Università
Ca'Foscari
Venezia

Ca' Foscari
Dorsoduro 3246
30123 Venezia

Corso di Laurea magistrale
(*ordinamento ex D.M. 270/2004*)
in Scienze Ambientali

Tesi di Laurea

Biohythane: ottimizzazione di processo

Definizione di un algoritmo di calcolo per l'automazione del controllo di portata sul flusso di ricircolo

Relatore
Ch. Prof. Paolo Pavan

Correlatore
Dott. Cristina Cavinato

Laureando
Federico Micolucci
Matricola 796457

Anno Accademico
2011 / 2012

Sommario

Abstract **3**

Capitolo 1 - Introduzione **4**
1.1 – Digestione Anaerobica 9
1.2 – Dark Fermentation 17
1.3 – Biohythane
processi a due fasi per la produzione combinata di idrogeno e metano 20
1.3.2 - stato dell'arte *22*

Capitolo 2 – Obiettivi della ricerca **24**

Capitolo 3 – Materiali e metodi **27**
3.1 – Metodi analitici 27
3.1.1 - Analisi chimico fisiche *27*
3.1.2 - Analisi microbiologiche *29*
3.2 – Approccio chemiometrico 33
3.3 – Descrizione impianto pilota e substrati 36
3.4 – Condizioni operative 41
3.4.1 - Stato di avanzamento *44*

Capitolo 4 – Risultati e discussione **48**
4.1 – Run 1 48
4.1.1 - Gas prodotto *61*
4.2.1 - Composizione biohythane e bilanci di massa *64*
4.4 – Analisi Chemiometrica 67

Capitolo 5 – Analisi microbiologica (FISH) **80**
5.1 – Osservazione in Epifluorescenza e Foto 81

Conclusioni 90

Glossario 92
Bibliografia 93

Abstract

The present dissertation focuses on the energy production from renewable resources.

The research concerns the optimization of a two-phase anaerobic digestion process; this process treats the OFMSW (Organic Fraction Municipal Solid Waste) for bio-hythane production.

Results show that the recirculation of the methanogenic reactor effluent wastewater as a buffer system, in the dark fermentation stage, is a good strategy to improve the production of bio-hythane in a continuous long-term double phase.

The dynamic control of the effluent flow allows to maintain the pH within the optimal range (5 – 5.5) for the hydrogenase catalysed reactions, therefore enhancing and stabilizing the bio-hydrogen production.

The results show that high biogas yields and a stable bio-hythane production can be achieved through this new optimized process.

According to this strategy the decisive step was to affirm the possibility to settle the parameters of stability to maintain the process strong and durable, however the ratio of recycling must be constantly tuned according to the change of the stability parameters of the reactors in time.

The above considerations point out the necessity to automate the control of ammonia levels (a process inhibitor), using the recirculation of the methanogenic reactor effluent.

The research focused on the development of statistical models to predict ammonia levels, difficult to measure online directly, on the basis of other parameters closely related to its concentration.

A preliminary statistical study to evaluate the feasibility of the conductivity as a key parameter has developed.

FISH microbiological analysis showed that the hydrogenotrophic metabolism is the main path for methane production in a double phase thermophilic anaerobic process.

Capitolo 1

Introduzione

Senza l'energia di origine fossile l'uomo del ventunesimo secolo si troverebbe in serie difficoltà e il mondo attorno a noi non sarebbe quello che conosciamo oggi. L'80% dei consumi mondiali di energia da fonte primaria è alimentato da 3 principali fonti esauribili quali il petrolio, il carbone e il gas naturale (IEA 2009). Tale processo è oggi inarrestabile e costantemente marca effetti negativi sull'ambiente. In primis, gas naturale e petrolio saranno sempre importanti per il sistema energetico mondiale e stime affermano che nel 2050 il gas naturale rimarrà un combustibile essenziale in tutti i settori con una domanda superiore a oggi. La fase di combustione in particolar modo emette sostanze inquinanti e contribuisce al riscaldamento globale del pianeta. Sebbene questo secondo aspetto susciti ancora oggi previsioni e dibattiti accesi tra gli scienziati, alcuni infatti hanno previsioni più catastrofiche altri negano quasi del tutto l'esistenza di un pericolo per la biosfera, resta inopinabile però che la dipendenza della specie umana dai combustibili fossili emetta una quantità di anidride carbonica che perpetuamente si accumula in atmosfera. La chimica dell'atmosfera afferma infatti che l'uso di combustibili fossili è il fattore più ovvio che causa incremento di CO_2.

Un piccolo accenno storico può farci riflettere su come questa molecola sia enormemente accresciuta: negli ultimi 250 anni la concentrazione di CO_2 è salita da 280 ppm a 370 ppm attualmente, con la velocità di crescita attuale si può stimare che la concentrazione di CO_2 sarà raddoppiata a metà di questo secolo (IPCC).

Il progressivo impoverimento delle riserve mondiali di combustibili fossili crea la necessità di trovare fonti di energia alternative.

Un esempio è l'impiego delle biomasse come fonti energetiche in sostituzione delle tradizionali fonti fossili. Le biomasse rappresentano una fonte di energia praticamente inesauribile e, in linea di principio, la quota di anidride carbonica immessa nell'atmosfera corrisponde a quella fissata durante la fase di fotosintesi promuovendo così, in caso di combustione completa, flussi netti di gas serra nulli. Inoltre le biomasse si prestano facilmente ad essere

sottoposte a processi di trasformazione biologica, energeticamente più sostenibili rispetto a quelli tradizionali.

Le biomasse possono essere ricavate dalla:

- coltivazione delle colture energetiche (energy crops) e raccolta di vegetazione spontanea;
- raccolta della porzione biodegradabile dei rifiuti organici di origine civile e agroindustriale.

La prima tipologia, quella delle coltivazioni dedicate, può produrre una quantità significativa di energia. Tuttavia persiste il problema della scarsità delle risorse idriche, nonchè il possibile aumento dei prezzi dei prodotti alimentari a causa della derivante minor disponibilità di superficie di terreni destinati alla produzione di prodotti agricoli. Di non minore importanza è anche il determinarsi di un certo grado di compromissione dell'equilibrio naturale conseguente all'inevitabile perdita di biodiversità. In tal senso è evidente che l'utilizzo dei rifiuti organici sia di origine civile che agroindustriale giocherà un ruolo di primaria importanza per la produzione di energia da biomasse.

Tra le varie tecnologie rinnovabili dunque vi è la conversione della biomassa in energia utilizzabile. Alcune possono oggi considerarsi giunte ad un livello di sviluppo utilizzato su scala industriale. Una di queste è la digestione anaerobica (DA), processo di conversione di tipo biochimico che avviene in assenza di ossigeno, ad opera di microrganismi, batteri e archea, che consiste nella demolizione di sostanze organiche complesse come glucidi, lipidi e protidi, contenute nei vegetali e nei sottoprodotti animali. Essa produce un biogas costituito per il 50-70% da metano e per la restante parte da anidride carbonica.

Il biogas prodotto viene raccolto, compresso, pulito e puo' essere immagazzinato come combustibile per alimentare lo stesso processo di bioconversione, attraverso la cogenerazione a gas, la quale produce calore ed energia elettrica. La cogenerazione infatti è un processo che recupera il calore residuo prodotto. È la produzione combinata in un unico processo di due forme di energia, elettrica e termica o meccanica, mediante un sistema che impieghi un unico combustibile, in questo caso il biogas. (art. 2 D.Lgs. n.20 del 08 Febbraio 2007). Il biogas sostituisce il gas di origine fossile come

combustibile per la cogenerazione.

Attualmente buona parte della della frazione organica biodegradabile dei rifiuti solidi urbani viene inviata a compostaggio. Solo una piccola parte viene sottoposta al processo di DA. Tuttavia la DA non esclude il compostaggio ma, al contrario, accoppiare i due processi comporta dei vantaggi. (F.Cecchi et al.,1990).

Infatti se il flusso viene prima trattato mediante digestione anaerobica si hanno alcuni vantaggi:

1) recuperare energia

2) i tempi per la maturazione del compost diminuiscono perché ha già subito una sorta di stabilizzazione biologica anaerobica

3) si diminuiscono i volumi dei capannoni utilizzati per il compostaggio.

Alla fine della maturazione è possibile utilizzare il compost (scarti organici trasformati) come ammendante per terreni.

Tra le fonti energetiche alternative c'è dunque la frazione organica del rifiuto solido urbano che viene trattata mediante DA perché oltre ad ottimizzare la gestione del flusso, consente di valorizzarlo dal punto di vista energetico.

Altri processi, ad es. l'incenerimento, non consentono di chiudere in positivo il bilancio energetico del processo di tale flusso, poiché quest'ultimo è caratterizzato da un alto quantitativo d'acqua.

Gli impianti a digestione anaerobica possono essere alimentati anche con altri rifiuti alimentari, le deiezioni animali e i reflui civili.

E' importante notare che nel processo di digestione anerobica tutto il gas prodotto viene raccolto per essere usato come combustibile; ciò non accade nelle discariche opportunamente attrezzate per la raccolta di biogas, dove solo il 40% circa del gas generato può essere raccolto, che si sviluppa a danno della rimanente parte che viene dispersa in atmosfera. Questo aspetto è importante in quanto il metano, di cui è composto in maggior parte il biogas, è un gas serra potente, con un effetto circa 20 volte superiore a quello dell'anidride carbonica. Le emissioni in atmosfera di biogas non sono dunque desiderabili.

Al termine del processo di fermentazione si conservano i principali elementi nutritivi (azoto, fosforo e potassio) che erano presenti nella stessa materia prima precendentemente utilizzata o consumata in parte poi diventato rifiuto, feed per i batteri della digestione anaerobica. Si favorisce così la mineralizzazione dell'azoto organico risultando in tal modo ancora un ottimo fertilizzante (esclusivamente su trattamento di FORSU e deiezioni animali).

Il recupero di energia da scarti di produzione delle attività agro-industriali è un'ulteriore vantaggio economico e sociale in quanto il settore riutilizza e smaltisce rifiuti organici in modo ecologico, uno scarto che può considerarsi infinito nella nostra società.

Va chiarito il concetto di biomassa, per non confonderlo con il rifiuto destinato a termodistruzione. Le biomasse sono esclusivamente scarti di origine vegetale e animale e non vanno confusi con i rifiuti secchi delle attività umane.

Lo sfruttamento a fini energetici delle biomasse rappresenta per il nostro Paese un importante giacimento energetico potenziale, che potrebbe permettere di ridurre la nostra vulnerabilità nell'approvvigionamento delle risorse energetiche e limitare l'importazione di energia elettrica.

Da un punto di vista di pianificazione territoriale per ridurre l'impatto ambientale è inoltre necessario che le centrali siano di piccole dimensioni ed utilizzino biomasse locali, evitando in questo modo il trasporto da luoghi lontani.

Per la pentrazione sul mercato e la competitività, abbattendo il più possibile i costi di produzione, sarebbe auspicabile progettare filiere energetiche il cui substrato di partenza abbia costi ridotti o nulli di approvvigionamento, essendo quest'ultimo un aspetto che va ad incidere pesantemente sul costo totale di produzione. Appare del tutto evidente come la produzione di energia da rifiuti civili e agroindustriali, unitamente alla necessità di gestire adeguatamente i loro flussi, giocherà un ruolo centrale nello scenario futuro di approvvigionamento energetico da fonti rinnovabili.

I governi dovranno però incentivare lo sviluppo di nuove e innovative tecnologie per conseguire soprattutto i tagli alle emissioni di CO_2. Al 2008 il petrolio risulta essere al primo posto come contributo al soddisfacimento della domanda di energia primaria mondiale con una quota pari a circa il 35%, carbone 24.5%, gas naturale 20.7% e nucleare 6.4%. L'apporto delle energie rinnovabili al consumo mondiale di energia primaria è del 12.8%, con un tasso medio annuo di crescita del 2%. (ISPRA 2012).

Tale contributo se lo si rapporta alla produzione di energia elettrica mondiale corrisponde al 18.5% di cui gran parte proviene dal settore idroelettrico (dati riferiti al 2008). Vanno considerate anche le scelte politiche dei governi; la Cina si è posta l'obiettivo di ridurre del 16% la sua intensità energetica entro il 2015; gli Stati Uniti hanno adottato nuovi standard di efficienza volti ad ottimizzare il consumo di carburanti; l'Unione Europea si è impegnata nella riduzione del 20% della sua domanda di energia entro il 2020 (Commissione Europea 2012); il Giappone mira a ridurre del 10% i suoi consumi elettrici entro il 2030.

1.1 La Digestione Anaerobica

La digestione anaerobica è quel processo biologico dove in assenza di ossigeno la sostanza organica viene degradata da microrganismi attraverso diversi step. Partendo da sostanze complesse (proteine, grassi, carboidrati) si ottengono così sostanze sempre più semplici (zuccheri, amminoacidi) fino ad arrivare al prodotto finale che è il biogas. Particolari microrganismi dunque trasformano la sostanza organica, attraverso un processo biologico, in biogas. La sua composizione chimica generalmente è 60% di CH_4 e 40% di CO_2 e può variare a seconda delle condizioni di processo e dal tipo di sostanza organica fermentata. Il processo biologico della DA è mediato dall'azione di particolari microrganismi, batteri e archaea, che lavorano in stretta *sintrofia* dove il prodotto di una reazione è il substrato per la successiva. Essi trasformano la sostanza organica (polisaccaridi, grassi, proteine e sostanze organiche complesse) in composti intermedi come acetato, idrogeno e anidride carbonica. Tutto l'H_2 prodotto durante le fermentazioni primarie viene utilizzato da microorganismi consumatori di idrogeno come gli omoacetogeni, i metanogeni o i solfato-riduttori (in ambiente con solfati). Anche l'acetato e l'anidride carbonica possono essere utilizzati da archaea metanogeni che chiudono il processo con la produzione di CH_4 e CO_2.

La sintrofia è un fenomeno descritto dalla "collaborazione" di diversi organismi che possono degradare insieme composti più o meno complessi, ricavandone energia, che non sarebbero in grado di sfruttare e utilizzare separatamente. Nella digestione anaerobica la relazione sintrofica implica la presenza di idrogeno (H_2), il quale viene prodotto da uno dei microrganismi della catena trofica e successivamente o contemporaneamente consumato da un altro. Tale processo prende nome di trasferimento interspecifico di idrogeno.

In particolar modo batteri solfato-riduttori, denitrificanti, omoacetogeni e metanogeni, sono in grado di utilizzare l'idrogeno.

La degradazione anaerobica di un substrato biodegradabile è proprio un esempio di sintrofia, ovvero il risultato di una complessa serie di reazioni biochimiche che trasformano la sostanza organica fino a metano e biossido di carbonio in cui i microrganismi coinvolti cooperano tra di loro.

Le varie fasi della digestione anarobica sono:

1 – **idrolisi**;

l'*idrolisi* dei substrati complessi accompagnata da acidificazione con formazione di acidi grassi volatili, chetoni ed alcoli.

In questa prima fase si ha la degradazione di substrati organici complessi particolati o solubili (proteine, grassi e carboidrati) con formazione di composti semplici (aminoacidi, acidi grassi e monosaccaridi).

I microrganismi coinvolti sono:

- batteri idrolitici, che depolimerizzano le macromolecole biodegradabili in composti più semplici. Essi producono idrolasi (enzimi extracellulari) capaci di solubilizzare il materiale particolato e di scindere le sostanze macromolecolari in monomeri e oligomeri facilmente trasportabili all'interno delle cellule di microrganismi acidogenici fermentanti.

2 – **acidogenesi**;

Nell'*acidogenesi* si hanno VFA (volatile fatty acids) e acidi grassi a lunga catena (da C_2 fino a C_7). Essi sono il prodotto che rappresenta il substrato di partenza per il gruppo di microrganismi successivo, gli acetogeni.

Nel processo fermentativo acidogenico i batteri fermentativi degradano i monomeri e oligomeri organici, zuccheri, acidi grassi ed amminoacidi, producendo acidi grassi volatili essenzialmente propionato e butirrato.

Viene inoltre prodotto ammonio come sottoprodotto (dalla fermentazione degli amminoacidi).

I microrganismi coinvolti sono:

- batteri acidogeni, che utilizzano come substrato i composti organici semplici liberati dai batteri idrolitici. Questi operano generalmente l'ossidazione dei substrati organici semplici fino alla forma del piruvato che viene poi trasformato in acidi grassi volatili, alcoli e chetoni che rappresentano i substrati di partenza per la successiva fase acetogenica.

L'idrogeno che si forma è un prodotto delle prime due reazioni, idrolisi e acidogenesi. Prodotto di nostro interesse è l'H_2, che essendo un donatore di elettroni ha un importante ruolo, bilancia le reazioni redox all'interno del

sistema di digestione anaerobica.

3 – **acetogenesi**;

l'*acetogenesi* sono reazioni in cui a partire dagli acidi grassi, delle fasi precedenti (propionato, butirrato e altri), si ha la formazione di acido acetico, acido formico, CO_2 ed idrogeno molecolare.

Vi sono 2 meccanismi che devono essere considerati:

a) la degradazione a partire da acidi grassi a catena lunga (LCFA, long chain fatty acids)

b) la degradazione a partire da acidi grassi a catena corta (SCFA, short chain fatty acids, o VFA, volatile fatty acids).

I microrganismi coinvolti sono:

- batteri acetogeni:

In anaerobiosi l'ecosistema è complesso, vi è la presenza di specializzati gruppi batterici in grado di effettuare passaggi precisi in cui la sostanza organica in primo luogo viene fermentata a idrogeno, CO_2 e acidi grassi volatili (VFA – volatile fatty acids). In particolare i VFA (prodotto fermentativo), ad opera di una popolazione di microorganismi, vengono convertiti in acido acetico, CO_2 e idrogeno.

Questi specifici batteri sono gli OHPA, acetogeni produttori obbligati di idrogeno, i loro prodotti rappresentano i substrati diretti per la metanogenesi.

Gli OPHA (Obligate Hydrogen Producing Acetogens) utilizzano come substrato i prodotti dei batteri acidogeni, convertendo attraverso il processo di β-ossidazione gli acidi grassi volatili superiori in acido acetico, CO_2 e H_2.

Gli acidi grassi insaturi vengono dapprima saturati e poi ossidati.

- batteri omoacetogeni:

batteri omoacetogeni che sintetizzano acetato partendo da anidride carbonica e idrogeno.

Durante la produzione di acido acetico la presenza di idrogeno molecolare nel mezzo può determinare problemi di inibizione. Se però H_2 viene mantenuto a basse concentrazioni, grazie all'attività dei microrganismi metanogeni H_2 ossidanti (idrogenotrofi), la degradazione degli acidi grassi ad H_2 ad opera dei batteri acetogeni è resa più probabile, nonostante la formazione di H_2 sia energeticamente sfavorita.

La pressione parziale in un processo in continuo è importante, infatti l'effettiva concentrazione dei reagenti e dei prodotti di una reazione può cambiare drasticamente il bilancio energetico della reazione stessa.
I prodotti di ossidazione, degli acidi grassi ad idrogeno, se vengono consumati immediatamente es. dagli omoacetogeni o metanogeni, mantengono la concentrazione dell'idrogeno a livelli bassi. Ciò porta la variazione di ΔG (energia libera), associata all'ossidazione degli acidi grassi ad acetato e idrogeno, a livelli di poco negativi (-18kJ ca.) ovvero ad una reazione esoergonica con liberazione di energia utile per un miglior sviluppo della flora idrogenogenica.

4 – **metanogenesi**;
Cioè la formazione di metano a partire dall'acido acetico o attraverso la riduzione del biossido di carbonio utilizzando l'idrogeno come cosubstrato. In minor misura si ha la formazione di metano a partire dall'acido formico.
La produzione di CH_4 rappresenta la conclusione della sintrofia anaerobica. Il metano infatti è l'unico composto non reattivo nell'intero processo di digestione anaerobica e può, pertanto, essere considerato il prodotto finale.
I microrganismi metanogeni (appartenenti al regno *Archaea*) sono distinti in due gruppi:
a) Microrganismi che producono CH_4 e CO_2 partendo da acido acetico, detti *acetoclastici*; prevedono la dismutazione anaerobica dell'acido acetico con formazione di metano e biossido di carbonio. Questo meccanismo determina la maggior parte della produzione di metano nel complesso del processo, in processi di tipo mesofilo (20°-40°C).
b) Microrganismi che producono CH_4 partendo da CO_2 e H_2, operano l'ossidazione anaerobica dell'idrogeno, detti *idrogenotrofi*.

In estrema anaerobiosi avvengono processi di degradazione della sostanza organica complessa grazie a microrganismi eterotrofi specializzati che effettuano il processo di metanogenesi, ove anidride carbonica e altre molecole carboniose sono ridotte a metano e anche biossido di carbonio. Importante specificare infatti che i substrati metanogeni sono suddivisi in 3 classi: substrati di tipo CO_2, substrati metilici e substrati acetoclastici.

Reazione	ΔG, kJ/mol CH_4
$4H_2 + HCO_3^- + H^+ \rightarrow CH_4 + 3H_2O$	- 135.6
$4HCOOH + H_2O \rightarrow CH_4 + 3HCO_3^- + 3H^+$	- 130.4
$4CH_3OH \rightarrow 3CH_4 + HCO_3^- + H^+ + H_2O$	- 104.9
$4CH_3NH_3^+ + 3H_2O \rightarrow 3CH_4 + HCO_3^- + 4NH_4^+ + H^+$	- 74.8
$CH3COO^- + H_2O \rightarrow CH_4 + HCO_3^-$	- 28.0

La maggior parte dei metanogeni utilizza l'anidride carbonica come accettore finale di elettroni, riducendola a metano con il consumo di H_2, solo pochi altri substrati possono essere convertiti direttamente a metano da questi microrganismi. Questo significa che, per la conversione della maggior parte di composti organici a CH_4, i metanogeni devono collaborare con altri organismi che possono fornire i substrati a loro necessari, microrganismi sintrofici.

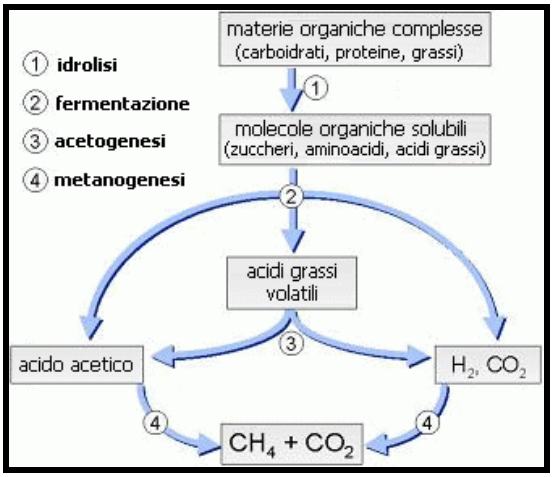


Figura 1.0: schema semplificato della digestione anaerobica

Si è visto come la digestione anaerobica coinvolga diversi gruppi microbici interagenti tra loro: batteri *idrolitici*, batteri *acidificanti* (acetogeni ed omoacetogeni) o batteri *metanogeni* (acetoclasti e idrogenotrofi).

Tutti i diversi gruppi di microrganismi sono caratterizzati da cinetiche specifiche e da condizioni ottimali di crescita.

La popolazione microbica è strettamente dipendente dall'intervallo di temperatura in cui si opera. Per tanto distinguiamo i microrganismi: *psicrofili* (temperature inferiori a 20 °C), *mesofili* (temperature comprese tra i 20 °C ed i 40 °C), *termofili* (temperature superiori ai 45 °C).

Si evidenza che in *mesofilia* il grosso della produzione di metano avviene per via Acetoclastica, ossia il metano si forma essenzialmente dall'acido acetico.

Lo stadio finale del processo metanogenico è dato dalla rottura dell'acetato a CO_2 e CH_4 con la reazione definita Acetotrofica:

$$CH_3COO^- + H_2O \rightarrow CH_4 + HCO_3^- \quad \Delta G = -28 kJ/mol\ CH_4$$

Normalmente in mesofilia la formazione di metano deriva per > 2/3 da acetato e < 1/3 da H_2 e CO_2. Queste reazioni sono tutte di tipo esoergonico e possono essere utilizzate dalle cellule per produrre ATP.

Una parte minore viene prodotta invece per via Idrogenotrofa, reazioni che portano alla formazione di metano da H_2 e CO_2.

Substrato CO_2 viene ridotto a metano, utilizzando H_2 come donatore di elettroni:

$$CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_4 + 2\ H_2O \quad \Delta G = -135\ kJ/mol\ CH_4$$

Recentissimi studi hanno confermato ed evidenziato che in *termofilia* il grosso della produzione di metano avviene per via Idrogenotrofa e solo una piccola parte per via Acetoclastica, ovvero il contrario di ciò che avviene in mesofilia (Vavlin et al., 2010).

L' ambiente di reazione nella digestione anaerobica all'interno di un reattore deve coniugare le esigenze di crescita dei singoli gruppi microbici.

La produzione di biogas è il dato più significativo se si guarda il processo dal punto di vista industriale. Essa dipende da vari parametri. I più importanti sono l'HRT (Hydraulic retention time) la temperatura di esercizio.

Tempi di residenza lunghi favoriscono la metanogenesi, poiché questi microrganismi hanno lente cinetiche di crescita della biomassa e di degradazione del substrato. Tuttavia l'HRT deve essere ben bilanciato e non deve essere eccessivamente lungo poiché potrebbe risultare antieconomico su scala industriale in quanto riduce il tasso di utilizzo dell'impianto stesso.

Per quanto riguarda la temperatura, l'intervallo ottimale è quello termofilo in riferimento alle rese in biogas. Tuttavia la termofilia comporta degli svantaggi rispetto alla mesofilia per via delle maggiore instabilità del processo quando si verificano variazioni improvvise dei parametri d'esercizio degli impianti. Questo aspetto è una diretta conseguenza della minor diversificazione della popolazione microbica in condizioni termiche termofile rispetto a quelle mesofile. Per tanto la maggior parte dei digestori anaerobici in esercizio

operano in un intervallo mesofilo (circa 40°C).

Altro paramentro importante è il pH. L'azione dei metanogeni è favorita in un intervallo che va da 6.5 a 7.5.

Altro aspetto importante è la degradazione degli amminoacidi. Questo processo porta alla separazione del gruppo amminico NH_3, grazie ad enzimi (transaminasi), dal resto dello scheletro carbonioso di quello che era l'amminoacido. Vi sono evidenze in letteratura (Wiegant e Zeeman - 1986) che sottolineano che l'ammoniaca libera quando raggiunge determinate concentrazioni (indicativamente sopra i 700 mg/l) (ricordando che essa dipende dalla temperatura e dal pH a parità di concentrazione di azoto ammoniacale totale dunque in termofilia è più alta rispetto alla mesofilia) in termofilia va in generale ad inibire il processo di metanogenesi bloccando le reazioni che portano alla degradazione dell'acido propionico (VFA), che è un prodotto dei path principali che si sviluppano in condizioni termofile quando il processo dominante è quello idrogenotrofo (A.Giuliano et al., 2013).

Si veda la figura 1.1.

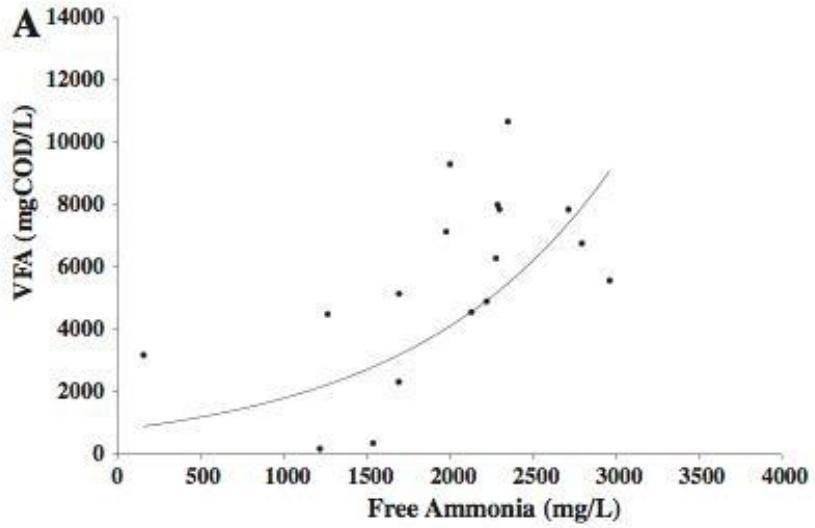


Fig. 1.1: concentrazione VFA in funzione del contenuto di ammoniaca libera (free ammonia) all'effluente di: (A) reattore *termofilo* (A.Giuliano et al., 2013)

La figura 1.1 mostra la concentrazione nell'effluente di VFA in relazione alla concentrazione di NH_3 in termofilia. Si evince come l'aumento di concentrazione di NH_3 porti ad un accumulo di VFA in metanogenesi.

In particolare, l'effetto di NH_3 (free ammonia) inibisce la la formazione di metano a partire da H_2 e CO_2 bloccando le reazioni che portano alla degradazione dell'acido propionico.

Le tecniche di digestione anaerobica possono essere suddivise in due gruppi principali:

- digestione a secco (dry digestion), quando il substrato avviato a digestione ha un contenuto di sostanza secca superiore al 20%;
- digestione a umido (wet digestion), il substrato ha un contenuto di sostanza secca inferiore al 10%; tale tecnica è la più diffusa, in particolare con i liquami zootecnici. Processi con valori intermedi di sostanza secca, meno comuni, definiti processi a semisecco (semi-dry).

Il processo di digestione anaerobica è anche suddiviso in:

- processo monostadio, quando le fasi di idrolisi, fermentazione acida e metanogena avvengono contemporaneamente in un unico reattore;
- processo bistadio, quando si ha un primo stadio durante il quale il substrato organico viene idrolizzato sino alla fase acida. Nel secondo stadio avviene la fase metanogena.

1.2 La Dark Fermentation

Come accennato in precedenza tra i prodotti della fermentazione anaerobica ritroviamo l'H_2, che insieme alla CO_2, oltre ad essere il substrato di partenza per la produzione di metano da parte dei microrganismi idrogenotrofi, svolge un importante ruolo di regolatore del processo.

Per bioidrogeno si intende l'idrogeno molecolare prodotto mediante processi biologici. Il processo di produzione di idrogeno molecolare tramite processi fermentativi, ad opera di batteri anaerobi stretti o facoltativi, prende il nome di *Dark Fermentation* (DF) che ad oggi rappresenta una delle tecnologie più promettenti dal punto di vista economico per la produzione in continuo di bioidrogeno. Per la produzione di idrogeno troviamo anche:

- processi di fotobiolisi diretta e indiretta dell'acqua ad opera rispettivamente di alghe verdi e cianobatteri (Reith et al., 2003);
- foto-fermentazione ad opera di batteri fotosintetici (Guo et al., 2010)

Per il trasferimento su scala industriale della produzione di bioidrogeno, la dark fermentetion mostra alcuni vantaggi rispetto ai processi fotobiologici come la possibilità di sfruttare substrati di rifiuto ad alta biodegradabilità, come ad esempio la frazione organica di rifiuti solidi urbani. Essi operano inoltre con cicli continui in modo indipendente da fonti esterne quali la luce.

Analizzando ciò che avviene a livello enzimatico le complesse reazioni biologiche che portano alla generazione di idrogeno molecolare via dark fermentation sono mediate da complessi enzimatici appartenenti alle idrogenasi, la cui classificazione dipende dal tipo di cofattore presente sul sito attivo, molecola non proteica che si associa all'enzima stesso rendendone possibile l'attività catalitica.

Le Idrogenasi sono enzimi appartenenti alle ossidoreduttasi che catalizzano il trasferimento di elettroni da una molecola (che si ossida, riducente o donatrice di idrogeno) ad un'altra (che si riduce, ossidante o accettrice di idrogeno). Utilizzano idrogeno per la riduzione di una varietà di sostanze e in presenza di potere riducente catalizzano la riduzione di protoni ad H_2.

$AH_2 \rightleftarrows H_2 + A$

L'attività delle idrogenasi è fortemente influenzata da fattori ambientali quali pH e T, i cui valori ottimali per la massima attività sono stati individuati essere 5.5 e 55°C rispettivamente (Valdez-Vazques I. et al. 2009, Hallenbeck P.C. et al. 2009, Reith J.H. et al. 2003).

Nel sistema DF dove sia presente un substrato ricco di carboidrati e in condizioni di anaerobiosi, si possono facilmente acclimatare e sviluppare diverse forme batteriche dotate di un metabolismo idrogenogenico. Esse producono idrogeno partendo da substrati complessi come glucidi, proteine e grassi. Differenti quantità di H_2 possono essere prodotte per mole di glucosio in via dipendente dal pathway di fermentazione e con specifici prodotti finali. In particolare questi prodotti da fermentazioni idrogenogeniche sono l'acido acetico e l'acido butirrico. Di seguito è elencata una reazione specifica che denota la produzione di acido acetico, anidride carbonica e idrogeno a partire da substrati come il glucosio

$$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 2\ CO_2 + 4H_2$$

In questa specifica reazione, quando il prodotto finale è anche l'acido acetico si ha la massima resa teorica di idrogeno, ovvero 4 moli di H_2 per mole di glucosio.
Una seconda reazione da specificare è quella in cui da glucosio i batteri fermentanti idrogenogenici portano al prodotto finale di butirrato

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + CO_2 + 2H_2$$

Qui la massima resa teorica ottenibile di idrogeno sono 2 moli per mole di glucosio. In linea generale le rese di conversione dei glucidi in idrogeno sono comprese tra valori intermedi alle due trasformazioni teoriche sopracitate.
Nella DF il catabolismo con alta produzione di idrogeno attraverso un metabolismo anaerobico porta alla formazione di piruvato.
Principali microrganismi dotati di tale metabolismo sono *Clostridium spp*, *Thermoanaerobacterium* spp., *Enterobacter* e *Bacillus* (Reith J.H. et al. 2003).

La produzione di idrogeno dipende fortemente da alcuni parametri, quali ad esempio la temperatura di esercizio, il carico organico applicato (OLR), il pH, il tempo di residenza idraulico (HRT), il tipo di substrato nonché la configurazione reattoristica.
La temperatura gioca un ruolo molto importante nella Dark Fermentation (DF) in quanto influenza il metabolismo microbico e di conseguenza le rese del processo in termini di H_2 prodotto. La maggiore attività specifica delle idrogenasi è stata individuata a 55°C con accumulo nel buffer di reazione di acido acetico (Karlsson et al., 2008).
È possibile creare una comunità microbica adatta a partire da un comune substrato organico non sterile, come avviene per la digestione anaerobica.

Introducendo il carico organico non esiste un *optimum* in letteratura in quanto, così come la temperatura, esso dipende da diversi fattori concomitanti. In generale è possibile affermare che gli alti carichi (maggiori di quelli applicati nei comuni digestori anaerobici) sfavoriscono la crescita dei metanigeni in quanto questi sono caratterizzati da una cinetica di inibizione da substrato, al contrario dei fermentativi che son dotati di una cinetica di primo ordine (Kraemer J.T. et al. 2007).

Il pH è un fattore molto importante che va di incidere sulla produzione di idrogeno. In genere variazioni del pH modificano la composizione microbica con conseguente variazione dello spettro di metaboliti finali ed esso trova pieno concordo nel suo valore ottimale nel range 5-6. (Ye et al., 2007; Temudo et al. 2007). All'interno di tali valori i complessi enzimatici delle idrogenasi esercitano la massima attività ad una temperatura di 55°C (Kim et al., 2004; Doi et al., 2009). Riuscire a mantenere il pH per lunghi periodi di esercizio su questi valori è spesso risultato un problema in assenza di controllo esterno, in quanto gli alti carichi applicati a questo tipo di processi comportano un accumulo di VFA con conseguente aumento dell'acidità (il reattore infatti lo si porta in acidogenesi) il quale favorisce sotto i valori intorno al 5 un metabolismo fermentativo verso prodotti tipici della solventogenesi (alcoli e acido lattico). Per tanto sono diversi i casi in letteratura in cui è previsto un controllo esterno del pH.

1.3 Il biohythane

Processi a due fasi per la produzione combinata di idrogeno e metano.

L'aspetto proficuo e perspicace che tratterà questo studio è la produzione di bio-hythane da matrici biodegradabili organiche, frazione del rifiuto solido urbano.

L'ottimizzazione del processo di DA è quella di una configurazione che prevede la separazione delle fasi tipiche della catena trofica anaerobica mediante la disposizione in serie di più bioreattori in modo tale da ottimizzare separatamente le condizioni ambientali di crescita dei differenti microrganismi che catalizzano le fasi della digestione anaerobica. L'idea nasce appunto dal fatto che le diverse classi di microrganismi non condividono le stesse condizioni ambientali ottimali di crescita, in quanto questi differiscono in termini fisiologici, di cinetiche di crescita, di richieste nutrizionali e di sensibilità alle condizioni a contorno.

Vi è dunque una prima fase (F1) di dark fermentation in cui si cerca di ottimizzare la produzione di idrogeno e una seconda fase (F2) in cui si cerca di massimizzare la produzione di metano. Quest'ultima fase è strettamente collegata alla prima (il processo va visto come un continuum) poiché essa viene alimentata con l'effluente in uscita della fase uno. Vengono così ottimizzate le reazioni di idrogenogenesi e di metanogenesi in modo indipendente tra loro ma naturalmente connesso, cercando di raggiungere un sistema ideale.

Il risultato finale saranno due gas biologici che miscelati tra loro (H_2 e CH_4+CO_2), secondo precise concentrazioni, danno vita ad un gas con alto potere calorifero: il biohythane (BHy).

Le corrispettive concentrazioni per questo combustibile di nuova generazione sono 60% di metano, 30% di anidride carbonica e 10% di idriogeno. Ricorda infatti l'hythane, una miscela gassosa composta dal 90% da metano e il 5-7% da idriogeno, 3-5% gas inerti, quali anche anidride carbonica. A livello industriale questa miscela è ottenuta raffinando gas naturale addizionato a percentuali suddette di idrogeno, il quale deriva da processi a costo energetico come l'idrolisi dell'acqua. È stata creata questa miscela per scopi

ben precisi, essa ha una qualità come combustibile più elevata rispetto al metano da NG, dunque si presta efficacemente per autoveicoli, migliorandone l'efficienza della combustione nel motore a scoppio e riducendo le emissioni degli ossidi d'azoto, di idrocarburi incombusti e di monossido di carbonio tipico dello sfruttamento del benzene come combustibile. Inoltre rispetto al normale biometano, il biohythane ha un efficienza maggiore con delle rese del tutto paragonabili al classico metano. Esso porta le stesse caratteristiche come combustibile nel mercato dell'hythane, ma è prodotto biologicamente in maniera del tutto rinnovabile, a basso costo e smaltendo inoltre la frazione organica del rifiuto solido urbano.

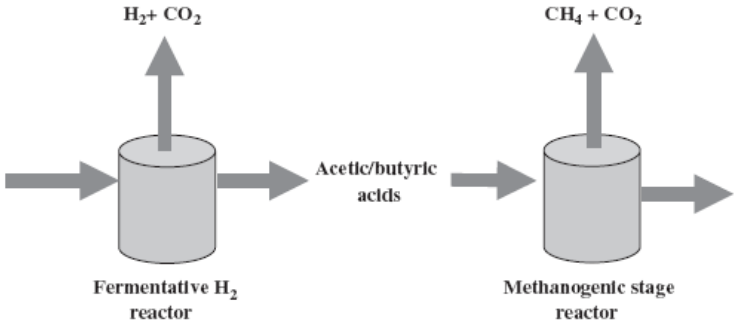


Figura 1.3: Configurazione a doppia fase per la produzione accopiata di H_2 e CH_4

Il suo utilizzo non richiede motori di nuova generazione, bensì un normale adeguamento del mezzo a combustione a metano. Questo studio cercherà di incentivare questo tipo di produzione, poiché ad oggi la produzione di BHy da materiale come la frazione organica del rifiuto, ovvero ad alta biodegradabilità, non ha trovato ancora piena applicabilità su scala industriale.

Il processo a doppia fase ottimizzato per la produzione di biohythane necessita di una gestione più accurata e continua rispetto alla digestione anaerobica in unica fase in quanto la fase di DF, per via della sua natura acidogenica non è in grado di autoregolarsi e necessità di tecniche di controllo del pH che incrementano i costi di gestione con conseguente perdita di concorrenza nel mercato al quale i prodotti di questo processo devono inserirsi.

Lo stato dell'arte

Allo stato dell'arte dei sistemi a doppia fase per la produzione di biohythane si riconosce in letteratura che esistono diversi esempi su scala di laboratorio e pilota di applicazioni di digestione anaerobica a doppio stadio, mirati alla produzione combinata di idrogeno e metano. Prendendo in considerazione i casi di trattamento di rifiuti organici è emerso che che la maggior parte dei casi non ha adottato un pre-trattamento particolare del substrato. Nella letteratura è sempre presente però la triturazione del substrato in clasti di dimensione 2 – 6 mm circa.

L'eterogeneità dei dati è marcata per quelli relativi alla fase di *Dark Fermentation* rispetto al processo di digestione anaerobica.

Riferendosi al parametro HRT è stato riscontrato che le velocità di produzione di idrogeno (HPR) aumentano al diminuire dei tempi di residenza applicati e che un aumento di temperatura consente di spingersi verso tempi di residenza minori.

L'applicazione di bassi HRT in sistemi CSTR consente il wash-out dei metanogeni (Hawkes et al., 2007), favorendo lo sviluppo dei batteri fermentativi produttori di idrogeno. Il tempo di ritenzione idraulica deve essere però maggiore del tasso di crescita specifico dei microrganismi produttori di idrogeno per evitare il loro wash-out (P. Kongjan et al., 2010).

Sperimentazioni mirate all'ottimizzazione della fase fermentativa hanno spesso previsto un controllo del pH (Shin et al., 2005; Gomez et al., 2006; Lee et al., 2010) e/o pretrattamento del substrato (Han et al. 2005; Chou et al., 2008; Lee et al., 2010).

A tal proposito una perspicace pratica si è sviluppata negli ultimi anni in alternativa all'impiego di *chemicals* esterni per il controllo del pH nella fase di Dark Fermentation. Essa consiste nell'applicazione di un ricircolo in testa al processo proveniente dalla fase di metanogenesi al fine di sfruttare la capacità tamponante residua (es. sali ammoniacali, bicarbonato) di tale matrice (Cecchi et al., 2005). L'applicazione del ricircolo consente inoltre di bilanciare l'apporto di nutrienti e di diluire il feedstock utilizzato (Kataoka et al., 2005; Chu et al., 2008; Lee et al., 2010).

Tuttavia a lungo termine il continuo ricircolo può portare ad un aumento di alcalinità nel sistema favorendo la proliferazione di microrganismi idrogenotrofi e abbassare le rese del processo in termini di produzione di H_2. Il problema principale che può manifestarsi nel caso in cui si scelga il sistema a due fasi con ricircolo, riguarda l'accumulo di ammoniaca.

In condizioni termofile l'ammoniaca libera porta all'inibizione della produzione di metano a concentrazioni superiori ai 700 mg/l, come già specificato (Angelidaki et al., 1994). In letteratura si evidenzia che anche il tasso di produzione di idrogeno può essere inibito dalla presenza di ammoniaca ad alte concentrazioni (Salerno et al., 2006).

Sono molteplici le condizioni operative applicate in letteratura a riguardo dei processi a doppia fase e non è stato facile distinguere un carico organico ottimale per questi sistemi. Il range in DF va da circa 9 a 38 kgTVS/m3rd. (Wang et al., 2009). Aspetto importante da sottolineare è che, come si può notare dalla figura 1.4,

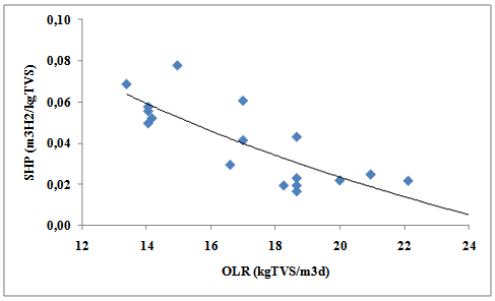


Figura 1.4: correlazione tra OLR e produzione specifica di idrogeno

all'aumentare del carico organico applicato diminuisce la produzione specifica di idrogeno. Ciò può essere dovuto all'accumulo di sostanze come acido lattico e acido propionico quando si opera ad alti OLR (Wang et al., 2009).

Ricapitolando in breve ad oggi in sistemi a doppia fase sono stati riscontrati dei limiti; l'accumulo di sostanze inibenti il processo di biogassificazione, come ad esempio l'ammonica e la necessità di ricorrere al tamponamento del pH nella fase di acidogenesi.

Alla luce di ciò, come già sottolineato, è necessario l'intervento esterno per poter mantenere il processo anaerobico stabile, condizione difficile per poter implementare il sistema in piena scala, lo studio è volto infatti a cercare una correlazione tra alcuni parametri che possa aiutare una futura automazione del processo, in modo che si possa regolare autonomamente.

Capitolo 2

Obiettivi della ricerca

In modo affine allo schema di figura 2.1 in questo studio di ricerca è stato sviluppato un processo di digestione anaerobica in doppia fase separata, di tipo termofilo (55°C), mediante l'applicazione di 2 reattori pilota di grosso volume, utilizzando la frazione organica biodegradabile del rifiuto solido urbano (FORSU) come matrice da biodegradare (FEED / substrato) per la produzione di bio-hythane (BHy, 5-10% H_2, 50-60% CH_4 e 20-30% CO_2).
In un primo reattore pilota (F1) vengono catalizzate e ottimizzate le reazioni che portano alla produzione di H_2 mentre nel secondo reattore pilota (F2) avvengono le reazioni di metanogenesi, che concludono la catena trofica tra i diversi ceppi microbici che popolano e degradano le sostanze con produzione di CH_4 e CO_2.

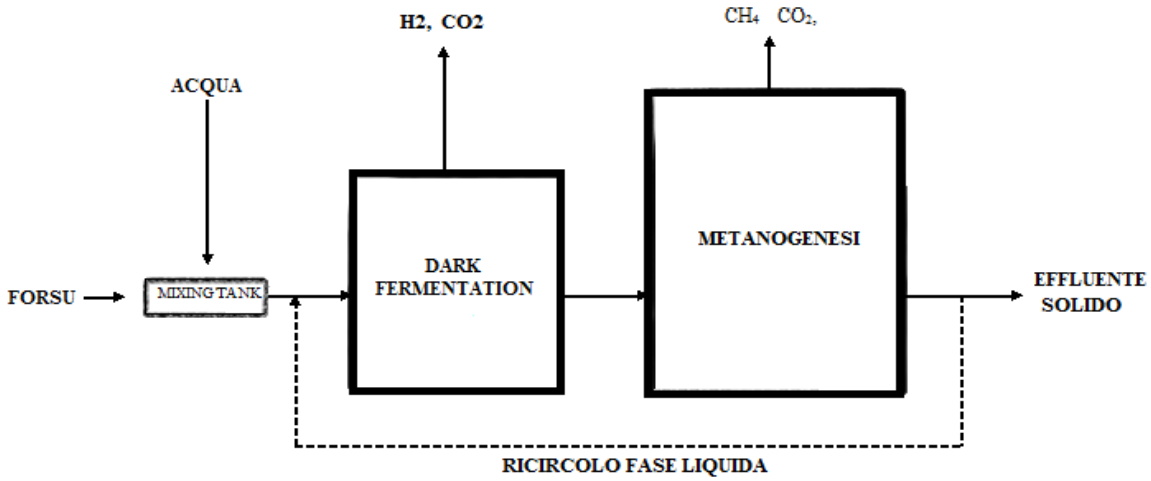


Figura 2.1: Processo schematizzato per la produzione accoppiata di idrogeno (via dark fermentation) e metano.

Allo stato di avanzamento attuale sono stati applicati diversi OLR al fine di definire le migliori rese del processo sulla base della qualità e della quantità del gas totale prodotto.
In questo studio si è applicato un unico OLR, poiché definito il miglior carico organico, dai 16 ai 18 kg di TVS/m^3 di reattore giorno^{-1}, si è voluto studiare un

processo a lungo termine mantenendolo in un'unica condizione operativa in termini di carico, OLR non variabile.

È stato previsto l'impiego di un ricircolo, dell'effluente in uscita dal reattore di metanogenesi (F2), pensato come mezzo tampone per il controllo del pH del primo reattore (F1) di dark fermentation, al fine di consentire la stabilità del processo, ottimizzando le reazioni che portano alla produzione di idrogeno.

Questo approccio risulterebbe particolarmente utile se si volesse minimizzare i costi di gestione per lo scale up, in quanto consente di evitare il ricorso a sostanze tampone esterne. Tuttavia, soprattutto in termofilia, l'applicazione di un continuo flusso di ricircolo genera a lungo termine fenomeni d'instabilità a causa dell'effetto inibente, dovuto all'accumulo dell'ammoniaca, sul metabolismo anaerobico.

Lo studio precedente ha verificato che mantenendo il ricircolo costante vi è stato un accumulo di azoto ammoniacale nel sistema.

Ciò ha portato ad un abbassamento delle rese di produzione di idrogeno e metano.

Quest'ultima condizione operativa ha portato a ridurre il rapporto di ricircolo per abbassare il contenuto di ammoniaca. Tale variazione ha consentito di ripristinare il sistema facendo registrare buone rese in termini bio-hythane. D'altra parte l'abbassamento del ricircolo, a lungo termine ha portato ad una riduzione dell'apporto di alcalinità nel primo reattore comportando di conseguenza una riduzione del pH, allontanando il sistema dalla condizione ideale per la produzione di idrogeno (pH 5-5.5). Questa evidenza ha aperto alla necessità di controllare il processo in modo dinamico, ossia variando quotidianamente flusso di ricircolo in funzione delle risposte analitiche dei reattori, in modo tale da mantenere efficienti e costanti le rese di processo. Quindi il parametro principale monitorato è stato l'ammoniaca.

Poiché non esistono sistemi di misure on line di questo parametro su matrici del tipo degli effluenti di digestione anaerobica, lo scopo è stato quello di testare la possibilità di una implementazione di un sistema automatico di controllo basato sulla misura indiretta di altri parametri primo fra tutti la conducibilità il quale dall'analisi della letteratura è risultata essere un parametro chiave per questo tipo di applicazioni.

Poiché la conducibilità è una misura aspecifica si andranno a vedere quelle che sono le correlazioni tra i diversi parametri di stabilità (ammoniaca, pH, alcalinità, vfa, etc.).

Come appena anticipato, studi di letteratura affermano che vi sia una correlazione in particolare tra azoto ammoniacale e conducibilità (C.Cavinato et al., 2011).

Una prospettiva futura sarebbe quella di sviluppare un processo stabile che tramite una sonda a basso costo possa controllare il processo mediante un sistema ad hoc, che riesca, attraverso un algoritmo di calcolo, a regolare il flusso di ricircolo in modo da massimizzarne le rese evitando l'accumulo di ammoniaca.

In questo studio attraverso l'ausilio di software si cercherà di modellare come variabile dipendente Y il parametro ammoniaca, tentando un approccio multivariato dove i predittori saranno una serie di variabili, tra cui la conducibilità, che sembrano essere rilevanti, al fine di trovare un'equazione che possa predire al meglio il parametro Y. Ricordando che la validità del modello, se possibile, sarà comunque a livello locale. I criteri adottati sono quelli della regressione lineare di tipo semplice e multiplo.

Altro importante aspetto è stata l'analisi microbiologica degli effluenti dei reattori. Questo per verificare la presenza predominante di microrganismi dotati di un metabolismo idrogenotrofo i quali sono particolarmente sensibili alle alte concentrazioni di ammoniaca. Tale aspetto, se confermato, andrebbe ancora di più a giustificare la necessità di implementare un sistema di controllo automatico ed efficace del parametro ammoniaca.

Capitolo 3
Materiali e metodi

3.1 Metodi analitici

3.1.1 Analisi Chimico Fisiche

In accordo con gli standard methods (APHA – AWWA – WEF) è stato effettuato il monitoraggio dei reattori mediante i seguenti parametri:
pH, alcalinità, ammoniaca, conducibilità, VFA, TS, TVS, TKN e Fosforo totale.
La conducibilità è stata misurata mediante conduttimetro mantenendo l'effluente, posto in un becker, a bagnomaria a temperatura di 55°C, temperatura dei reattori.
L'analisi degli acidi grassi volatili è stata condotta con un gascromatografo Carlo Erba™ equipaggiato con un detector a ionizzazione di fiamma (T=200°C), una colonna capillare in silice fusa Supelco NUKOL™ (15 m x 0,53 mm x 0,5 µm spessore del film), mentre come carrier è stato impiegato idrogeno gas. L'analisi è stata condotta mediante una rampa di temperatura da 80°C a 200°C (10°C/min). I campioni prima di essere analizzati sono stati centrifugati e filtrati con un filtro a 0,45 µm.
La produzione di gas per entrambi i reattori è stata monitorata mediante due misuratori di portata Ritter Company™. Le percentuali di metano, anidride carbonica e ossigeno sono state determinate tramite un analizzatore portatile di gas ad infrarossi GA2000™ (Geotechnical Instrument™). La percentuale di idrogeno è stata determinata attraverso un gascromatografo GC Agilent Technoloy 6890N™ equipaggiato con una colonna HP-PLOT MOLESIEVE™ (30m x 0,53m ID x 25um spessore del film), a carrier gas Argon e con un detector a conduttività termica (TDC).
In tabella 3.1 sono riassunti i parametri e la frequenza con cui è stato eseguito il monitoraggio dei due reattori.
Il contenuto di solidi totali e volatili sono stati analizzati 2 volte a settimana, il COD totale, il fosforo totale e il TKN analizzati una volta a settimana. Il COD solubile è stato determinato una volta ogni due settimane.

Tabella 3.1: Parametri monitorati

Parametri di stabilità		**Unità di misura**	**Frequenza**
pH	pH	-	giornalmente
Alcalinità	ALK	$mgCaCO_3/l$	giornalmente
Ammoniaca	NH_3	$mgN\text{-}NH_3/l$	giornalmente
Acidi grassi volatili	VFA	mgCOD/l	giornalmente
Conducibilità	COND	mS/cm	giornalmente
Solidi totali e volatili	TS-TVS	g/l	2 per settimana
Parametri di processo			
Tempo di residenza idraulico	HRT	days (d)	-
Carico organico applicato	OLR	$kgTVS_f/m^3_r d$	giornalmente
Rese			
Velocità di produzione di gas	GPR	$m^3_{biogas}/m^3_r d$	giornalmente
Produzione specifica di gas	SGP	$m^3_{biogas}/kgTVS_f d$	giornalmente
Composizione del gas	$\%CH_4$ $\%CO_2$ $\%H_2$	%	giornalmente
Macronutrienti			
Chemical Oxygen Demand	COD	gCOD/l	1 per settimana
Total Kijeldal Nitrogen	TKN	mgN/l	1 per settimana
Fosforo totale	Ptot	$mgP\text{-}PO_4/l$	1 per settimana

3.1.2 Analisi Microbiologiche

L'analisi microbiologica degli effluenti di entrambi i reattori è stata effettuata tramite *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH).

La tecnica FISH è oggi una delle tecniche maggiormente utilizzate per monitorare le dinamiche di popolazioni microbiche nell'ambiente. Essa permette di identificare in situ la presenza di un'ampia varietà di microrganismi prescindendo dall'isolamento in coltura pura che spesso risulta difficoltoso e inattuabile. Per questo viene ampiamente utilizzata anche per individuare le popolazioni batteriche coinvolte nei processi delle acque reflue e rifiuti.

Nel presente lavoro la tecnica FISH è stata utilizzata principalmente per studiare la popolazione di *Archea* responsabile della produzione di metano nel processo di digestione anaerobica.

Gli step principali per l'analisi dei campioni mediante tecnica FISH, sono raffigurati nella figura 3.1.2 e di seguito descritti.

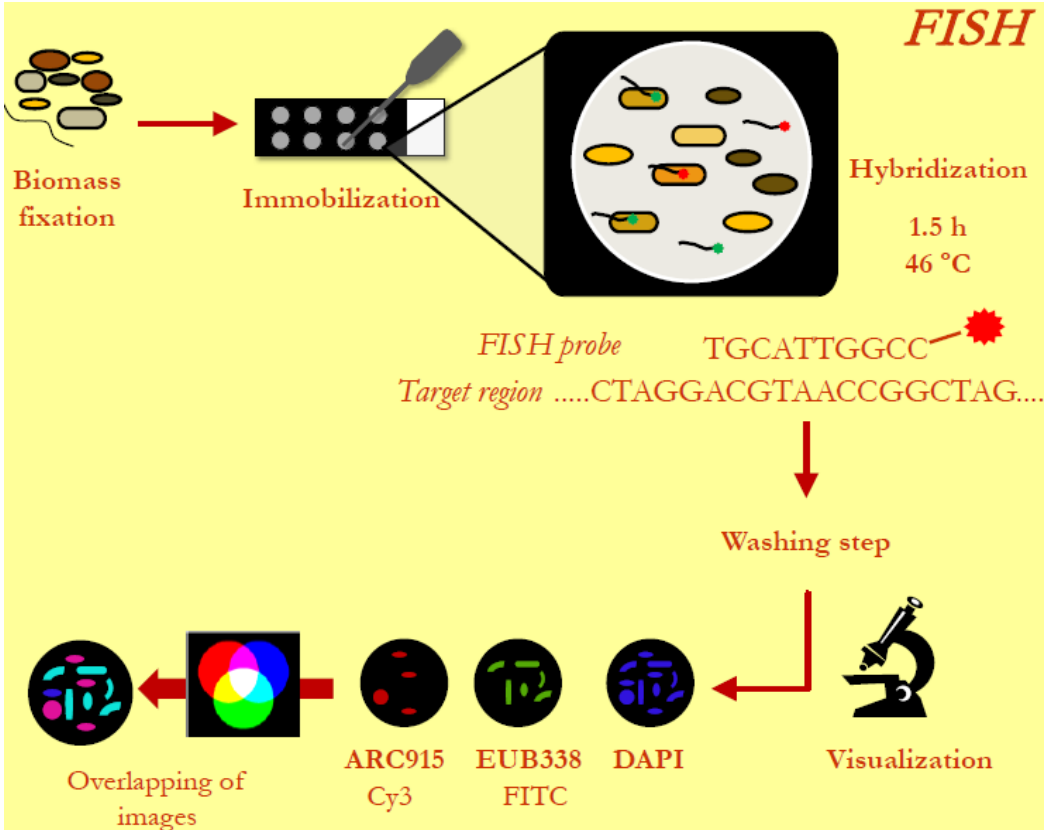


Figura 3.1.2: Fasi principali dell'analisi FISH

Fissaggio:

il fissaggio del campione si effettua immediatamente dopo il prelievo, seguendo la metodica di Amann et al. (1995). Ciò è essenziale per mantenere l'integrità morfologica delle cellule in seguito all'esposizione nel corso dell'ibridazione ad elevate temperature, a detergenti ed a gradienti osmotici. Inoltre il fissaggio del campione favorisce una maggiore permeabilità delle cellule alle sonde molecolari. Generalmente il fissaggio in paraformaldeide (soluzione al 4%) è più adatto per le cellule Gram negative mentre per i campioni contenenti cellule Gram positive è necessario fissarne una aliquota anche con etanolo.

Immobilizzazione e disidratazione del campione:

per l'ibridazione in situ si utilizzano vetrini speciali rivestiti con materiale idrofobico (teflon) ad eccezione delle zone in cui viene posto il campione. Sono in commercio vetrini rivestiti in teflon con 6, 8 o 12 pozzetti in cui effettuare l'ibridazione. Ciò permette di tenere separati e quindi di analizzare più campioni sullo stesso vetrino. 8 µl di campione fissato vengono lasciati essiccare all'aria su ogni singolo punto di osservazione di tali vetrini. Le patine essiccate vengono in seguito disidratate immergendo il vetrino in successione per tre minuti in soluzioni di etanolo a concentrazione crescente (50, 80, 98%). I vetrini così trattati possono essere conservati.

Ibridazione in Situ:

per ogni reazione di ibridazione vengono aggiunti 10 µl di tampone di ibridazione e 1 µl di sonda molecolare alla concentrazione di 50ng/µl (fluos) o 30 ng/µl (cy3). Il vetrino viene quindi incubato a 46°C per due ore orizzontalmente in un tubo di polipropilene in cui è stata posta della carta imbevuta di tampone di ibridazione. Ciò viene fatto per evitare la concentrazione della soluzione di ibridazione per evaporazione ed il conseguente probabile legame non specifico delle sonde alle cellule. Il tampone contiene NACL 0,9M, Tris/HCl 20nM, SDS 0,01%, X% di formamide, pH 7,2. La quantità di formammide aggiunta nel tampone di ibridazione varia a seconda della sonda utilizzata e viene definita e fornita ogni qualvolta sono messe a punto nuove sonde molecolari.

Lavaggio:

questo passaggio si rende necessario per rimuovere completamente le sonde molecolari che non si sono legate. La procedura prevede un lavaggio del vetrino in un tampone i cui componenti sono gli stessi utilizzati per il tampone di ibridazione (NaCl, Tris HCl, SDS) con l'eccezione della formammide. La concentrazione dei vari reagenti è costante (le concentrazioni finali sono le seguenti (Tris/HCl 20mM, SDS 0,01%), mentre varia la concentrazione di NaCl che è dipendente dalla stringenza (dalla concentrazione di formammide) utilizzata nella fase di ibridazione. Il tampone di lavaggio viene preparato in tubi di polietilene da 50 ml e viene preriscaldato in un bagno termostatico a 48°C. Dopo l'ibridazione il vetrino viene rimosso con cautela dal tubo, sciacquato immediatamente in un tampone di lavaggio e mantenuto immerso nel tampone per 15 minuti. Successivamente il vetrino viene lavato con acqua distillata ed immediatamente asciugato all'aria e tenuto al buio.

Sonde molecolari:

le sonde utilizzate hanno son segnate 5' con un fluoro cromo (FITC e Cy3) (ThermoFisher). Gli oligonucleotidi modificati vengono generalmente acquistati alla concentrazione di 0,2 µmol e poi diluiti alla concentrazione di lavoro. In tabella 3.1.2 sono riportate le sonde molecolari utilizzate, la sequenza nucleotidica, la percentuale di formammide per l'ibridazione e gli organismi target di ogni sonda.

Tabella 3.1.2: Sonde oligonucleotidiche utilizzate (Banks et al., 2012)

Sonda	Sequenza (5'-3')	FA (%)	Organismi	
EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	**0-50**	**Bacteria domain**	**FITC**
Arch915	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	**35**	**Archea**	**CY3**
MX825	TCGCACCGTGGCCGACACCTAGC	**50**	**Methanosaetaceae**	**CY3**
MS1414	CTCACCCATACCTCACTCGGG	**50**	**Methanosarcinaceae**	**CY3**
hMS1395	GGTTTGACGGGCGGTGTG		**MS1414-helper**	**-**
hMS1480	CGACTTAACCCCCCTTGC		**MS1414-helper**	**-**
MB1174	TACCGTCGTCCACTCCTTCCTC	**45**	**Methanobacteriaceae**	**FITC**
MG1200	CGGATAATTCGGGGCATGCTG	**30**	**Methanomicrobiacea & Metahnospirillacea**	**FITC**
MC1109	GCAACATAGGGCACGGGTCT	**45**	**Methanococcales**	**CY3**

Nell'ultimo step sul vetrino vanno poste alcune gocce di Vectashield (mezzo di preparazione con DAPI) e il copri oggetto. I vetrini verranno osservati in epifluorescenza attraverso filtri su microscopio (Leica DMRX).

3.2 Approccio chemiometrico

Lo studio si è evoluto cercando di trovare quale relazione possa collegare la conducibilità all'ammoniaca, quest'ultima probabilmente condizionata anche da altri parametri (come ammoniaca libera, alcalinità, VFA e pH) o meno. Ci si è serviti di tutta la base dati della fase sperimentale a lungo termine del processo di produzione di bio-hythane, circa 180 giorni di processo di digestione anaerobica.

È stata misurata la conducibilità giornalmente negli effluenti dei due reattori e tutti gli altri parametri che ad essa potrebbero essere collegati più o meno direttamente.

Il limite possibile dell'utilizzo di un sistema basato sulla conducibilità per la determinazione dell'azoto ammoniacale consiste nel fatto che, poiché essa da informazioni sulla quantità totale di ioni disciolti nel mezzo, il suo andamento dipende da numerosi fattori.

Verrà qui di seguito analizzato il problema da un punto di vista chemiometrico di analisi anche multivariata, poichè non è detto che sia possibile correlare direttamente la variazione della concentrazione di azoto ammoniacale alla sola variazione del parametro conducibilità.

Specificando che $N\text{-}NH_4^+$ è l'azoto ammoniacale e NH_3 è l'ammoniaca libera. Definito in modo non propriamente corretto ci si riferisce al parametro $N\text{-}NH_4^+$ come "ammoniaca". Il parametro che porta all'inibizione è NH_3, che dipende dalla concentrazione di $N\text{-}NH_4^+$, temperatura e pH.

Pensando ad un sistema di controllo dell'ammoniaca basato sulla determinazione diretta della conducibilità si deve tentare di elaborare una risposta derivante da un modello statistico costruito su informazioni insite in più variabili, dalle quali bisognerà se necessario escludere quelle meno significative e ridondanti ai fini di una migliore predizione. Informazioni di questo tipo potrebbero essere date da un approccio multivariato, tipicamente utilizzato nell'analisi dei dati ambientali. Poiché con i mezzi attuali l'ammoniaca è un parametro che non può essere direttamente misurato con facilità, si è deciso di escluderlo come set di dati in ingresso per l'elaborazione di una regressione lineare semplice o multipla la quale dovrebbe essere in

grado di restituire un'equazione (output) in cui la variabile dipendente Y (nel nostro caso l'ammoniaca) è definita da una serie di variabili indipendenti (predittori) che si suppongano abbiamo effetto su Y.

I criteri adottati sono quelli dell'analisi attraverso regressioni lineari di tipo semplice e multiplo.

Le regressioni lineari semplici e multiple saranno validate allo scopo di confrontarle e determinarne la miglior predizione possibile del parametro azoto ammoniacale. Queste operazioni di calcolo e sviluppo statistico saranno effettuate con l'ausilio del software "STATISTICA" e "XLSTAT".

La chemiometria è la disciplina che può dare una risposta a questi scopi, per possibili fini futuri di aiuto per il controllo del processo.

Delle variabili potenzialmente implicate non si conosce precisamente la rilevanza per il problema in esame e quanto rumore mascherino che potrebbe confondere i veri effetti delle variabili. Non sono noti dunque i loro effetti sinergici, ovvero quegli effetti dovuti al ruolo combinato di due o più variabili, che probabilmente non si manifesterebbero se si considerassero le variabili separatamente una alla volta (Roberto Tedeschini, 1998).

In base allo studio dell'informazione contenuta nei dati sperimentali si effettueranno delle valutazioni chemiometriche e modellistiche (soft models) per il reattore di metanogenesi, F2, importante dal punto di vista della possibile predizione del quantitativo di azoto ammoniacale presente, essendo l'ammoniaca il fattore che può portare ad inibizione del processo con utilizzo di ricircolo.

Necessario è l'utilizzo sistematico di tecniche di validazione capaci di stimare il potere predittivo dei modelli.

Questa strategia non esclude che un insieme di modelli mono o multivariati a validità locale, di provata qualità e affidabilità, possano costituire il nucleo iniziale di un nuovo sviluppo che rafforzi e delinei questo fenomeno di relazioni tra i parametri, testimoniate in questo studio e in letteratura.

L'insieme di dati è costituito da *n* oggetti (i campioni di substrato giornaliero), ciascuno descritto da *p* variabili (azoto ammoniacale, free ammonia, conducibilità, alcalinità, VFA e pH). La prima fase sarà l'analisi esplorativa dei dati per poter estrarre informazioni relative alle correlazioni tra le variabili, in particolare l'*analisi delle componenti principali*.

Le variabili che descrivono i dati sono state anche trasformate in nuove variabili, chiamate componenti principali, attraverso l'utilizzo dei softwares sopracitati. Le componenti principali sono combinazioni lineari delle variabili originali la cui caratteristica fondamentale è quella di essere tra loro ortogonali. Tramite questa tecnica si potranno valutare le correlazioni tra le variabili e la loro rilevanza. Essa è un passaggio intermedio per le successive tecniche multivariate.

Successivamente si cercherà di evidenziare una relazione lineare semplice o multipla che permetta di predire valori quantitativi di una variabile (la risposta) dai valori, noti per *n* campioni, assunti da un insieme indipendente di variabili (i predittori) (Roberto Tedeschini, 1998). I metodi che portano a soluzioni di questo tipo sono i *metodi di regressione*, lineare semplice o multiplo.

3.3 Descrizione impianto pilota e substrati

In questa ricerca il processo di produzione di biohythane è stato studiato all'interno dell'area sperimentale presso l'impianto di trattamento acque e reflui del comune di Treviso, attraverso l'utilizzo di due reattori CSTR *continued stirred tank reactor* realizzati in acciaio (aisi-304), completamente miscelati tramite agitatori meccanici a bracci ad ancora. Un reattore per la dark fermentation e l'altro per la metanogenesi.
Nel reattore di DF è possibile creare una comunità microbica adatta a partire da un comune substrato organico non sterile, come avviene in principio per la digestione anaerobica (Wang X. et al. 2009).
I processi di fermentazione seguono la mesofilia o la termofilia, in base alla tempreatura di esercizio scelta. La mesofilia opera in un range normalmente tra i 35° e i 37° C. La termofilia, scelta adottata per questo studio, opera in un range tra i 50° e i 55° C.
La temperatura matenuta constante tramite camicia esterna nel reattore è stata di 55°C. Indubbiamente il consumo energetico è maggiore rispetto alla termofilia, ma il vantaggio di questa scelta operativa è che in condizione di termofilia l'enzima idrogenasi trova le sue migliori condizioni di operatività con un optimum a 55°C, inoltre vi è l'abbattimento dei microorganismi patogeni.
Le temperature maggiori rispetto alla mesofilia inoltre rendono la solubilità del gas molto più ridotta con un rilascio di anidride carbonica dalla fase liquida, un altro importante fattore che aiuta a tamponare in parte l'acidificazione del sistema dovuta alla produzione massiccia di VFA in prima fase (Valdez-Vazques I. et al. 2005, Ueno Y. et al. 2007).

Il tempo di ritenzione idraulica definito HRT si definisce in letteratura in un range con un minimo di 8 ore ad un massimo di 3/5 giorni, in base al carico organico, definito come OLR e al tipo di substrato da degradare nonché alla temperatura di esercizio e acclimatazione degli organismi (Reith J.H. et al. 2003, Valdez-Vazques I. et al. 2009).

Il pH 5.5 è l'optimum per l'enzima idrogenasi; limite superiore oltre il quale vi è un cambio di metabolismo verso la solventogenesi.
L'abbassamento del pH è causato da un eventuale accumulo di VFA. Se il pH raggiunge il pH 4.5 vi è un cambio metabolico con passaggio alla solventogenesi, qui si instaura una produzione di etanolo e butanolo, di acetone e lattato. Questo tipo di metaboliti portano ad un bilancio produttivo di idrogeno nullo. (Antonopolou G. et al. 2008)
La solventogenesi è data anche dall'innalzamento della pressione parziale se vi è accumulo di idrogeno, che va ad inibire l'azione degli enzimi idrogenasi (Valdez-Vazques I. et al. 2009, Kraemer J.T. et al. 2007).
Sono dunque molto importanti i controlli della fase di dark fermentation, come il pH, che dev'essere mantenuto a valori ottimali di pH 5-5.5, che vanno ad incrementare la produzione di bioidrogeno, evitando l'inibizione delle idrogenasi.
In letteratura si specifica che una diminuzione del pH, a causa di un accumulo di VFA in generale, porta inevitabilmente alla richiesta di un "aiuto" esterno, ovvero un controllo chimico del pH, come già specificato. (Shin et al., 2005; Gomez et al., 2006; Lee et al., 2010). Questo perché se il sistema non viene tamponato esso decresce repentinamente e rovinosamente nella produzione di idrogeno, dunque si è costretti ad intervenire per non portare il sistema al collasso.

La potenza impiegata è di 2.2 kW per i motori elettrici installati. Un sistema a baderna porta gli alberi centrati nella parte superiore dei reattori e ne tutela inoltre una tenuta sicura riguardo ai gas prodotti.
L'alimentazione è avvenuta in maniera manuale attraverso un imbuto superiore, semicontinua, una volta al giorno. Lo scarico avveniva per "troppo pieno" da una guardia laterale. L'alimentazione del primo reattore è costituita da 60 litri di miscela a rapporti diversi tra FORSU, ricircolo F2 e acqua. Le proporzioni variano in base a quanto già descritto.
L'alimentazione del secondo reattore F2, di metanogenesi, è costituita da 30 litri di effluente F1. Durante l'alimentazione del secondo reattore la metà dell'effluente (30 litri) viene eliminata, in quanto il volume della seconda fase è troppo basso per poter trattare tutto l'effluente (60 litri) nelle condizioni di

esercizio volute (HRT 12.6 d).

Il recupero del gas è situato nella parte superiore ed è inviato ad una guardia idraulica esterna con lo scopo di mantenere una pressione di esercizio pari a 0.1 m di colonna d'acqua.

Ambo i reattori possiedono una camicia esterna che permette di mantenere la temperatura del boiler di processo in termofilia.

Il controllo della temperatura è mantenuto in un range ±1°C attraverso due punti differenti, il primo all'interno del boiler per non superare la temperatura massima di esercizio della caldaia e il secondo all'interno del digestore mediante sonde PT100.

I due reattori, F1 e F2, hanno un volume di esercizio di 200 l e 380 l, relativamente per la fase di dark fermentation e di metanogenesi.

Figure 3.3: reattori impiegati per la produzione di bio-hythane: dark fermentation (sinistra) e metanogesi (destra)

La FORSU, matrice biodegradabile organica del rifiuto solido urbano, è un substrato non sterile che ha permesso che si sviluppasse una flora microbica endogena.

Per favorire lo sviluppo di microrganismi fermentativi il reattore è stato caricato con un alto OLR iniziale (52.8 kgTVS/m3d) con una miscela di FORSU e acqua in un rapporto di 3:5. Questa scelta deriva dalla necessità di dover ricreare le condizioni sfavorevoli alla crescita per i microorganismi

metanogeni, per effetto dell'inibizione da substrato, favorendo lo sviluppo di batteri tipici della catena trofica anaerobica delle prime fasi della fermentazione della dark fermentation.

Come specificato in letteratura, per casi di sviluppo simili, è stata attuata una triturazione del substrato in clasti da 2 a 6 mm circa, in questo caso di studio si è cercato di mantenere tale tipo di frammentazione e miscelazione eterogenea. Non è stato adottato alcun pre-trattamento se non quello dell'eliminazione attenta ma non necessariamente completa di inerti residui come plastiche, materiali ferrosi, e inerti non biodegradabili anche di origine naturale, come ad es. gusci ed esoscheletri animali, grazie un primo trituratore a coltelli e successivamente mediante un dissipatore ad umido sotto lavello. La triturazione di questa matrice fortemente eterogenea comporta una pezzatura minore, dunque a parità di volumi le superfici "attaccabili" e biodegradabili dai microrganismi aumentano.

I due reattori di processo sono stati alimentati in modalità semicontinua, ovvero con cadenza giornaliera per cinque giorni su sette, saltuariamente anche il fine settimana.

Vengono riportate in tabella 3.3 le caratterizzazioni della FORSU relative al periodo sperimentale.

Tabella 3.3: Caratterizzazione della FORSU

Parametro	Unit	Average Value	Min	Max
Solidi Totali (TS)	gTS/kg forsu	260 ± 44	151	331
Solidi Volatili (TVS)	gVS/kg forsu	216 ± 36	133	283
TS/TVS	%	83 ± 3	80	88
$P\text{-}PO_4$	gP/kgTS	3.2 ± 0.5	2.0	3.7
TKN	gN/kgTS	29 ± 8	13	44
COD	gO_2/kgTS	854 ± 83	780	1103

Il periodo sperimentale è caratterizzato da un substrato di partenza con un contenuto medio di solidi totali pari al 26% circa del peso umido totale ed una frazione di solidi volatili superiore all'80% dei TS.

È evidenziato così l'alto grado di biodegradabilità della FORSU che assieme ad una buona distribuzione dei macronutrienti (COD, TKN e P) ne fa un substrato particolarmente adatto a processi di trattamento biologico.

La fase di metanogenesi del reattore F2 è stata alimentata con 30 litri di digestato proveniente da F1 il secondo giorno di operatività e aggiunta acqua in modo tale da raggiungere il volume operativo del reattore.

Il giorno successivo all'alimentazione dei reattori le matrici presenti possedevano le seguenti caratteristiche riportate nella tabella 3.3.

Tabella 3.3

Parametro	Unità	DarkFermentation F1	Metanogenesi F2
TS	g/kg	53	22
TVS	g/kg	43	15
TVS/TS	%	83	69
pH	-	5.9	8.2
VFA	mgCOD/l	2631	1086
$N\text{-}NH_4^+$	mg/l	786	882
Alcalinità Parziale pH6	$mgCaCO_3/l$	-	3779
Alcalinità Totale pH4	$mgCaCO_3/l$	-	4535

Un'analisi dell'effluente di dark fermentation ha definito una frazione di solidi volatili (> del 80% dei TS).

3.4 Condizioni operative

Questa sperimentazione ha avuto una durata complessiva di 140 giorni.

L'inizio è caratterizzato da un innalzamento del carico organico (valori superiori a 52 kgTVS/m^3_rd). La gestione del rapporto del flusso di ricircolo è di tipo variabile a seconda delle condizioni giornaliere dei reattori.

L'innalzamento del carico organico iniziale serve per portar il reattore DF in condizioni di acidogenesi. Come già accennato, per far crescere tali microrganismi è noto che le prime fasi del processo di digestione anaerobica, in particolare idrolisi e acidogenesi, sono governate da cinetiche di primo ordine, quelle metanogene da cinetiche di inibizione da substrato.

Agli occhi della cinetica, sta il motivo per cui sono stati applicati alti OLR per cercare di inibire la crescita dei microrganismi metanogeni nella DF e portare quest'ultima in condizioni di acidogenesi.

Il carico organico ottimale è quello in cui al di sopra o al di sotto di esso la produzione totale di idrogeno e la sua velocità diminuiscono (Shin H.S. et al. 2005). In DF il carico ottimale è strettamente connesso con l'effetto inibitorio sulla produzione di idrogeno, condizionato dagli acidi grassi volatili che ne abbassano il pH, prodotto del metabolismo dei batteri idrogenogeni.

Benchè la presenza di acidi grassi volatili (VFA – volatile fatty acid) crei una condizione di pH tale che l'acidità riduca notevolmente la possibilità di proliferazione di metanigeni (Kraemer J.T. et al. 2007).

I tempi di residenza e le temperature di esercizio applicate nei due reattori sono stati mantenuti costanti per l'intera durata della sperimentazione.

Nel reattore di dark fermentation l'HRT era nell'ordine dei 3.3 giorni al fine di consentire il wash-out dei microrganismi metanogeni per via delle cinetiche di crescita più lente rispetto ai microrganismi fermentativi. Al contrario nel secondo reattore al fine di portare a termine le reazioni culminanti con la produzione di biogas sono stati applicati HRT più lunghi, di 12.6 giorni.

Il carico organico medio applicato nella prima fase, di idrogenogenesi, è stato di 18.41 kgTVS/m^3_rd. Nel reattore di seconda fase, metanogenesi, invece di 4.84 kgTVS/m^3_rd.

L'unica eccezione, per alcuni giorni di processo, precisamente dal 70 al 75 giorno il carico organico di prima fase è stato aumentato portandolo ad una

media di 22.7 kgTVS/m^{3}d cercando portare in condizioni di acidogenesi nuovamente il sistema, questo per una presenza riscontrata di metano nel gas in uscita.

Durante la sperimentazione il ricircolo è stato fermato al giorno 90 fino a termine. Si è cercato di eliminare del tutto l'effetto tamponante con il fine di provar ad eliminare la presenza di probabili microrganismi metanogeni acclimatati nel reattore di DF e con l'intenzione di recuperare a pieno il processo con sola produzione di idrogeno. Sebbene applicato anche un aumento del carico in ingresso, non si è riusciti nell'intento eliminatorio di tali microrganismi.

Questa situazione ha portato a verificare e caratterizzare attraverso tecnica FISH, quali ceppi si fossero acclimatati a queste condizioni sfavorevoli per la sopravvivenza, in un reattore di canonica acidogenesi.

Per cercare di inibire la residua attività degli archaea metanogeni in F1 sono stati applicati anche carichi organici più alti verso i giorni ultimi oltre allo stop del ricircolo, come già specificato. Già espresso infatti che le prime fasi del processo di digestione anaerobica, ossia idrolisi e acidogenesi, sono governate da cinetiche di primo ordine. Alte concentrazioni di substrato corrispondono ad alte velocità di consumo e conseguente accumulazione dei prodotti di reazione, che vanno ad inibire la crescita dei microrganismi metanogeni che rispondo invece a cinetiche di secondo ordine, ovvero inibizione da substrato.

In tabella 3.5 sono riassunte le condizioni operative dello studio nel corso del quale la temperatura (55°C) e l'agitazione sono rimaste sempre costanti.

Tabella 3.5 Condizioni operative del periodo sperimentale

	DARK FERMENTATION			
PARAMETRO	media	min	max	s.d.
HRT (d)	3.3	3.3	3.3	-
OLR (kgVS/m^{3}d)	18.41	15.5	32.2	7.04
	METANOGENESI			
HRT (d)	12.6	12.6	12.6	-
OLR (kgVS/m^{3}d)	4.84	3.4	7.1	0.8

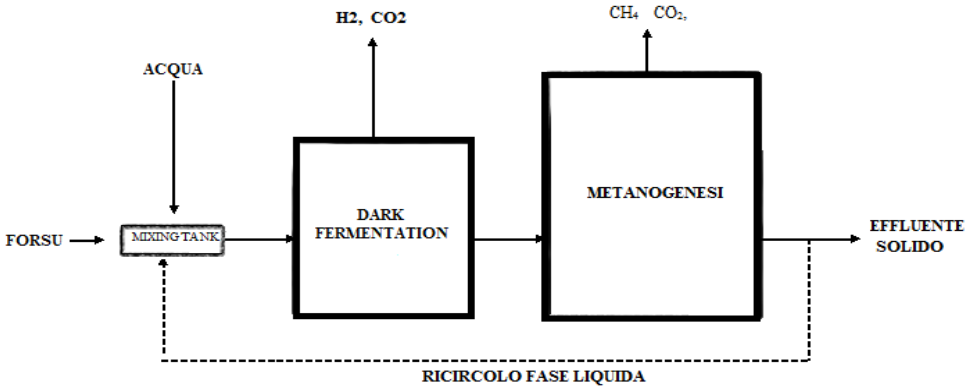


Figura 3.4: Schema di processo adottato per la produzione di biohythane

Il processo ha previsto l'impiego di un ricircolo della fase liquida dell'effluente del reattore di metanogenesi, in cui la separazione della fase liquida e solida è stata condotta mediante un separatore gravitazionale dotato di una coclea.

Si è voluto verificare se i valori dei parametri di processo impostati (HRT, ricircolo variabile e carico organico in ingresso) permettevano di raggiungere e confermare uno stato stazionario stabile e duraturo e, in secondo luogo, di verificare se in un processo a lungo termine la modifica del rapporto di ricircolo possa stabilizzare il processo all'insorgere di inibizioni dovute in primo luogo all'accumulo di ammoniaca.

3.4.1 Lo stato di avanzamento

Nella fase sperimentale precedente a questa è stata valutata la stabilità del processo di produzione combinata di idrogeno e metano mediante un approccio di digestione anaerobica termofila a doppia fase separata, per cercare di trovare la migliore condizione operativa in termini di carico organico, quindi sono stati esplorati diversi carichi organici e definito il miglior carico organico quello che va dai 16.5 ai 18.5 kg di TVS/m^3 di reattore, si è voluto studiare un processo a lungo termine cioè mantenendo il processo in un'unica condizione operativa in termini di carico OLR quindi non più variabile. Nel primo CSTR adibito alla produzione di idrogeno è stato applicato un carico organico intorno ai 18 kgTVS/m^3_rd e un HRT di 3.3 giorni. Il secondo reattore è stato alimentato con un carico compreso tra i 4-5 kgTVS/m^3_rd ed un HRT di 12.6 giorni.

Tale reattore è stato alimentato per circa una settimana con carichi organici superiori ai 30 kgTVS/m^3_rd in modo tale da indirizzare il digestore rapidamente in acidogenesi creando quindi condizioni sfavorevoli per lo sviluppo di microrganismi metanogeni. Il carico organico del reattore di metanogenesi è stato gradualmente incrementato fino ad applicare l'OLR previsto dal piano operativo (4-5kgTVS/m^3_rd). Il rapporto di ricircolo applicato era di 0.5, quantità eccessiva che ha portato ad accumulo di azoto ammoniacale.

Successivamente è stato dimezzato (RUN B) rispetto alla condizione di partenza (RUN A). Le altre condizioni operative sono rimaste invariate.

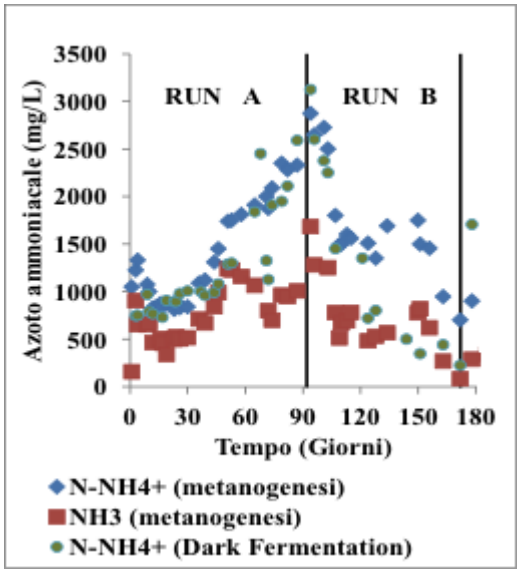


Figura 3.5:
profilo temporale dell'ammoniaca durante il precedente RUN A & B

Al fine di simulare un sistema di controllo automatizzato del flusso di ricircolo da giorno 173 in poi si riprenderà con questo caso di studio in cui il rapporto tra la portata del ricircolo, Qr, e la portata totale, Qt, è stato modificato con l'intento di mantenere la concentrazione di ammoniaca su livelli inferiori al limite di inibizione del processo di biogassificazione.

Le ragioni della variazione del rapporto Qr/Qt risiedono nel fatto che la concentrazione di ammoniaca intorno al 90° giorno, dello studio precedente, aveva raggiunto dei livelli potenzialmente inibenti per il processo di produzione di biogas nel reattore di metanogenesi (Figura 3.5).

Infatti dalla figura 3.5 risulta che la concentrazione di azoto ammoniacale aveva raggiunto concentrazioni superiori a 2500mg/l, a cui corrispondeva una concentrazione di ammoniaca libera superiore al livello critico di 700mg/l.

L'effetto inibitorio dell'ammoniaca si è manifestato attraverso un accumulo di acidi grassi volatili nel reattore di metanogenesi (Figura 3.6)

La strategia di intervento ha previsto il dimezzamento del flusso di ricircolo passando da un rapporto Qr/Qt di 0.5 a 0.25.

La variazione del flusso di ricircolo ha consentito di ridurre in pochi giorni il contenuto di azoto ammoniacale in entrambi i reattori.

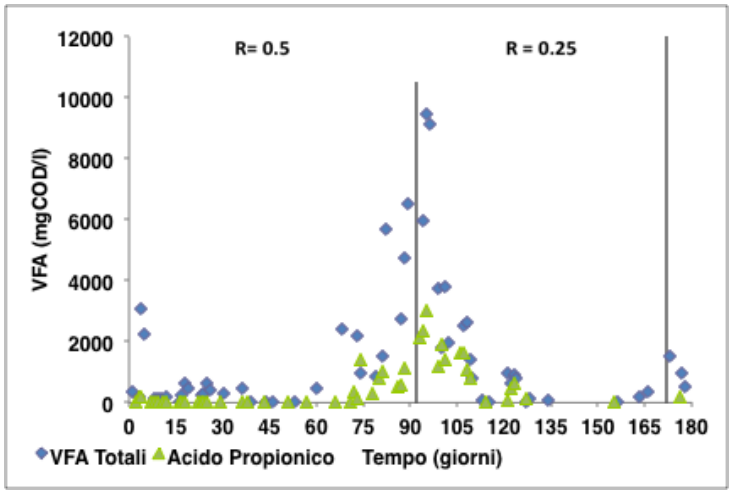


Figura 3.6:
profilo temporale dei VFA nel RUN A & B (metanogenesi).
R = rapporto ricircolo

L'incremento dei VFA era dovuto essenzialmente alla presenza di acido propionico, il quale intorno al novantesimo giorno rappresentava il 32% del contenuto totale di acidi grassi volatili (9500 mgCOD/l). Con la riduzione del rapporto Qr/Qt, per circa una settimana è stato ridotto anche il carico organico nel reattore di metanogenesi al fine di evitare un ulteriore accumulo di acidi grassi volatili.

Come si può notare dalla figura 3.6 la concentrazione di VFA ha subito una netta riduzione, restando su valori inferiori di 2000 mgCOD/l per l'intera durata del RUN B ed è ripresa di nuovo la degradazione dell'acido propionico e dei vfa in generale.

Durante il RUN A il progressivo incremento dell'azoto ammoniacale ammoniaca ha comportato a sua volta un aumento dell'alcalinità totale nel reattore di metanogenesi (figura 3.7)

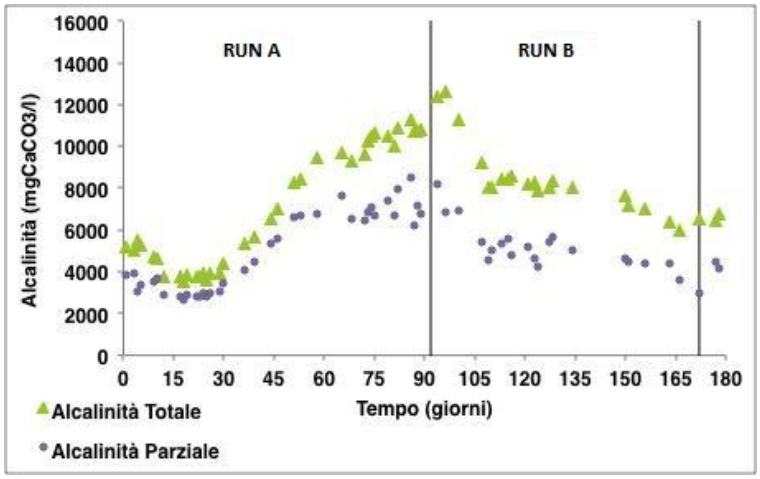


Figura 3.7: Profilo temporale dell'alcalinità durante il RUN A & B

Con l'instaurarsi di fenomeni di squilibrio della catena trofica anaerobica manifestatisi attraverso l'accumulo di acidi grassi volatili (Figura 3.6), si è assistito ad un aumento della differenza tra i valori di alcalinità totale e parziale (Figura 3.7). Come si poteva intuire nel RUN B si è assistito ad una riduzione del potere tamponante senza far registrare particolari variazioni del pH all'interno dei due reattori (figura 3.8).

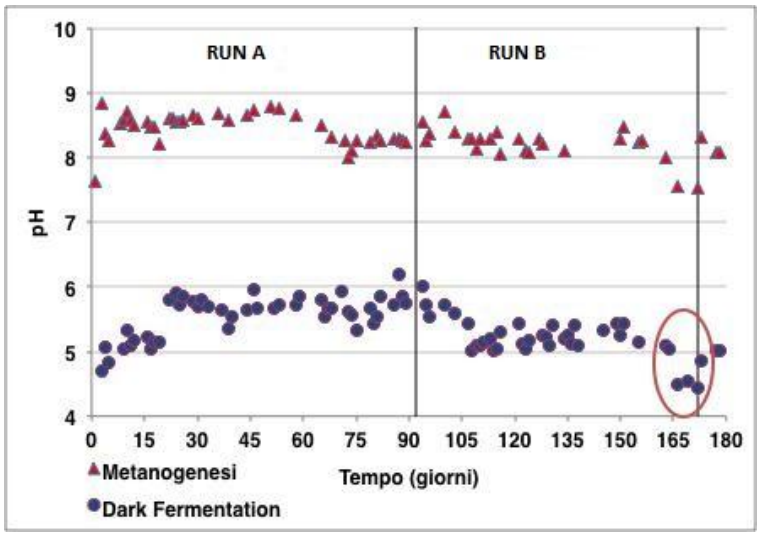


Figura 3.8: Profilo temporale del pH durante il RUN A & B

Il sistema dunque è un sistema già consolidato e che si utilizza una configurazione a doppia fase che consente di produrre H_2 e CH_4 e che viene usato il ricircolo per questi motivi principali:

1) il recupero di nutrienti
2) consente di diminuire i substrati di partenza, la FORSU
3) la capacità tamponante.

Dal grafico (figura 3.8) si evince inoltre che al giorno 165 il pH si è abbassato sotto valore 5, questo spiega come il rapporto di ricircolo a 0.25 avesse abbassato l'alcalinità al sistema e l'accumulo di ammoniaca legato, risultando a lungo termine (70 giorni circa) troppo basso per sorreggere l'acidificazione che avverrebbe, come già spiegato, spontaneamente in condizioni fermentative con la produzione di VFA.

È per questo che con il seguente caso di studio si è voluto sviluppare una regolazione del flusso di ricircolo variabile per mantenere il pH della fase fermentative in condizioni di dark fermentation per la produzione ottimizzata di idrogeno.

Capitolo 4

Risultati e discussione

RUN 1

Il periodo sperimentale si è svolto in un RUN di 140 giorni. E' stato applicato al reattore di dark fermentation (F1) un HRT di 3.3 giorni, in modo tale che vi fosse lo sviluppo di ceppi batterici idrogenogenici e non metanogeni. Si è stabilito per il secondo reattore (F2) difatti un tempo di residenza maggiore, 12.6 giorni, sufficiente per lo sviluppo del processo di metanogenesi in approccio di digestione a doppia fase.

L'OLR medio applicato giornalmente è stato di 18.41 kgTVS/m^3d per F1 e di 4.84 kgTVS/m^3d per F2, quest'ultimo alimentato con l'effluente della fase di dark fermentation.

Il processo in studio è però iniziato con un alto carico in alimentazione intorno ai 60 kgTVS/m^3_rd, per ristabilire le condizioni acidogeniche e per cercare di inibire i microrganismi metanogeni che si erano sviluppati in seguito ad un blocco per problemi di manutenzione del reattore di DF a seguito dell'ultimo processo evidenziato nel paragrafo dello stato di avanzamento. La manutenzione ha portato infatti ad un blocco delle operazioni di carico e questo ha portato a dilatare i tempi di residenza (HRT) favorendo così spontaneamente la crescita di organismi metanogeni all'interno del primo reattore.

Nonostante l'aumento del carico organico, benché si fossero ripristinate le condizioni di corretto pH e alcalinità atte alla produzione di idrogeno in DF, si è riscontrata la presenza di metano, ipotizzando che vi fosse un probabile acclimatamento di alcuni ceppi metanogeni.

Per la fase di idrogenogenesi, da quella metanogenenica, si è adoperato un rapporto di ricircolo non fisso bensì variabile, come precedentemente chiarito e ne è stata valutata la stabilità del processo a lungo termine, cercando attentamente di evitare accumuli ammoniacali che avrebbero inibito il processo di biogassificazione.

Lo scopo dell'adozione del ricircolo Qr (effluente del reattore di metanogenesi sottoposto a filtrazione) era quello di riuscire a tamponare il sistema mantenendo il pH intorno a livelli ottimali (5.5) per la produzione di H_2.
Tale strategia ha consentito di ottenere una buona stabilità in entrambi i reattori.
Vengono successivamente esposti gli andamenti dei parametri significativi di processo.
In primis viene evidenziato l'andamento del parametro pH.

il pH nel reattore di metanogenesi (F2).

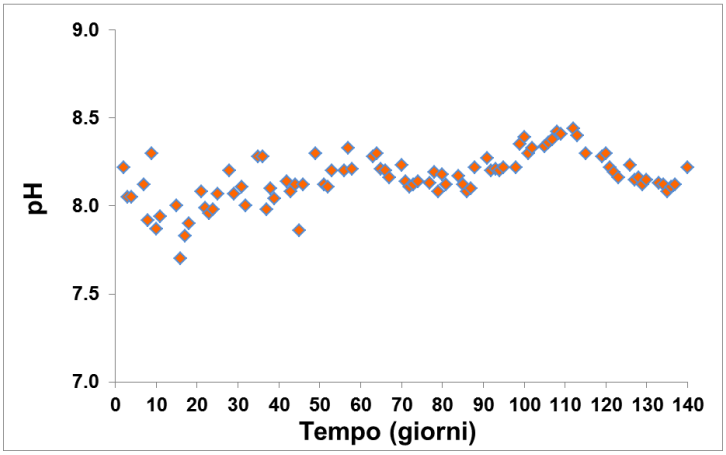


Figura 4.1: il pH della seconda fase

Si deduce da figura 4.1 che nel reattore di metanogenesi il pH già si trovava in condizioni più o meno stabili e che una volta ripreso il processo tale stabilità s'è mantenuta intorno a pH 8. Esso ha mantenuto un range pressoché costante durante tutto il processo fino al termine della sperimentazione.

Il pH del reattore fermentativo DF, nonostante l'alta attività di acidogenesi, non ha subito una riduzione, questo grazie al ruolo del ricircolo come effetto tamponante del sistema Il quale possedeva un'alcalinità media di 3527 mgCaCO3/l.

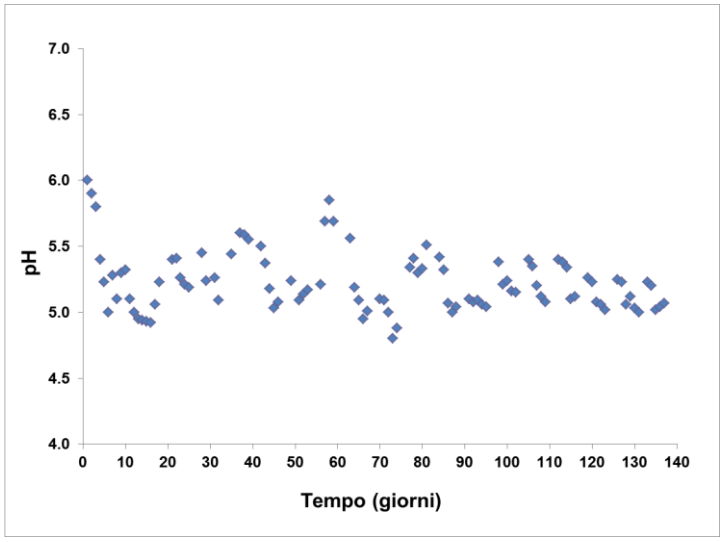


Figura 4.2: il pH nella fase di dark fermentation

Dalla figura 4.2 si può desumere come il pH nella fase di dark fermentation raggiunga un certo grado di stabilità già nella prima settimana.
Con l'ingresso iniziale di alti carichi organici adottati per riavviare velocemente il processo di acidogenesi, il pH si è abbassato passando da un valore iniziale intorno a 6 fino a stabilizzarsi dopo pochi giorni, in un range di 5 – 5.5, ottimale per l'attività delle idrogenasi (Cavinato et al., 2011.).

Intorno al 60° giorno si può notare come il pH si sia alzato nuovamente, si fornisce dunque un particolare del grafico per delucidare quanto successo, riassumendo i valori di pH.

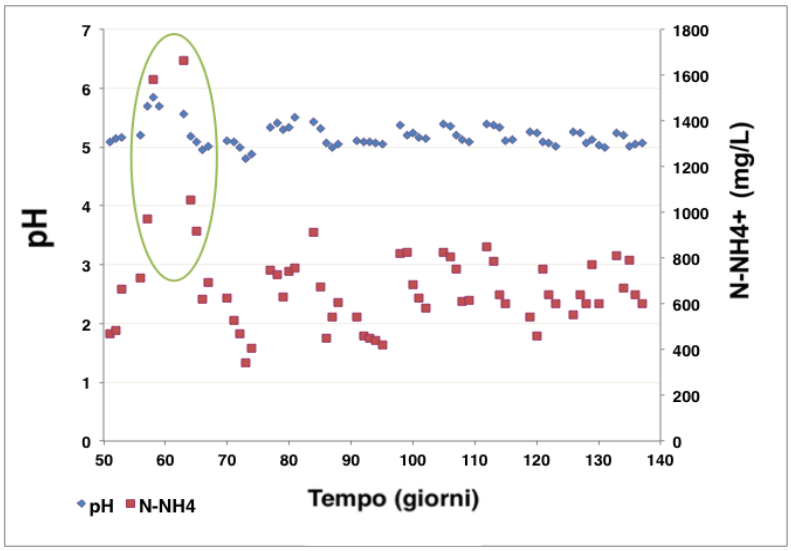


Figura 4.3: valori di pH e azoto ammoniacale in relazione grafica

La punta che si nota (figura 4.3) al 59° e 60° giorno in cui si innalza notevolmente l'ammoniaca e il valore di pH è la risposta precisa ad un ulteriore blocco dell'alimentazione, per via di interventi di manutenzione sulla linea di preselezione della FORSU. L'azione intrapresa quindi è stata quella di ridurre il flusso di ricircolo fino al suo stop (90° giorno) e nello stesso tempo è stato innalzato l'OLR medio per cercare di inibire i metanogeni che si erano acclimatati nel reattore della DF.

A tal proposito si espone il grafico relativo alla presenza di metano nel reattore di dark fermentation, a più alte percentuali durante l'inizio di ogni settimana.

(Per facilitare la visualizzazione sono riportati i primi 50 giorni, figura 4.4).

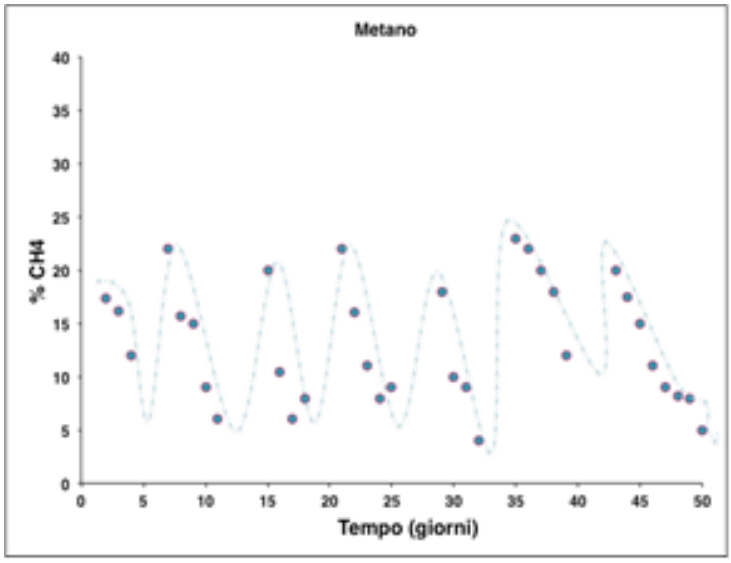


Figura 4.4: presenza di metano durante il processo di DF

Innalzamento dell'OLR medio risultava avere quindi in tali giorni valori medi maggiori di 21.11 kgTVS/m^3_rd e di 5.56 kgTVS/m^3_rd nella dark fermentation e metanogenesi, rispettivamente.

L'alzamento del carico organico ha portato ad un massiccio incremento della concentrazione di VFA, si riporta il grafico di figura 4.5, in cui si riportano solo i giorni successivi all'innalzamento del carico organico.

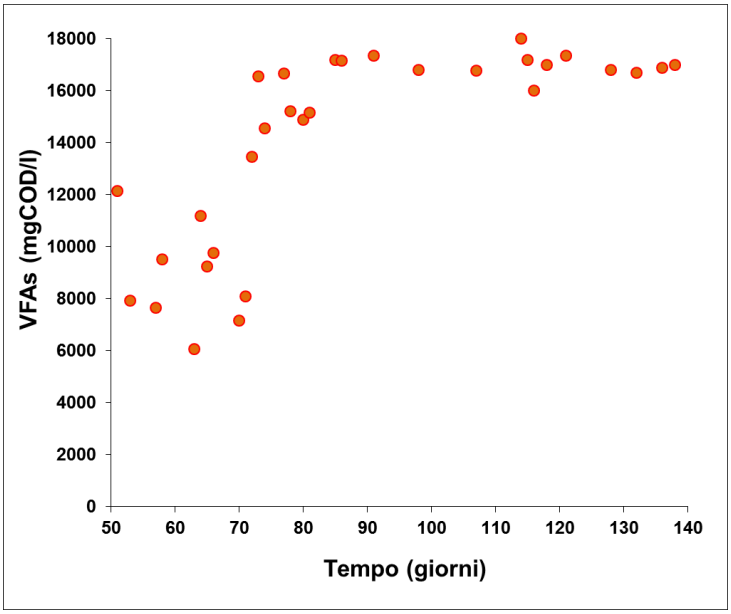


Figura 4.5: crescita VFA nella fase di dark fermentation

Il blocco delle operazioni di alimentazione durante il fine settimana però favoriva l'azione dei microrganismi metanogeni, per via della dilatazione dell'HRT, portando di conseguenza ad un consumo dei VFA, consentendo nello stesso tempo una maggiore esposizione della componente proteica all'azione degradativa della biomassa microbica. Ne consegue quindi anche un aumento dell'azoto solubile nel mezzo di reazione.

La presenza di microrganismi metanogeni ha inoltre contribuito, con il loro metabolismo, al consumo di idrogeno in prima fase.

Il seguente grafico (figura 4.6) mostra tale particolare aspetto che si può evidenziare dall'andamento ben visibile dell'idrogeno prodotto dai batteri idrogenogenici che, ogni qual volta vi sia stato un blocco nell'alimentazione (il fine settimana), venga con velocità consumato dalla presenza di alcuni ipotizzati archaea idrogenotrofi che si sono acclimatati nel reattore di dark fermention. Questi probabili archaea, con capacità di utilizzo di idrogeno come portatore di elettroni nelle reazioni di riduzione della componente CO_2 per la produzione di metano, verranno ricercati attraverso un'analisi microbiologica.

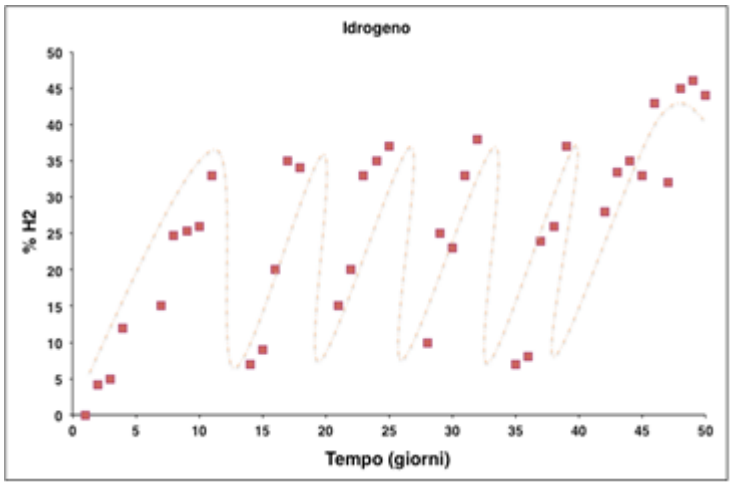


Figura 4.6: concentrazione di idrogeno nel gas in uscita dal reattore di dark fermentation

Si specifica che durante l'intero processo le rese in percentuale di idrogeno nel gas prodotto nel primo reattore ha fatto registrare valori medi del 28%.

Di seguito si riporta un altro parametro significativo per i reattori, il profilo temporale dell'ammoniaca, dimostrando che il rapporto del flusso di ricircolo variabile ha portato buona stabilità al processo.

La capacità tamponante del mixed liquor del reattore di metanogenesi e, di conseguenza, anche nel reattore di dark fermentation per via del ricircolo applicato, era dovuta in parte alla solubilizzazione dei gruppi amminici della componente proteica contenuta nella FORSU, come evidenziato dal profilo crescente della concentrazione dello ione ammonio in entrambi i reattori (figure 4.7-4.8) e di cui si riporterà in seguito anche la correlazione con il parametro alcalinità (figura 4.10a).

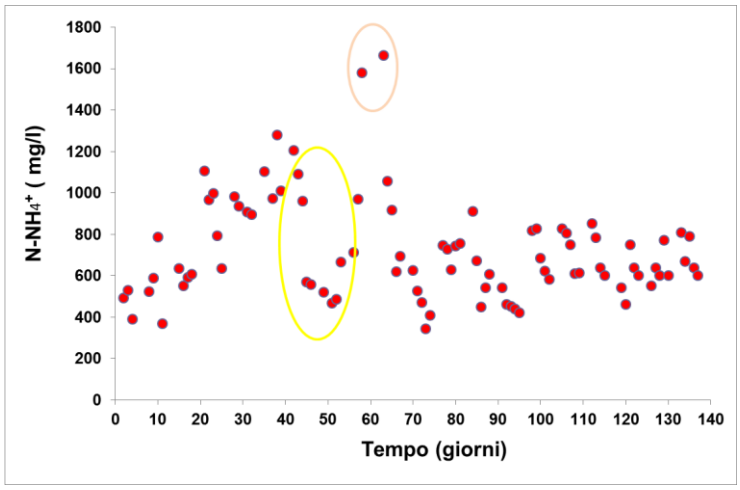


Figura 4.7: Profilo temporale della concentrazione di $N\text{-}NH_4^+$ nel reattore DF

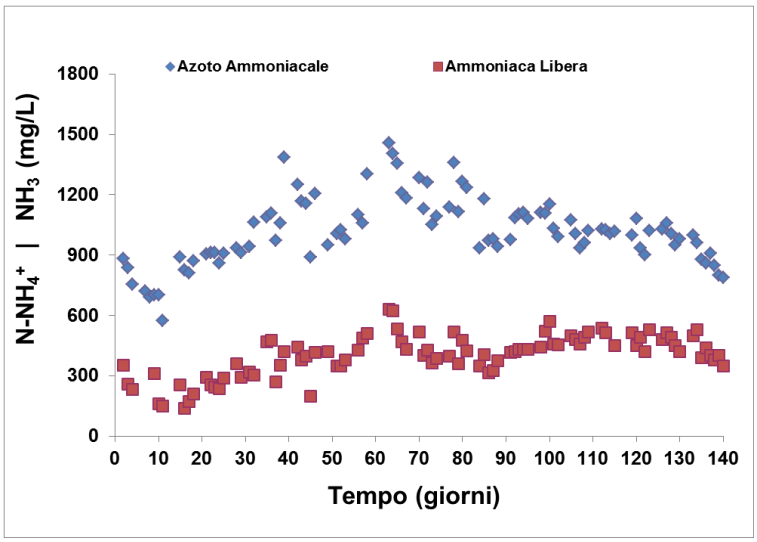


Figura 4.8: Profilo temporale della concentrazione di N-NH_4^+ e dell'ammoniaca libera (NH_3) nel reattore di metanogenesi

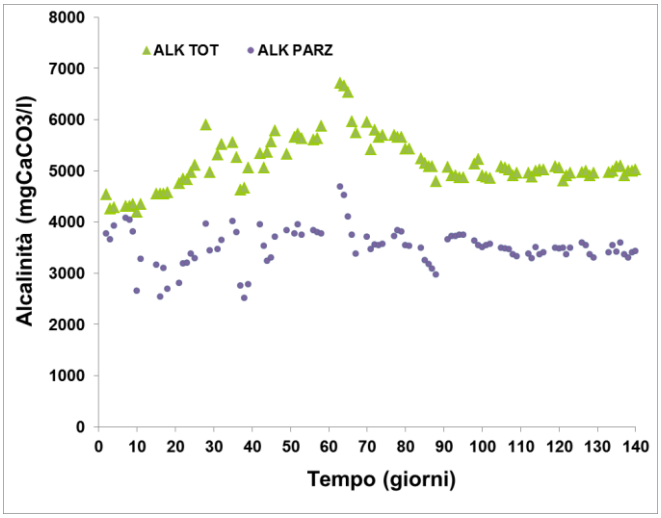
Come si può notare sin dalle prime fasi di processo in entrambi i reattori c'è stato un incremento costante della concentrazione di N-NH_4^+ (figura 4.7 e 4.8), si nota però che nel reattore di dark fermentation l'effetto del ricircolo (oltre ad essere tamponante) fa aumentare decisamente il quantitativo di ammoniaca nel sistema, essendo tale concentrazione bassa in un sistema acidogenico. Questo fatto fa constatare come l'ammoniaca tenda ad accumularsi nel sistema e dev'essere perciò attentamente controllata con regolarità. Nei giorni 44-50 il calo del quantitativo di ammoniaca è dato da una riduzione del quantitativo di ricircolo nel mixed liquor utilizzato per alimentare il reattore di DF, pur mantenendo il suo pH a livelli costanti, si veda giorni 44-50 di figura 4.2.

Nella figura 4.7 è evidenziato nuovamente l'aumento repentino di azoto ammoniacale nei giorni 59-60 dovuta alla degradazione proteica.

La stabilità come già evidenziato dai valori precedenti di pH sia nella fase di idrogenogenesi che di metanogenesi è dovuta alla capacità tamponante del flusso di ricircolo sul sistema, quantificabile tramite l'alcalinità.

Il profilo temporale dell'alcalinità nella fase di metanogenesi è mostrato in figura 4.9, nella quale si può notare un progressivo leggero aumento durante la sperimentazione.

Figura 4.9:
Profilo temporale dell'alcalinità totale e parziale nel reattore di metanogenesi



Anche in questo caso si nota come il reattore F2 fosse già vicino a valori stabili di alcalinità. Si ricorda che anch'esso ha subito un blocco nella digestione a causa della manutenzione. Questo sta a significare che le reazioni ultime della catena trofica di digestione anaerobica erano già in atto da tempo, sebbene rallentate. Lo si evince infatti dai primi giorni in cui si registra una leggera progressione positiva di alcalinità, sia nei parametri di alcalinità parziale (pH 6) che totale (pH 4), rimanendo sempre attorno ad un valore stabile medio di 5184 mgCaCO3/l con deviazione standard di 551 mgCaCO3/l.

Alcalinità parziale e totale inoltre sono caratterizzate da una differenza tra i loro valori pressoché costante, indicando quindi un buon bilanciamento della catena trofica anaerobica.

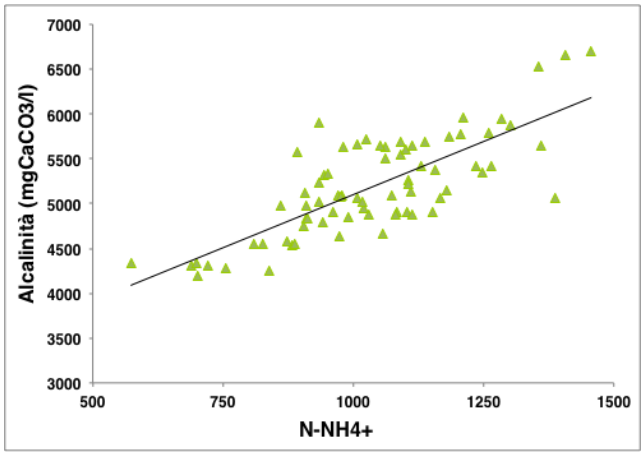


Figura 4.10a: Alcalinità Vs Azoto Ammoniacale (metanogenesi)

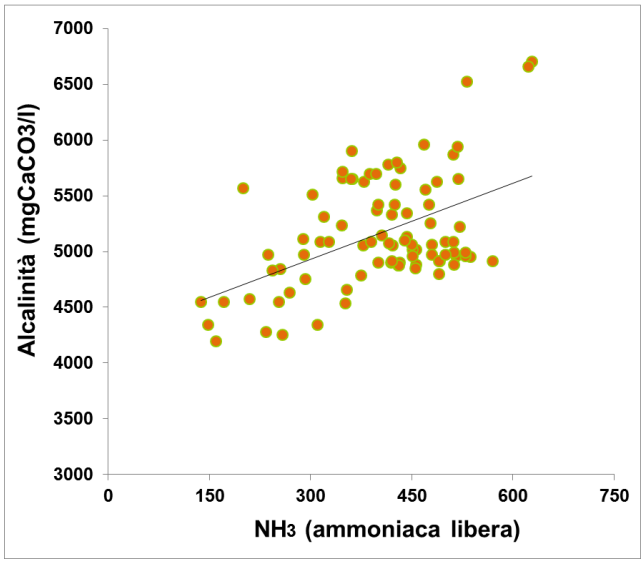


Figura 4.10b: Alcalinità Vs Ammoniaca libera (metanogenesi)

La figura 4.10a pone in evidenza come alcalinità e azoto ammoniacale siano strettamente legati, così come l'ammoniaca libera (figura 4.10b) quest'ultima può portare inibizione se si dovesse accumulare nel sistema. Ecco perché è necessario un controllo giornaliero della quantità ammoniacale del sistema, in questo studio è stato simulato un sistema di controllo automatizzato del flusso di ricircolo, variandolo giornalmente se necessario. Un aspetto futuro sarebbe quello di automatizzare il controllo del flusso di ricircolo che sia in grado di mantenere il sistema in stabilità.

L'alcalinità è un parametro che dipende dalla quantità di sali disciolti nel sistema, tra i quali ritroviamo anche i sali di ammonio. L'accumulo di ammoniaca nel tempo (figura 4.8) quindi sicuramente contribuisce ad aumentare la capacità tamponante del sistema. Il ricircolo dell'effluente dalla fase di metanogenesi in testa al sistema ha permesso quindi di evitare un abbassamento del pH nella fase di dark fermentation su valori inferiori a quelli ottimali per la produzione di idrogeno (si veda pH figura 4.2) dovuta all'accumulo di VFA (figura 4.11).

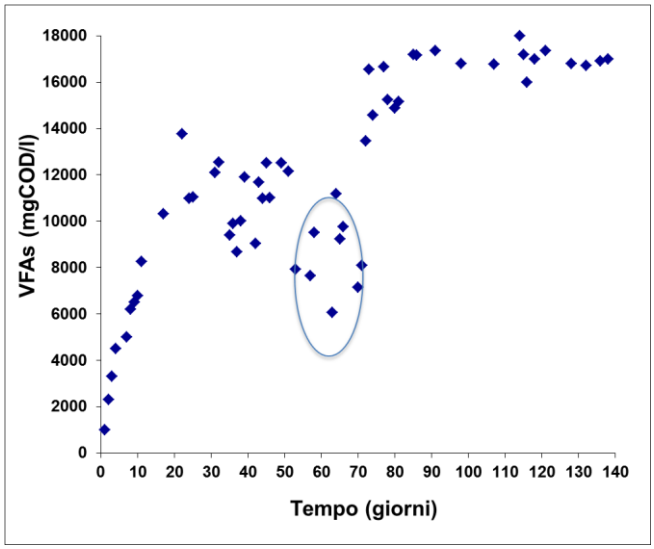


Figura 4.11: Profilo temporale dei VFA totali nella DF

Andando a chiarire la figura 4.11 si può considerare che in una settimana circa i microrganismi idrogenogenici si sono riprodotti riprendendo attivamente il loro metabolismo, fatto verificato dalla crescita dei VFA totali che fino al quinto giorno circa sono rimasti sotto la concentrazione di 4 gCOD/l, precisamente non più di 2 HRT.

Si è attuata l'inibizione substrato-substrato per i metanogeni, cioè si aumenta il carico organico ai microrganismi di prima fase (DF) che hanno una cinetica di primo ordine e di conseguenza tanto substrato porta a tanti prodotti di reazione.

Già al terzo HRT di processo si registra una notevole crescita della concentrazione degli acidi grassi volatili, segnato dall'incremento delle attività delle prime fasi di DF, fino a raggiungere una concentrazione più o meno stabile dopo appena 15 giorni, con una media di 12.2 gCOD/l.

Il calo della produzione di VFA intorno al giorno 60, potrebbe essere dovuto all'aumento di ammoniaca nel sistema come visto nel grafico di figura 4.7. Tale inibizione ha effetto sulla diminuzione dell'acido acetico e butirrico (figura 4.12), in letteratura questo fatto è spiegato come il metabolismo associato alla produzione di idrogeno sia spostato verso altri metabolismi, con l'aumentare dell'ammoniaca si riscontra un calo dei suddetti acidi volatili. (B. Salerno et al., 2006; C.Cavinato et al., 2012)

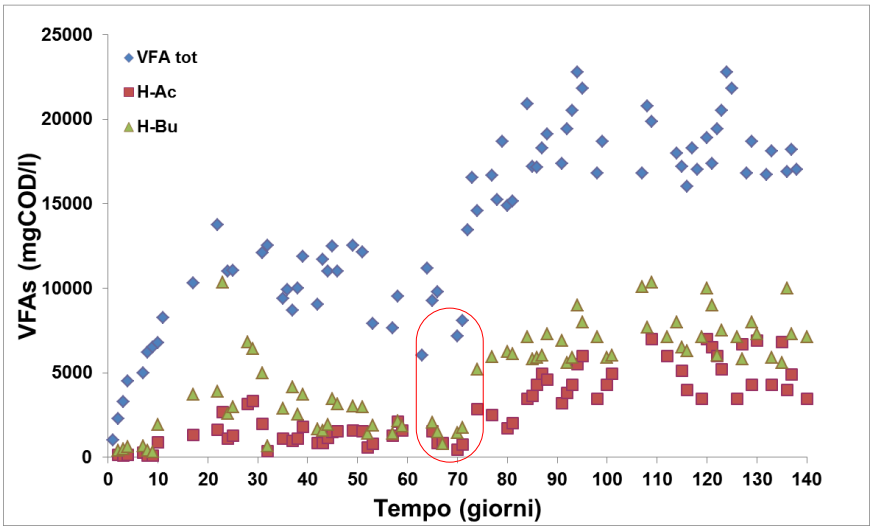
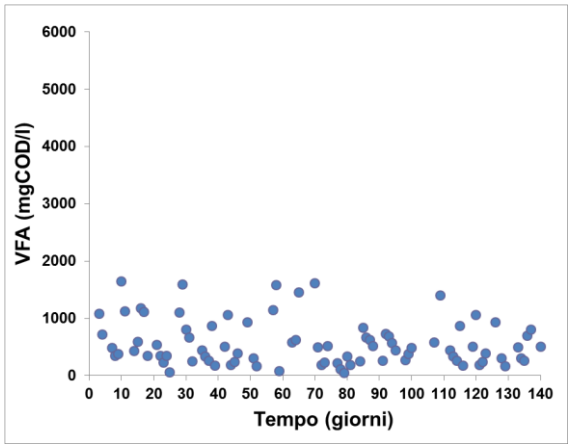


Figura 4.12: Profilo temporale dei VFA totali catena corta nella DF

Andando ad analizzare come i rapporti tra le concentrazioni di alcuni VFA possano rappresentare, raggiunta la stabilità del processo, corrispettive buone rese di produzione di idrogeno, si è riscontrato in letteratura che le massime rese di idrogeno ottenute si hanno quando la fermentazione acetogenica porta alla formazione di l'acido acetico e acido butirrico. Non è stato ancora trovato un significato preciso alla relazione tra i due o una correlazione del rapporto tra i due. Numerosi studi confermano comunque un rapporto Ac/Bu sia tra 0.5 e 2 (C_4/C_2) nelle massime fasi di produzione di idrogeno (Zhu H. et al. 2008, Antonopolou G. et al. 2008, Lee D.Y. et al. 2010, D.Liu et al.,2006). In questo caso di studio le concentrazioni medie di acido butirrico e acetico sono state 3744 mgCOD/L e 1949 mgCOD/L rispettivamente, mantenendo un rapporto più o meno costante di 1.88, in fase di equilibrio del processo di DF.

Nel reattore di metanogenesi l'ottima sintrofia tra le due fasi di processo è stata confermata anche dalle basse concentrazioni di VFA (< 1gCOD/l) e dai costanti valori di pH intorno a 8.16 medio con bassa deviazione standard (0.14) registrati nel reattore F2 adibito alla produzione di CH_4 (figura 4.13).
Nella figura 4.13 si concretizza come i microrganismi metanogeni degradino i VFA mantenendo le loro concentrazioni costanti e molto basse (640 mgCOD/l medi), poiché consumate come substrato utile per le reazioni ultime della catena trofica.

Figura 4.13: profilo giornaliero dei VFA totali nella fase di



Nella tabella 4.1 sono indicati i valori medi dei parametri derivanti dalla caratterizzazione dell'effluente della dark fermentation (F1) e della successiva fase di metanogenesi (F2).

(F1) Dark Fermentation

Tabella 4.1: Parametri di stabilità e macronutrienti medi nelle CSS

Parametro	u.m.	media	sd
TS	g/kg	46	11
TVS	g/kg	37	9
TVS,TS	%	81	3
COD	gCOD/kg	39	8
TKN	g/kgTS	26	7
P_{TOT}	g/kgTS	6.5	0.6
pH		5.2	0.2
$N\text{-}NH_4^+$	mg/l	705	261
VFA	mgCOD/l	12241	5643

(F2) Metanogenesi

Tabella 4.2: Parametri di stabilità e macronutrienti medi nelle CSS

Parametro	u.m.	media	sd
TS	g/kg	35	3
TVS	g/kg	21	3
TVS,TS	%	62	5
COD	gCOD/kg	11	2
TKN	g/kgTS	27	9
P_{TOT}	g/kgTS	7.4	1.2
ALCALINITA' pH 4	mgCaCO3/l	5184	551
ALCALINITA' pH 6	mgCaCO3/l	3527	408
pH		8.1	0.1
$N\text{-}NH_4^+$	mg/l	1190	152
VFA	mgCOD/l	640	350

Dalle tabelle si deduce che il ricircolo proveniente dall'effluente F2, utilizzato nella miscela di alimentazione per la fase DF (F1), ha dei valori medi di alcalinità totale (alk pH 6) di 3527 mgCaCO3/l che hanno il compito di tamponare giornalmente la prima fase, mantenendo così il suo pH medio a 5.2 con una deviazione standard molto bassa, rientrando nel range di condizioni di stabilità (pH 5-5.5) per la massima resa delle attività di idrogenasi presenti nel corredo enzimatico dei batteri acidogenici che popolano il primo reattore.

Questi organismi possiedono una buona attività, lo si deduce dall'alta concentrazione di acidi grassi volatili riscontrati nel reattore di dark fermentation (con un picco di 22765 mgCOD/l e un valore medio di 12241 mgCOD/l).

Il digestato invece della fase metanogena presenta una bassa concentrazione di acidi grassi volatili (valore medio 640 mgCOD/l), vi è dunque buona attività di organismi metanogeni che consumano e degradano questi ultimi. (E.Tuna, F.Kargi et al., 2009).

Le concentrazioni di ammoniaca per i due reattori sono inferiori ai 2000 mg/l, limite per il quale si potrebbe manifestare un'inibizione nella produzione specifica di gas (B. Salerno, W. Park et al., 2006)

4.1.1 Gas prodotto

La buona stabilità del processo nelle condizioni di esercizio sono state confermate dalle interessanti performance registrate in termini di gas prodotto.

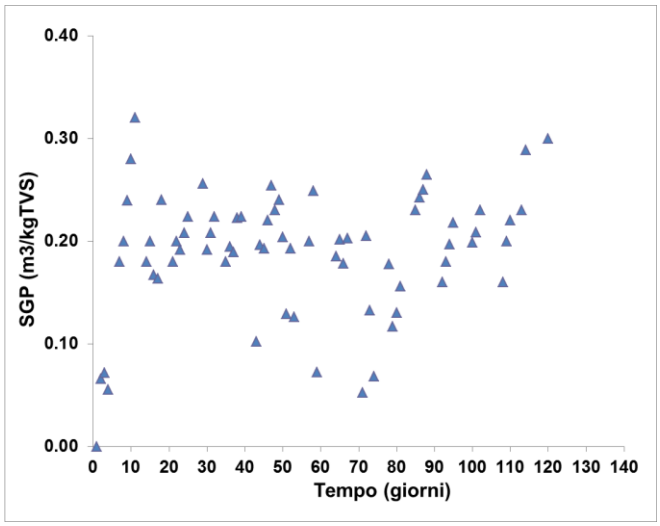


Figura 4.1.1: produzione specifica di gas in F1

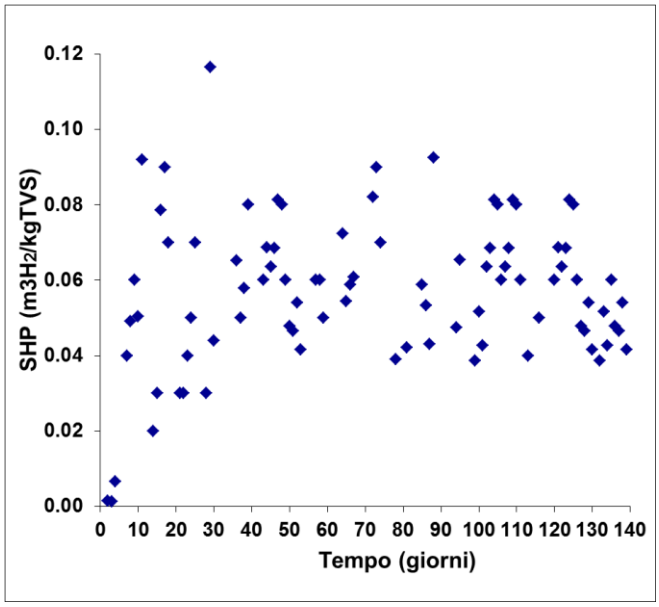


Figura 4.1.2: produzione specifica di idrogeno in F1

Il grafico di figura 4.1.2 riassume la produzione specifica di idrogeno in metri cubi su chilogrammo di TVS, si può notare come ogni inizio settimana vi sia un calo di produzione specifica di idrogeno, causa blocco alimentazione del fine settimana, e ciò non si verifichi invece nei giorni 35-50 e negli ultimi 20 giorni, in cui si è deciso di tenere l'alimentazione continua anche nel weekend.

I bassi tempi di residenza del reattore di dark fermentation incidono sulla variabilità nella produzione di idrogeno che dipende anche dal blocco nell'alimentazione di ogni fine settimana e dall'eterogeneità del substrato FORSU.

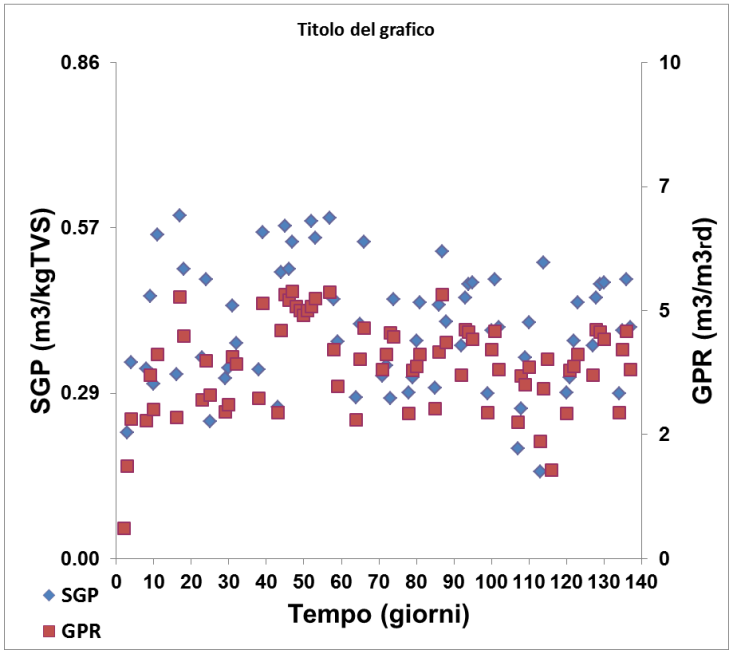


Figura 4.1.3: produzione specifica di gas e velocità di produzione di gas a confronto in metanogenesi

La figura 4.1.3 delinea come vi sia stata una rapida ripresa del processo di metanogenesi con produzione specifica di gas che ha raggiunto in 1 HRT la stabilità, con un valore medio di produzione specifica di gas di 0.38 m^3/kgTVS con una deviazione standard di 0.1. e una velocità di produzione media di 2.11 m^3/m^3_rd.

Nella tabella 4.1.1 è riportato il bilancio totale dei gas prodotti nei due reattori.

Tabella 4.1.1 : Rese di produzione medi nelle CSS

RESE DI PRODUZIONE	u.m.	Media ± ds (F1)	Media ± ds (F2)
GPR	m^3/m^3d	3.32±0.42	2.11±0.84
H_2	%	25±9	-
CH_4	%	16±7	63±5
CO_2	%	53±3	36±2
SHP	m^3/kgTVS	0.06±0.02	-
SGP	m^3/kgTVS	0.22±0.14	0.38±0.09

Nello stato stazionario la massima produzione specifica di idrogeno è stata di 99 l/kgTVS con punte percentuali nella composizione del gas H_2 del 45.5%.
La massima produzione di biogas nella fase di metanogenesi è stata di 1200 l/d con una composizione tipica media del 63% di CH_4 e 36% di CO_2.
La produzione specifica media di biogas è stata di 0.38 m^3/kgTVS con punte di 0.6 m^3/kgTVS, 600 l/kgTVS. Tali valori sono un po' più bassi ma simili alle rese ottenute in altri lavori condotti in condizioni simili a quelle applicate nel corso di questa sperimentazione.

4.2.1 Composizione del Biohythane e bilanci di massa

Si riportano i valori medi del gas totale prodotto nelle CSS.

Tabella 4.1.2: Bilancio del gas totale prodotto nei due reattori di questo studio

Dark Fermentation				
Parametro	**media**	**DS**	**max**	**Min**
H_2 (m^3H_2/d)	0.21	0.05	0.31	0.05
CH_4 (m^3CH_4/d)	0.09	0.05	0.18	0.04
CO_2 (m^3CO_2d)	0.36	0.04	0.44	0.28
Metanogenesi				
CH_4 (m^3CH_4/d)	1.07	0.21	1.27	0.68
CO_2 (m^3CO_2d)	0.56	0.14	0.79	0.38
Bio-Hythane				
H_2 (%)	7	2	12	3
CH_4 (%)	53	3	60	46
CO_2 (%)	39	4	43	31
SGP (m^3/kgTVS)	0.60	0.11	0.79	0.44
GPR (m^3/m^3_rd)	2.71	0.58	3.12	2.12

Come si può notare dalla tabella 4.1.2, nelle condizioni di stazionarietà raggiunte in questo studio, nel momento in cui è stato simulato un sistema di controllo automatico del processo, la produzione media specifica del gas totale prodotto era di 0.60 m^3/kgTVS con una velocità di produzione pari a circa 2.71 m^3/m^3_rd. In tale periodo la composizione media del gas è rientrata nel range tipico del biohythane, facendo registrare percentuali medie di H_2, CH_4 (derivante della somma del metano prodotto sia nel primo che nel secondo reattore) e CO_2 rispettivamente del 7%, 53% e 39%.

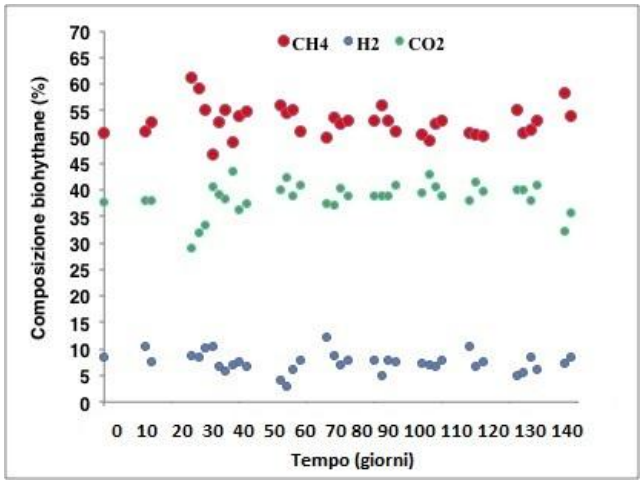


Figura 4.1.4: composizione del gas totale prodotto nell'intero processo

Questo interessante grafico ultimo esplica come il gas prodotto dai due reattori ha avuto un andamento pressoché costante. La maggior produzione in termini di biohythane si è avuta nei primi 50 giorni, in cui l'alimentazione del reattore F1 era con carichi medi di 18.1 kgTVS/m3rd (OLR) e in cui era applicato il flusso di ricircolo.

Nei successivi giorni fino a termine della sperimentazione la scelta operativa è stata quella di ridurre fino ad annullare il flusso di ricircolo in fase di dark fermentation per la presenza di metano oscillante ma sempre presente prodotto da microrganismi che si erano acclimatati alle condizioni acidogeniche del reattore e a sovraccaricare il reattore F1 per una settimana. Nonostante ciò l'attività di metanogenesi ha continuato a manifestarsi.

Pur subendo in una riduzione l'attività dei microrganismi metanogeni non è mai cessata completamente. Ciò ha portato alla decisione di condurre delle analisi microbiologiche alla ricerca della specificità dei microrganismi acclimatati nella ricerca di ripresa del processo.

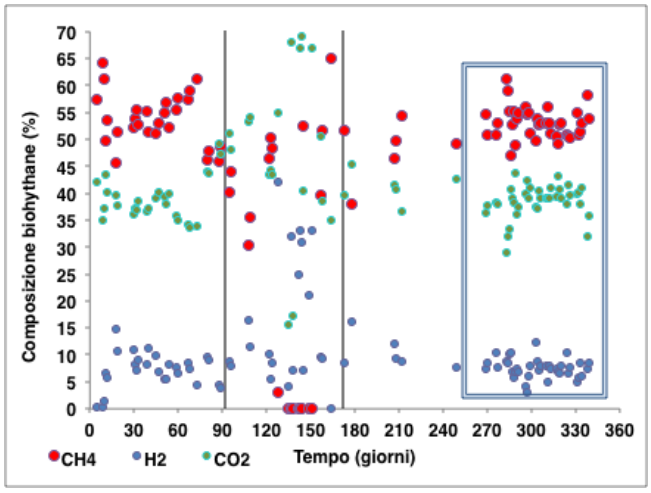


Figura 4.1.5: composizione del gas totale prodotto in relazione ai periodi precedenti a questo studio. Evidenziata la fase di sperimentazione di questo studio

Nella visione globale degli studi, quello precedente rapportato a questa sperimentazione, il maggior grado di stabilità nella composizione di biohythane si è ottenuto nel periodo descritto in questo studio, in cui l'alimentazione è stata continua ed è stato controllato il flusso di ricircolo.

Vengono successivamente riportati i bilanci di massa.

Tabella 4.1.3: Bilanci di massa

PARAMETRO	ENTRATA	USCITA	ABBATTIMENTO	BILANCIO
	g/d	g/d	%	%
TS	4628	4097	55	11
TVS	3844	3289	66	14
P_{TOT}	14.8	15.5	-	+2
N_{TOT}	133	131	-	-5

4.4 Analisi chemiometrica

In questo studio è stata verificata la correlazione che sussiste tra il parametro conducibilità e il parametro alcalinità, quest'ultimo correlato anche all'ammoniaca.

Come specificato negli obiettivi di questo elaborato allo stato attuale non esiste una sistema economico e affidabile in grado di dare delle informazioni dirette sulla concentrazione di ammoniaca all'interno di matrici come gli effluenti della digestione anaerobica. Un'alternativa potrebbe essere quella dell'installazione di un sistema di sonde in grado di acquisire segnali indiretti che opportunamente elaborati dovrebbero dare delle informazioni sulla concentrazione di ammoniaca nel refluo (Spagni et al., 2001; Provolo et al. 2007). Diversi autori hanno dimostrato che la conducibilità potrebbe essere un segnale indiretto in grado di dare informazioni sulla concentrazione di nutrienti nei liquami (Cesar-Arturo Aceves-Lara et al., 2012).

Vengono a tal proposito esposti due grafici elaborati durante il periodo di sperimentazione di questo studio che descrivono, sia per il processo di dark fermentation (F1) che per quello di metanogenesi (F2), come questi due parametri, conducibilità e ammoniaca siano in un qualche modo correlati.

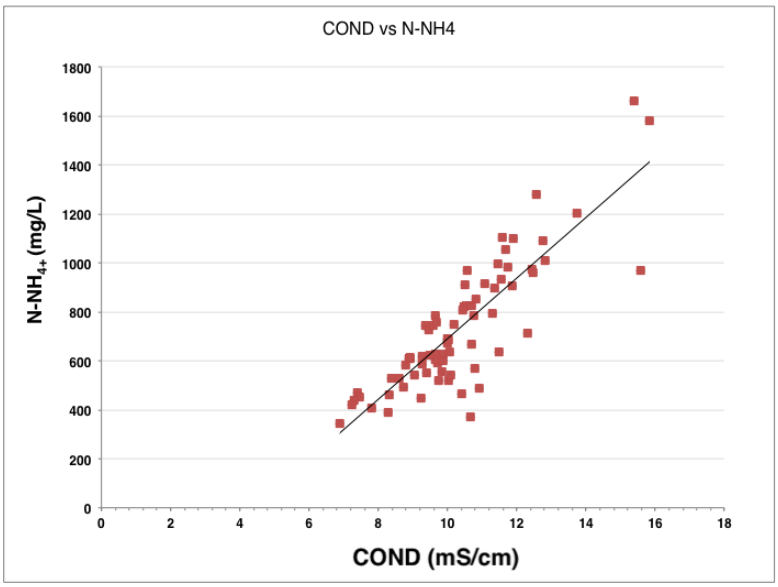


Figura 4.4: Conducibilità in funzione dell'ammonica. Dark fermentation (F1)

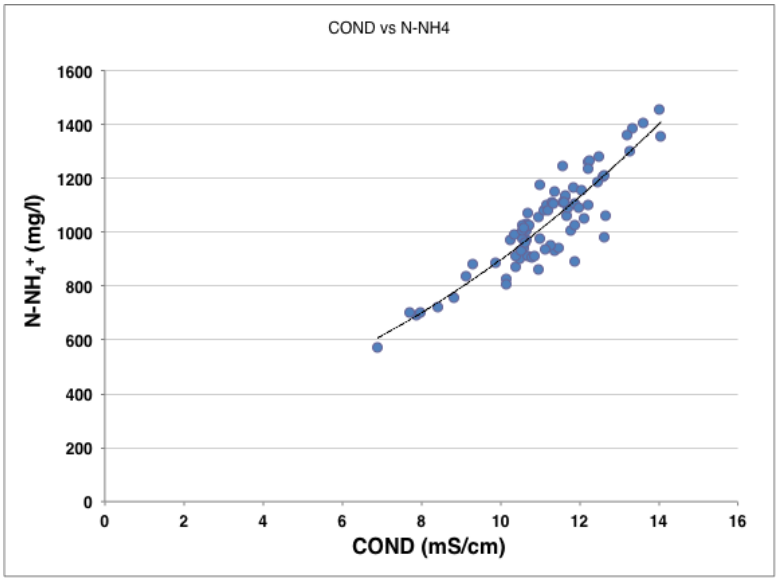


Figura 4.5: Conducibilità in funzione dell'ammonica. Metanogenesi (F2)

Questi due grafici fanno notare come potrebbe esserci una relazione lineare che collega i due parametri, rispettivamente ammoniaca e conducibilità elettrica, sia nel processo acidogenico che in quello metanogeno. Bisogna porre attenzione però al fatto che la misura della conducibilità è una misura aspecifica, ovvero può dipendere da diversi parametri che si relazionano tra loro all'interno del mixed liquor. Quindi la relazione non è detto che sia direttamente collegabile solamente a questi due parametri con un metodo lineare semplice.
Si è cercato così di evidenziare quelli che potrebbero essere gli altri parametri che influenzano la conducibilità misurata on-line nei due reattori.

L'alcalinità è un parametro che sembra essere annesso alla conducibilità. Le figure 4.6 e 4.7 esplicano la correlazione possibile tra alcalinità totale e conducibilità.

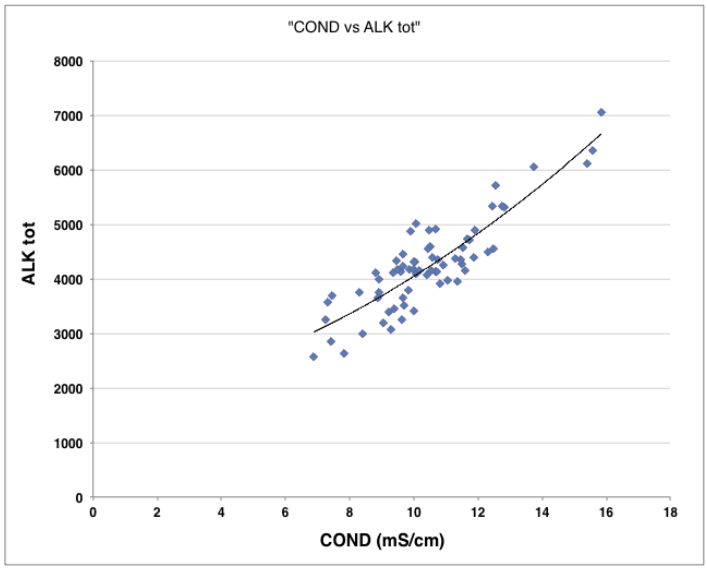


Figura 4.6: Conducibilità in funzione dell'alcalinità. Dark fermentation (F1)

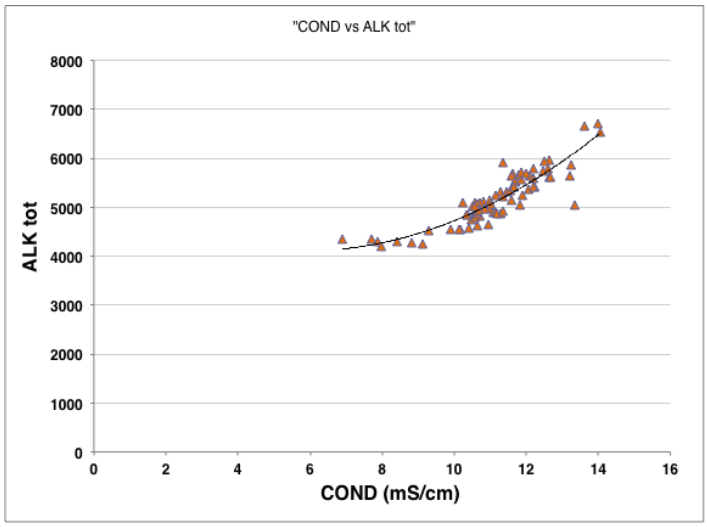


Figura 4.7: Conducibilità in funzione dell'alcalinità. Metanogenesi (F2)

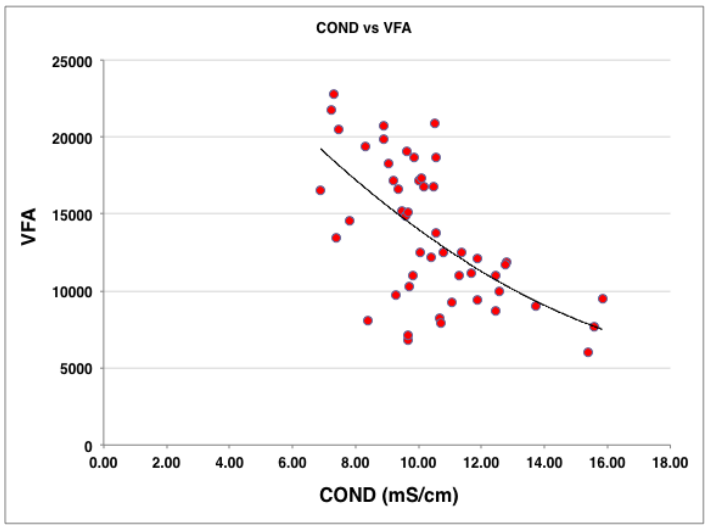


Figura 4.8: Conducibilità in funzione dei VFAs. Dark fermentation (F1)

Per i VFA è stato visto che si assiste ad un loro decremento quando l'ammoniaca raggiunge un livello critico alto (ricollegandosi alla letteratura di B. Salerno et al., 2006; C.Cavinato et al., 2012), lo si evince poiché alta coducibilità sta ad indicare un incremento dell'ammoniaca (figura 4.4).

Elevati livelli di ammoniaca corrispondono a cambi di pH intracellulari, che richiedono una spesa energetica più alta. Ciò porta ad una deplezione di potassio intracellulare e all'inibizione di specifici enzimi di reazione (Wittmann et al., 1995; C.Gallert et al., 1998).

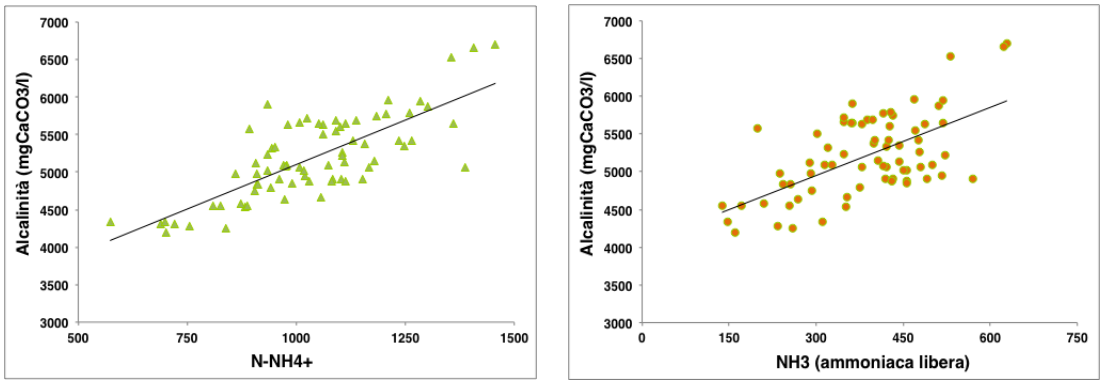


Figure 4.9 – 4.10: Alcalinità in funzione dell'azoto ammoniacale e dell'ammoniaca libera. (F2)

Le due figure (4.9 – 4.10), delineano come nel reattore F2 l'alcalinità effettivamente sia correlata all'ammoniaca. A variazioni di concentrazione di ammoniaca susseguono cambiamenti della quantità di alcalinità totale.

Quest'ultima è connessa sia al parametro azoto ammoniacale che al parametro ammoniaca libera.

Il flusso di ricircolo ha un potere tamponante dovuto alla sua alcalinità, ma è costituito anche da sali d'ammonio (a sua volta correlati con il parametro conducibilità figura 4.5).

L'ammoniaca, come già evidenziato in precedenza, è il parametro che dev'essere tenuto sotto controllo costante in modo da non inibire il processo.

Probabilmente dunque la conducibilità potrebbe essere il parametro aspecifico che permette di leggere il quantitativo di azoto ammoniacale che è presente in un determinato flusso di ricircolo.

I campioni prelevati giornalmente e utilizzati nell'approccio chemiometrico sono 171, ciascuno dei quali è rappresentato da 6 variabili che descrivono appunto i campioni. Come prima cosa sono stati autoscalati, poiché le variabili che descrivono gli oggetti possiedono scale di misura differenti e bisogna renderli confrontabili tra loro, in modo che abbiano la stessa importanza, massimizzandone cioè la confrontabilità.

Con *autoscaling* risulta che ogni variabile abbia *media = 0* e *deviazione standard unitaria*.

È stata così calcolata la matrice di correlazione di Pearson, che porta a qualche informazione di seguito descritta.

Matrice di correlazione (Pearson (n))

Tabella 4.11:

Variabili	pH	VFA	ALK Tot	COND	$N\text{-}NH_4^+$	NH_3
pH	1	0.16	0.26	0.43	0.39	0.63
VFA	0.16	1	0.70	0.71	0.73	0.67
ALK Tot	0.26	0.70	1	0.87	**0.95**	0.83
COND	0.43	0.71	0.87	1	**0.94**	0.87
$N\text{-}NH_4^+$	0.39	0.73	**0.95**	**0.94**	1	0.89
NH_3	0.63	0.67	0.83	0.87	0.89	1

livello di significatività alfa 0.05

Gli indici di correlazione di Pearson tra le variabili prese a coppie sono dei coefficienti che esprimono la loro linearità tra la loro covarianza e il prodotto delle rispettive deviazioni standard. Tali indici sono stati definiti con la covarianza delle due variabili divisa per il prodotto delle loro deviazioni standard. I coefficienti come si può notare assumono valori compresi tra -1 e 1. Se due variabili (si veda la matrice) hanno il loro indice di Pearson > 0, ciò indica che esse sono *correlate* positivamente, viceversa se < 0, correlate negativamente o *inversamente correlate*. Più L'indice di P. si avvicina al valore 0 più le variabili della coppia presa in considerazione saranno *incorrelate*.

Se ne evince dalla tabella 4.11 come azoto ammoniacale e conducibilità presentino una forte correlazione (0.94), non solo, la conducibilità è correlata fortemente ad altri parametri, così come precedentemente supposto e analizzato in questo studio. Anche l'ammoniaca e l'alcalinità sono fortemente correlate (0.95). Questi sono tutti dati che rafforzano i concetti espressi lungo questa sperimentazione.

Analisi componenti principali

La tecnica utilizzata serve per una semplificazione dei dati utilizzati nell'ambito della statistica multivariata. Lo scopo primario è la riduzione del numero delle variabili (che rappresentano le caratteristiche del fenomeno osservato) in alcune variabili latenti.

Tabella e figura 4.12
Analisi in Componenti Principali:

Autovalori:

	t1	t2	t3	t4	t5	t6
Autovalore	4.5	1.0	0.3	0.1	0.1	0.0
Varianza (%)	**74.7**	**15.9**	5.8	2.0	1.2	0.5
% cumulata	74.7	**90.6**	96.4	98.3	99.5	100

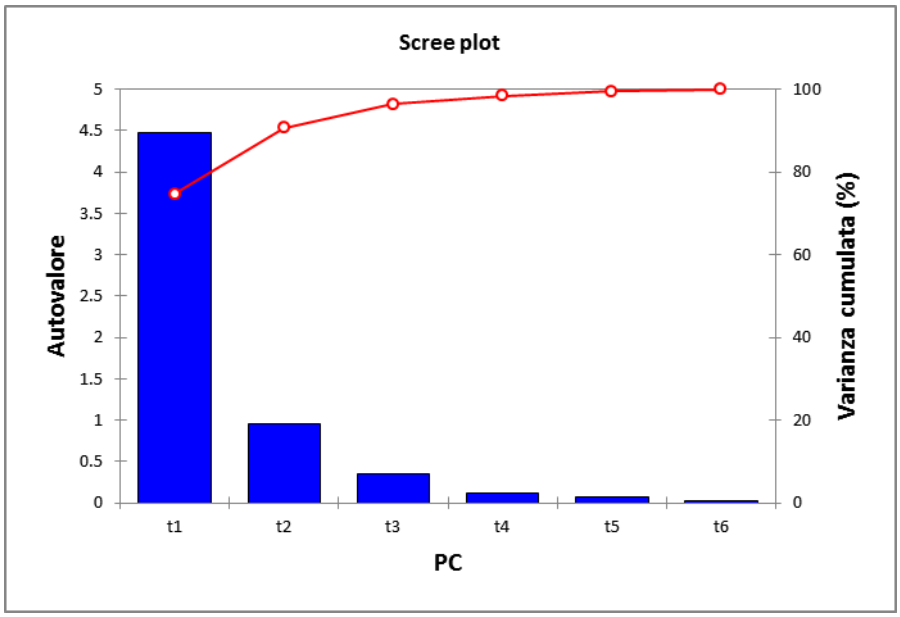


Figura 4.13: loading plot

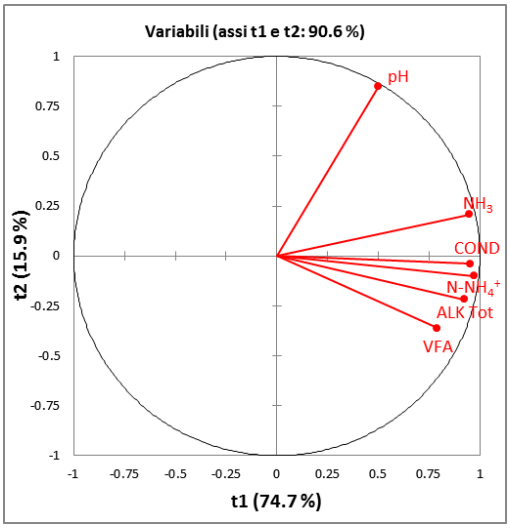
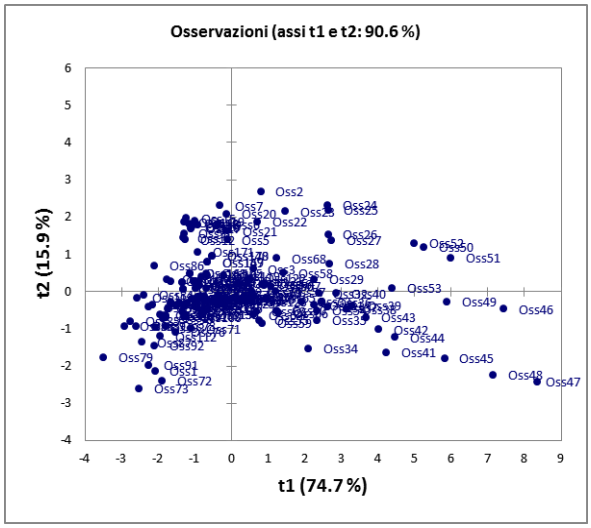


Figura 4.14: score plot



Come si può notare è avvenuta una trasformazione lineare delle variabili che proietta quelle originarie in un nuovo sistema cartesiano nel quale la maggiore varianza viene proiettata sul primo asse e la variabile nuova, seconda per dimensione della varianza, sul secondo asse. Sono state analizzate le prime due componenti principali e le variabili in funzione di esse, figura 4.13 loading plot.

Gli stessi dati hanno determinato i vettori di trasformazione. Nel loading plot le variabili X sono riportate nel nuovo sistema avente per assi le componenti principali. In figura 4.13 è possibile osservare se due variabili sono simili (e per tanto forniscono la stessa tipologia di informazione), oppure distanti.

Se ne evince che conducibilità e azoto ammoniacale siano molto rappresentate dalla prima componente dunque possano fornire informazioni simili. Così anche alcalinità e ammoniaca libera, pesano nella prima PC, i VFA solo in parte dipendono anche dalla seconda, ciò significa che anch'essi possono rispetto ad es. alla conducibilità influire sulla misura di quest'ultima.

Meno il pH, che pesa principalmente sulla seconda componente principale.

Nello score plot (figura 4.14) si osservano le rappresentazioni dei campioni (osservazioni) nei nuovi assi cartesiani costituiti dalle prime due componenti principali (il nuovo spazio vettoriale). Mediante questo grafico le rappresentazioni degli oggetti sono la maggior parte riuniti, da questo se ne può estrapolare le loro condizioni di pseudo-stabilità nel tempo, questo caso di studio a rapporto di ricircolo variabile. Le rappresentazioni degli oggetti che

si dissociano dalla massa significa che, rispetto al processo e al suo sviluppo, essi rappresentano condizioni di variabilità dei campioni rispetto alle variabili. Infatti se si va ad osservare cosa avvenne nel periodo che raggruppa le rappresentazioni degli oggetti es. 41-48 si può osservare come i parametri (variabili) ammoniaca e conducibilità fossero aumentate in quello spazio temporale di processo che corrisponde a parte del periodo in cui il rapporto di ricircolo portato a 0.5 ha portato ad un accumulo di ammoniaca nel reattore, con conseguente inibizione del processo (caso di studio precedente). L'osservazione 47, ad esempio, riportava nel periodo valori di ammoniaca a 2.9 g/l e ammoniaca libera a 1.8 g/l estremamente inibenti per il processo, con conducibilità particolarmente alta 20.1 mS/cm. Le osservazioni delle giornate 72-73 indicano come nel processo l'alcalinità e la conducibilità fossero calate nel sistema, infatti rispecchia il periodo finale dello studio antecedente, con applicato un rapporto di ricircolo a 0.25, in cui nel sistema si era ridotta notevolmente la concentrazione di ammoniaca.

PCR – Regressione lineare sulle componenti principali

È stata calcolata una regressione lineare semplice tra la componente Y dipendente $N\text{-}NH_4^+$ e la variabile *t1*, rispettivamente la prima componente principale, che spiega il 74.7% della varianza dei dati.
Il set di dati è stato diviso in *training set* e *validation set*, rispettivamente con 86 e 85 campioni selezionati esplorando il range di variazione delle variabili in modo da garantirsi che i campioni popolino in maniera omogenea lo spazio delle variabili.

L'equazione del modello monovariato è stata la seguente
$N\text{-}NH_4^+ = 1294 + 238 * t1$

I relativi coefficienti di bontà di adattamento sono stati
$R^2 = 0.94$ e $Q^2 = 0.91$

La figura 4.15 è la rappresentazione grafica del modello “validato esternamente”.

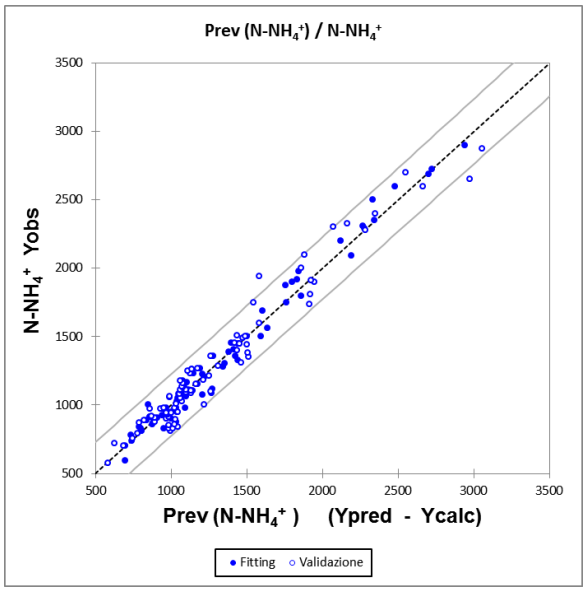


Figura 4.15: rappresentazione grafica del modello monovariato (PCR) validato esternamente

In figura 4.15 la linea tratteggiata indica i valori predetti uguali agli osservati, una retta di 45° vincolata all’origine per la quale $R^2=Q^2=1$ e $Y_{obs}=Y_{pred}(Y_{calc})$.
Si è preso inoltre in considerazione di invertire il training set con il validation set, in modo tale che venga dimostrata la caratteristica di stabilità del modello che lo renda sufficientemente indipendente dai dati particolari utilizzati per costruire (calibrare) il modello stesso (training set).
I parametri risultati sono stati
R^2 = 0.95 (coefficiente di determinazione del modello, la varianza unitaria spiegata dal modello)
Q^2 = 0.90 (la varianza unitaria spiegata dal modello in predizione)

Un buon modello deve essere allo stesso tempo predittivo e stabile. (se i parametri di predittività non cambiano molto, come in questo caso, significa anche che il training set e il validation set erano stati selezionati correttamente).
Un aumento della complessità del modello accresce sempre la qualità descrittiva dello stesso (fitting) e al contrario un non controllato aumento della complessità del modello ne può deteriorare le sue prestazioni in predizione (overfitting).

Successivamente è stata calcolata una regressione lineare multipla tra la componente Y dipendente $N\text{-}NH_4^+$ e la variabili *t1* e *t2*, rispettivamente la prima e la seconda componente principale, con varianza cumulata del 90.6%.

L'equazione del modello multivariato è stata la seguente

$N\text{-}NH_4^+ = 1294 + 238 * t1 – 55 * t2$

I relativi coefficienti di bontà di adattamento sono stati

$R^2 = 0.95$ e $Q^2 = 0.94$

Invertendo il training set di dati con il validation set si sono ottenuti

$R^2 = 0.96$ e $Q^2 = 0.94$

Il modello multivariato a 2 componenti principali ha migliorato entrambe le capacità; di calcolare sé stesso, ovvero la capacità di descrivere il complesso dei dati con cui è stato creato (fitting), e la sua capacità predittiva (validation). Si esprime la validazione grafica in figura 4.16

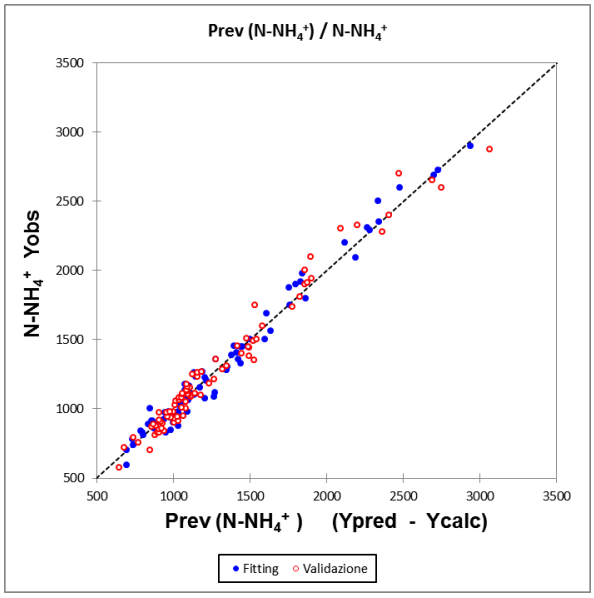


Figura 4.16: grafico del modello multivariato (PCR) validato esternamente

Si può concludere che il modello multivariato calcolato tramite regressione lineare multipla con le prime due componenti principali, ha una migliore capacità di predire i dati "esternamente" e inoltre presenta buona stabilità, poiché incrociando il training set con il validation set i coefficienti R^2 e Q^2 non sono praticamente cambiati.

Sono stati calcolati i seguenti parametri di valutazione dei metodi di regressione:

Tabella 4.13

	TRAINING SET	
RSS	**SDEC**	**R^2**
845977	99	0.96

	VALIDATION SET	
PRESS	**SDEP**	**Q^2**
1128862	114	0.94

Il parametro RSS rappresenta la bontà del fitting ed esso viene utilizzato per il calcolo di R^2.

Il parametro PRESS è l'errore totale commesso in predizione e serve per il calcolo dealla varianza unitaria spiegata dal modello in predizione, Q^2.

Lo SDEP è un parametro molto importante poiché stima, in maniera dimensionalmente corretta, l'errore del modello in predizione, ovvero di "quanto può sbagliare" il modello nell'andare a predire valori della risposta Y degli oggetti della classe la cui risposta non sia nota. I valori Y_{pred} saranno dunque accompagnati dal parametro ± SDEP, ad indicare l'incertezza (media) della predizione. Nel nostro caso un' incertezza di 114 (ovvero 114 mg/l N-NH_4^+) è da considerarsi un buon risultato, sebbene l'incertezza nella misura tra i valori calcolati (osservati) in laboratorio è risultata essere circa ± 86 mg/l N-NH_4^+.

Regressione lineare semplice

Si è voluto successivamente calcolare una regressione lineare semplice tra il parametro ammoniaca Y e il parametro conducibilità, per capire a livello locale la predittività dell'equazione risultante.

N-NH_4^+ = - 1170 + 205 * COND

Anche le predizioni di questa equazione sono state calcolate e predette tramite training set e validation set, con validazione esterna e successivamente invertiti i set.

I risultati sono stati i seguenti:

$R^2 = 0.84$ $R^2 = 0.83$

$Q^2 = 0.80$ $Q^2 = 0.78$

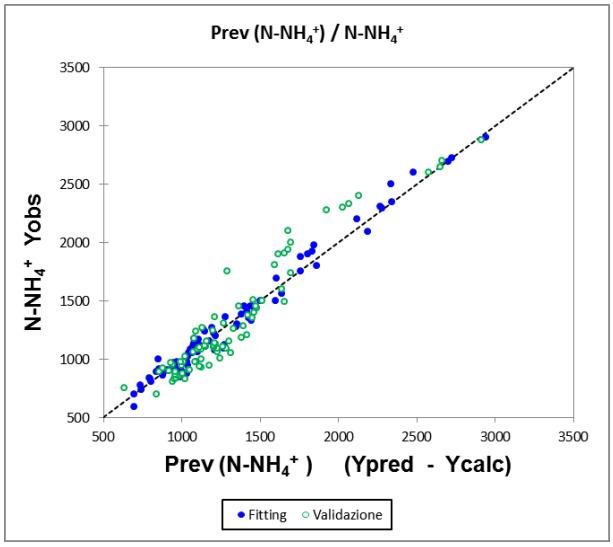


Figura 4.17: rappresentazione grafica del modello monovariato da regressione lineare semplice tra ammoniaca e conducibilità

Il modello è risultato stabile a perturbazione, dopo aver invertito il training set e il validation set constatando che i parametri di predittività non sono variati di molto, sebbene la predittività stessa non sia del tutto convincente.

Per un futuro approccio all'automazione del processo si è pensato di uscire dalla prassi statistica, da quelli che sono gli step chemiometrici di utilizzo della PCA e PCR, bypassando le stesse, e si è cercato di elaborare una regressione lineare multipla tra alcuni parametri coinvolti nella misura della conducibilità, come già spiegato in questo studio. Questo per cercare di giungere ad un algoritmo di calcolo che potrebbe essere utilizzato e testato nella realtà (locale), che sfrutti dei predittori che abbiano la possibilità di essere utilizzati poiché parametri ipoteticamente provenienti dal segnale di sonde di analisi all'interno dei reattori stessi.

In particolare il seguente algoritmo di calcolo porta come variabile dipendente l'azoto ammoniacale e come predittori conducibilità, VFA e alcalinità.

Il modello ha riportato la seguente equazione

$N\text{-}NH_4^+ = - 697 + 0.014 * (VFA) + 0.135 * (ALK\ tot) + 92.7 * (COND)$

I valori delle varianze unitarie spiegate del modello nel ricalcolare sé stesso e in predizione (vengono rappresentati anche le varianze a training e validation set invertiti):

$R^2 = 0.94$ $R^2 = 0.94$

$Q^2 = 0.93$ $Q^2 = 0.92$

Tabella 4.14

	TRAINING SET	
RSS	**SDEC**	**R^2**
1129807	114	0.94

	VALIDATION SET	
PRESS	**SDEP**	**Q^2**
1128862	116	0.93

È interessante notare come il modello sembri stabile e con una buona predizione, a tal proposito si è elaborato un grafico nel tempo della progressione dell'azoto ammoniacale osservato (reale) in rapporto con quello predetto da quest'ultima equazione del modello multivariato.

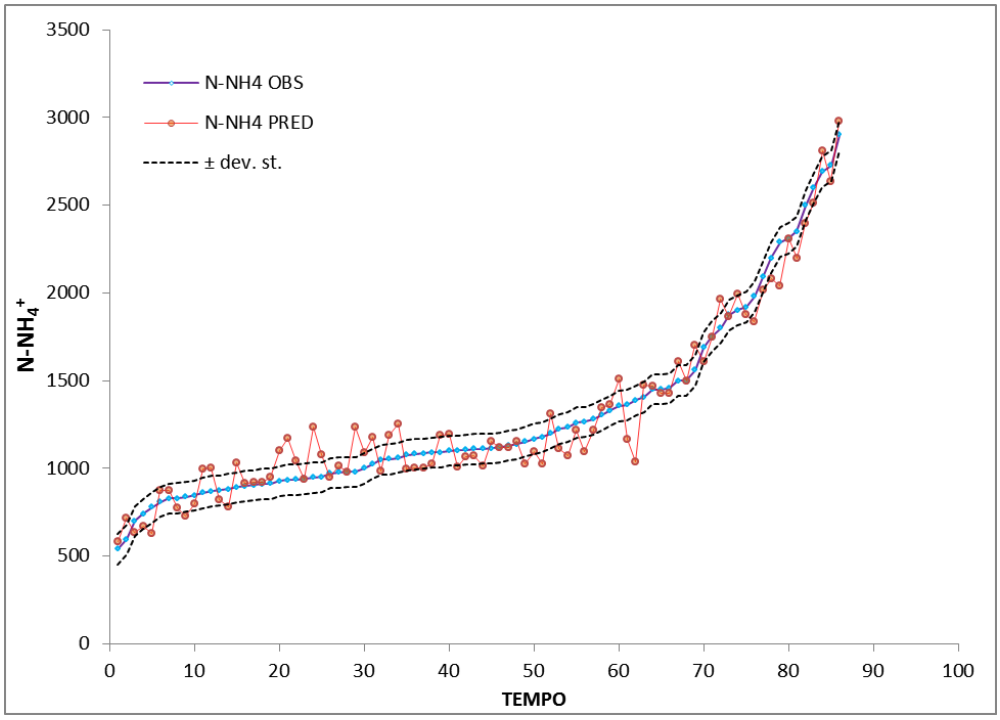


Figura 4.18: rappresentazione grafica della predittività del modello multivariato in relazione con i valori reali di azoto ammoniacale

Le predizioni attraverso quest'ultimo modello rapportati ai valori osservati (reali) risulta diverse volte (per questo set di dati omogeneo) al di fuori dell'incertezza della misura dei dati osservati (dev.st.).

Capitolo 5

Analisi Microbiologica - FISH

Le analisi FISH sono state eseguite per studiare l'attività della popolazione Archaea nel primo e nel secondo reattore. La biomassa microbica è stata fissata con 4% di soluzione di paraformaldeide ed utilizzata per l'analisi FISH (Daims et al., 2005). Le sonde oligonucleotidiche utilizzate per le popolazioni di Archaea (ARC915), Methanosaetaceae (MX825), Methanosarcinaceae (MS1414) Methanobacteriaceae (MB1174) Methanomicrobiales (MG1200) Methanococcales (MC1109) secondo la rigorosità di ibridazione e scelte sulla base di Banks et al. (2012).

Come si è visto l'aumento dei VFA è dovuto principalmente all'accumulo dell'acido propionico, lo squilibrio della catena trofica anaerobica osservato può essere collegato all'effetto inibente dell'ammoniaca libera (unionized ammonia o free ammonia) sulla produzione di metano da idrogeno e CO_2, che è la via principale di formazione del metano in condizioni termofile (Banks et al., 2012) come verrà confermato dai seguenti risultati delle analisi microbiologiche.

Il cambio giornaliero del rapporto di flusso di ricircolo è stata effettuato allo scopo di mantenere la concentrazione di ammoniaca di sotto del valore critico e garantire al tempo stesso una sufficiente quantità di alcalinità nel reattore di dark fermentation.

Ricordando che l'ammoniaca libera dipende dalla concentrazione di azoto ammoniacale, dal pH e dalla temperatura.

Questa strategia ha portato ad un comportamento stabile di entrambi i reattori, raggiungendo una produzione media di gas totale di 0,60 m^3/kgTVS con una percentuale (V/V) di CH_4, H_2 e CO_2 del 53%, 7% e 39%, rispettivamente. Dopo il riavvio dell'operazione di alimentazione, questo caso di studio, il biogas prodotto dal reattore di DF ha mostrato una leggera diminuzione media del contenuto di idrogeno. Al tempo stesso è stata osservata un aumento della concentrazione di metano (15-20%). Questo aspetto può essere collegato con l'aumento del tempo di ritenzione per

l'arresto delle operazioni di alimentazione che valorizza la crescita di microrganismi metanogeni. L'attività biologica di batteri metanogeni nel primo reattore è stata confermata dall'analisi FISH che ha mostrato risultati positivi ottenuti con Archaea sonda di corrispondenza e Methanosarcina spp.

Durante questo periodo inoltre, il digestato della fase metanogenica ha mostrato una comunità microbica composta da membri delle famiglie Methanomicrobiacea & Metahnospirillacea e Methanosarcinales (M. mazei ceppo Goe1 tramite identificazione DGGE). Proprio come volevasi dimostrare metanogeni idrogenotrofi (Methanomicrobiacea & Metahnospirillacea idrogenotrofi. Methanosarcinales acetoclasti e idrogenotrofi) . (Wassila Laloui-Carpentier et. Al., 2006)

5.1 Osservazione in epifluorescenza

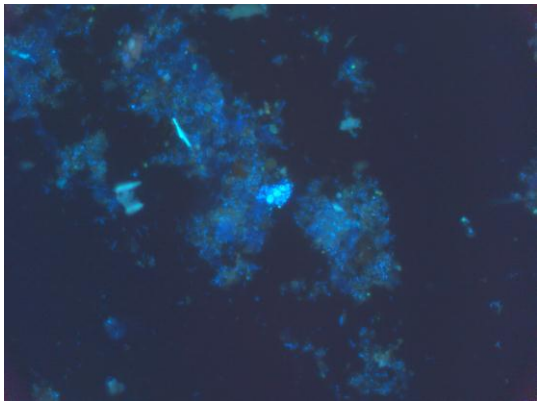
Analisi delle popolazioni microbiche mediante FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*)

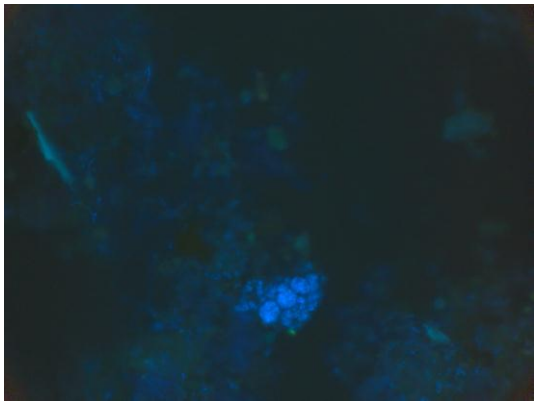
Foto 5.1:

Sonda: DAPI (presenza di organismi cellulari) colore azzurro/blu

Immagine: zoom ottico 40x e 100x

Sample: Reattore F1





Presenza di organismi cellulari identificabili come minuscole fluorescenze e un elemento centrale a grappolo.

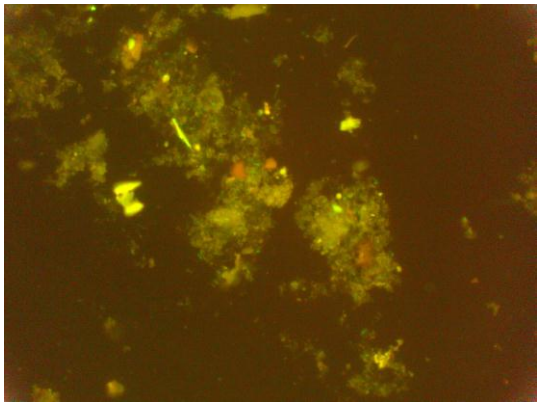
Il colore della sonda DAPI, perché si possa ritenere positivo (presenza di organismi cellulari), deve risultare di un colore azzurro/blu acceso.

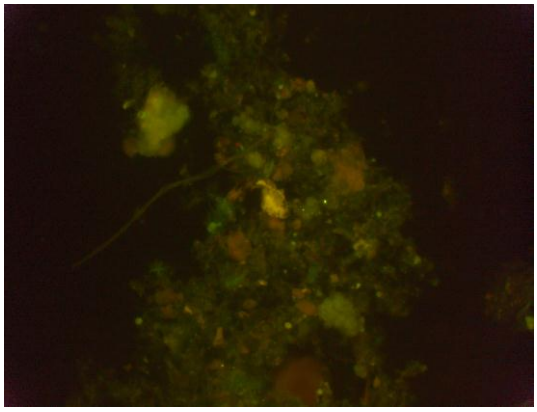
Foto 5.2:

Sonda: EUB (Batteri) colore fluorescenza Verde

Immagine: zoom ottico 40x

Sample: Reattore F1





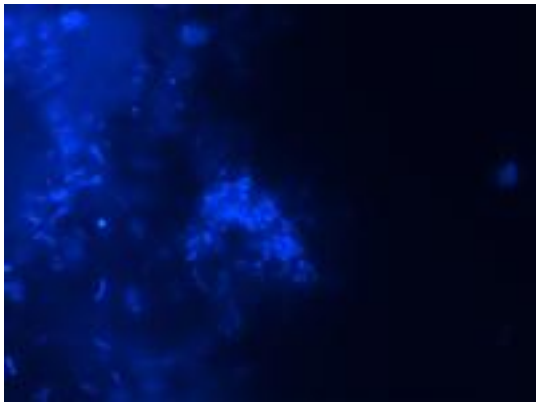
Il campione è molto eterogeneo e di difficile lettura, si constata però che vi è la presenza di batteri identificabili come puntini di colore verde acceso.

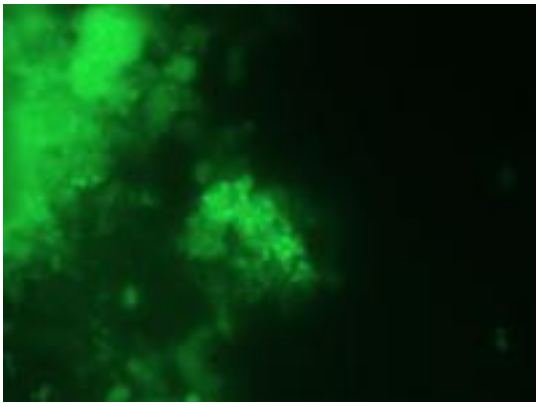
Foto 5.3:

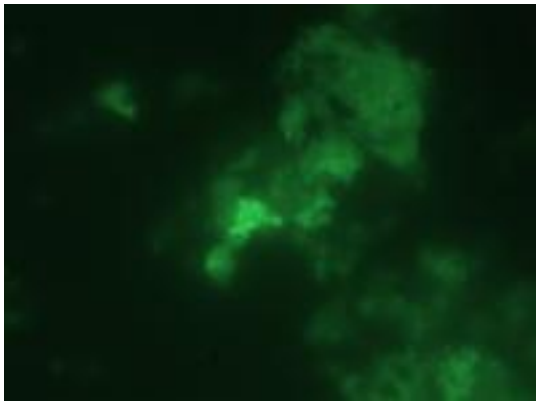
Sonda: EUB (Batteri) colore fluorescenza Verde & DAPI (presenza di organismi cellulari) colore azzurro/blu

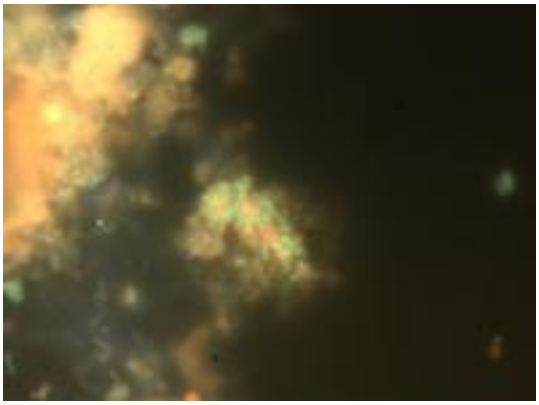
Immagine: zoom ottico 100x

Sample: Effluente Reattore F1









Nelle seguenti foto si evince la presenza di batteri grazie alla sonda generica EUB nel reattore di dark fermentation, l'ultima foto in particolare utilizza un filtro BGR che permette di far risaltare con chiarezza la presenza di batteri di color verde acceso.

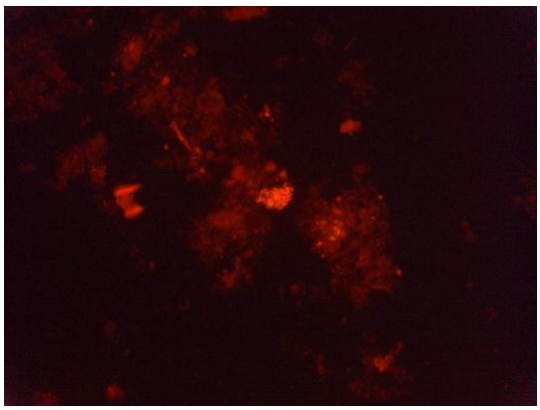
Foto 5.4:

Sonda: ARC915 (Archaea) colore fluorescenza Rosso

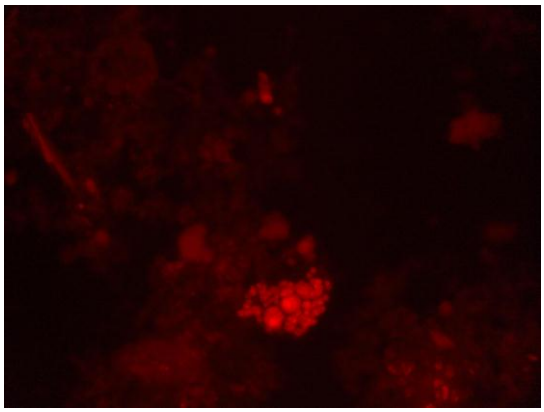
Immagine: zoom ottico 40x

Sample: Effluente Reattore F1

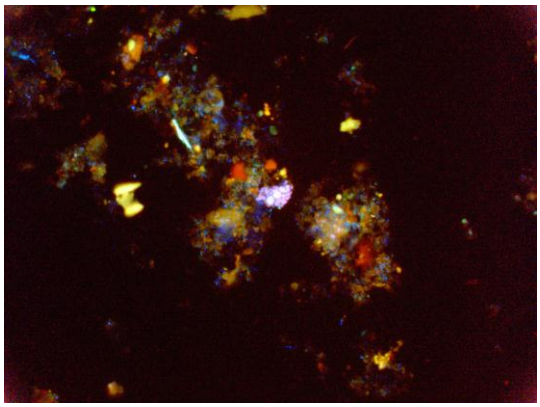
A

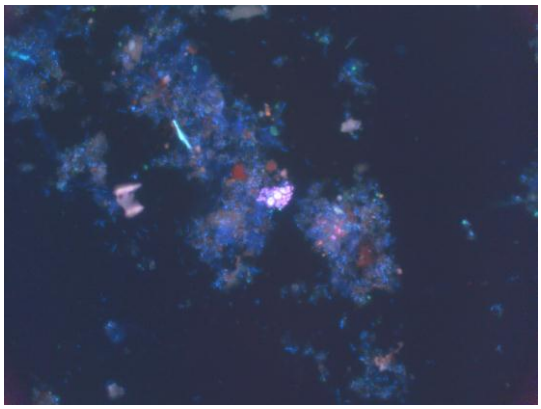


B



C **D**





Archaea identificabile come grappolo al centro delle prime due immagini di colore rosso acceso.

Le foto 5.4 C e D sono state elaborate sormontando due o più layers.
Utilizzo di photoshop Overlay + Screen efx.
Sonda: EUB + ARC915
Immagine: zoom ottico 40x / Overlay + Screen
L'immagine 5.4 C rappresenta un overlay delle foto (5.1, 5.2 e 5.4 A).
DAPI + EUB + ARC915. Photoshop – Overlay + Screen.
L'archaea in primo piano è ben visibile dato l'overlay screen dei colori Azzurro (DAPI) e Rosso (ARC915), il colore risultante è infatti un ROSA-VIOLA acceso. Nettamente distinto dai Batteri di un Verde vivace, dopo esser stati accostati per overlay, somma di tonalità Azzurro (DAPI) e Verde (EUB).
L'immagine risulta interessante poiché si può scartare tutto il rumore di fondo causato dall'eterogeneità del campione, es. i colori Giallo, Marrone, Rosso e Arancio.

Sonda: DAPI + ARC915
Immagine: zoom ottico 40x / Overlay + Screen Light
L'immagine 5.4 D riporta l'overlay delle foto con sonda ARC915 e DAPI.
L'Archaea centrale ha assunto infatti il colore Rosa-Viola acceso e chiaramente i batteri sono rimasti del loro colore originario, quello del DAPI (Blu, organismi cellulari).

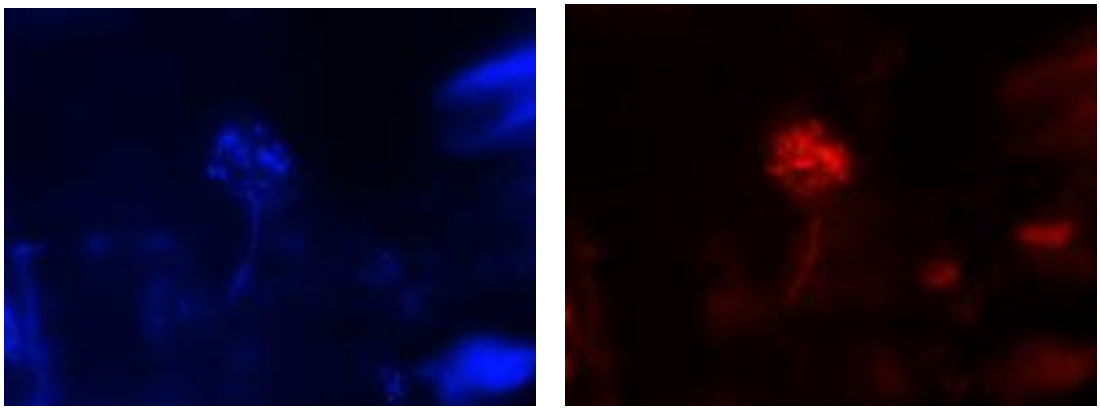
Identificata la presenza di Archaea nel primo reattore di dark fermentation si è voluto utilizzare sonde più specifiche per verificare quali genere o famiglie di Archaea fossero presente nel suddetto reattore e anche nell'effluente della seconda fase, quella metanigena.

Foto 5.5:

Sonda: MS1414 (Methanosarcinaceae) + DAPI

Immagine: zoom ottico 100X

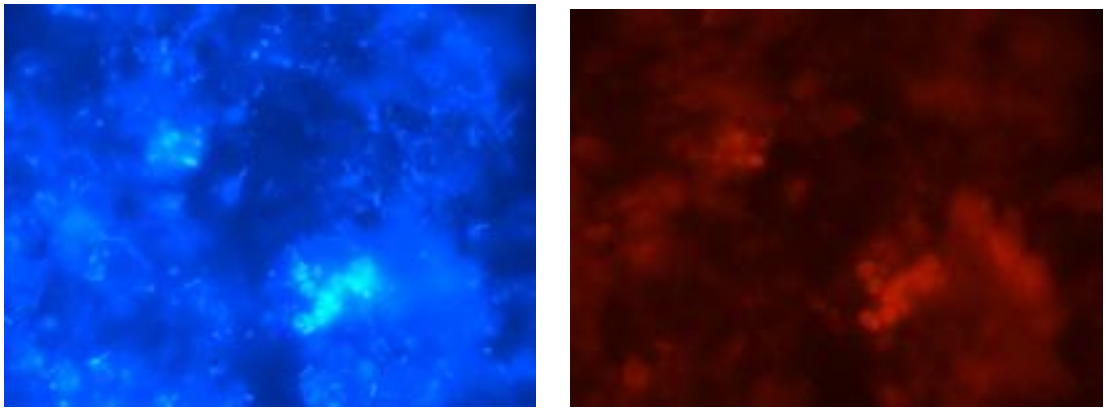
Sample: Reattore F1



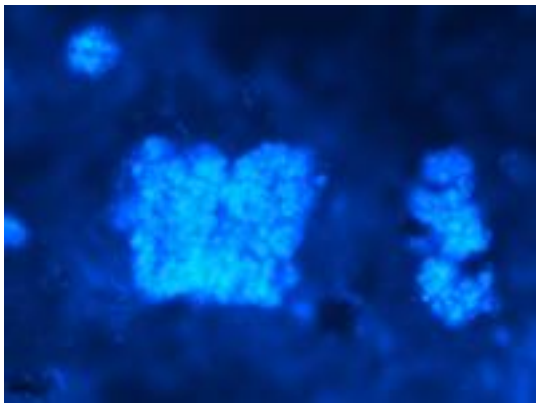
Grazie a questa foto si riesce ad identificare il ceppo Archaea della famiglia delle Methanosarcinaceae con l'utilizzo della sonda MS1414.

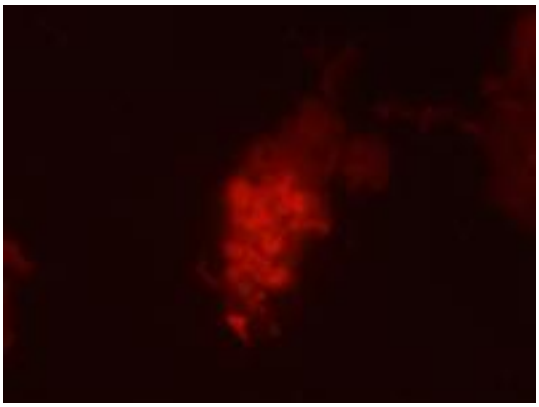
Foto 5.6:

A **B**



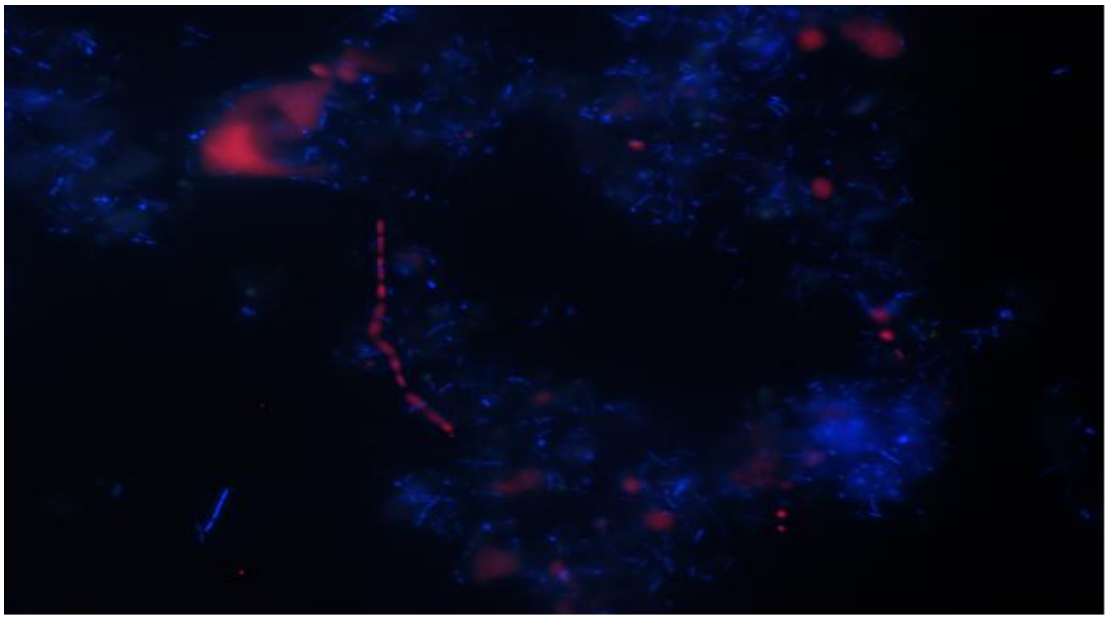
C **D**





zoom ottico 100x permette di vedere la struttura cellulare degli archaea presenti nel reattore dark fermentation F1 (A – B) e F2 (C – D)

Figura Daime 5.1:



La figura Daime 5.1 mostra la percentuale di Archaea è di circa il 10% dei microrganismi attivi totali. Per calcolare la % dei microrganismi all'interno dei campioni è stato usato il Daime software. Il software ottiene la percentuale in funzione del colore della luminosità dei microrganismi.

Lla sonda EUB338mix ha mostrato una percentuale batterica circa 80-85% e una piccola quantità (circa il 10-15%) della popolazione archaea.

La famiglia Methanosaetaceae sembra essere la più importante popolazione nelle immagini che hanno riscontrato archaea, che mostra un aspetto sottile. Questa famiglia è di tipo idrogenotrofo.

Foto 5.7:

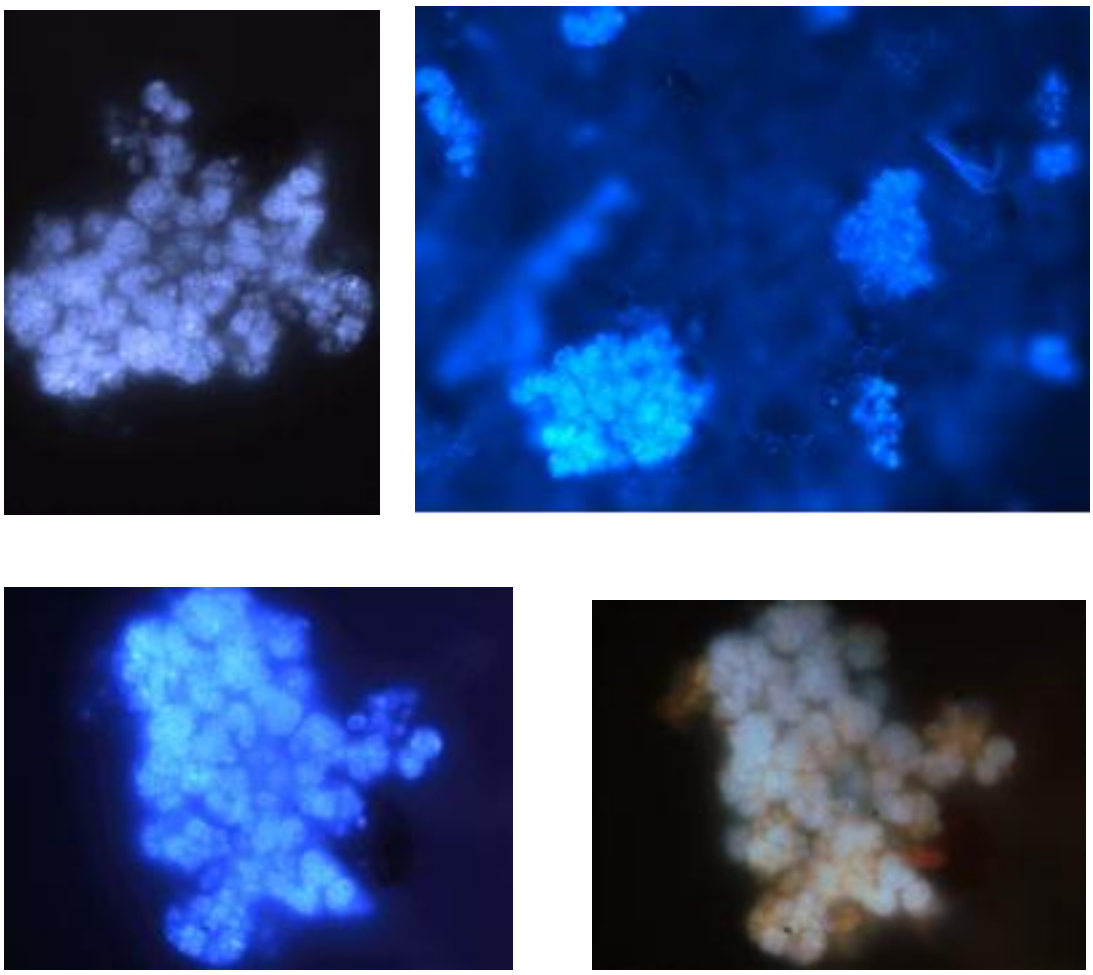
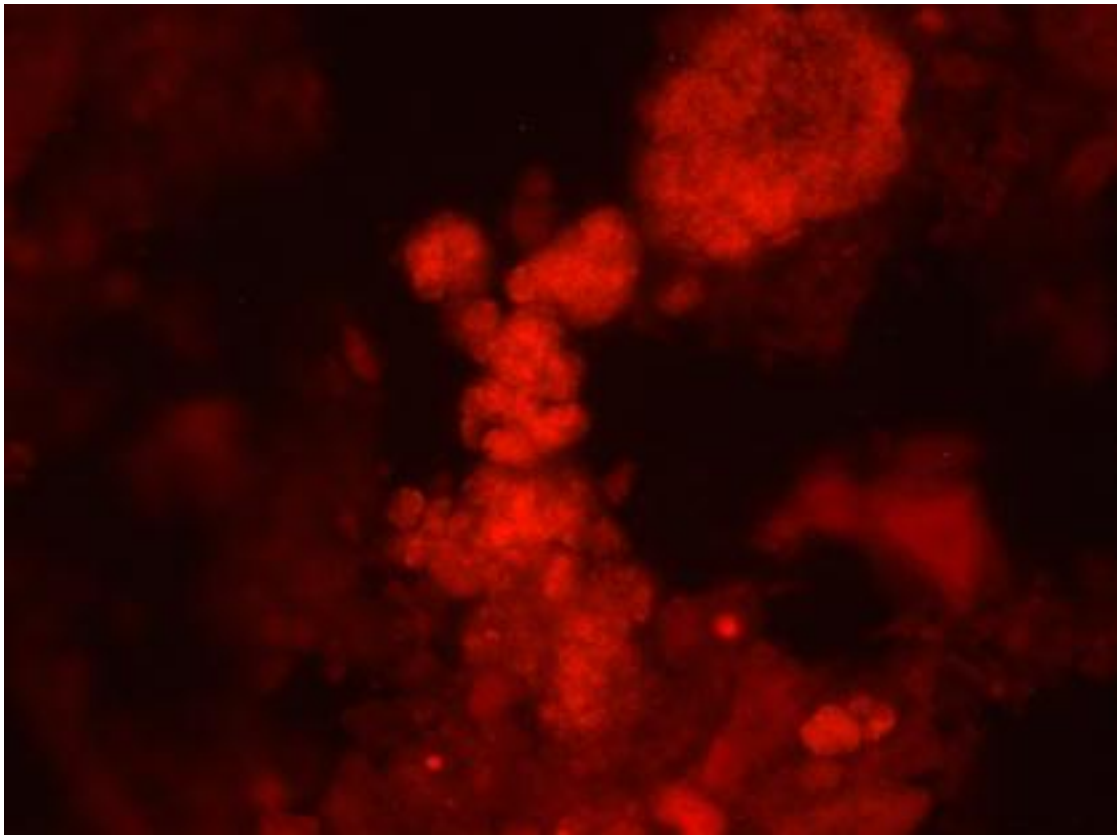


Foto proveniente dall' effluente di metanogenesi attraverso il DAPI e uno zoom 100x si riconoscono le caratteristiche forme degli Archaea Methanosarcinae, Methanomicrobiacea & Metahnospirillacea.

Il successivo utilizzo delle sonde MS1414 e MG1200 ha riscontrato la presenza di queste famiglie nell'effluente del secondo reattore.

Foto 5.8:



Questa foto è stata scattata con un ingrandimento 100X su un campione di effluente del reattore F2, di metanogenesi.

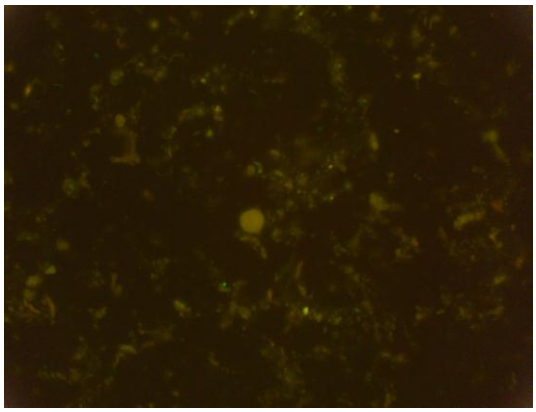
La sonda utilizzata è MG1200 corrisponendente alle famiglie Methanomicrobiacea & Metahnospirillacea.

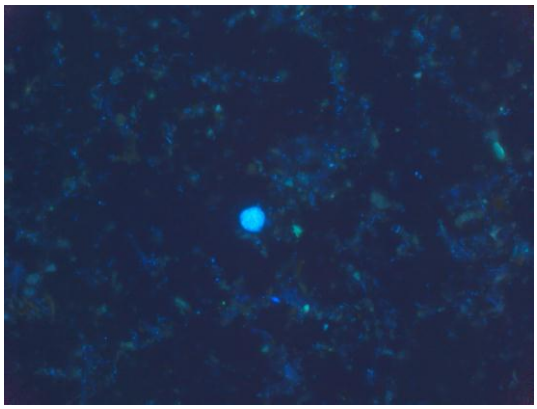
Attraverso un'analisi attenta della letteratura si evince che questa famiglia sia di tipo termofilo idrogenotrofo. Come volevasi dimostrare la presenza di Archaea metanogeni che utilizzano l'idrogeno per la produzione di metano sono le famiglie predominanti in termofilia.

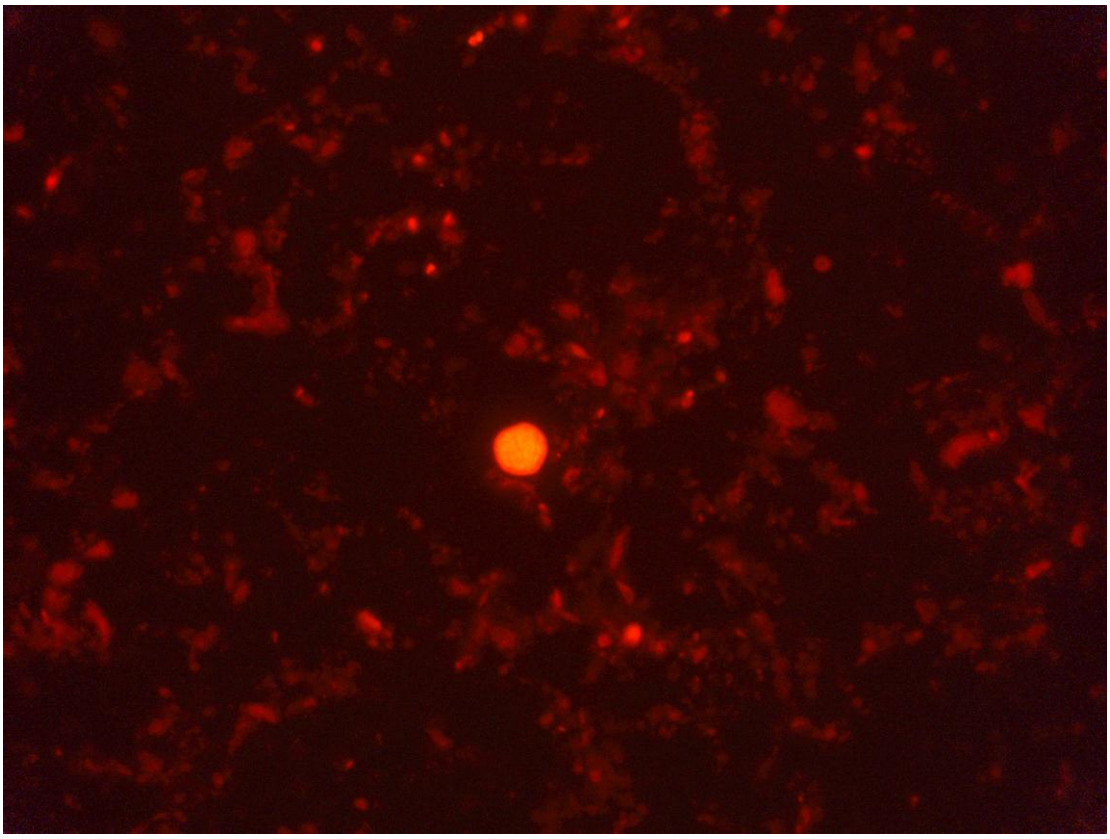
Inoltre nel reattore di dark fermentation il blocco nell'alimentazione per manutenzione avvenuto precedentemente a questo studio ha portato alla crescita di Methanosarcinae che sono state in grado di acclimatarsi a condizioni sfavorevoli di acidogenesi e a proliferarsi. La produzione di metano nel primo reattore riscontrata e la sonda MS1414 nel campione effluente di DF, ne confermano la presenza di questi microrganismi metnogeni idrogenotrofi.

Le successive foto 5.9 mostrano con chiarezza come la sonda DAPI rispecchi la presenza di microrganismi viventi (blu), la sonda EUB non riporti la presenza di batteri (Verde a fluorescenza non evidente), bensì la sonda MS1414 riscontri la presenza di un complesso Archeae della famiglia delle Methanosarcinae (Rosso fluorescenza accesa).

Foto 5.9:







Conclusioni

Questo studio, condotto in reattori pilota di grossa taglia quindi in condizioni fluidodinamiche assolutamente comparabili a quelle dei reattori in piena scala, ha permesso di constatare che l'utilizzo come mezzo tampone del ricircolo dell'effluente liquido del reattore di metanogenesi in quello adibito alla produzione di idrogeno (dark fermentation), è un'ottima strategia per migliorare la produzione di biohythane basata su un approccio di digestione anaerobica a doppia fase. L'applicazione del ricircolo infatti ha consentito di rendere il processo continuativo e stabile per un lungo periodo di esercizio senza dover ricorrere a costosi interventi esterni per creare le condizioni ottimali di processo. Mediante il controllo giornaliero della portata di ricircolo è stato possibile mantenere il pH del reattore della dark fermentation in un intervallo ottimale per il corretto svolgimento delle reazioni catalizzate dalle idrogenasi.

La possibilità dell'insorgere di fenomeni di inibizione dovuta all'applicazione del ricircolo legati all'accumulo di ammoniaca (parametro non direttamente misurabile on line), porta alla necessità di dover controllare automaticamente tale flusso in riferimento all'andamento giornaliero di alcuni parametri chiave. Quindi per dare il via ad un possibile controllo automatico dell'intero processo, il quale verrà sviluppato in una futura ricerca, sono stati elaborati dei modelli in grado di predire la concentrazione di ammoniaca tramite la misura in linea di parametri facilmente quantificabili attraverso l'impiego di sonde a basso costo dotate di alto grado di robustezza analitica.
Basandosi su evidenze ritrovate nella letteratura del settore, i modelli elaborati si sono basati su uno studio statistico per valutare la fattibilità dell'utilizzo della conducibilità come parametro chiave di controllo del processo. Si sottolinea la necessità che tali modelli debbano essere implementati lasciando spazio a sviluppi futuri.
Inoltre, oltre alla presenza dominante di microrganismi idrogeno produttori nel reattore della dark fermentation, le indagini microbiologiche hanno confermato la presenza di Archaea appartenenti alla famiglia delle Methanosarcinaceae i

quali si sono riusciti ad acclimatare all'interno del reattore fermentativo generando così una presenza costante e continua di metano nel gas in uscita dalla prima fase del processo. Nonostante ciò, le rese di produzione di idrogeno ottenute (SHP medio 0.06 m^3/kgTVS) sono state ottime e del tutto paragonabili a casi in letteratura in cui sono stati condotti degli interventi di controllo esterno al processo. La composizione media della miscela gassosa totale prodotta (7% H_2, 53% CH_4, 39% CO_2), è stata tale da rendere la sua applicazione interessante da diversi punti di vista ambientali e industriali. Nella seconda fase di metanogenesi è stato stabilito che il pathway metabolico predominante in condizioni termofile è quello che porta alla formazione di metano a partire da H_2 e CO_2, poiché sono stati identificati le classi appartenenti alle famiglie di Methanomicrobiaceae, Methanospirillaceae, Methanosaetaceae e in parte Methanosarcinaceae. Queste specie microbiche appartenenti al dominio Archeae sono tutte caratterizzate da un metabolismo idrogenotrofo il quale è particolarmente sensibile, poiché risulta essere inibito quando l'ammoniaca nella sua forma libera raggiunge determinate concentrazioni. Questo aspetto conferma ulteriormente la necessità di controllare in modo appropriato e tempestivo il parametro ammoniaca all'interno dei reattori se si vuole raggiugere delle elevate rese di biohythane.

Glossario

COD = *Chemical Oxygen Demand*, richiesta chimica di ossigeno (mgO2/l o mgCOD/l)
CSTR = *Continuosly Stirred Tank Reactor*, reattore miscelato continuamente
FORSU = Frazione Organica dei Rifiuti Solidi Urbani
GPR = *Biogas Production Rate*, velocità di produzione di biogas (m3biogas/(m3reattore giorno))
HRT = H*ydraulic Retention Time*, tempo di ritenzione idraulico (giorni)
OLR = O*rganic Loading Rate*, carico organico volumetrico (kgsubstrato alimentato/(m3reattore giorno))
Ptot = fosforo totale (mg/gTS o mg/l)
SGP = *Specific Biogas Production*, produzione specifica di biogas (m3biogas / kgsubstrato alimentato)
TKN = *Total Kjiendhal Nitrogen*, azoto totale con metodo Kjiendhal (mg/gTS o mg/l)
TS = *Total Solids*, solidi totali (g/kg)
TVS = *Total Volatile Solids*, solidi volatili totali (g/kg)
VFA = *Volatile Fatty Acids*, acidi grassi volatili (mgCOD/l o mgCH3COOH/l)

Bibliografia

A.Giuliano, D.Bolzonella, P.Pavan, C.Cavinato, F.Cecchi, 2013. Co-digestion of live stock effluents, energy crops and agro-waste: Feeding and process optimization in mesophilic and thermophilic conditions. Bioresource Technology 128 (2013) 612-618

Amann 2005. Fluorescently labelled, rRNA-targeted oligonucleotide probes in the study of microbial ecology. Molecular Ecology 1995,4,543-554

Angelidaky, I. and Aharing, B.K., 1994. Anaerobic thermophilic digestion of manure at different ammonia loads: effect of temperature digestion. Water Res. 28 (3), 727-731.

Antonopolou G., Gavala H.N., Skiadas I.V., Angelopoulos K., Lyberatos G., 2008. ―Biofuels generation from sweet sorghum: fermentative hydrogen production and anaerobic digestion of remaining biomass‖. Bioresources Technology, 99, 110 – 119

Banks, C.J., Zhang, Y., Jiang, Y., Heaven, S., 2012. Trace element requirements for stable food waste digestion at elevated ammonia concentrations. BioresourceTechnology. 104, 127–135.

C Gallert, S Bauer, J Winter - Applied microbiology and biotechnology, 1998 – Springer . Effect of ammonia on the anaerobic degradation of protein by a mesophilic and thermophilic biowaste population 0175-7598

Cavinato C., Bolzonella D., Fatone F., Cecchi F., Pavan P. (2011) Optimization of two-phase thermophilic anaerobic digestion of biowaste for bio-hythane production through reject water recirculation. Bioresource Technology, 102(18), 8605-8611

Cavinato, C., Giuliano, A., Bolzonella, D., Pavan, P., Cecchi, F., 2012. Bio-hythane production from food waste by dark fermentation coupled with anaerobic digestion process: a long-term pilot scale experience. International Journal of Hydrogen Energy. 37 517 (15), 11549–11555.

Cecchi F., Vallini G. and Mata-Alvarez J. (1990) Anaerobic digestion and composting in an integrated strategy for managing vegetable residues from agro-industries or sorted organic fraction of municipal solid waste Water Science and Technology 1990 Vol. 22 No. 9 pp. 33-41

Cesar-Arturo Aceves-Lara, Eric Latrille, T. Conte and Jean-Philippe Steyer, 2012. Online estimation of VFA, alkalinity and bicarbonate concentrations by electrical conductivity measurement during anaerobic fermentation. Water Science & Technology 65.7, IWA Publishing, pages 1283-1288

Chou C.H., Wang C.W., Huang C.C., Lay J.J., 2008. ―*Pilot study on the influence of stirring and pH on anaerobes converting high-solid organic wastes to hydrogen.*‖ International Journal of hydrogen energy. 33, 1550 – 1558.

Chu C.F., Li Y.Y., Xu K.Q., Ebie Y., Inamori Y., Kong H.N. A pH temperature phased two-stage process for hydrogen and methane production from food waste. International Journal of Hydrogen Energy 33, 4739-46.

Daims, H., Stoecker, K., Wagner, M., 2005. Fluorescence in situ hybridization for the detection of prokaryotes. In: Smith, A.M., Osborn, C.J. (Eds.), Abingdon Advanced Methods in Molecular Microbial Ecology. Bios- Garland, pp. 213–239.

Doi T, Matsumoto H, Abe J, Morita S. Feasibility study on the application of rhizosphere microflora of rice for the biohydrogen production from wasted bread. Int J Hydrogen Energy 2009;34(4):1735-43.

Gomez X., Moran A., Cuetos M.J., Sánchez ME (2006) The production of hydrogen by dark fermentation of municipal solid waste and slaughterhouse waste: a two phase process. Journal of power sources, 157, 727-732.

Guo, X. M., Trably, E., Latrille, E., Carrere, H., Steyer J.P., 2010. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. Intern. Jour. Of Hydr. Ener. 35 (2010) 10660-10673.

Hallenbeck P, Ghosh D, Skonieczny M, Yargeau V. 2009. Microbiological and engineering aspects of biohydrogen production. Indian Journal of Microbiology, 49(1), 48-59
Han S.K., Kim S.H., Kim H.W., Shin H.S. (2005) *Pilot-scale two-stage process: a combination of acidogenic hydrogenesis and methanogenesis*. Water Science & Technology, 52, 1-2, 131-138.

Hawkes F, Hussy I, Kyazze G, Dinsdale R, Hawkes D, 2007. Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress. International Journal of Hydrogen Energy, 32(2), 172-184.

IPCC – http://www.ipcc.ch/

IEA – http://www.iea.org/

ISPRA 2012. Rapporto sui rifiuti solidi urbani - http://www.isprambiente.gov.it/it

Karlsson A, Vallin L, Ejlertsson J. Effects of temperature, hydraulic retention time and hydrogen extraction rate on hydrogen production from the fermentation of food industry residues and manure. Int J Hydrogen Energy 2008; 33(3):953-62.

Kataoka N., Ayame S., Miya A., Ueno Y., Oshita N., Tsukahara K., Sawayama S., Yokota N. (2005) *Studies on hydrogen-methane fermentation process for treating garbage and waste paper*. ADSW 2005 Conference Proceedings, 2, Process Engineering.

Kim SH, Han SK, Shin HS. (2004). Feasibility of biohydrogen production by anaerobic co-digestion of food waste and sewage sludge. Int J Hydrogen Energy 2004;29(15):1607-16.

Kraemer J.T., Bagley D.M., 2007. ―Improving the yield from fermentative hydrogen production‖ Biotechnol Lett. 29, 685 – 695.

Lee D.Y., Ebie Y., Xu K.Q., Li Y.Y., Inamori Y. (2010) *Continuous H2 and CH4 production from high-solid food waste in the two-stage thermophilic fermentation process with the recirculation of digester sludge*. Bioresource Technology, 101, S42-S47.

Nielsen, H.B,. Uellendahl, H., Ahring, B.K., 2007. Regulation and optimization of the biogas process: Propionate as a key parameter. Biomass Bioenerg. 31 (11–12), 820– 830

Prawit Kongjan, Irini Angelidaki, Extreme thermophilic biohydrogen production from wheat straw hydrolysate using mixed culture fermentation: Effect of reactor configuration, Bioresource Technology, Volume 101, Issue 20, October 2010, Pages 7789-7796

Provolo G., L Martínez-Sulle 2007 In situ determination of slurry nutrient content by electrical conductivity. Bioresource technology Volume 98, Issue 17, December 2007, Pages 3235–3242

Reith, J. H.; Wijffels, R. H.; Barten, H. 2003. Bio-methane and bio-hydrogen: status and perspectives of biological methane and hydrogen production. Dutch Biological Hydrogen

Roberto Tedeschini, 1998 Introduzione alla chemiometria, EdiSES

Salerno M.B., Park W., Zuo Y., Logan B.E., 2006. ―Inhibition of biohydrogen production by ammonia.‖ Water Research 40, 1167 – 1172.

Shin H.S., Youn J.H. (2005) Conversion into hydrogen by thermophilic acidogenesis. Biodegradation, 16, 33-44.

Spagni A., Buday J. , Ratini P.,Bortone G., Experimental considerations on monitoring ORP, pH, conductivity and dissolved oxygen in nitrogen and phosphorus biological removal processes World water congress No1vol. 43, no 11, pp. 197-204.

Tang, Y., Shigematsu, T., Ikbal, Morimura, S., Kida, K. 2004 The effects of micro-aeration on the phylogenetic diversity of microorganisms in a thermophilic anaerobic municipal solid-waste digester. Water Research 38 2537–2550.

Temudo MF, Kleerebezem R, Loosdrecht MV. 2007. Influence of the pH on (open) mixed culture fermentation of glucose: a chemostat study. Biotechnol Bioeng 2007;98(1):69e79.

Ueno Y., Fukui H., Goto M., 2007a. Operation of a two stage fermentation process producing Hydrogen and methane from organic waste.‖ Environmental Science and Technology, 41, 1413 – 1419.

Ueno Y., Tatara M., Fukui H., Makiuchi T., Goto M., Sode K., 2007b. Production of Hydrogen and methane from organic solid wastes by phase-separation in anaerobic process. Bioresources Technology , 98, 1861 – 1865.

Valdez – Vazquez I., Poggi-Varaldo H.M. 2009. Hydrogen production by fermentative consortia‖ Renewable and sustainable energy Reviews 13, 1000 – 1113.

Vavlin, V.A., 2010. Anaerobic Degradation of Organic Waste: An Experience in Mathematical Modeling. Microbiology., 79 (3), 352–359.

Wang X., Zhao Y.C. (2009) A bench scale study of fermentative hydrogen and methane production from food waste in integrated two-stage process. International journal of hydrogen energy, 43, 245-254.

Wassila Laloui-Carpentier, Tianlun Li, Vassilia Vigneron, Laurent Mazéas and Thèodore Bouchez ., Spinger 2006 Methanogenic diversity and activity in municipal solid waste landfill leachates

Wiegant, W.M., Zeeman, G., 1986. The mechanism of ammonia inhibition in the thermophilic digestion of livestock wastes. Agr. Wastes. 16 (4), 243–25

Yasin, N.H.M., Rahman, N.A.A, Man, H.C., Yusoff, M.Z.M., Hassan, M.A. 2011 Microbial characterization of hydrogen-producing bacteria in fermented food waste at different pH values. International Journal Of Hydrogen Energy 36, 9571-9580

Ye NF, Lu F, Shao LM, Godon JJ, He PJ (2007). Bacterial community dynamics and product distribution during pH-adjusted fermentation of vegetable wastes. J Appl Microbiol;103 (4):1055e65.

Zhu H., Stadnyk A., Bèland M., Seto P. (2008) Co-production of hydrogen and methane from potato waste using a two-stage anaerobic digestion process. Bioresource Technology, 99 (11), 5078-5084.