POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

Corso di Laurea Magistrale
in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili

Tesi di Laurea Magistrale

Metodi avanzati per il miglioramento della produzione di H_2 e CH_4 nella digestione anaerobica attraverso il Fe° e Studio Cinetico

Relatore
Prof. Bernardo Ruggeri

Correlatore
Ing. Carlos Enrique Gomez Camacho

Candidato
Mauro Fernando Grassi

Luglio 2018

A Dario Saccomando,
Per la sua tenacia e bontà d'animo,
Per essere stato un esempio di dedizione e coraggio.

Sommario

1 Introduzione ... 1

2 La Digestione Anaerobica ... 3
2.1 Introduzione alla Digestione Anaerobica ... 3
2.2 Le Fasi della Fermentazione Anaerobica ... 4
2.2.1 Fase Idrolitica ... 6
2.2.2 Fase Acidogenica (Prima Fermentazione) ... 6
2.2.3 Fase Acetogenica (Seconda Fermentazione) ... 6
2.2.4 Fase Metanigena ... 7
2.3 Microorganismi della Digestione Anaerobica ... 8
2.3.1.1 Batteri Metanigeni ... 8
2.4 Parametri della Digestione Anaerobica ... 11
2.4.1 Il pH ... 11
2.4.2 La Temperatura ... 12
2.4.3 Il Potenziale di Ossido-Riduzione ... 13
2.4.4 Gli Acidi Volatili Organici e l'Alcalinità Totale ... 13
2.5 La Digestione Mesofila e Termofila ... 14
2.6 La Digestione a Due Stadi ... 14
2.7 La Digestione Wet e Dry ... 15

3 La Termodinamica e Microorganismi della Corrosione ... 17
3.1.1 Diagramma di Pourbaix ... 17
3.1.2 I Microorganismi nella Corrosione ... 21

4 Prove Sperimentali di Corrosione Abiotica in Anaerobiosi ... 23
4.1 Obiettivi ... 23
4.2 Materiali e Metodi ... 23
4.2.1 AMPTS II ® ... 23
4.2.2 Il Fe° Granulare ... 24
4.2.2.1 Dispersione e Miscelazione del Fe° ... 25
4.2.2.2 Trattamento del Fe° ... 25
4.2.3 Brodo Sintetico ... 25
4.2.4 Inibizione della Fase Biotica ... 25
4.3 Procedura Sperimentale ... 26
4.3.1 Prova di Corrosione ... 26
4.3.2 Prova di Corrosione Abiotica ... 27
4.4 Misure Analitiche ... 28
4.4.1 Determinazione Complessometrica di Ioni Metallici ... 28
4.5 Risultati ... 30
4.5.1 Prova di Corrosione ... 30
4.5.1.1 Analisi statistica dati sperimentali ... 34
4.5.2 Prova di Corrosione Abiotica ... 35
4.5.2.1 Analisi statistica dati sperimentali ... 37

5 Prove Sperimentali per la Produzione di H_2 in presenza di Fe° ... 39
5.1 Introduzione ... 39
5.2 Obiettivi ... 40
5.3 Materiali e Metodi ... 40
5.4 Preparazione e Pretrattamento del Substrato ... 40
5.4.1 Preparazione del Substrato ... 40
5.4.2 Pretrattamento Basico ... 43

5.5 Preparazione dell'Inoculo **43**
5.5.1 Preparazione dell'Inoculo Primitivo per la Produzione di H_2 43
5.5.2 Preparazione dell'Inoculo Stabilizzato e Adattato al Fe° 44
5.6 Procedura Sperimentale **45**
5.6.1 Produzione di H_2 45
5.7 Misure Analitiche **46**
5.8 Analisi dei Dati **47**
5.9 Valutazioni Energetiche **48**
5.10 Risultati **48**
5.10.1 Condizioni sperimentali 48
5.10.2 Risultati sperimentali di produzione di H_2 50
5.10.3 Valutazioni energetiche 53
5.10.4 Analisi statistica dei dati sperimentali 54

6 Prove sperimentali per la produzione di CH_4 con supplemento di Fe° **55**
6.1 Introduzione **55**
6.2 Materiali e Metodi **55**
6.3 Preparazione e Pretrattamento del Substrato **55**
6.3.1 Preparazione del Substrato 55
6.3.2 Pretrattamento Basico del Substrato 56
6.4 Preparazione dell'Inoculo **56**
6.4.1 Preparazione dell'Inoculo Metanigeno 56
6.5 Procedura Sperimentale **57**
6.5.1 Produzione di CH_4 57
6.6 Misure Analitiche **58**
6.7 Analisi dei Dati **58**
6.1 Valutazioni Energetiche **58**
6.2 Risultati **59**
6.2.1 Condizioni Sperimentali 59
6.2.2 Modello produzione di CH_4: Gompertz 61
6.2.1 Modello Saturativo di I Ordine 63
6.2.1 Valutazioni Energetiche 68

7 Studio Sperimentale di Cinetica nella Produzione di H_2 + CH_4 in Presenza di Fe° 69
7.1 Introduzione **69**
7.2 Materiali e Metodi **69**
7.3 Preparazione e Pretrattamento del Substrato **69**
7.3.1 Preparazione del Substrato 69
7.3.2 Pretrattamento Basico 69
7.4 Preparazione dell'Inoculo **69**
7.4.1 Preparazione Coltura Metanigena 69
7.5 Procedura Sperimentale **70**
7.5.1 Prova cinetica Produzione di CH_4 + H_2 70
7.6 Misure Analitiche **71**
7.7 Crescita Microbica **71**
7.7.1 Dinamica della produzione di biogas H_2 + CH_4 74
7.7.2 Cinetica per la produzione di biogas 74
7.8 Condizioni sperimentali **76**
7.9 Risultati **76**
7.9.1 Risultati Sperimentali Produzione di H_2 + CH_4 76
7.9.2 Risultati Studio Cinetico in Presenza di Fe° 79

7.9.3 Risultati Cinetica 80
8 Conclusioni 81
9 Indice delle Figure 82
10 Indice delle Tabelle 84
11 Riferimenti bibliografici 86
12 Ringraziamenti 88

1 Introduzione

La richiesta energetica globale è in forte crescita, ad oggi tale domanda è soddisfatta per l'88% da combustibili fossili [1][b]. Al contempo la concentrazione di gas serra è in forte aumento, in particolar modo le emissioni da combustibili fossili di CO_2 [2][b]. Un fattore non meno importante è l'approvvigionamento energetico dei paesi. Infatti, le riserve di petrolio e gas naturale sono geograficamente distribuite in zone politicamente instabili. In questo contesto, la produzione di energia da biomasse e rifiuti tramite la digestione anaerobica gioca un ruolo vitale per i prospetti futuri per la generazione di energia sostenibile. La digestione anaerobica è una delle più interessanti tecnologie per la produzione di energia sostenibile e per la gestione dei rifiuti. Dalla digestione anaerobica si ottengono molteplici vantaggi:

- Il recupero parziale dell'energia presente all'interno del substrato
- La produzione di energia (elettrica e/o calore)
- Riduzione delle emissioni di CO_2
- Gestione sostenibile dei rifiuti organici
- Condizioni miti di processo (P atmosferica e T da 35-50 °C)
- Produzione di un fertilizzante stabile (digestato)

La produzione di biogas dalla digestione anaerobica è ormai una tecnologia ben consolidata. L'ottimizzazione della digestione anaerobica prevede la conoscenza di una vasta gamma di microorganismi e di percorsi metabolici. Oggi uno dei metodi più interessanti per il miglioramento delle prestazioni dei digestori anerobici è il supplemento di metalli zero valenti come il Fe°. Infatti, già da alcuni anni la corrosione microbica è oggetto di studio. L'estensione dello studio dalle colture pure ai consorzi microbici e l'attività dovuta ai metalli zerovalenti hanno permesso un ulteriore sviluppo della conoscenza dei microorganismi della digestione anaerobica [1]. La metanogenesi è un processo biologico chiave nella digestione anerobica e nei cicli del carbonio (*Figura2.1*). La metanogenesi si compie ad opera di una interazione sintropica tra differenti specie microbiche, dove avviene un scambio di elettroni tramite molecole *carrier* (i.e. idrogeno) per la degradazione del substrato. L'obiettivo di questa tesi è di sostenere l'ipotesi che l'introduzione di Fe° crea delle sinergie tra specie microbiche migliorando la metanogenesi e l'intero processo di fermentazione. Lo studio si compie attraverso quattro fasi sperimentali:

- Prove di Corrosione Anaerobica
- Prove per la produzione di H_2 in presenza di Fe°
- Prove per la produzione di CH_4 in presenza di Fe°
- Studio cinetico per la produzione di biogas in presenza di Fe°

Nel dettaglio, nel ***Capitolo 2*** si presenta una panoramica della digestione anerobica. Presentando le fasi del processo fermentativo e le specie microbiche coinvolte. Si evidenziano i parametri di processo più importanti per questo studio e le modalità operative del processo.

Il ***Capitolo 3*** introduce i concetti della corrosione legata all'attività microbica. Si da anche una descrizione della costruzione semplificata dei diagrammi di Pourbaix.

Nel ***Capitolo 4*** si descrivono gli obiettivi, le procedure sperimentali e i risultati delle prove di corrosione e le prove di corrosione abiotica.

Il ***Capitolo 5***, è dedicato alla presentazione delle prove sperimentali di fermentazione per la produzione di H_2 in presenza di Fe°. La descrizione del comportamento dei sistemi a fronte dell'introduzione di Fe° è approfondito. Si descrivono le procedure sperimentali e si presentano i risultati delle prove.

Il ***Capitolo 6*** descrive le prove per la produzione di CH_4 in presenza di Fe° con una enfasi particolare sulla modellazione delle curve di produzione e sulle modalità operative in funzione dei rapporti di Inoculo/Substrato introdotti.

Nel ***Capitolo 7*** si descrive lo studio cinetico per la produzione di biogas in presenza di Fe°. Si descrivono i modelli cinetici per la digestione anaerobica e si presentano i risultati della modellazione dei dati sperimentali.

Nel ***Capitolo 8*** si presentano le conclusioni delle prove sperimentali di questo studio sulla digestione anerobica.

2 La Digestione Anaerobica

2.1 Introduzione alla Digestione Anaerobica

La Digestione Anaerobica (*Anaerobic Digestion AD*) è un processo biochimico esistente in natura. Esso avviene ad opera di microorganismi in ambienti a basse concentrazioni di O_2. In natura si trovano condizioni simili ad esempio nei fondali marini, nei sedimenti fangosi degli stagni e nel sottosuolo. L'innovazione tecnologica ha adattato questo meccanismo biologico (*Figura 2.1*) per la degradazione di materiale organico con lo scopo di valorizzare energeticamente il rifiuto organico (i.e., scarti agroalimentari e agroindustriali, letami, liquami, ecc.) producendo metano. Oggi la digestione anaerobica è un processo largamente utilizzato per il trattamento di rifiuti organici e la produzione di CH_4.

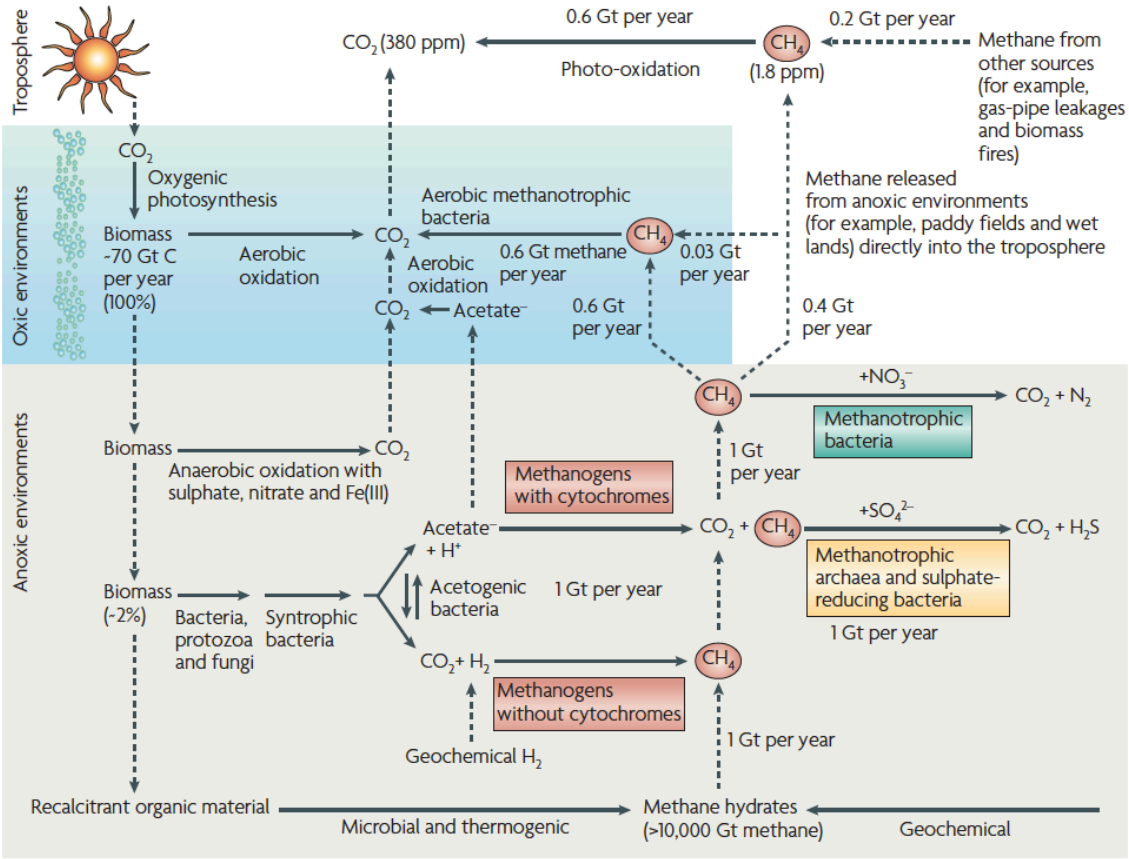

Figura 2.1 *Cicli del carbonio in natura: il CH_4 e i microorganismi metanigeni* [2].

La fermentazione di un substrato organico da parte di batteri è indirizzata, con le opportune condizioni, verso la produzione di biogas composto principalmente da metano (CH_4) e anidride carbonica (CO_2).

Il processo si può dividere in quattro fasi:

- Idrolitica
- Acidogenica
- Acetogenica
- Metanigena

Ad ogni fase è associato un gruppo microbico diverso, responsabile di ogni trasformazione chimica del substrato. La prima fase è la fase idrolitica. Il substrato, ovvero il materiale organico fonte di carbonio e di energia per i microorganismi, è principalmente composto da macromolecole organiche come proteine, carboidrati, lignina, cellulosa, ecc. . Tali composti vengono idrolizzati da batteri idrolitici in soluzione. I batteri acidogenici (o fermentativi) intervengono nella seconda fase trasformando zuccheri e amminoacidi in CO_2, H_2, NH_3 e acidi organici. I batteri acetogenici, a loro volta, convertono gli acidi organici in acido acetico (CH_3COOH). I batteri metanigeni, come ultima fase, convertono questi prodotti in CO_2 e CH_4. Il processo richiede una complessa interazione tra i vari gruppi microbici per trasformare le macromolecole del substrato in CO_2 e CH_4.

2.2 Le Fasi della Fermentazione Anaerobica

L'AD è un processo biologico complesso che coinvolge percorsi metabolici differenti che proseguono sia in successione che in parallelo (*Figura 2.2*). Dal substrato tal quale al CH_4. Le fasi sono strettamente collegate da interazioni sintrofiche dei microorganismi in ciascuna fase. Le fasi studiate singolarmente sono predominate da gruppi microbici differenti ma il processo complessivo è dettato da numerosi parametri.

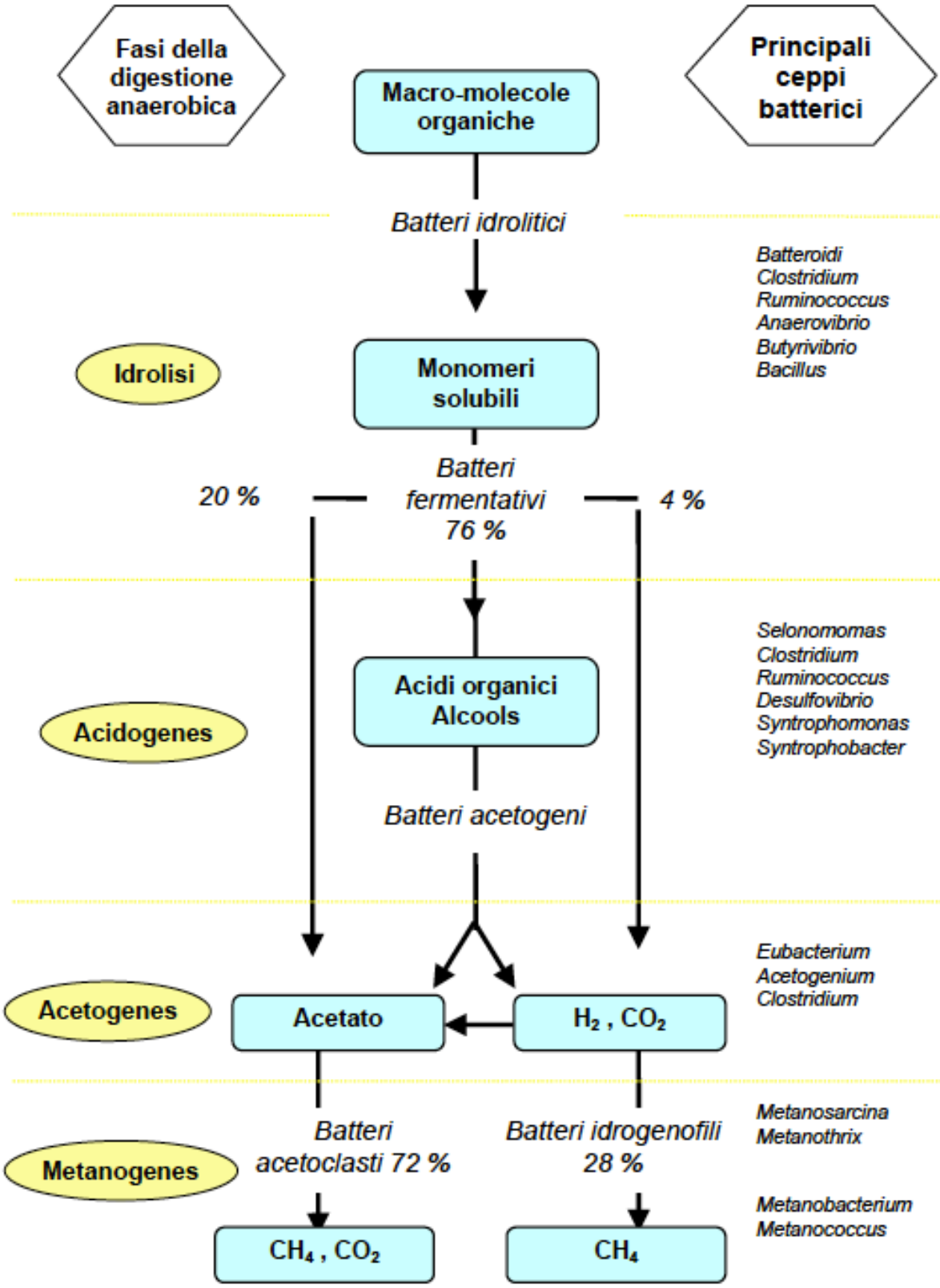

Figura 2.2 *Fasi della Digestione Anaerobica* [3][b].

2.2.1 Fase Idrolitica

Nella prima fase le macromolecole del substrato come la cellulosa, la lignina e altri polimeri organici sono trasformati, attraverso l'ausilio di enzimi extracellulari, da batteri anaerobi (obbligati o facoltativi) in oligomeri e monomeri. Alcune specie sono i *Clostridium, Bacillus e Pseudomonas* [3] . L'idrolisi dei carboidrati avviene dopo poche ore per effetto degli enzimi cellulasi e amilasi. Le proteine sono degradate dagli enzimi peptidasi in amminoacidi. I lipidi sono decomposti dagli enzimi lipasi in glicerolo e acidi grassi. Le macromolecole, invece, vengono degradate più lentamente e in maniera imparziale, talvolta è necessario effettuare dei pretrattamenti per migliorare la degradabilità del substrato.

2.2.2 Fase Acidogenica (Prima Fermentazione)

La fase acidogenica prevede la formazione di acidi grassi volatili (*Volatile Fatty Acids VFA*) e di solventi come gli alcoli. I prodotti della prima fase vengono metabolizzati dai batteri anaerobi (*Bifidobacterium spp., Selenomonas spp. e Flavobacterium spp.)* e trasformati in acidi organici, molecole C1-C5 (i.e. acido acetico, acido butirrico e acido propionico) con formazione di alcoli, H_2 e CO_2 .

2.2.3 Fase Acetogenica (Seconda Fermentazione)

In questa fase è favorita la crescita di microorganismi che hanno come metabolita primario l'acetato e come substrato acidi organici volatili. Gli acidi grassi sono ulteriormente ossidati ad acido acetico e H_2 da batteri acidogenici come *Acetobacterium spp., Ruminococcus spp., Sporomusa spp.*. I batteri acetogenici sono produttori obbligati di idrogeno (*H_2-producing bacteria, HPB*). La formazione di acetato, dall'ossidazione di lunghe molecole di acidi grassi, è termodimanicamente favorita per bassi valori di pressione parziale di H_2. Ciò implica che i batteri acetogenici sono favoriti e possono metabolizzare il substrato per ottenere energia per bassi livelli pressione parziale di H_2. In natura questo processo è denominato sintropia microbica, infatti i batteri acetogenici vivono in prossimità dei batteri metanigeni (*Figura 2.4*) compiendo un trasferimento di idrogeno tra le specie [3] (*Figura2.3*).

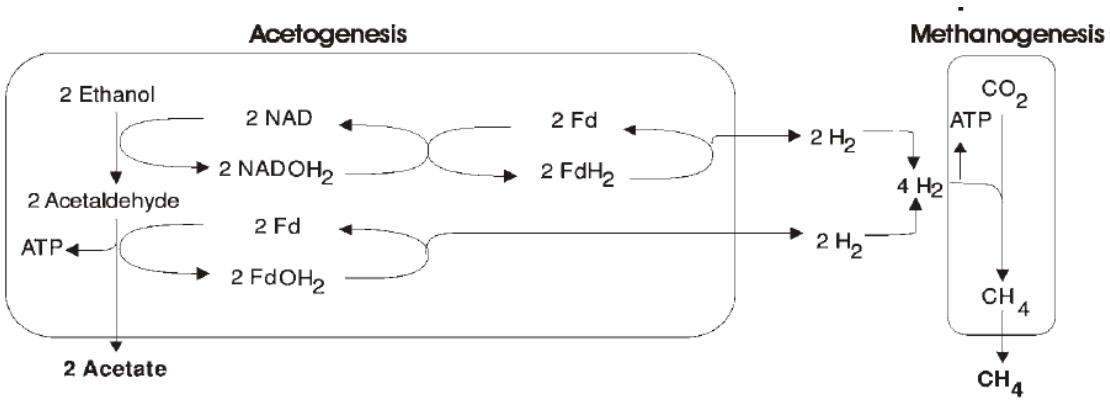

Figura 2.3 *Trasferimento di idrogeno tra specie microbiche* [3].

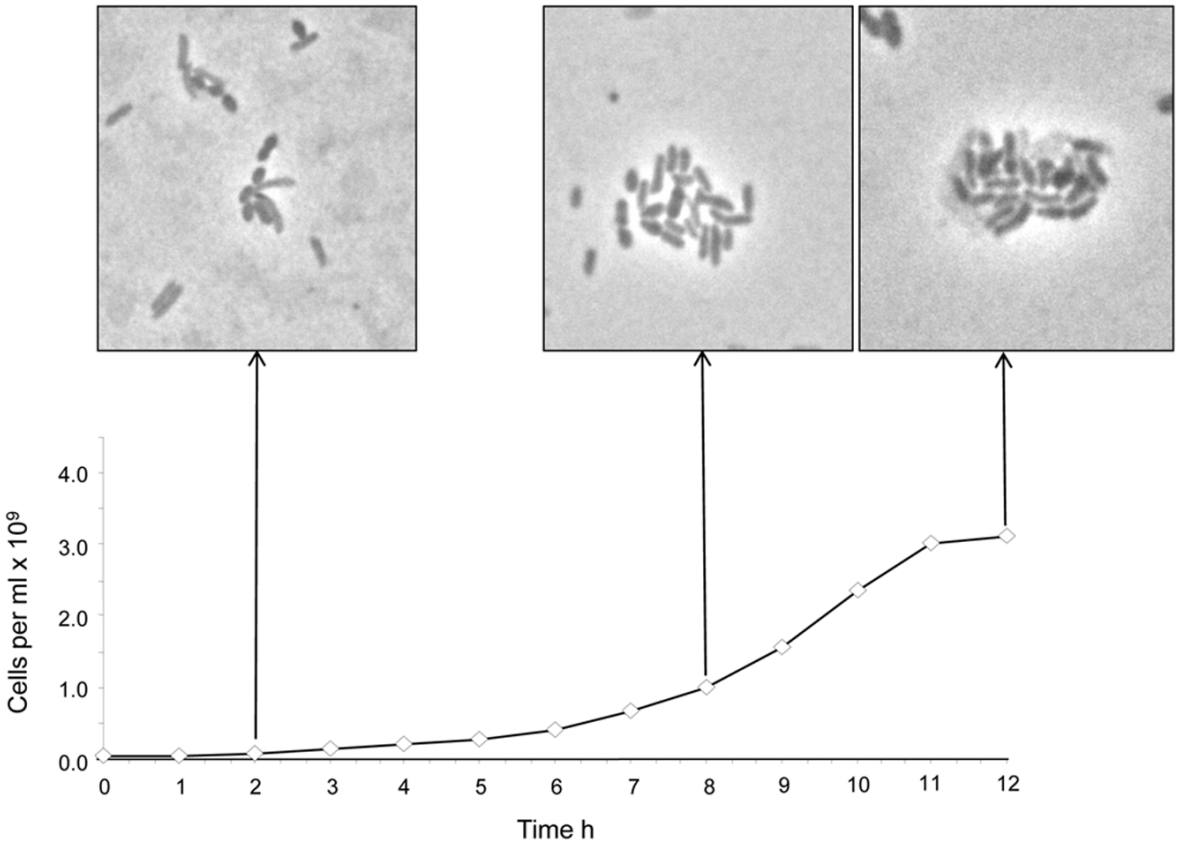

Figura 2.4 *Interazione tra specie microbiche, microorganismi scuri a forma di bastoncello (metanigeni), e microorganismi più chiari (fermentativi). Le immagini al microscopio sono scattate dopo 2, 8 e 12 h dopo l'inoculazione della co-coltura delle specie metanigene e fermentative* [4].

I batteri metanigeni richiedono una pressione parziale maggiore di idrogeno. I metanigeni consumano i prodotti dei batteri acetogenici, in particolare esclusivamente comoposti C1 e raramente i C2. Al fine di mantenere i livelli di pressione parziale dell'idrogeno accettabili, consumano CO_2 e H_2. In queste condizioni i batteri acetogenici producono H_2, CO_2 e acetato. In condizioni di pressione parziale dell'idrogeno alta la metanogenesi non avviene e i prodotti principali sono acido butirrico, propionico, caprionico, valerico, etanolo e H_2.

2.2.4 Fase Metanigena

La produzione di metano è dovuta a microorganismi anaerobi obbligati. I microorganismi coinvolti in questa fase appartengono al dominio *Archaea* (i.e. *Methanobacteria spp., Methanococci spp. , Methanomicrobia spp.).* Questi organismi sono diversi rispetto alle altre specie di microorganismi. A fronte di variazioni delle condizioni ottimali, come variazioni di pH, temperatura, presenza di ossigeno e sforzi di taglio (stress meccanico), l'attività dei metanigeni risulta compromessa. L'intero processo, se volto alla produzione di metano, mira al mantenimento delle condizioni ottimali per la crescita dei metanigeni. Il metano è il prodotto finale della digestione anaerobica. E' possibile ottenere metano tramite due vie metaboliche: matanogenesi idrogenotropica (2.1) e metanogenesi acetoclastica (2.2 e 2.3).

$$4\,H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + H_2O \qquad (2.1)$$

$$CH_3COOH \rightarrow CH_4 + CO_2 \qquad (2.2)$$

$$4CO + 2H_20 \rightarrow \mathrm{CH_4} + 3CO_2 \qquad (2.3)$$

La prima coinvolge batteri che ossidano l'H_2, mentre la seconda partendo dall'acido acetico arriva alla formazione di CH_4 e CO_2. Nella fermentazione anaerobica la via preponderante è la via acetoclastica, circa il 70% del metano prodotto deriva da questo percorso metabolico [3].

2.3 Microorganismi della Digestione Anaerobica

I batteri anaerobi in presenza di ossigeno molecolare sono inibiti. Gli anaerobi si dividono in due gruppi: batteri tolleranti all'ossigeno e intolleranti all'ossigeno. I primi in presenza di ossigeno vengono inibiti e non possono proseguire con la degradazione del substrato, i secondi in presenza di ossigeno libero invece non sopravvivono. I prodotti della fermentazione dipendono dal gruppo microbico prevalente. Infatti, cambiamenti nelle condizioni operative della fermentazione conseguono in una variazione della concentrazione di acidi e solventi, che a loro volta influenza il substrato per i batteri metanigeni.

2.3.1.1 Batteri Metanigeni

I batteri produttori di metano sono tra i batteri più antichi e appartengono al dominio *Archaea*. Questo dominio comprende una varietà molto ampia di batteri, dagli alofili estremi ai termofili estremi. I microorganimsi metanigeni sono particolari per alcune caratteristiche:

- Hanno una parete cellulare lipidica non rigida (*Figura 2.5*) [4];
- Dalla loro attività metabolica si produce CH_4;
- Possiedono coenzimi specializzati.

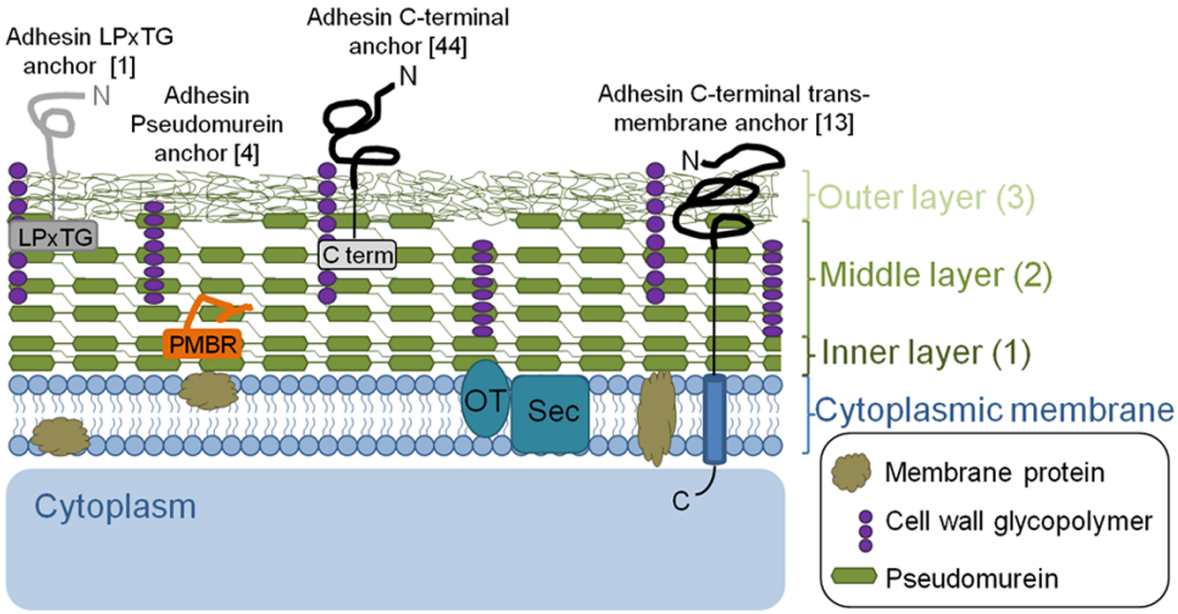

Figura 2.5 *Schema proposto per una membrana cellulare Gram+ (Metanigeno)* [4].

I coenzimi sono delle moelcole non proteiche, spesso contenenti metalli, che incorporate agli enzimi, ne migliorano l'attività. I coenzimi unici ai metanigeni sono il coenzima M e i coenzimi contenenti nickel: F_{420} e F_{430}. Il coenzima M è importante nel metabolismo per la riduzione della CO_2 a metano. Invece i coenzimi F_{420} e F_{430} sono un carrier di idrogeno nella formazione del metano. Questi composti contribuiscono al sistema di trasporto degli elettroni per la produzione di energia (all'interno del microorganismo) che ottiene energia rimuovendo elettroni dal substrato degradato (*Figura 2.6*).

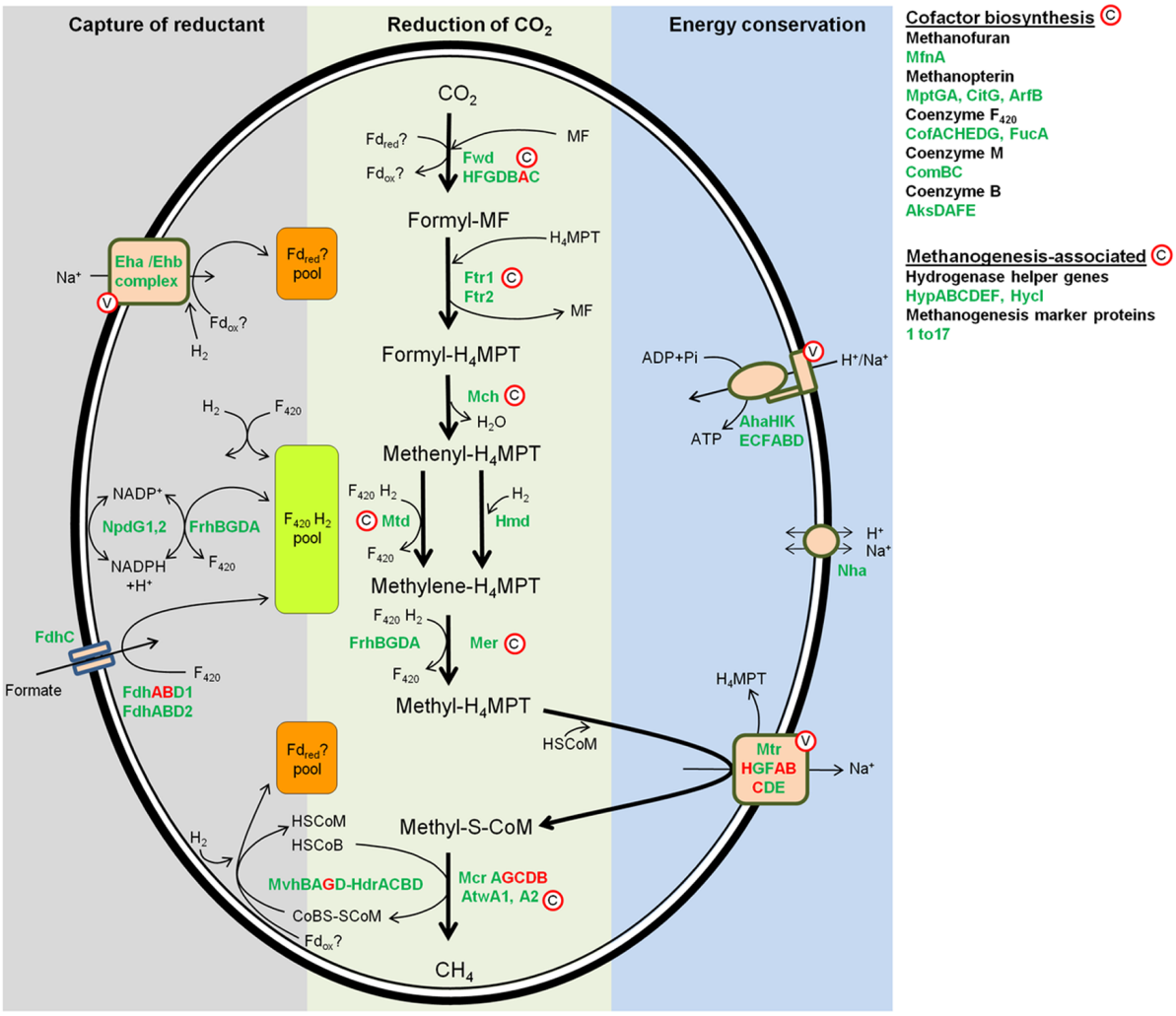

Figura 2.6 *Percorso metabolico proposto della metanogenesi per metanigeni senza citocromi* [4].

La composizione della parete cellulare rende i batteri metanigeni particolarmente sensibili a inquinanti come tensioattivi che possono facilmente danneggiare la parte della cellula irreparabilmente. Come evidenziato nello schema in *Figura 2.5,* la presenza di pseudomureina invece dell'acido muramico rende la cellula più debole. I batteri metanigeni sono classificati in base alla struttura, al substrato utilizzato, agli enzimi prodotti e all'intervallo di temperatura ottimale di crescita.

I substrati principali dei metanigeni sono: idrogeno, acetato e molecole C1 e C2. L'acetato è dismutato per formare metano mentre l'idrogeno è fissato con anidride carbonica. Ogni specie metanigena può degradare un particolare substrato. L'anidride carbonica serve sia come fonte di carbonio sia come accettore finale di elettroni rilasciati dal substrato. E' fondamentale che la popolazione di microrganismi sia grande in numero e diversità.

2.4 Parametri della Digestione Anaerobica

La digestione anaerobica coinvolge direttamente batteri anaerobi, di conseguenza i parametri che la influenzano sono strettamente legati a quelli che influenzano la crescita dei batteri. Molti fattori possono influenzare l'AD. Il pH, la temperatura, l'agitazione, il potenziale di ossido-riduzione, il carico organico, la concentrazione di solidi nel brodo, la presenza di ioni in soluzione, ecc. . Essendo il brodo di fermentazione un sistema biologico costituito da un consorzio microbico, è importante che esso non subisca brusche variazioni dalle condizioni ottimali nel corso della fermentazione. E' importante inoltre monitorare e controllare alcuni parametri. Ricordiamo che le condizioni ottimali del processo idrolitico e acidogenico sono diverse dalle condizioni ottimali della fase acetogenica e metanigena.

2.4.1 Il pH

Il pH è un parametro fondamentale per la digestione anaerobica, il suo valore determina o meno la possibilità di crescita microbica (*Figura 2.7*). L'attività microbica è strettamente legata all'attività degli enzimi agenti nel microorganismo. Il pH influenza la struttura e la carica superficiale degli enzimi.

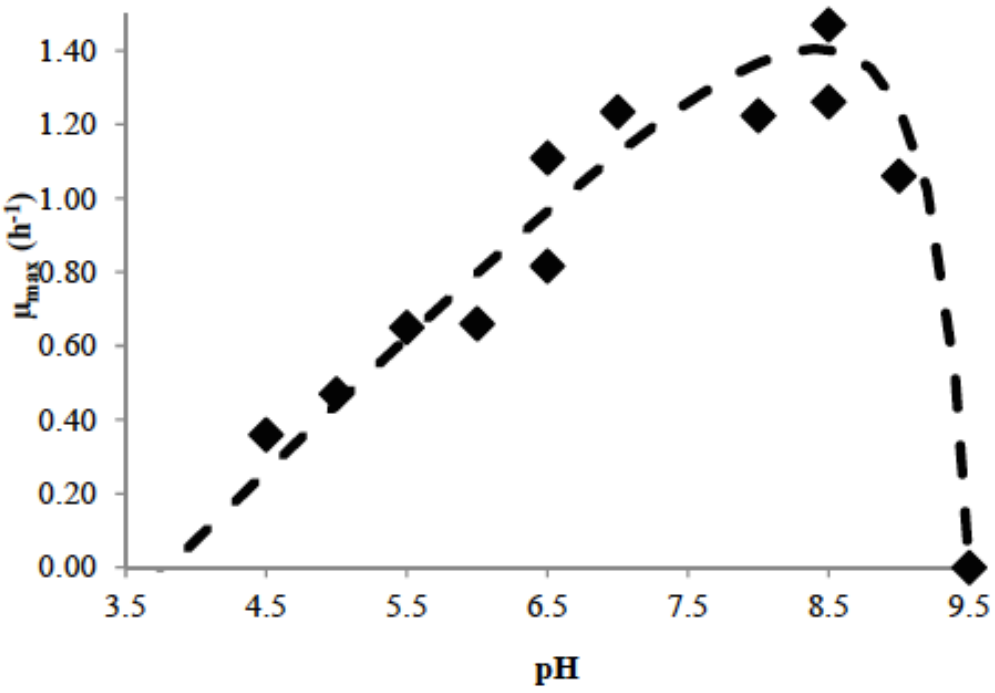

Figura 2.7 *Effetti del pH sulla crescita microbica* [5].

Inoltre il potere tamponante del brodo di fermentazione è un indice di stabilità del mezzo di reazione. La variazione del pH nel brodo di fermentazione è legata a molteplici fattori: nella prima fase il pH tende a diminuire perché i batteri acidogenici producono acidi volatili e

CO_2. Nella fase acetogenica e metanigena si crea un equilibrio dovuto a due effetti tamponanti. Il primo è il sistema tamponante anidride carbonica/idrogeno bicarbonato/carbonato. La CO_2 è continuamente prodotta dal sistema, la diminuzione di pH causa un cambiamento dell'equilibrio del sistema e provocando l'assorbimento della CO_2 nel brodo; con aumenti di pH la CO_2 disciolta forma acido carbonico, che ionizza con liberazione di ioni idrogeno. Il secondo sistema tamponante costituito da ammoniaca/ammonio previene l'acidificazione. L'equilibrio stabilito dal sistema può essere disturbato da una aggiunta di substrato fresco con la conseguente fase idrolitica e acidogenica, formazione di acidi volatili, con conseguente necessità di controllo di pH in modo da non disturbare e uccidere la popolazione metanigena.

2.4.2 La Temperatura

Nei processi biologici, la temperatura è un parametro fondamentale. Ogni microorganismo raggiunge velocità di replicazione massima in corrispondenza di una temperatura ottimale, per valori inferiori la crescita è rallentata, invece per valori superiori si raggiunge la denaturazione di proteine e la conseguente morte della specie (*Figura 2.8*).

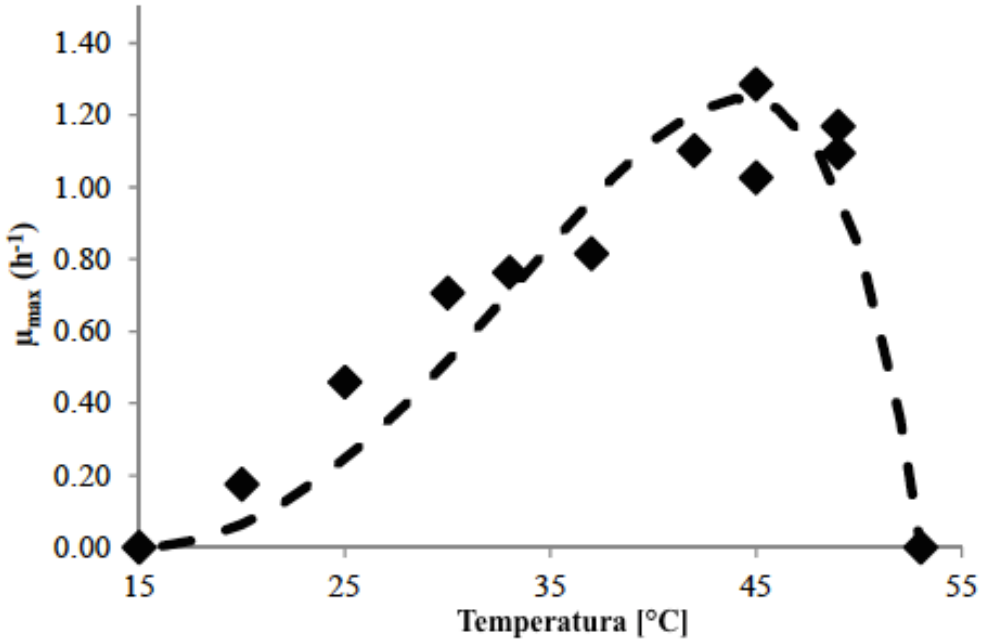

Figura 2.8 *Effetti della temperatura sulla crescita microbica per microorganismi termofili* [5].

I microorganismi si possono distinguere in base al range di attività ottimale per la crescita e attività metabolica:

- psicrofili: temperatura ottimale e massima velocità di replicazione tra 15 - 25 °C.
- mesofili: temperatura ottimale e massima velocità di replicazione tra 25 – 45°C.
- termofili: temperatura ottimale e massima velocità di replicazione tra 45 – 70°C.

La temperatura aumenta la velocità di degradazione delle macromolecole e l'attività metabolica dei microorganismi, inoltre, favorisce il trasferimento di massa.

2.4.3 Il Potenziale di Ossido-Riduzione

Il potenziale di ossido-riduzione (RedOx) è uno dei parametri più importanti della digestione anaerobica, se non si raggiungono condizioni di forte anaerobiosi, i microorganismi metanigeni non sopravvivono. Valori di potenziale RedOx < -300mV sono un requisito indispensabile per la fermentazione. Il potenziale RedOx è un indice del potere riducente del sistema e della presenza di ossigeno sciolto in soluzione. I metanigeni sono inibiti a valori superiori a -250 mV, invece per valori superiori a -130 mV i batteri acidogenici e acetoclastici sono inibiti.

2.4.4 Gli Acidi Volatili Organici e l'Alcalinità Totale

La degradazione del substrato ad opera dei vari gruppi microbici che si susseguono producono diversi prodotti di reazione. Il processo della digestione anaerobica, come già descritto in precedenza, si divide in alcune fasi fondamentali, la fase idrolitica e acidogenica e la fase acetogenica e metanigena. La produzione di acidi organici è preponderante nella fase acidogenica e acetogenica. Gli acidi volatili organici prodotti sono acido acetico, acido propionico e acido butirrico ed in quantità minori acido formico, isobutirrato ed altri acidi volatili organici. E' consuetudine utilizzare il parametro FOS/TAC [6] per monitorare il processo. Il risultato del parametro è un valore dato dal rapporto degli acidi organici volatili espressi come CH_3COOH equivalente in mg/L e la capacità tamponante del brodo espressa come $CaCO_3$ equivalente in mg/L. Il metodo utilizzato oggi è stato introdotto dai contributi di McGhee nel 1968 e Nordmann nel 1977. Ed è stato ulteriormente standardizzato dalla *"Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft/FAL"* come metodo di titolazione *Nordmann-method*.
La capacità tamponante (*Equazione 2.3*), ovvero il $CaCO_3$ equivalente, si determina con una titolazione di un campione di 20 ml del brodo di fermentazione dal suo valore originale di pH al valore di pH =5.

$$TAC = A * 250 \left[mg \frac{CaCO_3}{L}\right] \qquad (2.3)$$

dove A è il volume di acido solforico H_2SO_4 a titolo 0,1 N in mL.

La presenza di acidi volatili organici (*Equazione 2.4*) si determina con la titolazione del medesimo campione da pH = 5 a pH = 4,4.

$$FOS = \left((B * 1{,}66) - 0{,}15\right) * 500 \; [mg \; CH_3COOH/L] \qquad (2.4)$$

dove B è il volume di acido solforico H_2SO_4 a titolo 0,1 N in mL.

2.5 La Digestione Mesofila e Termofila

Nella digestione anaerobica si adottano due temperature: per impianti mesofili la temperatura ottimale è di circa 35-37 °C invece per impianti termofili la temperatura ottimale è circa 55°C. I batteri metanigeni sono maggiormente mesofili, poche specie sono termofile, inoltre i termofili sono più sensibili a variazioni di temperatura. E' importante controllare la temperatura del digestore a valori +/- 2 °C. Operare in condizioni termofile offre il vantaggio di aumentare le cinetiche di reazione, si ha una rimozione di batteri patogeni e si ottengono maggiori produzioni di metano, anche se potrebbe non essere energeticamente vantaggioso dovuto all'elevato dispendio energetico per riscaldare il brodo fermentativo.

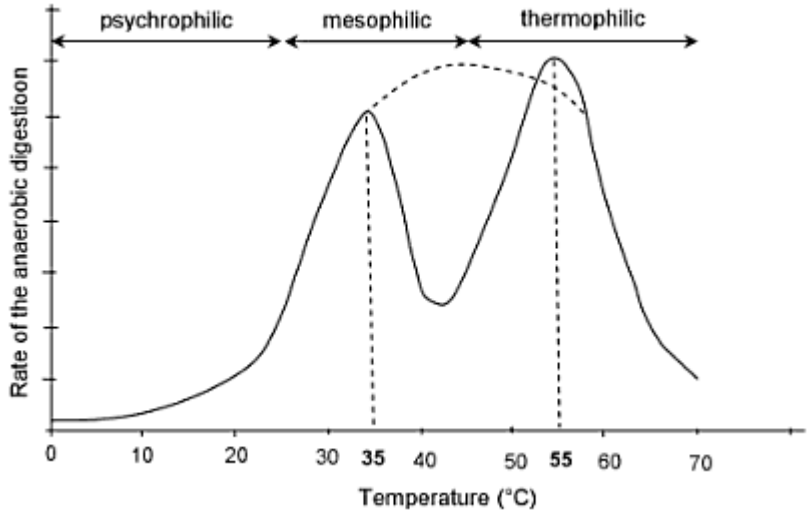

Figura 2.9 *Attività della digestione anaerobica in funzione della temperatura* [5].

Non ostante si ottengano valori velocità di reazione 5-6 volte inferiori [7] per la degradazione della cellulosa, la stabilità del processo migliora lavorando in campo mesofilo.

2.6 La Digestione a Due Stadi

La digestione anaerobica solitamente è condotta in un unico reattore dove avvengono tutte le reazioni coinvolte nella fermentazione, ma è possibile dividere le fasi in due o più reattori, dove avvengono separatamente alcune fasi della digestione. La digestione a due stadi prevede due reattori in cui avvengono, la fase idrolitica/acidogenica e la fase acetogenica/metanigena rispettivamente nel primo e nel secondo reattore. La separazione del processo in più fasi è motivata dalle attività microbiche differenti dei due stadi. Ogni gruppo microbico compie delle reazioni diverse e inoltre necessita per replicarsi e metabolizzare i reagenti del processo delle particolari condizioni di pH, temperatura e agitazione. In questo modo è possibile ottimizzare ogni fase e massimizzare i prodotti aumentando le rese globali del processo in termini di resa di degradazione e produzione di

biogas. La divisione in due fasi permette l'arricchimento selettivo di batteri d'interesse in ciascuna delle due fasi. Nel primo stadio la materia organica è degradata da batteri acidogenici in acidi volatili e alcoli, successivamente nel secondo stadio il lavoro sinergico degli acetogenici e metanigeni metabolizzano facilmente le molecole in anidride carbonica e metano. Le due fasi oltre a compiere diverse reazioni sono caratterizzare da microorganismi diversi con tempi di replicazione diversi e condizioni ottimali di pH e agitazione diverse.
Qualora il substrato organico fosse di natura fibrosa con elevate concentrazioni di materia lignocellulosica, con tempi di degradazione molto lenti, si preferisce procedere con uno stadio aggiuntivo: il pretrattamento.
Il pretrattamento consiste nel trattare il substrato per renderlo biodegradabile, in alcuni casi la presenza di molecole come i polifenoli nel reflui della lavorazione dell'olio di oliva e le molecole lignocellulosiche necessitano di una trattamento per accelerare la degradazione e neutralizzare effetti battericidi di alcune molecole. Condurre la digestione anerobica in più stadi è vantaggioso perché permette di ottimizzare separatamente ogni fase nelle specifiche condizioni, di ridurre dove necessario il volume dei reattori (diminuendo i tempi di permanenza nel caso di reattori continui), diminuire il dispendio energetico e aumentare l'efficienza energetica del processo.

2.7 La Digestione Wet e Dry

Il processo di AD si può condurre ad elevate concentrazioni di solidi "dry fermentation" o a concentrazioni minori "wet fermentation". Un fattore di riferimento è la concentrazione di solidi nel bioreattore ma è l'umidità il fattore fondamtale per il design del reattore. La presenza di acqua è fondamentale per l'attività microbica. La disponibilità dell'acqua per i microorganismi si valuta tramite l'attività dell'acqua che esprime la disponiblità dell'acqua per i microorganismi. Se la concentrazione di solidi da 200-400 g/L si parla di "dry fermentation", ciò non significa che vi sia assenza di acqua, ma si tratta di una condizione di processo a minor qantitativo di acqua invece se la concentrazione di solidi è inferiore a 150 g/L si tratta di "wet fermentation". La fermentazione "wet" richiede quindi che il rifiuto sia portato alle condizioni di lavoro, con aggiunta di acqua o con il ricircolo dell'effluente liquido o aggiungendo un rifiuto liquido (liquami animali). La fermentazione "dry" solitamente richiede un'accurata miscelazione meccanica, inoltre in termini energetici la spesa per riscaldamento è inferiore mentre quella per la movimentazione è superiore.

3 La Termodinamica e Microorganismi della Corrosione

Il fenomeno della corrosione è stato studiato a lungo in vari settori. Negli ultimi anni, grazie alla scoperta dell'attività dei materiali metallici di degradare inquinanti clorurati congiuntamente a particolari ceppi microbici, lo studio degli effetti sinergici della corrosione del Fe° e dell'attività microbica ha trovato molteplici applicazioni. Dalla bonifica di terreni e falde acquifere contaminate da composti clorurati alla additivazione di Fe° per l'aumento delle rese in metano o idrogeno nella digestione anaerobica [8]. Le tappe fondamentali di tali studi si possono riassumere unendo i criteri termodinamici suggeriti da M. Pourbaix e le recenti scoperte di attività dei microorganismi zolfo-riducenti [1]. Lo studio dei meccanismi biochimici e della attività enzimatica e metabolica di questi microorganismi hanno portato ad una conoscenza più dettagliata permettendo notevoli sviluppi della materia. I microorganismi zolfo-riducenti sono anaerobi obbligati e il loro particolare metabolismo costringe i batteri a vivere in consorzi microbici dalle peculiari caratteristiche. I gruppi microbici partecipano ad una complessa catena trofica condivisa tra le specie microbiche. La degradazione dell'inquinante o del substrato vede come ultimo accettore di elettroni proprio il consorzio microbico. In questo contesto si colloca il lavoro di tesi volto principalmente a delineare, per via sperimentale, gli effetti del ferro in anaerobiosi e in presenza di fase biologica.
Ad oggi il meccanismo di interazione tra il Fe° e i microorganismi non è del tutto chiaro. In letteratura è possibile trovare molteplici studi che confermano la presenza di microorganismi che favoriscono la corrosione anaerobica traendo vantaggio per il loro metabolismo. Alcuni studi hanno osservato, dapprima nella corrosione delle condotte e successivamente gli effetti sul metabolismo microbico, che combinando il Fe° e colture microbiche anaerobiche si registra un aumento della velocità di degradazione del cloroformio $CHCl_3$. La velocità di degradazione è 2,4 volte maggiori della somma dei due effetti separati. Il processo di degradazione del cloroformio abiotico e microbico non sono indipendenti quando si uniscono Fe° e microorganismi. E' stato proposto un meccanismo sinergico di interazione dovuta al risultato della ossidazione anerobica del Fe°, i cui prodotti vengono stati usati come substrato primario per il co-metabolismo della degradazione del cloroformio [9].

3.1.1 Diagramma di Pourbaix

Grazie ai diagrammi pH-Potenziale RedOx suggeriti da Pourbaix [10] è possibile stabilire i limiti termodinamici della reazione di corrosione del Fe° e valutare, a diversi valori di pH-RedOx, il prodotto di reazione favorito dalla termodinamica. Per la costruzione dei diagrammi occorre stabilire le specie chimiche presenti nel sistema, quindi occorre conoscere già l'evoluzione empirica del fenomeno. Per procedere alla construzione dei diagrammi si assumono le condizioni di equilibrio termodinamico e si assumono note le specie chimiche coinvolte e i valori di energia libera di Gibbs dei solidi e degli ioni coinvolti alle condizioni di temperatura e pressione standard (TPS). Per le reazioni chimiche si sfrutta l'equazione di Van't Hoff (3.1).

$$\Delta G° = -RT \ln K \qquad (3.1)$$

Per le reazioni elettrochimiche si procede con la manipolazione dell'equazione di Nernst diventa:

$$\phi = \phi° + \frac{RT}{nF} ln \frac{(a_P)^p \, (a_{H+})^h}{(a_R)^r \, (a_{H2O})^w} \qquad (3.2)$$

Raggruppando i termini costanti, R = 8,314472 J K^{-1} mol^{-1}, T = 298,15 K, F=96485,309 C mol^{-1} e tenendo conto del fattore di conversione da logaritmo naturale a logaritmo decimale, si ottiene il fattore 0,05916:

$$\phi = \phi° + \frac{0{,}05916}{n} log \frac{(a_P)^p \, (a_{H+})^h}{(a_R)^r \, (a_{H2O})^w} \qquad (3.2)$$

dove,

$$\phi = Potenziale\ di\ riduzione\ [V]$$

$$\phi° = \frac{\Delta G°}{nF}\ [V]$$

$$\Delta G° = Energia\ libera\ di\ Gibbs\ [\text{ J mol}^{-1}]$$

$$n = numero\ di\ elettroni\ trasferiti$$

$$F = 96485{,}309\ [C\ mol^{-1}]$$

per una generica reazione:

$$rR + w\,H_2O \rightarrow pP + hH + ne^- \qquad (3.3)$$

La costruzione dei diagrammi di Pourbaix [10], permette di individuare le regioni di equilibrio termodinamico per le specie considerate, attraverso il potenziale RedOx e la concentrazione idrogenionica.

- Una reazione all'equilibrio che coinvolge una sostanza solida, una sostanza disciolta e ioni idrogeno in acqua senza rilascio di elettroni liberi, è rappresentata da una linea verticale nel diagramma, ossia è indipendente dal potenziale RedOx.

- Una reazione all'equilibrio che coinvolge una sostanza solida, una sostanza disciolta con rilascio di elettroni liberi, è rappresentata da una linea orizzontale nel diagramma, ovvero è indipendente dal pH.

- Una reazione all'equilibrio che coinvolge una sostanza solida, una sostanza disciolta e ioni idrogeno in acqua con rilascio di elettroni liberi, è rappresentata da una linea retta con una data pendenza, ossia che dipende sia dal pH che dal potenziale RedOx.

Assumendo come ipotesi la presenza delle sole sostanze solide Fe°, Fe_3O_4 (Magnetite) e Fe_2O_3 (Ematite) è possibile costruire il diagramma Fe°-H_2O come riportato in *Figura 3.1*. Da questo diagramma possiamo evidenziare alcuni parametri della corrosione anaerobica.

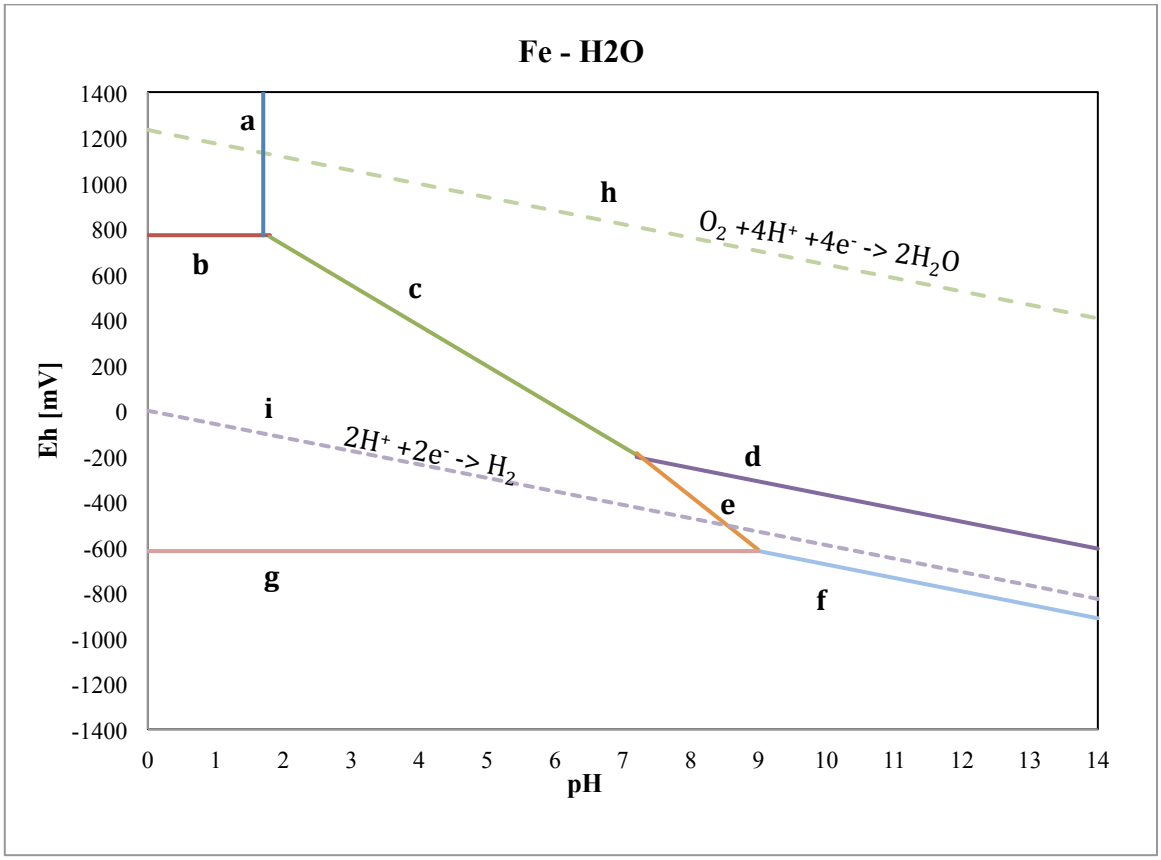

Figura 3.1 *Diagramma di Pourbaix.*

Per la costruzione del diagramma in figura, si assume una concentrazione iniziale di ioni pari a 10^{-6} M, inoltre si assumono i sistemi in condizioni ideali a TPS. I prodotti della corrosione considerati sono Ematite (Fe_2O_3), Magnetite (Fe_3O_4), Fe^{2+} e Fe^{3+}. Si scelgono le reazioni coinvolte nel sistema considerato, si esplicitano i termini delle equazioni di Nernst e di Van't Hoff. Si sostituiscono le attività dei componenti con le concentrazioni a_{Fe3+} = [Fe^{3+}] e a_{Fe2+} = [Fe^{2+}]. In *Tabella 3.1* sono riportate le equazioni utilizzate per la costruzione del Diagramma di Pourbaix.

Tabella 3.1 *Reazioni considerate per la costruzione dei Diagrammi di Pourbaix in Figura 3.1.*

N°	Reazione	Equazione
a	$Fe^{3+} + 3H_2O \rightarrow Fe_2O_3 + 6H^+$	$Log(a_{Fe3+}) = -*0,72 – 3*pH$
b	$Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + e^-$	$E_0 = 0,771+0,0591* Log(a_{Fe3+}/ a_{Fe2+})$
c	$Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + e^-$	$E_0 = 0,728+0,1773* pH-0,0591* Log(a_{Fe2+})$
d	$2Fe_3O_4 + H_2O \rightarrow 3Fe_2O_3 +2H^+ + 2 e^-$	$E_0 = 0,221-0,0591*pH$
e	$3Fe^{2+} + 4H_2O \rightarrow Fe_3O_4 +8H^+ + 2 e^-$	$E_0 = 0,98 +0,2364*pH-0,0886* Log(a_{Fe2+})$
f	$3Fe° + 4H_2O \rightarrow Fe_3O_4 +8H^+ + 8 e^-$	$E_0 = - 0,085-0,0591*pH$
g	$Fe° \rightarrow Fe^{2+} + 2e^-$	$E_0 = - 0,440 + 0,0295*Log(a_{Fe2+})$
h	$O_2 +4H^+ +4e^- \rightarrow 2H_2O$	$E_0 = 1,223 - 0,0591* pH$
i	$2H^+ +2e^- \rightarrow H_2$	$E_0 = - 0,0591* pH$

Dalla *Figura 3.1* si denotano le regioni di stabilità termodinamica dei vari cationi e degli idrossidi prodotti per precipitazione. Dal diagramma risultano le zone di stabilità per i cationi Fe^{2+} e Fe^{3+}. Le regioni corrispondenti alla stabilità degli ioni corrispondono alle regioni della corrosione. Le regioni dove sono stabili le specie Ematite (Fe_2O_3) e Magnetite (Fe_3O_4) il metallo si ossida creando un film sulla superficie che lo protegge da ulteriore corrosione (passivazione). Le regioni della corrosione d'interesse per lo studio microbico si evidenzia in *Figura 3.2*. Il quadrato verde comprende un'area del diagramma corrispondente alle condizioni della fase idrolitica e acidogenica per la produzione di H_2, Il quadrato rosso, invece, racchiude la zona corrispondente alle condizioni della fase acetogenica e metanigena. I valori di Eh vanno da -200 mV a -550 mV che corrisponde alle condizioni di anaerobiosi, i valori di pH da 5,2 a 7,5 rispettivamente le condizioni di pH per la crescita dei *H_2-producing bacteria* e le condizioni di pH per la produzione di metano ad opera dei metanigeni.

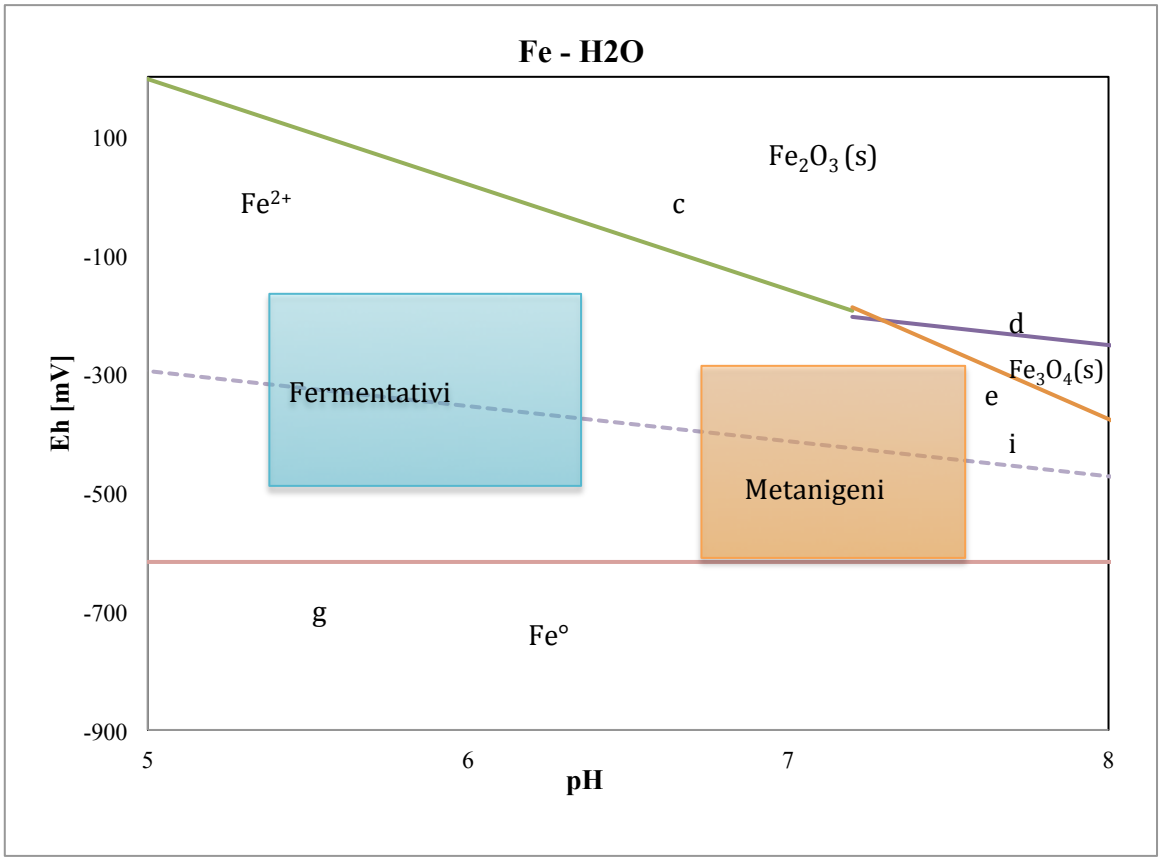

Figura 3.2 *Zone d'interesse per la Digestione Anaerobica: riquadro blu per i batteri fermentativi, riquadro rosso per i metanigeni.*

3.1.2 I Microorganismi nella Corrosione

L'utilizzo dei metalli zero valenti ha avuto un forte sviluppo dopo che si è osservata la loro attività nella degradazione del tricloroetano. Tale scoperta portò all'utilizzo di Fe° in granuli dispersi in barriere per la bonifica di terreni e acque inquinate. Lo studio approfondito delle superfici di contatto tra inquinante e metallo [11] ha portato all'individuazione di due categorie di barriere permeabili reattive: i metalli corrosivi e i metalli catalitici. Tra le barriere permeabili reattive per la degradazione degli inquinanti, il metallo più comune è il Fe°, ma non è l'unico. Infatti, si sono studiate anche effetti del magnesio, zinco e altri metalli. Studi hanno dimostrato che nei sistemi Fe° si riscontra una attività microbica non trascurabile. Gli effetti possono coinvolgere la biocorrosione, il metabolismo microbico, la dissoluzione/precipitazione e il biofouling. Studi sulla biocorrosione hanno dimostrato che microorganismi utilizzatori di H_2 accelerano la corrosione per depolarizzazione catodica, infatti questi microorganismi consumando idrogeno per il loro metabolismo abbassano la concentrazione del prodotto della reazione di corrosione spostando l'equilibrio favorendo la corrosione. Si è dimostrato che combinando il Fe° con colture microbiche consumatrici di idrogeno, come i consorzi metanigeni possono accelerale il metabolismo di degradazione degli inquinanti [9]. Altri studi invece hanno dimostrato che la presenza del Fe° migliora le capacità di degradazione degli inquinanti clorurati anche senza la presenza di H_2 come substrato. Ad esempio nella specie *Methanosarcina thermophilia* la degradazione del

tetracloruro di carbonio e del cloroformio è dovuta alla presenza di fattori metallo-proteici secreti dal batterio quando esposto a Fe°. Si prospetta una opportunità per lo studio degli effetti sinergici tra il metabolismo microbico del Fe° e dei suoi ioni e i metabolismi dei microorganismi che coinvolgono sia gli inquinanti che per esempio i substrati utilizzati nella digestione anaerobica.
Gli idrocarburi alifatici clorurati sono degli inquinanti molto frequenti nelle acque. Esistono dei microorganismi che catalizzano le trasformazioni chimiche di questi inquinanti. I microorganismi coinvolti sono colture miste di batteri metanigeni, colture miste di batteri anaerobi e altri consorzi microbici. E' possibile fornire molecole donatrici di elettroni grazie alla corrosione anaerobica del Fe° e il rilascio di idrogeno libero. Si è dimostrato che colture microbiche metanigene, omoacetogeniche e zolfo-riducenti hanno la capacità di utilizzare l'idrogeno catodico come fonte di energia per le vie cataboliche [9]. Altri studi hanno dimostrato un'attività dovuta all'aggiunta di Fe° in prove di digestione anaerobica.

4 Prove Sperimentali di Corrosione Abiotica in Anaerobiosi

4.1 Obiettivi

L'obiettivo di questa fase sperimentale è quello di valutare la produzione di H_2 dal fenomeno della corrosione anaerobica e il rilascio di ioni Fe^{2+} in soluzione. Si valuta il volume e composizione dei gas prodotti, il pH, il potenziale RedOx e la temperatura. Si valuta la quantità di gas prodotto dalla corrosione del Fe° in funzione della concentrazione di Fe° aggiunto. Si divide il lavoro di questo capitolo in due fasi sperimentali.
La prima campagna sperimentale riguarda la corrosione del Fe° in acqua e in brodo sintetico. In questa prima fase si valuta l'effetto del trattamento chimico superficiale del Fe°. Si valuta congiuntamente l'effetto corrosivo a 0,5 g/L e 3 g/L di Fe° aggiunto e il volume di gas prodotto.
La seconda campagna sperimentale ha come obiettivo la valutazione del volume di gas prodotto dalla corrosione anaerobica in brodo abiotico (in assenza di microorganismi attivi) in funzione della concentrazione di Fe° aggiunto. Si esplorano le concentrazioni di 0,5 g/L, 1,5 g/L e 3 g/L. Nel capitolo si descrivono le procedure sperimentali utilizzate e si presentano i risultati ottenuti.

4.2 Materiali e Metodi

4.2.1 AMPTS II ®

L'Automatic Methane Potential Test System (AMPTS II ®, Bioprocess Control AB, Lund, Svezia) è una apparecchiatura analitica specifica per la conduzione di prove sperimentali di fermentazione batch. Essa è costituita da tre unità. La prima unità, in *Figura 4.1,* è costituita da un bagno termostatico con regolazione di temperatura automatico ed ha una capacità di 15 reattori da 500 ml.

Figura 4.1 *Immagine dei reattori dell'AMPTS II ® con i motori elettrici e del bagno termostatico a regolazione automatica.* [4][b]

La seconda unità in *Figura 4.2* è costituita da 15 assorbitori di CO_2 da 100 ml.

Figura 4.2 *Immagine degli assorbitori di CO_2*[4][b].

La terza unità in *Figura 4.3* è costituita dall'apparecchiatura di misurazione del gas prodotto. Vi sono 15 celle di misurazione con meccanismo a spostamento di liquido.

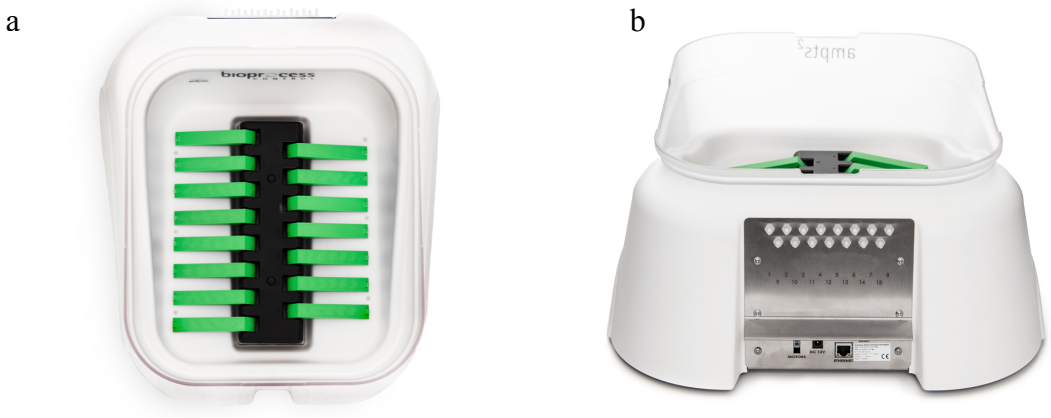

Figura 4.3 *Imagini dell'unità di misurazione per il biogas vista dall'alto (a) e vista frontale (b)* [4][b].

Lo strumento ha una sensibilità di misurazione di 1 [mL/min]. Il campo di misurazione va da 9 [mL/min] a 110 [mL/min]. I dati sono misurati e salvati nel software ed è possibile accedervi da remoto tramite connessione a rete internet. Ogni sistema è autonomo, ciascun reattore da 500 ml è opportunamente agitato da motori elettrici a corrente continua con velocità di agitazione controllata da remoto da 10 rpm a 200 rpm. L'apparecchiatura è utilizzata per le prove sperimentali di corrosione ed anche per le prove sperimentali di fermentazione anaerobica.

4.2.2 Il Fe° Granulare

In letteratura è frequente l'utilizzo di ferro zero valente. La maggioranza degli articoli però utilizza ferro in granuli di dimensioni di 10^{-9} [m] zerovalente (*nanostructured Zero Valent Iron,* nZVI). Seguendo gli obiettivi e le finalità di questo lavoro ovvero, il miglioramento complessivo, ed in particolare energetico, della digestione anaerobica è opportuno utilizzare

materiali a basso impatto energetico. La produzione di nZVI comporta sicuramente un impatto energetico maggiore, rispetto al ferro (Fe°) utilizzato che è di tipo granulare dalle dimensioni dell'ordine dei 10^{-6} [m] e derivante da scarti di lavorazioni industriali.

4.2.2.1 Dispersione e Miscelazione del Fe°

L'obiettivo è determinare la migliore configurazione per la corretta dispersione del Fe° nel volume del reattore. A tale scopo si compiono delle prove preliminari di miscelazione nei sistemi predisposti per le prove di corrosione. Si vuole evitare che il ferro depositi e crei dei cumuli riducendo la superficie esposta all'azione dell'acqua. Si è esplorata la velocità di agitazione al 10 %, al 50 % e al 100% della velocità massima degli agitatori rispettivamente corrispondente a 20 rpm, 100 rpm e 200 rpm.

4.2.2.2 Trattamento del Fe°

Il Fe° è utilizzato in due diverse condizioni. Il Fe° non trattato (Fe° nT) e il Fe° trattato (Fe° T). Il trattamento ha lo scopo di attivare la superficie eventualmente ossidata per accentuare il fenomeno corrosivo. Il trattamento chimico superficiale consiste nel lavaggio del Fe° con soluzione acquosa di HCl al 10 % v/v in condizioni di agitazione vigorosa per un tempo di 2 minuti. Si drena il liquido e si risciacqua con acetone e acqua in rapporto 1:1. Segue la rimozione della soluzione con l'acetone e il flussaggio di N_2 fino alla totale rimozione del liquido, fino a quando il Fe° risulti asciutto.

4.2.3 Brodo Sintetico

La preparazione del brodo sintetico si riconduce alle necessità di ricreare le condizioni di pH e composizione simili a quelle di un brodo di fermentazione. La composizione di un brodo di fermentazione in un digestore anaerobico è di enorme complessità. Si possono ricondurre le condizioni di un brodo di fermentazione in assenza di microorganismi sfruttando un parametro largamente utilizzato nel monitoraggio dei Digestori Anaerobici. Il parametro VFA/TA (conosciuto come FOS/TAC in tedesco) che sta ad indicare il rapporto tra due grandezze. Gli acidi volatili (VFA *volatile fatty acids*) in milligrammi equivalenti di acido acetico e l'alcalinità totale (TA *total alkalinity*) misurata in milligrammi equivalenti di carbonato di calcio. Per analogia si ricostruisce un brodo sintetico utilizzando acido acetico CH_3COOH e carbonato di calcio $CaCO_3$. In particolare si prepara una soluzione acquosa con acido acetico e carbonato di calcio (*Figura 4.5)* rispettivamente a concentrazioni 5 g/L e 2 g/L. Il rapporto VFA/TA utilizzato è il medesima del brodo di fermentazione usato nelle prove seguenti di corrosione abiotica.

4.2.4 Inibizione della Fase Biotica

Si vuole rendere il brodo di fermentazione microbiologicamente inattivo. Nelle prove di corrosione abiotica si vuole valutare l'effetto in assenza di microorganismi ma in un mezzo acquoso a composizione il più possibile vicino al brodo di fermentazione vero e proprio. Il

trattamento scelto è un trattamento termico. Si preleva il campione di brodo e si versa in flaconi da 500 mL. I flaconi si ripongono nel bagno termostatico dell'AMPTS II ® alla Temperatura di 80 °C per un tempo di 60 minuti. In questo modo i microorganismi mesofili sono resi inattivi a causa della denaturazione delle membrane cellulari e conseguentemente alla morte dei microorganismi, è possibile considerare tale brodo privo di microorganismi attivi verso la produzione di gas, quindi abiotico.

4.3 Procedura Sperimentale

4.3.1 Prova di Corrosione

Si utilizzano i reattori (flaconi) da 500 ml. Si valutano quattro sistemi differenti. Due sistemi per la valutazione dell'efficacia del trattamento del Fe°, un terzo sistema per valutare se l'aumento della concentrazione di Fe° determina una variazione intensiva nella produzione di H_2. Nel quarto sistema preparato si valuta l'effetto corrosivo in presenza di acido acetico e carbonato di calcio. In Tabella si riportano le condizioni sperimentali dei quattro sistemi. Il primo sistema (Fe° nT 0,5) si prepara con un volume di 400 ml di acqua deionizzata a concentrazione di Fe° non trattato di 0,5 g/L. Il secondo sistema (Fe° T di 0,5) si prepara con il medesimo volume di liquido e con una concentrazione di Fe° trattato di 0,5 g/L. Il terzo sistema (Fe° nT 3) si prepara con 400 ml di acqua deionizzata e una concentrazione di Fe° non trattato di 3 g/L. Il quarto sistema (brodo sintetico) prevede la preparazione del brodo sintetico, con un volume di 400 ml di soluzione nel flacone e a concentrazione di Fe° non trattato di 0,5 g/L. In *Tabella 4.1* si riportano la condizioni sperimentali dei sistemi in prova.

Tabella 4.1*Condizioni iniziali dei sistemi per la prova di corrosione***.**

	Fe° 0,5 nT	***Fe° 0,5 T***	***Fe° 3 nT***	***Brodo Sintetico***
Trattamento	no	si	no	no
Fe [g/L]	0,5	0,5	3	0,5
Volume [mL]	400	400	400	400
CH_3COOH [g/L]				5
$CaCO_3$ [g/L]				2
pH	5,47 ± 0,2	5,47 ± 0,2	5,47 ± 0,2	6,48 ± 0,4

Tutti i sistemi sono riposti sul bagno termostatico dell'AMPTS alla temperatura di 35 °C. Le prove di Corrosione prevedono il raggiungimento di condizioni di anaerobiosi dei reattori. Prima del flussaggio di N_2 si valuta il pH iniziale. Si flussa in testa ad ogni reattore N_2 per 5 minuti. Si i collega ciascun reattore al proprio sistema di raccolta gas con l'accortezza di tenere sempre i sistemi in leggera sovrappressione ed evitando l'apertura delle valvole e l'entrata di aria nei reattori.
Non è possibile valutare il potenziale RedOx senza perturbare le condizioni di anaerobiosi, quindi, si considera la condizione iniziale di potenziale RedOx di + 300 mV antecedente al

flussaggio di N_2. Le prove si conducono senza controllo di pH e si fermano quando la produzione di gas si arresta (tempo atteso 2-5 giorni).
Un esempio di sistema per le prove di corrosione è descritto in *Figura 4.5*. I reattori sono provvisti di due uscite, una uscita (1) è chiusa con una pinza di Hoffman, l'altra uscita di gas (2) è collegata al dispositivo di raccolta gas (3). Si utilizzano delle siringhe per la raccolta del gas prodotto dai reattori di corrosione. La scelta delle siringhe si riconduce alla sensibilità dello strumento, infatti, l'AMPTS II ® non è in grado di misurare volumi piccoli come quelli attesi (da 5 mL a 10 mL) invece utilizzando le siringhe si è in grado di raccogliere e misurare il volume gas prodotto. Il gas prodotto è poi analizzato per valutarne la composizione ed in particolare la presenza di H_2. Si valuta inoltre il pH finale di ogni sistema, la concentrazione di ioni metallici in soluzione e il potenziale RedOx. Le prove sono condotte in duplicato.

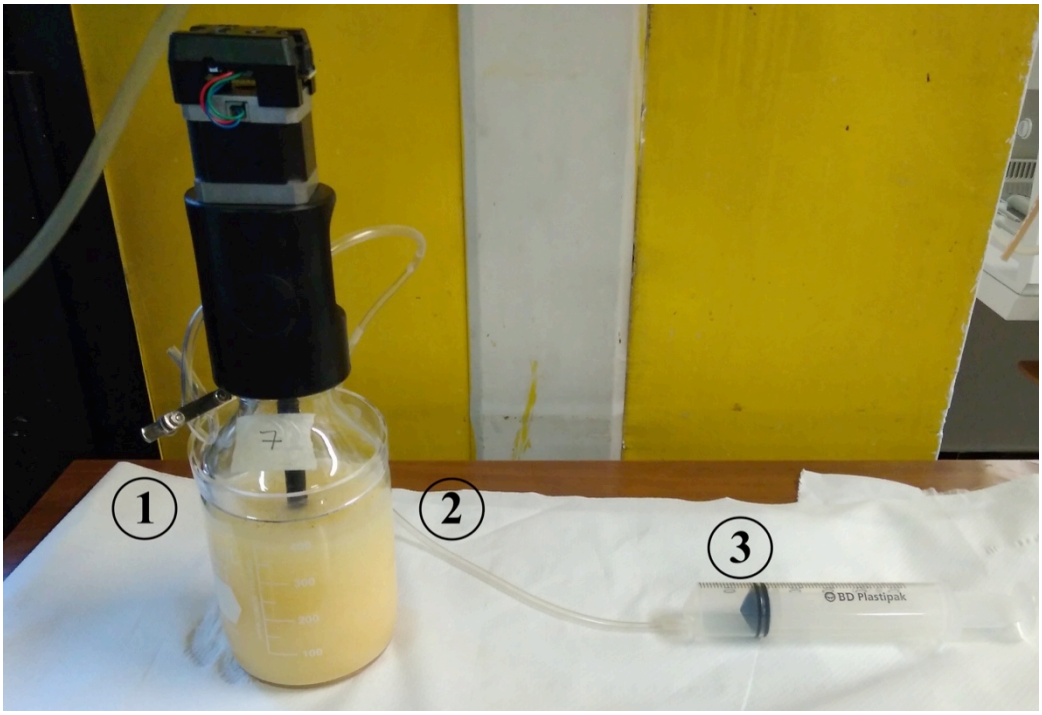

Figura 4.4 *Fotografia della configurazione di un sistema per la prova di corrosione: 1) uscita gas chiusa 2) uscita gas aperta e conessa a 3) siringa di raccolta gas.*

4.3.2 Prova di Corrosione Abiotica

Si utilizzano i reattori da 500 ml. Si valutano cinque sistemi differenti. Tre sistemi per la valutazione degli effetti della concentrazione di Fe° in brodo abiotico. Un sistema di controllo dove si valuta l'attività residua di microorganismi sopravvissuti al trattamento termico per la sterilizzazione. Si valuta un sistema per misurare il rilascio di ioni metallici in acqua alle stesse condizioni dei sistemi con il brodo abiotico. I primi tre sistemi si preparano con un volume di 400 ml di brodo abiotico (*Abiotic Corrosion Iron ACI*) a concentrazione di Fe° non trattato di 0,5 g/L, 1,5 g/L e 3 g/L. Il quarto sistema si prepara con il medesimo volume di brodo abiotico, senza aggiunta di Fe°, questo costituisce il sistema di controllo (*Abiotic Corrosion Control ACC*). Il quinto sistema si prepara con 400 ml di acqua

deionizzata e una concentrazione di Fe° non trattato di 1,5 g/L (*Water Iron WI*). Tutti i sistemi sono riposti sul bagno termostatico dell'AMPTSalla temperatura di 35 °C. Le prove di corrosione prevedono il raggiungimento di condizioni di anaerobiosi dei reattori attraverso il flussaggio di N_2. Prima del flussaggio di N_2 si valuta il pH iniziale. Si flussa in testa ad ogni reattore N_2 per 5 minuti e si collega ciascun reattore al proprio sistema di raccolta gas. In questi sistemi, tranne quello con acqua deionizzata, è possibile valutare il potenziale RedOx perturbando le condizioni di anaerobiosi in testa ai reattori ma senza compromettere la misurazione del potenziale RedOx nel liquido (brodo abiotico).
Le prove si conducono senza controllo di pH e si fermano quando la produzione di gas si arresta. Il tempo atteso per il termine delle prove è di 2-5 giorni. I reattori sono configurati come mostrato in *Figura 4.5*. Si utilizza l'unità di misurazione gas dell'AMPTS, infatti, si attendono dei volumi di gas prodotto maggiori rispetto alla prova di corrosione. Il gas prodotto è poi analizzato al gas cromatografo per valutarne la composizione. Si valuta inoltre il pH finale di ogni sistema e il valore di potenziale RedOx. Le prove sono condotte in triplicato.

4.4 Misure Analitiche

Il pH è stato misurato usando un pH-metro CONSORT P903 (LAISS Apparecchi Scientifici, Torino, Italia). La lettura diretta del volume raccolto nelle siringhe è stato il metodo utilizzato per misurare il gas prodotto nella prova di corrosione. Il gas prodotto dalle prove di corrosione abiotica invece è stato misurato con l'ausilio dell'unità automatica di misurazione dell'AMPTS. I gas prodotti sono stati analizzati utilizzando un gas cromatografo off-line (Varian Micro-GC CP-4900, Palo Alto, Stati Uniti d'America) istallato con due colonne: *i)* Colonna Poroplot U per la rilevazione di CO_2 (temperatura di iniezione 85 °C, 200 kPa, Ar come carrier) e *ii)* Colonna setaccio molecolare per rilevare H_2, CH_4, CO, O_2 e N_2 (temperatura di iniezione 95 °C, 200 kPa, He come carrier).

4.4.1 Determinazione Complessometrica di Ioni Metallici

La determinazione complessometrica degli ioni metallici Ca^{2+}, Mg^{2+} e Fe^{2+} si è svolta seguendo la procedura largamente utilizzata per la valutazione della durezza dell'acqua. La titolazione è volta a determinare una concentrazione di ioni equivalenti di $CaCO_3$. Per gli obiettivi della prova di Corrosione è sufficiente valutare la differenza di ioni prima e dopo il fenomeno di corrosione del Fe°.
Per procedere con la titolazione le soluzioni sono state diluite opportunamente con acqua deionizzata. Per il caso dei sistemi di corrosione con acqua deionizzata, utilizzando una pipetta, sono stati inseriti 5 mL della soluzione in un matraccio e successivamente è stata aggiunta acqua deionizzata fino al raggiungimento del segno corrispondente a 35 mL ottenendo una soluzione con fattore di diluizione 6. Per i sistemi con maggiore presenza di ioni, ad esempio il brodo sintetico, si diluisce con fattore di diluizione 10.

In seguito è stato preparato il beacker da titolazione con:

- 5 mL di soluzione diluita
- 5 mL di tampone ammoniacale
- 30 mL di acqua deionizzata
- 2,5 mL di soluzione a concentrazione nota di (nero eriocromo T) NET.

La soluzione da titolare è stata messa in agitazione utilizzando un miscelatore magnetico impostato a velocità 3. Questa soluzione presentava ioni metallici liberi. Il solido NET ha dato il colore magenta alla soluzione legandosi agli ioni metallici. Il NET, infatti, funge da indicatore metallocromico, meno stabile del complesso metallo-EDTA. La prima titolazione è stata compiuta aggiungendo in maniera graduale pochi mL alla volta in modo da trovare il punto di viraggio della soluzione da magenta ad azzurro. Il viraggio della soluzione, ottenuto in corrispondenza del volume di EDTA necessario a complessare tutti gli ioni Ca^{2+}, Mg^{2+} e Fe^{2+}, è stato visibile quando si è giunti al colore azzurro, in seguito all'eliminazione del complesso NET-ione metallo che dava il colore magenta alla soluzione. La soluzione diluita è stata titolata più volte seguendo la procedura spiegata in precedenza.
Le prime titolazioni sono state utili nella determinazione indicativa del volume di EDTA necessario per visualizzare il viraggio. Successivamente, sono state effettuate diverse titolazioni scegliendo 3 valori di volume di EDTA compresi in un intervallo di +/- 0,2 mL. La Molarità della soluzione standard di EDTA: 0,001. La titolazione è effettuata su prelievi di 5 mL. La concentrazione di ioni metallici equivalenti si determina con la seguente equazione:

$$I^{+} = V_t * M_t * 2 * F_d * 1000/V_p \tag{4.1}$$

dove

$V_t = volume\ mL\ di\ EDTA\ usato\ nella\ titolazione$ [mL]

$M_t = Molarit\grave{a}\ EDTA\ [mol/L]$

$V_p = volume\ mL\ del\ prelievo\ campione\ [mL]$

$F_d = fattore\ di\ diluizione$

4.5 Risultati

4.5.1 Prova di Corrosione

In via preliminare si è testata la misurazione in linea del potenziale RedOx. Mentre si gorgoglia N_2 in acqua si è evinto che dopo un abbassamento iniziale del potenziale RedOx il valore si stabilizza e permane costante indipendentemente dal tempo di flussaggio. La misurazione del potenziale RedOx dei sistemi dopo il flussaggio di N_2 non è stabile. L'elettrodo a disposizione (Pt4805 SC DPASK8S/225 Combination RedOx, METTLER-TOLEDO GmbH, Svizzera) è un elettrodo al gel per sistemi biologici a reologia diversa da quella dell'acqua. I tempi di risposta dell'elettrodo sono molto lenti rispetto all'evoluzione dei sistemi sperimentali messi in prova.
Si è testata la misurazione del potenziale RedOx durante il flussaggio di N_2 in acqua deionizzata e dopo 5 minuti si arriva ad un valore limite di -160 mV oltre il quale è difficile valutare ulteriori decrementi di potenziale. Il valore iniziale e finale considerati alla luce delle prove preliminari si considerano di 300 mV iniziali e – 160 mV finali. Inoltre durante le misurazioni ripetute si evincono effetti di memoria dell'elettrodo. Questi sono eliminabili con lavaggio dello stesso in soluzione acida 0,1 M di HCL.
Da tali prove preliminari si è evinta la difficoltà della misurazione del potenziale RedOx dell'acqua dopo il flussaggio di azoto nei reattori. La misurazione del potenziale nei brodi di fermentazione invece risulta decisamente più agevole dovuta alla composizione del brodo e al suo stato reologico e alla compatibilità dell'elettrodo utilizzato.
In *Tabella 4.2* si riportano i valori di pH iniziale e finale e i risultati delle misurazioni complessometriche. Notiamo come i campioni Fe° 0,5 nT hanno un valore finale di pH = 6,76 maggiore rispetto ai campioni Fe° 0,5 T con un pH = 6,48. Il sistema Fe° 3 nT ha mostrato il valore massimo raggiunto a fine prova, pH = 7,17. Il risultato trova un riscontro consistente nella determinazione complessometrica. Il rilascio di ioni metallici da parte dei granuli di Fe° non trattati è stato maggiore. Il sistema Fe° 3 nT mostra un rilascio di ioni minore rispetto agli altri sistemi, è importante considerare anche il valore di pH_{finale} =7,17 come sarà spiegato in seguito.

Tabella 4.2 *Risultati delle misure della prova di corrosione.*

		Fe° 0,5 nT	***Fe° 0,5 T***	***Fe° 3 nT***	***Brodo Sintetico***
Trattamento		no	si	no	no
Fe [g/L]		0,5	0,5	3	0,5
pH	**iniziale**	5,47 ± 0,2	5,47 ± 0,2	5,47 ± 0,2	6,48 ± 0,4
	finale	6,76 ± 0,3	6,48 ± 0,5	7,17 ± 0,2	6,86 ± 0,2
I^+ [mol/L]		0,13 ± 0,03	0,10 ± 0,02	0,09 ± 0,01	38,65 ± 1,48
Δ I^+ [mol/L]		0,05 ± 0,03	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,02	-18,01 ± 2,63

Dai campioni di brodo sintetico (*Figura 4.5),* si denota il colore e la torbidezza della soluzione dovuta alla sua composizione. Nella titolazione complessometrica si sono riscontrate notevoli difficoltà, principalmente dovute all'individuazione del viraggio, infatti, la presenza di ossidi di ferro e la stessa composizione del brodo rendono il compito assai difficoltoso. Per i sistemi con l'acqua (Fe°0,5nT, Fe°0,5T e Fe°3 nT) la torbidezza della soluzione è dovuta alla formazione di composti della corrosione del ferro, questa però non compromette la misurazione complessometrica. In *Figura 4.5,* si vede come inevitabilmente si deposita ferro sul fondo creando un cumulo e riducendo la superficie esposta, inoltre si possono osservare piccoli aggregati di particelle.

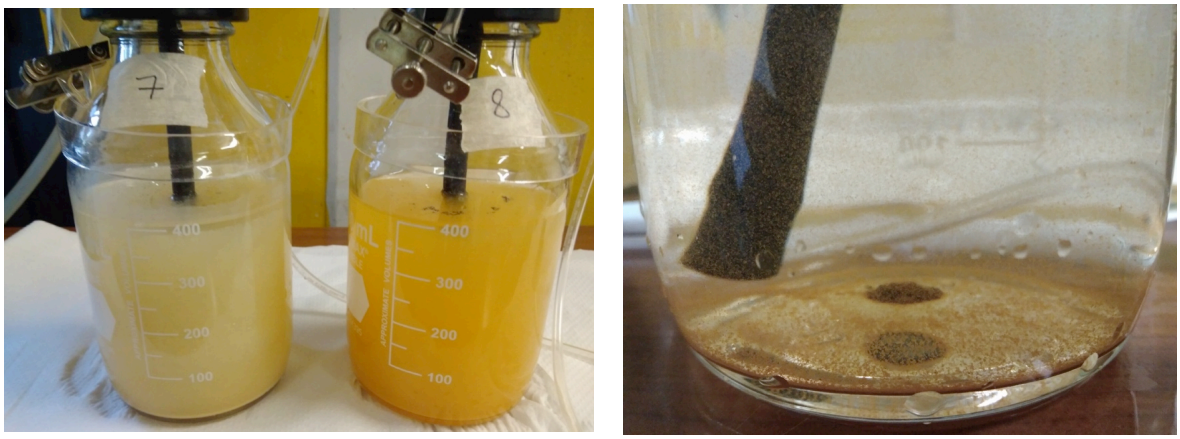

Figura 4.5 *Fotografia di due sistemi di brodo sintetico dopo la prova di corrosione (sinistra); Fotografia del fondo del reattore di un sistema Fe° 0,5 T dopo la prova di corrosione (destra).*

E' possibile visualizzare lo stato iniziale e lo stato finale dei sistemi di corrosione per i due sistemi più significativi nei diagrammi di Pourbaix. In *Figura 4.6,* si vede come i sistemi Fe° 0,5 e Fe° 3 nT, dopo la prova di corrosione anaerobica, evolvono verso zone dove la Magnetite è più favorita. In particolare il sistema Fe ° 0,5 T con ferro trattato si è fermato ad uno stato dove è possibile una ulteriore ossidazione. Ciò si trova in accordo con l'effetto del pretrattamento, infatti rimuovendo i composti ossidati in superficie per azione chimica si rende la superficie meno passivata. Il sistema con ferro trattato (Fe°0,5 T) richiedono un tempo maggiore per raggiungere una condizione di totale passivazione della superficie come il sistema Fe° 3 nT.

Il sistema con ferro non trattato (Fe°3 nT) avendo già uno strato di composti ossidati in superficie dovuto alla esposizione all'aria e alla normale passivazione della superficie, durante il fenomeno corrosivo si è portato alle condizioni termodinamicamente favorevoli per la presenza di Magnetite (Fe_2O_3). Il valore riscontrato nella misurazione di ioni trova qui una valida spiegazione, infatti, il valore di pH finale di 7,17 corrisponde ad una zona nel diagramma di Pourbaix di stabilità termodinamica della Magnetite e quindi segno evidente di scarsa corrosione e conseguentemente poco rilascio di ioni.

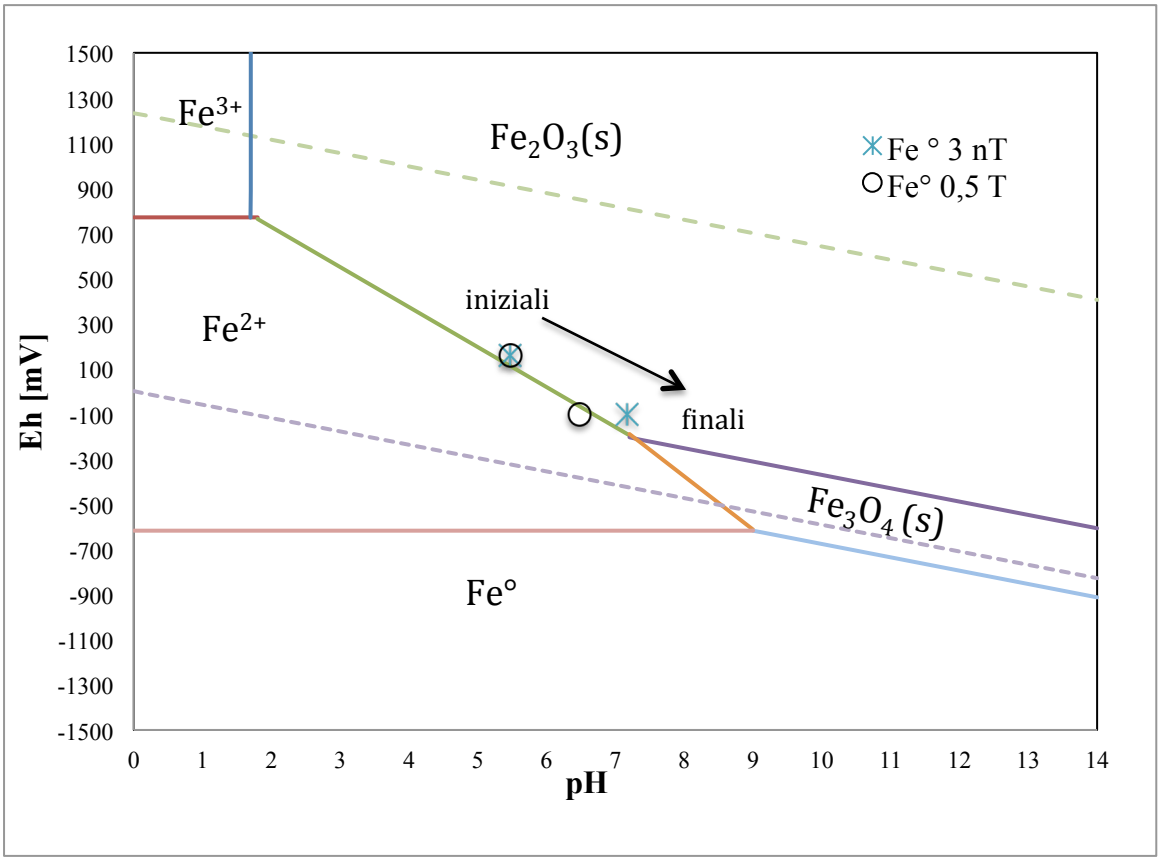

Figura 4.6 *Diagramma di Pourbaix per il sistema Fe°-H_2O, evidenziando le condizioni iniziali e finali per i sistemi Fe° 3 nT e Fe° 0,5 T.*

In *Tabella 4.3* si riportano i volumi raccolti dalle prove di corrosione. Si evince come i sistemi di accumulo dei gas prodotti abbiano avuto efficacia diversa. Nei campioni con siringhe di materiale plastico la raccolta di gas prodotti è stata efficace. Per i campioni con siringhe in vetro non si è riuscito ad avere alcuna lettura. Le siringhe di vetro non sono completamente sigillate e hanno delle perdite.

Tabella 4.3 *Volumi di gas raccolti dalle prove di corrosione.*

	n° campione	***raccolta gas***		***Volume raccolto [mL]***
		siringa vetro	***siringa plastica***	
Fe° 0,5 nT	1		✓	3,5 ± 0,1
	2	✓		
Fe° 0,5 T	3		✓	2,2 ± 0,1
	4	✓		
Fe° 3 nT	5		✓	2,3 ± 0,1
	6		✓	2,3 ± 0,1
Brodo Sintetico	7		✓	16,0 ± 0,1
	8		✓	15,5 ± 0,1

I volumi dei gas prodotti per i sistemi di corrosione anerobica con acqua e aggiunta di Fe° non sono stati sufficienti per procede con l'analisi al gas cromatografo. I campioni costituiti da brodo sintetico invece hanno prodotto una quantità sufficiente ed è stato possibile analizzare i campioni al gas cromatografo. In figura si riporta la composizione dei gas prodotti dai sistemi di corrosione con brodo sintetico. I gas prodotti in prevalenza sono H_2 al 33,18% e CO_2 al 65,89 % per il campione 7 (*Figura 4.9 a*), e H_2 al 38,52 % e CO_2 al 61,45 % per il campione 8 (*Figura 4.9 b*). Tracce di O_2 e N_2 si devono all'aria infiltrata nei tubi durante le operazioni di analisi.

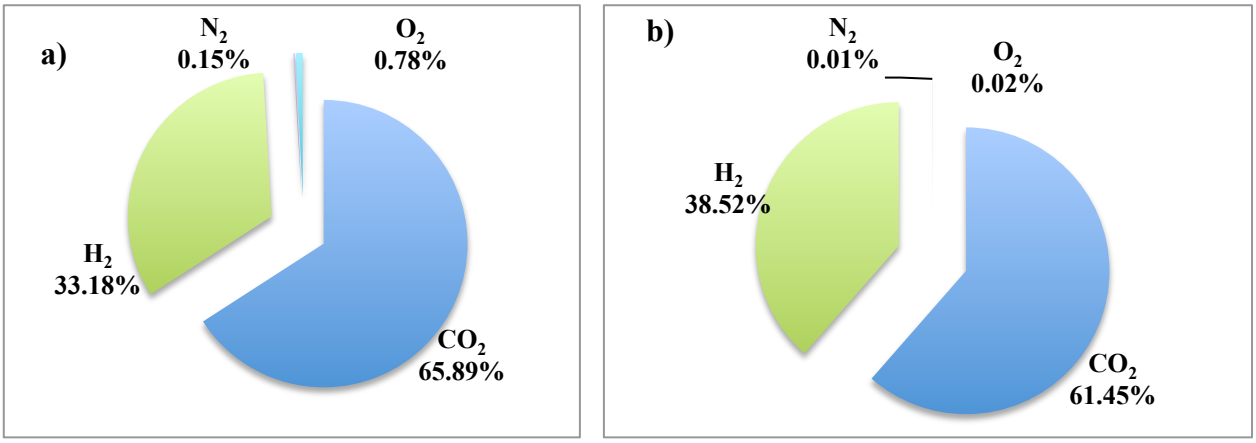

Figura 4.7 *Composizione dei gas prodotti per i sistemi con brodo sintetico: a) campione 7; b) campione 8.*

4.5.1.1 Analisi statistica dati sperimentali

Dopo un'analisi statistica dei risultati delle titolazioni complessometriche possiamo asserire che i sistemi si possono considerare sono diversi. I sistemi sono fuori dalla varianza tra i gruppi con un valore di confidenza *p>0,005*. Si riporta in *Tabella 4.4* l'analisi di varianza ANOVA (*Analysis of Variance*) eseguita sui risultati delle misurazioni delle titolazioni. Il software utilizzato è un plug-in di Microsoft Excel 2011, Statplus.

Tabella 4.4 *Risultati ANOVA per le misure delle titolazioni complessometriche della prova di corrosione.*

Analysis of Variance (One-Way)							
Descriptive Statistics							
Groups	*Sample size*	*Sum*	*Mean*	*Variance*			
Fe ° 0,5 nT	6	0,79	0,13167	0,00062			
Fe ° 0,5 T	6	0,60	0,1000	0,00036			
Fe ° 3 T	6	0,56	0,09333	0,00011			
Total	18		0,10833	0,00061			
ANOVA							
Source of Variation	*d.f.*	*SS*	*MS*	*F*	*p-value*	*F crit*	*Omega Sqr.*
Between Groups	2	0,00503	0,00252	6,96923	0,00724	2,69517	0,39877
Within Groups	15	0,00542	0,00036				
Total	17	0,01045					
Residual standard error	0,019						
Hartley Fmax (d.f. = 3, 5)	5,78125						
Cochran C (d.f. = 3, 5)	0,56923						
Bartlett Chi-square (d.f. = 2)	3,15707	*p-value*	0,20628				

4.5.2 Prova di Corrosione Abiotica

In *Tabella 4.5* si riassumono i risultati complessivi delle misurazioni di pH, delle misurazioni complessometriche di ioni metallici assoluti e la loro variazione dallo stato iniziale (prima della corrosione) allo stato finale (dopo il fenomeno della corrosione). La misurazione del potenziale RedOx dei sistemi è stata possibile principalmente per la tipologia di elettrodo (Pt4805 SC DPASK8S/225 Combination RedOx, METTLER-TOLEDO GmbH, Svizzera). La misurazione risulta stabile e coerente. Si osserva come il sistema ACI 3 abbia avuto un rilascio di ioni metallici inferiore ai sistemi ACI 0,5 e ACI 1,5. Un fattore importante da considerate è il potenziale RedOx finale del sistema ACI 3 è -622 mV. Coerentemente con quanto risultato dalla prova di corrosione, anche nel sistema Fe°3 nT si è avuto uno scarso rilascio di ioni. Nel sistema ACI 3 il fattore limitante è stato il basso valore di potenziale RedOx = -622 mV. Il sistema ACI 1,5 ha un massimo valore di ioni rilasciati ed ha il valore minore di pH tra i sistemi abiotici.

Tabella 4.5 *Risultati delle misurazioni per i sistemi della prova di corrosione abiotica.*

Sistema	I^+ [mol/L]	ΔI^+ [mol/L]	pH Iniziale	pH Finale	Rop [mV]
ACI 0,5	13,92 ± 0,83	2,72 ± 1,59	6,78 ± 0,5	7,55 ± 0,06	-282 ± 125
ACI 1,5	14,64 ± 0,73	3,44 ± 1,49	6,78 ± 0,5	7,51 ± 0,04	-275 ± 60
ACI 3	12,48 ± 0,52	1,28 ± 1,28	6,78 ± 0,5	7,52 ± 0,03	-622 ± 68
WI 1,5	1,86 ± 0,25	1,79 ± 0,30	5,67 ± 0,2	8,11 ± 0,17	-40 ± 28
ACC 0	11,2 ± 0,76	-	6,78 ± 0,5	7,48 ± 0,02	-279 ± 55
BWTT	13,74 ± 0,23	-	6,96 ± 0,5	6,96 ± 0,50	-498 ± 50

Dal Diagramma di Pourbaix in *Figura 4.8* si vede chiaramente che per valori di potenziale RedOx < - 600 mV la specie chimica favorita è il Fe°, ovvero la corrosione non è favorita. Il pH iniziale dei campioni inoltre è importante per la corrosione, se il potenziale RedOx è compreso tra -600 mV e +600 mV, infatti è il pH a determinare l'evoluzione del sistema verso il rilascio di ioni Fe^{2+} o verso la Magnetite Fe_2O_3.
I sistemi ACI 0,5 e ACI 1,5 con potenziali RedOx rispettivamente di - 282 mV e - 275 mV sono stati più favoriti al rilascio di ioni metallici, infatti il loro pH finale si colloca nella zona del diagramma di Pourbaix dove è favorita la specie Fe^{2+}, quindi è favorita la corrosione.

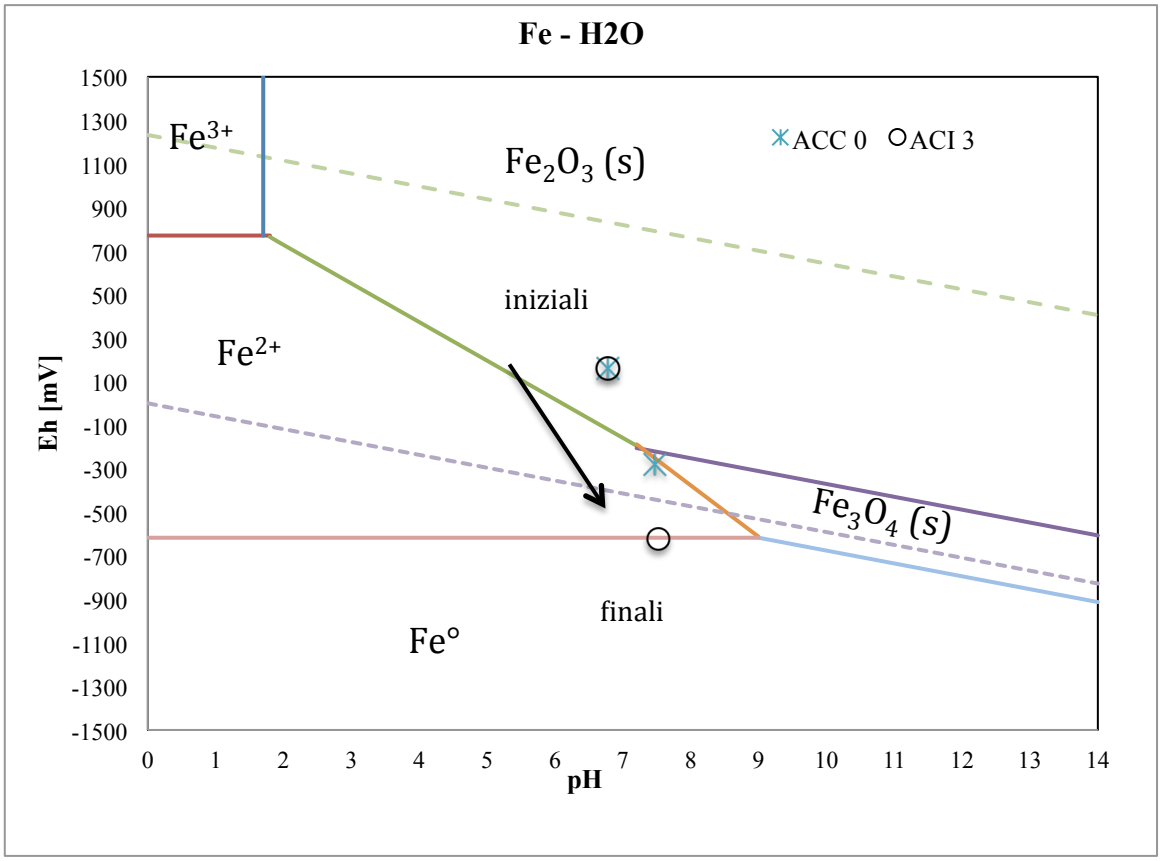

Figura 4.8 *Diagramma di Pourbaix per il sistema Fe°-H_2O, evidenziando le condizioni iniziali e finali per i sistemi ACC 0 e ACI 3.*

L'aumento dell'aggiunta di Fe° non determina un aumento del valore di ioni metallici misurati. Dai campioni di brodo si denota la difficoltà nella determinazione complessometrica dovuta all'eccessiva quantità di ioni in soluzione e alla torbidezza della soluzione, nonché alla presenza di molteplici specie chimiche che interferiscono con la misurazione. La difficoltà maggiore risiede nell'individuazione del viraggio, infatti la presenza di ossidi di ferro e la stessa composizione del brodo rendono il compito assai difficoltoso.

La misurazione del volume gas prodotto non ha dato risultati misurabili. Le velocità di produzione dei sistemi è molto inferiore alla sensibilità dello strumento AMPTS. Non è stato possibile prelevare alcun campione per l'analisi al gas cromatografo. Si inserisce in tabella anche il valore dei parametri misurati nella prova per un brodo senza trattamento termico (BWTT). L'obiettivo è di dare un riferimento rispetto i campioni analizzati. Si vede come il valore di ioni presenti in soluzione è superiore ai sistemi ACI 1,5 e ACI 3. Il trattamento termico provoca dei cambiamenti nella composizione del brodo; alla temperatura di 80 °C precipitano molti composti e altri polimerizzano cambiandone la composizione. Inoltre si mostra come l'incertezza della misurazione dovuta a molteplici fattori renda la misura complessometrica di ioni effettivamente poco attendibile in senso assoluto, ma è valida ai fini comparativi.

4.5.2.1 Analisi statistica dati sperimentali

Si esegue un'analisi statistica dei risultati delle titolazioni complessometriche e possiamo asserire che i sistemi considerati sono diversi. I sistemi sono fuori dalla varianza tra i gruppi con una confidenza *p>0,0005*. Si riporta in *Tabella 4.6* i risultati dell'ANOVA eseguita sui risultati delle misurazioni delle titolazioni.

Tabella 4.6 *Risultati dell'ANOVA per le misurazioni per le prove di corrosione abiotica.*

Analysis of Variance (One-Way)							
Descriptive Statistics							
Groups	*Sample size*	*Sum*	*Mean*	*Variance*			
ACI 0,5	6	83,52	13,92	0,6912			
ACI 1,5	6	87,84	14,64	0,64512			
ACI 3	6	74,88	12,48	0,3456			
Total	18		13,68	1,34852			
ANOVA							
Source of Variation	*d.f.*	*SS*	*MS*	*F*	*p-value*	*F crit*	*Omega Sqr.*
Between Groups	2	14,5152	7,2576	12,94521	0,00054	2,69517	0,57031
Within Groups	15	8,4096	0,56064				
Total	17	22,9248					
Residual standard error	0,74876						
Hartley Fmax (d.f. = 3, 5)	2,						
Cochran C (d.f. = 3, 5)	0,41096						
Bartlett Chi-square (d.f. = 2)	0,61583	*p-value*	0,73498				

5 Prove Sperimentali per la Produzione di H_2 in presenza di Fe°

5.1 Introduzione

Negli ultimi anni l'idrogeno è considerato un vettore energetico di notevole interesse. L'aumento di attenzione verso le emissioni da parte degli idrocarburi ha reso l'idrogeno una valida alternativa energetica. Le emissioni a basso impatto, la possibilità di ottenimento da molte fonti naturali rendono l'idrogeno un candidato ideale come vettore energetico sostenibile. Ad oggi la maggior parte della produzione di idrogeno avviene per reforming del metano e per via elettrolitica. La produzione di idrogeno attraverso microorganismi può offrire una valida opportunità per la valorizzazione di rifiuti organici e l'utilizzo di risorse rinnovabili. La fermentazione anaerobica per la produzione di idrogeno, può essere una opzione valida per la gestione dei rifiuti organici. I rifiuti che soddisfano requisiti di degradabilità, disponibilità, contenuto in carboidrati possono essere utilizzati come materia per la produzione di bio-idrogeno. Alle necessità di produrre idrogeno, si è accoppiato anche il nuovo approccio nella digestione anaerobica di condurre la fermentazione in due stadi. I due stadi del processo si conducono in due reattori differenti. I reattori separano il metabolismo di due consorzi microbici differenti, I microorganismi produttori di idrogeno e i microorganismi consumatori di idrogeno. La fermentazione anerobica associa alla produzione di idrogeno, la produzione di altri metaboliti come gli acidi organici, acido acetico, butirrato cosi come altri composti che sono metabolizzati dai metanigeni nel secondo stadio. La separazione delle due fasi, permette di condurre le due fasi alle rispettive migliori condizioni di pH, temperatura, agitazione e potenziale RedOx. Le specie microbiche coinvolte nella prima fermentazione sono *Clostridia*. Il genere *Clostridium* rappresenta circa il 70% del consorzio microbico per la produzione di idrogeno, invece la specie *Bacillus* il 14% [12]. I batteri acidogenci sono anche dei batteri che riducono il substrato producendo idrogeno e acidi volatili. Alcuni acetogeni utilizzano l'idrogeno per produrre acetato, in un processo detto omoacetogenico. Nell'ultima fase i batteri membri del genere *Archaea* come i *Methanobacteriales, Methanococcales, Methanosarcinales, Methanomicrobiales* producono metano. Vi è un legame sintropico tra i due consorzi microbici. L'associazione dei metanigeni idrogenitropici e gli acetogeni produttori di idrogeno favorisce un metabolismo tra le specie energeticamente favorevole verso la produzione di metano.

Un parametro molto importante della fermentazione per la produzione di idrogeno è il pH. Il campo dei valori ottimali di pH è 5,0 – 6,5. Recenti studi hanno evidenziato come il controllo del pH sia un fattore chiave per l'aumento delle rese e della produttività di idrogeno. Per valori di pH < 4,5 i metabolismi deviano verso la solventogenesi arrestando completamente la produzione di idrogeno. Per valori di pH = 4,5, l'idrogenasi è inattiva. L'idrogenasi è un enzima a cui si associa un complesso metallo proteico Fe-S, la Ferrodossina coinvolta nel metabolismo del trasporto degli elettroni e capace di ridurre protoni H^+ a H_2. In un consorzio microbico di batteri produttori di idrogeno, per valori di pH = 5,8 l'attività dell'idrogenasi è 2,2 volte maggiore di quella dell'attività di una coltura analoga a pH =4,5 [13]. Si evidenzia che l'attività dell'enzima idrogenasi e della disponibilità della Ferrodossina sono fondamentali per la produzione di idrogeno.

Nel corso degli ultimi anni lo studio di metalli zero valenti come supplemento per i sistemi biologici desta molto interesse, in particolar modo nella digestione anaerobica. Originariamente si pensava che la presenza di alcuni metalli fosse inibente per l'attività microbica, ora invece si cerca di spiegare il miglioramento dovuto all'aggiunta di metalli zerovalenti ai brodi di fermentazione. L'interazione microbica con i metalli zero valenti ancora non è del tutto chiara. La presenza di innumerevoli ceppi microbici e altrettanti enzimi rende il problema di difficile comprensione. I miglioramenti registrati nei vari studi riguardano sia la composizione del gas prodotto, ovvero vedono un arricchimento in idrogeno o metano ma anche la riduzione di tempi di latenza. I primi studi in letteratura (2013) dimostrano che piccole dosi di Fe° nano strutturato aumentano la produzione di CH_4 del 10% [14]. Altri studi hanno ottenuto miglioramenti del 60% di resa con un dosaggio maggiore di 20 g/L di Fe° nano strutturato. Molti studi hanno evidenziato i miglioramenti dovuti non solo all'aggiunta di Fe°, ma anche all'effetto di altri metalli come cobalto, nickel e magnetite. Per questi metalli si è registrato un effetto di biostimolazione. Uno studio di particolare interesse è stato condotto da Meng et al. [15] dove è stata osservata una stimolazione della degradazione del propionato in acetato nella fermentazione per la produzione di idrogeno dall'aggiunta di Fe°. Il risultato dello studio suggerì che l'aggiunta di Fe° e la generazione di ioni Fe^{2+} come prodotti della corrosione, potrebbero essere correlati all'aumento significativo dell'attività di metallo-proteine contenenti Fe. In particolare l'attività del Piruvato: Ferrodossina Ossidoriduttasi che ha dei siti attivi a base di Fe-S, coinvolti nella produzione d'idrogeno in diversi percorsi metabolici.

5.2 Obiettivi

In questo capitolo si vuole valutare il miglioramento in termini di volume di gas prodotto da una coltura fermentativa idrolitica per effetto dell'aggiunta di Fe°. Si conducono due prove sperimentali in parallelo, una prova volta a valutare l'effetto delle concentrazioni crescenti di Fe° sulla produzione di H_2. La seconda prova invece ha come obiettivo la valutazione della produzione di H_2 data dalla capacità dei microorganismi di adattamento ad un ambiente con rilascio di ioni Fe^{2+} dovuti alla corrosione.

5.3 Materiali e Metodi

5.4 Preparazione e Pretrattamento del Substrato

5.4.1 Preparazione del Substrato

Il substrato utilizzato è recuperato dalla frazione organica vegetale degli scarti mercatali. La frazione vegetale degli scarti del mercato rionale di Racconigi (Torino) è stata raccolta manualmente selezionando una vasta tipologia di frutta e verdura come mostrato in *Figura* 5.1. La varietà delle specie vegetali è variabile, poiché dipende dalla stagionalità dei prodotti, quindi non è possibile ottenere un substrato identico a ogni sua preparazione.

Figura 5.1 *Fotografia di un campione di frutta e verdura raccolti nel mercato rionale di Racconigi (Torino).*

Tuttavia data l'origine del substrato, la composizione chimica varia in funzione della varietà di frutta e verdura raccolta e quindi in funzione della stagione in cui si prepara il substrato. Il substrato è stato preparato con uno sminuzzamento manuale usando dapprima un coltello da cucina. Si è cercato di rimuovere parti eccessivamente lignocellulosiche. Queste vengono degradate con maggiore difficoltà. Si esegue un successivo trattamento meccanico in un frullatore domestico Dolcevita da 600 W (Imetec Tenacta Group S.p.a., Bergamo, Italia) fino al raggiungimento di una omogeneità accettabile. Il passaggio nel frullatore prevede l'aggiunta di substrato sminuzzato e un volume di acqua in rapporto 1:1. In tabella 5.2 si riportano il valori nutrizionali medi della frutta e verdura utilizzati per questa preparazione, i dati sono tratti dalla banca dati della *United States Department of Agriculture Agricultural Research Service USDA Food Composition Databases* [5][b] . La diluizione con acqua porta ad un substrato meno concentrato in solidi volatili (SV g/L) e solidi totali (ST g/L), ma con il vantaggio che può essere facilmente pompato con una pompa peristaltica. Inoltre la diluizione agevola lo sminuzzamento al frullatore, evitando un eccessivo riscaldamento del motore elettrico. Si è ottenuto cosi un composto omogeneo dalla frazione organica vegetale da scarti mercatali pronto per le prove di biodegradazione. Si riportano in *Tabella 5.1* le concentrazione di solidi totali ST g/L e solidi volatili SV g/L del substrato non trattato (nT), e del substrato dopo il pretrattamento basico (dPB).

Tabella 5.1 *Composizione del substrato utilizzato per le prove di produzione di H_2.*

	ST [g/L]	SV [g/L]	ceneri [g/L]
substrato nT	67,19 ± 1,69	62,87 ± 1,65	4,32 ± 0,28
substrato dPB	64,95 ± 0,81	51,46 ± 0,85	13,64 ± 1,77

Tabella 5.2 *Valori medi su base annua dei valori di composizione delle varietà di frutta e verdura secondo USDA Food Composition Databases [5]*[b].

#	*Costituenti*	Massa [g]	Acqua [g]	Proteine [g]	Grassi [g]	Zuccheri [g]	Fibre [g]	Ferro [g]	Acqua aggiunta [g]
1	*Ananas*	297,43	254,8	1,11	0,36	28,80	4,16	8,6E-04	300
2	*Spinaci*	301,8	274,8	8,13	1,18	0,77	6,64	8,2E-03	300
3	*Peperoni dolci*	336,19	309,0	2,83	1,01	13,62	7,06	1,4E-03	350
4	*Banane*	308,39	230,0	2,86	1,02	37,22	8,02	8,0E-04	300
5	*Patate*	405	320,0	7,80	0,36	2,82	8,51	3,3E-03	600
6	*Pomodori*	278,24	262,0	1,95	0,56	6,82	3,34	7,5E-04	250
7	*Mele*	364,38	310,8	0,45	0,62	37,36	8,75	4,4E-04	350
8	*Mango*	286,91	238,5	1,85	1,09	38,69	4,59	4,6E-04	300
9	*Cetrioli*	198,26	187,8	0,79	0,22	2,81	0,99	5,6E-04	200
10	*Kiwi*	259,92	214,9	2,46	1,35	22,87	7,80	8,1E-04	250
11	*Melanzane*	259,09	238,1	2,04	0,47	8,65	7,77	6,0E-04	550
12	*Carote*	232,14	204,0	1,66	0,56	10,50	6,50	7,0E-04	350
13	*Limes, raw*	62,8	54,4	-0,06	0,13	0,56	1,76	3,8E-04	100
16	*Cipolle*	156,32	138,3	1,22	0,16	6,13	2,66	3,3E-04	150
17	*Cavolo*	147,62	133,3	2,45	0,15	2,85	4,58	5,9E-04	150
18	*Sedano*	88,73	83,7	0,11	0,15	0,69	1,42	1,8E-04	100
19	*Peperoncino piccante*	38,43	2,1	4,12	6,64	3,47	10,45	3,0E-03	150
20	*Pesche*	344,51	305,2	2,64	0,86	28,40	5,17	8,6E-04	350
21	*Pere*	239,11	199,8	0,36	0,33	22,81	7,41	4,3E-04	250
22	*Uva da tavola*	101,9	91,2	0,20	0,10	6,95	1,12	6,1E-05	100
23	*Susine*	156,75	135,7	0,60	0,44	15,05	2,19	2,7E-04	150
24	*Lattuga*	114,64	107,9	1,06	0,17	0,39	1,49	9,9E-04	400
25	*Melone giallo*	226,46	207,0	2,01	0,23	12,39	2,04	7,7E-04	250
26	*Melone di pane*	259,35	232,8	1,68	0,49	19,88	2,33	5,4E-04	250
TOTAL		5464,37	4736,01	50,31	18,62	330,50	116,74	0,027	6500
% (w/w)		100%	86,67%	0,92%	0,34%	6,05%	2,14%	0,00050%	54,33%

5.4.2 Pretrattamento Basico

Il substrato preparato può essere utilizzato tal quale, ma da recenti studi, si è evidenziato come un pretrattamento basico diminuisca le fasi di latenza dei microorganismi e aumenti i volumi di gas prodotto (Luongo M. 2015). Si è condotto un trattamento basico portando il volume di substrato da utilizzare ad una temperatura di 40 °C e ad pH = 12, usando NaOH in granuli. Per favorire lo scioglimento dei granuli di soda si è miscelato per 30 min a 200 rpm. Gli effetti del trattamento basico coinvolge la frazione lignocellulosica delle fibre vegetali. La lignina e l'emicellulosa, per effetto di reazioni di saponificazione, aumentano la porosità, aumentando la superficie interna, diminuendo il grado di polimerizzazione e anche il grado di cristallinità delle molecole vegetali. Il trattamento basico rompe i legami strutturali dei carboidrati e della lignina rendendo più disponibile il materiale organico ai microorganismi e aumentando la biodegradabilità del substrato. In questo lavoro si parlerà sempre di substrato considerando che questo è stato pretrattato. Il substrato è riportato a pH neutro prima del suo utilizzo nelle prove.

5.5 Preparazione dell'Inoculo

5.5.1 Preparazione dell'Inoculo Primitivo per la Produzione di H_2

Il consorzio microbico utilizzato come inoculo per le prove di produzione di idrogeno utilizzate in questo lavoro è dominato dalla specie *Clostridia*. Esistono molti metodi per arricchire la presenza di *hydrogen producing bacteria HPB* quali acidificazione, basificazione, congelamento e molti altri [12]. L'inibizione dei batteri metanigeni si ottiene tramite il trattamento acido di letame bovino. Il letame bovino tal quale è ricco di microorganismi metanigeni ed è necessario procedere con un trattamento per inibire l'attività dei microorganismi consumatori di idrogeno. Si è filtrato per rimuovere le parti organiche non digerite, come paglia e residui lignocellulosici. Si procede portando il letame filtrato a T = 35°C, pH = 3 con una soluzione 3M di HCl per 24 ore. Si valutano le condizioni iniziali del letame tal quale, valutando SV (g/L) e ST (g/L). Il letame trattato è stato utilizzato come inoculo per una coltura a prevalenza di *HPB* dall'accrescimento di questa si preleva un volume di 300 mL e si utilizza come inoculo di HPB per l'avvio delle prove di produzione di idrogeno. In *Tabella 5.3* le concentrazini di SV e ST dell'inoculo HBP e del Letame tal quale.

Tabella 5.3 *Concentrazione di SV e ST per l'inoculo HPB e il letame t.q. utilizati nella prova di produzione di H_2.*

	ST [g/L]	SV [g/L]
inoculo HPB	6,625 ± 0,13	3,34 ± 0,29
Letame bovino t.q.	130,76 ± 5,50	117,15 ± 5,30

5.5.2 Preparazione dell'Inoculo Stabilizzato e Adattato al Fe°

L'inoculo adattato alla presenza di Fe° è stato frutto di un lavoro molto complesso che in questa sede si decide di descrivere per sommi capi. Si prepara una coltura per la produzione di idrogeno, utilizzando l'inoculo di microorganismi fermentativi. Come substrato di coltura si utilizza il substrato pretrattato dalla frazione organica vegetale degli scarti mercatali. L'obiettivo è ottenere una coltura di microorganismi stabili e il cui metabolismo sia predisposto alla degradazione del substrato utilizzato in queste prove. E' necessario un tempo di adattamento per permettere ai microorganismi di attivate i percorsi metabolici per la degradazione del substrato. In analogia all'adattamento per il substrato, anche per il Fe° è necessario un tempo di adattamento per attivare percorsi metabolici alternativi e sistemi di regolazione per il rilascio di enzimi in presenza di Fe°. Per adattare i microorganismi al substrato utilizzato sono state condotte 3 prove batch in un reattore biologico da 2 L (Minifors, INFORS HT, Svizzera) mostrato in *Figura 5.3*. Con queste prove preliminari si è giunti al raggiungimento di un consorzio microbico stabile e capace di degradare il substrato da scarti mercatali.

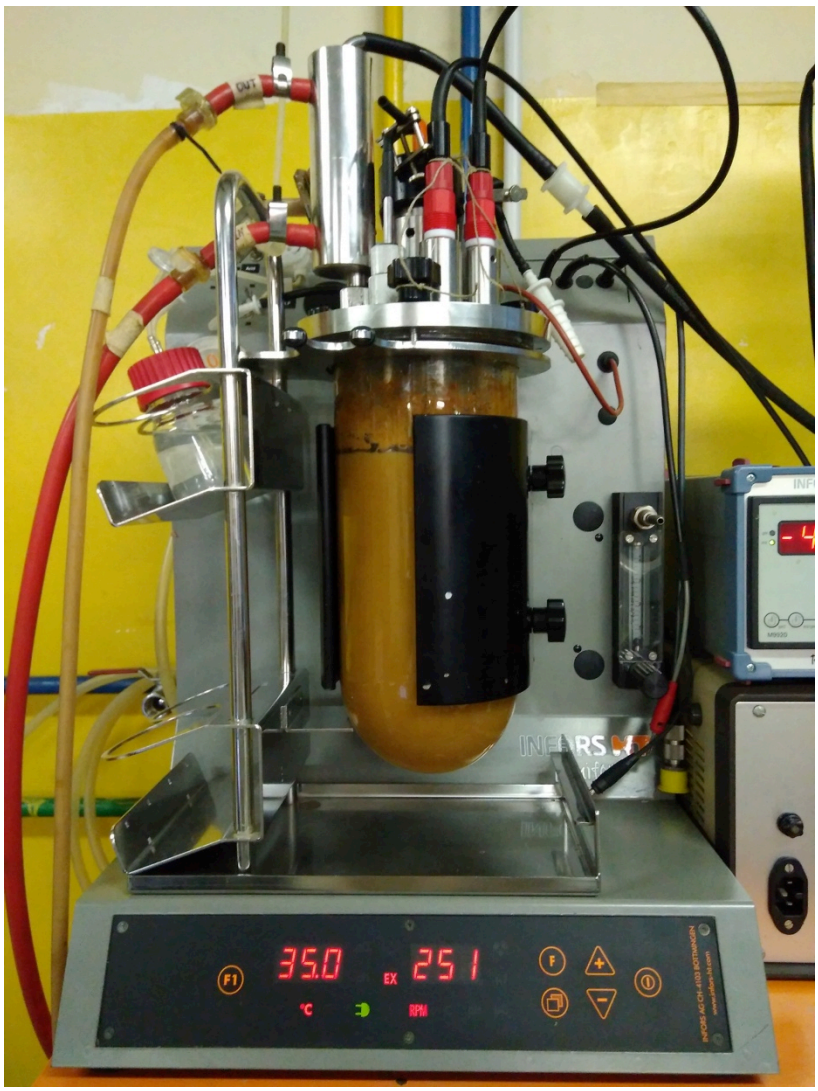

Figura 5.2 *Fotografia del bioreattore Minifors durante la fase di preparazione dell'inoculo adattato.*

Per il raggiungimento di una coltura esposta a Fe° e conseguentemente a Fe^{2+} si effettua una prova batch. Le prove sperimentali batch si eseguono conducendo una fermentazione per circa 5 giorni fino al raggiungimento della velocità di produzione di idrogeno prossime a 0,001 L/h.
Una prova batch di fermentazione prevede l'avvio della prova con inoculo di *hydrogen producing bacteria* HPB e substrato, seguito da un flussaggio di N_2 per il raggiungimento delle condizioni anaerobiche. Si monitorano in linea, volume di gas prodotto, pH, potenziale RedOx e agitazione. Segue la fase di produzione di idrogeno e al termine della prova si preleva un volume di 500 mL di brodo fermentato e si alimenta con un volume analogo di substrato fresco dando inizio al secondo batch. La prova è stata ripetuta per tre cicli ripristinando i valori di ST iniziali. Al terzo ciclo di produzione di idrogeno si è prelevato un campione di 500 mL del brodo di fermentazione come inoculo stabilizzato (IS). Per la prova relativa all'inoculo adattato al Fe°, è stata effettuata una prova batch con l'aggiunta di Fe° 1,5 g/L e al primo ciclo si è prelevato un campione di 500 mL del brodo di fermentazione come inoculo adattato al Fe°. Si riporta in *Tabella 5.4* i valori di ST e SV del substrato e dell'IS e inoculo adattato al Fe°.

Tabella 5.4 *Condizioni iniziali del substrato, dell'inoculo (IS) e dell'inoculo adattato.*

Condizioni iniziali				
	ST [g/L]	**SV [g/L]**	**T °C**	**pH**
Substrato	64,95 ± 0,34	48,83 ± 0 ,63	35 ± 1	4,6 ± 0,2
Inoculo stabilizzato IS	49,04 ± 0,75	23,06 ± 0 ,53	35 ± 1	5,88 ± 0,2
Inoculo adattato Fe°	48,26 ± 0,34	30,78 ±0 ,33	35 ± 1	6,24 ± 0,2

5.6 Procedura Sperimentale

5.6.1 Produzione di H_2

Si utilizzano dei reattori da 500 mL per la produzione di idrogeno. Si è preparato il brodo di fermentazione usando l'inoculo stabilizzato (IS), l'inoculo adattato al Fe° e il substrato (S). I sistemi considerati hanno cinque tipi di configurazione differenti come mostrato in *Tabella 5.5*. La prima configurazione costituisce il sistema di controllo, dove è presente solo il substrato e l'inoculo stabilizzato. Le tre configurazioni successive prevedono l'IS e il substrato con l'aggiunta di Fe° a tre concentrazioni differenti, 0,5 g/L, 1 g/L e 2 g/L. Il quinto sistema è composto dall'inoculo adattato al Fe° con l'aggiunta di Fe° a concentrazione di 1 g/L. Le prove si conducono in triplicato, e in modalità batch. Il volume di brodo di ogni reattore è di 155 mL. Si dosano inoculo e substrato in modo da ottenere 5,76 g sV aggiunti per ogni sistema tra inoculo e substrato. Si riportano in *Tabella 5.5* le condizioni operative della prova. Il rapporto tra solidi volatili aggiunti dall'inoculo (I) e i solidi volatili aggiunti dal substrato (S), ovvero I/S, è di 0,42.

Tabella 5.5 *Condizioni sperimentali dei sistemi in prova per la produzione di H_2.*

Sistema	IS [mL]	IA Fe° [mL]	S [mL]	$SV_{aggunti}$ Inoculo [g]	$SV_{aggiunti}$ S [g]	I/S
Control	71,96	-	83,04	1,706	4,055	0,42
Fe° 0,5	71,96	-	83,04	1,706	4,055	0,42
Fe° 1	71,96	-	83,04	1,706	4,055	0,42
Fe° 2	71,96	-	83,04	1,706	4,055	0,42
Fe° 1 adapted		71,96	83,04	1,659	4,055	0,41

Si è aggiunto un volume di 10 mL di buffer a pH =7,4. La temperatura è controllata dal bagno termostatico dell'AMPTS II 35 °C. Si monitora la produzione di gas in linea con l'unità di misurazione dell'AMPTS da remoto. L'uscita di gas di ogni reattore è collegata ad un assorbitore di CO_2, quindi si attende prevalentemente H_2. Le prove si considerano avviate quando si è flussato N_2 in ogni reattore per 5 minuti. Si garantisce così l'assenza di O_2 in testa ai reattori favorendo la presenza dei microorganismi anaerobi. A prova terminata, si preleva un campione di gas in testa al reattore e si valuta la composizione. Le prove si considerano terminate quando la produzione di gas termina, ovvero quando la velocità di produzione è prossima a 1 ml/h. L'agitazione è controllata da remoto tramite il software AMPTS azionata a 180 rmp e intervallata da 600 secondi di agitazione e 300 secondi di pausa. Gli *HPB* necessitano di un corretto bilanciamento tra gli sforzi di taglio (dovuti all'agitazione) e la necessita di rimuovere l'H_2 prodotto in prossimità della loro membrana cellulare, infatti ad elevate concentrazioni di idrogeno la loro attività è inibita. Si richiede quindi un degassamento del brodo di coltura attraverso una intensa agitazione. In *Tabella 5.6* si riportano le condizioni iniziali della prova sperimentale.

Tabella 5.6 *Condizioni sperimentali di SV e ST dei sistemi in prova per la produzione di H_2.*

	Condizioni Iniziali			
	ST [g/L]	**SV [g/L]**	**T [°C]**	**pH**
Control	52,29 ± 0,57	37,16 ±0,33	35 ± 1	7,4 ± 0,2
Fe ° 0,5	52,29 ± 0,57	37,16 ±0,33	35 ± 1	7,4 ± 0,2
Fe ° 1	52,29 ± 0,57	37,16 ±0,33	35 ± 1	7,4 ± 0,2
Fe° 2	52,29 ± 0,57	37,16 ±0,33	35 ± 1	7,4 ± 0,2
Fe ° 1 adapted	57,55 ± 0,75	36,85 ±0,54	35 ± 1	7,4 ± 0,6

5.7 Misure Analitiche

Si sono misurate le condizioni iniziali e finali del substrato, dell'inoculo adattato al Fe° e dell'inoculo stabilizzato (IS). I solidi totali e solidi volatili sono stati valutati con la procedura standard dell'*APAH* [16]. Il pH è stato misurato con il pH-metro CONSORT P903 (LAISS Apparecchi Scientifici, Torino, Italia) e con l'elettrodo (HA405-DXK-S8, Mettler Toledo). Per la misurazione del gas prodotto si monitora in linea da remoto tramite l'unità di misurazione dell'AMPTS. Per la misurazione dei parametri relativi alle prove

preliminari per la preparazione dell'inoculo, si utlizza il Software Iris ® della INFORS HT e le apparecchiatura di controllo del reattore Minifors I (INFORS HT, Svizzera). La composizione del gas prodotto in testa ai reattori è stata analizzata tramite gas cromatografo off-line Varian Micro-GC CP-4900.

5.8 Analisi dei Dati

Si costruisce una curva di regressione dai dati ottenuti per via sperimentale da un modello di produzione cumulativa di gas. Nel campo della digestione anaerobica il modello più adottato è il Gompertz modificato:

$$G = G_{max} * \ exp\left\{-exp\left[\frac{R_{max}*e}{G_{max}}(\lambda - t) + 1\right]\right\} \qquad (5.1)$$

dove G rappresenta il volume cumulativo della produzione di H_2 nel tempo in condizioni standard (NmL). R_{max} (NmL/h) corrisponde alla velocità massima di produzione di H_2. G_{max} (NmL) è la quantità totale di gas prodotto e λ (h) è il tempo di latenza o adattamento *(lag phase)*. Per stimare i parametri R_{max}, G_{max} e λ si modella la curva sperimentale di ogni prova con l'eq (5.2), si ricavano i parametri a, b, e x_0 e con le formule (5.1.21-3) si arriva ai parametri della Gompertz. Si segue la stessa procedure per tutti i sistemi, su ogni curva sperimentale e successivamente si mediano i valori dei parametri ricavati. Si utilizza il software Sigma Plot v10.01 per la procedura best-fit.

Le curve si modellano con l'equazione:

$$f = a * \exp\left\{-\exp(-\frac{x-x_0}{b})\right\} \qquad (5.2)$$

da cui si ricavano i parametri della (5.1) con le seguenti equazioni:

$$\lambda = x_0 - b \qquad (5.1.1)$$

$$R_{max} = \frac{a}{e*b} \qquad (5.1.2)$$

$$G_{max} = a \qquad (5.1.3)$$

5.9 Valutazioni Energetiche

Il parametro usato per valutare l'efficienza energetica della fermentazione per la produzione di idrogeno è *l'efficienza di conversione energetica* (η) [17]. Per poter considerare l'efficienza della digestione anaerobica, o di uno dei suoi stadi, è necessario considerare l'energia prodotta che si può estrarre dal substrato dopo il pretrattamento e dopo la bioreazione rispetto all'energia disponibile contenuta nel substrato. Con l'energia prodotta (E_p) si intende l'energia espressa come idrogeno o metano, invece l'energia iniziale (E_0) è l'energia del substrato. Si definisce η come di seguito:

$$\eta = \frac{E_p}{E_0} \qquad (5.3)$$

Dove E_p rappresenta l'energia totale prodotta come idrogeno o metano, ed E_0 rappresenta l'energia iniziale contenuta nel substrato. L'energia prodotta E_p è facilmente calcolabile, valutando la concentrazione media di H_2 e CH_4 nel gas e considerando in condizioni standard i volumi prodotti. Si moltiplica per i rispettivi valori di potere calorifico, ovvero LHV (*lower heating value)*, per l'idrogeno di 239,20 kJ/mol e per il metano di 800,32 kJ/mol. La difficoltà risiede nel calcolo dell'energia iniziale E_0 contenuta nel substrato. Per il calcolo di E_0 è necessario considerare solo l'energia presente nel substrato che è disponibile per i microorganismi. I microorganismi non riescono ad utilizzare tutta l'energia presente nei legami delle molecole energetiche del substrato per la produzione di idrogeno o metano. Una parte di quella energia è utilizzata per il loro metabolismo e riproduzione.

5.10 Risultati

5.10.1 Condizioni sperimentali

In *Tabella 5.7* si riportano i valori di SV e ST dei sistemi in prova.

Tabella 5.7 *Condizioni sperimentali finali per le prove di produzione di H_2.*

	Condizioni finali			
	sT [g/L]	**sV [g/L]**	**T [°C]**	**pH**
Control	48,37 ± 0,37	29,49 ± 2,05	35 ± 1	4,6 ± 0,2
Fe ° 0,5	49,43 ± 0,23	30,99 ± 1,66	35 ± 1	4,8 ± 0,4
Fe ° 1	49,83 ± 0,39	32,29 ± 1,75	35 ± 1	4,4 ± 0,4
Fe° 2	50,36 ± 0,32	32,69 ±1,47	35 ± 1	4,5 ± 0,3
Fe ° 1 adapted	53,58 ± 0,38	33,69 ± 1,30	35 ± 1	4,5 ± 0,4

I risultati della acquisizione dati *in line* dell'AMPTS sono riportati in *Figura 5.3*. Il primo aspetto da evidenziare è la mancanza di una fase di latenza prima dell'avvio della produzione. I sistemi hanno iniziato a produrre idrogeno praticamente in maniera istantanea. Si nota anche dall'andamento dei grafici in *Figura 5.3,* come ci sia un andamento differente

per il sistema inoculo adattato (IA) al Fe°, sia per il quantitativo di gas prodotto ma anche per l'andamento della curva. Infatti le velocità istantanee di produzione R(t) [NmL/h] corrispondono alle derivate calcolate su due punti della curva. In Tabella si riporta il massimo del valore di produzione R_{max} e il valore della valocità di produzione dopo un tempo t= 1h dall'inizio della prova. Dalla *Tabella 5.8* di vede come la velocità di produzione di gas R(t) per i sistemi Fe° 0,5, Fe° 1e Fe° 2 al tempo t =1 h sono circa 0,5 volte la velocità iniziale del sistema con IA Fe°. Il sistema con l'Inoculo adattato è partito con una velocità di produzione di 8,17 NmL/h, circa 2,15 volte il sistema di controllo. Invece il tempo necessario al raggiungimento della velocità massima di produzione (fase esponenziale) per il sistema IA Fe° è stato il minore con un t = 3,67 h. La fase esponenziale corrisponde al punto massimo di attività metabolica dei microorganismi. In questa fase i microorganismi hanno la massima velocità di replicazione e corrispondentemente la massima velocità di produzione di gas. Per i sistemi con l'IS, i tempi per il raggiungimento della fase esponenziale aumentano all'aumentare della concentrazione di Fe° aggiunta. D'altro canto, all'aumentare della concentrazione di Fe° aggiunto aumenta il valore assoluto della velocità di produzione.

Tabella 5.8 *Dati sperimentali di velocità di produzione R(t) al tempo t=1 h e R_{max} sperimentali dei sistemi per la produzione di H_2.*

	Dati sperimentali			
	R(t) [NmL/h]	t [h]	R_{max} [NmL/h]	t [h]
Control	3,80 ± 0,51	1	7,43 ± 0,06	4,91 ± 0,80
Fe ° 0,5	4,13 ± 0,15	1	7,60 ± 0,44	5,58 ± 0,57
Fe ° 1	4,47 ± 0,70	1	8,33 ± 0,23	6,16 ± 0,29
Fe° 2	5,20 ± 0,30	1	8,43 ± 0,55	6,83 ± 0,29
Fe ° 1 adapted	8,17 ± 0,49	1	11,07 ± 0,93	3,67 ± 0,95

5.10.2 Risultati sperimentali di produzione di H_2

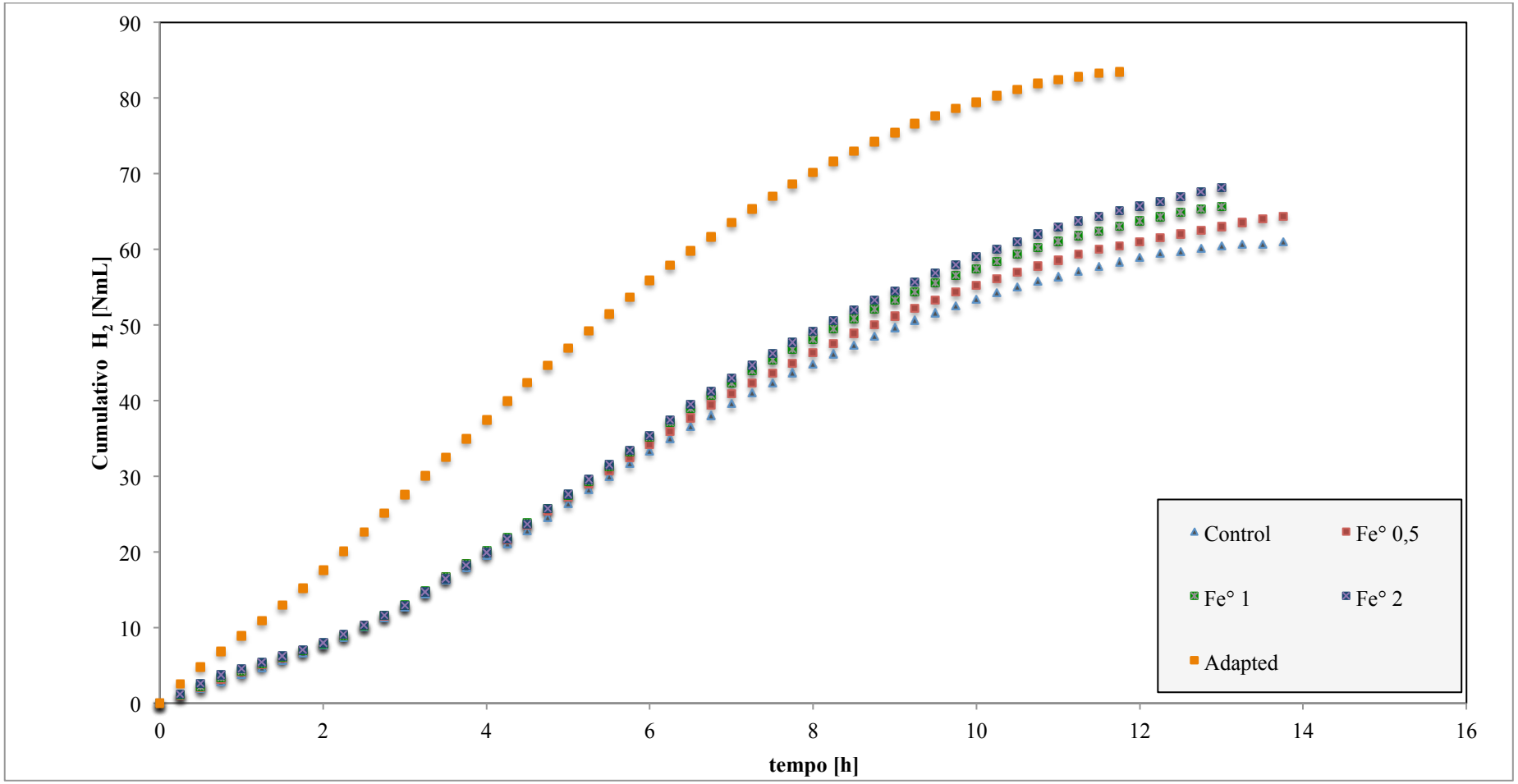

Figura 5.3 *Dati sperimentali dei sistemi in prova per la produzione di H_2.*

In *Tabella 5.9* si riportano i parametri utilizzati per la costruzione del modello di Gompertz con l'equazione (5.2). L'equazione è stata utilizzata per la costruzione dei grafici presentati in *Figura 5.4*.
In *Tabella 5.10* si confrontano i dati sperimentali e i dati ricavati dal modello. Il modello di Gompertz prevede la presenza di una fase di latenza per i sistemi, ma in realtà nella nostra prova la produzione di H_2 non è presente un tempo di latenza.

Tabella 5.9 *Parametri della modellazione Gompertz per i sistemi in prova per la produzione di H_2.*

	Control	Fe° 0,5	Fe° 1	Fe° 2	Fe° 1 adattato
a	65,66	69,60	72,82	76,31	90,55
b	3,43	3,55	3,54	3,65	3,17
x_0	4,68	4,79	4,87	5,03	3,64

L'inizio della fase di fermentazione, di fatto, è avvenuta durante il procedimento di preparazione dei sistemi e durante la fase di avviamento dei sistemi. Il tempo per la preparazione è stato maggiore di 1 h, e avendo utilizzato degli inoculi molto attivi sicuramente, già durante la fase preparativa i sistemi producevano gas, ma non è stato possibile valutare tale produzione. E' evidente che il sistema con l'inoculo adattato al Fe° abbia delle prestazioni migliorate in relazione alla quantità di gas prodotta e al minor tempo di latenza. Si può ipotizzare che ci sia un effetto non trascurabile dovuto alla presenza di Fe° nei sistemi; ancora più marcato è l'effetto quando i microorganismi sono sottoposti ad ambiente con Fe°. L'idea di adattare i microorganismi alla presenza di Fe° infatti trova in questi risultati una valida conferma che sicuramente vi è uno slittamento dei percorsi metabolici dovuti al Fe°.

Tabella 5.10 *Dati sperimentali delle curve di produzione di H_2 e parametri dalla modellazione della Gompertz modificata.*

	Dati sperimentali		Gompertz		
	R_{max} [NmL/h]	**G_{max} [NmL]**	**R_{max} [NmL/h]**	**G_{max} [NmL]**	**λ [h]**
Control	7,43 ± 0,06	61,00 ± 1,68	7,03 ± 0,36	65,66 ± 2,17	1,25 ± 0,04
Fe ° 0,5	7,60 ± 0,44	64,40 ± 1,93	7,22 ± 0,28	69,60 ± 2,16	1,24 ± 0,02
Fe ° 1	8,33 ± 0,23	65,63 ± 1,00	7,57 ± 1,03	72,82 ± 4,21	1,33 ± 0,15
Fe° 2	8,43 ± 0,55	68,13 ± 2,29	7,70 ± 1,45	76,31 ± 6,74	1,38 ± 0,24
Fe ° 1 adapted	11,07 ± 0,93	83,47 ± 1,10	10,52 ± 1,74	90,54 ± 6,60	0,47 ± 0,06

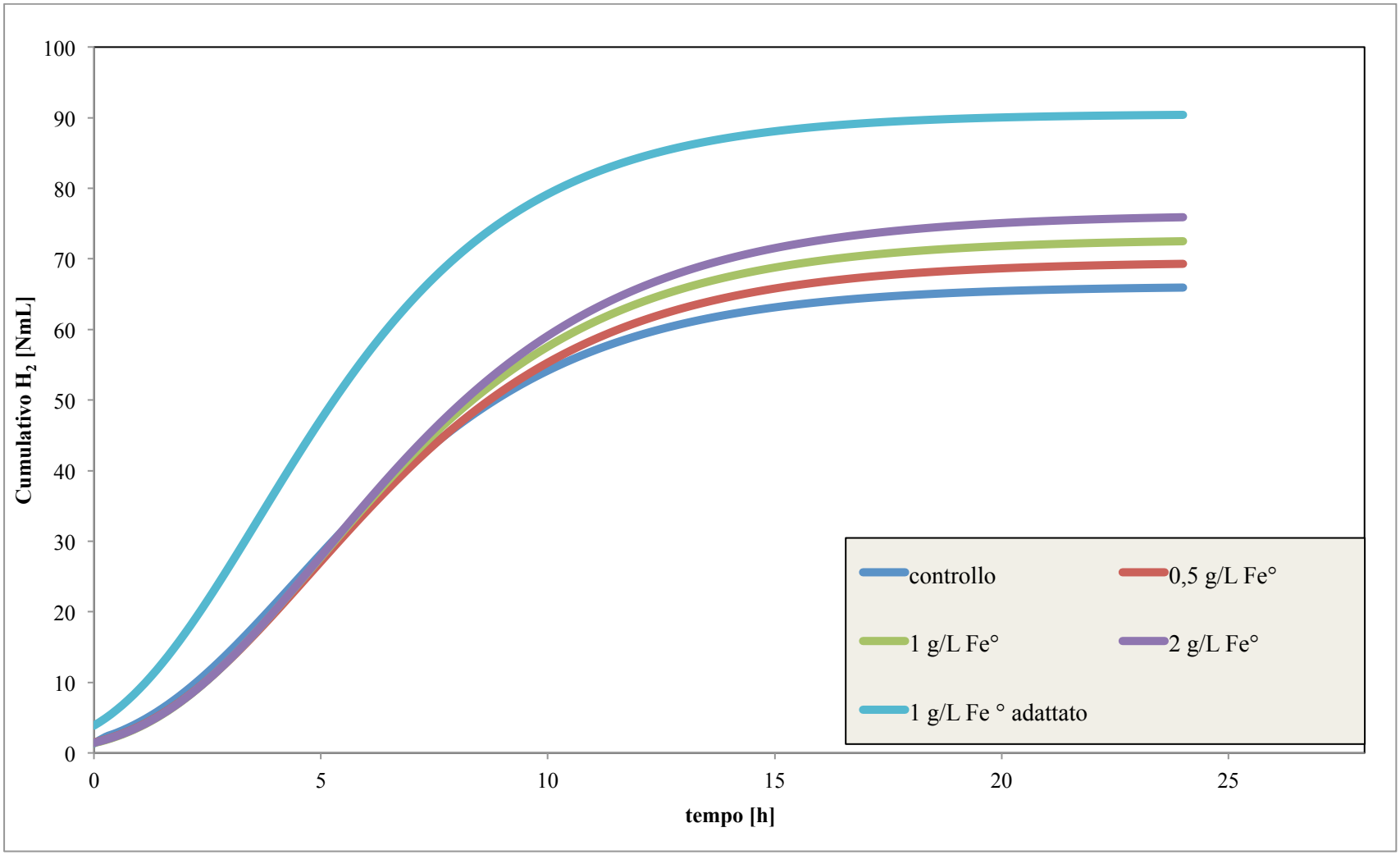

Figura 5.4 *Curve di modellazione per la produzione di H_2 con eq. 5.1 e parametri in Tabella 5.9.*

5.10.3 Valutazioni energetiche

In *Tabella 5.7* si presenta la valutazione energetica della prima fermentazione. Il volume prodotto (V_p) è calcolato in condizioni standard come volume prodotto su litro di brodo di fermentazione. L'Energia prodotta E_p corrisponde al volume di H_2 prodotto, tradotto in moli e moltiplicato per il LHV dell'idrogeno. L'Energia specifica E_s è calcolata come energia prodotta su litro di brodo di fermentazione. L'Energia iniziale E_0 calcolata come l'energia disponibile per i microorganismi data dalla variazione dei SV (g/L) iniziali e SV (g/L) finali. I solidi volatili si possono considerare, rispetto ai ST, come la frazione del contenuto solido più degradabile. In questo caso l'abbassamento dei SV è dovuto principalmente alla degradazione da parte di microorganismi, ma non tutta quella energia è utilizzata per la sola produzione di gas. Inoltre, i microorganismi durante la produzione accrescono la loro massa, quindi è ancora un calcolo che non tiene conto dell'energia usata per il metabolismo, l'efficienza η in % è calcolata come in *equazione 5.3*.

Tabella 5.11 *Dati della valutazione energetica per le prove di produzione di H_2.*

	V_p [NL/L]	E_p [kJ]	E_s [kJ/L]	Δ sV [g/L]	E_0 [kJ/Δ g sV]	η [%]
Control	0,3935	0,651	4,200	7,67	21,068	3%
Fe ° 0,5	0,4155	0,687	4,434	6,17	16,947	4%
Fe ° 1	0,4234	0,700	4,519	4,87	13,377	5%
Fe° 2	0,4395	0,727	4,691	4,47	12,278	6%
Fe ° 1 adapted	0,5385	0,891	5,747	3,18	8,735	10%

5.10.4 Analisi statistica dei dati sperimentali

Dopo un'analisi statistica dei risultati del volume cumulativo di gas (G_{max}) delle prove, possiamo asserire che i sistemi non si possono considerare diversi. Il valore di confidenza *è* $p > 0,394$. Si riporta in *Tabella 5.12* l'analisi di varianza ANOVA eseguita sui risultati delle misurazioni del massimo valore di gas prodotto per i sistemi Controllo, Fe° 0,5, Fe° 1 e Fe° 2. Includendo nello studio anche il sistema con L'IA al Fe° si ha una risposta positiva del test, infatti questo è un sistema diverso quindi non poteva essere incluso nell'analisi.

Tabella 5.12 *ANOVA per i dati di* G_{max} delle prove di produzione di H_2.

Analysis of Variance (One-Way)							
Descriptive Statistics							
Groups	*Sample size*	*Sum*	*Mean*	*Variance*			
Controllo	3	196,9973	65,66577	4,73634			
Fe ° 0,5	3	208,9365	69,6455	4,69175			
Fe ° 1	3	206,9245	68,97483	17,75456			
Fe ° 2	3	213,9947	71,33157	45,4278			
Total	12		68,90442	17,82028			
ANOVA							
Source of Variation	*d.f.*	*SS*	*MS*	*F*	*p-value*	*F crit*	*Omega Sqr.*
Between Groups	3	50,80222	16,93407	0,93287	0,46833	2,9238	-0,01707
Within Groups	8	145,22091	18,15261				
Total	11	196,02313					
Residual standard error	4,26059						
Hartley Fmax (d.f. = 4, 2)	9,68247						
Cochran C (d.f. = 4, 2)	0,62564						
Bartlett Chi-square (d.f. = 3)	2,9822	*p-value*	0,39438				

6 Prove sperimentali per la produzione di CH_4 con supplemento di Fe°

6.1 Introduzione

Molti studi hanno confermato una interazione tra i metalli zero valenti e consorzi microbici. Si vuole dare un chiarimento sull'effetto diretto o indiretto del Fe° sull'attività dei batteri metanigeni ed in particolare l'effetto macroscopico nella digestione anaerobica. Nelle prove di corrosione abiotica e nelle prove di produzione di idrogeno con aggiunta di Fe°, si cercava di valutare l'effetto su microorganismi fermentativi, ora invece l'attenzione si estende anche ai produttori di metano e consumatori di idrogeno.
In letteratura sono innumerevoli gli studi che parlano di aumento dell'attività biologica, in particolare delle capacità sinergiche del Fe° e di alcuni batteri nella rimozione di inquinanti. Come riportato da Hamilton [1], si è dimostrato che batteri utilizzatori di H_2 accelerano la corrosione anaerobica. I batteri utilizzando l'idrogeno prodotto dalla corrosione del Fe° spostano l'equilibrio della reazione di corrosione anaerobica verso la progressiva corrosione, accelerando il processo. La disponibilità di H_2 fornito dalla corrosione aumenta l'attività enzimatica dei batteri favorendo il metabolismo e la rimozione di inquinanti. Allo stesso modo si cerca di capire il meccanismo di miglioramento di produzione di metano CH_4 dall'aggiunta di Fe°. Alcuni batteri metanigeni possiedono un particolare enzima extracellulare, il quale in presenza di Fe°, viene secreto con maggiore abbondanza [2].
In questo capitolo, descriveremo le prove di fermentazione anaerobica in modalità batch con aggiunta di Fe°. In questa fase della sperimentazione si è utilizzato un inoculo da un digestore anaerobico termofilo industriale (ACEA Pinerolese Energia S.r.l., Pinerolo, Italia). Il substrato utilizzato è prodotto da scarti organici vegetali.

6.2 Materiali e Metodi

6.3 Preparazione e Pretrattamento del Substrato

6.3.1 Preparazione del Substrato

Per le prove di produzione di CH_4, si prepara il substrato da rifiuti vegetali. Il substrato è composto da scarti di frutta e verdura stagionali, recuperati manualmente da un mercato rionale di Racconigi (Torino). Inizialmente si è sminuzzato con un coltello da cucina e si rimuovono le parti più lignocellulosiche. La rimozione delle parti lignocellulosiche è dovuto al tempo previsto di digestione, nei digestori anaerobi industriali la fermentazione si conduce in continuo, e i tempi di permanenza sono di circa 20- 30 gg dando tempo ai microorganismi per degradare i composti più fibrosi. Inoltre, la presenza di parti fibrose causa il surriscaldamento del motore del frullatore impiegato nella fase successiva. Segue un ulteriore trattamento meccanico, che consiste nel passaggio in frullatore fino al raggiungimento di un composto fluido e omogeneo. Ogni passaggio nel frullatore dei pezzetti sminuzzati è aiutato con l'aggiunta di acqua in modo da facilitare l'azione

meccanica. Si valutano la concentrazione di solidi totali e solidi volatili dopo il pretrattamento.

6.3.2 Pretrattamento Basico del Substrato

Il pretrattamento al substrato è volto a ridurre i tempo di degradazione da parte dei microorganismi. Si è condotto un trattamento basico portando il volume di substrato a pH = 12 e a T = 35°C per 24 h usando NaOH in granuli. Si procede con una fase di miscelazione, in modo da favorire l'omogeneizzazione del composto e lo scioglimento della soda, per un tempo di 30 min a 200 rpm. La composizione dei rifiuti utilizzati è complessa e variegata, ciò è dovuto alla presenza di molecole. In *Tabella 6.1* si riportano i dati del substrato.

Tabella 6.1 *Valori di ST e SV prima e dopo il pretrattamento del substrato per la prova di produzione di CH_4.*

	sT [g/L]	sV [g/L]	ceneri [g/L]
substrato nT	67,19 ± 1,69	62,87 ± 1,65	4,32 ± 0,28
substrato dPB	64,95 ± 0,81	51,46 ± 0,85	13,64 ± 1,77

6.4 Preparazione dell'Inoculo

6.4.1 Preparazione dell'Inoculo Metanigeno

In questa fase sperimentale si è utilizzato un inoculo proveniente da un digestore anaerobico (ACEA Pinerolese Energia S.r.l., Pinerolo, Italia) a conduzione termofila di 55 °C. L'inoculo è stato trasportato in contenitori sigillati ed evitando bruschi sbalzi termici che avrebbero portato all'indebolimento dei microorganismi termofili. La scelta della temperatura a cui condurre la prova è da ricondursi alla disponibilità di inoculo metanigeno attivo, che in questo caso è termofilo. In *Tabella 6.2* la concentrazione in SV e ST dell'inoculo termofilo.

Tabella 6.2 *Valori di ST e SV dell'inoculo termofilo metanigeno.*

	sT [g/L]	sV [g/L]	ceneri [g/L]
Inoculo Termofilo	23,76 ± 0,33	15,77 ± 0,57	8,00 ± 0,44

6.5 Procedura Sperimentale

6.5.1 Produzione di CH_4

Si utilizzano dei reattori da 500 mL per la produzione di metano con supplemento di Fe°. Si è preparato il brodo di fermentazione usando l'inoculo metanigeno termofilo in cinque tipi di configurazione differenti. La prima configurazione costituisce il sistema di controllo, dove è presente solo il substrato e l'inoculo termofilo. Le configurazioni successive prevedono l'inoculo termofilo e il substrato con l'aggiunta di Fe° a diverse concentrazioni, 0,25 g/L, 0,5 g/L, 1 g/L e 2 g/L. In *Tabella 6.3* si riporta la condizione del brodo di fermentazione per tutti i sistemi.

Tabella 6.3 *Valori di ST e SV per il brodo di fermentazione per le prove di produzione di CH_4.*

	ST [g/L]	SV [g/L]	ceneri [g/L]
Brodo di Fermentazione	36,49 ± 0,22	24,52 ± 0,14	11,97 ± 0,09

Le prove si conducono in triplicato, e in modalità batch. Il volume di brodo di ogni reattore è di 400 mL. Si dosano inoculo e substrato in modo da ottenere un rapporto tra inoculo e substrato di solidi totali aggiunti di 0,92. Si riportano in *Tabella 6.4* le condizioni sperimentali iniziali.

Tabella 6.4 *Condizioni sperimentali per i sistemi per la prova di produzione di CH_4.*

	Inoculo [mL]	Substrato [mL]	$SV_{aggunti}$ I [g]	$SV_{aggiunti}$ S [g]	I/S
Control	117,14	292,86	4,62	6,03	0,77
Fe ° 0,25	117,14	292,86	4,62	6,03	0,77
Fe ° 0,5	117,14	292,86	4,62	6,03	0,77
Fe° 1	117,14	292,86	4,62	6,03	0,77
Fe ° 2	117,14	292,86	4,62	6,03	0,77

In letteratura è possibile trovare dei valori ottimali tra aggiunta di solidi volatili da inoculo e da substrato. Questi valori si possono associare al rapporto tra microorganismi e materiale organico utilizzato come medium di coltura. Si è aggiunto un volume di 10 mL di buffer a pH =7,4 per evitare di far precipitare il pH a causa dell'attività dei microorganismi fermentativie procurare la morte dei microorganismi metanigeni. La temperatura è controllata dal bagno termostatico dell'AMPTS a 55 °C.. L'uscita di gas di ogni reattore è collegata ad un assorbitore di CO_2, il gas misurato sarà prevalentemente H_2 e CH_4. Le prove si considerano avviate quando si è flussato N_2 in ogni reattore per 5 minuti. Si garantisce così l'assenza di O_2 in testa ai reattori favorendo la presenza dei microorganismi anaerobi. A prova terminata si preleva un campione di gas in testa al reattore e si valuta la composizione. Le prove si considerano terminate quando la produzione di gas termina, ovvero quando la velocità di produzione è prossima a 1 NmL/h. L'agitazione è controllata da remoto tramite il software AMPTS azionata a 100 rmp dei e intervallata da 600 secondi

di agitazione e 300 secondi di pausa. La scelta della velocitò di agitazione è basata sul fatto che specie microbiche per la produzione di metano sono molto sensibili agli sforzi di taglio impressi dagli agitatori. Gli agitatori utilizzati non procurano degli sforzi eccessivi. Si predilige quindi una agitazione blanda per favorire la crescita dei microorganismi metanigeni.

6.6 Misure Analitiche

Si sono misurate le condizioni iniziali e finali del substrato, dell'inoculo adattato e dell'inoculo stabilizzato. I solidi totali e solidi volatili sono stati valutati con la procedura standard dell'*APHA*.

6.7 Analisi dei Dati

Si costruisce una curva di regressione dai dati ottenuti per via sperimentale da un modello di produzione cumulativa di gas come già riportato nella *Sezione 5.8*. E' possibile costruire una curva di regressione di tipo saturativo del primo ordine. Si modellano i dati sperimentali con un modello del primo ordine secondo l'equazione (5.6):

$$f = \frac{B_{\max 1} * x}{K_{d1} + x} \qquad (5.6)$$

L'equazione 5.6 rappresenta l'evoluzione del volume cumulativo della produzione di CH_4 nel tempo in condizioni standard (NmL). Dove B_{max1} (NmL) è la quantità massima di gas prodotto. La costante di saturazione K_{d1} corrisponde al tempo necessario per produrre il 50% della massima produzione di gas.
Si segue la stessa procedure per tutti i sistemi, su ogni curva sperimentale e successivamente si mediano i valori dei parametri ricavati. Si utilizza il software Sigma Plot per la procedura best-fit.

6.1 Valutazioni Energetiche

Si eseguono le valutazioni energetiche come riportato in *Sezione 5.9*.

6.2 Risultati

6.2.1 Condizioni Sperimentali

In *Tabella* 6.5 si riportano i valori di delle misurazioni complessometriche, il pH e Potenziale RedOx dopo il termine della prova.

Tabella 6.5 *Risultati delle misurazioni complessometriche per i campioni per le prove di produzione di CH_4.*

	I^+ [mol/eq]	pH finale	Rop [mV]
Control	6,24 ± 0,68	7,82 ± 0,03	- 395 ± 11,35
Fe ° 0,25	6,08 ± 0,27	7,76 ± 0,03	- 408 ± 8,08
Fe ° 0,5	6,84 ± 0,17	7,78± 0,01	- 418 ± 4,35
Fe° 1	8,40 ± 1,55	7,83 ± 0,04	- 400 ± 4,00
Fe ° 2	8,96 ± 1,00	7,84 ± 0,03	- 447 ± 23,00

Dalla *Tabella 6.6* si può notare come la fermentazione abbia portato ad una buon livello di degradazione del substrato. Infatti, vi è stata una forte diminuzione di SV [g/L] per tutti i sistemi. Ciò si deve al rapporto di I/S inpigato e all'attività elevata dell'inoculo.

Tabella 6.6 *Dati delle condizioni finali in termini di variazione di SV e ST.*

	ST [g/L]	SV [g/L]	Δ ST [g/L]	Δ SV [g/L]	Δ SV/ Δ ST [%]
Control	21,78 ± 0,42	10,45 ± 0,15	14,71	14,05	96%
Fe ° 0,25	22,37 ± 0,52	10,29 ± 0,14	14,12	14,02	99%
Fe ° 0,5	22,00 ± 0,27	10,61 ± 0,34	14,49	13,88	96%
Fe° 1	22,08 ± 0,12	10,43 ± 0,12	14,41	14,06	98%
Fe ° 2	22,17 ± 0,23	10,41 ± 0,19	14,32	14,08	98%

Dai risultati ottenuti nelle prove per la produzione di CH_4, i sistemi non di differenziano molto. Infatti, le velocità di produzione R_{max} dei sistemi sono tutte entro la deviazione standard (*Tabella 6.7*). Non è possibile asserire nulla sull'effetto del Fe° cosi come era stato fatto per la produzione di H_2. Allo stesso modo per la produzione massima G_{max}.
Anche dalla *Figura 6.1* si nota come i dati dei sistemi in prova si sovrappongano. Solo il sistema di controllo mostra una produzione minore per un certo tempo, da t = 40 a t = 60.

Tabella 6.7 *Dati estrapolati dalle curve sperimentali per la produzione di CH_4.*

	Dati sperimentali	
	R max [NmL/h]	**G max [NmL]**
Control	85,03 ± 3,80	2584,3 ± 3,6
Fe ° 0,25	87,23 ± 3,41	2546,4 ± 29,3
Fe ° 0,5	87,30 ± 3,63	2558,3 ± 41,8
Fe° 1	88,20 ± 0,56	2590,0 ± 17,6
Fe ° 2	87,56 ± 3,62	2563,0 ± 16,1

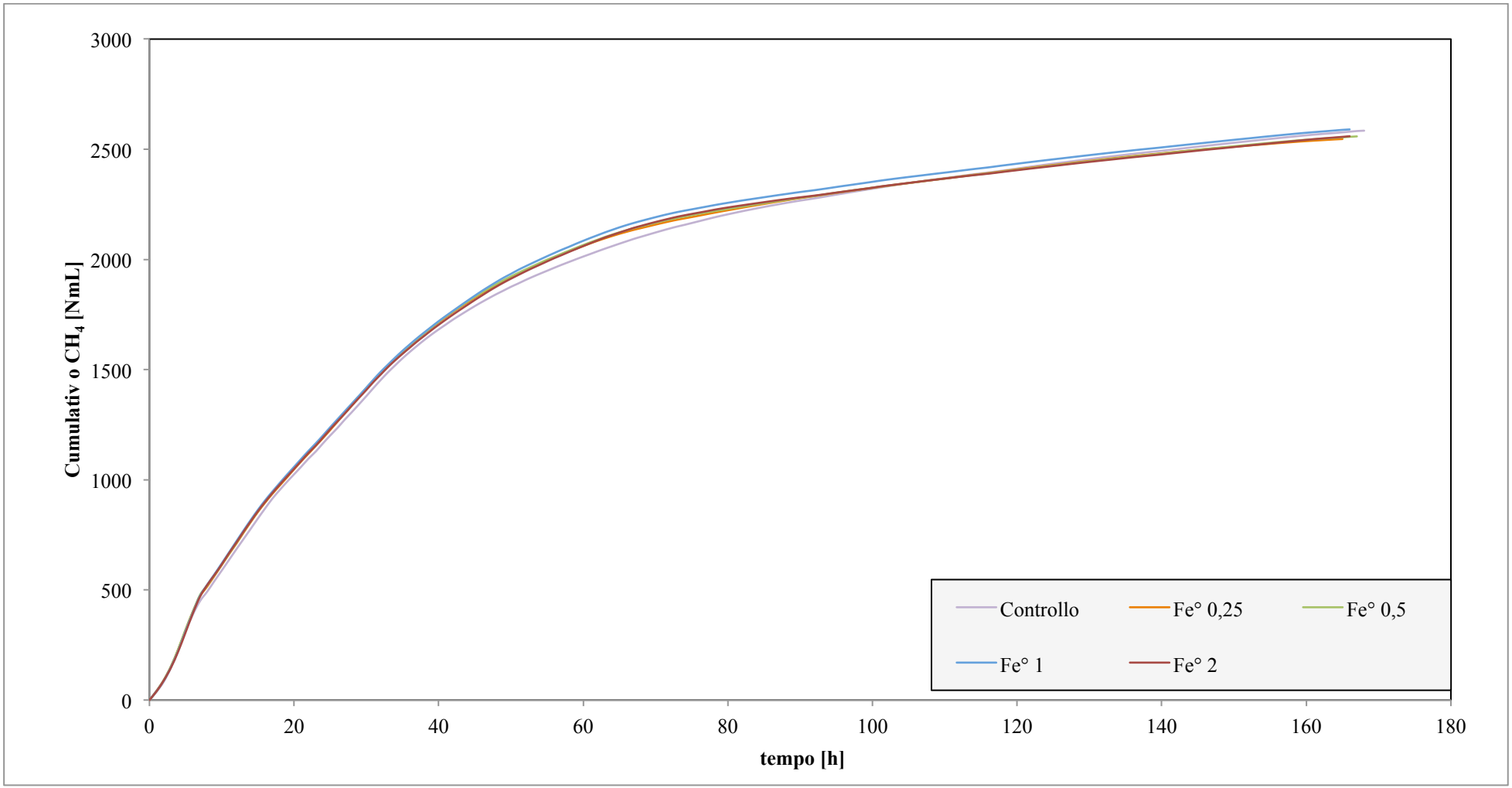

Figura 6.1 *Dati sperimentali per la produzione di CH_4.*

6.2.2 Modello produzione di CH_4: Gompertz

Dalla regressione dei dati sperimentali adottando il modello di Gompertz si ottengono i parametri esposti in *Tabella 6.8.*

Tabella 6.8 *Parametri dalla modellazione Gompertz dei dati sperimentali per la produzione di CH_4.*

	Control	Fe° 0,25	Fe° 0,5	Fe° 1	Fe° 2
a	2473,27	2448,49	2452,34	2483,62	2453,22
b	24,67	22,87	22,89	23,13	23,01
xo	18,68	17,78	17,73	17,97	17,87

Dalla *Tabella 6.9* si nota che i tempi di *lag phase* hanno valori negativi. Un tempo negativo non ha alcun significato fisico.

Tabella 6.9 *Parametri biologici della Gompertz dalle prove di produzione di CH_4.*

Control		Fe° 0,25	Fe° 0,5	Fe° 1	Fe° 2
λ [h]	-5,99	-5,09	-5,16	-5,16	-5,14
G_{max} [NmL]	2473,27	2448,49	2452,34	2483,62	2453,22
R_{max} [NmL/h]	36,88	39,39	39,41	39,50	39,22

Si può spiegare dal fatto che l'andamento previsto per il modello adottato deve comprendere una fase in cui la produzione di gas sia pari a 0. Questa fase corrisponde alla *lag phase*. una fase in cui la velocità aumenta fino al raggiungimento di un massimo, che corrisponde alla fase di crescita esponenziale e anche una fase dove la velocità decresce asintoticamente fino allo 0. Tale andamento è atteso dalla fermentazioni anaerobica nelle condizioni di ottimo operativo. Nel caso in esame l'andamento della curva di produzione ha una velocità iniziale molto alta da 50 – 80 NmL/h. Dalla *Figura 6.2* possiamo osservare l'andamento della velocità di produzione R [NmL/h] che corrisponde alla derivata della curva dei dati di gas cumulativo. Si nota come, dopo il picco di velocità di produzione, ci sia una lenta diminuzione nella velocità di produzione.
Dalla *Figura 6.2* si nota come la velocità di produzione da dati sperimentali sia molto lontana dall'andamento descritto dalla derivata della Gompertz. Conseguentemente le curve utilizzate per descrivere l'andamento della produzione con il modello gompertz non descrive correttamente il fenomeno in esame.

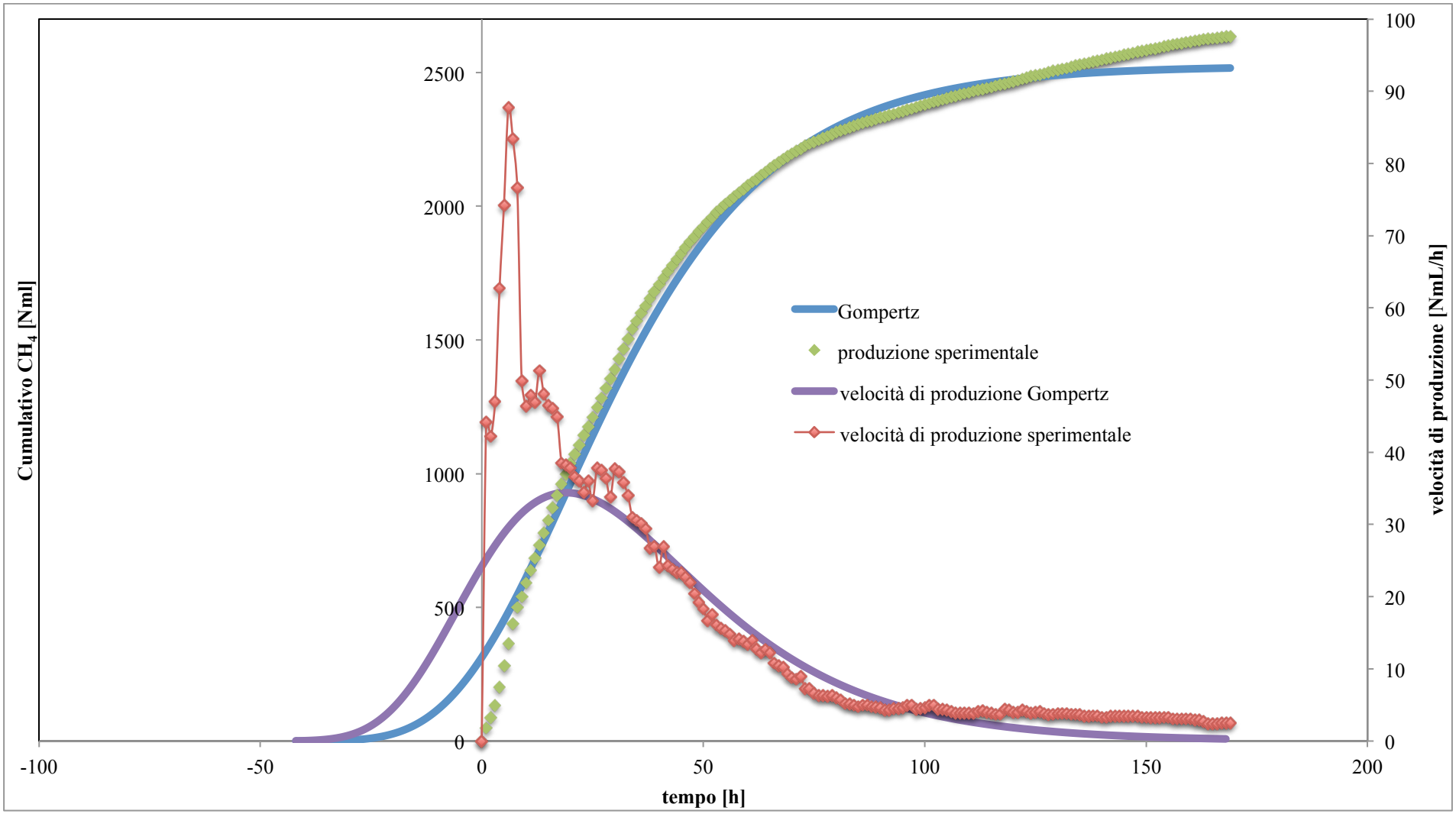

Figura 6.2 *Dati sperimentali rappresentati da punti; curve modellate rappresentate da linee continue. Raffronto Gompertz e dati sperimentali.*

6.2.1 Modello Saturativo di I Ordine

Dalla modellazione delle curve di produzione e dalla modellazione delle velocita di produzione è possibile dedurre che il modello Gompertz, data la sua natura, non descrive al meglio il sistema in esame. Infatti in figura , si può facilmente vedere come la curva di Gompertz non descriva l'andamento della produzione per tempi prossimi al t = 0. E' possibile costruire una curva di regressione di tipo saturativo del primo ordine. Si modellano i dati sperimentali con un modello del primo ordine secondo l'equazione (6.6). Un utile strumento per valutare l'andamento delle prove si ricava con il calcolo della derivata della (6.6):

$$\frac{\partial f}{\partial x} = \frac{B_{\max 1} * K_{d1}}{(K_{d1}+x)^2} \qquad (6.7)$$

L'equazione 6.7 rappresenta la velocità di produzione di gas, La variazione di gas prodotto su unità di tempo corrisponde proprio alla velocità di produzione. I dati sperimentali sono misurazioni puntuali e ad ogni tempo x = t_i corrisponde un valore di gas prodotto G_i . Si calcola la derivata con le formule di derivazione numerica:

$$\frac{\Delta G}{\Delta t} = \frac{G_{i+1} - G_{i-1}}{t_{i+1} - t_{i-1}} \qquad (6.8)$$

Per il caso in esame x = t .

Si ricava per $x = K_{d1}$ la velocità di produzione R_{kd} (NmL/h) risulta :

$$R_{t=K_{d1}} = \frac{B_{\max 1}}{4 * K_{d1}} \qquad (6.9)$$

La velocità iniziale, per $x = 0$ corrisponde la velocità massima R_{max} (NmL/h):

$$R_{max} = \frac{B_{\max 1}}{K_{d1}} \qquad (6.10)$$

In *Tabella 6.10* si presentano i parametri ricavati dal modello per i sistemi in prova.

Tabella 6.10 *Parametri dael modello saturativo del I ordine per le prove di produzione di CH_4.*

	Control	Fe° 0,25	Fe° 0,5	Fe° 1	Fe° 2
B_{max1}	3199,39	3132,03	3128,76	3178,19	3134,58
K_{d1}	37,99	34,80	34,54	35,20	34,88
R_{max}	84,22	90,00	90,58	90,29	89,87
$R_{0,5}$	21,05	22,50	22,65	22,57	22,47

Dalla *Figura 6.3* si nota come l'andamento dei dati sperimentali di gas cumulativo segua in maniera discreta l'andamento della curva saturativa del primo ordine. I dati della velocità di produzione hanno un andamento inizialmente massimo per poi avere un decadimento. La curva della derivata del modello saturativo, riesce a descrivere l'andamento dei dati sperimentali con coerenza. In *Figura 6.4* si mostrano i due modelli adottati e la curva di produzione di un reattore. E' evidente come la Gompertz preveda un andamento molto diverso per tempi iniziali.
Ciò si deve al fatto che il rapporto di Inoculo e Substrato utilizzato è elevato. Dalla *Tabella 6.3* si vede come tale valore sia di 0,07. L'aggiunta di poco substrato ad un inoculo molto attivo, come nel nostro caso, ha portato alla produzione di gas senza esibire fase esponenziale. Solitamente il tempo di latenza è il tempo richiesto dai microorganismi per acclimatarsi alle condizioni del brodo. In questo caso il volume di substrato aggiunto rispetto all'inoculo e la bassa concentrazione di SV iniziali del brodo hanno portato a questo andamento. La fermentazione è partita da una condizioni già avanzata, dove il quantitativo di microorganismi è già elevato e non vi è più fase esponenziale di crescita, proprio perché vi è già una presenza consistente di microorganismi. Ci si può immaginare di aver iniziato la fermentazione da un punto successivo della curva di gompertz, come mostrato in *Figura 6.5*.

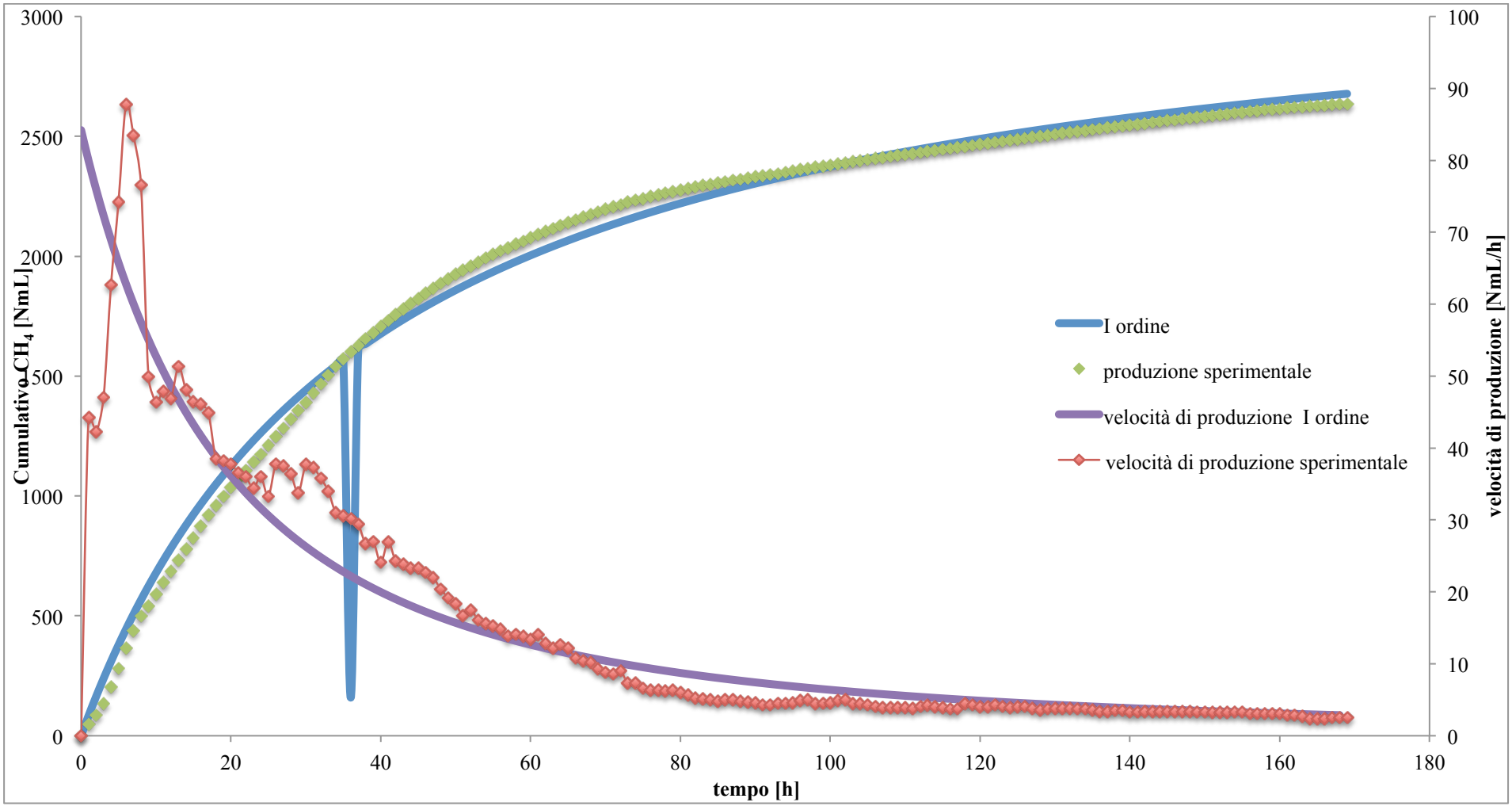

Figura 6.3 *Dati sperimentali rappresentati da punti; Curve modellate rappresentate da linee continue. Raffronto tra I ordine e dati sperimentali.*

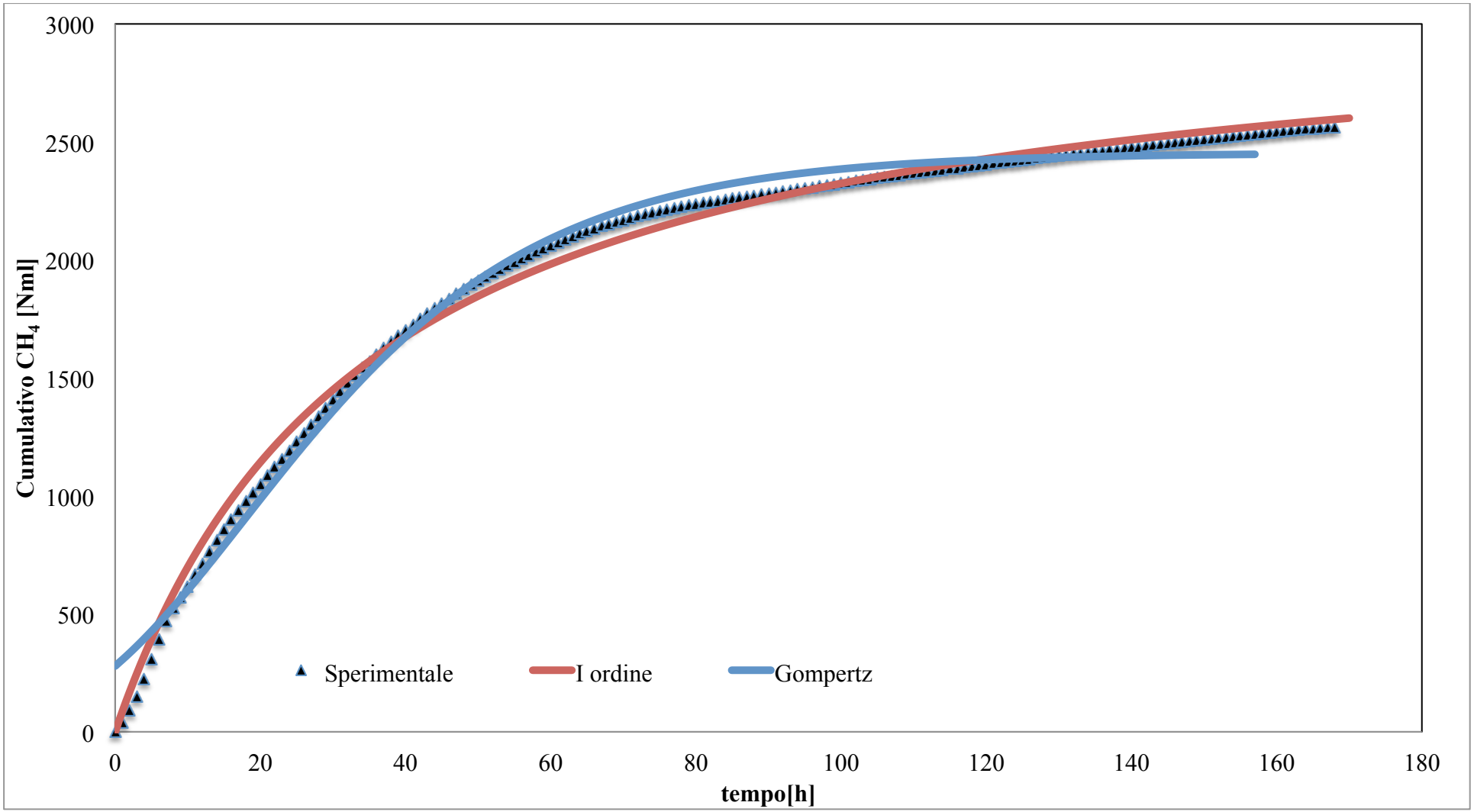

Figura 6.4 *Confornto tra il modello di Gompertz, il I ordine e i dati sperimentali di produzione di CH_4.*

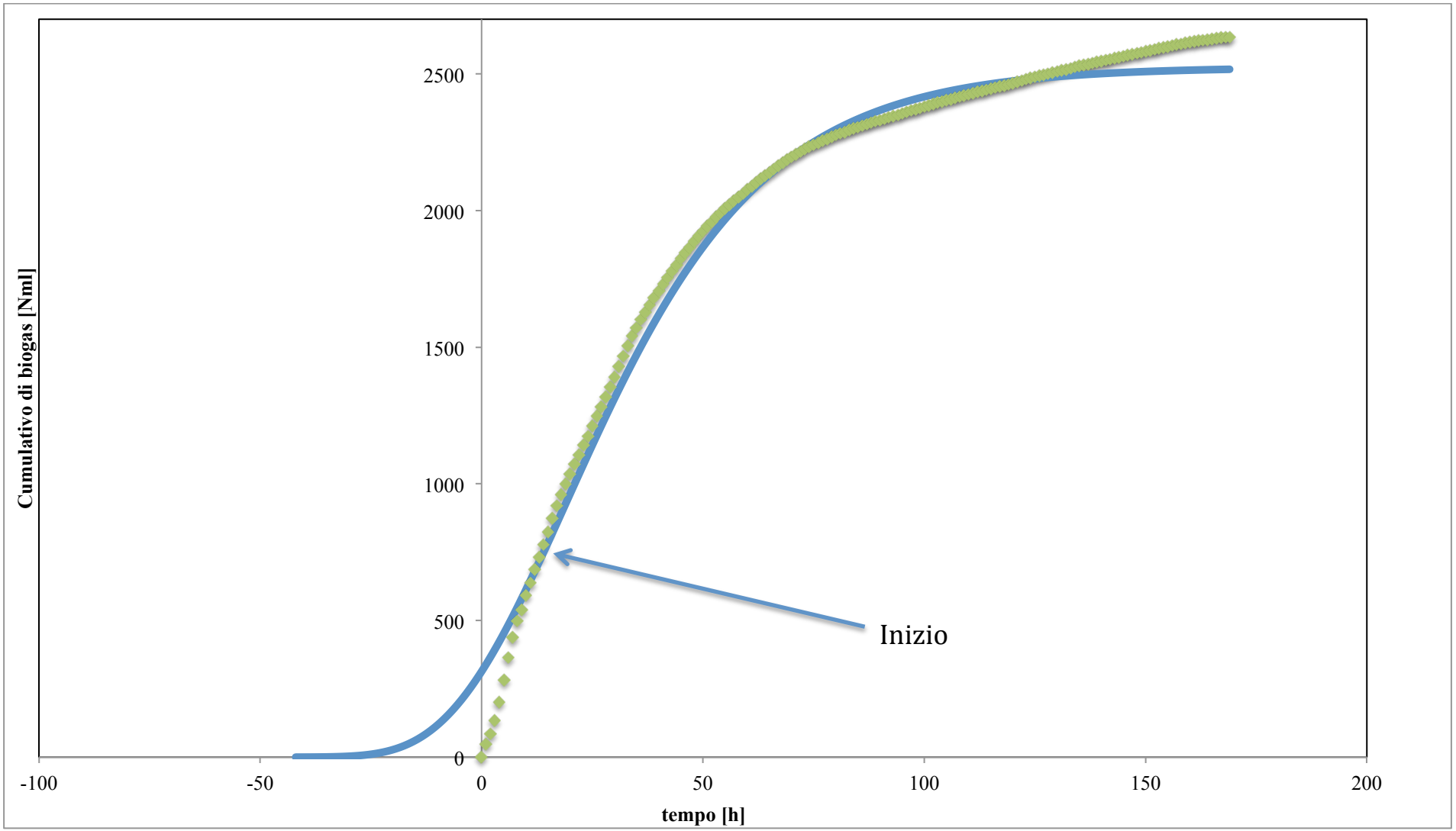

Figura 6.5 *Inizio ipotetico di fermentazione dovuto al rapporto inadeguato di Inoculo e Substrato. Il grafico a linea continua rappresenta la curva di Gompertz; I grafico rappresentato da punti sono dati sperimentali.*

6.2.1 Valutazioni Energetiche

In *Tabella 5.7* si presenta la valutazione energetica della digestione anaerobica (produzione di CH_4) come riportato nella *Sezione 5.9*.

Tabella 6.11 *Risultati della valutazione energetica per le prove di produzione di CH_4.*

	Recupero energetico								
	Produzione [NL/L]	Energia totale [kJ]	Energia [kJ/L]	Δ SV [g/L]	SV [g/L]	Energia disponibile [kJ/Δ g SV]	Efficienza Energetica %	Energia disponibile [kJ/g SV iniziali]	Efficienza Energetica %
Control	6,58	94,03	235,06	14,05	21,78	99,58	94%	154,41	61%
Fe ° 0,25	6,50	92,88	232,20	14,20	22,37	100,68	92%	158,59	59%
Fe ° 0,5	6,52	93,17	232,93	13,88	22,00	98,42	95%	155,97	60%
Fe° 1	6,60	94,20	235,51	14,06	22,08	99,67	95%	156,54	60%
Fe ° 2	6,52	93,18	232,96	14,08	22,17	99,81	93%	157,17	59%

7 Studio Sperimentale di Cinetica nella Produzione di H_2 + CH_4 in Presenza di Fe°

7.1 Introduzione

La conoscenza della cinetica per la produzione di H_2 + CH_4 è un passo fondamentale per la comprensione dei meccanismi e dei percorsi metabolici che compiono i microorganismi. Si vuole inquadrare uno studio cinetico per la produzione di biogas in presenza di Fe° per dare maggiore chiarezza sull'evoluzione della produzione di biogas in presenza di Fe°.
Si descrive la procedura sperimentale adottata e si descrivono i modelli cinetici utilizzati nella digestione anaerobica. Si esegue una prova sperimentale per la valutazione degli effetti di una molecola donatrice di elettroni (Fe°) sulla cinetica di produzione di biogas su un intervallo di concentrazioni iniziali di substrato S_0 da 20 a 120 (g/L) di ST. Per questo studio il substrato utilizzato è prodotto dalla frazione vegetale degli scarti organici. La valutazione della cinetica si svolge con il metodo "*Modified Initial Rate Method*".

7.2 Materiali e Metodi

7.3 Preparazione e Pretrattamento del Substrato

7.3.1 Preparazione del Substrato

Il substrato utilizzato è recuperato dalla frazione organica vegetale degli scarti del mercato rionale di Racconigi (Torino). La procedura è la stessa gia descritta nella *Sezione 5.4*.
Il primo passaggio nel frullatore prevede l'aggiunta di substrato sminuzzato, contrariamente a quanto svolto nelle precedenti prove, non si aggiunge acqua al substrato. Questo ci permettere di avere un substrato più concentrato.

7.3.2 Pretrattamento Basico

Si effettua in maniera analoga alle precedenti come spiegato nella *Sezione 5.5.*

7.4 Preparazione dell'Inoculo

7.4.1 Preparazione Coltura Metanigena

In questa fase sperimentale è necessario produrre un inoculo metanigeno attivo. Inoltre è fondamentale che l'inoculo sia preventivamente stabilizzato e adattato al substrato organico da rifiuti mercatali. A tale scopo si predispone una coltura metanigena in un bioreattore da 14 L. Inizialmente si riempie il reattore con letame e acqua in proporzioni tali da garantire una corretta miscelazione. Il letame bovino è raccolto da un allevamento locale in provincia di Torino. Si effettua una parziale filtrazione e diluizione con acqua e contestualmente si procede alla rimozione delle componenti lignocellulosiche non digerite, si versa il composto all'interno del reattore e si effettua un flussaggio di N_2 fino al raggiungimento di condizioni di potenziale RedOx di -600 mV. La regolazione della temperatura e del pH del reattore permettono di controllare il processo in linea. Si imposta una temperatura del reattore a

35°C e un set point di pH = 7,5. Si misura in linea anche la produzione di gas del reattore. La stabilizzazione della coltura si protrae per circa 60 giorni con aggiunta di substrato per tre fermentazioni batch. Si valuta l'andamento della curva cumulativa della produzione dei gas CO_2 e H_2 e CH_4. L'uscita dei gas del reattore è collegata ad un gasometro MilliGascounter® (Ritter Apparatebau GmbH & Co. KG, Germania) e ad un assorbitore di CO_2. L'assorbitore di CO_2 è composto da una soluzione di NaOH 3M dove il gas i uscita dal reattore gorgoglia. All'uscita dell'assorbitore si collega ad un altro gasometro MilliGascounter. In questo modo si può monitorare la curva cumulativa di biogas, e la curva cumulativa di H_2 e CH_4. Quando il reattore esibisce un tratto di produzione di biogas ad andamento esponenziale, si procede con il prelievo dell'inoculo per la prova cinetica considerando che i microorganismi nella fase esponenziale di produzione abbiano la velocità massima di replicazione e conseguentemente anche la maggior attività metabolica.

Tabella 7.1 *Valori di ST e SV per il substrato e l'inoculo metanigeno per le prove di cinetica.*

	ST [g/L]	SV [g/L]	pH
Substrato	137,03 ± 0,83	107,20 ± 0,92	6,35 ± 0,68
Inoculo metanigeno	71,04 ± 0,96	36,56 ± 0,62	7,37 ± 0,51

7.5 Procedura Sperimentale

7.5.1 Prova cinetica Produzione di CH_4 + H_2

Si utilizzano dei reattori da 500 mL per la produzione di biogas con aggiunta di Fe°. Si è preparato il brodo di fermentazione usando l'inoculo metanigeno attivo in cinque diverse configurazioni. La prima configurazione è il sistema a concentrazione di substrato di 20 g/L ST. Il secondo sistema è costituito da una concentrazione di substrato di 60 g/L di ST. Il terzo sistema si prova con una concentrazione di 80 g/L ST. Le configurazioni successive prevedono le concentrazioni di substrato di 100 g/L e 120 g/L di ST. In maniera analoga tutti i sistemi a concentrazione di substrato hanno a loro volta tre configurazioni di aggiunta di Fe°, come riportato in *Tabella 7.2*.

Tabella 7.2 *Schema della configurazione dei reattori per la prova di cinetica.*

S_0 [g/L]	Numero identificativo reattore		
140	13	14	15
100	10	11	12
80	7	8	9
60	4	5	6
20	1	2	3
Fe° [g/L]	0	0,5	1

La prova consiste, quindi, in 15 sistemi differenti svolte in modalità batch. Il volume di brodo di ogni reattore è di 400 mL. Si dosa un volume di inoculo attivo di 50 mL. Ad ogni sistema di diluisce opportunamente il substrato per ottenere le concentrazioni desiderate e si versa il volume prestabilito nei reattori. La temperatura è controllata dal bagno termostatico dell'AMPTSa 35 °C. Si monitora la produzione di gas in linea con l'unità di misurazione dell'AMPTS da remoto. Le prove si considerano avviate quando si è flussato N_2 in ogni reattore per 5 minuti. Al fine della prova è indispensabile valutare i dati iniziali di produzione, almeno fino al raggiungimento delle condizioni di massima velocità di produzione. L'agitazione è controllata da remoto tramite il software AMPTS azionando gli agitatori a 100 rmp e intervallando 600 secondi di agitazione e 300 secondi di fermo.

7.6 Misure Analitiche

Si eseguono le misure analitiche come riportato nella *Sezione 6.6*.

7.7 Crescita Microbica

Esistono molti modelli matematici per la descrizione del comportamento dei microrganismi a fronte di differenti condizioni chimiche e fisiche come ad esempio la temperatura, il pH, concentrazione di substrato, agitazione ecc. Questi modelli ci permettono di valutare l'attività metabolica, i percorsi metabolici ed eventuali criticità nella produzione di un metabolita o nel consumo di un substrato [18]. Per la costruzione di questi modelli è necessario poter misurare la crescita microbica. La crescita microbica (quando si trova in condizioni di substrato limitato) presenta alcune fasi di crescita come mostrato in *Figura 7.1*.

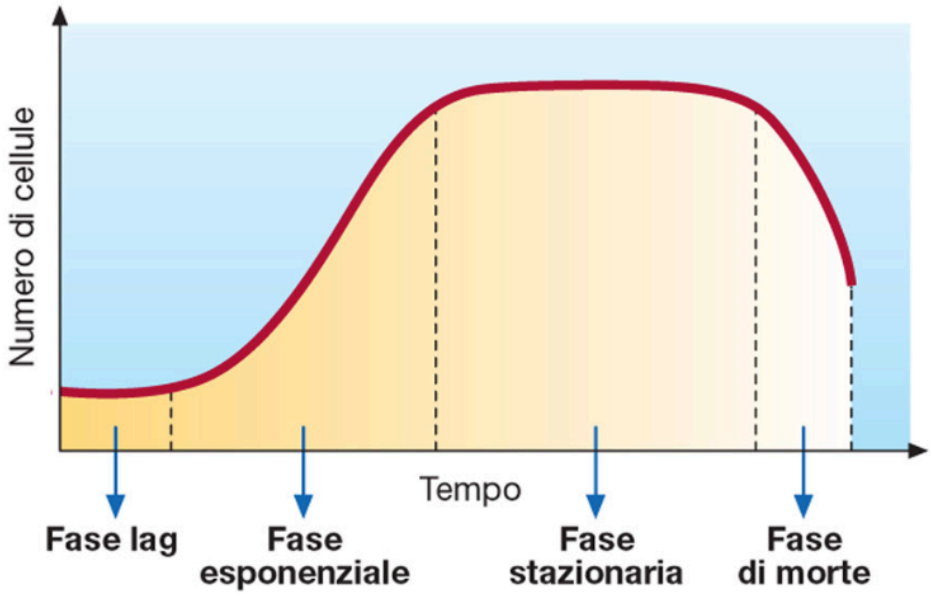

Figura 7.1 *Esemio di una curva di crecita per una popolazione con substrato limitato* [6][b].

Nella prima fase la coltura microbica esibisce una velocità di crescita (o replicazione) nulla per un certo tempo (λ). Questo tempo è definito tempo di latenza *lag phase*. In seguito vi è un'accelerazione esponenziale nella crescita fino ad arrivare ad un valore di crescita (μ_{max}) massimo. La popolazione microbica cresce sempre più lentamente fino ad arrivare alla fase stazionaria dove il numero di batteri morti uguaglia il numero di nuovi batteri. Ed in fine, causa la limitazione di substrato, la popolazione inizia a decrescere fino alla estinzione della popolazione. Se si diagramma la crescita microbica come il logaritmo del numero di organismi rispetto al tempo, la curva assume un comportamento sigmoidale con *lag phase* λ, con un valore massimo di velocità di replicazione μ_{max} e una popolazione massima raggiunta (*A)* come mostrato in *Figura 7.2*.

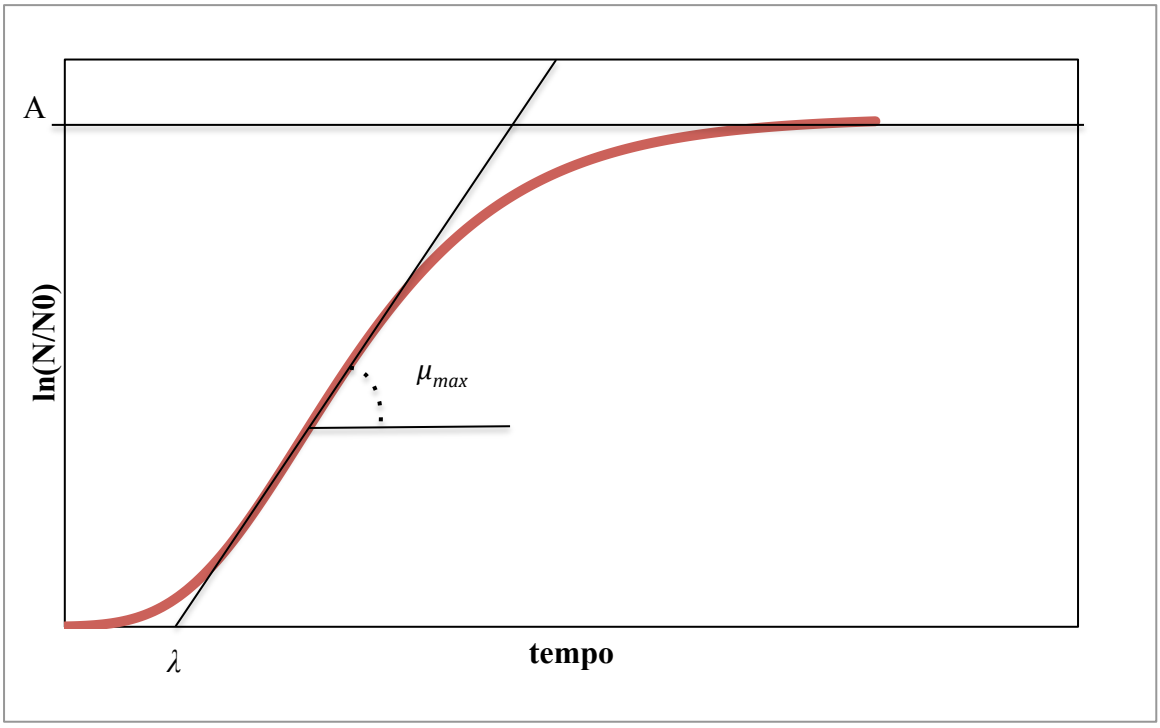

Figura 7.2 *Valutazione dei parametri per una curva di crescita microbica.*

In letteratura è possibile trovare molti modelli che descrivono la crescita microbica, come i modelli di Gompertz [19], Richards [20], Stannard et al [21] e Logistic [22] , come mostrato in *Tabella 7.3*.

Tabella 7.3 *Esempi di modelli utilizzati per descrivere le curve di crescita microbica.*

Modello	Equazione	Equazione modificata
Logistic	$y = \frac{a}{(1 + \exp\,(b - cx))}$	$y = \frac{A}{(1 + \exp\,(\frac{4\mu_{max}(\,\lambda - t) + 2}{G_{max}}))}$
Gompertz	$y = a * \exp(-\exp(b - cx))$	$y = A \exp\,(-\frac{\mu_{max} * e\,(\,\lambda - t) + 1}{G_{max}}$
Richards	$y = a\{1 + \nu * \exp\,(k(\tau - x))\}^{(-1/\nu)}$	$y = a\left\{1 + \nu * e^{(1+\nu)}\ e^{[\frac{\mu_{max}}{G_{max}}(1+\nu)(a+\frac{1}{\nu})(\lambda-t)]}\right\}^{(-1/\nu)}$
Stannard et al.	$y = a * [1 + e^{\left(-\frac{l+kx}{p}\right)}]^{(-p)}$	$y = a\left\{1 + \nu * e^{(1+\nu)}\ e^{[\frac{\mu_{max}}{G_{max}}(1+\nu)(a+\frac{1}{\nu})(\lambda-t)]}\right\}^{(-1/\nu)}$

Questi modelli utilizzano come unica variabile il numero di organismi della popolazione. I parametri di maggiore interesse sono: la velocità massima di replicazione μ_{max} che è data dalla pendenza della curva di crescita quando la crescita è esponenziale. Tale parametro si stima considerando il tratto più lineare della curva, si estrapola la curva interpolante i dati sperimentali tramite regressione lineare e si valuta la pendenza della retta interpolante. Un altro metodo per ricavare anche altri parametri come la *lag phase* λ e la massima popolazione G_{max} è il metodo di *best-fit*, si sceglie un modello matematico descritto da un'equazione e tramite Software si ricavano i parametri che meglio approssimano la curva

sperimentale. Alcuni autori utilizzano i modelli elencati in tabella per descrivere la crescita microbica. I microorganismi crescono esponenzialmente, quindi è possibile diagrammare la popolazione relativa $y = \ln(N/N_0)$, con N_0 uguale alla popolazione al $t = 0$. I tre parametri della curva, λ, μ_{max} *e* A descrivono le tre fasi principali della crescita microbica, rispettivamente la fase di latenza, la fase esponenziale e la fase stazionaria. Allo stesso modo nella digestione anaerobica la produzione di gas che è associata ad una crescita microbica può esserre descritta con equazioni opportunamente modificate (*Tabella 7.3*) Molte equazioni che esibiscono un comportamento sigmoidale possono contenere dei parametri matematici (a, b, c, d…), nel caso della digestione anerobica è preferibile esprimere tali parametri come grandezze che abbiano un significato fisico come λ, μ_{max} *e* G_{max}.

7.7.1 Dinamica della produzione di biogas $H_2 + CH_4$

La dinamica della produzione di biogas può essere descritta dal modello di Gompertz che presenta un bet-fit migliore per i dati sperimentali. Molti autori utilizzano l'equazione Logistic modificato e l'equazione Gompertz modificata (7.1 e 7.2) [23].

$$V_{gas} = \frac{V_{gas,max}}{1+\exp\left[\left(\frac{R_{max,gas}*e}{V_{gas,max}}\right)(\lambda-t)+1\right]} \qquad (7.1)$$

$$V_{gas} = V_{gas,max}\exp\left\{-\exp\left[\frac{R_{max,gas}*e}{V_{gas,\max}}(\lambda-t)+1\right]\right\} \qquad (7.2)$$

dove V_{gas} è il biogas totale prodotto (mL) al tempo t (h). Il $V_{gas,max}$ [mL] è la quantità massima di biogas prodotta e la velocità massima di produzione è $R_{gas,max}$ (mL/h) e λ [h] è il tempo di latenza per la fase esponenziale di produzione di biogas. In questo studio si utilizza l'equazione 7.10.

7.7.2 Cinetica per la produzione di biogas

Per determinare la velocità di produzione di biogas $r_p(S)$ in funzione del substrato si valuta la pendenza della curva interpolante dei dati sperimentali della prova di corrosione. Ad ogni sistema con concentrazione iniziale di substrato S_0 differente si associa il corrispettivo valore di produzione $r_p(S)$ come mostrato in *Figura 7.3*.

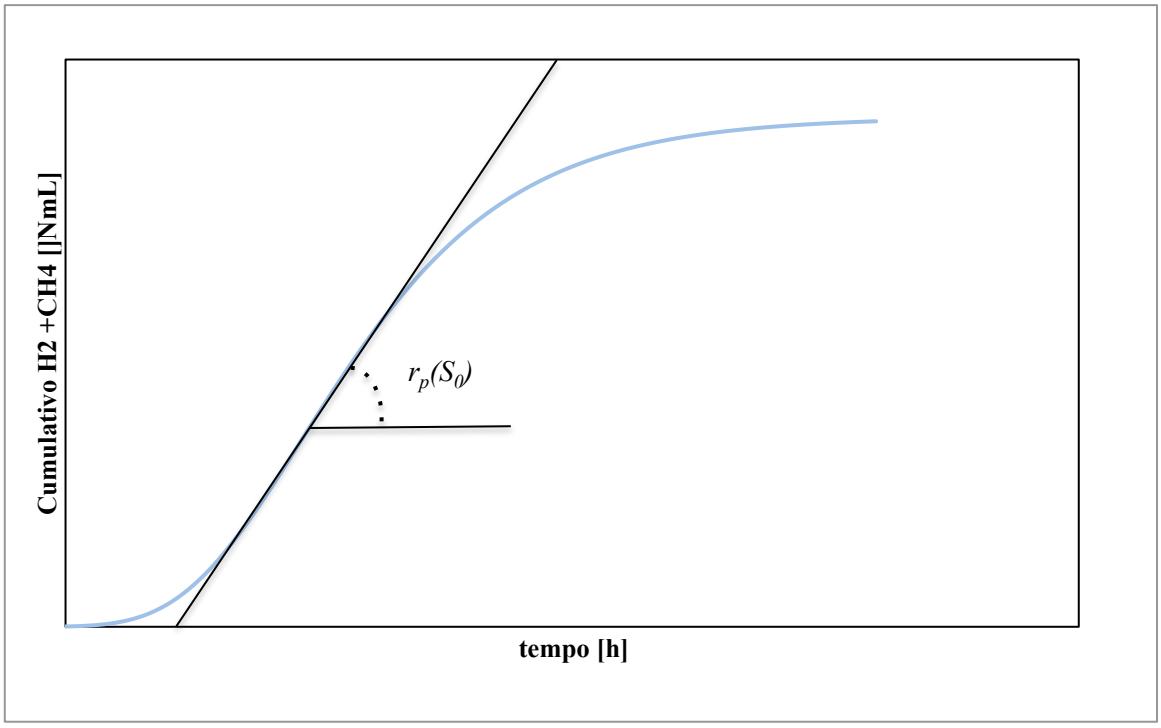

Figura 7.3 *Esempio descrittivo del metodo di valutazione della velocità di produzione r_p.*

Si utilizza l'*equazione 7.3* per descrivere la cinetica di produzione di biogas.

$$r_p(S) = \frac{r_{max}\, S}{K_S + S} \qquad (7.3)$$

dove, r_{max} [NmL/h] e K_S [g/L]sono due parametri del modello e S è la concentrazione di substrato in [g/L].

Per descrivere il comportamento di una cinetica per la produzione di biogas con inibizione da substrato si utilizza l'*equazione 7.4*.

$$r_p(S) = \frac{r_{max}\, S}{K_S + S} e^{\frac{-S}{K_I}} \qquad (7.4)$$

dove dove, r_{max} [NmL/h], K_S [g/L] e K_I [g/L] sono i tre parametri del modello e S è la concentrazione di substrato in [g/L].

7.8 Condizioni sperimentali

In *Tabella 7.4* si riportano i volumi si substrato aggiunto per ciascuna serie di reattori.

Tabella 7.4 *Condizioni sperimentali per i sitemi delle prove sperimentali di cinetica.*

So [g/L] nominale	Inoculo [mL]	Substrato [mL]	Acqua [mL]
140	50	350,0	0,00
100	50	272,9	77,06
80	50	230,5	119,45
60	50	174,1	175,93
20	50	83,1	266,95

In *Tabella 7.5* si riporta la quantità di Fe° aggiunto ai sistemi.

Tabella 7.5 *Valore di Fe° aggiunto ad ogni sistema per le prove sperimentali di cinetica.*

So [g/L] nominale	n° reattore	Fe° [g]	n° reattore	Fe° [g]
140	14	0,1997	15	0,4008
100	11	0,1992	12	0,3984
80	8	0,1995	9	0,4003
60	5	0,2009	6	0,4023
20	2	0,2009	3	0,3994

7.9 Risultati

7.9.1 Risultati Sperimentali Produzione di H_2 + CH_4

In *Figura 7.4* sono riportate le curve di produzione di biogas. I sistemi con concentrazione di Fe° 0,5 e 1 g/L non presentano differenze evidenti, anche le curve di produzione hanno comportamento analogo. Le curve con linee continue rappresentano una media del valori di gas prodotto tra i due sistemi in presenza di Fe°. Le curve a linea tratteggiata corrispondono alle curve di produzione dei sistemi senza aggiunta di Fe°. Dalla modellazione dei dati sperimentali in *Figura 7.4* con *l'equazione 7.10* si ricavano i parametri riportati in *Tabella 7.6*.

Tabella 7.6 *Parametri delle curve di produzione per le prove di cinetica.*

So iniziale [g/L]	R_{MAX} [NmL/h]		G_{MAX} [NmL]		λ [h]	
	no Fe°	Fe°	no Fe°	Fe°	no Fe°	Fe°
20	7,95	7,18	56,44	55,44	2,92	2,53
60	8,42	10,09	70,74	71,11	3,52	3,93
80	11,81	12,06	78,52	79,19	4,58	4,57
100	11,80	15,47	92,42	100,05	5,28	5,97
140	8,75	9,37	105,19	103,84	5,10	4,87

Considerando i risultati in *Tabella 7.7*, per i sistemi con concentrazione iniziale di substrato S_0 = 102 g/L, la presenza di Fe° determina un incremento del 8,2% in termini di G_{max} rispetto al sistema in assenza di Fe°. La velocità di produzione di biogas R_{max} risulta incrementata del 31% rispetto l'analogo senza il supplemento di Fe°. I sistemi in presenza di Fe° presentano un miglioramento sia in termini di R_{max} che di G_{max}. I reattori a concentrazione S_0 di 20 g/L la presenza di Fe° risulta ininfluente.

Tabella 7.7 *Parametri delle curve di produzione per le prove di cinetica normalizzati rispetto la concentrazione iniziale di ST.*

So iniziale [g/L]	R max [NmL/h/g ST]		G max [NmL/ g ST]	
	no Fe°	Fe°	no Fe°	Fe°
37,32	0,532	0,481	3,780	3,714
68,50	0,564	0,676	4,738	4,763
87,84	0,791	0,808	5,259	5,304
102,35	0,790	1,036	6,190	6,701
128,75	0,586	0,627	7,046	6,955

Dalla *Figura 7.3* si può apprezzare il fenomeno di inibizione da substrato, infatti entrambi le curve dei sistemi a S_0 = 140 g/L con Fe° e senza Fe° presentano una diminuzione della pendenza in fase esponenziale. Inoltre le curve dei sistemi senza l'aggiunta di Fe°, dopo la fase di massima produzione, sono sempre al di sotto delle curve dei sistemi in presenza di Fe°.

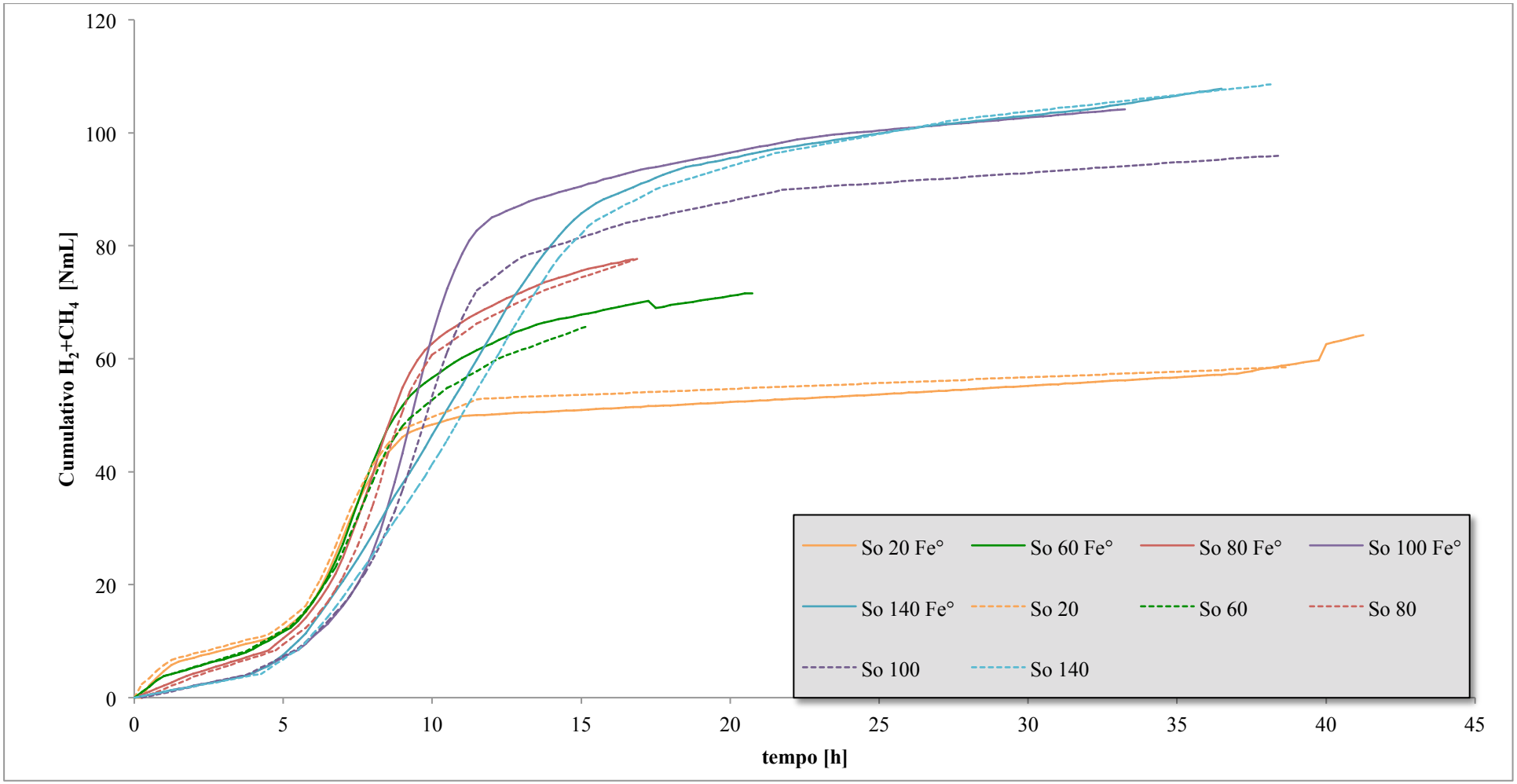

Figura 7.4 *Dati sperimentali delle curve di produzione per le prove di cinetica per la produzione di (H_2+CH_4).*

7.9.2 Risultati Studio Cinetico in Presenza di Fe°

Le velocità di produzione di H_2 + CH_4 R_{max}, riportate in *Tabella 7.8*, sono state valutate nella fase esponenziale della produzione di biogas. La cinetica per la produzione di biogas esibisce un fenomeno di inibizione da substrato. Dalla *Figura 7.5* si evince che non si rilevano grandi differenze tra i sistemi con 0,5 g/L e 1 g/L. L'andamento della velocità di produzione di biogas presenta un massimo per S = 93 [g/L]. In presenza di Fe° il massimo della curva si attesta per S =103 [g/L]. La presenza di Fe° mitiga l'inibizione da substrato permettendo quindi di introdurre un maggior quantitativo di substrato senza incorrere in fenomeni inibitori. Il picco della curva non solo si estende da 93 [g/L] a 103 [g/L], ma per S_0 = 102 g/L i sistemi senza Fe° hanno una velocità di produzione di 3,52 [NmL/h]. I sistemi con Fe° raggiungono una velocità di produzione di 4,4 [NmL/h].

Tabella 7.8 *Valori delle r_p per i sistemi Fe° 0, Fe° 0,5 e Fe° 1 in funzione della concentrazione iniziale di substrato.*

S_0 [g/L] reale	Fe° 0 [NmL/h]	Fe° 0,5 [NmL/h]	Fe° 1 [NmL/h]
37,32	2,382	2,485	2,470
68,50	2,564	3,000	2,988
87,84	3,596	3,499	3,772
102,36	3,520	4,360	4,450
128,75	2,120	2,239	2,140

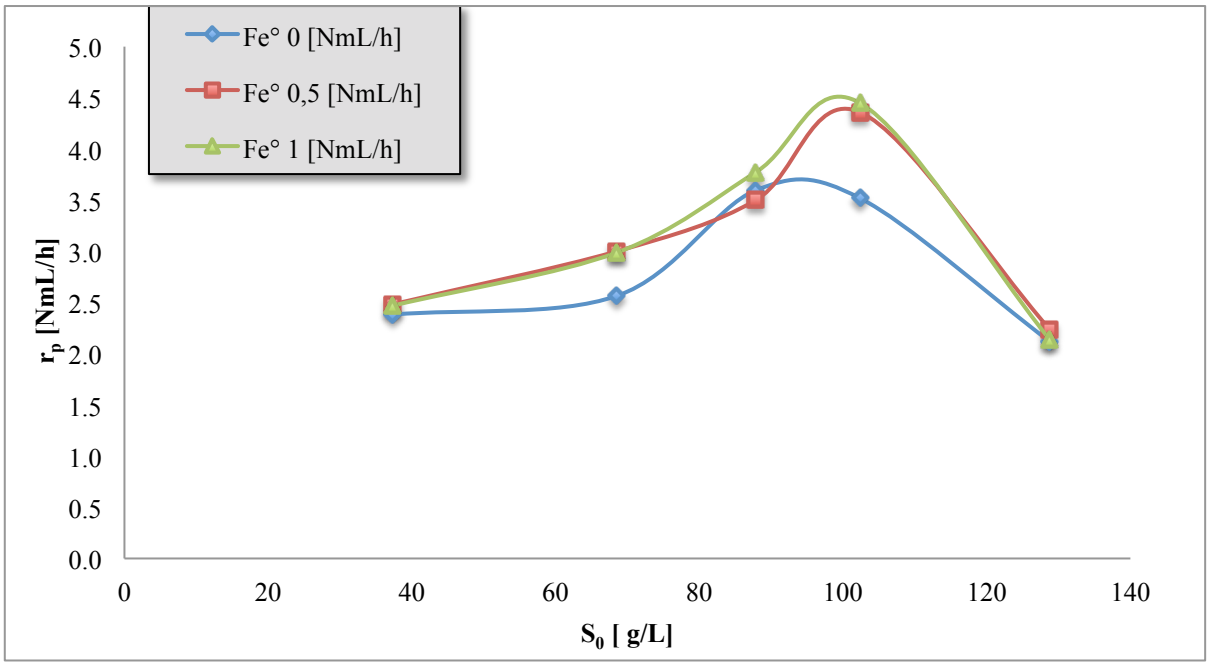

Figura 7.5 *Grafico della r_p in funzione della concentrazione iniziale di substrato S_0. I punti sono dati sperimentali, le linee hanno scopo puramente chiarificativo.*

7.9.3 Risultati Cinetica

Come evidenziato dalla *Tabella 7.9*, slo una curva polinomiale di terzo grado riesce a fittare bene l'andamento dei dati sperimentali.

Tabella 7.9 *Risultati della modellazione della cinetica per la produzione di biogas e confronto del R^2 per i modelli adottati*

Modello	Equazione	R^2
Primo ordine (1)	$r_p(S) = \frac{r_{max}\, S}{K_S + S}$	0,20
Primo ordine con inibizione esponenziale (2)	$r_p(S) = \frac{r_{max}\, S}{K_S + S} e^{\frac{-S}{K_I}}$	0,34
Polinomiale (3)	$r_p(S) = aS + bS^2 + cS^3$	0,89

Se non altro è possibile fare un raffronto tra i sistemi in presenza di Fe° e non con i parametri del modello (2). Ai parametri del modello si attribuisce un significato fisico che agevola la comprensione delle differenze riscontrate nella fase sperimentale. In *Tabella 7.10* si riportano i parametri del modello (1).

Tabella 7.10 *Parametri del modello (1) per la cinetica di produzione di biogas.*

Parametri (1)	senza Fe°	Fe°	
$\mathbf{r_{max}}$	3,49	4,37	**[NmL/h]**
$\mathbf{K_S}$	16,81	26,85	**[g/L]**

Dalla *Tabella 7.11* si evidenzia che il parametro $\mathbf{r_{max}}$ e il parametro K_S sono pressoché invariati, invece il K_I per il sistema senza Fe° è di 91 [g/L], per i sistemi in presenza di Fe° è di 99,56 [g/L].

Tabella 7.11 *Parametri del modello (2) per la cinetica di produzione di biogas.*

Parametri (2)	senza Fe°	Fe°	
$\mathbf{r_{max}}$	743,77	776,74	[NmL/h]
$\mathbf{K_S}$	8078,77	8075,73	[g/L]
$\mathbf{K_I}$	91,01	99,56	[g/L]

8 Conclusioni

In conclusione possiamo affermare per le prove di corrosione che i volumi di gas prodotti dalla corrosione non sono comparabili con l'aumento dovuto alla presenza di Fe° nella fermentazione. Dunque si esclude un fenomeno di sovrapposizione degli effetti. La misurazione del potenziale RedOx per i sistemi con acqua risulta instabile.
Le prove di produzione di H_2 hanno esibito dei risultati soddisfacenti. In particolare il sistema con l'inoculo adattato ha mostrato un miglioramento nella velocità di produzione, nel volume di gas prodotto e nella riduzione dei tempi di latenza. Si può ipotizzare che ci sia un effetto non trascurabile dovuto alla presenza di Fe° nei sistemi, ed in particolare ai sistemi con inoculo adattato. Nel particolare non si possono ipotizzare dei percorsi metabolici se non approfondendo lo studio biologico dei ceppi metanigeni.
Le prove di produzione di CH_4 non hanno evidenziato alcun effetto dovuto alla presenza di Fe°. Un'ipotesi avanzata è che uno squilibrio nelle proporzioni di volume introdotto di substrato e di inoculo all'interno del sistema batch non permetta l'evolvere della fase esponenziale. Un eccesso di inoculo attivo, come nel caso delle prove, e l'aggiunta di poco substrato porta ad un consumo totale del substrato, infatti le efficienze di fermentazione rispetto alla variazione di materiale organico volatile nel brodo dimostrano che la fermentazione ha degradato quasi completamente il substrato, non permettendo però una produzione veloce. Infatti, alla fase esponenziale di crescita microbica si associa la produzione di biogas. Le prove di fermentazione batch solitamente si preparano con un piccolo volume di inoculo. Infatti l'inoculo si adatta alla degradazione del substrato, in volume maggiore, cresce esponenzialmente fino al raggiungimento della massima velocità di produzione per poi esaurire le risorse, esibendo in questo modo un ìa curva di produzione di gas completa. Nel caso delle prove di CH_4 il substrato in volume minore è stato degradato da una popolazione microbica attiva, avvicinandosi ad un *BioMethane Potential test* e non ad una fermentazione batch.
I risultati delle prove cinetiche hanno confermato l'effetto positivo sui sistemi microbici. Per formulare ipotesi sull'origine dell'attività migliorativa del Fe° si rimanda ad ulteriori studi di metabolismo microbico. Si può osservare però che la cinetica per la produzione di biogas (H_2 e CH_4) è una cinetica con inibizione da substrato. La presenza di Fe° mitiga l'inibizione da substrato. Inoltre non si evince alcuna differenza tra i sistemi con Fe° 0,5 e Fe° 1 g/L.

9 Indice delle Figure

Figura 2.1 *Cicli del carbonio in natura: il CH_4 e i microorganismi metanigeni* [2]. 3
Figura 2.2 *Fasi della Digestione Anaerobica* [3][b]. 5
Figura 2.3 *Trasferimento di idrogeno tra specie microbiche* [3]. 6
Figura 2.4 *Interazione tra specie microbiche, microorganismi scuri a forma di bastoncello (metanigeni), e microorganismi più chiari (fermentativi). Le immagini al microscopio sono scattate dopo 2, 8 e 12 h dopo l'inoculazione della co-coltura delle specie metanigene e fermentative* [4]. 7
Figura 2.5 *Schema proposto per una membrana cellulare Gram+ (Metanigeno)* [4]. 9
Figura 2.6 *Percorso metabolico proposto della metanogenesi per metanigeni senza citocromi* [4]. 10
Figura 2.7 *Effetti del pH sulla crescita microbica* [5]. 11
Figura 2.8 *Effetti della temperatura sulla crescita microbica per microorganismi termofili* [5]. 12
Figura 2.9 *Attività della digestione anaerobica in funzione della temperatura* [5]. 14
Figura 3.1 *Diagramma di Pourbaix.* 19
Figura 3.2 *Zone d'interesse per la Digestione Anaerobica: riquadro blu per i batteri fermentativi, riquadro rosso per i metanigeni.* 21
Figura 4.1 *Immagine dei reattori dell'AMPTS II ® con i motori elettrici e del bagno termostatico a regolazione automatica.* [4][b] 23
Figura 4.2 *Immagine degli assorbitori di CO_2*[4][b]. 24
Figura 4.3 *Imagini dell'unità di misurazione per il biogas vista dall'alto (a) e vista frontale (b)* [4][b]. 24
Figura 4.4 *Fotografia della configurazione di un sistema per la prova di corrosione: 1) uscita gas chiusa 2) uscita gas aperta e conessa a 3) siringa di raccolta gas.* 27
Figura 4.5 *Fotografia di due sistemi di brodo sintetico dopo la prova di corrosione (sinistra); Fotografia del fondo del reattore di un sistema Fe° 0,5 T dopo la prova di corrosione (destra).* 31
Figura 4.6 *Diagramma di Pourbaix per il sistema Fe°-H_2O, evidenziando le condizioni iniziali e finali per i sistemi Fe° 3 nT e Fe° 0,5 T.* 32
Figura 4.7 *Composizione dei gas prodotti per i sistemi con brodo sintetico: a) campione 7; b) campione 8.* 33
Figura 4.8 *Diagramma di Pourbaix per il sistema Fe°-H_2O, evidenziando le condizioni iniziali e finali per i sistemi ACC 0 e ACI 3.* 36
Figura 5.1 *Fotografia di un campione di frutta e verdura raccolti nel mercato rionale di Racconigi (Torino).* 41
Figura 5.2 *Fotografia del bioreattore Minifors durante la fase di preparazione dell'inoculo adattato.* 44
Figura 5.3 *Dati sperimentali dei sistemi in prova per la produzione di H_2.* 50
Figura 5.4 *Curve di modellazione per la produzione di H_2 con eq. 5.1 e parametri in Tabella 5.9.* 52
Figura 6.1 *Dati sperimentali per la produzione di CH_4.* 60
Figura 6.2 *Dati sperimentali rappresentati da punti; curve modellate rappresentate da linee continue. Raffronto Gompertz e dati sperimentali.* 62
Figura 6.3 *Dati sperimentali rappresentati da punti; Curve modellate rappresentate da linee continue. Raffronto tra I ordine e dati sperimentali.* 65
Figura 6.4 *Confornto tra il modello di Gompertz, il I ordine e i dati sperimentali di produzione di CH_4.* 66

Figura 6.5 *Inizio ipotetico di fermentazione dovuto al rapporto inadeguato di Inoculo e Substrato. Il grafico a linea continua rappresenta la curva di Gompertz; I grafico rappresentato da punti sono dati sperimentali.* 67
Figura 7.1 *Esemio di una curva di crecita per una popolazione con substrato limitato* [6][b]. 72
Figura 7.2 *Valutazione dei parametri per una curva di crescita microbica.* 73
Figura 7.3 *Esempio descrittivo del metodo di valutazione della velocità di produzione* r_p. . 75
Figura 7.4 *Dati sperimentali delle curve di produzione per le prove di cinetica per la produzione di* (H_2+CH_4). 78
Figura 7.5 *Grafico della* r_p *in funzione della concentrazione iniziale di substrato* S_0. *I punti sono dati sperimentali, le linee hanno scopo puramente chiarificativo.* 79

10 Indice delle Tabelle

Tabella 3.1 *Reazioni considerate per la costruzione dei Diagrammi di Pourbaix in Figura 3.1.* 20
Tabella 4.1 *Condizioni iniziali dei sistemi per la prova di corrosione.* 26
Tabella 4.2 *Risultati delle misure della prova di corrosione.* 30
Tabella 4.3 *Volumi di gas raccolti dalle prove di corrosione.* 32
Tabella 4.4 *Risultati ANOVA per le misure delle titolazioni complessometriche della prova di corrosione.* 34
Tabella 4.5 *Risultati delle misurazioni per i sistemi della prova di corrosione abiotica.* 35
Tabella 4.6 *Risultati dell'ANOVA per le misurazioni per le prove di corrosione abiotica.* 37
Tabella 5.1 *Composizione del substrato utilizzato per le prove di produzione di H_2.* 41
Tabella 5.2 *Valori medi su base annua dei valori di composizione delle varietà di frutta e verdura secondo USDA Food Composition Databases [5]*[b]. 42
Tabella 5.3 *Concentrazione di SV e ST per l'inoculo HPB e il letame t.q. utilizati nella prova di produzione di H_2.* 43
Tabella 5.4 *Condizioni iniziali del substrato, dell'inoculo (IS) e dell'inoculo adattato.* 45
Tabella 5.5 *Condizioni sperimentali dei sistemi in prova per la produzione di H_2.* 46
Tabella 5.6 *Condizioni sperimentali di SV e ST dei sistemi in prova per la produzione di H_2.* 46
Tabella 5.7 *Condizioni sperimentali finali per le prove di produzione di H_2.* 48
Tabella 5.8 *Dati sperimentali di velocità di produzione R(t) al tempo t=1 h e R_{max} sperimentali dei sistemi per la produzione di H_2.* 49
Tabella 5.9 *Parametri della modellazione Gompertz per i sistemi in prova per la produzione di H_2.* 51
Tabella 5.10 *Dati sperimentali delle curve di produzione di H_2 e parametri dalla modellazione della Gompertz modificata.* 51
Tabella 5.11 *Dati della valutazione energetica per le prove di produzione di H_2.* 53
Tabella 5.12 *ANOVA per i dati di G_{max}* delle prove di produzione di H_2. 54
Tabella 6.1 *Valori di ST e SV prima e dopo il pretrattamento del substrato per la prova di produzione di CH_4.* 56
Tabella 6.2 *Valori di ST e SV dell'inoculo termofilo metanigeno.* 56
Tabella 6.3 *Valori di ST e SV per il brodo di fermentazione per le prove di produzione di CH_4.* 57
Tabella 6.4 *Condizioni sperimentali per i sistemi per la prova di produzione di CH_4.* 57
Tabella 6.5 *Risultati delle misurazioni complessometriche per i campioni per le prove di produzione di CH_4.* 59
Tabella 6.6 *Dati delle condizioni finali in termini di variazione di SV e ST.* 59
Tabella 6.7 *Dati estrapolati dalle curve sperimentali per la produzione di CH_4.* 59
Tabella 6.8 *Parametri dalla modellazione Gompertz dei dati sperimentali per la produzione di CH_4.* 61
Tabella 6.9 *Parametri biologici della Gompertz dalle prove di produzione di CH_4.* 61
Tabella 6.10 *Parametri dael modello saturativo del I ordine per le prove di produzione di CH_4.* 63
Tabella 6.11 *Risultati della valutazione energetica per le prove di produzione di CH_4.* 68
Tabella 7.1 *Valori di ST e SV per il substrato e l'inoculo metanigeno per le prove di cinetica.* 70
Tabella 7.2 *Schema della configurazione dei reattori per la prova di cinetica.* 71
Tabella 7.3 *Esempi di modelli utilizzati per descrivere le curve di crescita microbica.* 73
Tabella 7.4 *Condizioni sperimentali per i sitemi delle prove sperimentali di cinetica.* 76
Tabella 7.5 *Valore di Fe° aggiunto ad ogni sistema per le prove sperimentali di cinetica.* 76

Tabella 7.6 *Parametri delle curve di produzione per le prove di cinetica.* 76
Tabella 7.7 *Parametri delle curve di produzione per le prove di cinetica normalizzati rispetto la concentrazione iniziale di ST.* 77
Tabella 7.8 *Valori delle r_p per i sistemi Fe° 0, Fe° 0,5 e Fe° 1 in funzione della concentrazione iniziale di substrato.* 79
Tabella 7.9 *Risultati della modellazione della cinetica per la produzione di biogas e confronto del R^2 per i modelli adottati* 80
Tabella 7.10 *Parametri del modello (1) per la cinetica di produzione di biogas.* 80
Tabella 7.11 *Parametri del modello (2) per la cinetica di produzione di biogas.* 80

11 Riferimenti bibliografici

[1]W. A. Hamilton, «and Anaerobic Corrosion», *Corrosion*, pagg. 195–217, 1985.

[2]R. K. Thauer, A. Kaster, H. Seedorf, e W. Buckel, «Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation», vol. 6, n. august, pagg. 579–591, 2008.

[3]D. Deublein e A. Steinhauser, *Biogas from Waste and Renewable Resources*. 2008.

[4]S. C. Leahy *et al.*, «The Genome Sequence of the Rumen Methanogen Methanobrevibacter ruminantium Reveals New Possibilities for Controlling Ruminant Methane Emissions», vol. 5, n. 1, 2010.

[5]B. de J. C. Munanga, G. Loiseau, J. Grabulos, e C. Mestres, «Modeling Lactic Fermentation of Gowé Using Lactobacillus Starter Culture», *Microorganisms*, vol. 4, n. 4, pag. 44, 2016.

[6]M. Lili, G. Biró, E. Sulyok, M. Petis, J. Borbély, e J. Tamás, «Novel approach on the basis of FOS/TAC method», *Risk Factors Environ. Food Saf.*, vol. XVII, pagg. 713–718, 2011.

[7]H. Bouallagui, O. Haouari, Y. Touhami, R. Ben Cheikh, L. Marouani, e M. Hamdi, «Effect of temperature on the performance of an anaerobic tubular reactor treating fruit and vegetable waste», *Process Biochem.*, vol. 39, n. 12, pagg. 2143–2148, 2004.

[8]G. C. Carlos Enrique e B. Ruggeri, «Enhanced Biohydrogen Production and CO2 Sink by Powered Fe ° Addition in Dark Fermentation POWERED Fe ° ADDITION IN DARK FERMENTATION», n. September, 2017.

[9]L. J. Weathers, G. F. Parkin, e P. J. Alvarez, «Utilization of cathodic hydrogen as electron donor for chloroform cometabolism by a mixed, methanogenic culture», *Environ. Sci. Technol.*, vol. 31, n. 3, pagg. 880–885, 1997.

[10]J. D. Verink, «Simplified Procedure for Constructing Pourbaix Diagrams», *Uhlig's Corros. Handb. Third Ed.*, vol. 535, n. 1979, pagg. 93–101, 2011.

[11]P. Tratnyek, «Permeable Reactive Barriers of Iron and Other Zero- Valent Metals», n. May, 2003.

[12]H. H. P. Fang, T. Zhang, e H. Liu, «Microbial diversity of a mesophilic hydrogen-producing sludge», *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 58, n. 1, pagg. 112–118, 2002.

[13]J. S. Chen e D. K. Blanchard, «Isolation and properties of a unidirectional H2-oxidizing hydrogenase from the strictly anaerobic N<sub>2</s>-fixing bacterium *Clostridium pasteurianum* W5», *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 84, n. 4, pagg. 1144–1150, 1978.

[14]Y. Yang, J. Guo, e Z. Hu, «Impact of nano zero valent iron (NZVI) on methanogenic activity and population dynamics in anaerobic digestion», *Water Res.*, vol. 47, n. 17, pagg. 6790–6800, 2013.

[15]X. Meng, Y. Zhang, Q. Li, e X. Quan, «Adding Fe0powder to enhance the anaerobic conversion of propionate to acetate», *Biochem. Eng. J.*, vol. 73, pagg. 80–85, 2013.

[16]APHA/AWWA/WEF, «Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater», *Stand. Methods*, pag. 541, 2012.

[17]A. C. Luongo Malave', M. Bernardi, D. Fino, e B. Ruggeri, «Multistep anaerobic digestion (MAD) as a tool to increase energy production via H2 + CH4», *Int. J. Hydrogen Energy*, vol. 40, n. 15, pagg. 5050–5061, 2015.

[18]M. Zwietering e I. Jongenburger, «Modeling of the bacterial growth curve», *Appl. ...*, vol. 56, n. 6, pagg. 1875–1881, 1990.

[19]B. Gompetz, «On the Nature of the Function Expressive of the Law of Human Mortality, and on a New Mode of Determining the Value of Life Contingencies», *R. Soc. London*, vol. 115, n. 1816, pagg. 513–585, 1825.

[20]F. J. Richards, «NA Flexible Growth Function for Empirical Useo Title», *J. Exp. Bot*, vol. 10, n. 39, pagg. 290–301, 1959.
[21]C. J. Stannard, A. P. Williams, e P. A. Gibbs, «Temperature/growth relationships for psychrotrophic food-spoilage bacteria», *Food Microbiol.*, vol. 2, n. 2, pagg. 115–122, 1985.
[22]Y. Mu, H. Q. Yu, e G. Wang, «Evaluation of three methods for enriching H2-producing cultures from anaerobic sludge», *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 40, n. 4, pagg. 947–953, 2007.
[23]A. Gibson, N. Bratchell, e T. Roberts, «The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extent of growth of clostridium botulinum type A in pasteruized pork slurry», *J. Appl. Bacteriol.*, vol. 62, pagg. 479–490, 1987.

[1][b] *IEA 2006, World Energy Outlook. International Energy Agency*

[2][b] *IPCC 2000, Special report on emission scenarios, Intergovernmental Panel on Climate Change*).

[3][b] http://www.isprambiente.gov.it/it [ultimo accesso 15 Giugno 2018]

[4][b] http://www.bioprocesscontrol.com/products/ampts-ii/

[5][b] https://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list [ultimo accesso 13 Maggio 2018]

[6][b] http://www2.unibas.it/parente/wordpress/wp-content/upLoads/CrescitaST.pdf [ultimo accesso 23 Giugno 2018]

12 Ringraziamenti

Sicuramente meritano menzione speciale le persone che mi hanno seguito in questo lavoro di tesi. Il professor Ruggeri, che con le sue lunghe chiacchierate mi ha saputo trasmettere la curiosità verso il mondo circostante. E' stato un immenso piacere conoscerlo e poter trarre qualche piccolo, ma significativo insegnamento di vita. Secondo ma non meno importane è Carlos, che dal primo momento che abbiamo inziato a lavorare è stato per me un punto di riferimento, una persona da ammirare e seguire. Non ho mai conosciuto una persona cosi vivace e geniale. Ringrazio di cuore anche Lorenzo che con la sua meticolosità e dedizione mi ha insegnato veramente moltissimo in laboratorio e non solo.