alcune ore a 3 giorni, in dipendenza dal substrato. Inoltre hanno affermato che lavorare con alte concentrazioni di substrato potrebbe migliorare l'efficienza del processo mesofilo, ma potrebbe anche comportare inibizione da acido butirrico e altri prodotti.

Invece, Kargi et al. [39] hanno affermato che la produzione di H₂ da siero in condizioni termofile, sia migliore in caso di una più bassa concentrazione di substrato e di simultanea rimozione di VFA. Nel 2012, Ngo et al. [65], hanno conseguito una resa di 32,1±1,6 mmolH₂/L, utilizzando i batteri strettamente termofili *Thermotoga neapolitana*, in un processo di produzione fermentativa di idrogeno da xilosio.

La Tabella 3.7 riassume diversi studi riguardanti l'effetto della temperatura sulla produzione fermentativa di idrogeno.

Tabella 3.7 – Effetto della temperatura sulla produzione fermentativa di idrogeno. (Sinha, Pandey, 2011)

Inoculum	Substrate	Temperature (°C)		Yield of hydrogen
		Range studied	Optimal	
<i>Citrobacter</i> CDN1	Glucose	27–40	30	2.1 mol/mol glucose
<i>Ethanoligenes harbinense</i> YUAN-3	Glucose	20–44	37	1.34 mol/mol glucose
Anaerobic sludge	Glucose	25–55	40	275.1 ml/g glucose
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> PSU-2	Sucrose	40–80	60	2.53 mol/mol hexose
Municipal sewage sludge	Sucrose	30–55	40	3.88 mol/mol sucrose
Municipal sewage sludge	Starch	37–55	55	1.44 mmol/g starch
Cow dung	Cow dung	37–75	60	743 ml/kg cow dung
Anaerobic digester sludge	Organic waste	37–55	55	360 ml/g VS

Valori di tassi di produzione più elevati sono stati ottenuti a temperature maggiori, soprattutto perché la fermentazione sopra i 37 °C non solo inibisce l'attività dei consumatori di H₂, ma inoltre sopprime la crescita di batteri produttori di lattato. Comunque, alcuni esperimenti hanno mostrato un tasso maggiore in condizioni mesofile. Il *Citrobacter* CDN1 produce al meglio a 30 °C, così come il *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* ATCC 27021. Il motivo di questo comportamento è correlato al fatto che l'alta temperatura possa indurre una denaturazione termica delle proteine che incidono sull'attività batterica. [83] Infatti, Lee et al. [47], analizzando l'effetto della temperatura sulla produzione di H₂ in un CIGSB (*carrier induced granular sludge bed bioreactor*), hanno osservato che, incrementando la temperatura da 35 a 45 °C, si potrebbe avere un'inibizione della crescita cellulare o della formazione di fango granulare, principalmente a causa della denaturazione degli enzimi essenziali al metabolismo, e una diminuzione della produzione di polimeri extracellulari.

3.5.3 Pressione parziale dell'idrogeno

La pressione parziale dell'idrogeno può influenzare la produzione di bioidrogeno attraverso dark fermentation, poiché una pressione parziale inferiore in testa al reattore faciliterebbe il trasferimento dell'idrogeno dallo stato liquido a quello gassoso.

Durante un processo fermentativo, l'idrogenasi è coinvolta in un processo reversibile di ossidazione/riduzione della ferredoxina. Se la concentrazione di idrogeno in fase liquida aumentasse, l'ossidazione della ferredoxina sarebbe sfavorita, e, così, si verificherebbe la riduzione della ferredoxina, diminuendo la produzione di H₂.

Lee et al. [47] hanno studiato l'effetto provocato sulla produzione di H₂ in un CSTR, da parte di una diminuzione della pressione parziale, scoprendo che essa potrebbe portare a un miglioramento nella produzione di H₂: ad un HRT di 6 h, essi hanno conseguito la resa

ottimale di H_2 ($4,5 \text{ mol}_{H_2}/\text{mol}_{\text{saccarosio}}$) e un'efficienza di produzione di idrogeno del 56,2 %. Analogamente, la riduzione della pressione da 760 mmHg a 380 mmHg ha permesso a Mandal et al. [58] di conseguire una resa di produzione di H_2 migliore.

Jung et al. [36] hanno descritto alcune strategie per rimuovere l'idrogeno disciolto dal mixed liquor, tra cui evitare la supersaturazione causata da una forte miscelazione, aerazione con N_2 e CO_2 e applicazione di membrane permeabili all'idrogeno. Allo stesso modo, la pressione parziale dell'idrogeno potrebbe essere ridotta direttamente, diminuendo la pressione di lavoro nel reattore, usando una pompa da vuoto. Tuttavia, l'utilizzo di pompe da vuoto incrementa il costo del processo, mentre l'aerazione con N_2 e CO_2 può rendere difficile il recupero di H_2 , a causa della diluizione del flusso di H_2 . [27]

3.5.4 Organic Loading Rate (OLR)

È noto che più elevate concentrazioni di substrato potrebbero innalzare l'efficienza di produzione di bioidrogeno, ma inibizioni del substrato o del prodotto si verificherebbero nel caso in cui il substrato/carico organico ecceda un certo livello di soglia. Inoltre, non è stata individuata una concentrazione di substrato ottimale per la fermentazione di substrati differenti per produrre bioidrogeno. [50] L'OLR può essere controllato sia incrementando la concentrazione di substrato sia diminuendo l'HRT. In genere l'accrescimento della concentrazione di substrato e dell'OLR comporta un aumento del tasso di produzione di H_2 in sistemi in continuo, alimentati con acque reflue. Lin e Lay [50] hanno affermato che il massimo valore del tasso di produzione di H_2 (362 L/L/d) fosse stato ottenuto ad un HRT di 0,5 h e con un OLR di $1920 \text{ g}_{\text{COD}}/\text{L/d}$, lavorando in un reattore CSABR (*Continuously-Stirred-Anaerobic Bioreactor*) ad una concentrazione di saccarosio di $40 \text{ g}_{\text{COD}}/\text{L}$.

In contrasto con quel che concerne il tasso di produzione, si è osservato che, a più alti OLR, si ha una riduzione della resa di idrogeno. Questo è probabilmente dovuto al fatto che, in caso di elevati OLR, si ha uno spostamento delle vie metaboliche verso la fase solventogenica, la quale limita la produzione di bioidrogeno. [50] Wu et al. [101] hanno scoperto che un elevato OLR conduca verso la produzione di propionato e di etanolo.

3.5.5 Nutrienti e oligoelementi

Durante i processi di fermentazione i microrganismi richiedono nutrienti per l'attività batterica e per la crescita. Così, nutrienti, quali l'azoto, il fosfato, ioni metallici e altri micronutrienti, sono richiesti nei processi fermentativi per le attività enzimatiche e per la crescita della biomassa, la quale incide sulla produzione di H_2 . Una biomassa ricca di carboidrati, come gli scarti del grano e gli effluenti di olio di palma, potrebbe essere carente

di nutrienti (quali l'azoto e il fosforo) o di minerali (come i metalli in tracce). Perciò, nutrienti o micronutrienti devono essere forniti come supplemento, per ottenere un'attività microbica ottimale. [50]

Azoto e Fosforo

L'azoto è molto importante per i produttori di idrogeno, poiché costituisce un'importante componente delle proteine, degli acidi nucleici e degli enzimi. Allo stesso modo, oltre all'azoto, anche il fosforo è importante, in quanto serve come elemento tampone nelle reazioni biochimiche. Ci sono, però, state delle discordanze riguardo ai rapporti ottimali del carbonio con l'azoto e con il fosforo.

Durante una dark fermentation termofila, tramite effluenti da frantoi per olio di palma (POME), O-Thong et al. [67] hanno mostrato come l'aggiunta di ferro ($257 \text{ mg}_{\text{Fe}^{2+}}/\text{L}$), l'aggiustamento del rapporto C/N da 95 a 74 (usando il peptone come fonte di azoto) e del rapporto C/P da 650 a 559 (usando $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), abbiano potuto migliorare la produzione di H_2 . Il tasso di produzione di idrogeno è aumentato del 60 %, mentre l'efficienza di rimozione del COD è migliorata da $35,5 \pm 9,8$ % a $62,2 \pm 2,8$ %, in confronto con l'utilizzo di POME senza aggiunta di nutrienti. Similmente, Argun et al. [7] hanno analizzato gli effetti dei rapporti C/N e C/P sulla resa di produzione di H_2 e sul tasso di produzione specifica di H_2 , nel caso di dark fermentation tramite una soluzione con polvere di grano e con l'aggiunta di azoto e fosforo. I risultati dello studio hanno mostrato che la più alta resa di produzione di H_2 ($281 \text{ NmL}_{\text{H}_2}/\text{g}_{\text{amido}}$) sia stata ottenuta con un rapporto C/N di 200 e un rapporto C/P di 1000. Lin e Lay [50] hanno conseguito un incremento di resa e tasso di produzione di H_2 , rispettivamente del 500 % e dell'80 %, con un rapporto C/N di 47, rispetto al caso di assenza di azoto. Analogamente, O-Thong et al. [67] hanno ottenuto una produzione ottimale di idrogeno e un'ottimale rimozione del COD con un rapporto C/N di 74 e C/P di 559.

Infine, in svariati studi è stata utilizzata l'integrazione di co-substrati quale strategia per mantenere un appropriato rapporto C/N, tra essi si possono citare l'uso di letame di maiale come fonte di azoto nella co-fermentazione tramite rifiuti vegetali e l'uso dell'amido di manioca nella co-fermentazione con le microalghe *Chlorella pyrenoidosa*. [83]

Ioni metallici e micronutrienti

Elevate concentrazioni di ioni metallici comportano effetti inibitori sui produttori di idrogeno, ma, la presenza in tracce di alcuni di essi migliora la prestazione del reattore. Si è osservato di come ferro e zolfo incidano molto sulle funzioni delle proteine, essendo portatori di elettroni ed essendo coinvolti nell'ossidazione del piruvato in acetil-CoA, CO_2 e

H₂. Il ferro potrebbe anche dare vita ad un'alterazione metabolica ed essere coinvolto in FeS e non FeS-proteine che operano nell'idrogenasi. Il valore ottimale di ferro per la produzione di H₂ differisce in base al tipo di refluo e questa variazione è probabilmente associata alla composizione del substrato e al tipo di microrganismi. [83] Azbar et al. [10] hanno scoperto che il valore ottimale di concentrazione del ferro è compreso tra 50-150 mg/L, per produrre H₂ da siero.

Visto che il nichel costituisce una componente fondamentale della NiFe-idrogenasi, potrebbe incidere sulla produzione fermentativa di H₂, influenzando l'attività della NiFe-idrogenasi. A concentrazioni troppo elevate, il nichel può inibire l'attività della NiFe-idrogenasi e, di conseguenza, la produzione di H₂ che ne deriva. Wang e Wan [97] hanno rilevato, usando colture miste, che, incrementando la concentrazione di Ni²⁺ da 0 a 0,1 mg/L, il tasso produzione di H₂ cresceva, ma diminuiva con un successivo incremento di Ni²⁺ da 0,2 a 50 mg/L.

La richiesta di magnesio da parte dei microrganismi è principalmente dovuta alla specifica richiesta dei ribosomi. Inoltre il magnesio funziona da cofattore per gli enzimi ed è uno dei costituenti delle pareti cellulari e delle membrane. In uno studio condotto da Alshiyab et al. [2] si è scoperto come il tasso di produzione di idrogeno e la resa venissero migliorati con la fornitura di MgSO₄·7H₂O, in un range tra 50 e 500 mg/L, ma che diminuissero in caso di successivi incrementi.

Inibizione causata da metalli pesanti

Metalli pesanti tossici, quali il cadmio (Cd), il cromo (Cr), lo zinco (Zn), il rame (Cu), il nichel (Ni), e il piombo (Pb), che possono essere reperiti in rifiuti industriali e comunali, possono stravolgere o addirittura impedire il funzionamento dei reattori anaerobici. Altas et al. [3] hanno analizzato l'effetto inibente di metalli pesanti sulla produzione di idrogeno con fango anaerobico granulare. Il livello di tossicità dei singoli metalli è stato, in ordine decrescente: Zn (7,5 mg/L) > Cr (27 mg/L) > Ni (35 mg/L) ≈ Cd (36 mg/L).

3.6. Prospetti futuri

3.6.1. Solid state dark fermentation (SSDF)

I reattori anaerobici sono generalmente classificati in processi umidi (<10 % TS), semi-secchi (10-20 % TS) e secchi (>20 %). Accrescendo il contenuto di TS (solidi totali), i processi di dark fermentation possono funzionare con un alto OLR e con una minore aggiunta di acqua. Questo offrirebbe alcuni vantaggi, come un minore volume del reattore, una più facile maneggevolezza dei residui nel digestato e una maggiore semplicità dal punto di vista tecnico. D'altra parte, gli svantaggi della SSDF (*Solid State Dark Fermentation*) sono rappresentati dalle minori rese di H₂ conseguibili, a causa di limitazioni nel trasferimento dell'energia e della massa, che incidono sulla formazione dei prodotti. [27]

Usando rifiuti agro-industriali (70 % di bagassa di canna da zucchero, 15 % dal processo di sbucciatura dell'ananas e 15 % di rifiuti di fango attivo) e sotto condizioni mesofile, Robledo-Narváez et al. [74] hanno scoperto una riduzione nella resa di H₂ (3 mmol_{H₂}/g_{TS}), in corrispondenza di un contenuto di TS più elevato del 18 %, testando un range di TS compreso tra 15 % e 35 %. Risultati simili sono stati ottenuti nelle sperimentazioni di Valdez-vazquez e Poggi-Varaldo [93], in cui le più elevate produttività e resa di H₂ (463,7 NmL/kg/d e 54,8 N mL/g_{V_Srimosso}, rispettivamente) sono state conseguite a una percentuale di TS del 20,9 %, usando rifiuti solidi organici (40 % di carta e 60 % di cibo), testando un range di percentuali di TS compreso tra 20,9 % e 35,1 %. Allo stesso modo, Motte et al. [62] hanno definito 19 % come percentuale di TS limite, per poter conseguire migliori prestazioni nella produzione di H₂, attraverso dark fermentation di paglia del grano, poiché i percorsi metabolici si sposterebbero verso la formazione dell'acido lattico in caso di più alti contenuti di TS.

Quindi, sono necessarie ulteriori ricerche sulla SSDF, con l'obiettivo di chiarire quali siano i meccanismi coinvolti durante un processo di dark fermentation ad elevati contenuti di solidi.

3.6.2. Utilizzo dei sottoprodotti

La bassa resa del processo e la conversione incompleta della sostanza organica costituiscono due delle maggiori difficoltà nella produzione di idrogeno attraverso dark fermentation a livello commerciale. Inoltre, i residui della dark fermentation sono principalmente composti da acidi grassi volatili (VFA), che consistono nel principale sottoprodotto della dark fermentation, e che devono essere utilizzati per poter raggiungere la conversione completa della sostanza organica.

I sistemi a due stadi integrano la trasformazione dei carboidrati in acidi organici, nel primo stadio (dark fermentation), e la trasformazione dei sottoprodotti, nel secondo stadio, in H₂ (fotofermentazione, celle bioelettrochimiche) o in CH₄ (digestione anaerobica). La Tabella 3.8 riporta alcuni esempi di integrazione del processo di dark fermentation con alcuni post-trattamenti.

Tabella 3.8 – Esempi di condizioni operative e di prestazioni in sistemi integranti la dark fermentation con altri processi. (Ghimire et al., 2015)

First stage: DF							Second stage: Photofermentation						
Substrate type	Microbial inoculum	pH	T (°C)	HRT days	Max. H ₂ prod. rate	Max. H ₂ yield	Dominant end products	Process & microbial inoculum	pH	T (°C)	HRT days	Max. biogas prod. rate	Max. H ₂ yield
Sucrose	<i>Clostridium pasteurianum</i>	7	37	-	-	3.85 mol H ₂ /mol sucrose	Butyrate and acetate	<i>Rhodospseudomonas palustris</i> WPI-5	7.1	32	96 h	25.2 mL H ₂ /L/h	4.03 mol H ₂ /mol sucrose
Sucrose	Heat treated cattle dung and sludge from biogas plant	6	38	Batch	360 mL H ₂ /L/h	3.67 mol H ₂ /mol sucrose	Butyrate and acetate	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> SH2C	7	30	Batch	-	4.06 mol H ₂ /mol sucrose
Acid hydrolyzed sugarcane bagasse	<i>Enterobacter aerogenes</i> MTCC 2822	6.8	38	Batch	1000 mL H ₂ /L	-	Butyrate and acetate	<i>Rhodospseudomonas</i> BBU 01	6.8	34	Batch	755 mL/L	-
First stage: DF							Second stage: AD						
Substrate type	Microbial inoculum	pH	T (°C)	SRT days	Max. H ₂ prod. rate	Max. H ₂ yield	Dominant end products	Process & microbial inoculum	pH	T (°C)	SRT days	Max. CH ₄ prod. rate	Max. CH ₄ yield
OFMSW	Heat treated sludge from biogas plant	5.2	37	2	640 mL H ₂ /d	43 mL H ₂ /g VS _{added}	Acetate and butyrate	Sludge from biogas plant	7.5	37	15	7500 mL CH ₄ /d	500 mL CH ₄ /g VS _{added}
Food waste	Indigenous microbial cultures from food waste	5.2-5.8	40	6.66	-	65 mL H ₂ /g VS	Acetate and butyrate	Anaerobic granular sludge from UASB	6.8	40	26.67	-	546 mL CH ₄ /g VS
Micro algae (<i>Chlorella vulgaris</i>)	<i>Clostridium thermocellum</i>	-	55	Batch	-	53.4 mL H ₂ /g VS	Acetate and butyrate	Anaerobic granular sludge from ASBR	-	55	Batch	22.38 mL CH ₄ g VS d	320.6 mL CH ₄ /g VS
First stage: DF							Second stage: Bioelectrochemical systems						
Substrate type	Microbial inoculum	pH	T (°C)	HRT days	Max. H ₂ prod. rate	Max. H ₂ yield	Dominant end products	Process & microbial inoculum	pH	T (°C)	HRT days	Max. H ₂ prod. rate	Max. H ₂ yield
Molasses	-	-	-	Batch	700 mL H ₂ /L/d	0.27 mol H ₂ /mol COD	Ethanol, acetic and butyric acid	Domestic wastewater	6.7-7.0	25	Batch	1410 mL H ₂ /L/d	-
Corn stover	<i>Clostridium thermocellum</i>	6.8	50	Batch	0.25 L H ₂ /L/d	1.67 mol H ₂ /mol glucose	Acetic acid and ethanol	Inoculum from microbial fuel cell wastewater	7.3	-	Batch	1 ± 0.19 L/L/d	750 ± 180 mL/g COD
Corn stalk	Microwave irradiation pre-treated cow dung	7.0	36	Batch	1.73 m ³ H ₂ /m ³ d	129.8 mL H ₂ /g corn stalk	Acetate, butyrate, propionate, ethanol	Spent dark fermentation medium (single chambered cell)	7.0	36	Batch	3.43 ± 0.12 m ³ H ₂ /m ³ d	257.3 mL H ₂ /g corn stalk

Studi sull'accoppiamento Dark fermentation – fotofermentazione e Dark fermentation - MEC

La capacità dei *Purple non sulfur bacteria* di convertire gli acidi organici in bioidrogeno rende la fotofermentazione un buon post-trattamento per la produzione di idrogeno dagli effluenti della dark fermentation. [27]

Nath et al. [63] hanno studiato la combinazione tra dark fermentation e fotofermentazione, usando il glucosio come substrato. La dark fermentation è stata realizzata grazie ai ceppi di *Enterobacter cloacae* DM11, mentre la seguente fotofermentazione è stata realizzata dai ceppi di *Rhodospseudomonas sphaeroides* O.U.001, degradando l'effluente dalla dark fermentation, il quale conteneva principalmente acido acetico. La resa di H₂ ottenuta è stata più elevata rispetto al caso di un singolo sistema di produzione di idrogeno: 1,86 mol_{H₂}/mol_{glucosio} in dark fermentation, a cui si sono aggiunte 1,5-1,72 mol_{H₂}/mol_{glucosio}

ottenute attraverso la fotofermentazione. Sempre utilizzando gli effluenti di una dark fermentation del glucosio attraverso una fotofermentazione, Su et al. [86] hanno ottenuto una resa di $4,16 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{glucosio}}$ (aumentando la resa totale a $5,48 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{glucosio}}$).

Per la diffusione di post-trattamenti della dark fermentation consistenti in sistemi MEC, sono ancora necessari studi che ne analizzino le performance a lungo termine. Lalaurette et al. [46] hanno operato con un processo a due stadi, combinando la dark fermentation (con la cellulosa come substrato) con dei sistemi MEC per produrre idrogeno. Questo ha permesso di accrescere la resa totale di produzione di H_2 fino a $9,95 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{glucosio}}$, mentre dopo la sola dark fermentation della cellulosa la resa consisteva in $1,64 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{glucosio}}$. Analogamente, Liu et al. [53] hanno usato gli acidi volatili, accumulatisi durante la fermentazione di fango attivo, come fonte di carbonio per la produzione di idrogeno in un sistema MEC, caratterizzato da una resa di H_2 e da un tasso di produzione rispettivamente di $1,2 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{COD}}$ e $120 \text{ mL}_{\text{H}_2}/\text{g}_{\text{VSS}}/\text{d}$. I risultati dell'analisi dei prodotti finali dell'elettroidrogenesi hanno mostrato che più del 90 % dell'acetato e del propionato siano stati convertiti in idrogeno, mentre la conversione dell'n-butirato e dell'n-valerato è stata inferiore (<20 %). Wang et al. [96] hanno investigato la produzione di idrogeno attraverso cellulosa, utilizzando un'integrazione tra dark fermentation, MFC e MEC. La produzione totale di idrogeno è stata aumentata del 41 %, rispetto alla sola produzione ottenuta tramite dark fermentation.

Accoppiamento Dark fermentation – digestione anaerobica

I processi a due stadi, combinanti la produzione di bioidrogeno, nel primo stadio, e una digestione anaerobica, nel secondo stadio, non solo accrescono la sostenibilità del processo, ma anche garantiscono il completo trattamento del rifiuto organico. In questo campo sono state esaminate diverse configurazioni.

Antonopoulou et al. [4] hanno studiato la degradazione a due stadi del siero, a una temperatura di $35 \text{ }^\circ\text{C}$, con una configurazione composta da un CSTR e un reattore PABR (*periodic anaerobic baffled reactor*). Il CSTR lavorava ad un HRT di 24 h, mentre il PABR è stato fatto operare con HRT di 20, 10 e 4,4 giorni. La rimozione del COD ottenuta nel CSTR era inferiore al 5 % e il contenuto di H_2 nel biogas in condizioni stazionarie era del 29,3 %, mentre la resa di produzione di H_2 era di $0,041 \text{ m}^3_{\text{H}_2}/\text{kg}_{\text{COD}}$, inferiore ai valori teoricamente ottenibili a causa del consumo di H_2 da parte di batteri omoacetogeni e della conversione di parte della sostanza organica in acidi acetico e butirrico. Nel PABR è stata ottenuta una rimozione di COD del 99 %, operando con HRT di 20 e 10 giorni, e del 94 % con un HRT di 4,4 giorni (per via di un accumulo di acido propionico), mentre il contenuto di CH_4 si è

mantenuto superiore al 70 % in ogni condizione. Conseguentemente, i ricercatori hanno concluso che la produzione di H_2 potrebbe essere efficacemente accoppiata con quella di CH_4 e che il siero consista in una materia prima ideale per la produzione di biocombustibile. Venetsaneas et al. [95] hanno lavorato con due CSTR sequenziali a 35 °C, per produrre H_2 e CH_4 da siero di latte ad alta resistenza, con una concentrazione di 60 g_{COD}/L . L'HRT era di 24 h nel reattore CSTR per produrre H_2 , mentre era di 20 giorni in quello produttore metano. Nel primo bioreattore il consumo totale di carboidrati in equivalenti di glucosio è stato dell'86 % e la resa di produzione di H_2 ottenuta era di 0,052 $m^3_{H_2}/kg_{COD}$, mentre è stata raggiunta un'efficienza di rimozione del COD del 95,3 %, dopo la degradazione a due stadi. Dunque, vista la recente popolarità dei sistemi a due stadi di digestione anaerobica, volti a trattare acque reflue ad alta resistenza o solidi concentrati, il primo dei due stadi potrebbe essere modificato in modo da conseguire produzione di idrogeno. Inoltre, il processo di dark fermentation potrebbe essere visto come un pretrattamento, nel caso che il rifiuto organico di interesse necessiti di una completa stabilizzazione. [27]

Altri utilizzi dei sottoprodotti

Gli acidi grassi volatili e altre fonti di riduzione del carbonio possono essere utilizzati, oltre che nella produzione di idrogeno o metano attraverso processi biologici, in varie applicazioni: rimozione dei nutrienti biologici dalle acque reflue, riduzione di solfuri e solfati, produzione di biopolimeri (quali il poliidrossibutirrato) e produzione di lipidi batterici.

Lim et al. [49] hanno analizzato l'uso degli acidi grassi volatili, derivanti da rifiuti alimentari, come fonte di carbonio nella rimozione di azoto e fosforo da acque reflue municipali, in un reattore batch sequenziale (SBR). Allo stesso modo, Elefsiniotis et al. [20] hanno studiato il processo di denitrificazione (20-200 mg_{NO_3-N}/L), utilizzando VFA, generati durante la digestione anaerobica di acque reflue, industriali e municipali, ricche di amido, come fonte di carbonio in reattori batch.

Mentre nel 2016, Yousuf et al. [104] hanno studiato il recupero di acidi carbossilici, prodotti durante dark fermentation, attraverso adsorbimento su carbonio attivo e Amberlite IRA-67, ottenendo una percentuale di adsorbimento degli acidi, rispettivamente, del 63 % e del 74 %.

Ntaikou et al. [66] hanno indagato riguardo la produzione combinata di bioidrogeno e di biopolimeri attraverso la dark fermentation di acque reflue da frantoi dell'olio d'oliva, e, poi, attraverso l'uso degli effluenti dalla dark fermentation, contenenti principalmente VFA, in un SBR, in cui erano presenti colture batteriche volte a produrre poliidrossialcanoati (PHA).

Tuna et al. [90] hanno usato gli acidi grassi volatili provenienti da una dark fermentation per produrre idrogeno attraverso elettrolisi. L'idrogeno è stato generato applicando un basso voltaggio, nel range di 1-3 V in corrente continua, su effluenti di polvere di grano, contenenti differenti concentrazioni di VFA. La massima efficienza energetica (56 %) è stata registrata

applicando un voltaggio di 2 V, a una concentrazione di VFA di 10,85 g/L. Nel 2016, anche Argun et al. [6] hanno investigato sul possibile accoppiamento dark fermentation – elettroidrolisi, in una sperimentazione concernente la produzione di idrogeno da polpa di pesca. Durante la dark fermentation, la massima resa di idrogeno è stata di 460,93 mL_{H₂}/g_{COD}, mentre il massimo tasso di produzione di idrogeno è stato di 2,44 mL_{H₂}/h. Tramite l'elettroidrolisi sono poi stati liberati gli ioni di idrogeno intrappolati negli effluenti dalla dark fermentation, tra gli acidi grassi volatili, producendo 30,09 mL_{H₂}/mL_{reattore} in 310 h. Sempre nel 2016 Argun et al. [8] hanno effettuato il medesimo esperimento, ma utilizzando rifiuti cartacei, ottenendo una produzione di idrogeno totale simile a quella conseguita utilizzando polpa di pesca (30,12 mL_{H₂}/mL_{reattore}).

In anni recenti, l'associazione tra dark fermentation e la coltivazione eterotrofa di microalghe (HCM) è stata indicata quale promettente approccio sostenibile per la produzione di biocombustibili liquidi e gassosi. Turon et al. [91] nel 2016 hanno condotto uno studio sull'utilizzo di effluenti da dark fermentation come substrato nella crescita delle microalghe, riscontrando come la crescita di microalghe sia favorita attraverso effluenti contenenti un'alta concentrazione di acetato (>3 g/L) e con un elevato rapporto acetato/butirrato (>2,5).

3.6.3 Produzione di biohythane

La digestione anaerobica di un substrato organico è composta da una serie di reazioni biochimiche il cui prodotto finale è un biogas formato per il 50–70 % da metano e per la restante parte da anidride carbonica. Nel corso della degradazione del substrato si assiste anche alla produzione di idrogeno. Separando le due fasi di produzione di idrogeno e metano e miscelando successivamente i due prodotti secondo precise concentrazioni, si ottiene un combustibile di nuova generazione, noto come *biohythane* (o bioidrometano), avente un PCI maggiore di quello del comune biogas. L'utilizzo di questa miscela gassosa in motori a combustione interna consente di raggiungere rendimenti di conversione dell'energia mediamente più elevati rispetto a quelli ottenibili con il solo metano, grazie alla presenza dell'idrogeno, il cui minor punto di fiamma consente di ottenere una maggior completezza nella combustione e l'eliminazione di alcuni inquinanti tipici di processi di combustione incompleta.

Le caratteristiche qualitative del siero di latte e le prestazioni energetiche ottenibili con un processo di digestione anaerobica ne fanno un substrato interessante per la produzione di *biohythane* tramite un processo in due fasi. L'iniziale fase di dark fermentation consente la fermentazione iniziale del substrato organico e la degradazione del lattosio presente in un biogas, formato da idrogeno e CO₂, e acidi, principalmente acido acetico e butirrico, che sono

successivamente inviati al seguente reattore di digestione anaerobica per la conversione in metano.

3.7 Conclusioni

La dark fermentation possiede un eccellente potenziale futuro per la produzione di bioidrogeno, in quanto la biomassa rinnovabile può essere utilizzata come materia prima e l'integrazione con altri sistemi potrebbe accrescere la resa di produzione di H_2 e la fattibilità economica.

Ogni fonte di reflui caseari possiede delle proprie caratteristiche inquinanti e richiede considerazioni specifiche riguardanti l'ottimizzazione dei parametri ambientali e delle condizioni di lavoro nel bioreattore, in modo da poter conseguire un trattamento efficiente e una buona produzione di bioenergia. Un refluo caseario ricco di carboidrati possiede un gran potenziale per quanto concerne la produzione di energia. I metodi di arricchimento dell'inoculo possono poi migliorare la resa di produzione di H_2 , e anche il pretrattamento dei substrati potrebbe aumentare la resa, incrementando la biodegradabilità dei substrati.

Tra i sistemi a un solo stadio, il reattore CSTR ha permesso di ottenere la massima resa di produzione di H_2 e il massimo tasso di produzione volumetrica rispetto agli altri reattori.

Le considerazioni economiche e la produzione su scala industriale raccomandano un processo in continuo. Dunque, maggiori ricerche sulla dark fermentation in continuo devono essere effettuate, per dimostrare la fattibilità di funzionamento a lungo termine dei processi in continuo.

Lo sviluppo della dark fermentation su scala industriale è però limitato dalla sua bassa resa di produzione di H_2 , rispetto alla resa massima teorica (4 moli di H_2 per mole di esoso) e ai costi stimati ad essa associati.

L'uso dei residui provenienti dalla dark fermentation in una fotofermentazione e/o in sistemi elettrochimici, come stadio secondario, potrebbe aprire la strada verso sistemi su grande scala per produrre idrogeno in maniera sostenibile.

Infine, la digestione anaerobica è richiesta per ottenere una successiva stabilizzazione dei residui generati dai processi a monte. I futuri design e configurazioni dei processi di dark fermentation su scala industriale saranno simili a quelli dei processi di digestione anaerobica, con alcune modifiche nei parametri di processo. Gli impianti esistenti a due stadi di produzione del metano possono essere modificati per la dark fermentation, mentre la *solid state dark fermentation* introduce nuove opportunità per la produzione di bioidrogeno da biomassa rinnovabile.

CAPITOLO 4

MATERIALI E METODI

4.1 Impostazione e design

4.1.1 Pianificazione dell'attività sperimentale

L'attività sperimentale ha riguardato la gestione e il monitoraggio di un impianto pilota da laboratorio CSTR alimentato in continuo per la produzione di idrogeno da siero di latte, mediante il processo di dark fermentation. La Tabella 4.1 riassume i principali parametri operativi adottati durante la sperimentazione. Alcuni sono stati mantenuti costanti, mentre altri (HRT e concentrazione di COD in ingresso) sono stati variati tra una fase e la successiva. I valori operativi di temperatura e pH sono stati impostati sulla base dei principali riferimenti presenti in letteratura, in particolare si è scelto di condurre il processo in condizioni mesofile, mentre il pH a 5,5 rappresenta una soluzione di compromesso: pH prossimi alla neutralità (>6) favorirebbero infatti la metanogenesi, mentre valori di pH inferiori a 5, se da un lato portano alla completa inibizione dell'attività metanigena, dall'altro favoriscono la solventogenesi e l'accumulo di VFA indissociati, con contestuale minor produzione di idrogeno (vedi paragrafo 3.5.2). [34]

Tabella 4.1 – Principali parametri durante il processo in continuo.

PARAMETRO	VALORE	UNITÀ DI MISURA
Volume mixed liquor	3	L
Velocità di rotazione	200	RPM
pH	5,5	-
Temperatura	36	°C
HRT	6 - 9 -12	h
Portata in ingresso	8	L/d
Concentrazione di COD in ingresso	10 - 20 - 30	g _{cod} /L

Per una maggiore chiarezza il lavoro può essere riassunto in 5 fasi sperimentali successive, come riportato in Tabella 4.2. L'attività di monitoraggio di ogni fase ha previsto l'analisi della composizione e produzione volumetrica di biogas, oltre al monitoraggio dei principali parametri di processo (HRT, pH, temperatura) e delle principali caratteristiche dell'effluente (concentrazione della biomassa VSS, concentrazione di COD, VFA, azoto totale TKN, azoto ammoniacale N-NH₄⁺). Le analisi sono state effettuate anche per l'alimento solo saltuariamente, a scopo di controllo.

Tabella 4.2 – Fasi dell'attività sperimentale

FASE	DURATA	AVVIO	DESCRIZIONE
FASE 1	46 giorni	Reattore già in funzione	Gestione e monitoraggio dell'impianto pilota alimentato con 30 g _{cod} /L, al variare dell'HRT (12 h, 6 h e 9 h) e con presenza di granuli.
FASE 2A	31 giorni	Reattore già in funzione	Gestione e monitoraggio dell'impianto pilota alimentato con 20 g _{cod} /L, ad un HRT di 9 h e con presenza di granuli.
FASE 2B	67 giorni	Mixed liquor precedente, 2 h in batch	Gestione e monitoraggio dell'impianto pilota alimentato con 20 g _{cod} /L, ad un HRT di 9 h e in assenza di granuli.
FASE 3A	51 giorni	Nuovo alimento, 2 h in batch	Gestione e monitoraggio dell'impianto pilota alimentato con 10 g _{cod} /L, ad un HRT di 9 h e in assenza granuli + test sulla miscelazione.
FASE 3B	72 giorni	Nuovo alimento, 2 h in batch	Gestione e monitoraggio dell'impianto pilota alimentato con 10 g _{cod} /L, ad un HRT di 9 h e in assenza granuli.

La fase 1 ha avuto come obiettivo quello di testare la produzione idrogenica al variare dell'HRT, con una concentrazione costante di 30 g_{COD}/L in ingresso. Si è operato dapprima per 25 giorni con un HRT di 12 h, poi per 17 giorni con un HRT di 6 h e, infine per 5 giorni con un HRT di 9 h. La fase è iniziata quando il reattore era già stato avviato, così il primo giorno è stato necessario solamente variare la portata di pompaggio in ingresso, in modo che si ottenesse un HRT di 12 h. Già da prima che la fase iniziasse nel reattore si era registrata una spontanea crescita di granuli, i quali sono rimasti presenti durante tutta la durata della fase.

Nelle fasi successive si è voluto osservare la variazione della produzione idrogenica non più al variare dell'HRT, mantenuto costante a 9 h, bensì al variare della concentrazione di COD in ingresso.

Nella fase 2A si è analizzata la produzione da parte dei batteri alimentando il reattore con 20 g_{COD}/L. Anche in questa situazione si sono sempre osservati granuli all'interno del mixed liquor.

Nella fase 2B si è optato per riproporre le medesime condizioni operative della fase 2A, cercando però di evitare la formazione di granuli, la quale è sembrata essere causa di un peggioramento a livello prestazionale. Questa fase ha avuto inizio la mattina del 22 agosto, quando il reattore è stato riavviato (per la descrizione della procedura di avvio si veda il paragrafo 4.3.1) dopo due settimane di spegnimento, in corrispondenza chiusura estiva del laboratorio. È stato innanzitutto reimmesso nel reattore il mixed liquor contenente la biomassa, utilizzato in precedenza e conservato in una tanica in frigorifero, e si è operato in batch per qualche ora, prima di riattivare la modalità in continuo alle ore 13:00. Si è registrata inizialmente una leggera presenza di granuli, corrispondente a quella contenuta all'interno del mixed liquor riutilizzato, dopodiché si è registrata una formazione granulare molto blanda o del tutto assente.

Durante la fase 3A il reattore è stato riavviato operando due importanti novità. La prima ha riguardato il mixed liquor, in quanto si è deciso per il non riutilizzo del mixed liquor utilizzato in precedenza. Bensì si è optato per riempire il reattore con 3 L di alimento e, per favorire lo sviluppo della biomassa idrogenogena, si è operato in batch per 2 ore. La scelta di non riutilizzare il precedente mixed liquor è stata motivata dalla volontà di evitare completamente la formazione di granuli. La pulizia accurata del reattore e la creazione di un nuovo mixed liquor hanno comportato l'assenza di granuli per tutta la durata della fase. La seconda novità apportata ha riguardato la concentrazione di COD alimentata, in quanto si è optato per un passaggio da 20 g/L a 10 g/L. L'HRT è stato mantenuto a 9 h. Durante questa fase si sono inoltre effettuati tre test riguardanti la miscelazione, in cui, per differenti durate, si è provato ad alternare periodi di miscelazione a 200 RPM a periodi di assenza di miscelazione.

Nella fase 3B si è deciso di riproporre le stesse condizioni (stesse modalità di avvio e stesse condizioni operative) della fase 3A, sostanzialmente per due motivi:

- 1) le condizioni stabili sono state raggiunte soltanto al termine della fase 3A, a causa di problematiche legate alla pompa d'immissione dell'alimento e all'uso di siero di latte contaminato. Dunque si è voluto comprendere se quelle corrispondessero effettivamente alle condizioni stazionarie, nonché in quanto tempo esse potessero essere raggiunte, operando in condizioni ottimali;
- 2) soprattutto durante i periodi di normale funzionamento del sistema, nella fase 3A sono stati conseguiti degli ottimi risultati in termini di contenuto idrogenico, resa e produzione di idrogeno.

La Tabella 4.3 chiarisce le condizioni operative caratteristiche di ciascuna fase.

Tabella 4.3 – Parametri variabili tra le fasi.

COD_{in}	30 g_{cod}/L	20 g_{cod}/L	10 g_{cod}/L
HRT			
6 h	Fase 1		
9 h	Fase 1	Fase 2	Fase 3
12 h	Fase 1		

4.1.2 Monitoraggio del fermentatore

Per quanto riguarda il monitoraggio del processo biologico, è stato seguito un piano di analisi settimanale, calibrato in maniera tale da poter collezionare un numero sufficiente di dati, senza però disturbare eccessivamente l'attività di microrganismi presenti nel reattore. Le analisi eseguite (vedi paragrafo 4.3.3) hanno riguardato tutte le matrici presenti, e cioè il mixed liquor di reazione e il biogas prodotto.

La Tabella 4.4 illustra il piano di lavoro settimanale.

Tabella 4.4 – Piano di lavoro settimanale.

GESTIONE REATTORE		Lun	Mar	Mer	Gio	Ven
Calcolo portate	Alimento	X	X	X	X	X
	Effluente	X	X	X	X	X
	Base	X	X	X	X	X
Preparazione alimento		X		X		X
Manutenzione	Keller	X	X	X	X	X
	Tubi alimento/effluente	X				
Download dati	Keller	X	X	X	X	X
	Software Diaferm					X
Analisi tramite kit del mixed liquor	COD solubile	X		X		X
	TKN	X				X
	NH ₃	X				X
	VFA	X				X
Analisi solidi sospesi del mixed liquor	TSS	X		X		X
	VSS	X		X		X
Misura biogas	Composizione biogas	X	X	X	X	X
	Produzione biogas	X	X	X	X	X

Inoltre, saltuariamente si sono eseguite anche le seguenti operazioni:

- preparazione soluzione basica e soluzioni contenenti nutrienti (vedi paragrafi 4.2.3 e 4.2.4);
- analisi tramite kit di nitriti, nitrati, ortofosfato e alcalinità;
- analisi tramite kit dei metaboliti all'interno del siero di latte e dell'alimento;
- pulizia del reattore;
- sostituzione tubi per i pompaggi.

4.2 Materiali

4.2.1 L'impianto

L'impianto pilota (mostrato in Figura 4.1) è stato realizzato con l'obiettivo di ottenere la valorizzazione del siero di latte inviato dalla cooperativa PLAC di Cremona, attuando un processo di dark fermentation; esso è stato utilizzato anche in precedenti sperimentazioni ([28]).

Il bioreattore ha avuto come base di partenza un fermentatore fornito dalla casa produttrice svizzera Diachrom.



Figura 4.1 – Impianto pilota utilizzato per eseguire il processo di dark fermentation.

1) FREEZER

2) FRIGORIFERO, in cui viene conservata la tanica da 30 L contenente l'alimento al reattore.

3) POMPA DELL'ALIMENTO: pompa peristaltica di marca VELP, utilizzata per prelevare alimento ed immetterlo nel reattore.

4) UNITÀ D'INTERFACCIA (UNITÀ 1)

L'intero impianto viene controllato attraverso questo dispositivo, che costituisce perciò l'interfaccia tra il reattore e l'operatore e permette il controllo dei principali parametri di processo, quali il pH, la temperatura, il numero di giri dell'agitatore, la portata e il funzionamento delle pompe, tramite apposita pulsantiera. È dotata di uno schermo digitale su cui sono visualizzati i valori misurati dei parametri di processo. Su un display sono visualizzati i valori misurati di questi parametri.

L'impianto pilota si interfaccia con l'operatore anche tramite un software dedicato (vedi Figura 4.2), in grado di registrare tutti i principali parametri operativi e consentire la gestione automatizzata del reattore, in particolare per quanto riguarda il funzionamento delle pompe 1, 2, 3 e 4.

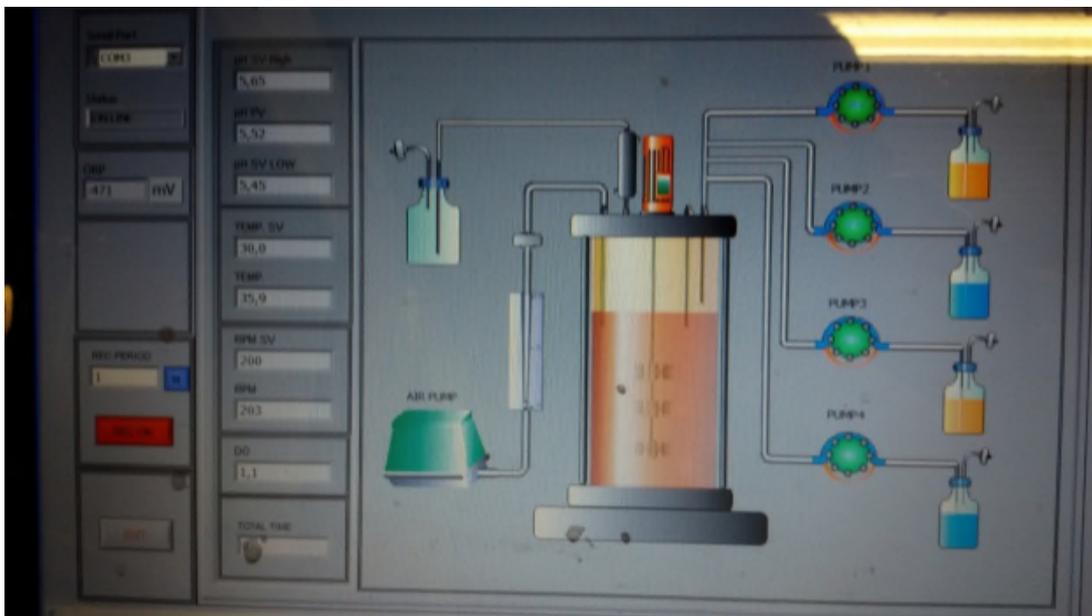


Figura 4.2 – Schermata principale del software Diaferm. Si possono distinguere a sinistra il pompaggio dell'aria e il sistema di sicurezza, al centro il reattore, e a destra le pompe peristaltiche (solo la 1 e la 4 sono state mantenute in funzione).

5) TASTO DI ATTIVAZIONE DELL'UNITÀ D'INTERFACCIA

6) POMPE PERISTALTICHE

Queste quattro pompe peristaltiche Verderflex vengono controllate attraverso l'unità di interfaccia, attraverso la quale è possibile impostare il pompaggio automatico e la velocità di pompaggio. Soltanto due di esse è stato però necessario utilizzare:

- pompa 1. Essa ha la funzione di prelievo del mixed liquor dal reattore, per immetterla nella tanica addetta a contenere il refluo di spurgo. Il suo pompaggio è solitamente mantenuto in automatico: quando nel reattore il mixed liquor supera il livello dei 3 litri si attiva il pompaggio, in modo da mantenere la miscela su quella soglia;
- pompa 4. Questa consiste nella pompa di immissione della soda caustica nel reattore, con la funzione di basificare, quando il pH scende sotto il valore di 5,5. Anche per essa è impostato il pompaggio automatico.

7) QUADRO ELETTRICO



Figura 4.3 – Quadro elettrico

È attraverso il quadro elettrico che si può attivare l'intero sistema e, inoltre, questo pannello gestisce il funzionamento dell'elettrovalvola per l'insufflazione del gas e monitora alcuni parametri di sicurezza, quali la portata della cappa aspirante e la pressione interna al reattore. Tramite tale pannello è possibile impostare le soglie di allarme e il timer per l'erogazione del gas.

8) RECIPIENTE DI RACCOLTA DEL BIOGAS

Dopo essere passato nel condensatore per la separazione dall'umidità, il biogas è inviato al recipiente di raccolta, in cui è fatto gorgogliare sotto battente ed è convogliato sotto la cappa di aspirazione. Il recipiente è dotato di raccordi per il campionamento del biogas, ai fini dell'analisi qualitativa, tramite *bag* in tedlar.

9) RECIPIENTE PER LA SODA: la soda (con concentrazione di 3 mol/L) è contenuta in questa bottiglia in PE della capacità di 2 L.

10) REATTORE CSTR

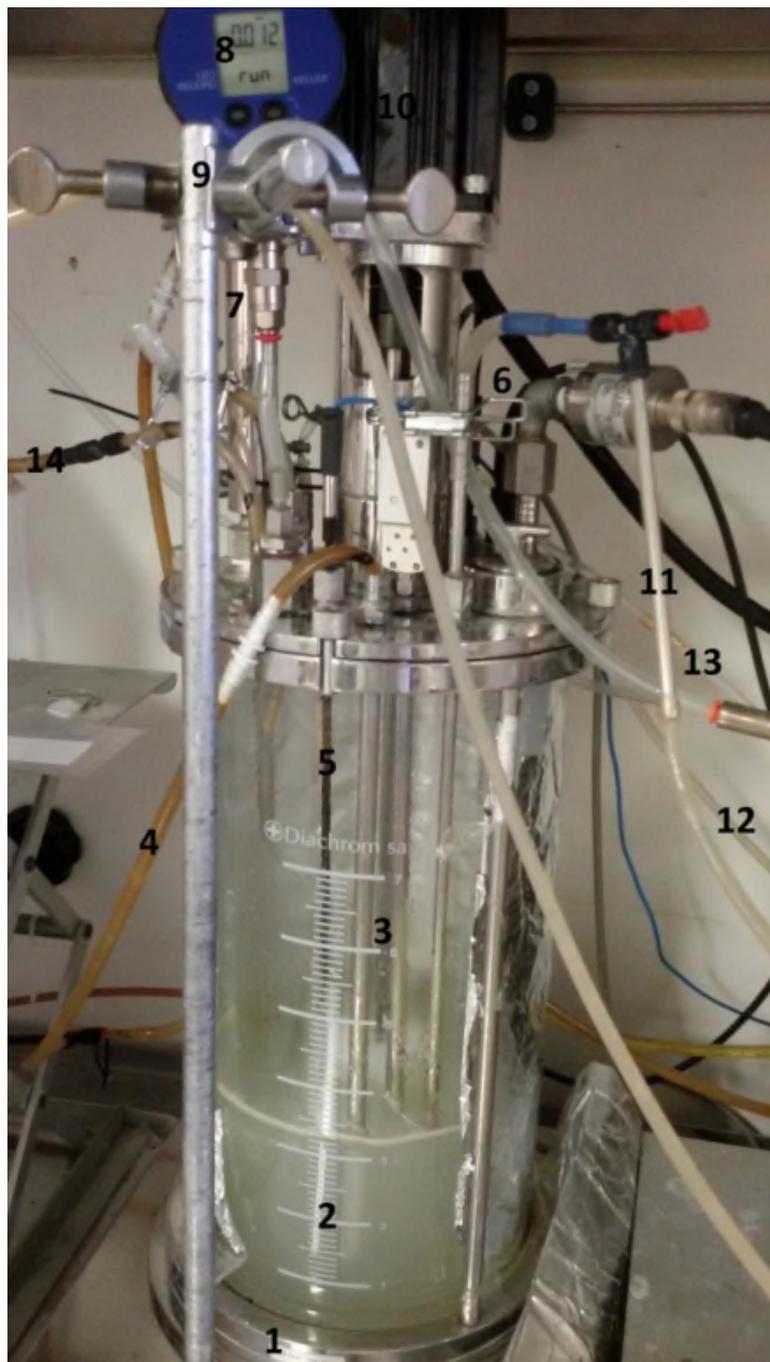


Figura 4.4 – Reattore CSTR, fornito dalla casa produttrice svizzera Diachrom.

Questo è il bioreattore in cui la biomassa idrogenica viene fatta crescere e, quindi, è qui che si verifica il processo di dark fermentation, con la produzione di idrogeno. Si tratta di un contenitore stagno di forma cilindrica, realizzato in vetro trasparente, per consentire il controllo visivo dell'ambiente interno, avente capacità nominale di 9 L. Si possono distinguere diversi elementi:

- 1) piastra. Il riscaldamento del fermentatore è affidato alla piastra riscaldante che funge anche da base di appoggio del reattore;
- 2) mixed liquor, contenente i batteri e il substrato. Riempie i 3 litri iniziali del bioreattore;
- 3) agitatore ad albero, per mantenere completamente miscelato l'ambiente, favorendo l'aerazione e la crescita della biomassa;
- 4) tubo per il raffreddamento. L'eventuale raffreddamento del sistema è controllato automaticamente e realizzato mediante questo tubo, all'interno del quale scorre acqua proveniente dalla rete idrica;
- 5) Sonda di livello, con lo scopo di monitorare il livello della miscela all'interno del reattore. Qualora la miscela la raggiungesse, significherebbe che essa abbia superato la soglia dei 3 litri, determinando così la conseguente attivazione della pompa 1, per il pompaggio in uscita;
- 6) sonde per la misurazione della pressione interna, del pH, della temperatura e del potenziale redox;
- 7) condensatore per la separazione dell'umidità dal biogas;
- 8) manometro *keller*, che misura la pressione, registrandone l'andamento, che è significativo per la produzione di idrogeno;
- 9) morsetto per fissare il *keller*;
- 10) motore per azionare il rotore;
- 11) tubo per il pompaggio in uscita;
- 12) ingresso dell'alimento;
- 13) ingresso della soda;
- 14) ingresso dell'acqua per il controllo della pressione.

11) CAPPA D'ASPIRAZIONE

Operare con un gas altamente infiammabile come l'idrogeno ha richiesto l'adozione di particolari misure di sicurezza quali il collocamento dell'impianto pilota sotto una cappa aspirante, verso cui il biogas è convogliato mediante tubo in acciaio, materiale in grado di resistere alla capacità acidificante dell'idrogeno.

12) SISTEMA DI SICUREZZA

Questa bottiglia, della capacità di 2 L, contiene acqua deionizzata, fino al livello in cui è stata realizzata una apposita traccia con il pennarello indelebile. Il liquido contenuto nel sistema di sicurezza risale un microtubo di vetro, che dalla base del recipiente è collegato al reattore in modo da formare una curva a gomito in uscita dalla bottiglia, creando un sifone. Durante il funzionamento regolare dell'impianto, l'interfaccia liquido-gas è collocata ben al di sotto del livello dell'acqua all'interno del recipiente, che è posta in corrispondenza del gomito del tubo di vetro. Nel caso di blocco del reattore a causa di un allarme, il progressivo raffreddamento

e conseguente abbassamento della pressione interna, innescano il sifone che riporta il livello di pressione ad un adeguato valore di sicurezza.

13) TANICA PER LO SPURGO

14) BOMBOLA

In questa bombola è contenuto azoto, che viene immesso nel reattore qualora si renda necessario un innalzamento della pressione, nel caso raggiungesse dei valori troppo bassi. Il flusso di azoto in ingresso all'impianto viene regolato attraverso l'apposita valvola.

15) CARRELLO, per facilitare lo spostamento durante operazioni di manutenzione.

4.2.2 Siero di latte

Il siero di latte utilizzato come substrato durante il processo proviene dal caseificio PLAC di Cremona, dove vengono prodotti grana padano e provolone. Si tratta di siero da grana padano deproteinizzato, a seguito di ultrafiltrazione (10 KDa). Dopo la consegna il siero viene conservato in cella frigorifera senza congelamento.

Ad ogni nuovo arrivo di taniche contenenti siero (generalmente viene effettuato un ordine di 9/10 taniche da 10 L, ogni mese), viene prelevato un campione da una di esse e si effettuano le analisi di alcune sue componenti. Saltuariamente si sono analizzati, tramite le apposite sonde, pH, temperatura e conduttività. In alcune situazioni, per comprendere se vi fossero granuli presenti già all'interno del siero di latte, si sono effettuate anche le analisi dei solidi sospesi totali e volatili, attraverso la filtrazione.

Di norma, invece, vengono sempre realizzate le analisi concernenti COD, azoto totale e ammoniacale (nella Tabella 4.5 vengono indicati i range all'interno dei quali questi parametri si sono collocati), in quanto si tratta di parametri necessari per il calcolo della composizione dell'alimento. Queste analisi vengono realizzate sempre tramite kit.

Tabella 4.5 – Intervalli di concentrazione all'interno dei quali si sono collocati i risultati delle analisi concernenti il siero di latte.

PARAMETRO	CONCENTRAZIONE
COD	50÷60 g/L (solitamente ~ 55 g/L)
TKN	120÷200 mg/L
NH ₃	10÷25 mg/L

In realtà, si è registrato che anche tra una tanica e un'altra, relative allo stesso ordine, si può osservare un leggero cambiamento di questi parametri. Per questo, qualche volta, si è preferito calcolare il COD prendendo campioni di siero di latte da più taniche di uno stesso ordine.

4.2.3 Nutrienti

Nella preparazione dell'alimento vengono utilizzate 2 soluzioni contenenti nutrienti e sono state denominate "Soluzione 1" e "Soluzione 2". La Soluzione 1 contiene elementi nutritivi metallici: Fe, S, Na, Cu, Mn, Ca, Mg. Vengono utilizzate 7 diverse sostanze chimiche (ricavati dalla pubblicazione di Cota-Navarro et al. [18]) che li contengono e di esse sono note le concentrazioni richieste (indicate in Tabella 4.6) per preparare un litro di alimento.

Tabella 4.6 – Sostanze chimiche, e rispettive concentrazioni in g/L_{alimento}, che compongono la Soluzione 1.

SOSTANZA CHIMICA	CONCENTRAZIONE [g/L]
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,0355
ZnCl ₂	0,00075
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,005
MnSO ₄ · H ₂ O	0,0092
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,00261
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,0125
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0,1

La Soluzione 2 contiene come elementi nutritivi il fosforo e il potassio, i quali sono forniti dalla sostanza chimica KH₂PO₄ (vedi Tabella 4.7).

Tabella 4.7 – Concentrazione di KH₂PO₄ necessaria per preparare 1 L di alimento.

SOSTANZA CHIMICA	CONCENTRAZIONE [g/L]
KH ₂ PO ₄	0,1

Per semplificare la procedura, sono state preparate soluzioni concentrate da aggiungere nella corretta quantità durante la preparazione dell'alimento, in modo da ottenere le concentrazioni desiderate.

4.2.4 Soluzione con NaOH

L'idrossido di sodio (NaOH) viene utilizzato per mantenere il pH all'interno del reattore sul valore di 5,5 e viene dosato in automatico. La concentrazione voluta di soda nella soluzione con acqua è di 3 mol/L e, normalmente, viene preparata una scorta di 4 litri di soluzione.

4.3 Metodi

4.3.1 Procedura di avvio

L'avvio del reattore in condizioni di alimentazione continua, è stato preceduto da una serie di prove batch condotte direttamente sul fermentatore, allo scopo di valutare e verificare la resa di produzione di idrogeno in termini molari e di stimolare la crescita e l'acclimatamento della biomassa alle condizioni di processo prima di procedere al dosaggio continuo di substrato organico.

In realtà, la sperimentazione oggetto della tesi ha avuto inizio quando l'impianto era già stato avviato. Però, a causa di differenti problematiche (legate normalmente all'assenza di corrente o a periodi di chiusura del laboratorio), durante il corso della sperimentazione si sono resi necessari successivi riavvii dell'impianto, seguendo la procedura seguente:

1) PULIZIA DEL REATTORE

Dopo aver scollegato i tubi e le sonde e dopo aver rimosso il motore, il reattore viene aperto e si provvede alla pulizia di esso, dei tubi e delle sonde, tramite l'uso di carta e di acqua deionizzata.

2) CALIBRAZIONE DELLA SONDA DEL pH

Essendo il pH un parametro fondamentale durante il processo di dark fermentation, normalmente, al riavvio dell'impianto viene riefettuata la calibrazione della sonda di misurazione di questo parametro, utilizzando delle soluzioni di pH noto (una con un pH di 7, l'altra di 4,01).

3) INOCULO

I 3 litri iniziali del reattore vengono riempiti con il mixed liquor utilizzato in precedenza (opportunamente conservato in frigorifero) o con nuovo alimento.

4) MODALITÀ BATCH

Attraverso l'unità di interfaccia, viene azionato l'agitatore. Si sistemano poi il pH sul valore di 5,5 (solitamente in avvio il pH è leggermente basico, ed è quindi necessario aggiungere un modesto quantitativo di acido) e il pompaggio automatico della soda. Dopodiché si opera in modalità batch, attendendo che il valore di temperatura richiesto (36 °C) si stabilisca all'interno del CSTR.

5) LAVORO IN CONTINUO

Raggiunto il valore richiesto di temperatura, si passa alla modalità in continuo, azionando le pompe in ingresso e in uscita.

4.3.2 Misura della portata di biogas

L'analisi della produzione volumetrica di biogas è stata realizzata mediante un manometro *Keller* (dal nome dell'azienda svizzera che lo produce, Keller Druck), collegato in testa al reattore, in grado di rilevare le variazioni di pressione e registrarle in memoria con un passo temporale di 10 secondi per la misura di una singola giornata. Il manometro viene spento e successivamente riacceso soltanto quando i dati relativi alla pressione, raccolti da questo strumento, vengono scaricati sul computer, in quanto il manometro è dotato di un collegamento USB. La lettura dei dati viene effettuata per mezzo del software *Logger 5.0*.

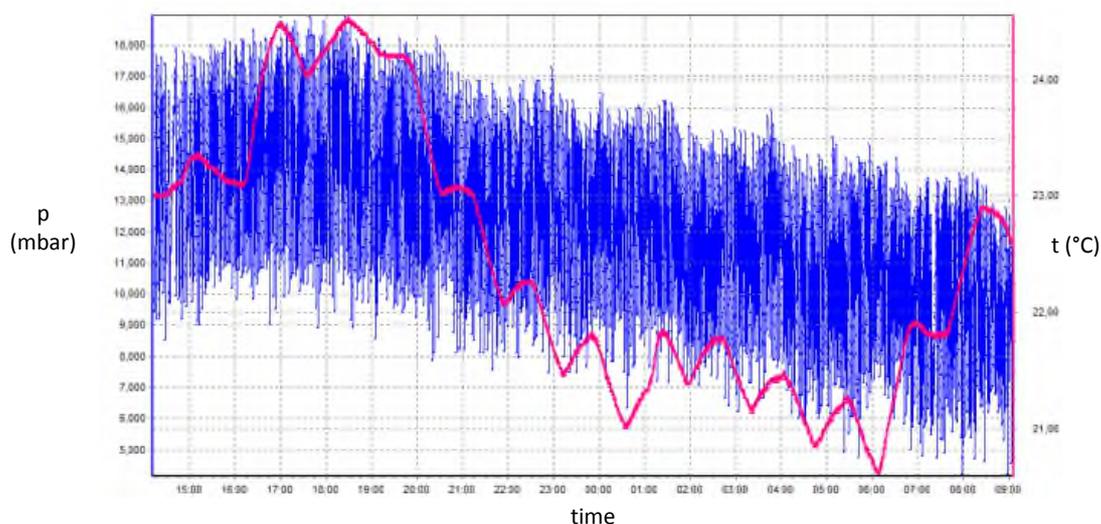


Figura 4.5 – Esempio di andamento della pressione, in blu, nel tempo (sulle ascisse si può visualizzare il tempo, mentre sulle ordinate i valori della pressione in mbar). La distanza tra un picco e il successivo fornisce un'indicazione sulla produzione del reattore: più i picchi sono vicini migliore è la produzione. La linea rossa descrive invece l'andamento della temperatura.

La Figura 4.5 rappresenta un esempio dell'andamento della pressione registrato dal manometro Keller. La curva presenta l'alternarsi di massimi e minimi, che costituiscono i valori soglia di pressione imposti per il sistema (0 e 17 mbar). La pendenza e la durata dell'intervallo tra due picchi sono indicatori dell'attività batterica e, quindi, indirettamente del volume di gas prodotto (in quanto variazione volumetrica e variazione della pressione sono tra loro correlate nella legge dei gas); tanto più l'intervallo è corto, tanto maggiore sarà la produzione di biogas nell'unità di tempo. Mediante un foglio di calcolo, le curve di pressione sono state trasformate in curve di volume, sulla base della legge dei gas perfetti, utilizzando anche i dati di pressione atmosferica registrati. Mediando i dati di volume di biogas prodotto durante l'intera giornata, se ne è ricavata la produzione giornaliera.

Combinando i risultati delle prove di composizione e produzione di biogas, è possibile risalire al volume di idrogeno prodotto giornalmente e quindi calcolarne la resa di produzione molare in riferimento alle moli di lattosio alimentate:

$$Y_{H_2} = \left[\frac{Q_{gas} \cdot \%H_2 \cdot t}{22,414} \right] / \left[\frac{Q_{in} \cdot C_{lattosio} \cdot t}{342,296} \right]$$

Dove:

- Y_{H_2} = resa molare di produzione di idrogeno [$\text{mol}_{H_2}/\text{mol}_{lattosio}$];
- Q_{gas} = portata giornaliera di biogas prodotto, in condizioni standard (0 °C e 1 atm) [L/h];
- $\%H_2$ = contenuto percentuale di idrogeno nel biogas;
- t = tempo di misurazione [h];
- Q_{in} = portata giornaliera di alimento [L/h];
- 22,414 = volume molare dei gas alle condizioni standard [L];
- $C_{lattosio}$ = concentrazione di lattosio nell'alimento [$\text{g}_{lattosio}/\text{L}$];
- 342,296 = peso molecolare del lattosio [$\text{g}_{lattosio}/\text{mol}_{lattosio}$].

4.3.3 Analisi

Composizione del biogas

Il biogas prodotto viene raccolto in apposite *bag* in tedlar. Per prima cosa la *bag* viene collegata alla bombola e viene riempita leggermente con l'azoto, in modo da avere il corretto grado di diluizione al fine di permettere al gascromatografo di rilevare le componenti, senza che esse assumano valori al di fuori del range di misura. Dopodiché la si collega all'apposito raccordo sul recipiente in cui il biogas viene raccolto. Si apre il flusso di biogas verso la *bag* e si chiude il flusso verso la cappa di aspirazione. Una volta riempita, la *bag* viene staccata dal recipiente e viene ripristinato il flusso di gas verso la cappa.

La misurazione del biogas avviene collegando la *bag* a un gascromatografo (vedi Figura 4.6 e Tabella 4.8), che è equipaggiato con 2 colonne analitiche: una a setacci per l'individuazione di N_2 , O_2 , CH_4 , H_2 , l'altra polimerica per quella di CO_2 e N_2O . Lo strumento dispone di una connessione LAN per interfacciarsi mediante il software *Soprane* (sviluppato da SRA) al fine della raccolta dati e della gestione del dispositivo.



Figura 4.6 – Gascromatografo MICROGC 3000A, utilizzato per l'analisi della composizione del biogas, a destra si possono notare le bombole contenenti i gas carrier (una contenente argon, l'altra elio).

Tabella 4.8 – Caratteristiche del gascromatografo.

METODO STRUMENTALE	
Temperatura colonna a setacci (mod. Molsiere 56° PLOT 10mt×0.32mm)	90°C
Temperatura colonna polimerica (mod. PLOT Q 8mt×0.32mm)	60°C
Pressione colonne	15 psi
Gas di trasporto (carrier)	Elio – Argon
Durata dell'analisi	120 s

Normalmente si è preferito attuare più ripetizioni della misurazione del biogas all'interno della *bag*; inizialmente se ne effettuavano 5, ma, poi, a causa della riduzione dei gas carrier nelle bombole, si è preferito ridurre a 2 il numero delle ripetizioni. Ogni misurazione dura 120 s.

Contenuto del mixed liquor

Per effettuare le analisi concernenti il contenuto del mixed liquor è necessario effettuare una filtrazione, con lo scopo di dividere la componente liquida da quella solida. Infatti, la procedura analitica dei kit richiede che non siano presenti elementi in sospensione, perché interferiscono con la misura. Una volta conclusa la filtrazione, il materiale filtrato viene utilizzato per analizzare COD, TKN, NH_3 e VFA (saltuariamente anche nitriti, nitrati, fosfati e alcalinità). Tutte queste analisi avvengono tramite l'ausilio degli appositi kit, prodotti dall'azienda tedesca Hach Lange GmbH. La Tabella 4.9 riassume le procedure seguite per l'analisi dei differenti parametri.

Tabella 4.9 – Metodo, numero di misurazioni e range relativi alle analisi di ciascun parametro.

Parametro	Metodo analitico	Misure	Range misura
COD	Digestione e determinazione fotometrica (Cuvette-test Dr. Lange LCK514)	Singola	100 – 2000 mg/l COD
N_{TOT}	Ossidazione con persolfato e determinazione fotometrica (Cuvette-test Dr. Lange LCK238)	Singola	5 - 40 mg/l TNb
N-NH_4^+	Metodo al fenoloipoclorito e determinazione fotometrica (Cuvette-test Dr. Lange LCK303)	Singola	2 – 47 mg N-NH_4^+
VFA	Metodo esterificazione e determinazione fotometrica (Cuvette-test Dr. Lange LCK365)	Singola	50 - 2500 mg/l CH_3COOH
SST	Filtrazione (GF/C Whatman 47 mm, 0,45 μm) ed essiccamento a 105°C	Doppia	\

Per l'analisi del COD e dell'azoto totale è necessaria anche una digestione ad alta temperatura in un termostato Lange HT 200S; mentre l'analisi dei VFA richiede la permanenza a 100 °C per 10 minuti all'interno di un termostato Lange LT 200. Terminata la procedura per l'analisi in kit, le cuvette, con cui si sono svolte le analisi, vengono inserite in uno spettrofotometro di massa Lange Xion 500 (prodotto dalla stessa azienda produttrice dei kit, vedi Figura 4.7), il quale è in grado di rilevare il quantitativo di analita presente all'interno della cuvetta.



Figura 4.7 – Spettrofotometro di massa Lange Xion 500. Questo strumento permette di quantificare le analisi svolte attraverso l'utilizzo degli appositi kit.

Come accennato nei paragrafi 4.1.1 e 4.2.2., all'occorrenza si sono effettuate analisi tramite kit dei differenti parametri anche per quel che concerne il siero di latte e l'alimento.

Solidi sospesi

I solidi sospesi totali (TSS, *Total Suspended Solids*) e i solidi sospesi volatili (VSS, *Volatile Suspended Solids*) sono stati misurati secondo la metodologia IRSA, utilizzando filtri in acetato di cellulosa (GF/C Whatman 47 mm, 0,45 μm).

4.3.4 Preparazione dell'alimento

Dopo aver calcolato il volume totale di alimento richiesto, è necessario calcolarne la composizione. Il volume totale di alimento viene suddiviso in siero di latte, acqua e nutrienti. Questa suddivisione dipende dalla concentrazione di COD che si vuole ottenere nell'alimento, infatti, è questo parametro a determinare le quantità di acqua e nutrienti con le quali il siero di latte deve essere diluito. Inoltre si rende necessaria l'aggiunta di azoto, dissolvendo nell'alimento una certa quantità di cloruro di ammonio (NH_4Cl), tale da ottenere un rapporto COD/N di 15 mg/g.

CAPITOLO 5

RISULTATI

5.1 Monitoraggio della fase 1: 27/5/2016 - 11/7/2016

Come accennato nel paragrafo 4.1.1, durante questa prima fase si è sperimentata la produzione di idrogeno al variare dell'HRT: si è operato con HRT di 12 h, 6 h e 9 h (nei grafici è stata inserita una linea retta verticale per separare i periodi in cui si è operato con un differente HRT). Il periodo in cui si è operato a 9 h è stato molto breve (di soli 5 giorni), in quanto si era già operato sufficientemente in passato alle medesime condizioni operative; per questo motivo, questa fase può essere considerata soprattutto come un confronto tra la produzione con HRT di 12 h e di 6 h. La fase ha avuto inizio quando il reattore era già attivo e la biomassa era già sviluppata. All'interno del reattore erano precedentemente presenti dei granuli, i quali sono rimasti anche durante l'intera fase 1, variando, però, in dimensioni e numero. La Tabella 5.1 riassume le condizioni operative.

Tabella 5.1 – Condizioni operative della fase 1.

PARAMETRO	VALORE	UNITÀ DI MISURA
Volume mixed liquor	3	L
Velocità di rotazione	200	RPM
pH	5,5	-
Temperatura	36	°C
HRT	12 (per 25 giorni), 6 (per 17 giorni), 9 (per 5 giorni)	h
Portata in ingresso	6 (per 25 giorni), 12 (per 17 giorni), 8 (per 5 giorni)	L/d
COD in ingresso	30	g _{cod} /L

La Figura 5.1 mostra la composizione del biogas contestualmente alla produzione di idrogeno durante il corso della fase 1, mentre in Figura 5.2 sono mostrate le rese conseguite. La resa di idrogeno è stata calcolata come l'idrogeno prodotto sulla totalità del lattosio entrante assumendo, come verificato da esperienze precedenti del gruppo di lavoro ([29], [77]), che il lattosio venga totalmente attaccato dalla biomassa batterica.

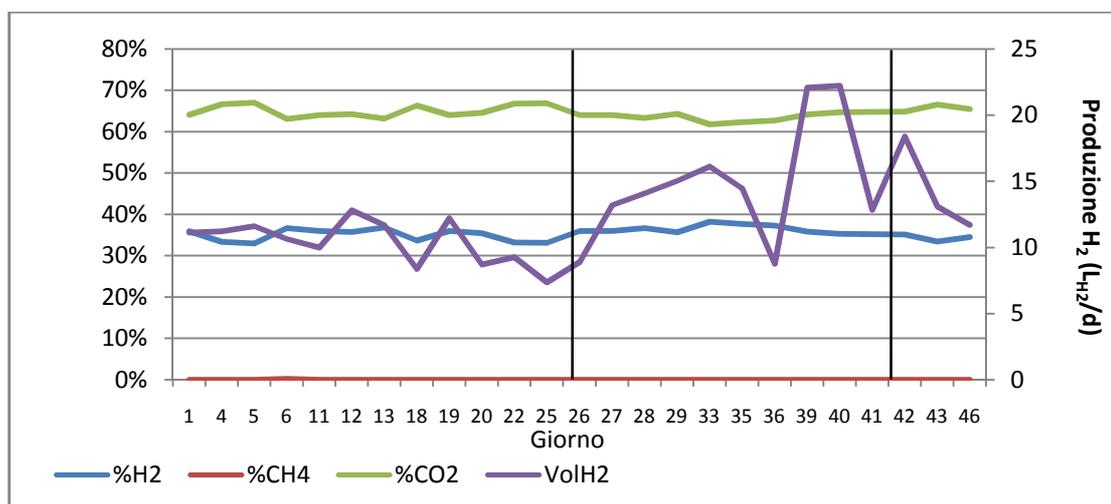


Figura 5.1 - Confronto tra l'andamento della produzione di idrogeno e la composizione del biogas.

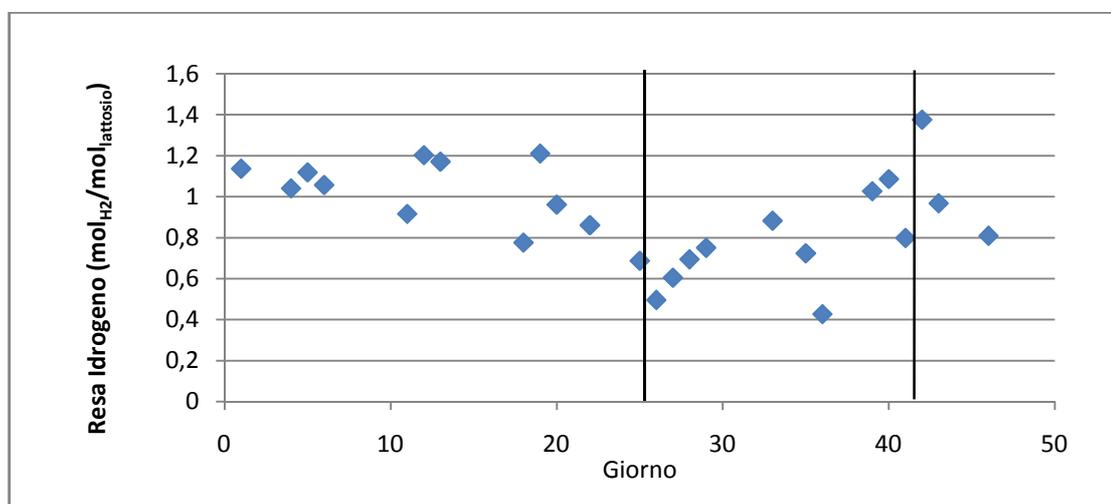


Figura 5.2 – Resa di produzione di idrogeno durante la fase 1.

Per prima cosa si può sottolineare come il biogas fosse composto solamente da idrogeno e anidride carbonica, con la predominanza di quest'ultima, mentre il contenuto di metano è sempre risultato nullo (con l'eccezione di una percentuale dello 0,2 % registrata soltanto durante il giorno 6). Il contenuto di idrogeno nel biogas (e, di conseguenza, anche quello di CO₂) è risultato non dipendente dall'HRT, mantenendosi sempre in un range tra 33 % e 38

%, anche se si può sottolineare come sia rimasto maggiormente costante e leggermente superiore (tra 35 % e 38 %) quando si è operato con un HRT di 6 h. Riguardo invece alla portata giornaliera di idrogeno, è stata superiore ad un HRT di 6 h (media di 14,76 L_{H2}/d), inferiore ma piuttosto costante quando si è operato a 12 h (media di 10,41 L_{H2}/d). Per i pochi giorni in cui si è operato a 9 h la produzione media è stata di 14,39 L_{H2}/d. I risultati conseguiti sono dunque in linea con la teoria, secondo cui maggiori produzioni volumetriche normalmente si riscontrano ad HRT inferiori, per effetto dei maggiori carichi in alimento. Tuttavia la resa conseguita (come mostrato in Figura 5.2) è stata superiore operando a 12 h (media di 1,011±0,17 mol_{H2}/mol_{lattosio}) e decisamente inferiore operando con un HRT di 6 h (media di 0,748±0,21 mol_{H2}/mol_{lattosio}), riaumentando per un HRT di 9 h (media di 1,05±0,29 mol_{H2}/mol_{lattosio}). La ragione di questo è stato probabilmente un eccessivo dilavamento della biomassa idrogenogena e/o il non completo utilizzo del lattosio quando si è operato con un HRT di 6 h, come riscontrato da Wang e Zhao [98]. Inoltre Davila-Vazquez et al. [18] hanno sperimentato come la produzione di idrogeno con un HRT di 6 h possa dipendere molto dall'OLR.

Le minori rese conseguite operando con un HRT di 6 h si manifestano anche nella minore rimozione del COD ottenuta, come mostrato in Figura 5.3, dove è raffigurato l'andamento della rimozione del COD, contestualmente alla concentrazione di COD solubile uscente COD_{out} (coincidente con quella presente nel mixed liquor).

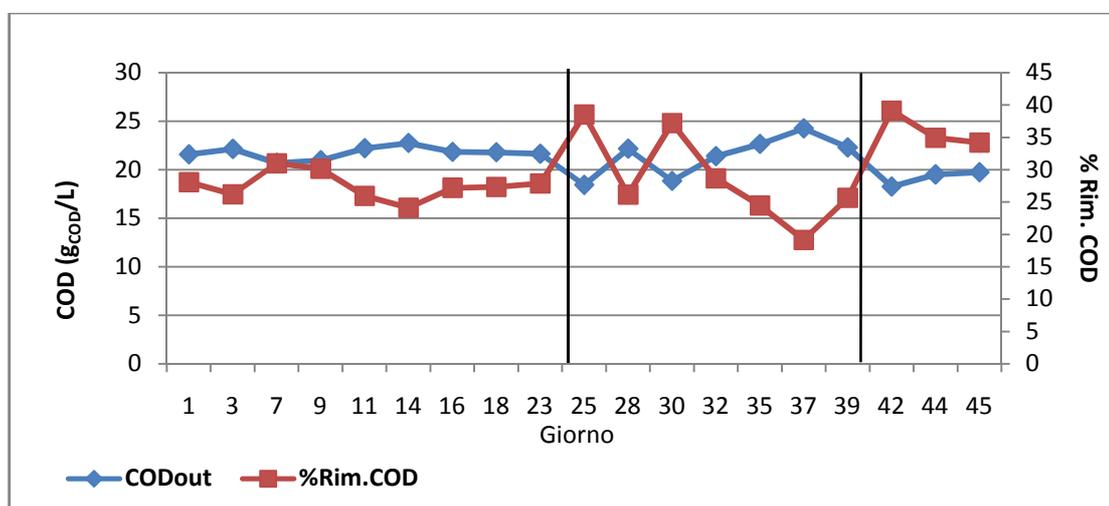


Figura 5.3 – Andamento del COD all'interno del mixed liquor e della sua rimozione in percentuale.

Operando a 12 h la rimozione del COD è stata piuttosto costante e ha assunto un valore medio del 28,64±4 %, mentre quando si è passati ad un HRT di 6 h, sebbene il suo valore medio non sia stato di molto inferiore (26,88±5,96 %), essa ha oscillato in un range di valori

decisamente più ampio. Migliore è stata la rimozione ottenuta durante i pochi giorni in cui si è operato con HRT di 9 h ($36,1 \pm 2,66$ %). La concentrazione di COD solubile uscente, avendo sempre operato alla medesima concentrazione di $30 \text{ g}_{\text{COD}}/\text{L}$ in ingresso, ha seguito un trend opposto rispetto a quello della rimozione del COD.

I solidi sospesi vengono utilizzati come parametro di quantificazione della biomassa. Nella Figura 5.4 è rappresentato l'andamento dei TSS e dei VSS, il quale è stato molto altalenante a causa della presenza dei granuli.

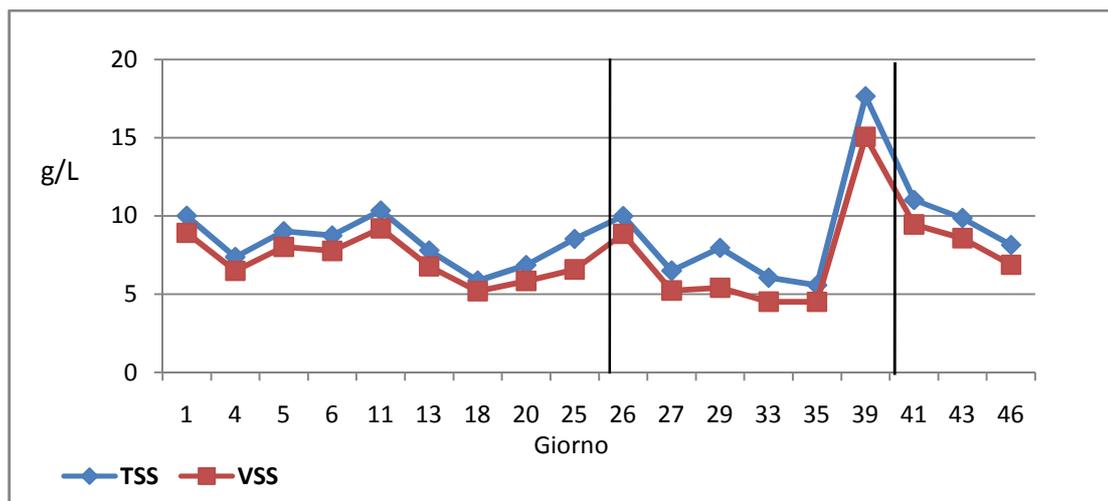


Figura 5.4 – Andamento dei solidi sospesi totali (TSS) e volatili (VSS) nel tempo.

Prima di tutto si può notare come il trend dei TSS e dei VSS sia risultato molto simile e di come essi siano stati vicini l'uno all'altro: questo significa che la presenza di VSS sia stata predominante rispetto a quella dei solidi sospesi non volatili (si è ottenuto un rapporto medio VSS/TSS di circa 0,86, con HRT di 12 h e 9 h, e di 0,8, con HRT di 6 h), come d'altra parte teoricamente prevedibile, stante la totale assenza di TSS e NVSS all'interno dell'alimento. La concentrazione dei solidi sospesi ha assunto valori molto differenti, mantenendosi però, solitamente, tra $4,5 \text{ g}_{\text{VSS}}/\text{L}$ e $9,4 \text{ g}_{\text{VSS}}/\text{L}$, se non si considera il valore anomalo registrato durante il giorno 39 ($15,05 \text{ g}_{\text{VSS}}/\text{L}$). La causa di questo ampio range è da attribuirsi alla presenza dei granuli, in diverse dimensioni e numero. La composizione dei granuli non è nota (avrebbe richiesto delle analisi specifiche), e nemmeno lo è la causa della loro formazione. Si è ipotizzato che la loro presenza fosse dovuta a particelle riscontrate all'interno di alcune taniche di siero di latte o ad alcuni sedimenti rinvenuti all'interno del tubo di pompaggio della soda, i quali, una volta entrati nel reattore, si sono trasformati in supporti per la biomassa, idrogenogena e non. Oppure la granulazione potrebbe essere stata causata da una aggregazione spontanea della biomassa all'interno del mixed liquor, in risposta a condizioni operative caratterizzate da SRT (= HRT) molto bassi che ne potevano provocare il dilavamento. Ad ogni modo, la presenza di granuli è sembrata non influire

positivamente sulla produttività del reattore. La concentrazione media dei solidi sospesi a diversi HRT è mostrata in Tabella 5.2.

Tabella 5.2 - Concentrazioni medie di solidi sospesi durante la fase 1.

HRT	TSS [g _{TSS} /L]	VSS [g _{VSS} /L]
12 h	8,27±1,45	7,19±1,36
6 h	8,94±4,55	7,26±4,14
9 h	9,665±1,44	8,29±1,31

Dunque, analizzando i soli valori medi, la concentrazione dei solidi sospesi è sembrata non variare molto con l'HRT (a 9 h è risultata maggiore, ma occorre sottolineare che si hanno pochi dati a disposizione ed, inoltre, la concentrazione stava diminuendo, dopo aver assunto il valore anomalo durante il giorno 39). D'altra parte occorre evidenziare come questi parametri abbiano avuto una deviazione standard elevata, in particolare operando con un HRT di 6 h.

Nelle figure 5.5 e 5.6 viene mostrato l'andamento dei VSS in relazione alla rimozione del COD e a quella dell'azoto. Essendo i VSS un parametro di quantificazione della biomassa, la cinetica di rimozione del COD dovrebbe essere dipendente dall'andamento dei VSS, e risultare crescente con questa. Analogo discorso per la quantità di azoto rimosso, che dovrebbe essere dipendente dalla crescita netta della biomassa. Dunque, maggiori rimozioni del COD e dell'azoto sono attese in corrispondenza di una maggiore crescita della biomassa. Per questa ragione si sono calcolate anche la crescita netta specifica Y (cioè $g_{VSScresciuti}/g_{CODrimosso}$) e la rimozione netta di azoto ($mg_{Nrimosso}/g_{VSScresciuti}$).

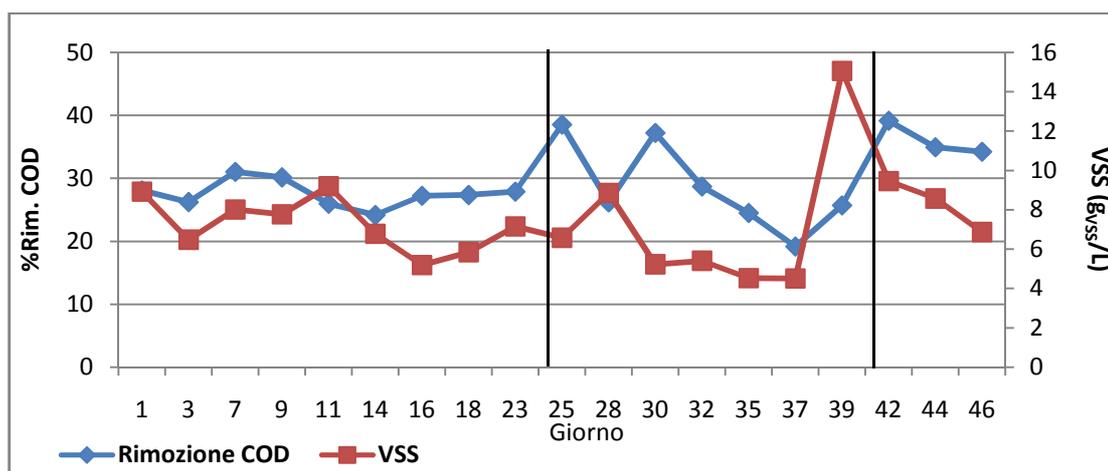


Figura 5.5 – Rimozione del COD all'interno del reattore, contestualmente alla produzione di VSS.

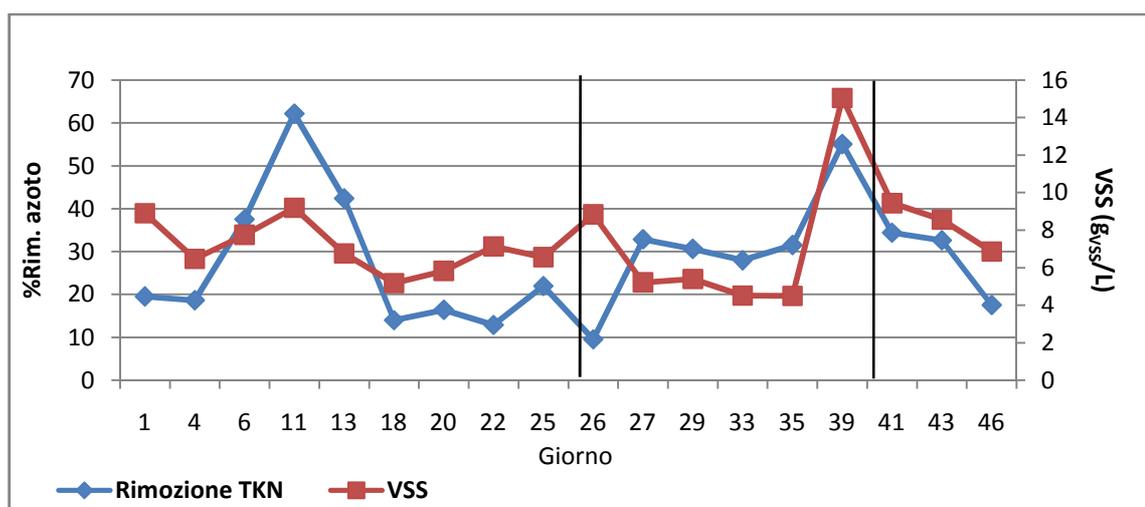


Figura 5.6 – Rimozione dell'azoto all'interno del reattore, contestualmente alla produzione di VSS.

La Figura 5.7 mostra la variazione nel tempo del rapporto tra COD rimosso e VSS formati, contestualmente all'andamento del rapporto tra l'azoto rimosso e VSS formati. Si osserva che la Y è variata solitamente tra 0,6 e 0,9 g_{VSS}/g_{CODrim} (ma nel giorno 39, addirittura 1,95). I valori più alti e comunque tutti i valori superiori a 0,3 non sono spiegabili con la sola crescita batterica, tanto più tenendo conto dei bassi valori di Y tipici dei batteri anaerobici ($0,1 \div 0,3 g_{VSS}/g_{CODrim}$). Si deve quindi supporre che vi siano stati altri fenomeni in atto che hanno portato alla formazione di sospesi di origine organica, quali ad esempio la granulazione. Il rapporto N/VSS è variato solitamente tra 12 e 25 mg_{Nrim}/g_{VSS} .

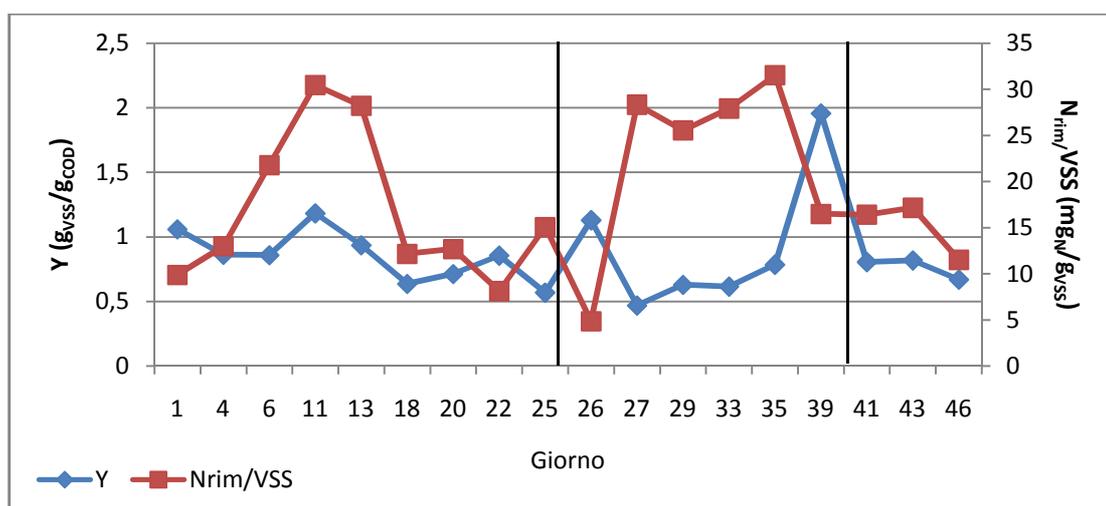


Figura 5.7 – Andamento della crescita batterica Y , contestualmente all'andamento del rapporto tra azoto rimosso e VSS formati.

A fronte dei risultati conseguiti durante questa fase si è optato per escludere il mantenimento di un HRT di 6 h, per via dell'eccessivo dilavamento batterico. Tenendo conto anche dei periodi precedenti alla fase 1, si è optato per la scelta di un HRT di 9 h, che sarebbe stato mantenuto poi nelle fasi successive, in cui si è deciso di sperimentare la produzione di idrogeno al variare della concentrazione di COD entrante.

5.2 Monitoraggio della fase 2A: 11/7/2016 - 12/8/2016

L'inizio di questa fase è datato 11/7/2016, quando si è optato per il passaggio della concentrazione di COD in entrata da 30 g/L a 20 g/L. Nella Tabella 5.3 vengono riassunte le condizioni operative.

Tabella 5.3 – Condizioni operative della fase 2.

PARAMETRO	VALORE	UNITÀ DI MISURA
Volume mixed liquor	3	L
Velocità di rotazione	200	RPM
pH	5,5	-
Temperatura	36	°C
HRT	9	h
Portata in ingresso	8	L/d
COD in ingresso	20	g _{cod} /L

All'interno del mixed liquor erano già presenti granuli prima dell'inizio della fase ed essi sono rimasti nel reattore per tutta la durata della fase.

Nella Figura 5.8 è mostrata la resa di produzione di idrogeno.

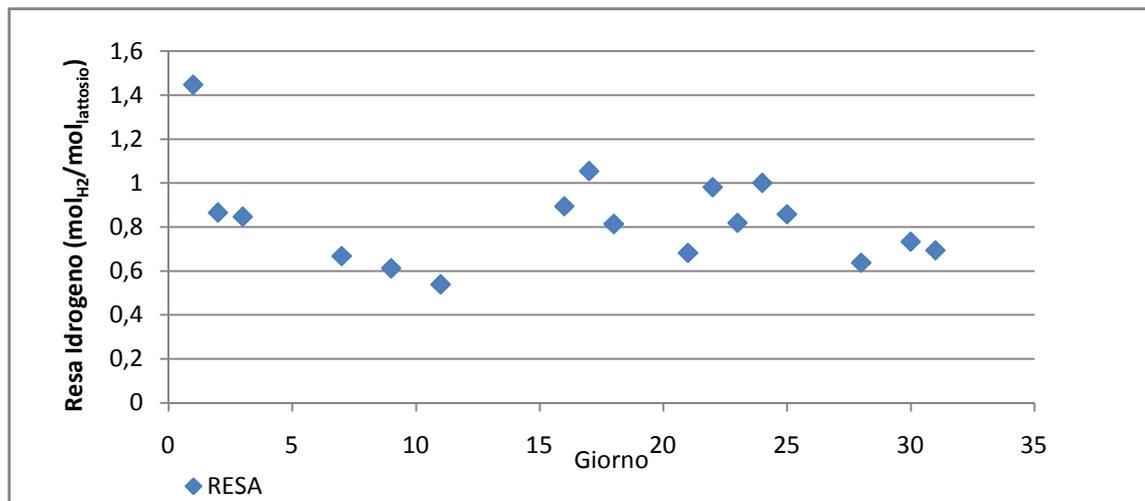


Figura 5.8 – Resa di produzione dell'idrogeno.

Come si può osservare, la resa è spesso risultata variabile, spaziando tra 0,6 e 1 mol_{H2}/mol_{lattosio}. Il massimo è stato ottenuto al giorno 1 (1,45 mol_{H2}/mol_{lattosio}), ma è sembrato essere un valore anomalo, non veritiero rispetto al corretto andamento durante il corso della fase: probabilmente questo valore è stato ottenuto quando i batteri risentivano ancora delle condizioni operative della fase precedente. Ad ogni modo la resa si è mantenuta sempre ben lontana dal valore massimo teorico di 4 mol_{H2}/mol_{lattosio} (valore massimo ottenibile se si verifica contestuale produzione di acido butirrico, vedi paragrafo 3.3.2.1).

La Figura 5.9 mostra il confronto tra gli andamenti della portata di idrogeno e la composizione del biogas.

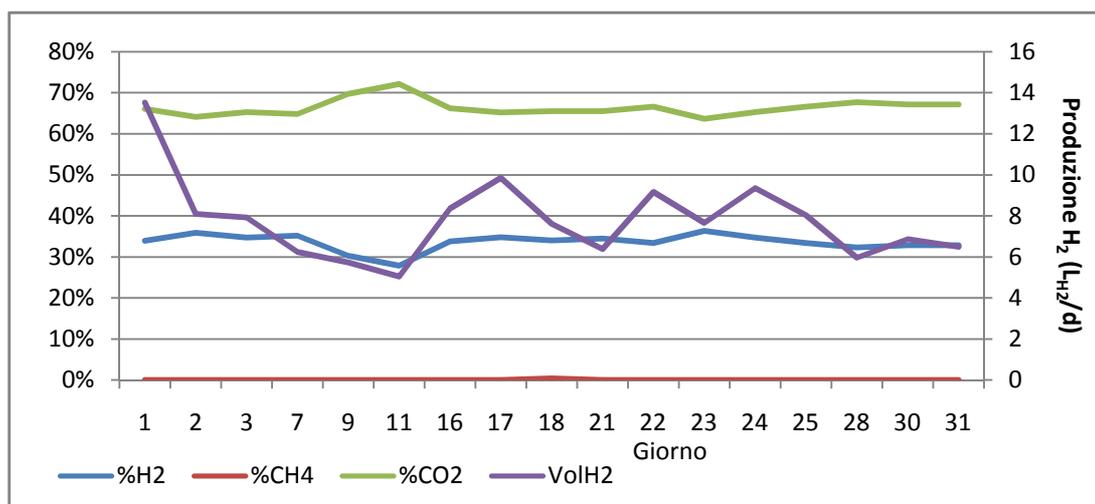


Figura 5.9 – Confronto tra l'andamento della produzione di idrogeno e la composizione del biogas.

Si evince che il trend relativo alla produzione di idrogeno abbia solitamente seguito quello del contenuto di idrogeno nel biogas, con alcune eccezioni (ad esempio durante i giorni 23 e 21, in cui ci si sarebbe aspettati una produzione maggiore, contestuale all'aumento del contenuto di idrogeno). Mentre durante i giorni 9 e 11 si è registrato un calo nella produzione di idrogeno, che ha influito anche sul contenuto di idrogeno, dopodiché entrambi i parametri si sono ristabiliti. Questo calo sembra essere dovuto a una diminuzione della biomassa durante quei giorni (vedi Figura 5.14), in quanto sia la rimozione del COD sia la produzione dei VFA hanno assunto valori nella norma.

Il contenuto di metano è sempre stato nullo. Il contenuto di idrogeno si è mantenuto solitamente tra il 33 % e il 36 %, mentre quello di CO₂ tra il 65 % e il 68 %. La maggiore anomalia risale al giorno 11, quando si è conseguito un contenuto idrogenico del 28 % (e 72 % di CO₂).

La produzione di idrogeno ha spaziato solitamente tra 6 e 10 L_{H₂}/d. Il suo massimo, come per la resa, è stato ottenuto al giorno 1 (13,54 L_{H₂}/d), ma, come già accennato prima, probabilmente questo valore è stato ottenuto quando i batteri risentivano ancora delle condizioni operative della fase precedente.

Nella Tabella 5.4 vengono indicati i valori massimi e minimi registrati di portata e resa di idrogeno.

Tabella 5.4 – Valori minimo e massimo della produzione di idrogeno e della resa di produzione di idrogeno.

	Giorno	VolH₂ [L_{H₂}/d]	Resa [mol_{H₂}/mol_{lattosio}]
Massimo	1	13,54	1,45
Minimo	11	5,05	0,54

Riassumendo, la resa, la produzione e i contenuti medi ottenuti sono stati:

- Resa = 0,83±0,21 mol_{H₂}/mol_{lattosio};
- Vol_{H₂} = 7,79±2 L_{H₂}/d;
- H₂ = 33 %;
- CO₂ = 67 %;
- CH₄ = 0 %.

La Figura 5.10 mostra l'andamento della portata di idrogeno in relazione alla produzione degli acidi grassi volatili (VFA).

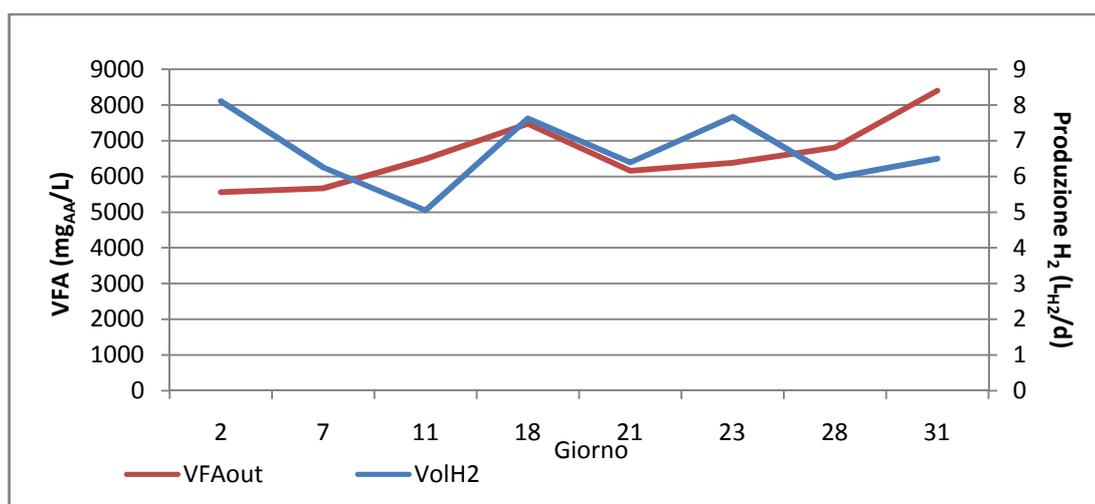


Figura 5.10 – Confronto tra portata di idrogeno e concentrazione di VFA.

Si può osservare come l'andamento della produzione di idrogeno sia stato inversamente proporzionale alla concentrazione di VFA in alcune situazioni (tra i giorni 2 e 11, soprattutto, e tra i giorni 21 e 28) mentre in altre situazioni i trend dei due parametri sono sembrati essere analoghi (tra i giorni 11 e 21). Occorre anche ricordare che un aumento dei VFA potrebbe comportare un'inibizione della produzione di idrogeno, dando vita così a trend differenti se non opposti (come riscontrato da Van Ginkel e Logan [94]). Bisogna sottolineare che le misure di VFA erano effettuate con kit e potevano quindi non essere molto precise. La loro concentrazione è stata piuttosto elevata, in particolare durante i giorni 15, 18 e 31 (durante il giorno 21 si è ottenuta la massima concentrazione di 8400 mg_{AA}/L). I valori minimi si sono conseguiti invece a inizio fase (il minimo, di 5560 mg_{AA}/L, si è registrato durante il giorno 2). Il valore medio di concentrazione dei VFA è stato di 6692 mg_{AA}/L.

In Figura 5.11 è mostrato l'andamento della componente uscente di COD legata ai VFA (calcolata considerando un rapporto di 1,5 g_{COD}/g_{VFA}, ricavato osservando sperimentazioni precedenti), rispetto a quello del COD entrante e del COD uscente.

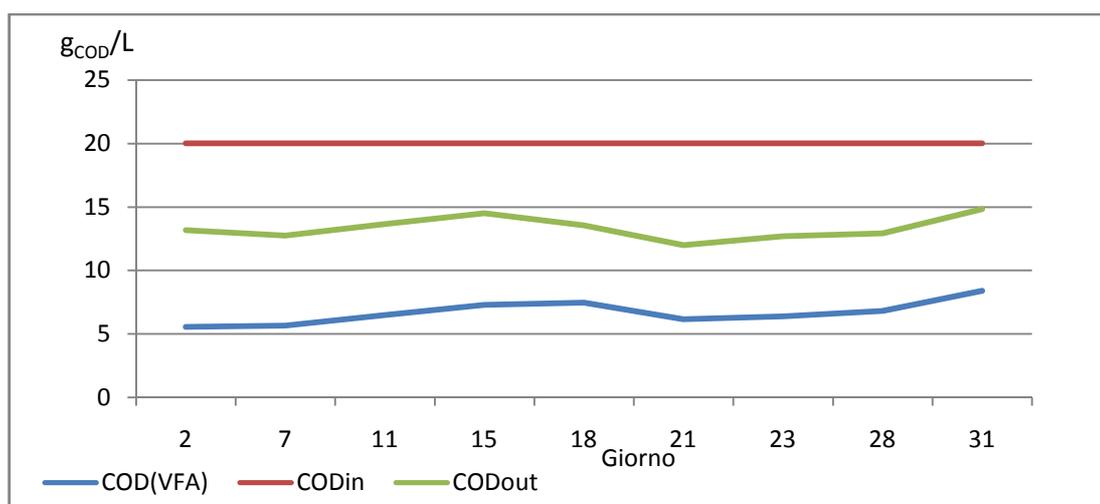


Figura 5.11 – Andamento del COD in (assunto costante e pari a 20 g/L), del COD out e della quota parte di COD out relativa ai VFA.

Si può notare come circa la metà del COD uscente fosse costituito da VFA. Tuttavia risulta chiaro che una grossa fetta del COD effluente sia da attribuirsi ad altri metaboliti di reazione e/o alla quota parte di substrato non degradato dalla popolazione batterica. Con i dati a disposizione però non è stato possibile fare ulteriori indagini al riguardo. Sarebbe stato necessario effettuare un'analisi completa ed esaustiva della composizione del COD effluente. L'andamento della rimozione del COD e della formazione di VFA è stato del tutto simile, senza presentare eccezioni.

In Figura 5.12 sono mostrati l'andamento del COD solubile all'interno del mixed liquor e della sua rimozione.

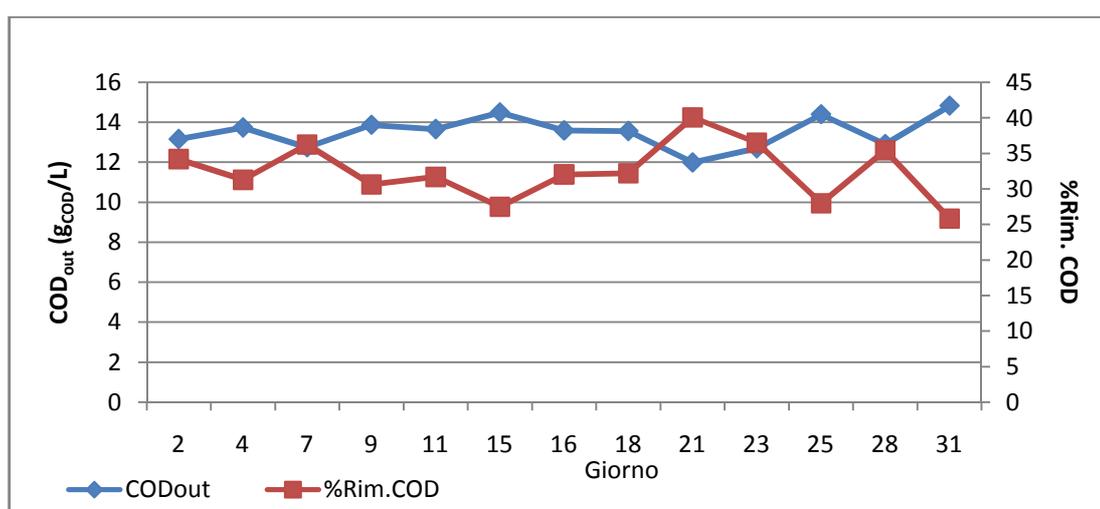


Figura 5.12 – Andamento del COD all'interno del mixed liquor e della sua rimozione in percentuale.

I valori del COD solubile nell'effluente e della rimozione del COD sono rimasti piuttosto costanti per l'intera fase, assumendo valori solitamente compresi tra 13 e 14 g_{cod}/L e tra 30 % e 35 %, rispettivamente. Non essendoci stato un riavvio del reattore in corrispondenza dell'inizio della fase, anche i valori di questi parametri relativi alla parte iniziale si sono mantenuti analoghi a quelli registrati successivamente, anzi una maggiore variabilità si è verificata verso la fine. Il valore massimo, ottenuto il giorno 31, è stato di 14,83 g/L, mentre il valore minimo è stato riportato durante il giorno 21 ed è stato di 11,99 g/L. Il valore medio durante tutta la fase è stato di 13,51±0,8 g/L, mentre la rimozione media è stata del 32,44±4 %.

Oltre al substrato, come spiegato nel paragrafo 3.5.5, i batteri necessitano anche di nutrienti, tra i quali l'azoto. Per questo motivo si è sempre provveduto ad integrare la concentrazione di azoto presente nell'alimento con un certo quantitativo di NH₄Cl (vedi paragrafo 4.3.4). La Figura 5.13 mostra l'andamento dell'azoto totale TKN contestualmente alle sue componenti ammoniacale NH₃ e organica N_{org}.

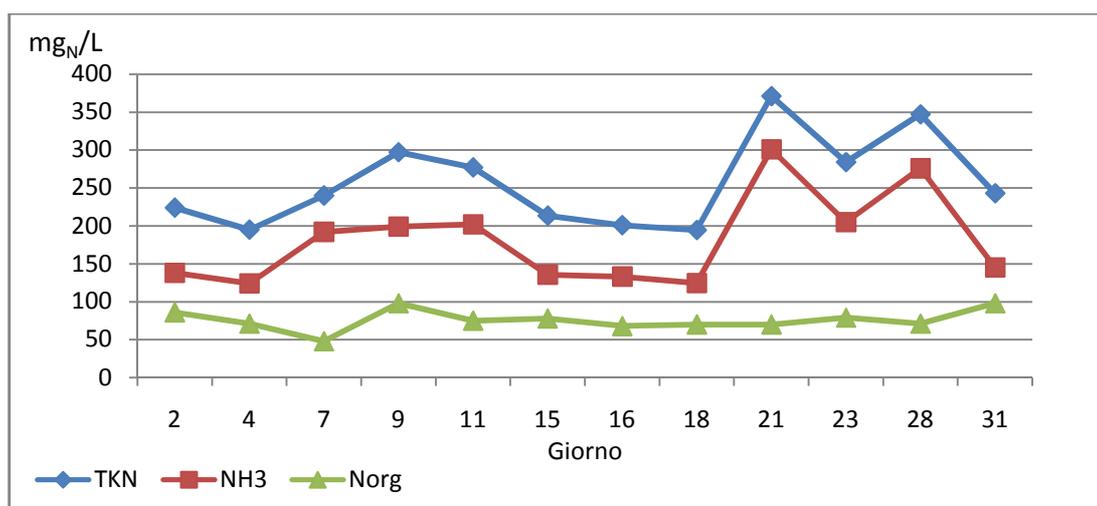


Figura 5.13 – Andamento dell'azoto totale, dell'azoto ammoniacale e dell'azoto organico all'interno del mixed liquor.

Come si evince dalla figura, l'andamento dell'azoto totale e di quello ammoniacale sono stati quasi del tutto analoghi. Si può notare come la concentrazione di azoto non sia rimasta costante durante la dark fermentation, se non per alcuni brevi periodi. Il massimo valore di concentrazione, sia per quanto riguarda l'ammoniaca sia per l'azoto totale (301 e 371 mg_N/L, rispettivamente), è stato raggiunto durante il giorno 21. L'azoto organico è stato calcolato effettuando una semplice differenza tra azoto totale e quello ammoniacale. Si può facilmente notare come la concentrazione dell'azoto organico sia stata inferiore e decisamente più

costante rispetto a quella dell'azoto ammoniacale, in particolare da dopo il giorno 21. I valori medi di concentrazione ottenuti sono stati i seguenti:

- TKN = $257,25 \pm 59$ mg_N/L
- NH₃ = $181,25 \pm 59,4$ mg_N/L
- Norg = $76 \pm 13,65$ mg_N/L

Si può quindi affermare che l'azoto totale fosse composto soprattutto da ammoniaca, ma, osservando la deviazione standard, si può anche comprendere come l'elevata variabilità della concentrazione di azoto totale dipendesse soprattutto dalla componente ammoniacale.

Come già detto, i solidi sospesi possono essere utilizzati quale parametro di quantificazione della biomassa. Il loro andamento è rappresentato in Figura 5.14.

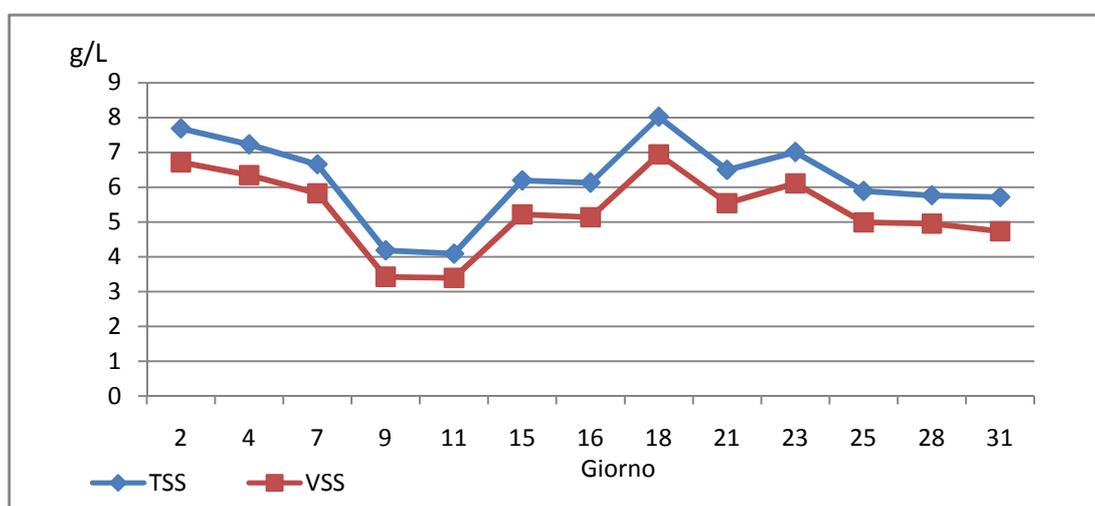


Figura 5.14 – Andamento dei solidi sospesi totali (TSS) e volatili (VSS) nel tempo.

Si sono confermate anche in questa fase la costanza del rapporto tra VSS e TSS e la predominanza dei VSS rispetto ai NVSS (si è ottenuto un rapporto medio VSS/TSS superiore a 0,85). Durante l'intera fase si è registrata una presenza consistente di granuli all'interno del mixed liquor, la quale ha influenzato la concentrazione di solidi sospesi, rendendola non costante (come è accaduto in fase 1). In particolare, le massime concentrazioni di solidi sospesi sono state registrate durante il periodo tra i giorni 2 e 7 e tra i giorni 18 e 23, a causa di un aumento nel numero e nella dimensione di questi granuli. I valori medi ottenuti sono stati i seguenti:

- TSS = $6,24 \pm 1,17$ g_{TSS}/L;
- VSS = $5,33 \pm 1,1$ g_{VSS}/L.

Nelle figure successive (Figura 5.15 e Figura 5.16) viene mostrato l'andamento dei VSS in relazione alla rimozione del COD e a quella dell'azoto; gli andamenti della resa netta di crescita e di consumo di azoto sono mostrati in Figura 5.17.

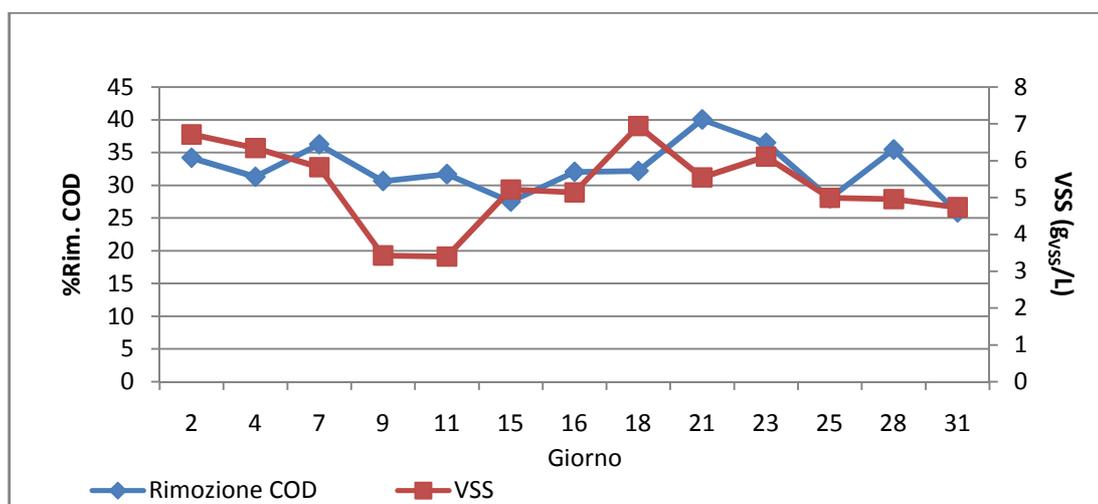


Figura 5.15 – Rimozione del COD all'interno del reattore, contestualmente alla produzione di VSS.

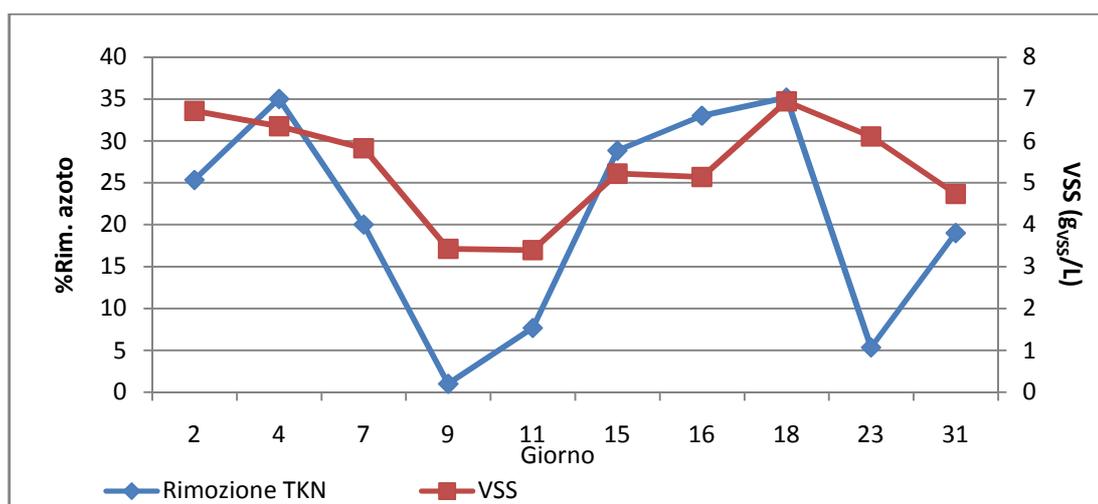


Figura 5.16 – Rimozione dell'azoto all'interno del reattore, contestualmente alla produzione di VSS.

La Figura 5.17 mostra come la Y sia variata solitamente tra 0,5 e 0,9 g_{VSS}/g_{CODrim} . Come accaduto nella fase precedente, i valori superiori a 0,3 non sono spiegabili con la sola crescita batterica. Come già detto, si deve quindi supporre che vi siano stati altri fenomeni in atto che hanno portato alla formazione di sospesi di origine organica. Il rapporto N/VSS è variato solitamente tra 5 e 15 mg_{Nrim}/g_{VSS} ed ha seguito l'andamento della crescita batterica Y .

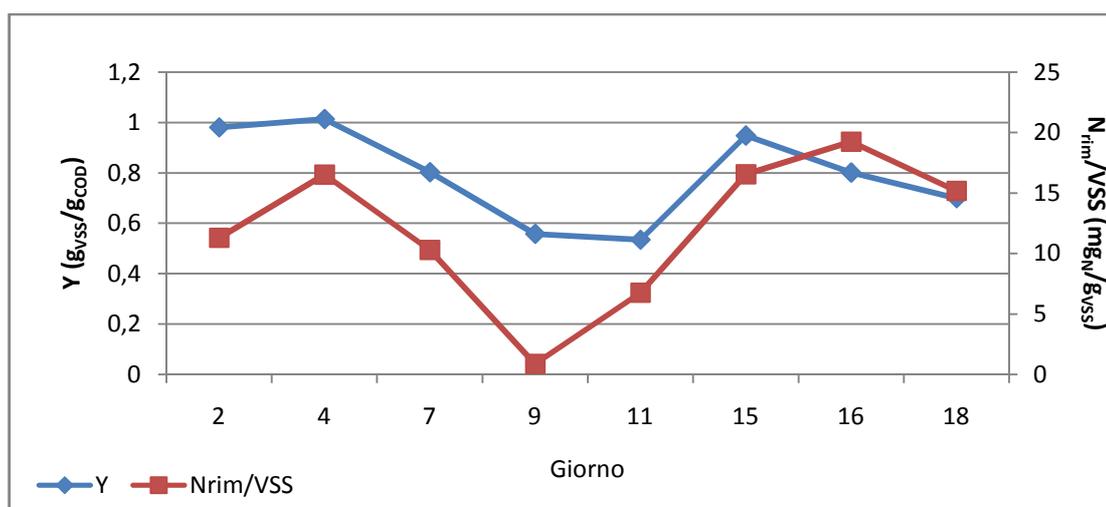


Figura 5.17 – Andamento della crescita batterica Y , contestualmente all'andamento del rapporto tra azoto rimosso e VSS formati.

Per verificare l'affidabilità dei risultati conseguiti, è stato effettuato il calcolo del bilancio di massa del COD. Per il principio di conservazione della massa, il COD entrante con l'alimento deve eguagliare quello in uscita. Il COD in uscita si compone del COD solubile residuo e del COD rimosso, il quale a sua volta si può scindere in due componenti, quello legato ai solidi sospesi volatili (e cioè alla biomassa) e quello trasformato in biogas. Non essendo la CO_2 legata al COD ed essendo il contenuto di metano risultato nullo, si assume che la componente di COD che è andata a costituire il biogas fosse solamente legata all'idrogeno. Il principio di conservazione della massa può essere quindi scritto come segue:

$$mCOD_{in} = mCOD_{out\ solubile} + mCOD_{VSS} + mCOD_{H_2}$$

Dove:

- $mCOD_{in}$ = massa di COD entrante con l'alimento;
- $mCOD_{out\ solubile}$ = massa di COD solubile residuo nel mixed liquor;
- $mCOD_{VSS}$ = massa di COD presente nei VSS;
- $mCOD_{H_2}$ = massa di idrogeno prodotto attraverso il COD;

Ogni termine è espresso in g_{COD} . Si sono utilizzati un rapporto di conversione dei VSS in COD di $1,42\ g_{COD}/g_{VSS}$ e un rapporto di conversione dell'idrogeno in COD di $0,71\ g_{COD}/L_{H_2}$ (rapporto ottenuto mediante la reazione dell'idrogeno con l'ossigeno a dare acqua).

Secondo il principio di conservazione della massa, il rapporto tra COD uscente e COD entrante dovrebbe essere pari a 1. Questo rapporto si è mantenuto sempre su valori prossimi all'unità, leggermente superiori. La massima differenza tra COD uscente ed entrante è stata registrata durante il giorno 18, quando il rapporto tra i due parametri è stato di 1,26. Il suo

valore medio è stato di 1,12. Le cause di un rapporto differente da 1 sono l'aver considerato il COD in ingresso con l'alimento sempre costante e pari a 20 g/L senza tenere conto delle possibili variazioni effettive, stante che il COD in alimento non veniva solitamente misurato, e, soprattutto, la presenza dei granuli, che ha influito sul calcolo dei VSS (e di conseguenza anche sul COD uscente), sovrastimandolo. Come già detto, non è chiaro se questi granuli fossero composti solamente da biomassa cresciuta attraverso la rimozione del COD. Si può sottolineare come le maggiori differenze tra COD in ingresso e quello in uscita siano state riscontrate durante i giorni in cui la presenza di granuli era più forte. La Figura 5.18 mostra la suddivisione in percentuale delle varie componenti del COD uscente e lo scarto in percentuale necessario a rendere pari a 1 il rapporto tra COD uscente e COD in ingresso.

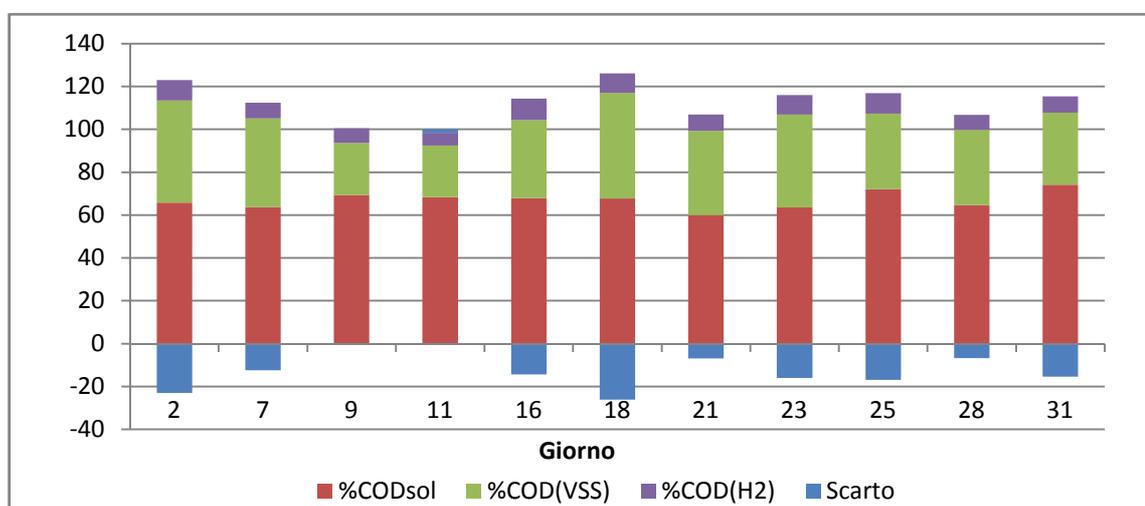


Figura 5.18 – Composizione percentuale del COD.

Attraverso il bilancio di massa si è conseguita la seguente composizione media del COD in uscita:

- $\text{COD}_{\text{out sol}} = 67,56 \pm 4 \%$;
- $\text{COD}_{\text{VSS}} = 37,88 \pm 7,8 \%$;
- $\text{COD}_{\text{H}_2} = 6,89 \pm 3,29 \%$.

Una percentuale di COD di poco inferiore al 7 % è stata convertita in idrogeno. La massima percentuale conseguita è stata di circa 9,9 %, durante il giorno 16.

Nel 46 % dei casi lo scarto è risultato superiore al 10 %, ma inferiore al 25 %. Nel complesso si può affermare che il bilancio del COD sia risultato accettabile a fronte dell'accuratezza delle misurazioni effettuate.

Questi valori e la complessiva bontà del bilancio portano quindi a concludere che, in queste condizioni, la quota parte del COD in alimento trasformata in idrogeno fosse modesta, mentre una consistente parte veniva trasformata in VSS.

5.3 Monitoraggio fase 2B: 22/8/2016 - 26/10/2016

Questa fase ha avuto inizio il 22/8/2016, quando il reattore, che era stato precedentemente spento per via delle vacanze estive, è stato riavviato. Le modalità di avvio sono spiegate nel paragrafo 4.1.1 e 4.3.1 e le condizioni con cui si è operato sono riassunte nella Tabella 5.5.

Tabella 5.5 – Condizioni operative della fase 2.

PARAMETRO	VALORE	UNITÀ DI MISURA
Volume mixed liquor	3	L
Velocità di rotazione	200	RPM
pH	5,5	-
Temperatura	36	°C
HRT	9	h
Portata in ingresso	8	L/d
COD in ingresso	20	g _{cod} /L

Dopo l'avvio del sistema in data 22/8/2016, a causa di differenti problematiche, l'impianto è stato spento e riavviato anche in altre situazioni:

- Tra i giorni 53 e 55 l'impianto è rimasto spento a causa di un temporale che il giorno 53 ha fatto saltare la corrente. Alle 14:00 del giorno 57 è stata ripristinata la modalità in continuo;
- il giorno 21 il pompaggio in ingresso si è interrotto per circa 6 ore, a causa di un malfunzionamento della pompa. Inoltre sempre in quella data, a causa di un eccessivo pompaggio della soluzione basica, la biomassa nel reattore si è ridotta di molto. Il giorno 23 si è operato in batch, mentre la modalità in continuo è stata ripristinata il giorno 24.

Durante le analisi svolte in date prossime al riavvio del sistema, si sono registrati dei valori differenti, relativi ai diversi parametri analizzati, rispetto a quelli ottenuti in precedenza. Questo è dovuto al fatto che le condizioni operative impiegano qualche giorno prima di ristabilirsi, in dipendenza dalla gravità della situazione. Per i diversi parametri analizzati si sono ottenuti dei valori anomali, solitamente costituenti dei massimi o dei minimi, che non sono stati poi considerati nel calcolo dei valori medi conseguiti durante l'intera fase, in quanto non rappresentativi delle normali condizioni operative. Nei grafici è stata posizionata una linea retta verticale in corrispondenza dei giorni in cui il sistema è stato riavviato. In

particolare, il sistema ha impiegato diverso tempo prima di stabilizzarsi dopo l'interruzione del giorno 21. Molto più veloce è invece stato il riassetto dopo il riavvio del giorno 56. Le ragioni principali sono le seguenti: i dati raccolti più prossimi al secondo riavvio sono relativi al giorno 58, mentre riguardo al primo riavvio, sono state effettuate analisi anche quando il sistema operava ancora in batch (giorno 23); il primo riavvio è stato causato da un anomalo pompaggio dell'idrossido di sodio, che ha innalzato il pH fino a valori prossimi all'11, uccidendo gran parte della biomassa. Il periodo più rappresentativo della fase è stato quello che va dal giorno 32 (quando il sistema si è completamente ristabilito dopo il riavvio del giorno 23) al giorno 53. Si tratta di un periodo di una ventina di giorni in cui il sistema ha potuto operare in continuo senza intercorrere in problematiche esterne, relative a malfunzionamenti delle pompe o altri fattori. Le condizioni operative si sono stabilite anche durante il periodo iniziale che va dal giorno 3 al giorno 18 e nel periodo finale, tra i giorni 60 e 67, ma, trattandosi di lassi di tempo di durata inferiore, sono meno rappresentativi, in particolare per quel che concerne il periodo finale, in cui le condizioni di funzionamento sono sembrate essere ancora in leggero mutamento.

Nella figura 5.19 è mostrata la resa di produzione di idrogeno.

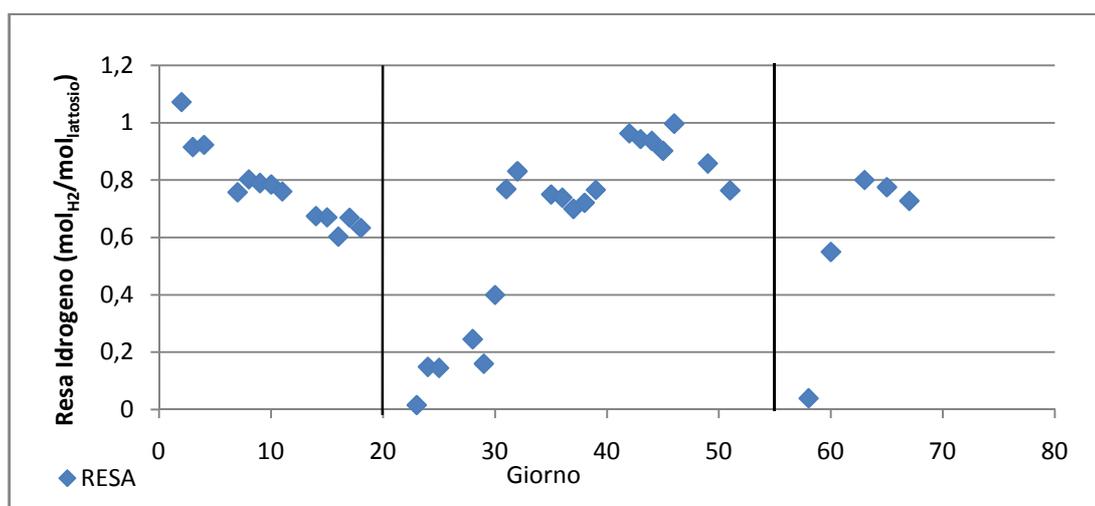


Figura 5.19 – Resa di produzione dell'idrogeno.

Come si può osservare, l'andamento è stato piuttosto discontinuo (a causa anche delle problematiche occorse e dei riavvii del reattore), ma, se si considerano soltanto i periodi di normale funzionamento dell'impianto, si può notare come la resa abbia spaziato tra 0,6 e 1 mol_{H₂}/mol_{lattosio}, come d'altronde era successo nella fase 2A.

La Figura 5.20 illustra la composizione del biogas, contestualmente alla portata di idrogeno.

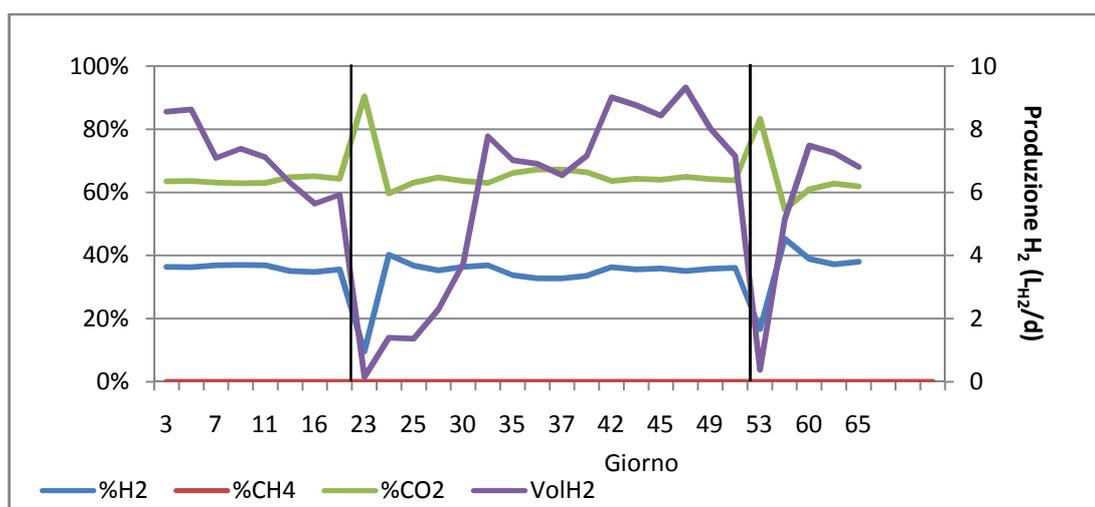


Figura 5.20 – Confronto tra l'andamento della produzione di idrogeno e la composizione del biogas.

Si evince come il trend relativo alla produzione di idrogeno abbia solitamente seguito quello del contenuto di idrogeno nel biogas. Ma, a differenza del contenuto di idrogeno, la portata di idrogeno è sembrata aumentare più lentamente nei periodi successivi al riavvio del sistema. Questo è visibile soprattutto analizzando i loro trend tra i giorni 23 e 32: mentre il contenuto di idrogeno registrato durante giorno 24 è stato piuttosto elevato (40 %), la portata di idrogeno ha iniziato ad essere più consistente soltanto a partire dal giorno 31 (7,19 L_{H₂}/d). Sembrerebbe dunque che dopo la riattivazione del sistema la biomassa produca una scarsa quantità di idrogeno, contestuale però ad una bassa presenza di CO₂, permettendo così di avere un più elevato contenuto percentuale di idrogeno. Considerando invece i periodi in cui le condizioni operative erano completamente ristabilite, l'andamento dei due parametri si può considerare analogo.

Il contenuto di idrogeno, considerando solo i periodi di normale funzionamento, si è mantenuto solitamente tra il 34 % e il 38 %, mentre quello di CO₂ tra il 62 % e il 67 %. Durante i periodi successivi ai due riavvii dell'impianto, si è registrato dapprima un contenuto minimo di idrogeno (e massimo di CO₂), seguito da un contenuto massimo di idrogeno (e minimo di CO₂). Dopodiché il contenuto ha iniziato a diminuire lentamente sino a raggiungere i livelli conseguiti in condizioni operative stabili, restando poi pressoché costante su questi valori. Anche durante questa fase non è stata registrata produzione di metano.

La produzione di H₂ è rimasta solitamente compresa tra 6 e 9 L_{H₂}/d, durante i periodi in cui le condizioni stabili sussistevano. I minimi valori si sono ottenuti, naturalmente, durante i giorni successivi alle problematiche occorse, di cui si è precedentemente discusso; in particolare la biomassa ha impiegato abbastanza tempo a riprendersi dopo il riavvio del

giorno 23. Una migliore produzione è stata riscontrata tra i giorni 42 e 46, ma, poi, essa ha iniziato a diminuire dal giorno 49, probabilmente a causa del contestuale aumento nella produzione di VFA, come illustrato in Figura 5.21.

Nella Tabella 5.6 vengono indicati i valori massimi e minimi di portata e resa di idrogeno registrati.

Tabella 5.6 – Valori minimo e massimo della produzione di idrogeno e della resa di produzione di idrogeno.

	Giorno	VolH ₂ [L _{H₂/d}]	Resa [mol _{H₂} / mol _{lattosio}]
Massimo	2	10,02	1,07
Minimo	23	0,15	0,019

Riassumendo, la resa, la produzione e i contenuti medi ottenuti sono stati:

- Resa = $0,71 \pm 0,27$ mol_{H₂}/mol_{lattosio};
- Vol_{H₂} = $6,66 \pm 2,52$ L_{H₂}/d;
- H₂ = 36 %;
- CO₂ = 64 %;
- CH₄ = 0 %.

Dunque, i risultati conseguiti sono molto simili a quelli ottenuti in fase 2A, rispetto alla quale, però, si è registrato un leggero miglioramento del contenuto medio di idrogeno (in fase 2A era del 33 %).

La Figura 5.21 mostra l'andamento della portata di idrogeno in relazione alla produzione degli acidi grassi volatili (VFA).

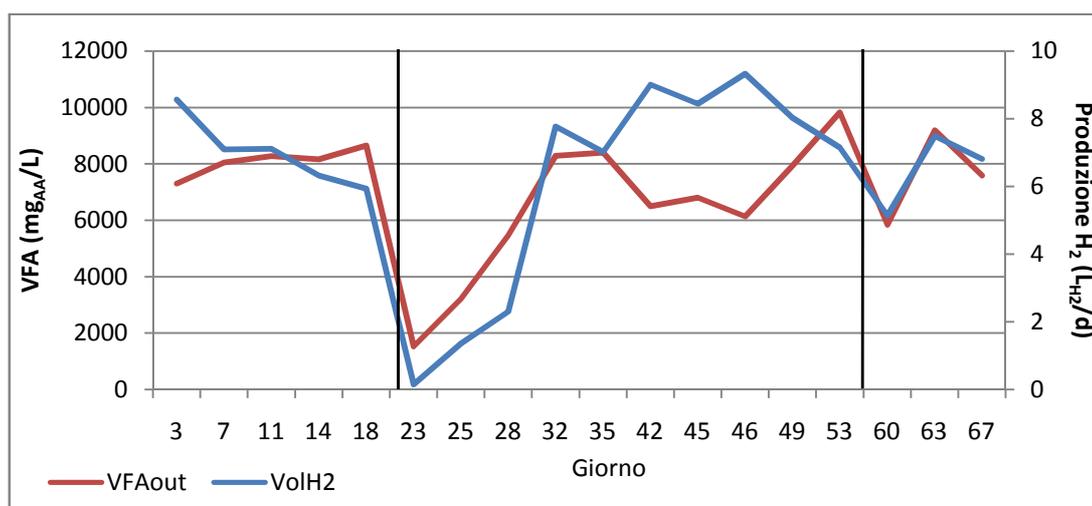


Figura 5.21 – Confronto tra portata di idrogeno [L_{H₂}/d] e concentrazione di VFA [mg_{AA}/L].

Considerando i soli periodi di normale funzionamento dell'impianto, si può osservare come l'andamento della produzione di idrogeno sia stata inversamente proporzionale alla concentrazione di VFA: quando la presenza di VFA è aumentata, la portata di idrogeno è diminuita. Questo fenomeno è particolarmente visibile se si osserva l'andamento dei due parametri tra i giorni 28 e 53, quando portata di idrogeno e concentrazione di VFA hanno avuto un trend quasi speculare (la specularità è discernibile anche per quel che concerne il periodo iniziale tra i giorni 1 e 18, anche se in maniera meno marcata). Considerando invece i periodi prossimi alla riattivazione dell'impianto, si è registrato lo stesso andamento da parte dei due parametri, poiché, non essendo ancora acclimatata la biomassa ed essendo sia l'idrogeno che gli acidi grassi volatili prodotti della dark fermentation, si è verificata una scarsa produzione di idrogeno contestuale a una scarsa produzione di VFA. In particolare, il valore più basso ($1535 \text{ mg}_{\text{AA}}/\text{L}$) è stato registrato durante il giorno 23. Dunque, anche la formazione di VFA ha impiegato diverso tempo dopo il riavvio del giorno 23 a ristabilirsi. Il massimo ($9825 \text{ mg}_{\text{AA}}/\text{L}$) è stato ottenuto durante il giorno 53 e, forse, il contenuto di VFA sarebbe stato destinato ad incrementarsi senza l'interruzione del funzionamento relativo al giorno 54, andando probabilmente ad inibire ulteriormente la produzione di idrogeno. Il valore medio di concentrazione dei VFA è stato di $7391,18 \text{ mg}_{\text{AA}}/\text{L}$.

In Figura 5.22 è mostrato l'andamento della componente uscente di COD legata ai VFA (calcolata come in precedenza), rispetto a quello del COD entrante e del COD uscente. Si può notare come, normalmente, circa la metà del COD nell'effluente fosse legata ai VFA (mentre durante i periodi prossimi al riavvio del reattore, la componente di COD relativa ai VFA è stata di molto inferiore).

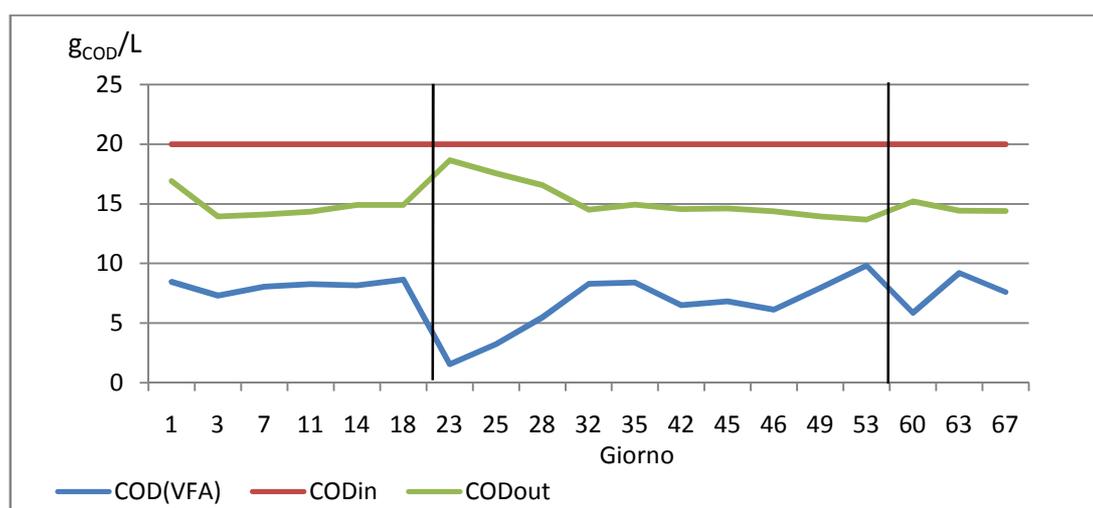


Figura 5.22 – Andamento del COD in (assunto costante e pari a 20 g/L), del COD out e della quota parte di COD out relativa ai VFA.

I VFA, essendo acidi, tendono ad abbassare il pH all'interno del reattore. Per mantenere il pH intorno al valore di 5,5, viene dosata all'occorrenza una certa quantità di idrossido di sodio, che, essendo una soluzione basica, contrasta l'acidità dei VFA, aumentando il pH (vedi paragrafo 4.2.4). Dunque, in caso di un incremento nella produzione di VFA, anche il dosaggio della base dovrebbe aumentare, come mostrato in Figura 5.23.

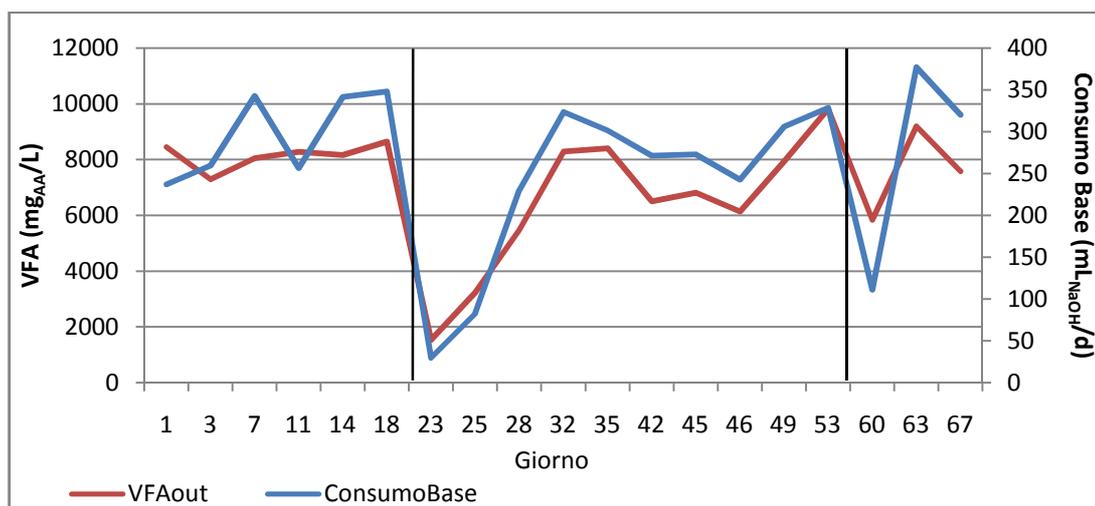


Figura 5.23 – Confronto tra l'andamento dei VFA [$\text{mg}_{\text{AA}}/\text{L}$] del mixed liquor e il consumo di NaOH [$\text{mL}_{\text{NaOH}}/\text{d}$].

L'andamento dei VFA e quello del consumo di NaOH sono stati all'incirca analoghi, tranne che per alcune eccezioni. Anche per il consumo di NaOH il minimo ($30 \text{ mL}_{\text{NaOH}}/\text{d}$) è stato raggiunto durante il giorno 23, mentre il massimo consumo ($377 \text{ mL}_{\text{NaOH}}/\text{d}$) è stato registrato durante il giorno 63, non in corrispondenza della massima concentrazione di VFA, ma, comunque, durante quel giorno la presenza di VFA è stata decisamente elevata ($9195 \text{ mg}_{\text{AA}}/\text{L}$). Il consumo medio di NaOH è stato di $282,28 \text{ mL}_{\text{NaOH}}/\text{d}$.

In Figura 5.24 sono mostrati l'andamento del COD solubile all'interno del mixed liquor e della sua rimozione.

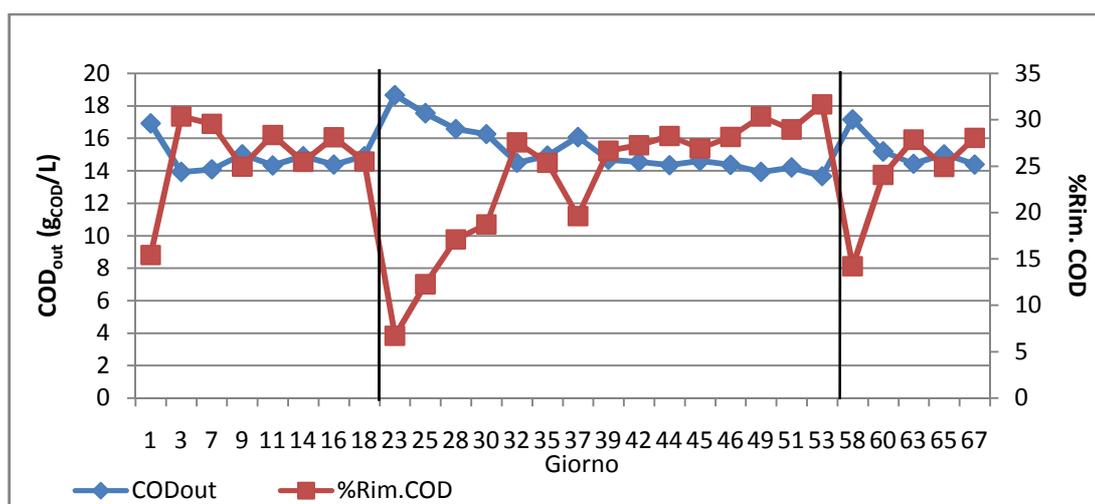


Figura 5.24 – Andamento del COD all'interno del mixed liquor (in blu) e della sua rimozione in percentuale (in rosso).

I valori massimi di COD nell'effluente sono stati ottenuti nei momenti in cui il reattore è stato riavviato, quando la biomassa degradante non si era ancora ben sviluppata. Il valore massimo, ottenuto il giorno 23, è stato di 18,66 g/L, mentre il valore minimo è stato riportato durante il giorno 53 ed è stato di 13,67 g/L. Si può anche notare come l'andamento del COD sia rimasto piuttosto costante, con concentrazioni solitamente comprese tra i 14 e i 15 g/L, durante i periodi di normale funzionamento. Un'unica eccezione è rappresentata dal giorno 37, data in cui si è misurato un contenuto di COD nel mixed liquor pari a 16,08 g/L. Il valore medio durante tutta la fase è stato di $14,83 \pm 0,72$ g/L. La rimozione minima di COD è stata registrata durante il giorno 23 (6,7 %) ed è rimasta piuttosto bassa fino al giorno 32, quando è tornata ad essere all'incirca sui valori medi conseguiti. Tra i giorni 32 e 53 la rimozione del COD è rimasta pressoché costante (escludendo il giorno 37) tra il 25 % e il 30 %, tendendo ad aumentare lentamente, raggiungendo il massimo valore di rimozione registrato durante la fase del 31,65 %, durante il giorno 53. La rimozione media è stata del $25,83 \pm 3,6$ %.

La Figura 5.25 mostra l'andamento dell'azoto totale contestualmente alle sue componenti ammoniacale e organica.

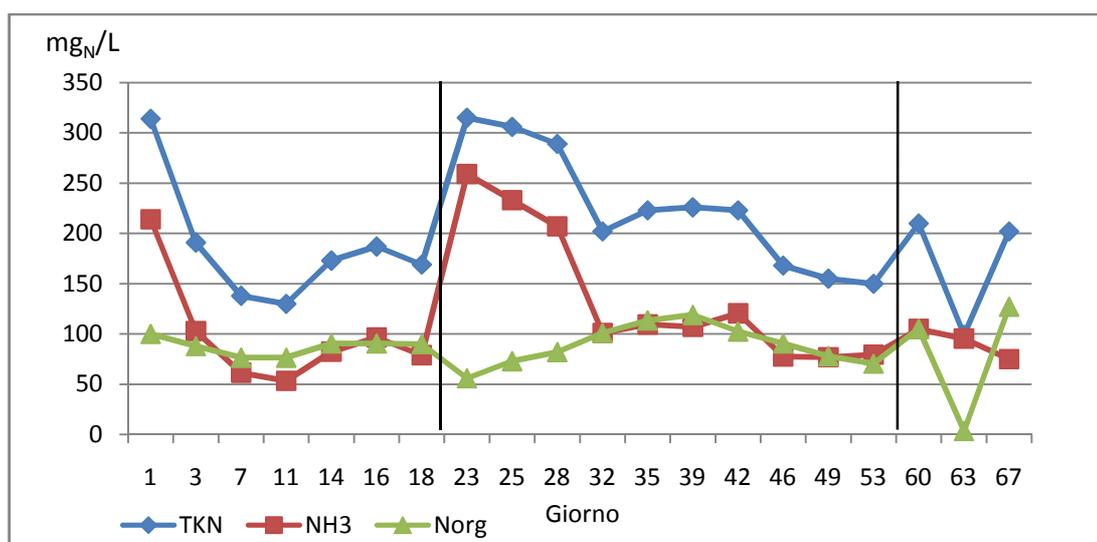


Figura 5.25 – Andamento dell'azoto totale, dell'azoto ammoniacale e dell'azoto organico all'interno del mixed liquor.

Gli andamenti dell'azoto totale e di quello ammoniacale sono stati abbastanza analoghi. Si può notare come la concentrazione di azoto non sia rimasta costante durante la dark fermentation, se non per alcuni brevi periodi. Durante il giorno 63 (giorno in cui azoto totale e ammoniacale sono stati più prossimi) è sembrato esserci stato un calo del solo azoto totale, il quale è poi aumentato nuovamente. Il massimo valore di concentrazione, sia per quanto riguarda l'ammoniaca sia per l'azoto totale (259 e 315 mg_N/L, rispettivamente), è stato raggiunto durante il giorno 23: il reattore era stato da poco riavviato, la biomassa non si era ancora bene sviluppata e così non si è registrato un elevato consumo di azoto da parte di essa. Tralasciando i periodi prossimi alla riaccensione del reattore, si può notare come la concentrazione di ammoniaca e di azoto organico siano state molto simili, con l'eccezione del giorno 63, quando l'azoto organico presente è risultato praticamente nullo. Inoltre, mentre si sono registrati dei picchi per quanto riguarda l'ammoniaca durante i giorni successivi a un riavvio del reattore (in particolare tra i giorni 23 e 28), la concentrazione dell'azoto organico non sembra aver risentito del cambiamento, restando all'incirca invariata. I valori medi di concentrazione ottenuti sono stati i seguenti:

- TKN = 191,18±57,87 mg_N/L
- NH₃ = 103,53±51,4 mg_N/L
- Norg = 87,65±25,82 mg_N/L

Si può quindi affermare che l'azoto totale fosse composto più o meno in uguale proporzione da azoto organico e ammoniacale, con una leggera predominanza di quest'ultima.

In Figura 5.26 è mostrato l'andamento nel tempo dei solidi sospesi.

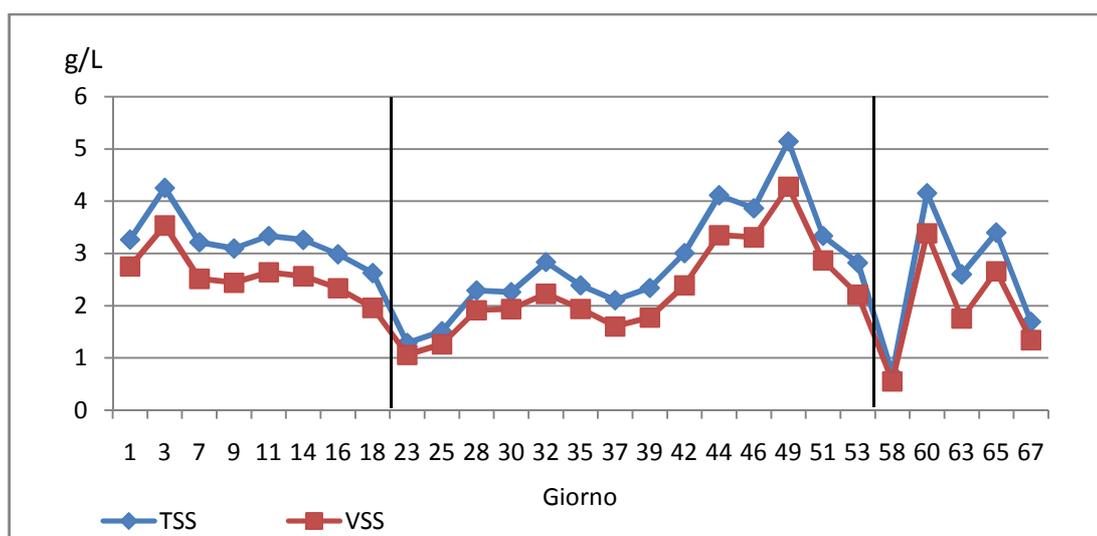


Figura 5.26 – Andamento dei solidi sospesi totali (TSS) e volatili (VSS) nel tempo.

Si è ottenuto un rapporto medio VSS/TSS di 0,8. I valori minimi per TSS e VSS sono stati ottenuti durante i giorni prossimi alla riaccensione del reattore, in quanto la biomassa non era bene sviluppata e, perciò, la sua concentrazione in termini di VSS è risultata minore. Durante l'intera fase si è registrata una leggera formazione di granuli all'interno del mixed liquor, la quale ha influenzato la concentrazione di solidi sospesi, rendendola non costante. Le massime concentrazioni di solidi sospesi sono state registrate durante il periodo tra i giorni 42 e 49, a causa di un leggero aumento nel numero e nella dimensione di questi granuli. Senza considerare questo periodo, negli altri momenti di normale funzionamento, però, la concentrazione di VSS è rimasta solitamente compresa tra i 2 e i 4 g/L, e lo stesso vale per i TSS. Dal giorno 58 non è più stata registrata la presenza di granuli, in quanto, prima del riavvio del sistema relativo al giorno 56, il reattore è stato aperto e pulito ed inoltre sono stati puliti i tubi dell'alimento e della soluzione basica. Ad ogni modo la presenza di granuli è sempre rimasta molto meno consistente rispetto a quella registrata durante le precedenti fasi e sembra aver inciso in maniera decisamente inferiore sul calcolo dei VSS. I valori medi ottenuti sono stati i seguenti:

- TSS = $2,93 \pm 0,84$ g_{TSS}/L;
- VSS = $2,35 \pm 0,73$ g_{VSS}/L.

Nelle figure 5.27 e 5.28 viene mostrato l'andamento dei VSS in relazione alla rimozione del COD e a quella dell'azoto, mentre gli andamenti della Y e del consumo di N sono riportati in Figura 5.29.

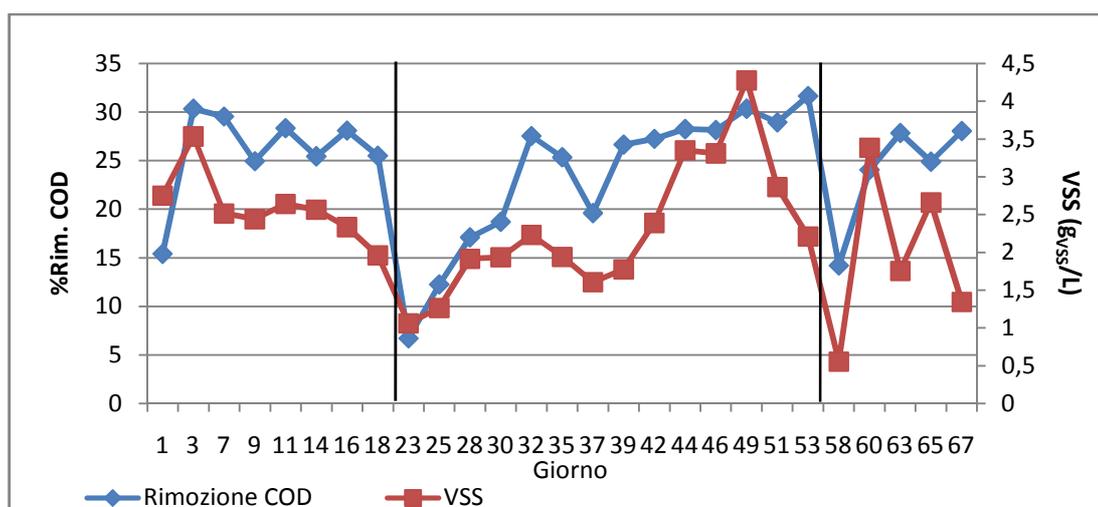


Figura 5.27 – Rimozione del COD all'interno del reattore, contestualmente alla produzione di VSS.

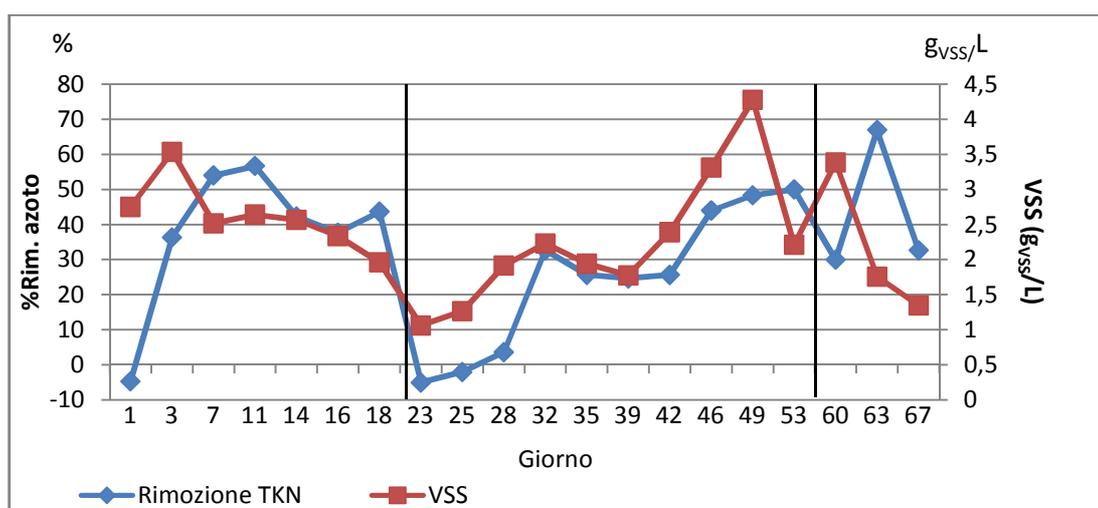


Figura 5.28 – Rimozione dell'azoto all'interno del reattore, contestualmente alla produzione di VSS.

La Figura 5.29 mostra come la Y sia variata solitamente tra 0,3 e 0,6 g_{VSS}/g_{CODrim} . In questo caso, i valori sono risultati più prossimi a quelli caratteristici dei batteri anaerobici, dunque, si ha un'ulteriore conferma del fatto che i granuli presenti in maniera consistente durante le precedenti fasi non fossero composti soltanto da biomassa formata attraverso la degradazione del COD. Il rapporto N/VSS è stato molto variabile (solitamente tra 30 e 60 mg_N/g_{VSS}) e più elevato che in precedenza.

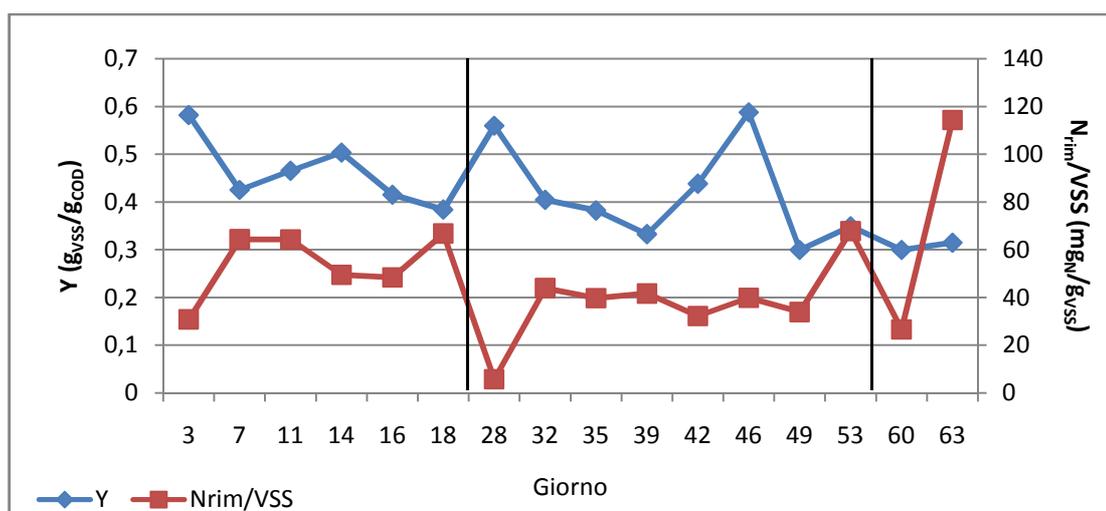


Figura 5.29 – Andamento della crescita batterica Y , contestualmente all'andamento del rapporto tra azoto rimosso e VSS formati.

Attraverso il bilancio di massa del COD si è osservato che il rapporto tra COD uscente e COD entrante si sia mantenuto sempre su valori prossimi all'unità. La massima differenza tra COD uscente ed entrante è stata registrata durante il giorno 67, quando il rapporto tra i due parametri è stato di 0,895. Comunque, normalmente, questo rapporto si è mantenuto sempre su valori superiori allo 0,94. Il suo valore medio è stato di 0,993: l'aver ottenuto un valore medio così prossimo a 1, significa che il principio di conservazione della massa sia stato rispettato. La Figura 5.30 mostra la suddivisione in percentuale delle varie componenti del COD uscente e lo scarto in percentuale necessario a rendere pari a 1 il rapporto tra COD uscente e COD in ingresso. Si può sottolineare come gli scarti maggiori si siano ottenuti durante il periodo in cui la presenza granulare è stata maggiore, andando a sovrastimare la componente di COD legata ai VSS (come era accaduto anche in fase 2A).

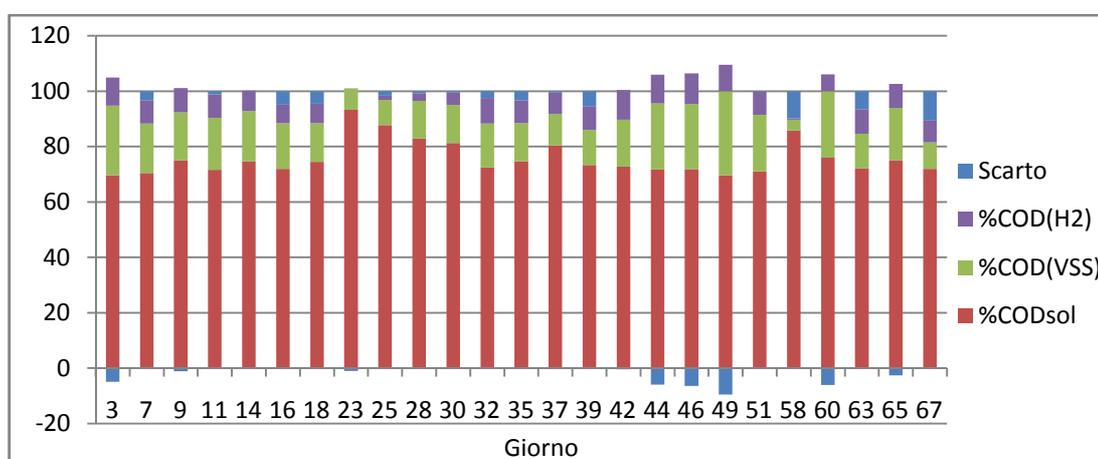


Figura 5.30 – Composizione percentuale del COD.

Si è conseguita la seguente composizione media del COD in uscita:

- $\text{COD}_{\text{out sol}} = 74,47 \pm 4,54 \%$;
- $\text{COD}_{\text{VSS}} = 17,28 \pm 5,37 \%$;
- $\text{COD}_{\text{H}_2} = 7,866 \pm 2,33 \%$.

Una percentuale di COD di poco inferiore all'8 % è stata convertita in idrogeno. La massima percentuale conseguita è stata di circa 11,03 %, durante il giorno 46. Lo scarto è sempre risultato inferiore al 10 % e nel 68 % dei casi è stato inferiore al 5 %, dunque si può affermare che il bilancio del COD sia stato decisamente rispettato.

5.4 Monitoraggio fase 3A: 2/11/2016 - 23/12/2016

Il giorno 28/10/2016 il reattore è stato spento, in quanto il laboratorio sarebbe rimasto chiuso fino al 2/11/2016. Al riavvio, si è deciso di cambiare condizioni operative (riassunte in Tabella 5.7), operando le due importanti novità descritte nel paragrafo 4.1.1, ovvero la creazione di un nuovo mixed liquor e il passaggio a 10 $\text{g}_{\text{COD}}/\text{L}$ in alimento.

Tabella 5.7 – Condizioni operative della fase 3.

PARAMETRO	VALORE	UNITÀ DI MISURA
Volume mixed liquor	3	L
Velocità di rotazione	200	RPM
pH	5,5	-
Temperatura	36	°C
HRT	9	h
Portata in ingresso	8	L/d
COD in ingresso	10	$\text{g}_{\text{COD}}/\text{L}$

Sebbene secondo la teoria, a fronte di una diminuzione della concentrazione di COD alimentata, si sarebbe dovuta conseguire una minore produzione da parte della biomassa, in questo caso, nonostante il passaggio da 20 $\text{g}_{\text{COD}}/\text{L}$ a 10 $\text{g}_{\text{COD}}/\text{L}$ in alimento, non è accaduto, anzi, la produzione è migliorata: dunque, la presenza di granuli sembrerebbe aver evidentemente influito negativamente sulla produzione passata. [48] Forse anche perché i granuli erano composti anche da biomassa non idrogenogena, comportando una maggiore competizione per il substrato, oppure era presente biomassa consumatrice di idrogeno, per esempio i batteri omoacetogeni. Altra possibile spiegazione è la seguente: lavorare con alte concentrazioni di substrato potrebbe migliorare l'efficienza del processo mesofilo, ma potrebbe anche comportare inibizione da acido butirrico e altri prodotti. [34] Inoltre,

durante alcuni studi si è riscontrata una riduzione delle rese di idrogeno all'aumentare dell'OLR, in quanto potrebbe verificarsi la contestuale produzione di propionato e di etanolo. [100] Si sono conseguite delle rese di H₂ più elevate, grazie al più consistente tasso di produzione di biogas, con la conseguente maggiore turbolenza e minore pressione parziale dell'idrogeno. [48]

Il giorno 22 è stata sostituita l'obsoleta e non sempre costante pompa peristaltica volta all'immissione dell'alimento nel reattore con una pompa più recente, di marca Watson Marlow.

Il processo di dark fermentation durante questa fase può essere suddiviso in quattro momenti principali:

- 1) fase iniziale instabile (giorni 0-26): durante questo lungo periodo iniziale, i parametri analizzati non hanno rivelato valori stabili nel tempo, forse a causa delle problematiche legate al pompaggio in ingresso non costante e del tempo richiesto dalla biomassa per svilupparsi e acclimatarsi completamente;
- 2) miglioramento (giorni 26-40): durante questo periodo si è verificato un miglioramento della produzione, fino a raggiungere il massimo durante il giorno 38;
- 3) problemi con l'alimento (giorni 40-44). Fino al giorno 39 è stata ottenuta un'ottima produzione di idrogeno, ma, il giorno 40, improvvisamente, la produzione è calata verso le ore 12:00. La causa di questo calo improvviso è sembrata essere l'alimento preparato durante il giorno 40, infatti, la produzione è iniziata a decrescere appena dopo aver sostituito il vecchio alimento con quello nuovo: era stata utilizzata una nuova tanica di siero di latte e, all'interno di essa, è stata riscontrata la presenza di alcuni grossi granuli bianchi, perciò, sebbene la tanica fosse chiusa e conservata in frigorifero, alcuni batteri sono riusciti a svilupparsi all'interno di essa. Ad ogni modo sarebbero state necessarie delle analisi a riguardo. La produzione ha cominciato a riprendersi soltanto dal giorno 43;
- 4) miglioramento finale (44-51): la produzione dal giorno 44 ha iniziato a incrementarsi nuovamente, fino a conseguire i valori raggiunti durante la fine del secondo periodo. I risultati ottenuti attraverso le analisi sono rimasti pressoché invariati durante quest'ultimo breve lasso di tempo: è sembrato che le condizioni stabili fossero state raggiunte. Il giorno 51 il reattore è stato poi spento in vista del periodo di chiusura del laboratorio durante le vacanze invernali.

Nella figura 5.31 è mostrata la resa di produzione di idrogeno.

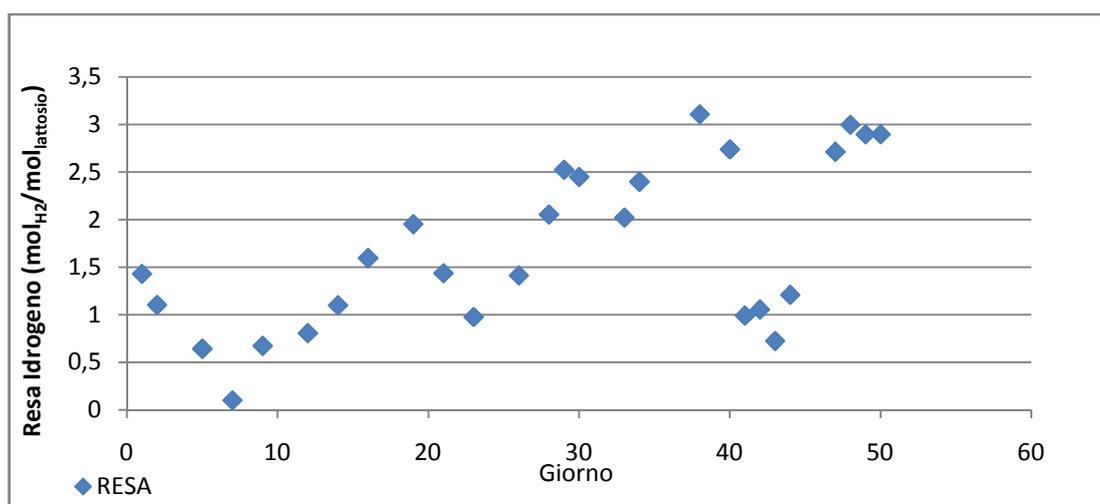


Figura 5.31 – Resa di produzione dell'idrogeno.

Come si può osservare, l'andamento della resa di idrogeno è stato piuttosto discontinuo, ma, se si considerano soltanto i periodi di normale funzionamento dell'impianto, che corrispondono ai periodi in cui si sono conseguite rese di idrogeno maggiori, questo parametro è rimasto all'incirca costante, spaziando tra i valori di 2,5 e 3 mol_{H2}/mol_{lattosio}. Si tratta di ottimi risultati, ma bisogna comunque sottolineare la brevità dei periodi in cui le condizioni sono sembrate essere stabili: escludendo quei brevi periodi, la resa ha assunto valori molto differenti e inferiori. Come già ipotizzato, la migliore produzione conseguita durante il corso di questa fase, rispetto alle fasi precedenti, può essere dovuta a diverse cause: minore produzione di VFA, assenza di granuli, minore inibizione da parte di altri microrganismi.

La Figura 5.32 illustra la composizione del biogas, contestualmente alla portata di idrogeno.

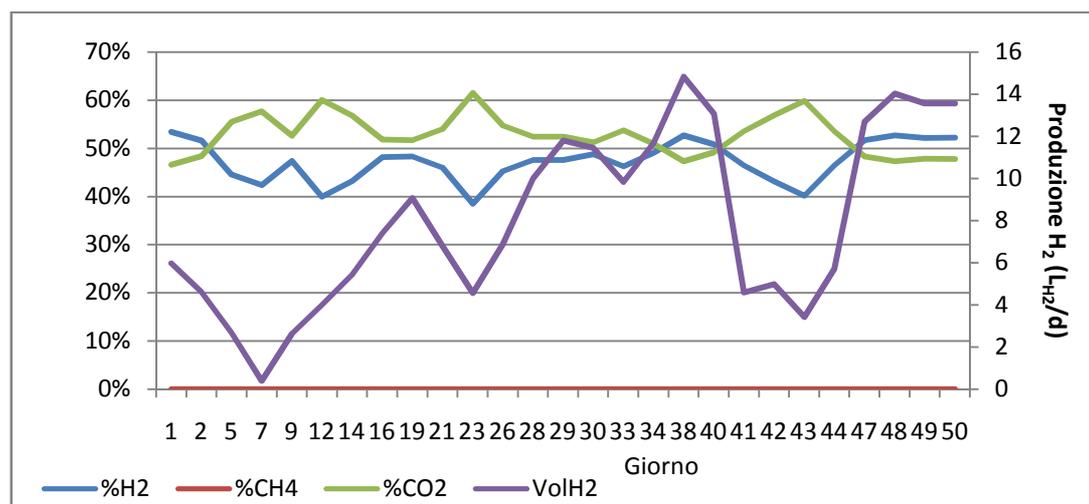


Figura 5.32 – Confronto tra l'andamento della produzione di idrogeno e la composizione del biogas.

Dalla figura si evince come il trend relativo alla produzione di idrogeno abbia solitamente seguito quello del contenuto di idrogeno nel biogas. Ma, a differenza del contenuto di idrogeno, la portata di idrogeno è sembrata risentire maggiormente delle problematiche relative alla pompa in ingresso e al siero di latte contaminato (in quest'ultima situazione si è verificato un repentino abbassamento della produzione idrogenica da circa 13 a poco più di 4 L_{H_2}/d). Considerando invece i periodi in cui le condizioni operative erano completamente ristabilite, l'andamento dei due parametri si può considerare analogo.

Il contenuto di metano è sempre stato nullo. Normalmente il contenuto di idrogeno si è mantenuto tra il 40 % e il 50 %, mentre quello di CO_2 tra il 50 % e il 60 %. Si è registrato un maggior contenuto di H_2 rispetto a quello di CO_2 durante il periodo finale (dal giorno 47 in poi) e tra i giorni 38 e 40. Proprio questi due periodi coincidono con quelli in cui le condizioni sono rimaste più stabili, dunque, sembrerebbe che, durante il normale funzionamento, a queste condizioni operative, il contenuto di idrogeno all'interno del biogas sia superiore al 50 %.

In condizioni stabili la produzione di H_2 è rimasta compresa tra 13 e 15 L_{H_2}/d .

Nella Tabella 5.8 vengono indicati i valori massimi e minimi di portata e resa di idrogeno registrati.

Tabella 5.8 – Valori minimo e massimo della portata giornaliera di idrogeno e della resa di produzione di idrogeno.

	Giorno	VolH2 [L_{H_2}/d]	Resa [$mol_{H_2}/ mol_{lattosio}$]
Massimo	38	14,82	3,11
Minimo	7	0,39	0,1

Riassumendo, la resa, la produzione e i contenuti medi ottenuti sono stati:

- Resa = $1,7 \pm 0,87 mol_{H_2}/mol_{lattosio}$;
- $Vol_{H_2} = 7,98 \pm 4,18 L_{H_2}/d$;
- $H_2 = 47\%$;
- $CO_2 = 53 \%$;
- $CH_4 = 0 \%$.

La Figura 5.33 mostra un confronto tra gli andamenti della portata d'idrogeno e dei VFA prodotti, in cui si può osservare come l'andamento della produzione di idrogeno sia stato, più chiaramente rispetto alle precedenti fasi, inversamente proporzionale alla concentrazione di VFA: quando la presenza di VFA è diminuita, la portata di idrogeno è aumentata.

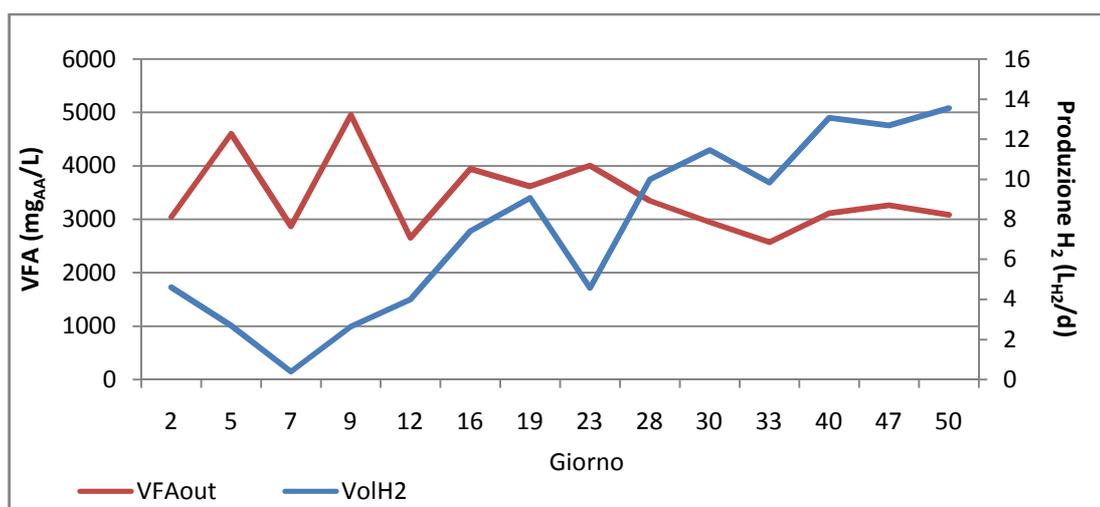


Figura 5.33 – Confronto tra portata di idrogeno e concentrazione di VFA.

La concentrazione di VFA nel tempo è stata piuttosto discontinua inizialmente, dopodiché si è stabilizzata intorno ai 3000 mg_{AA}/L dal giorno 28 in poi. In particolare, il valore più basso (2570 mg_{AA}/L) è stato registrato durante il giorno 33, mentre il massimo (4955 mg_{AA}/L) è stato ottenuto durante il giorno 9. Il valore medio di concentrazione dei VFA è stato di 3429,64 mg_{AA}/L. La minor produzione di VFA, rispetto alle fasi 1 e 2, era auspicabile per via del minor carico di COD in ingresso.

La Figura 5.34 mostra gli andamenti seguiti dal COD in ingresso e in uscita e dalla quota di COD uscente relativa agli acidi grassi volatili.

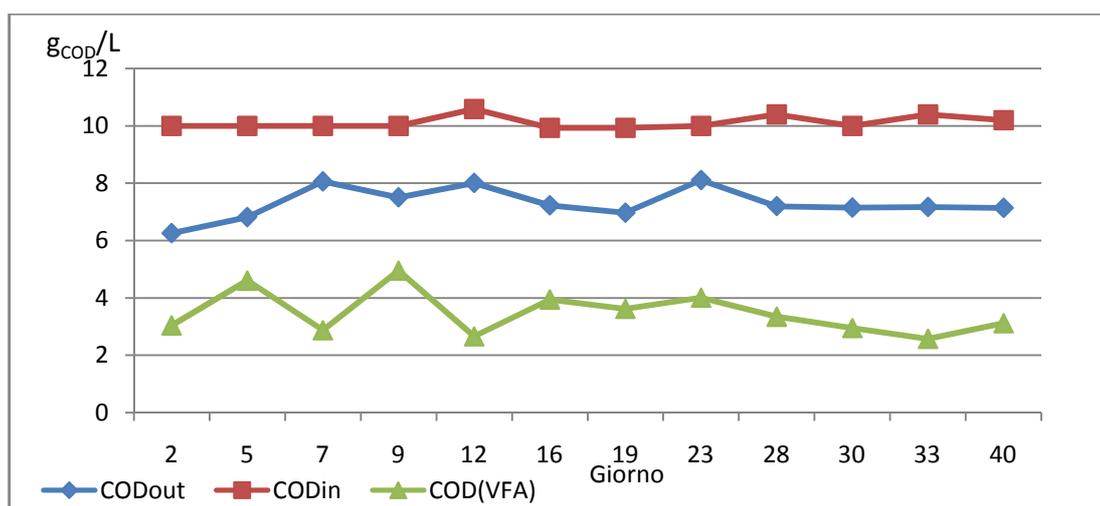


Figura 5.34 – Andamento del COD in, del COD out e della quota parte di COD out relativa ai VFA.

Si può notare come normalmente circa la metà del COD nell'effluente fosse legata ai VFA (mentre durante i periodi prossimi al riavvio del reattore, la componente di COD relativa ai VFA è stata abbastanza discontinua).

In Figura 5.35 vengono confrontati gli andamenti dei VFA e del consumo di base.

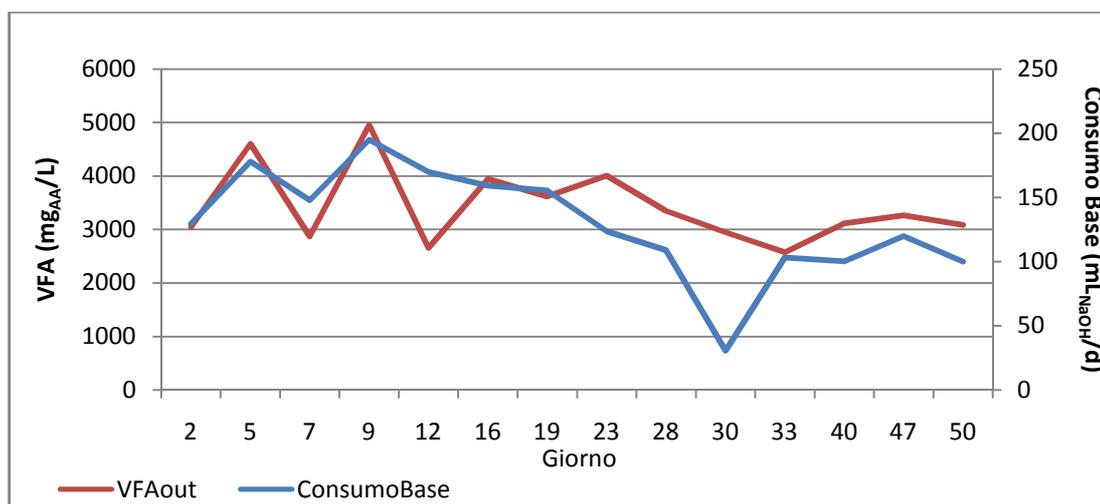


Figura 5.35 – Confronto tra l'andamento dei VFA nel mixed liquor e il consumo di NaOH.

L'andamento dei VFA e quello del consumo di NaOH sono rimasti all'incirca analoghi, tranne che per alcune eccezioni. Anche per il consumo di NaOH il massimo (177,9 mL_{NaOH}/d) è stato raggiunto durante il giorno 9. Da sottolineare lo strano consumo di base conseguito durante il giorno 30: sebbene la concentrazione di VFA fosse rimasta piuttosto costante, il consumo di NaOH calcolato (30,64 mL_{NaOH}/d) è stato più basso rispetto ai valori assunti durante gli altri giorni caratterizzati dalla medesima concentrazione di VFA. Il consumo medio di NaOH è stato di 130,09 mL_{NaOH}/d, poco inferiore alla metà di quello registrato nella fase precedente nella quale il carico di COD alimentato era doppio.

In Figura 5.36 sono mostrati l'andamento seguito dalla concentrazione del COD nel mixed liquor, contestualmente alla sua rimozione.

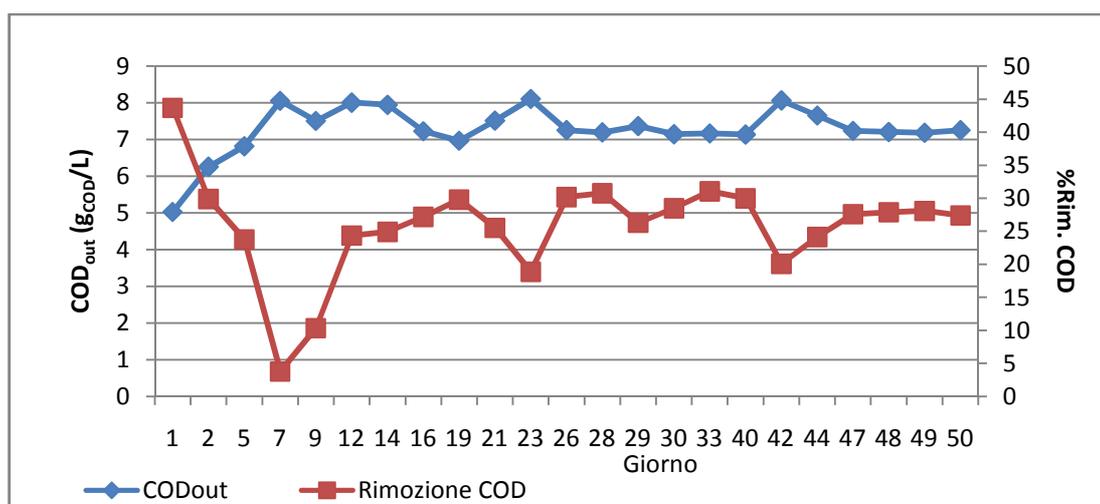


Figura 5.36 – Andamento del COD all'interno del mixed liquor (in blu) e della sua rimozione in percentuale (in rosso).

Si può notare come dopo il riavvio del reattore il COD uscente avesse assunto valori più bassi, fino ad aumentare a circa 8 g/L durante il giorno 7, rimanendo poi costantemente tra i valori di 7 e 8 g/L per tutto il resto della fase. Quando le condizioni operative sono rimaste maggiormente stabili (e cioè tra i giorni 26 e 40 e tra i giorni 44 e 51) il COD uscente si è assestato su valori intorno a 7,2 g/L. Si può notare come durante i giorni 23 e 42 si sia misurato un contenuto di COD nel mixed liquor leggermente superiore. Durante il giorno 23 si è avuto un leggero calo nella prestazione, molto breve, in quanto già durante il giorno 26 la produzione si è ripresa, tornando sui valori registrati fino al giorno 21. Il picco del giorno 42 è invece legato ai problemi probabilmente dovuti al siero di latte in alimento, dei quali si è discusso precedentemente. Il valore medio durante tutta la fase è stato di $7,46 \pm 0,45$ g/L. Inizialmente l'andamento della rimozione del COD è stato molto buono (43 % durante il giorno 1), dopodiché ha iniziato a decrescere, raggiungendo il minimo durante il giorno 7 (3,81 %), per poi incrementarsi, raggiungendo valori più o meno stabili (intorno al 25-30 %) dal giorno 12 in poi, con le eccezioni dei giorni 23 e 42, di cui si è discusso prima. Il massimo valore di rimozione (31,05 %) è stato registrato durante il giorno 33 (senza considerare i valori raggiunti inizialmente). La rimozione media è stata del $24,85 \pm 6,7$ %. Quindi, nonostante la rimozione del COD sia stata minore rispetto a quella conseguita nelle fasi precedenti, in questa fase si è conseguita una migliore prestazione: questo sembra confermare che nelle precedenti fasi non fosse solo la biomassa idrogenogena a degradare il COD.

La Figura 5.37 mostra l'andamento dell'azoto totale contestualmente alle sue componenti ammoniacale e organica.

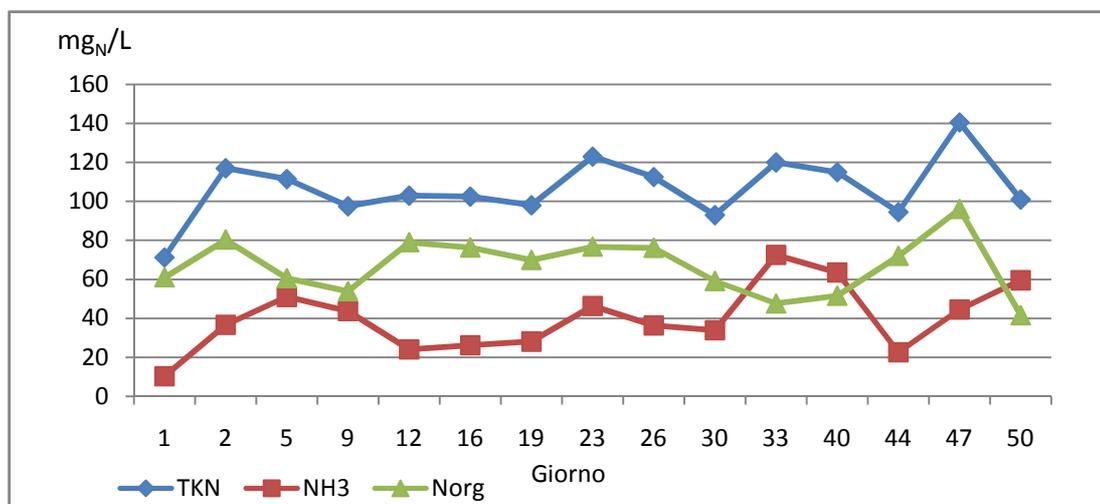


Figura 5.37 – Andamento dell'azoto totale, dell'azoto ammoniacale e dell'azoto organico all'interno del mixed liquor.

Gli andamenti dell'azoto totale e di quello ammoniacale sono stati analoghi. Si può notare come la concentrazione di azoto non sia rimasta costante durante la dark fermentation, se non per alcuni brevi periodi. Azoto totale e ammoniacale sono sempre rimasti piuttosto distanziati tra loro e questa distanza è sempre stata più o meno costante, tranne che tra i giorni 33 e 40, in cui essa si è ridotta, registrando i massimi valori dell'azoto ammoniacale (72,5 mg_N/L, durante il giorno 33). Il massimo valore di concentrazione per quanto riguarda l'azoto totale (140,5 mg_N/L) è stato invece raggiunto durante il giorno 47. Tralasciando alcune eccezioni, in Figura 5.37 si può notare come la concentrazione di ammoniaca sia stata solitamente inferiore a quella dell'azoto organico. L'ammoniaca è stata predominante soltanto tra i giorni 33 e 40 e durante il giorno 50, mentre i due parametri hanno assunto valori molto prossimi tra i giorni 5 e 9. I valori medi di concentrazione ottenuti sono stati i seguenti:

- TKN = 106,69±62,14 mg_N/L
- NH₃ = 39,95±60,19 mg_N/L
- Norg = 66,73±26,15 mg_N/L

Si può quindi affermare che l'azoto organico sia stata la componente principale dell'azoto totale.

In Figura 5.38 è mostrato l'andamento nel tempo dei solidi sospesi.

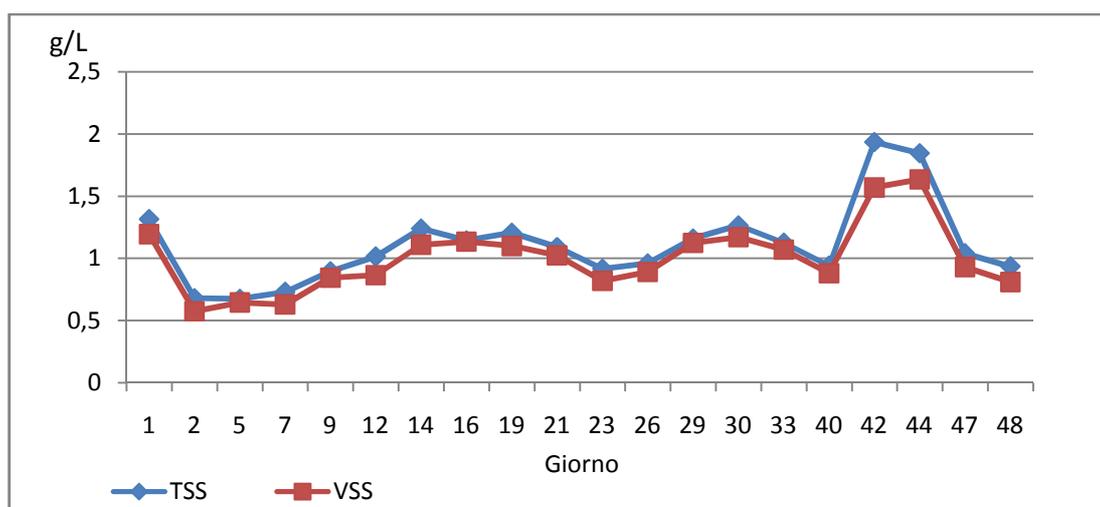


Figura 5.38 – Andamento dei solidi sospesi totali (TSS) e volatili (VSS) nel tempo.

In diversi punti si può notare come VSS e TSS siano addirittura quasi coincidenti, infatti, il loro rapporto medio è stato di 0,91. Durante questa fase non si è mai registrata formazione di granuli all'interno del mixed liquor, dunque i valori dei solidi sospesi misurati sono stati inferiori rispetto a quelli caratterizzanti le fasi precedenti: la concentrazione di TSS e VSS si è sempre mantenuta prossima all'unità. Valori più elevati sono stati quantificati durante i giorni 42 e 44 e si ipotizza che la causa di questo incremento sia stato il siero di latte utilizzato, in quanto, come spiegato in precedenza, durante quei giorni si è riscontrata della presenza di biomassa granulare all'interno della tanica di siero usato come substrato. Inoltre, l'assenza di granuli ha reso questi parametri più stabili: la concentrazione di VSS è stata solitamente confinata nel range di 0,6 e 1,1 g/L (senza considerare il periodo tra i giorni 42 e 44). I valori medi ottenuti sono stati i seguenti:

- TSS = $1,09 \pm 0,31$ g_{TSS}/L;
- VSS = $1 \pm 0,27$ g_{VSS}/L.

Nelle figure 5.39 e 5.40 viene mostrato l'andamento dei VSS in relazione alla rimozione del COD e a quella dell'azoto. Analizzando entrambe le figure si può affermare che la produzione di VSS (e quindi di biomassa) abbia in generale seguito gli andamenti della rimozione del COD e dell'azoto; le maggiori discordanze (visibili soprattutto in Figura 5.39) si sono verificate tra i giorni 40 e 42, a causa della presenza dei granuli all'interno dell'alimento, che hanno evidentemente influito sull'andamento dei VSS.

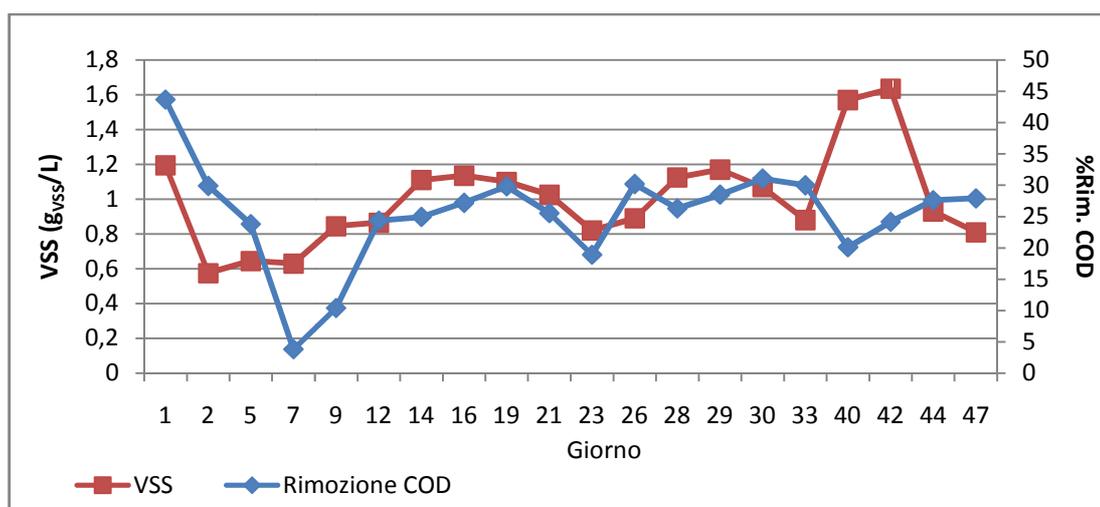


Figura 5.39 – Rimozione del COD, in percentuale, all'interno del reattore, contestualmente alla produzione di VSS.

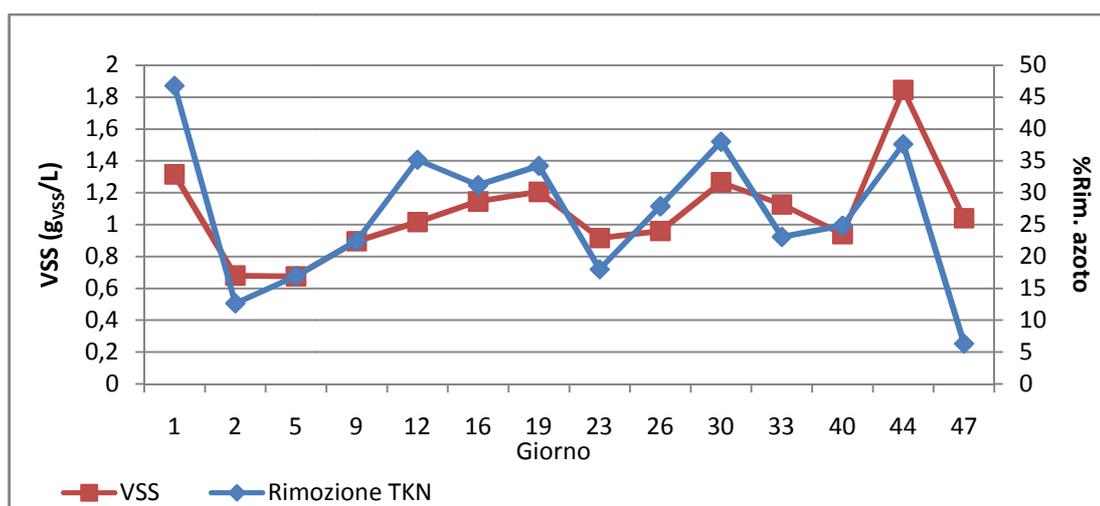


Figura 5.40 – Rimozione dell'azoto, in percentuale, all'interno del reattore, contestualmente alla produzione di VSS.

La Figura 5.41 mostra la variazione nel tempo della Y , contestualmente all'andamento del rapporto tra l'azoto rimosso e VSS formati. In questo caso la Y si è mantenuta solitamente su valori intorno a $0,3-0,4 \text{ g}_{\text{vss}}/\text{g}_{\text{COD}}$, risultando molto più simile a quella caratteristica dei batteri anaerobici. Il rapporto N/VSS , a parte rari casi, ha solitamente spaziato tra 35 e 50 $\text{mg}_N/\text{g}_{\text{vss}}$.

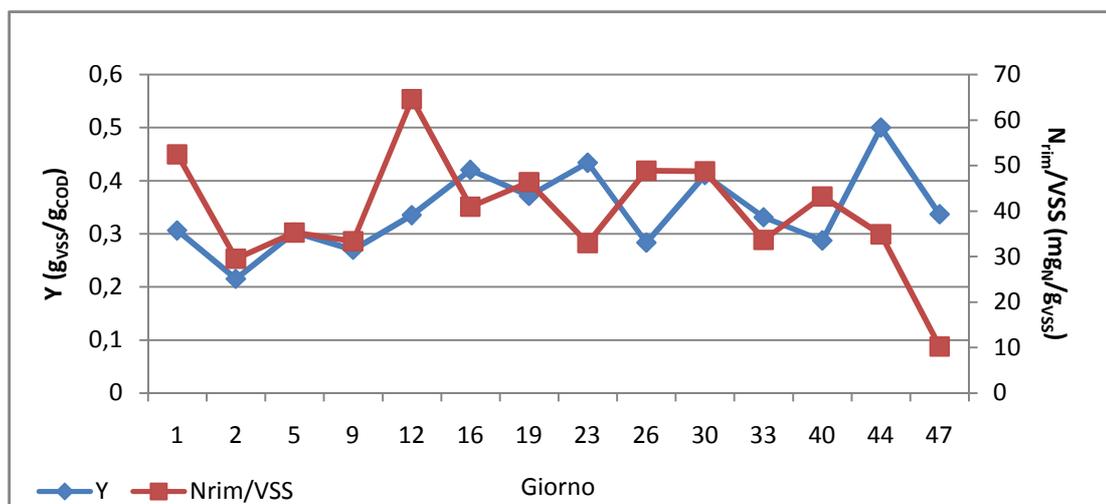


Figura 5.41 – Andamento della crescita batterica Y , contestualmente all'andamento del rapporto tra azoto rimosso e VSS formati.

Attraverso il bilancio del COD, si è ottenuto un rapporto tra COD in uscita e COD entrante sempre su valori prossimi all'unità. La massima differenza tra COD uscente ed entrante è stata registrata durante il giorno 29, quando il rapporto tra i due parametri è stato di 1,17. Il suo valore medio è stato di 1,06: l'aver ottenuto un valore medio prossimo a 1, significa che il principio di conservazione della massa sia stato rispettato. La Figura 5.42 mostra la suddivisione in percentuale delle varie componenti del COD uscente e lo scarto in percentuale necessario a rendere pari a 1 il rapporto tra COD uscente e COD in ingresso.

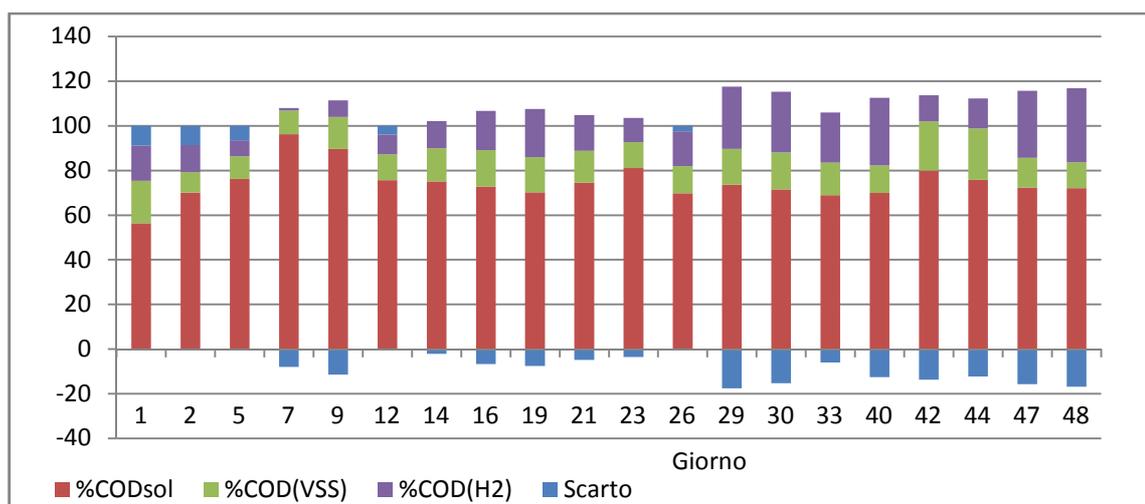


Figura 5.42 – Composizione percentuale del COD.

Il COD solubile, non degradato, è risultato essere la componente predominante, mentre quella legata all'idrogeno e quella legata ai VSS si sono complessivamente equivalse, con la predominanza della componente legata all'idrogeno nei periodi in cui le condizioni operative erano stabili, mentre quella legata ai VSS è stata predominante quando si sono verificati i problemi correlati al pompaggio in ingresso e alla preparazione dell'alimento. La seguente è stata la composizione media del COD in uscita:

- $\text{COD}_{\text{out sol}} = 74,59 \pm 8,08 \%$;
- $\text{COD}_{\text{VSS}} = 14,46 \pm 3,7 \%$;
- $\text{COD}_{\text{H}_2} = 17,11 \pm 8,94 \%$.

Dunque, in queste condizioni operative, una percentuale di COD di poco superiore al 17 % è stata convertita in idrogeno. La massima percentuale conseguita è stata di circa 33,18 %, durante il giorno 48. Nel 35 % dei casi lo scarto è rimasto compreso tra il 10 % e il 17 %, inferiore all'8 % nei restanti casi: complessivamente si può affermare che il bilancio del COD sia stato rispettato.

Su alcuni campioni di mixed liquor relativi ad alcuni giorni rappresentativi di conduzione sono stati misurati gli acidi volatili singoli ed altri metaboliti di reazione: acido acetico, acido butirrico, acido propionico ed etanolo. I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 5.9, dove sono mostrati anche la percentuale e la portata di idrogeno e il rapporto acido butirrico/acido acetico (B/A).

Tabella 5.9 – Concentrazioni di acido acetico, acido butirrico, acido propionico ed etanolo relative ai campioni di mixed liquor inviati a Cremona.

Fase	Giorno	%H ₂	VolH ₂ [L _{H₂} /d]	A. acetico [g _{COD} /L]	A. butirrico [g _{COD} /L]	A. propionico [g _{COD} /L]	B/A	Etanolo [g _{COD} /L]
Fase 2A	16	34%	8,37	2,91	12,62	0,18	4,34	2,10
	3	36%	8,56	3,54	10,23	0,15	2,89	4,01
Fase 2B	37	33%	6,55	4,67	10,32	0,18	2,21	1,88
	46	35%	9,33	3,44	9,04	0,13	2,63	3,92
	63	39%	7,49	4,65	8,96	0,10	1,92	1,12
Fase 3A	2	52%	4,61	2,25	2,00	0,04	0,89	0,95
	16	48%	7,41	2,18	4,02	0,11	1,84	1,26
	28	48%	9,99	1,46	4,02	0,28	2,75	2,28
	38	53%	14,83	1,05	5,14	0,18	4,90	0,65

Operando con concentrazione in ingresso di 20 g_{COD}/L (fase 2) la produzione di VFA è stata maggiore, risultando in una maggiore concentrazione di acido acetico e butirrico, mentre all'incirca invariate sono rimaste le concentrazioni di acido propionico, con però un picco durante il giorno 28 della fase 3. La concentrazione di etanolo è invece stata abbastanza varia, indipendentemente dalla concentrazione di COD alimentata, anche se si sono ottenuti

valori sotto a 1 g_{COD}/L soltanto durante la fase 3 e superiori a 3 g_{COD}/L solo nella fase 2. Non sembra esserci stata una dipendenza chiara tra la produzione di idrogeno e le concentrazioni di acido propionico e di etanolo, mentre nella fase 3 all'aumentare della portata di idrogeno si è constatato un aumento del rapporto B/A. Questo è in linea con le considerazioni di Kim et al. [41], secondo i quali i due parametri sono tra loro proporzionali.

5.4.1 Test sulla miscelazione: 28/11/2016, 29/11/2016, 30/11/2016

Come già accennato nel paragrafo 4.1.1, durante la fase 3A sono stati effettuati alcuni test riguardanti la miscelazione del mixed liquor. L'obiettivo era quello di verificare se una maggiore efficacia di miscelazione potesse avere effetti benefici sulla produzione di H₂, riducendo la sua concentrazione in fase disciolta.

Test del giorno 26

Durante l'intera sperimentazione il reattore è sempre stato fatto operare con una miscelazione continua di 200 RPM. Durante il giorno 26 si è voluto sperimentare per un breve lasso di tempo un differente tipo di miscelazione, per comprendere se esso avrebbe potuto comportare un miglioramento nella produzione. Si è operato con una miscelazione discontinua, ovvero alternando periodi di miscelazione a 200 RPM a periodi di assenza di miscelazione: dalle 12:25 alle 13:03 e dalle 14:15 alle 14:30 il reattore è stato fatto operare alternando 1 minuto di miscelazione e 1 minuto senza miscelazione. La Figura 5.43 mostra la produzione di biogas conseguita durante il test.

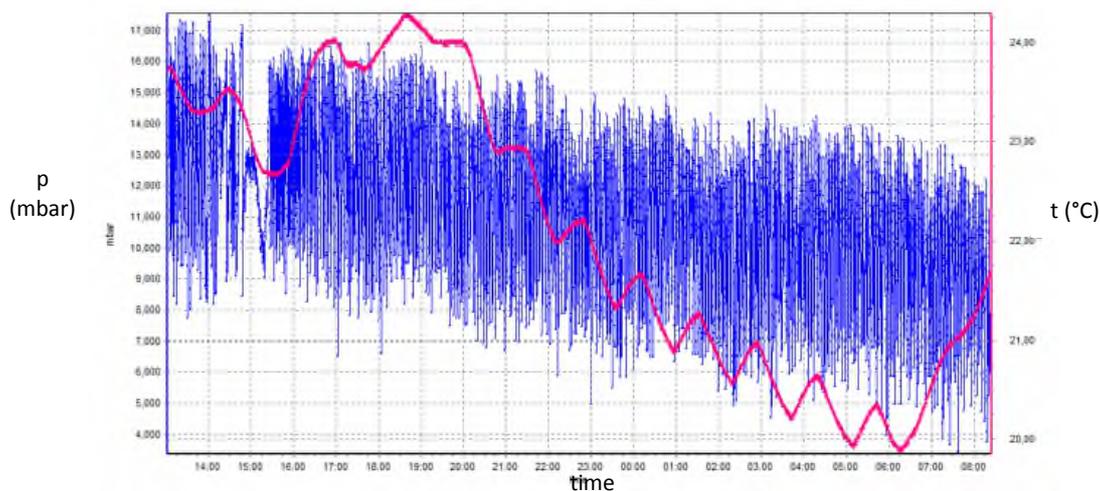


Figura 5.43 – Andamento della pressione registrato dal manometro Keller durante il giorno 26 dalle ore 13:00.

Come già spiegato in precedenza, la distanza tra un picco di pressione e il successivo è indice della produzione di biogas: maggiore è la vicinanza tra i picchi, maggiore è il volume di biogas prodotto (in quanto, per la legge dei gas, il volume è inversamente proporzionale a Δp).

Analizzando la figura, si possono distinguere i seguenti periodi:

- 13:00 ÷ 13:15: breve periodo con ottima produzione;
- 14:15 ÷ 14:25: breve periodo con scarsa produzione;
- 14:40 ÷ 15:20: periodo con produzione molto bassa;
- 15:20 ÷ 16:20: periodo caratterizzato da ottima produzione;
- 16:20 in poi: produzione costante e tornata a livelli normali.

Dunque, si potrebbe affermare che in corrispondenza dei periodi di miscelazione alternata, la produzione sia scarsa, però, nei periodi di poco successivi si registra un breve periodo caratterizzato da una produzione migliore. Questo è accaduto durante il primo periodo di test (dalle 12:25 alle 13:03). Più difficile da analizzare quello che è successo dopo il secondo periodo di test (dalle 14:15 alle 14:30). Infatti vi è stata una lunga fase (di circa 40 minuti), caratterizzata da una produzione molto bassa, seguita da una lunga fase (di quasi un'ora), caratterizzata da un'ottima produzione. Un'ipotesi sulle ragioni di questo fenomeno è stata formulata osservando i valori di temperatura registrati dal software *Diaferm* durante quel lasso di tempo. La fase con scarsa produzione di biogas è stata sicuramente causata dalle basse temperature operative: infatti, poco dopo il secondo periodo di test, a causa di un'anomalia nel sistema, la temperatura è crollata, gradualmente, da 36 °C fino a un minimo di 22,7 °C, allontanandosi così dalle condizioni volute di mesofilia. Dopodiché la temperatura ha iniziato ad innalzarsi, fino a ritornare sui valori richiesti. È proprio quando la temperatura ha iniziato ad aumentare che si è verificata la fase caratterizzata da una migliore produzione di biogas. Sembrerebbe quindi che il ristabilirsi delle condizioni di miscelazione continua e l'aumento della temperatura siano stati responsabili di questo periodo di migliore produttività.

Test del giorno 27

Il giorno 27 si è voluta testare nuovamente l'alternanza tra 1 minuto di miscelazione a 200 RPM e 1 minuto di assenza di miscelazione, ma, questa volta, per un lasso di tempo più consistente: il test è stato fatto durare 7 ore e 15 minuti, dalle 9:00 fino alle 16:15. Le figure 5.44 e 5.45 mostrano la produzione di biogas conseguita durante e dopo il test, rispettivamente.

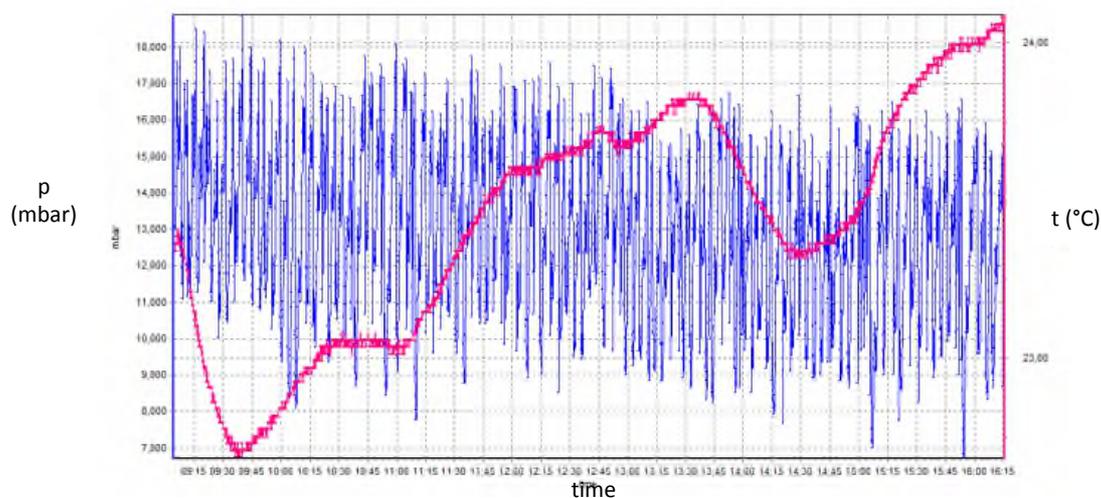


Figura 5.44 – Andamento della pressione registrato dal manometro Keller durante il test del giorno 27.

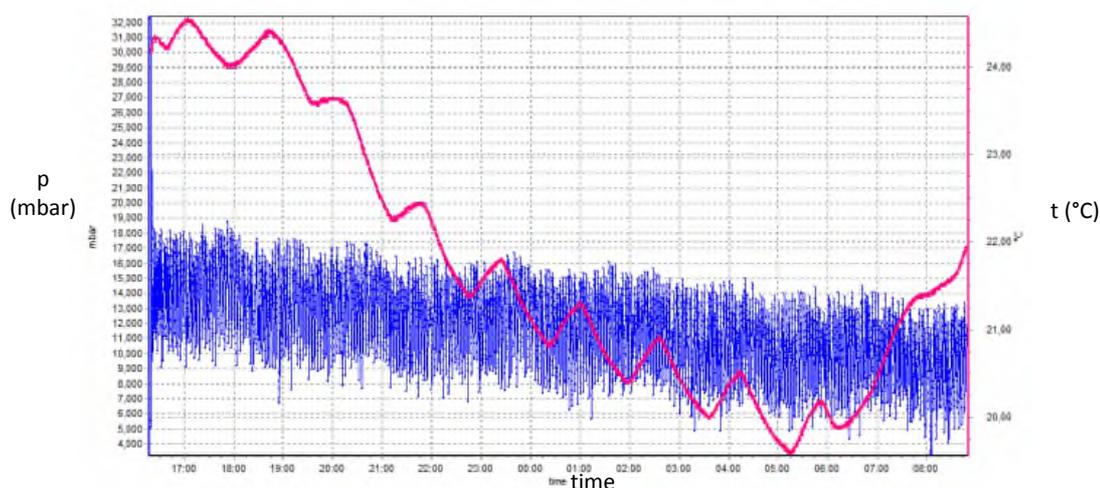


Figura 5.45 – Andamento della pressione registrato dal manometro Keller durante il giorno 27, successivamente al test sulla miscelazione.

Per quel che concerne la produttività durante le 7 ore e 15 con miscelazione a periodi alterni, si può notare come essa sia stata inferiore, se confrontata con quella conseguita durante condizioni di miscelazione normali: si può notare come i picchi di pressione siano maggiormente distanziati tra di loro. La seconda immagine mostra, invece, come ci sia stato un breve periodo, di circa 20/30 minuti, in cui i picchi di pressione sono più fitti, e, quindi, in cui la produzione è stata migliore. Questo periodo si colloca appena dopo la fine del test, quindi, verso le 16:15. Dunque, è stato confermato il risultato ottenuto il giorno precedente: il ripristinarsi delle condizioni di miscelazione comporta un breve periodo iniziale caratterizzato da una migliore produzione. A differenza del giorno precedente, però, il test

del giorno 27 è durato molto di più, ma, nonostante questo, il breve periodo di migliore produttività è stato di lunghezza analoga. Dunque, la lunghezza del periodo caratterizzato da buona produttività sembrerebbe non essere proporzionale alla lunghezza del periodo con miscelazione alternata.

Test del giorno 28

La mattina del giorno 28, dalle 9:15, per un totale di 96 minuti, si è effettuato un nuovo test sulla miscelazione, in cui a 20 minuti di miscelazione a 200 RPM è stato alternato 1 minuto di spegnimento dell'agitatore. La Figura 5.46 mostra la produzione di biogas conseguita durante il test.

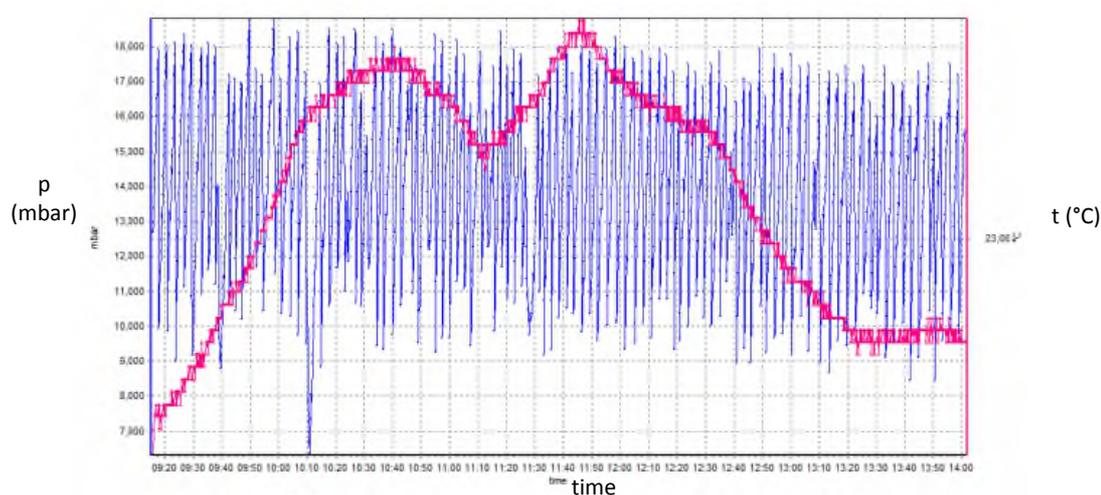


Figura 5.46 - Andamento della pressione registrato dal manometro Keller durante il giorno 28, dalle ore 9:15 alle ore 14:00.

Analizzando l'andamento registrato tramite il manometro, non si è osservato un cambiamento nella produzione, causato dalla differente miscelazione: il test è durato dalle 9:15 sino alle 10:50 e, come si può notare, non vi è differenza tra il trend della pressione registrato durante e dopo la prova.

Dunque, a fronte dei risultati delle prove svolte sulla miscelazione durante questi tre giorni, è stato deciso di continuare ad operare con una miscelazione continua a 200 RPM: non sono infatti stati riscontrati cambiamenti significativi nella produzione, tali da optare per l'adozione di una differente tipologia di miscelazione.

5.5 Monitoraggio della fase 3B: 11/1/2017 - 24/3/2017

Terminate le vacanze natalizie, in data 11/1/2017 si è fatto ripartire il reattore, optando per il mantenimento delle condizioni operative (vedi Tabella 5.10) sperimentate durante la fase precedente, per i motivi spiegati nel paragrafo 4.1.1.

Tabella 5.10 – Condizioni operative della fase 3.

PARAMETRO	VALORE	UNITÀ DI MISURA
Volume mixed liquor	3	L
Velocità di rotazione	200	RPM
pH	5,5	-
Temperatura	36	°C
HRT	9	h
Portata in ingresso	8	L/d
COD in ingresso	10	g _{COD} /L

Com'era già accaduto per la fase 3A, lo sviluppo della biomassa è stato repentino, consentendo ottimi risultati in termini di produzione idrogenica già durante il giorno stesso (vedi Figura 5.47).

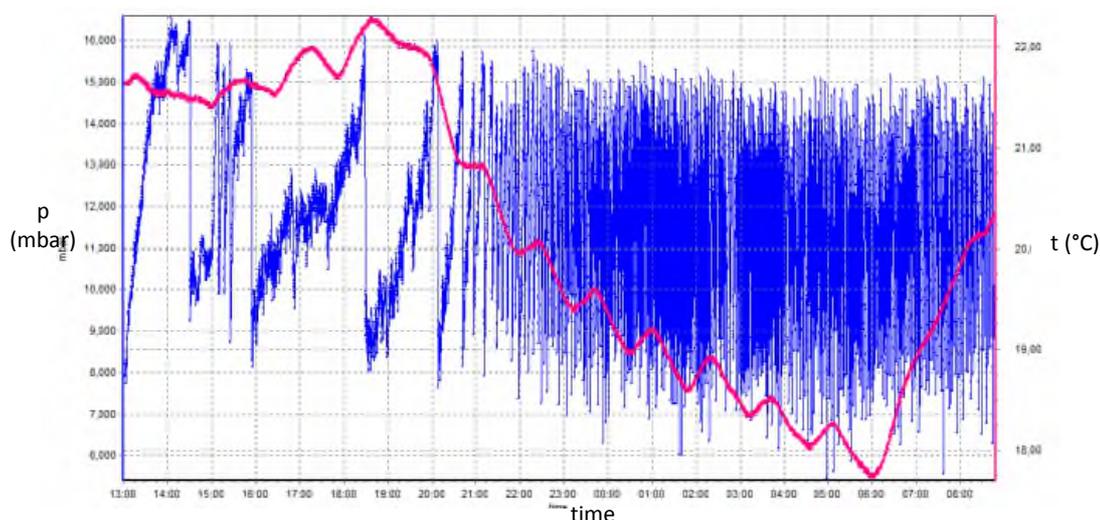


Figura 5.47 – Andamento della pressione registrato dal manometro Keller durante il giorno 1.

In figura è mostrato il trend della pressione durante il giorno 1, dalle ore 13:00, orario in cui si è iniziato a lavorare in batch. Verso le 15:00 si è passati a lavorare in continuo. Come si può notare, la biomassa ha iniziato a svilupparsi verso le 21:00, mentre dalle ore 23:00 si è

conseguita un'ottima produzione. Questo andamento è del tutto simile a quello ottenuto in data 2/11/2016, data di inizio della fase 3A. Nei giorni successivi la produzione non è rimasta del tutto costante, fino al giorno 11, quando, a causa di un'interruzione di corrente nel laboratorio, il reattore è rimasto spento fino al giorno successivo. A causa di altre problematiche occorse, tra le quali la formazione di granuli, la produzione di idrogeno non si è più ristabilita; per questa ragione, il giorno 15 si è optato per il riavvio del sistema, utilizzando nuovo alimento. Anche successivamente a questo nuovo riavvio, dapprima si è riscontrata una buonissima produzione (del tutto paragonabile a quella del giorno 1), dopodiché c'è stato un lasso di tempo con produzione incostante. Dopo però la produzione ha iniziato a migliorare, fino al giorno 30, dopo il quale è rimasta costante e sugli ottimi livelli che si erano già verificati verso la fine della fase 3A. Dunque si può affermare che, lavorando nelle condizioni operative della fase 3, senza problematiche esterne, la produzione segue questo andamento:

- ottima produzione iniziale per circa 3 giorni;
- produzione instabile e inferiore per una decina di giorni;
- raggiungimento delle condizioni stabili, caratterizzate da un'ottima produzione.

La produzione è rimasta stabile per circa due settimane, dal giorno 30 al giorno 44, poi sfortunatamente altre problematiche sono occorse, danneggiando la comunità batterica. Il giorno 43, a causa di un malfunzionamento del sistema, in 8 ore la temperatura è calata gradualmente da 36 °C fino a 19 °C. Risolto il problema, la comunità batterica si è ripresa in poche ore, ma durante il giorno 44 è stata gravemente danneggiata da un'altra problematica: una rottura del tubo dell'alimento ha fatto sì che la pompa dell'alimento continuasse a funzionare, pompando aria anziché alimento per circa 8 ore. Essendo anaerobico l'ambiente in cui i batteri dark fermentativi operano, l'ossigeno introdotto ha causato gravi danni alla biomassa e le condizioni stabili sono state ripristinate nuovamente dal giorno 58.

Per avere una migliore descrizione del funzionamento del sistema sotto le condizioni operative della fase 3, si è optato per rappresentare nei grafici l'andamento dei diversi parametri a partire dal giorno 16, data appena successiva al secondo riavvio, in quanto il periodo tra i giorni 1 e 15 risultava scarsamente rappresentativo del reale funzionamento, a causa delle diverse problematiche occorse.

Nella Figura 5.48 è mostrata la resa di produzione di idrogeno.

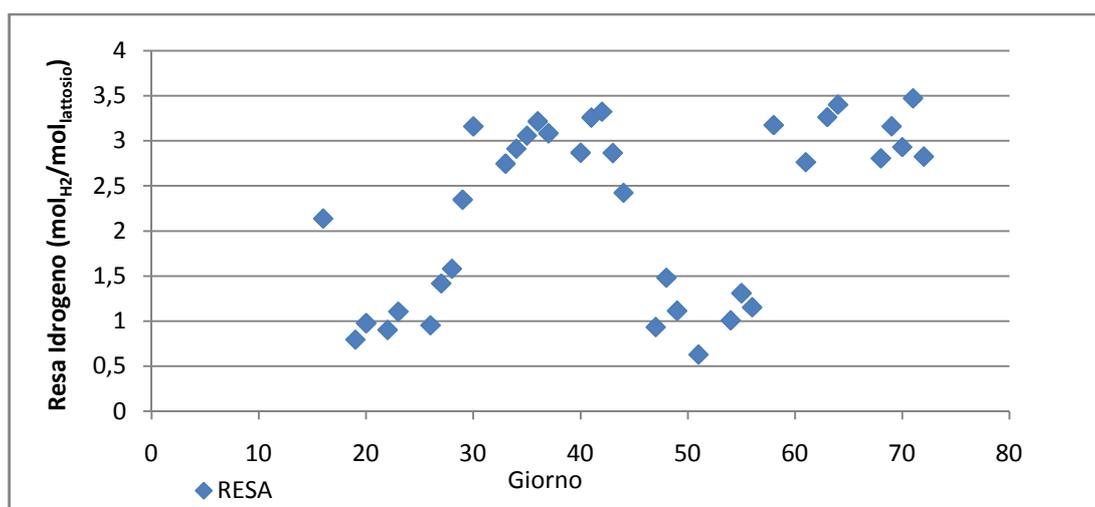


Figura 5.48 – Resa di produzione dell'idrogeno.

Come si può notare, la resa ha assunto valori variabili solitamente tra 0,7 e 1,5 mol_{H2}/mol_{lattosio} nei periodi in cui le condizioni stabili non erano raggiunte (tra i giorni 16 e 29, periodo in cui la biomassa doveva ancora acclimatarsi, e tra i giorni 44 e 58, periodo in cui la biomassa era stata danneggiata dal pompaggio d'aria). In particolare è stato raggiunto un minimo di 0,63 mol_{H2}/mol_{lattosio} durante il giorno 51. D'altra parte si possono notare le ottime rese conseguite durante i giorni in cui le condizioni erano stabili (tra i giorni 30 e 44 e tra i giorni 58 e 72): la resa si è sempre mantenuta sopra le 2,8 mol_{H2}/mol_{lattosio}. In particolare, il massimo è stato ottenuto durante il giorno 71 ed è stato di 3,47 mol_{H2}/mol_{lattosio}. Questo rappresenta sicuramente un ottimo risultato, considerata la massima resa teoricamente ottenibile dal lattosio pari a 4 mol_{H2}/mol_{lattosio}, quando si ha formazione di acido butirrico (vedi paragrafo 3.3.2.1). La resa media di tutta la fase è stata di $2,23 \pm 0,97$ mol_{H2}/mol_{lattosio}.

La Figura 5.49 mostra il confronto tra gli andamenti della portata di idrogeno e la composizione del biogas.

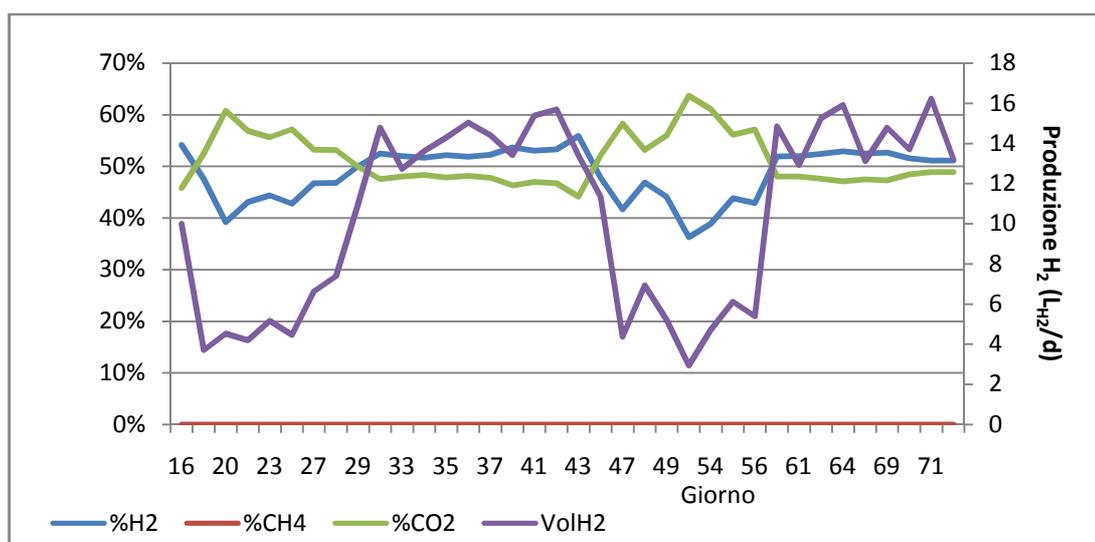


Figura 5.49 – Confronto tra l'andamento della produzione di idrogeno e la composizione del biogas.

Si evince che il trend relativo alla produzione di idrogeno abbia solitamente seguito quello del contenuto di idrogeno nel biogas, in particolare, il loro trend è stato quasi identico nei periodi in cui le condizioni stabili non erano raggiunte. Anche in condizioni stabili (giorni 30 e 44; giorni 58 e 72) i trend dei due parametri sono stati analoghi, ma la produzione giornaliera di idrogeno è sembrata essere più variabile.

La produzione di H₂ è rimasta solitamente compresa tra 13 e 15 L_{H2}/d, in condizioni stabili, mentre la sua media è stata di $10,46 \pm 4,5$ L_{H2}/d.

Il contenuto di metano è sempre stato nullo. Con queste condizioni operative, il contenuto di idrogeno è stato molto buono inizialmente (54 % il giorno 16), dopodiché è rimasto piuttosto instabile tra i giorni 17 e 29, raggiungendo un minimo del 39 % il giorno 20, poi ha iniziato ad incrementarsi lentamente fino al giorno 29, quando ha raggiunto il 50 %. Tra i giorni 30 e 44 si è mantenuto stabilmente sopra il 52 %, raggiungendo un massimo del 56 % durante il giorno 43, data in cui si è fronteggiato il problema relativo alla diminuzione della temperatura fino a 19 °C: sebbene la diminuzione della temperatura abbia influito negativamente sulla produzione, ha comunque comportato un aumento del contenuto di idrogeno nel biogas. Dal giorno 44, a causa dei problemi connessi al pompaggio in ingresso, il contenuto di idrogeno ha cominciato ad essere instabile (minimo del 36 %, durante il giorno 51), fino al giorno 58 quando è tornato ad assumere valori superiori al 52 %.

Nella Tabella 5.11 vengono indicati i valori massimi e minimi registrati di portata e resa di idrogeno.

Tabella 5.11 – Valori minimo e massimo della produzione di idrogeno e della resa di produzione di idrogeno.

	Giorno	VolH ₂ [L _{H₂/d}]	Resa [mol _{H₂} /mol _{lattosio}]
Massimo	71	16,22	3,47
Minimo	51	2,93	0,63

Riassumendo, la resa, la produzione e i contenuti medi ottenuti sono stati:

- Resa = $2,23 \pm 0,97$ mol_{H₂}/mol_{lattosio};
- Vol_{H₂} = $10,46 \pm 4,5$ L_{H₂}/d;
- H₂ = 49 %;
- CO₂ = 51 %;
- CH₄ = 0 %.

In Figura 5.50 sono mostrati l'andamento del COD solubile all'interno del mixed liquor e della sua rimozione.

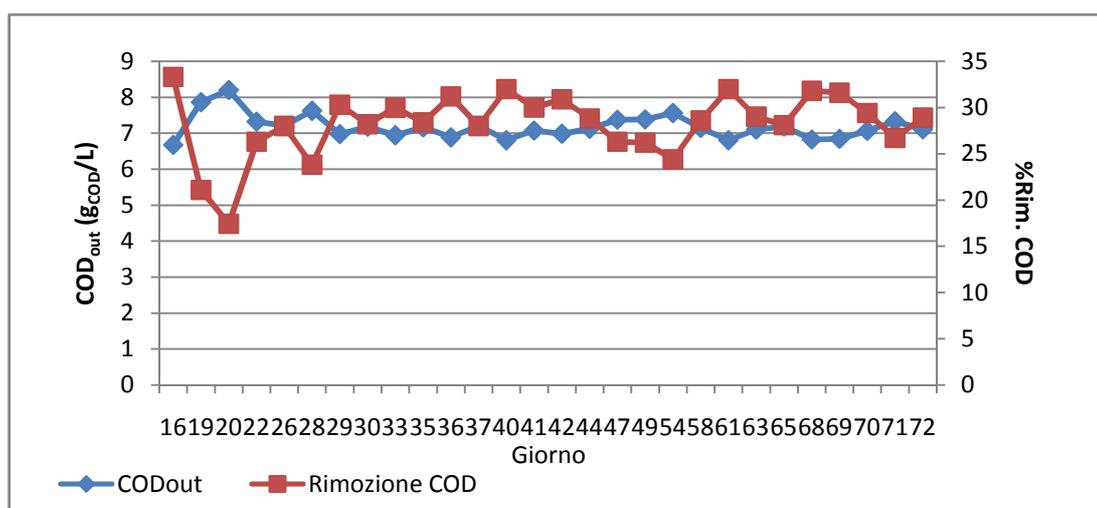


Figura 5.50 – Andamento del COD all'interno del mixed liquor e della sua rimozione in percentuale.

La rimozione del COD è stata inizialmente molto buona (33,3 % il giorno 16), dopoiché ha iniziato a diminuire, fino a un minimo del 17,42 % durante il giorno 20, dunque ha iniziato a incrementarsi nuovamente. Poi, dal giorno 29 al giorno 44 è rimasta maggiormente costante, oscillando tra il 28 % e il 31 %. Dal giorno 44 al giorno 58 essa è diminuita, per le problematiche già descritte, ma è comunque rimasta superiore al periodo precedente al giorno 29. Dal giorno 58 la rimozione è tornata a spaziare tra il 28 % e il 31 %. Anche per

quel che concerne il COD solubile, il suo andamento è rimasto pressoché costante in condizioni stabili (giorni 30 e 44; giorni 58 e 62), mantenendosi tra 6,8 e 7,2 g/L. Il valore minimo di 6,67 g/L è stato raggiunto durante il giorno 16, mentre il suo valore massimo è stato registrato il giorno 20 (8,2 g/L).

La Figura 5.51 mostra l'andamento dell'azoto totale contestualmente alle sue componenti ammoniacale e organica.

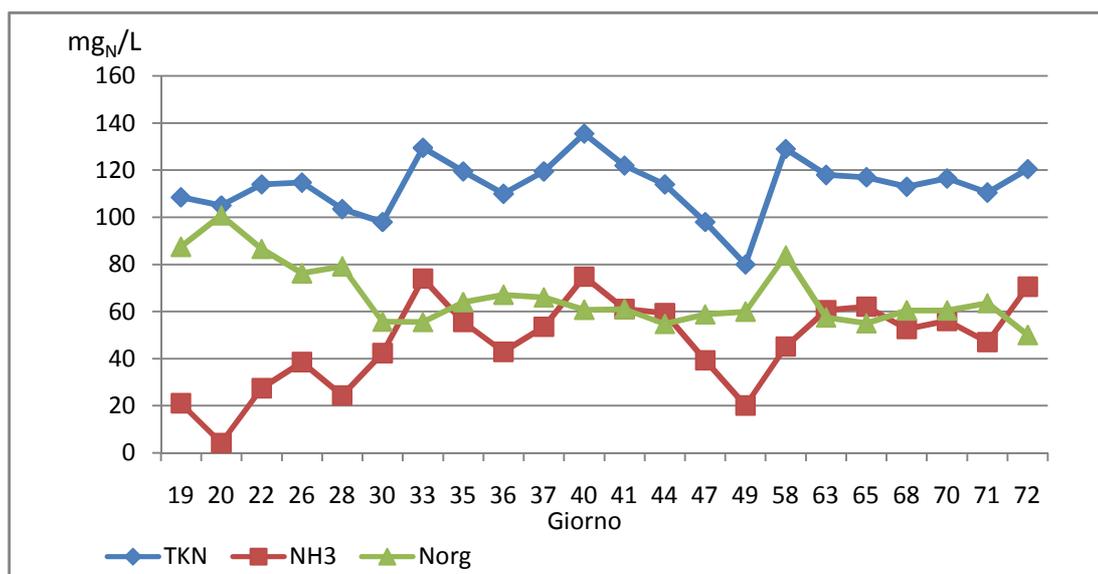


Figura 5.51 – Andamento dell'azoto totale, dell'azoto ammoniacale e dell'azoto organico all'interno del mixed liquor.

Come si evince dalla figura, gli andamenti dell'azoto totale e di quello ammoniacale sono stati quasi del tutto analoghi. Si può notare come la concentrazione di azoto non sia rimasta costante durante la dark fermentation, se non per alcuni brevi periodi. Il massimo valore di concentrazione, sia per quanto riguarda l'ammoniaca sia per l'azoto totale (74,75 e 135,5 mg_N/L, rispettivamente), è stato raggiunto durante il giorno 40. Tra i giorni 30 e 44 e tra i giorni 58 e 72 i due parametri sono stati più elevati e la loro variabilità è stata ridotta: si può affermare che, operando con queste condizioni operative, una volta raggiunte le condizioni stabili, l'azoto totale assuma concentrazioni comprese tra 100 e 130 mg_N/L, mentre quello ammoniacale tra 43 e 74 mg_N/L. Per entrambi i parametri, ma soprattutto per l'azoto ammoniacale (minimo di 4,16 mg_N/L durante il giorno 20), si sono registrati valori solitamente inferiori al di fuori del periodo di normale funzionamento, questo significa che, in condizioni stabili, la biomassa necessita di un minor consumo di azoto (come già riscontrato in fase 3A).

Si può facilmente notare come la concentrazione dell'azoto organico sia stata superiore a quella dell'azoto ammoniacale nei periodi in cui le condizioni stabili non sussistevano, mentre essa ha assunto valori all'incirca analoghi a quella dell'azoto ammoniacale, ma rimanendo più costante, durante le condizioni stabili. I valori medi di concentrazione ottenuti sono stati i seguenti:

- TKN = $113,466 \pm 12,03$ mg_N/L
- NH₃ = $46,88 \pm 18,7$ mg_N/L
- Norg = $66,58 \pm 13,27$ mg_N/L

Si può quindi affermare che l'azoto totale fosse composto soprattutto da azoto organico quando le condizioni erano instabili, mentre nei periodi di normale funzionamento le concentrazioni di azoto organico e azoto ammoniacale sono rimaste all'incirca analoghe. Da notare inoltre come le deviazioni standard di questi parametri siano state inferiori rispetto a quelle relative alle fasi precedenti (anche superiori a ± 50 per quel che riguarda azoto ammoniacale e totale).

In Figura 5.52 è mostrato l'andamento dei solidi sospesi.

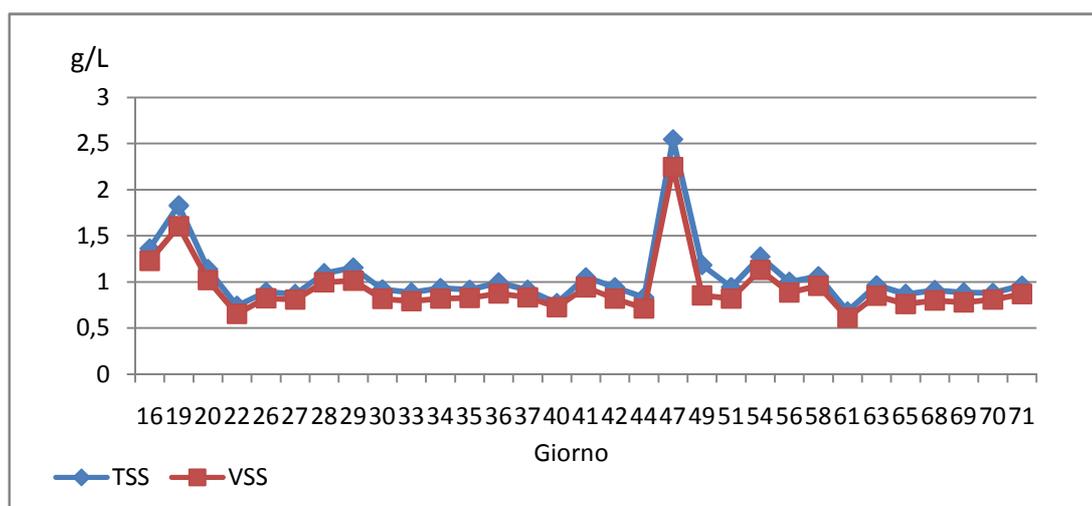


Figura 5.52 – Andamento dei solidi sospesi totali (TSS) e volatili (VSS) nel tempo.

Prima di tutto si può notare come il trend dei TSS e dei VSS sia molto simile e di come essi siano vicini l'uno all'altro, anzi, quasi coincidenti (si è ottenuto un rapporto medio VSS/TSS superiore a 0,88).

La concentrazione di solidi sospesi è rimasta piuttosto incostante quando le condizioni erano instabili o quando sono incorse le problematiche di cui si è discusso precedentemente. Mentre questo parametro è rimasto decisamente costante quando le condizioni erano stabili, assumendo valori intorno a 0,8-0,9 g_{vss}/L, valori inferiori rispetto a quando le condizioni

erano instabili: è ipotizzabile che, in condizioni instabili, sia presente altra biomassa oltre a quella idrogenogena. Ad ogni modo, dal giorno 16 in poi non è stata più registrata presenza di granuli all'interno del mixed liquor, con l'eccezione del giorno 47 (infatti, in Figura 5.52 si può notare il picco raggiunto dai solidi sospesi durante quel giorno), in cui si sono individuati dei sedimenti all'interno del mixed liquor, che però sono sembrati differenti dai granuli osservati in precedenza. La causa della loro formazione è stata probabilmente l'ossigenazione dovuta al malfunzionamento della pompa dell'alimento. Comunque, nei giorni successivi, al ristabilirsi delle condizioni operative, si è osservata anche la loro scomparsa. Invece, come già accennato in precedenza, la presenza di granuli è stata una delle cause del riavvio del giorno 15.

I valori medi ottenuti sono stati i seguenti:

- TSS = $1,04 \pm 0,35$ g_{TSS}/L;
- VSS = $0,92 \pm 0,3$ g_{VSS}/L.

Nelle figure successive (Figura 5.53 e Figura 5.54) viene mostrato l'andamento dei VSS in relazione alla rimozione del COD e a quella dell'azoto.

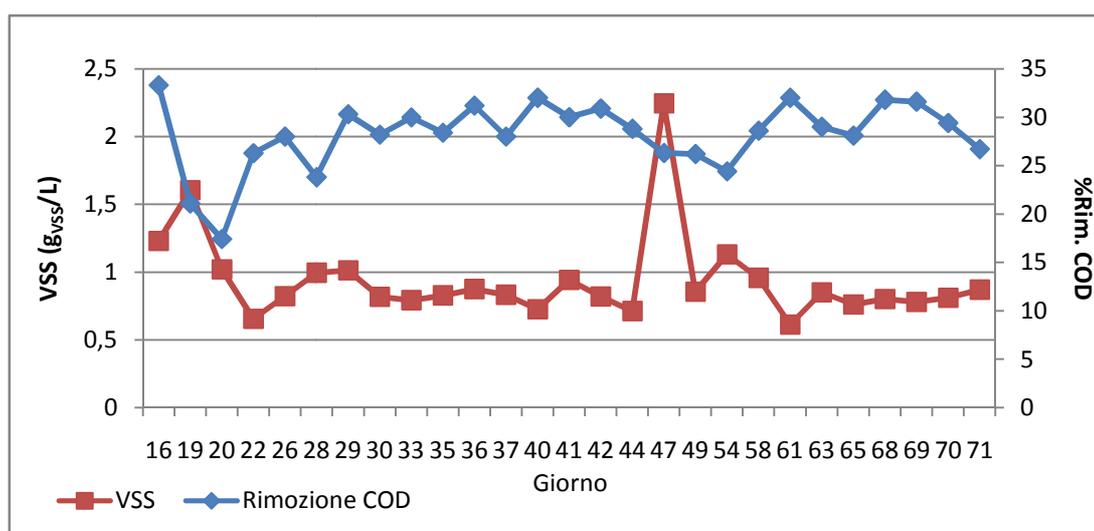


Figura 5.53 – Rimozione del COD all'interno del reattore, contestualmente alla produzione di VSS.

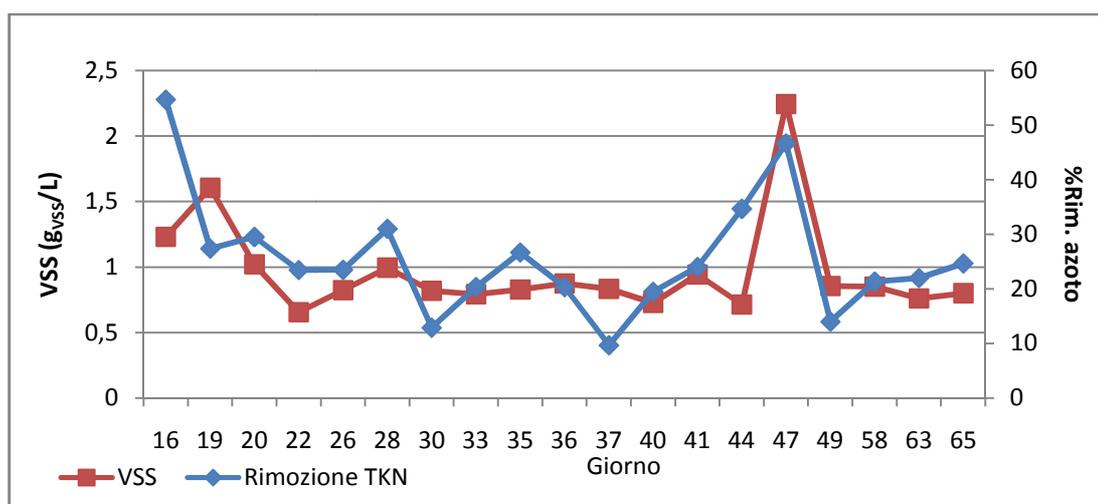


Figura 5.54 – Rimozione dell'azoto all'interno del reattore, contestualmente alla produzione di VSS.

La Figura 5.55 mostra la variazione nel tempo della crescita batterica Y , contestualmente all'andamento del rapporto tra l'azoto rimosso e VSS formati. Come in fase 3A, i valori della Y hanno rispecchiato quelli teorici per i batteri anaerobici. In questo caso il parametro si è mantenuto solitamente su valori intorno a $0,22-0,35 \text{ g}_{\text{VSS}}/\text{g}_{\text{COD}}$. Il rapporto N/VSS , a parte rari casi, ha solitamente spaziato tra 30 e $50 \text{ mg}_{\text{N}}/\text{g}_{\text{VSS}}$.

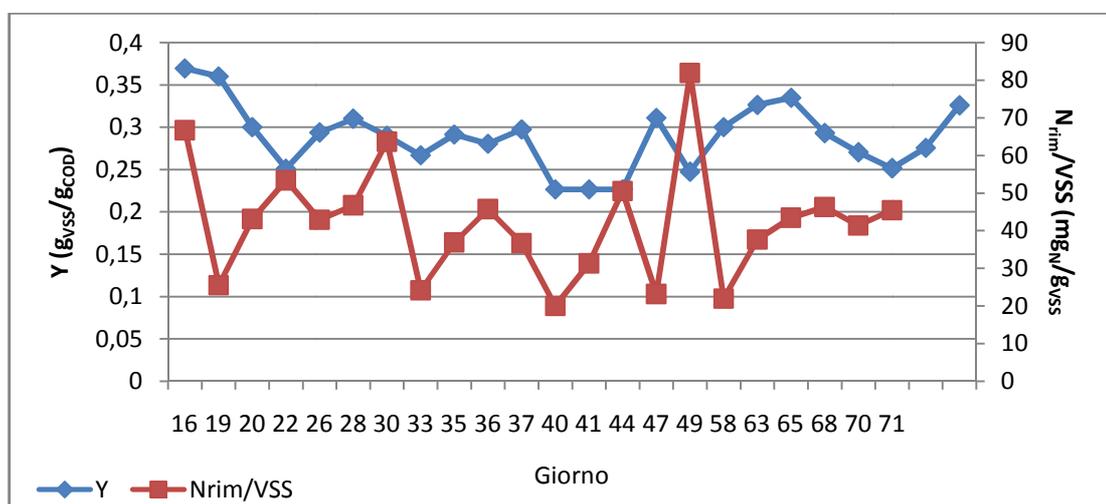


Figura 5.55 – Andamento della crescita batterica Y , contestualmente all'andamento del rapporto tra azoto rimosso e VSS formati.

Attraverso il bilancio del COD, si è ottenuto un rapporto tra COD in uscita e COD entrante sempre su valori prossimi all'unità. La massima differenza tra COD uscente ed entrante è

stata registrata durante il giorno 71, quando il rapporto tra i due parametri è stato di 1,24. Il suo valore medio è stato di 1,11. La Figura 5.56 mostra la suddivisione in percentuale delle varie componenti del COD uscente e lo scarto in percentuale necessario a rendere pari a 1 il rapporto tra COD uscente e COD in ingresso.

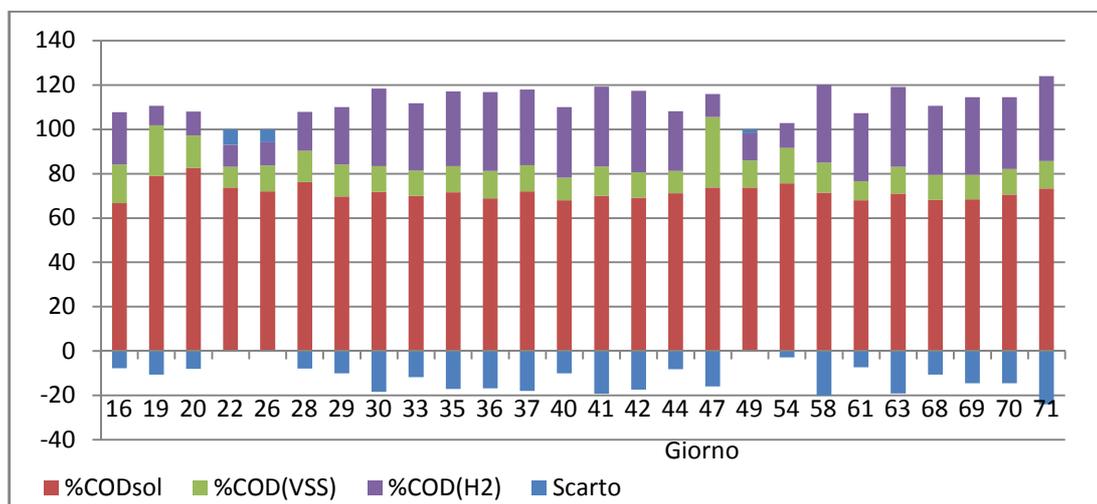


Figura 5.56 – Composizione percentuale del COD.

Il COD solubile, non degradato, è risultato essere la componente predominante, seguita da quella legata all'idrogeno e, infine, da quella legata alla biomassa. In particolare, durante le condizioni instabili, la componente legata ai VSS aumentava a discapito di quella legata all'idrogeno. La seguente è stata la composizione media del COD in uscita:

- $COD_{out\ sol} = 71,78 \pm 3,6 \%$;
- $COD_{VSS} = 13,44 \pm 4,71 \%$;
- $COD_{H_2} = 26,14 \pm 10,63 \%$.

Dunque, in queste condizioni operative, una percentuale di COD di poco superiore al 26 % è stata convertita in idrogeno. La massima percentuale conseguita è stata del 38,4 %, durante il giorno 71. Nel 46 % dei casi lo scarto è stato compreso tra il 10 % e il 20 %, mentre soltanto durante il giorno 71 esso è stato pari al 24 %; nel resto dei casi si è ottenuto uno scarto inferiore al 10 %.

5.6. Confronto tra le fasi

Questo paragrafo consiste in un riassunto del capitolo 5, in quanto vengono mostrati gli andamenti dei principali parametri registrati nel corso delle diverse fasi, per comprendere in maniera più chiara e rapida quali fossero le performance conseguite a differenti condizioni operative (sono state inserite delle rette verticali per separare tra loro le diverse fasi). In

Tabella 5.12 vengono ricordate le condizioni operative caratteristiche di ciascuna fase. Si ricorda inoltre che si sono sempre mantenuti un pH di 5,5 e una temperatura di 36 °C.

Tabella 5.12 – Parametri variabili tra le fasi.

COD _{in}	30 g _{COD} /L	20 g _{COD} /L	10 g _{COD} /L
HRT			
6 h	Fase 1		
9 h	Fase 1	Fase 2	Fase 3
12 h	Fase 1		

La Figura 5.57 mostra le rese di produzione di idrogeno.

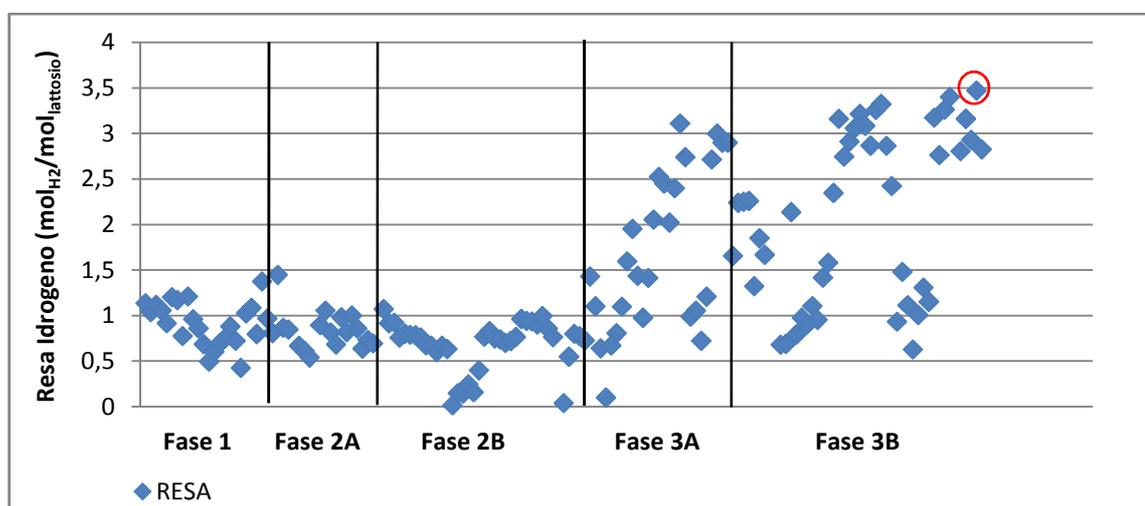


Figura 5.57 – Confronto tra le rese di idrogeno conseguite nel corso delle diverse fasi.

Saltano subito all'occhio le migliori rese conseguite nel corso della fase 3: le rese ottenute in condizioni stabili sono sempre state superiori alle 2,8 mol_{H2}/mol_{lattosio} e il valore massimo, cerchiato in rosso, è stato di 3,47 mol_{H2}/mol_{lattosio}. Come già detto si tratta di ottimi risultati, se confrontati con la massima resa ottenibile di 4 mol_{H2}/mol_{lattosio} in presenza di acido butirrico (vedi paragrafo 3.3.2.1). In fase 1 e 2, nonostante le differenze in termini di HRT e di concentrazione di COD alimentata, non è stata riscontrata un'elevata variabilità in termini di resa, la quale è rimasta generalmente compresa tra 0,6 e 1 mol_{H2}/mol_{lattosio}. La causa potrebbe essere stata l'utilizzo di mixed liquor contaminato: si ricorda che in fase 1 e 2A nel reattore è sempre stata riscontrata presenza di granuli; in fase 2B la presenza di granuli è stata molto meno consistente, per via del riavvio del reattore, ma è stato comunque riutilizzato come inoculo il mixed liquor usato nelle precedenti fasi. Come già spiegato, però,

questa affermazione avrebbe necessitato la conferma attraverso analisi approfondite della composizione del mixed liquor, nonché dei granuli. Osservando la figura, si può inoltre facilmente notare come le problematiche occorse abbiano influito sulla performance della biomassa idrogenogena: in fase 1 e in fase 2A, nonostante la presenza di granuli, non si sono fronteggiate particolari problematiche, dunque, la resa è rimasta quasi sempre compresa nel range di 0,6 e 1 mol_{H₂}/mol_{lattosio}; la fase 2B è stata invece decisamente influenzata dalle problematiche descritte all'inizio del paragrafo 5.3 (errato pompaggio di soda, in particolare), raggiungendo valori, in termini di resa, prossimi allo 0 quando esse sono occorse e riprendendosi molto lentamente; in fase 3 le problematiche relative alla pompa dell'alimento, soprattutto, e alla contaminazione del siero di latte (vedi paragrafi 5.4 e 5.5) hanno abbassato notevolmente la resa, a valori minimi comunque superiori a 0,6 mol_{H₂}/mol_{lattosio}.

La Figura 5.58 illustra il contenuto di biogas, in termini di idrogeno, CO₂ e metano.

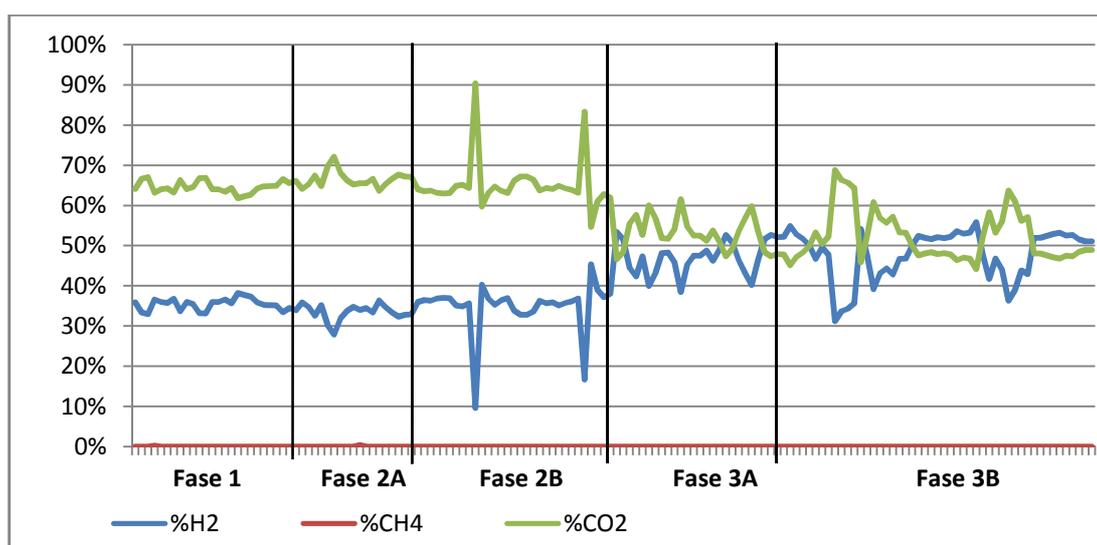


Figura 5.58 – Confronto tra i contenuti percentuali di H₂, CO₂ e CH₄, conseguiti nel corso delle diverse fasi.

Salta subito all'occhio la differenza netta che distingue il contenuto di biogas conseguito nelle fasi 1 e 2, da quello conseguito in fase 3. Infatti, in fase 3 si è sempre ottenuto un contenuto di idrogeno più elevato, in particolare, esso ha assunto valori sempre superiori al 50 % quando le condizioni stabili sussistevano. Invece nelle fasi 1 e 2, nonostante le differenti condizioni operative, il contenuto di idrogeno non ha subito particolari variazioni, assumendo valori solitamente prossimi al 36 %. Le problematiche fronteggiate hanno influenzato negativamente anche il contenuto di idrogeno, in particolare si possono notare i due minimi raggiunti in fase 2B (quando si è fronteggiato il problema relativo all'errato

dosaggio di soda si è ottenuta una percentuale di H_2 addirittura del 10 %, questo permette di comprendere meglio come il pH sia un parametro fondamentale). Si può infine affermare che le condizioni di pH e temperatura con cui si è operato non abbiano mai permesso lo sviluppo dei batteri metanigeni: in un solo caso, durante la fase 1, si è ottenuto un contenuto di metano diverso da 0, ma comunque irrisorio (0,2 %).

In Figura 5.59 è illustrata la rimozione del COD rilevata nel corso delle differenti fasi.

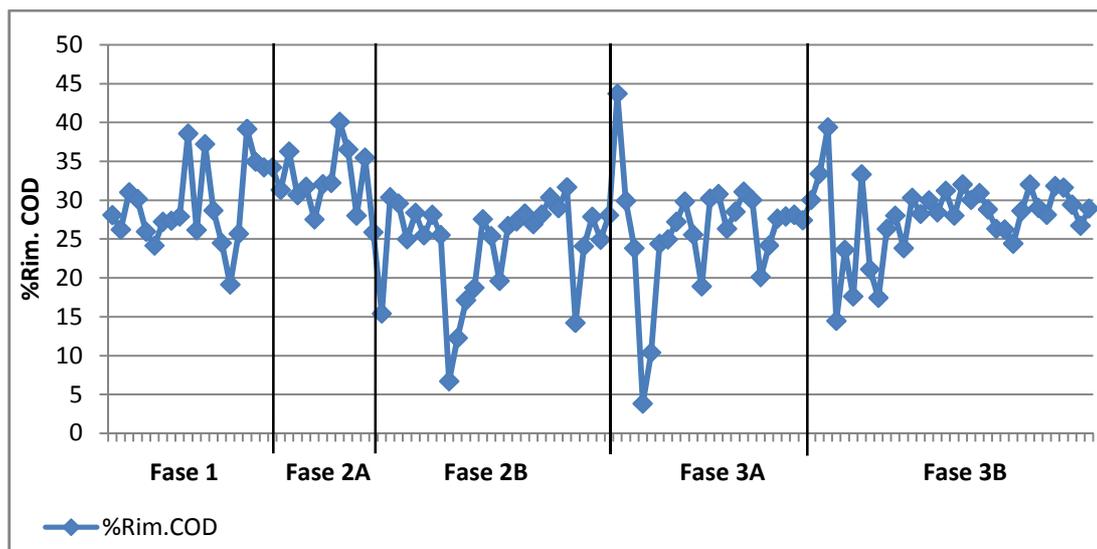


Figura 5.59 – Andamento della rimozione del COD nel corso delle diverse fasi.

Prima di tutto si può notare come la rimozione del COD sia stata generalmente compresa tra il 26 % e il 32 %. In particolare, è stata molto più costante durante la fase 3, assumendo valori intorno al 28 % solitamente. In fase 1 e in fase 2A, sebbene le performance del reattore non fossero sicuramente buone come in fase 3, la rimozione del COD è stata spesso superiore a quella ottenuta durante la fase 3. Per questo motivo si potrebbe supporre che non fosse soltanto la biomassa idrogenogena a degradare il COD durante quelle fasi (come già spiegato, sarebbe stato necessario effettuare delle analisi approfondite riguardanti il contenuto del mixed liquor). I minimi registrati in fase 2B e in fase 3 combaciano, come per gli altri parametri, con i periodi in cui si sono verificate le diverse problematiche già descritte. Mentre i massimi raggiunti in fase 3 (in particolare all'inizio della fase 3A), sono relativi ai periodi appena successivi ai riavvii del reattore. Infatti, a quelle condizioni operative, si è sempre verificato un repentino sviluppo della biomassa (e di conseguenza buone produzioni di idrogeno) già dal giorno del riavvio, per poi iniziare a decrescere per una decina di giorni, prima di raggiungere le condizioni stabili (vedi inizio del paragrafo 5.5).

La concentrazione di VFA è stata monitorata tramite kit soltanto durante le fasi 2 e 3A e il suo andamento è mostrato in Figura 5.60.

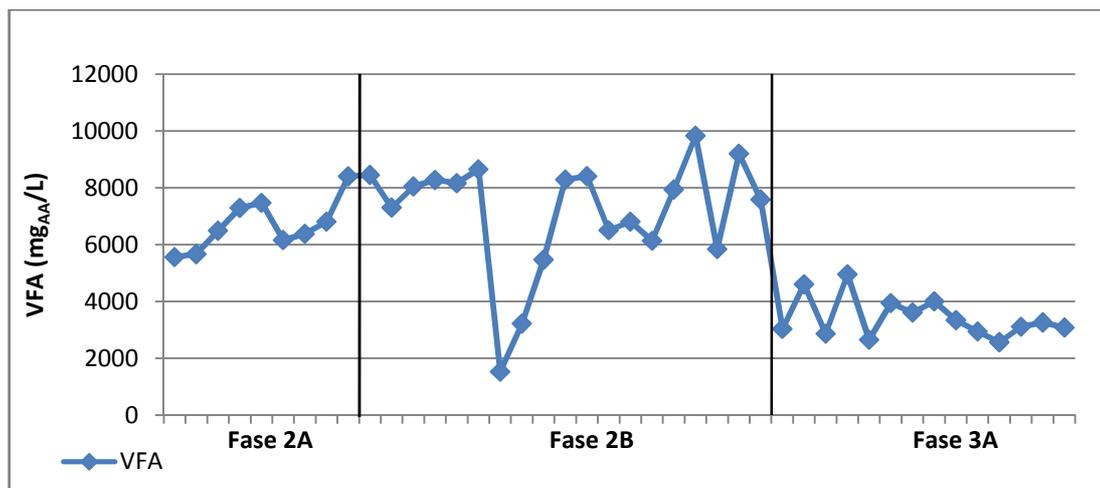


Figura 5.60 – Andamento della concentrazione di VFA durante le fasi 2A, 2B e 3A.

La concentrazione di VFA è stata decisamente inferiore durante la fase 3A, ma questo era auspicabile vista la diminuzione della concentrazione di COD in ingresso. Tuttavia, si può notare anche come essa sia stata molto più costante rispetto a quanto accaduto in fase 2, in particolare dopo aver raggiunto le condizioni stabili, quando ha assunto valori generalmente intorno ai 3000 mg_{AA}/L. In fase 2, invece, questo parametro è sembrato sempre in lenta (ma non costante) crescita, raggiungendo in fase 2B anche valori prossimi ai 10000 mg_{AA}/L. Valori così alti di acidi potrebbero avere inibito la produzione di idrogeno (vedi paragrafo 5.3). I minimi ottenuti in fase 2B meritano invece diverse considerazioni, in quanto sono stati causati dalle problematiche descritte a inizio paragrafo 5.3. In particolare, il minimo assoluto (1535 mg_{AA}/L) è stato raggiunto dopo l'errato dosaggio di soluzione basica.

La Figura 5.61 mostra l'andamento seguito dai solidi sospesi totali e volatili, usati, come già detto, quale parametro indicatore della biomassa.

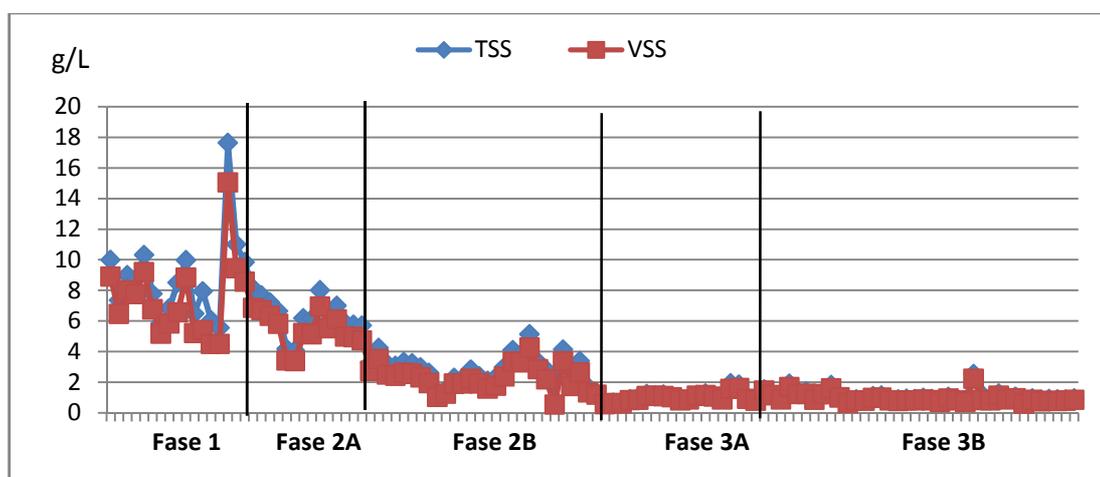


Figura 5.61 – Andamento di TSS e VSS nel corso delle diverse fasi.

Come secondo la teoria, maggiori concentrazioni di COD in ingresso hanno significato maggiori quantità di solidi sospesi: in fase 1 la concentrazione è stata praticamente sempre superiore ai 4 g_{VSS}/L; in fase 2B ha solitamente spaziato tra 2 g_{VSS}/L e 4 g_{VSS}/L; in fase 3 ha assunto valori intorno a 1 g_{VSS}/L, di poco inferiori in caso di condizioni stabili. D'altra parte è bene ricordare anche come il calcolo di questi parametri fosse stato influenzato dalla presenza dei granuli, durante le fasi 1 e 2A, risultando decisamente variabile, raggiungendo addirittura un picco di 15 g_{VSS}/L al termine della fase 1. L'influenza dei granuli risulta evidente anche confrontando le fasi 2A e 2B: a parità di condizioni operative, in fase 2B la concentrazione dei sospesi è stata decisamente inferiore, essendo questa fase caratterizzata da una presenza decisamente meno consistente o nulla di granuli. Confrontando l'andamento dei sospesi con quello degli altri parametri, risulta ipotizzabile che durante le fasi 1 e 2 ci sia stata una sovrastima della biomassa, dovuta appunto ai granuli, i quali probabilmente non erano costituiti solamente da biomassa idrogenogena formata attraverso la degradazione del COD. Altrimenti, ci si sarebbe aspettati una produzione migliore. A conferma di questo sono anche gli anomali valori conseguiti nelle fasi 1 e 2A nel calcolo del coefficiente di resa cellulare lorda (anche intorno a 0,8-0,9 g_{VSS}/g_{COD}), rispetto a quelli caratteristici (0,1÷0,3 g_{VSS}/g_{COD}). Si deve quindi supporre che vi siano stati altri fenomeni in atto che hanno portato alla formazione di sospesi di origine organica, quali ad esempio la granulazione. Infine può essere interessante notare come durante la fase 3 il rapporto tra VSS e TSS sia stato più elevato, molto vicino all'unità. Di conseguenza i trend di VSS e TSS sono risultati quasi coincidenti.

La Figura 5.62 mostra la composizione percentuale del COD, ottenuta attraverso il suo bilancio di massa, complessiva dell'intera sperimentazione.

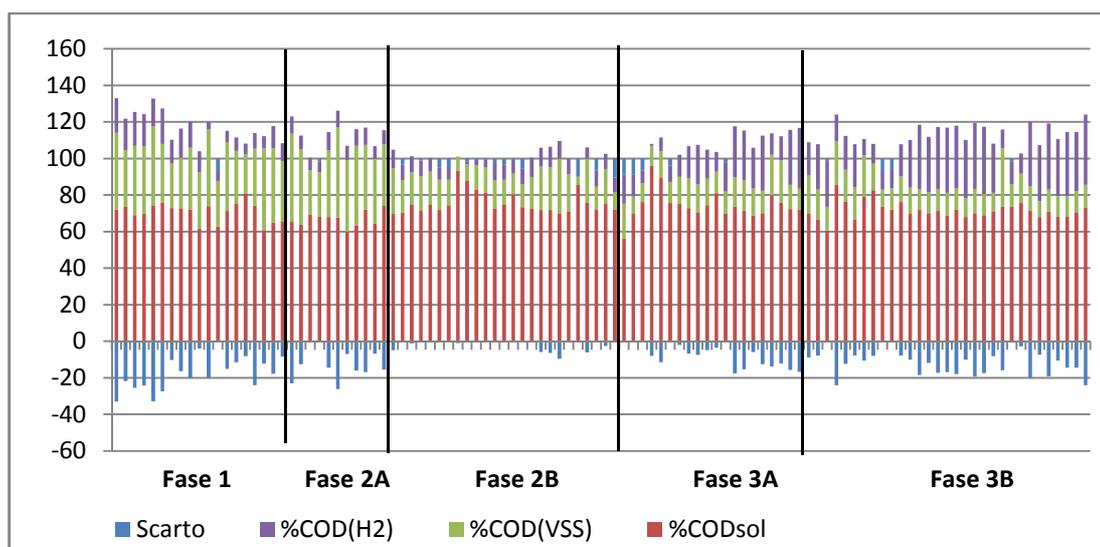


Figura 5.62 – Composizione percentuale del COD.

Il bilancio del COD è risultato sicuramente rispettato durante le fasi 2B e 3A, mentre durante le altre fasi si è spesso registrata una sovrastima del COD in uscita. Per quel che concerne la fase 3B questa sovrastima risulta di difficile discernimento, tuttavia soltanto in due casi si è registrato uno scarto superiore al 20 % (scarto massimo del 24 %). Invece si può sicuramente supporre che la sovrastima relativa alle fasi 1 e 2A fosse correlata alla presenza consistente di granuli, i quali, come si è già detto, hanno inciso sul calcolo dei VSS. In questo caso la sovrastima è stata più consistente: in 8 casi lo scarto è stato superiore al 20 %, e lo scarto massimo è stato del 32 %. Come si può facilmente notare, la componente principale è sempre stata quella relativa al COD solubile non degradato, con valori sempre superiori al 60 % (di solito si è mantenuta intorno al 70-75 %). A causa dei granuli, in fase 1 e fase 2A la componente di COD legata ai VSS è stata molto più consistente (30-40 %); mentre in fase 2B e in fase 3 essa si è ridotta di molto (10-15 %). In fase 3 la componente di COD legata all'idrogeno è stata decisamente più elevata, raggiungendo valori anche superiori al 30 % quando le condizioni stabili sussistevano. Nelle altre fasi essa ha invece assunto valori intorno al 9 %, leggermente superiori in fase 1 con HRT di 12 h (intorno al 15 %) e leggermente inferiori in fase 1 con HRT di 6 h (intorno al 6 %).

La Tabella 5.13 riassume i valori medi conseguiti relativamente ai principali parametri.

Tabella 5.13 – Valori medi dei principali parametri monitorati nel corso delle fasi.

PARAMETRO	FASE	Fase 1			Fase 2A	Fase 2B	Fase 3A	Fase 3B
	HRT 12 h	HRT 6 h	HRT 9 h					
Resa ($\text{mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{lattosio}}$)	1,011	0,748	1,05	0,83	0,71	1,7	2,23	
H ₂ (%)	34	36	34	33	36	47	49	
CH ₄ (%)	0	0	0	0	0	0	0	
CO ₂ (%)	65	63	65	67	64	53	51	
VolH ₂ (L _{H₂} /d)	10,41	14,76	14,39	7,79	6,66	7,98	10,46	
Rim. COD (%)	28,64	26,88	36,1	32,44	25,83	24,85	28,23	
VFA (mg _{AA} /L)	NA	NA	NA	6692	7391	3429	NA	
VSS (g _{VSS} /L)	7,19	7,26	8,29	5,33	2,35	1	0,92	
Y (g _{VSS} /g _{COD})	0,84	0,93	0,76	0,81	0,41	0,34	0,29	
Nrim/VSS (mg _N /g _{VSS})	16,8	22,4	15	11,15	45,55	39,6	41	

CAPITOLO 6

CONCLUSIONI

L'attività sperimentale svolta ai fini di questo elaborato di tesi ha permesso di valutare la possibilità di valorizzazione energetica del siero di latte deproteinizzato ultrafiltrato a dare idrogeno, mediante il processo di dark fermentation in un reattore CSTR alimentato in continuo, su scala pilota. I valori operativi di temperatura e pH sono stati impostati sulla base dei principali riferimenti presenti in letteratura, in particolare si è scelto di condurre il processo in condizioni mesofile (36 °C) e con un pH di 5,5. Lavorare in queste condizioni ha sempre comportato l'assenza di metanogenesi.

La **prima fase** ha previsto l'analisi della produttività batterica al variare dell'HRT, operando con una concentrazione di **COD in ingresso di 30 g/L**. In particolare, si è operato dapprima **per 25 giorni con un HRT di 12 h, poi per 17 giorni con un HRT di 6 h e, infine, per 5 giorni con un HRT di 9 h**. Il contenuto di idrogeno nel biogas è sembrato essere abbastanza indipendente dall'HRT, mantenendosi sempre in un range tra 33 % e 38 %. Riguardo invece alla portata giornaliera di idrogeno, è stata superiore ad un HRT di 6 h (media di 14,76 L_{H2}/d), inferiore ma piuttosto costante quando si è operato a 12 h (media di 10,41 L_{H2}/d). Per i pochi giorni in cui si è operato a 9 h la produzione media è stata di 14,39 L_{H2}/d. Tuttavia la resa conseguita è stata superiore operando a **12 h (media di 1,011 mol_{H2}/mol_{lattosio})** e decisamente inferiore operando con un HRT di **6 h (media di 0,748 mol_{H2}/mol_{lattosio})**, riprendendosi quando si è passati a un HRT di **9 h (media di 1,05 mol_{H2}/mol_{lattosio})**. La ragione di questo è stato probabilmente un **eccessivo dilavamento della biomassa idrogenogena quando si è operato con un HRT di 6 h**. Le minori rese conseguite operando con un HRT di 6 h si manifestano anche nella minore rimozione del COD ottenuta: operando a 12 h la rimozione del COD è stata piuttosto costante e ha assunto un valore medio del 28,64 %, mentre quando si è passati ad un HRT di 6 h, sebbene il suo valore medio non sia stato di molto inferiore (26,88 %), essa ha oscillato in un range di valori decisamente più ampio. Migliore è stata la rimozione ottenuta durante i pochi giorni in

cui si è operato con HRT di 9 h (36,1 %). I solidi sospesi sono stati utilizzati come parametro di quantificazione della biomassa. La loro concentrazione ha assunto valori molto differenti, indipendentemente dall'HRT, mantenendosi però, solitamente, tra 4,5 g_{vss}/L e 9,4 g_{vss}/L. La causa di questo ampio range è da attribuirsi alla presenza dei granuli: già da prima che la fase iniziasse nel reattore si era registrata una crescita di granuli, i quali sono rimasti presenti durante tutta la durata della fase, variando in dimensioni e numero e influenzando il calcolo dei solidi sospesi. Le cause della loro formazione e la loro composizione non sono chiare. **In termini di resa netta di crescita dei VSS rispetto al COD rimosso, nella fase 1 si sono conseguiti valori molto alti (0,86 come valore medio) e superiori a quelli teoricamente attesi per questo tipo di metabolismo. Ciò è probabilmente anche stata una delle cause della bassa resa. Le ragioni ipotizzabili sono numerose: fenomeni di coagulazione e formazione di VSS non costituiti da batteri, storage all'interno della cellula, etc. Al termine della fase 1 si è optato per il mantenimento dell'HRT pari a 9 h, analizzando invece la produzione di idrogeno al variare della concentrazione di COD alimentata. Nella fase 2 si è operato con una concentrazione di 20 g_{COD}/L, mentre nella fase 3 si è passati a 10 g_{COD}/L.**

La **fase 2** è stata suddivisa in due parti: la prima, della durata di 31 giorni (fase 2A), si è collocata di seguito alla fase 1 ed anch'essa è stata caratterizzata dalla presenza di granuli nel mixed liquor, mentre la seconda parte, di 67 giorni (fase 2B), ha avuto inizio a seguito di un riavvio del reattore, utilizzando come inoculo il mixed liquor delle precedenti fasi. Nella fase 2B la presenza di granuli è stata molto più blanda o nulla e soltanto tra i giorni 42 e 49 è stata più consistente. L'assenza di granuli ha reso la produzione e gli altri parametri analizzati più costanti, ma, ad ogni modo, tra la fase 2A e la fase 2B non si sono verificate elevate differenze a livello prestazionale, con la portata di idrogeno solitamente compresa tra 6 e 9 L_{H₂}/d e **la resa compresa tra 0,6 e 1 mol_{H₂}/mol_{lattosio}**. Un miglioramento più evidente si è osservato invece nel contenuto di idrogeno nel biogas, che è passato da un valore medio di 33 % nella fase 2A a un valore medio del 36 % nella fase 2B. La presenza dei granuli ha influenzato soprattutto il calcolo della biomassa, in quanto si è passati da un valore medio di 5,33 g_{vss}/L in fase 2A a un valore medio di 2,35 g_{vss}/L in fase 2B. Probabilmente i granuli non erano composti soltanto da biomassa batterica formatasi attraverso il processo di dark fermentation, lo dimostrano i risultati conseguiti effettuando il bilancio di massa del COD di entrambe le fasi. Secondo il bilancio del COD, il COD in ingresso deve eguagliare quello in uscita, che si compone di COD solubile, COD legato alla biomassa e COD legato all'idrogeno. Durante i giorni in cui la presenza di granuli è stata più consistente si sono ottenute maggiori discordanze nel bilancio del COD, a causa di una sovrastima del calcolo della biomassa.

La **fase 3** ha avuto inizio in seguito ad un riavvio del reattore ed ha comportato **due importanti novità**. La prima ha riguardato l'inoculo, in quanto si è deciso per il non

riutilizzo del mixed liquor utilizzato in precedenza, **bensì si è optato per riempire il reattore con 3 L di alimento e, per favorire lo sviluppo della biomassa idrogenogena, si è operato in batch per 2 ore.** La scelta di non riutilizzare il precedente mixed liquor è stata motivata dalla volontà di evitare completamente la formazione di granuli. La seconda novità apportata ha riguardato **la concentrazione di COD alimentata, in quanto si è optato per un passaggio da 20 g/L a 10 g/L.** A causa di diverse problematiche occorse, il reattore è stato riavviato più volte, ma, comunque, sembrerebbe che il processo di dark fermentation a queste condizioni operative possa sempre essere suddiviso in tre momenti principali:

- buona produzione iniziale per circa 3 giorni;
- produzione instabile e inferiore per una decina giorni;
- raggiungimento delle condizioni stabili, caratterizzate da un'ottima produzione.

Sebbene secondo la teoria, a fronte di una diminuzione della concentrazione di COD alimentata, si sarebbe dovuta conseguire una minore produzione da parte della biomassa, in questo caso, nonostante il passaggio da 20 g_{COD}/L a 10 g_{COD}/L in alimento, non è accaduto, anzi, la produzione è migliorata: dunque, la presenza di granuli sembrerebbe aver evidentemente influito negativamente sulla produzione passata, forse perché composti anche da batteri inibenti il processo.[48] Altra possibile spiegazione è la seguente: lavorare con alte concentrazioni di substrato potrebbe migliorare l'efficienza del processo mesofilo, ma potrebbe anche comportare inibizione da acido butirrico e altri prodotti. [34] Inoltre, durante alcuni studi si è riscontrata una riduzione delle rese di idrogeno all'aumentare dell'OLR, in quanto potrebbe verificarsi la contestuale produzione di propionato e di etanolo. [100] Si sono conseguite delle rese di H₂ più elevate, grazie al più consistente tasso di produzione di biogas, con la conseguente maggiore turbolenza e minore pressione parziale dell'idrogeno. [48] In particolare si è ottenuto **3,47 mol_{H₂}/mol_{lattosio} come valore massimo di resa (resa che comunque si è sempre mantenuta sopra 2,8 mol_{H₂}/mol_{lattosio} in condizioni stabili):** questo rappresenta un ottimo risultato se si considera che la massima resa teoricamente ottenibile dalla degradazione del lattosio consisterebbe di 4 mol_{H₂}/mol_{lattosio} quando si ha contestuale produzione di acido butirrico (8 mol_{H₂}/mol_{lattosio} se venisse prodotto solo acetato). Anche la composizione del biogas è stata migliore: in condizioni stabili il **contenuto di idrogeno si è sempre mantenuto intorno al 52 %.** La rimozione del COD è invece rimasta intorno al 25 %/30 %, come nelle precedenti fasi, ma più stabile.

Si sono effettuati anche alcuni test sulla miscelazione, in cui si è provato a vedere se, alternando la miscelazione a 200 RPM a periodi senza miscelazione, si sarebbe registrato un cambiamento della produzione. L'unico risultato è stato un miglioramento della produzione per pochi minuti dopo aver ristabilito le normali condizioni di miscelazione (miscelazione in continuo a 200 RPM); la lunghezza di questo periodo è sembrata essere indipendente

rispetto alla durata del test. Dopodiché l'andamento della produzione ritornava analogo a quello antecedente il test. Dunque, non sono stati riscontrati cambiamenti significativi nella produzione, tali da optare per l'adozione di una differente tipologia di miscelazione.

Riassumendo, nonostante le diverse problematiche occorse, si sono potute osservare le condizioni stabili, sotto alcuni parametri, durante ciascuna delle fasi descritte. **Confrontando le risultanze, si può affermare che le condizioni operative sperimentate in fase 3 (HRT di 9 h e COD in ingresso di 10 g/L) abbiano offerto le migliori prestazioni.**

Come prosieguo di questo lavoro sarebbe interessante operare nelle medesime condizioni operative della fase 3, per via degli ottimi risultati conseguiti, cercando di avvicinarsi sempre di più al valore di resa teorico di $4 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{lattosio}}$, provando magari uno sparging con azoto, che aumenterebbe la turbolenza, riducendo la pressione parziale dell'idrogeno. Questo potrebbe comportare un miglioramento nella produzione (vedi paragrafo 3.5.3). Sarebbe inoltre interessante far analizzare la composizione batterica di alcuni campioni di mixed liquor relativi alle differenti fasi, per poter comprendere se le performance inferiori conseguite durante le fasi 1 e 2 fossero correlate alla presenza di batteri inibitori e per chiarire le motivazioni della elevata resa di crescita dei VSS rispetto al COD rimosso. In relazione a questo, sarebbe inoltre interessante sperimentare nuovamente la concentrazione di $20 \text{ g}_{\text{COD}}/\text{L}$ in ingresso, ma riavviando il reattore utilizzando nuovo alimento invece che mixed liquor precedente. Si ricorda infatti che nelle fasi 1 e 2 si è sempre utilizzato lo stesso mixed liquor, in cui erano presenti i granuli. Forse le basse performance erano correlate al mixed liquor contaminato. Dunque la ripetizione della fase 2 (e anche della fase 1, in caso di esito positivo) creando del nuovo mixed liquor sarebbe dettata dalla volontà di comprendere se nel reattore si ristabilirebbero le condizioni già sperimentate, oppure se si possa ottenere una migliore prestazione.

Bibliografia

- [1] **Abreu A., Tavares F., Alves M., Pereira M.**, *Boosting dark fermentation with co-cultures of extreme thermophiles for biohythane production from garden waste*, *Bioresource Technology*, vol. 219, pp. 132-138, (2016).
- [2] **Alshiyab H., Kalil M., Hamid A., Mohtar W., Yusoff W.**, *Trace metal effect on hydrogen production using C. acetobutylicum*, *OnLine Journal of Biological Sciences*, vol. 8, no. 1, pp. 1-9, (2008).
- [3] **Altas L.**, *Inhibitory effect of heavy metals on methane-producing anaerobic granular sludge*, *Journal of Hazardous Material*, vol. 162, no. 2-3, pp. 1551-1556, (2009).
- [4] **Antonopoulou G., Stamatelatu K., Venetsaneas N., Kornaros M., Lybertos G.**, *Biohydrogen and methane production from cheese whey in a two-stage anaerobic process*, *Industrial and Engineering Chemistry Research*, no. 15, vol. 47, pp. 5227-5233, (2008).
- [5] **Argun H., Dao S.**, *Bio-hydrogen production from waste peach pulp by dark fermentation: Effect of inoculum addition*, *International Journal of Hydrogen Energy*, (2016).
- [6] **Argun H., Dao S.**, *Hydrogen gas production from waste peach pulp by dark fermentation and electrohydrolysis*, *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 41, pp. 11568-11576, (2016).
- [7] **Argun H., Kargi F., Kapdan I., Oztekin R.**, *Biohydrogen production by dark fermentation of wheat powder solution: Effects of C/N and C/P ratio on hydrogen yield and formation rate*, *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 33, no. 7, pp. 1813-1819, (2008).
- [8] **Argun H., Onaran G.**, *Hydrogen gas production from waste paper by sequential dark fermentation and electrohydrolysis*, *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 41, no. 19, pp. 8057-8066, (2016).

- [9] **Azbar N., Dokgoz F. T., Keskin T., Eltem R., Korkmaz K. S., Gezgin Y.,** *Comparative Evaluation of Bio-Hydrogen Production From Cheese Whey Wastewater Under Thermophilic and Mesophilic Anaerobic Conditions*, International Journey of Green Energy, vol. 6, no. 2, pp. 192-200, (2009).
- [10] **Azbar N., Dokgoz F. T., Keskin T., Korkmaz K. S., Syed H.,** *Continuous fermentative hydrogen production from cheese whey wastewater under thermophilic anaerobic conditions*, International Journal of Hydrogen Energy, vol. 34, no. 17, pp. 7441-7447, (2009).
- [11] **Bonomo Luca,** *Trattamenti delle acque reflue*, McGraw-Hill, (2011).
- [12] **Calli B., Schoenmaekers K., Vanbroekhoven K., Diels L.,** *Dark fermentative H₂ production from xylose and lactose - effects of on-line pH control*, International Journal of Hydrogen Energy, vol. 33, pp. 522-530, (2008).
- [13] **Campanile R.,** *La produzione di bioidrogeno attraverso il processo di fermentazione al buio*, (2004).
- [14] **Casal E., Montilla A., Moreno F.J., Olano A., Corzo N.,** *Use of Chitosan for Selective Removal of β -Lactoglobulin from Whey*, Journal of Dairy Science, vol. 89, no. 5, pp. 1384-1389, (2006).
- [15] **Castelló E., García y Santos C., Iglesias T., Paolino G., Wenzel J., Borzacconi L., Etchebehere C.,** *Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using a UASB reactor: Links between microbial community and reactor performance*, International Journal of Hydrogen Energy, vol. 34, no. 14, pp. 5674-5682, (2009).
- [16] **Davila-Vazquez G., Alatraste-Mondragon F., de Leon-Rodriguez A., 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, vol. 33, no. 19, pp. 4989-4997, (2008).
- [17] **Davila-Vazquez G., Arriaga S., Alatraste-Mondragon F., de Leon-Rodriguez A., Rosales-Colunga L., Razo-Flores E.,** *Fermentative biohydrogen production: trends and perspectives*, Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, vol. 7, no. 1, pp. 27-45, (2008).
- [18] **Davila-Vazquez G., Cota-Navarro C., de Leon-Rodriguez A., Rosales-Colunga L., Razo-Flores E.,** *Continuous biohydrogen production using cheese whey: Improving the hydrogen production rate*, International Journal of Hydrogen Energy, vol. 34, no. 10, pp. 4296-4304, (2009).
- [19] **De Gioannis G., Friargiu M., Massi E., Muntoni A., Poletini A., Pomi R., Spiga D.,** *Biohydrogen production from dark fermentation of cheese whey: Influence of pH*, International Journal of Hydrogen Energy, vol. 39, no. 36, pp. 20930-20941, (2014).

- [20] Elefsiniotis P., Wareham D.G., Smith M.O., *Use of volatile fatty acids from an acid-phase digester for denitrification*, Journal of Biotechnology, vol. 111, no. 3, pp. 289-297, (2004).
- [21] Ercoli L., Bonari E., Barresi F., *Acque reflue dei caseifici*, 2007.
- [22] Feng Y., Zhang H., Ma Y., Gao G., *Uncovering newly emerging variants of Streptococcus suis, an important zoonotic agent*, Trends in Microbiology, vol. 18, no. 3, pp. 124-131, (2010).
- [23] Ferchichi M., Crabbe E., Gil G.H., Hintz W., Almadidy A., *Influence of initial pH on hydrogen production from cheese whey*, Journal of Biotechnology, vol. 120, no. 4, pp. 402-409, (2005).
- [24] Fernandez C., Carracedo B., Martinez E.J., Gomez X., *Application of a packed bed reactor for the production of hydrogen from cheese whey permeate: effect of organic loading rate*, Journal of Environmental Science and Health, vol. 49, pp. 210-217, (2014).
- [25] Foglia D., Wukovits W., Friedl A., De Vrije T., Pieternel A.M., *Fermentative hydrogen production: influence of application of mesophilic and thermophilic bacteria on mass and energy balance*, Chem Eng Trans, vol. 2, pp. 815-820, (2006).
- [26] Gavala H., Skiadas I., Ahring B., *Biological hydrogen production in suspended and attached growth anaerobic reactor systems. Int J Hydrogen Energy*, International Journal of Hydrogen Energy, vol. 31, pp. 1164-75, (2006).
- [27] Ghimire A., Frunzo L., Pirozzi F., Trably E., Escudie R., Lens P. N. L., Esposito G., *A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products*, Applied Energy, vol. 144, pp. 73-95, (2015).
- [28] Gratarola P., *Produzione di bioidrogeno da siero di latte ultrafiltrato in reattore CSTR mediante dark fermentation*, (2016).
- [29] Grilli C., *Produzione di bioidrogeno e biometano da siero di latte: studi preliminari per l'avvio di un impianto pilota*, (2014).
- [30] Guo X. M., Trably E., Latrille E., Carrère H., Steyer J. P., *Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review*, International Journal of Hydrogen Energy, vol. 35, no. 19, pp. 10660-10673, (2010).
- [31] Hallenbeck P. C., Benemann J. R., *Biological hydrogen production; Fundamentals and limiting processes*, International Journal of Hydrogen Energy, vol. 27, no. 11-12, pp. 1185-1193, (2002).
- [32] Hallenbeck P. C., Ghosh D., *Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward?*, Trends of biotechnology, vol. 27, pp. 287-297, (2009).

- [33] **Han W., Zhu A., Huang J., Zhao H., Li Y.**, *A combined bioprocess based on solid-state fermentation for dark fermentative hydrogen production from food waste*, *Journal of Cleaner Production*, vol. 112, parte 5, pp. 3744-3749, (2016).
- [34] **Hawkes F., Hussy I., Kyazze G., Dinsdale R., Hawkes D.**, *Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress*, *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 32, no. 2, pp. 172–184, (2007).
- [35] **Janczukowicz W., Zielinski M.**, *Biodegradability evaluation of dairy effluents originated in selected sections of dairy production*, *Bioresource Technology*, vol. 99, no. 10, pp. 4199-4205, (2008).
- [36] **Jung K.W., Kim D.H., Shin H.S.**, *A simple method to reduce the start-up period in a H₂-producing UASB reactor*. *Int J Hydrogen*, *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 36, pp. 1466-1473, (2011).
- [37] **Karadag D., Koroglu O., Ozkaya B., Cakmakci M., Heaven S., Banks C.**, *A review on fermentative hydrogen production from dairy industry wastewater*, (wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jctb.4490, (2014).
- [38] **Karadag D., Özkaya B., Ölmez E., Nissilä M., Çakmakçı M., Yıldız S., Puhakka J.**, *Profiling of bacterial community in a full-scale aerobic composting plant*, *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 77, pp. 85-90, (2013).
- [39] **Kargi F., Eren N.S., Ozmihci S.**, *Hydrogen gas production from cheese whey powder (CWP) solution by thermophilic dark fermentation*, *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 37, pp. 226-2266, (2012).
- [40] **Khanal S., Chen W.H., Li L., Sung S.**, *Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products*, *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 29, pp. 1123-31, (2003).
- [41] **Kim J., Nhat L., Chun Y., Kim S.**, *Hydrogen production conditions from food waste by dark fermentation with Clostridium beijerinckii KCTC 1785*, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, vol. 13, no. 4, pp. 499–504, (2008).
- [42] **Kisielewska M., Wysocka I., Rynkiewicz M.**, *Continuous biohydrogen and biomethane production from whey permeate in a two-stage fermentation process*, *Environmental Progress Sustainable Energy* DOI 10.1002/ep, (2013).
- [43] **Kongjan P., Angelidaki I.**, *Extreme thermophilic biohydrogen production from wheat straw hydrolysate using mixed culture fermentation: effect of reactor configuration*, *Bioresource Technology*, vol. 101, no. 20, pp. 7789-7796, (2010).
- [44] **Koskinen P., Kaksonen A., Puhakka J.**, *The relationship between instability of H₂ production and compositions of bacterial communities within a dark fermentation fluidised-bed bioreactor*, *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 97, pp. 742-758, (2007).

- [45] **Kumar G., Zhen G., Kobayashi T., Sivagurunathan P., Kim S., Xu K.**, *Impact of pH control and heat pre-treatment of seed inoculum in dark H₂ fermentation: A feasibility report using mixed microalgae biomass as feedstock*, International Journal of Hydrogen Energy, vol. 41, no. 7, pp. 4382-4392, (2016).
- [46] **Lalurette E., Thammannagowda S., Mohagheghi A., Maness P., Logan B.**, *Hydrogen production from cellulose in a two-stage process combining fermentation and electrohydrogenesis*, International Journal of Hydrogen Energy, vol. 34, pp.6201-6210, (2009).
- [47] **Lee D., Show K., Su A.**, *Dark fermentation on biohydrogen production: Pure culture*, Bioresource Technology, vol. 102, no. 18, pp. 8393-8402, (2011).
- [48] **Lee M., Song J., Hwang S.**, *Effects of acid pre-treatment on bio-hydrogen production and microbial communities during dark fermentation*, Bioresource Technology, vol. 100, no. 3, pp. 1491-1493, (2009).
- [49] **Lim S., Choi D., Lee W., Kwon S., Chang H.**, *Volatile fatty acids production from food wastes and its application to biological nutrient removal*, Bioprocess Engineering, vol. 22, no. 6, pp. 543-545, (2000).
- [50] **Lin C., Lay C., Sen B., Chu C., Kumar G., Chen C., Chang J.**, *Fermentative hydrogen production from wastewaters: A review and prognosis*, International Journal of Hydrogen Energy, vol. 37, pp. 15632-15642, (2012).
- [51] **Lin C., Shei S.**, *Heavy metal effects on fermentative hydrogen production using natural mixed microflora*, International Journal of Hydrogen Energy, vol. 33, pp. 587-593, (2008).
- [52] **Liu D., Zeng R.J., Angelidaki I.**, *Effects of pH and hydraulic retention time on hydrogen production versus methanogenesis during anaerobic fermentation of organic household solid waste under extreme-thermophilic temperature (70 degrees C)*, Biotechnology and Bioengineering, vol. 100, no. 6, pp. 1108-1114, (2008).
- [53] **Liu W., Huang S., Zhou A., Zhou G., Ren N., Wang A.**, *Hydrogen generation in microbial electrolysis cell feeding with fermentation liquid of waste activated sludge*, International Journal of Hydrogen Energy, vol. 37, pp.13859-64, (2012).
- [54] **Logan B. et al.**, *Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers*, (2002).
- [55] **Luo G., Karakashev D., Xie L., Zhou Q., Angelidaki I.**, *Long-term effect of inoculum pretreatment on fermentative hydrogen production by repetitive batch cultivations: homoacetogenesis and methanogenesis as competitors to hydrogen production*, Biotechnology and Bioengineering, vol. 108, no. 8, pp. 1816-27, (2011).
- [56] **Magnusson L., Islam R., Sparling R., Levin D., Cicek N.**, *Direct hydrogen production from cellulosic waste materials with a single-step dark fermentation*

- process, *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 33, no. 20, pp. 5398-5403, (2008).
- [57] **Malpei F., Gardoni D.**, *Biogas da rifiuti solidi urbani - La digestione anaerobica: i principi del processo biologico e i criteri di dimensionamento*, Dario Flaccovio Editore, (2007).
- [58] **Mandal B., Nath K., Das D.**, *Improvement of biohydrogen production under decreased partial pressure of H₂ by Enterobacter cloacae*, *Biotechnology Letters*, vol. 28, no. 1, pp. 831-835, (2006).
- [59] **Mohan S., Babu V., Sarma P.**, *Effect of various pretreatment methods on anaerobic mixed microflora to enhance biohydrogen production utilizing dairy wastewater as substrate*, *Bioresource Technology*, vol. 99, no. 1, pp. 59-67, (2008).
- [60] **Moreno R., Escapa A., Cara J., Carracedo B., Gómez X.**, *A two-stage process for hydrogen production from cheese whey: integration of dark fermentation and biocatalyzed electrolysis*, *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 40, pp.1-8, (2015).
- [61] **Moreno-Dávila I., Ríos-González L.J., Garza-García Y., Rodríguez-de la Garza J.A., Rodríguez-Martínez J.**, *Biohydrogen production from dairy processing wastewater by anaerobic biofilm reactors*, *African Journal of Biotechnology*, vol. 10, no. 27, pp. 5320-5326, (2011).
- [62] **Motte J., Trably E., Hamelin J., Escudié R., Bonnafous A., Steyer J.P.**, *Total solid content drives hydrogen production through microbial selection during thermophilic fermentation*, *Bioresource Technology*, vol. 166, pp. 610-615, (2014).
- [63] **Nath K., Kumar A., Das D.**, *Hydrogen production by Rhodobacter sphaeroides strain O.U.001 using spent media of Enterobacter cloacae strain DM11*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 68, no. 4, pp. 533-541, (2005).
- [64] **Navarro C., Reyes J., Vazquez G., Mondragon F., Florez E.**, *Continuous hydrogen and methane production in a two stage cheese whey fermentation system*, *Water Science and Technology*, vol. 64, pp. 367-374, (2011).
- [65] **Ngo T., Nguyen T., Bui H.**, *Thermophilic fermentative hydrogen production from xylose by Thermotoga neapolitana DSM 4359*, *Renewable Energy*, vol. 37, no. 1, pp. 174-179, (2012).
- [66] **Ntaikou I., Antonopoulou G., Lyberatos G.**, *Biohydrogen Production from Biomass and Wastes via Dark Fermentation: A Review*, *Waste and biomass valorization*, vol. 1, no. 1, pp. 21-39, (2010).
- [67] **O-Thong S., Prasertsan P., Intrasungka N., Dhamwichukorn S., Birkeland N.K.**, *Optimization of simultaneous thermophilic fermentative hydrogen production and COD reduction from palm oil mill effluent by*

- Thermoanaerobacterium-rich sludge, *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 33, no. 4, pp. 1221-1231, (2008).
- [68] **Patel A., Vaisnav N., Mathur A., Gupta R., Tuli D.**, *Whey waste as potential feedstock for biohydrogen production*, *Renewable Energy*, vol. 98, pp. 221-225, (2016).
- [69] **Perna V., Castellò E., Wenzel J., Zampol C., Fontes Lima D. M., Borzacconi L., Varesche M. B., Zaiat M., Etchebehere C.**, *Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey*, *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 38, no. 1, pp. 54-62, (2013).
- [70] **Prazeres A., Carvalho F., Rivas J.**, *Cheese whey management: A review*, *Journal of Environment Management*, vol. 110, pp. 48-68, (2012).
- [71] **Rafrafi Y., Trably E., Hamelin J., Latrille E., Meynial-Salles I., Benomar S., Giudici-Ortoni M. T., Steyer J.P.**, *Sub-dominant bacteria as keystone species in microbial communities producing bio-hydrogen*, *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 38, no. 12, pp. 4975-4985, (2013).
- [72] **Ren N., Guo W., Liu B., Cao G., Ding J.**, *Biological hydrogen production by dark fermentation: challenges and prospects towards scaled-up production*, *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 22, no. 3, pp. 365-370, (2011).
- [73] **Reyes J., Celis L., Alatraste-Mondragon F., Razo-Flores E.**, *Different start-up strategies to enhance biohydrogen production from cheese whey in UASB reactors*, *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 37, no. 7, pp. 5591-5601, (2012).
- [74] **Robledo-Narváez P., Muñoz-Páez K., Poggi-Varaldo H., Ríos-Leal E., Calva G., Ortega-Clemente L.**, *The influence of total solids content and initial pH on batch biohydrogen production by solid substrate fermentation of agroindustrial wastes*, *Journal of Environmental Management*, vol. 128, pp. 126-137, (2013).
- [75] **Rosa P., Santos S., Sakamoto I., Varesche M., Silva E.L.**, *Hydrogen production from cheese whey with ethanol-type fermentation: effect of hydraulic retention time on the microbial community composition*, *Bioresource Technology*, vol. 161, pp. 10-19, (2014).
- [76] **Saady N.**, *Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge*, *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 38, no. 30, pp. 13172-13191, (2013).
- [77] **Sacchi D.**, *Produzione continua di idrogeno da siero di latte ultrafiltrato in reattore MBR*, (2014).
- [78] **Salerno B., Park W., Zuo Y., Logan B. E.**, *Inhibition of biohydrogen production by ammonia*, *Water Research*, vol. 40, no. 6, pp. 1167-1172, (2006).

- [79] **Saratale G., Chen S., Lo Y., Saratale R., Chang J.**, *Outlook of biohydrogen production from lignocellulosic feedstock using dark fermentation – a review*, Journal on Scientific & Industrial Research, vol. 67, pp. 962-979, (2008).
- [80] **Schievano A., Sciarria T., Gao Y., Scaglia B., Salati S., Zanardo M., Quiao W., Dong R., Adani F.**, *Dark fermentation, anaerobic digestion and microbial fuel cells: An integrated system to valorize swine manure and rice bran*, Waste Management, vol. 56, pp. 519-529, (2016).
- [81] **Show K., Zhang Z., Tay J., Tee D., Lee D., Ren N.**, *Critical assessment of anaerobic processes for continuous biohydrogen production from organic wastewater*, International Journal of Hydrogen Energy, vol. 35, pp. 13350-5, (2010).
- [82] **Show K., Zhang Z., Tay J., Teeliang D., Lee D., Jiang W.**, *Production of hydrogen in a granular sludge-based anaerobic continuous stirred tank reactor*, International Journal of Hydrogen Energy, vol. 32, pp. 4744–53, (2007).
- [83] **Sinha P., Pandey A.**, *An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production*, International Journal of Hydrogen Energy, vol. 36, pp. 7460–7478, (2011).
- [84] **Srikanth S., Venkata Mohan S., Lalit Babu V., Sarma P.N.**, *Metabolic shift and electron discharge pattern of anaerobic consortia as a function of pretreatment method applied during fermentative hydrogen production*, International Journal of Hydrogen Energy, vol. 35, no. 19, pp. 10693-10700, (2010).
- [85] **Stamatelatou K., Antonopoulou G., Tremouli A., Lyberatos G.**, *Production of gaseous biofuels and electricity from cheese whey*, Industrial and Engineering Chemistry Research, vol. 50, pp. 639-644, (2011).
- [86] **Su H., Cheng J., Zhou J., Song W., Cen K.**, *Combination of dark- and photo-fermentation to enhance hydrogen production and energy conversion efficiency*, International Journal of Hydrogen Energy, vol. 34, no. 21, pp. 8846-8853, (2009).
- [87] **Taherdanak M., Zilouei H., Karimi K.**, *The effects of Fe₀ and Ni₀ nanoparticles versus Fe²⁺ and Ni²⁺ ions on dark hydrogen fermentation*, International Journal of Hydrogen Energy, vol. 41, no. 1, pp. 167-173, (2016).
- [88] **Tang G., Huang J., Sun Z., Tang Q., Yan C., Liu G.**, *Biohydrogen production from cattle wastewater by enriched anaerobic mixed consortia: influence of fermentation temperature and pH*, Journal of Bioscience and Bioengineering, vol. 106, no. 1, pp. 80-87, (2008).
- [89] **Tao Y., Chen Y., Wu Y., He Y., Zhou Z.**, *High hydrogen yield from a two-step process of dark- and photo-fermentation of sucrose*, International Journal of Hydrogen Energy, vol. 32, pp. 200-206, (2007).

- [90]**Tuna E., Kargi F., Argun H.**, *Hydrogen gas production by electrohydrolysis of volatile fatty acid (VFA) containing dark fermentation effluent*, International Journal of Hydrogen Energy, vol. 34, pp. 262-269, (2009).
- [91]**Turon V., Trably E., Fouilland E., Steyer J. P.**, *Potentialities of dark fermentation effluents as substrates for microalgae growth: A review*, Process Biochemistry, vol. 51, no. 11, pp. 1843-1854, (2016).
- [92]**Valdez-Vazquez I., Poggi-Varaldo H.**, *Alkalinity and high total solids affecting H₂ production from organic solid waste by anaerobic consortia*, International Journal of Hydrogen Energy, vol. 34, pp. 3639-3646, (2009).
- [93]**Valdez-Vazquez I., Riosleal E., Esparzagarzia F., Cecchi F., Poggivaraldo H.**, *Semicontinuous solid substrate anaerobic reactors for H₂ production from organic waste: mesophilic versus thermophilic regime*, International Journal of Hydrogen Energy, vol. 30, pp. 1383-1391, (2005).
- [94]**Van Ginkel S., Logan B. E.**, *Inhibition of biohydrogen production by undissociated acetic and butyric acids*, Environ. Sci. Technol., vol. 39, no. 23, pp. 9351-6, (2005).
- [95]**Venetsaneas N., Antonopoulou G., Stamatelatou K., Kornaros M., Lyberatos G.**, *Using cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with alternative pH controlling approaches*, Bioresource Technology, vol. 100, pp. 3713-3717, (2009).
- [96]**Wang A., Sun D., Cao G., Wang H., Ren N., Wu W., Logan B.**, *Integrated hydrogen production process from cellulose by combining dark fermentation, microbial fuel cells, and a microbial electrolysis cell*, Bioresource Technology, vol. 102, no. 5, pp. 4137-4143, (2011).
- [97]**Wang J., Wan W.**, *Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures*, International Journal of Hydrogen Energy, vol. 33, no. 20, pp. 5392-5397, (2008).
- [98]**Wang X., Zhao Y.**, *A bench scale study of fermentative hydrogen and methane production from food waste in integrated two-stage process*, International Journal of Hydrogen Energy, vol. 34, no. 1, pp. 245-254, (2009).
- [99]**Weiland P.**, *Biomass digestion in agriculture: a successful pathway for the energy production and waste treatment in Germany*, Engineering in Life Sciences, vol.6, pp. 302-309, (2006).
- [100]**Wu X., Zhu J., Dong C., Miller C., Li Y., Wang L., Yao W.**, *Continuous biohydrogen production from liquid swine manure supplemented with glucose using an anaerobic sequencing batch reactor*, International Journal of Hydrogen Energy, vol. 34, no. 16, pp. 6636-6645, (2009).
- [101]www.clal.it

- [102]www.wikipedia.org.
- [103]**Yang P., Zhang R., McGarvey J.A., Benemann J.R.**, *Biohydrogen production from cheese processing wastewater by anaerobic fermentation using mixed microbial communities*, International Journal of Hydrogen Energy, vol. 32, pp. 4761–4771, (2007).
- [104]**Yousuf A., Bonk F., Bastiadas Oyanedel J., Schmidt J.**, *Recovery of carboxylic acids produced during dark fermentation of food waste by adsorption on Amberlite IRA-67 and activated carbon*, Bioresource Technology, vol. 217, pp. 137-140, (2016).
- [105]**Zhang Z., Show K., Tay J., Liang D., Lee D.**, *Biohydrogen production with anaerobic fluidized bed reactors—a comparison of biofilm-based and granule-based systems*, International Journal of Hydrogen Energy, vol. 33, pp. 1559-1594, (2008).