

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

Formazione di fiocchi e granuli microbici nel processo di fermentazione anaerobica



Relatori

Prof. Bernardo Ruggeri

Ing. Gomez Camacho Carlos Enrique

Candidato

Lorenzo Mangialardi

Luglio 2018

*“ Dai diamanti non nasce niente,
dal letame nascono i fior”*

Fabrizio De Andrè

INDICE GENERALE

1	Introduzione.....	1
1.1	Richiami sulla fermentazione anaerobica.....	2
1.1.1	La Respirazione Cellulare.....	2
1.1.2	Le fasi della fermentazione anaerobica.....	4
1.1.2.1	Idrolisi.....	5
1.1.2.2	Acidogenesi.....	5
1.1.2.3	Acetogenesi.....	5
1.1.2.4	Metanogenesi.....	6
1.1.3	I prodotti della FA: Biogas.....	6
1.1.3.1	Bio-H ₂	7
1.1.3.2	Bio-CH ₄	8
1.1.4	Substrato.....	9
1.1.4.1	Parametri che caratterizzano il substrato.....	9
1.1.4.1.1	Solidi Totali (TS) e Solidi Volatili (VS).....	9
1.1.4.1.2	Rapporto carbonio azoto Fosforo C/N/P.....	10
1.1.4.1.3	Micronutrienti e sostanze inibenti.....	10
1.1.4.2	Tipologie di Substrato.....	10
1.1.4.2.1	Reflui zootecnici.....	11
1.1.4.2.2	Biomasse da colture dedicate.....	11
1.1.4.2.3	Sottoprodotti e rifiuti.....	11
1.1.4.3	Pretrattamenti sulle biomasse.....	12
1.1.5	Parametri di controllo del processo di FA.....	13
1.1.5.1	Temperatura.....	13
1.1.5.2	pH.....	14
1.1.5.3	Poteziale Red-Ox.....	14
1.1.5.4	Tipo di substrato e sue caratteristiche chimico fisiche.....	14
1.1.5.5	Miscelazione.....	14
1.1.6	Configurazioni reattoristiche.....	15
2	Funzionalità dei granuli microbici nella FA.....	16
2.1	Microrganismi coinvolti nel processo di FA.....	16
2.1.1	Classificazione Metabolica.....	18
2.2	Sintrofia.....	18
2.2.1	Trasferimento elettronico interspecie (IET).....	19
2.2.1.1	Shuttled interspecies Electron Transfer.....	20

2.2.1.2	Direct interspecies Electron Transfer	21
2.2.1.3	Confronto tra DIET e SIET	23
2.3	Granuli microbici	24
2.3.1	Caratteristiche chimico-fisiche dei granuli microbici	24
2.3.1.1	Sedimentabilità	24
2.3.1.2	Permeabilità e porosità	24
2.3.1.3	Morfologia	25
2.3.1.4	Stabilità meccanica	25
2.3.1.5	EPS	25
2.3.2	Struttura dei granuli microbici	25
2.3.3	Processo di Granulazione	27
2.4	Effetto del ferro zero valente sul processo di FA	30
3	Effetti della miscelazione sulla FA	33
3.1	La miscelazione nei reattori biologici	33
3.1.1	Tipologia di agitatori	34
3.2	Parametri caratteristici degli agitatori e dei sistemi agitati	36
3.2.1	Numero di Reynolds rotazionale	37
3.2.2	Tip Velocity	37
3.2.3	Numero di potenza	37
3.2.4	Numero di portata	38
3.2.5	Tempo di miscelazione e di circolazione	38
3.2.5.1	Tempo di Miscelazione	39
3.2.5.2	Tempo di circolazione	40
3.2.5.3	Misurazione del tempo di circolazione e del tempo di miscelazione	42
3.3	Micromixing e turbolenza	43
3.3.1	Teoria isotropica della turbolenza di Kolmogorov	43
3.4	Interazioni fluido/particelle	44
4	Obiettivi , Preparazioni, Procedure e Metodi analitici	48
4.1	Obiettivi del lavoro	48
4.2	Metodi Analitici	48
4.2.1	Misura di Solidi Volatili (VS) e Solidi Totali (TS)	48
4.2.1.1	Misura Solidi Totali	48
4.2.1.2	Misura Solidi Volatili	49
4.2.2	Misura di pH	49
4.2.3	Misura del ORP	49
4.2.4	Misura del gas prodotto	49

4.2.5	Misura di composizione del gas prodotto	49
4.2.6	Misura di Viscosità	50
4.2.7	Analisi di immagini	50
4.3	Trattamento dei dati sperimentali	50
4.3.1	Analisi delle curve relative alla produzione di Biogas.....	50
4.3.2	Analisi statistica dei dati	51
4.3.3	Analisi dei dati prove di miscelazione	51
4.4	Procedure Sperimentali	51
4.4.1	Prove Idrodinamiche.....	51
4.4.1.1	Apparato sperimentale.....	51
4.4.1.2	Procedura sperimentale	52
4.4.2	Prove di fermentazione	54
4.4.2.1	Inoculo.....	56
4.4.2.1.1	Inoculo prove di produzione di Bio-H ₂	56
4.4.2.1.2	Inoculo prove di produzione di Bio-CH ₄	57
4.4.2.2	Substrato.....	58
4.4.3	Prova di fermentazione: produzione di Bio-H ₂ a diversi regimi idrodinamici	61
4.4.3.1	PROVA A 200 RPM.....	61
4.4.3.2	Prova a 500 rpm.....	61
4.4.3.3	Prova a 800 rpm.....	62
4.4.4	Prova di fermentazione: produzione di Bio-H ₂ in presenza di zvi.....	62
4.4.4.1	Procedura Operativa.....	62
4.4.5	Prova di fermentazione: produzione di Bio-CH ₄ a diversi regimi idrodinamici	63
4.4.5.1	Prova a 70 rpm.....	63
4.4.5.2	Prova a 120 rpm.....	63
4.4.5.3	Prova a 200 rpm.....	64
5	Risultati prove sperimentali.....	65
5.1	Prove Idrodinamiche	65
5.1.1	Prove Elica Marina e PBT-45°	66
5.1.1.1	Prove a 70 rpm.....	66
5.1.1.2	Prove a 120 rpm.....	67
5.1.1.3	Prove a 200 rpm.....	68
5.2	Prova di fermentazione: produzione di Bio-H ₂ a diversi regimi idrodinamici	69
5.3	Prova di fermentazione: produzione di Bio-H ₂ in presenza di ZVI	72
5.4	Prova di fermentazione: produzione di Bio-CH ₄ a diversi regimi idrodinamici.....	75
6	Analisi dei dati sperimentali e considerazioni	79

6.1	Prove Idrodinamiche	79
6.1.1	Prestazioni del sistema di miscelazione	79
6.1.2	Valutazione del tempo di circolazione medio nel brodo	82
6.2	Prova di fermentazione: produzione di Bio-H ₂ a diversi regimi idrodinamici	83
6.3	Prova di fermentazione: produzione di Bio-CH ₄ a diversi regimi idrodinamici	86
6.4	Considerazioni: tempi medi di circolazione e dimensione dei granuli microbici	89
6.5	Prova di fermentazione: produzione di Bio-H ₂ in presenza di zvi	89
7	Conclusioni	92
	Appendice A: Composizione OMW	95
	Appendice B: Misure tempi di miscelazione e tempi di circolazione	97
	Appendice C: Misure dimensione granuli HPB	99
	Appendice D: Misure dimensione granuli HCB	100
	Appendice E: Curve modellate prove di produzione di bio-H ₂ a diversi rpm	101
	Appendice F: Curve modellate prove di produzione di bio-CH ₄ a diversi rpm	103
	Appendice G: Curve modellate prove di produzione di bio-H ₂ in presenza di ZVI	105
	Bibliografia	107
	Ringraziamenti	111

INDICE TABELLE

Tabella 1.1 Tipologia di substrato e relativa capacità produttiva	1
Tabella 1.2 Tipologie di respirazione cellulare [9]	3
Tabella 1.3 ORP per Respirazione cellulare [9]	4
Tabella 1.4 Confronto PCI biogas e PCI combustibili gassosi.....	8
Tabella 1.5 Tipologia di processo a differenti % di TS. Tratta da [5] con modifiche.....	9
Tabella 1.6 Contributi delle diverse componenti organiche in termini di biogas[5].....	10
Tabella 1.7 Reflui zootecnici e relativa capacità produttiva [5].....	11
Tabella 1.8 Biomasse da colture dedicate e relativa capacità produttiva [5].....	11
Tabella 1.9 Sottoprodotti e rifiuti e relativa capacità produttiva	12
Tabella 1.10 Vantaggi e svantaggi tipologia di microrganismi[11].....	14
Tabella 1.11 Riepilogo parametri operativi FA. [11].....	15
Tabella 2.1 Principali batteri partecipanti al processo fermentativo [11].....	17
Tabella 2.2 Reazioni acetogeniche e relativa energia libera [26]	19
Tabella 2.3 Reazioni HCB e relativa energia libera [26]	19
Tabella 2.4 Principali teorie di granulazione. Tratta da [35] con modifiche.	28
Tabella 2.5 Studi sugli effetti dell'additivazione del ZVI sulla resa della FA	31
Tabella 3.1 Valori di K per diversi tipi di impeller [55]	35
Tabella 3.2 N_p e N_Q per varie tipologie di agitatore.....	38
Tabella 4.1 Caratteristiche degli agitatori	52
Tabella 4.2 Concentrazione biomassa inoculo HPB prima e dopo fase di crescita	57
Tabella 4.3 TS e VS per letame bovino trattato e non trattato	58
Tabella 4.4 VS e TS per substrato pretrattato e non pretrattato.....	60
Tabella 4.5 VS e TS per substrato pretrattato e idrolizzato.....	60
Tabella 5.1 Condizioni operative idrodinamiche elica marina	65
Tabella 5.2 Condizioni operative prove idrodinamiche PBT-45°	65
Tabella 5.3 τ_m e τ_c ricavati dalle prove a 70 rpm con elica marina.....	66
Tabella 5.4 τ_m e τ_c ricavati dalle prove a 70 rpm con PBT-45°.....	66
Tabella 5.5 τ_m e τ_c ricavati dalle prove a 120 rpm con elica marina.....	67
Tabella 5.6 τ_m e τ_c ricavati dalle prove a 120 rpm con PBT-45°.....	67
Tabella 5.7 τ_m e τ_c ricavati dalle prove a 200 rpm con elica marina.....	68
Tabella 5.8 τ_m e τ_c ricavati dalle prove a 200 rpm con PBT-45°.....	68
Tabella 5.9 Condizioni operative prove produzione idrogeno a diversi rpm	69
Tabella 5.10 Dimensione media granuli HPB	71
Tabella 5.11 Condizioni operative prove produzione idrogeno in assenza e in presenza di ZVI	72
Tabella 5.12 Condizioni operative prove produzione idrogeno a diversi rpm.	75
Tabella 5.13 Dimensione media granuli HCB.....	77
Tabella 6.1 Tempi medi di circolazione a vari regimi di agitazione.....	81
Tabella 6.2 Reynold rotazionali a confronto	82
Tabella 6.3 Stima dei tempi di circolazione medi per il brodo.....	82
Tabella 6.4 Parametri modello di Gompertz per bio-H ₂	83
Tabella 6.5 Confronto dimensioni Kolmogorov e dimensioni granuli HPB a vari rpm	85
Tabella 6.6 Parametri modello di Gompertz per Bio-CH ₄	86
Tabella 6.7 Confronto dimensioni Kolmogorov e dimensioni granuli HCB a vari rpm.....	88
Tabella 6.8 Parametri modello di Gompertz per Bio-H ₂ in presenza e in assenza di ZVI	89
Tabella A.1 Composizione OMW	95

Tabella B.1 Risultati prove elica marina	97
Tabella B.2 Risultati prove PBT-45°	98
Tabella C.1 Dimensioni granuli HPB	99
Tabella D.1 Dimensioni granuli HCB.....	100

INDICE FIGURE

Figura 1.1 Schema generale catena di trasporto degli elettroni. Tratto da [10] con modifiche.	3
Figura 1.2 Schema del processo di FA. Tratto da [12] con modifiche.	4
Figura 1.3 Processo di sporulazione/germinazione. Tratta da [14] con modifiche.	8
Figura 2.1 Phase-contrast micrographs di <i>D. desulfuricans</i> (a), <i>C. propionicum</i> (b), <i>Ms. bakeri</i> (c), <i>Mb. formicicum</i> (d) [21]–[23].	16
Figura 2.2 Meccanismo SIET generale.	20
Figura 2.3 DIET mediato da citocromi. Tratta da [27] con modifiche.	21
Figura 2.4 DIET mediato da pili conduttivi. Tratta da [27] con modifiche.	22
Figura 2.5 DIET mediato da materiale conduttivo non biologico. Tratta da [27] con modifiche.	22
Figura 2.6 Immagini SEM di meccanismi DIET. (a,b) DIET mediato da pili conduttivi, (c) DIET mediato da materiale conduttivo non biologico, (d) DIET mediato da citocromi. Tratte da [29]–[31]	23
Figura 2.7 Possibile Struttura Granulo microbico. Tratto da [32] con modifiche.	26
Figura 3.1 Tipologie di flusso (Flow Patterns). Tratto da [53] con modifiche.	34
Figura 3.2 Tipologie di agitatore e range di viscosità in cui applicarli.	35
Figura 3.3 Variazione di γ in funzione della distanza dall’agitatore. Tratto da [55].	36
Figura 3.4 Schema generale reattore agitato. Tratto da [51] con modifiche.	36
Figura 3.5 Variazione della velocità di circolazione in funzione della distanza dall’agitatore. misurato per turbina Rushton a 200 rpm. Tratto da [60].	39
Figura 3.6 Risultati generica prova sperimentale misurazione tempo di miscelazione e tempo di circolazione. Tratto da [62] con modifiche.	40
Figura 3.7 Possibili circolazioni all’interno del reattore agitato.	41
Figura 3.8 Interazione particelle sospese con eddies di grandi dimensioni.	45
Figura 3.9 Interazione particelle sospese con eddies di piccole dimensioni.	46
Figura 3.10 interazione tra particelle e eddies con dimensioni comparabili tra loro.	46
Figura 4.1 Agitatori impiegati nelle prove idrodinamiche: elica marina (A) e PBT-45° (B).	52
Figura 4.2 Configurazioni prove idrodinamiche: posizione elettrodo di misura.	53
Figura 4.3 Reattore Minifors I.	54
Figura 4.4 Schema apparato sperimentale.	55
Figura 4.5 Inoculo HPB: endospore.	56
Figura 4.6 Inoculo prima (A) e dopo (B) la fase di pre-coltura.	57
Figura 4.7 Raccolta inoculo per produzione di Bio-CH ₄ , presso Borgata Casaretto, Brozolo.	57
Figura 4.8 Composizione di un ipotetico OMW.	58
Figura 4.9 Composizione substrato espressa in termini di acqua, frazione organica e frazione minerale.	59
Figura 4.10 Composizione frazione organica substrato su base secca.	59
Figura 5.1 Prova a 70 rpm, BASSO, elica marina.	66
Figura 5.2 Prova a 120 rpm, BASSO, elica marina.	67
Figura 5.3 Prova a 200 rpm, ALTO, PBT-45°	68
Figura 5.4 Curve di Produzione a 200 rpm per il bio-H ₂	69
Figura 5.5 Curve di Produzione a 500 rpm per il bio-H ₂	70
Figura 5.6 Curve di Produzione a 800 rpm per il bio-H ₂	70
Figura 5.7 Granulo HPB Prova 200 rpm.	71
Figura 5.8 Granulo HPB Prova 500 rpm.	71
Figura 5.9 Granulo HPB Prova 800 rpm.	72

Figura 5.10 Curve di Produzione per il bio-H ₂ , Prova 1 in assenza di ZVI	73
Figura 5.11 Curve di Produzione per il bio-H ₂ , Prova 2 in assenza di ZVI	73
Figura 5.12 Curve di Produzione per il bio-H ₂ , Prova 3 in presenza di ZVI.....	74
Figura 5.13 Curve di Produzione per il bio-H ₂ , Prova 4 in presenza di ZVI.....	74
Figura 5.14 Curve di Produzione a 70 rpm per il bio-CH ₄	75
Figura 5.15 Curve di Produzione a 120 rpm per il bio-CH ₄	76
Figura 5.16 Curve di Produzione a 200 rpm per il bio-CH ₄	76
Figura 5.17 Granulo HCB Prova 70 rpm	77
Figura 5.18 Granulo HCB Prova 120 rpm	78
Figura 5.19 Granulo HCB Prova 200 rpm	78
Figura 6.1 Miscelazione del sistema difficoltosa, elica marina a 120 rpm	79
Figura 6.2 Buona miscelazione del sistema, PBT-45° a 120 rpm	80
Figura 6.3 Tempi di miscelazione per elica marina (A) e PBT-45° (B)	80
Figura 6.4 Tempi di circolazione per elica marina (A) e PBT-45° (B).....	81
Figura 6.5 Confronto tempi medi di circolazione elica marina e PBT-45°	81
Figura 6.6 Confronto tra tempi medi di circolazione	83
Figura 6.7 Parametri di efficienza del processo al variare del regime di agitazione. Resa in H ₂ (A), Produttività massima (B) e %H ₂ nel biogas (C).	84
Figura 6.8 Confronto tra dimensione granuli HPB e scala di Kolmogorov	85
Figura 6.9 Parametri di efficienza del processo al variare del regime di agitazione. Resa in CH ₄ (A), Produttività massima (B) e %CH ₄ nel biogas (C).....	87
Figura 6.10 Confronto tra dimensione granuli HCB e scala di Kolmogorov	88
Figura 6.11 Curve modellate messe a confronto	90
Figura E.1 Confronto curva sperimentale e modellata a 200 rpm per il bio-H ₂	101
Figura E.2 Confronto curva sperimentale e modellata a 500 rpm per il bio-H ₂	101
Figura E.3 Confronto curva sperimentale e modellata a 800 rpm per il bio-H ₂	102
Figura F.1 Confronto curva sperimentale e modellata a 70 rpm per il Bio-CH ₄	103
Figura F.2 Confronto curva sperimentale e modellata a 120 rpm per il Bio-CH ₄	103
Figura F.3 Confronto curva sperimentale e modellata a 200 rpm per il Bio-CH ₄	104
Figura G.1 Confronto curva sperimentale e modellata, in assenza di ZVI per il Bio-H ₂	105
Figura G.2 Confronto curva sperimentale e modellata, in assenza di ZVI per il Bio-H ₂	105
Figura G.3 Confronto curva sperimentale e modellata, in presenza di ZVI per il Bio-H ₂	106
Figura G.4 Confronto curva sperimentale e modellata, in presenza di ZVI per il Bio-H ₂	106

ACRONIMI

- DIET: Direct Interspecies Electron Transfer;
- DLVO: Derjaguin Landau Verwey Overbeek.
- EPS: Extracellular Polymeric Substances;
- FA: Fermentazione Anaerobica;
- FORSU: Frazione organica rifiuti solidi urbani;
- HCB: Hydrogen Consuming Bacteria;
- HLR: Hydraulic Loading Rate;
- HPB: Hydrogen Producing Bacteria;
- HRT: Hydraulic Retention Time;
- IET: Interspecies Electron Transfer;
- IFT: Interspecies Formate Transfer;
- IHT: Interspecies Hydrogen Transfer;
- OLR: Organic Loading Rate;
- OMW: Organic Market Waste;
- ORP: Oxidation-Reduction Potential;
- PCI: Potere Calorifico Inferiore;
- PIV: Particle Image Velocimetry;
- SIET: Shuttled Interspecies Electron Transfer;
- TS: Total Solids;
- VFA: Volatile Fatty Acids;
- VS: Volatile Solids;
- ZVI: Zero Valent Iron;

PARTE I: Analisi Bibliografica

1 INTRODUZIONE

Negli ultimi anni il fabbisogno energetico mondiale è cresciuto sempre più e, ad oggi circa l'88% di tale domanda è soddisfatta dai combustibili fossili. In questo scenario, il biogas prodotto da rifiuti di varia natura, specialmente il bio-metano, può rappresentare una valida alternativa ai combustibili fossili o anche al gas naturale in termini di gas di sintesi [1].

A dimostrazione di quanto appena detto è sufficiente mettere a confronto i dati forniti dal Biogas Barometer per gli anni 2007 e 2017. Viene infatti riportato come nell'ultimo decennio, la produzione di biogas a livello europeo sia passata da 5783 ktoe a 16094 ktoe; a livello nazionale si è passati, da 445 ktoe a 2029 ktoe. [2], [3]

Rispetto ad altre forme di bioenergia, quella legata al biogas prodotto attraverso fermentazione anaerobica (FA) offre molteplici vantaggi in quanto :

- sfrutta materiale di scarto largamente disponibile per produrre un ottimo combustibile *in situ*, riducendo allo stesso tempo le conseguenze sull'ambiente derivanti dal trattamento dei rifiuti;
- consente di ridurre le emissioni di anidride carbonica;
- la biomassa residua dopo la digestione anaerobica è un eccellente fertilizzante.

La potenzialità di questo processo è quindi quella di produrre energia e di stabilizzare i rifiuti di natura organica che passano per la via fermentativa [4]. Come è possibile osservare in Tabella 1.1, esistono numerose tipologie di substrato impiegabili nei processi di FA, ognuna delle quali presenta un certo rendimento in biogas. La resa in biogas del sistema, e di conseguenza anche quella energetica, per le varie tipologie di substrato non è un valore assoluto, ma è molto variabile ed è legata a tutta una serie di caratteristiche alcune delle quali sono riportate in Tabella 1.1 [5].

Tabella 1.1 Tipologia di substrato e relativa capacità produttiva

Tipo di Substrato	Solidi Totali (ST) (%)	Solidi Volatili (SV) (%diST)	Resa in Biogas (m ³ /gSV)	CH4 in Biogas (%)	Rif.
Frazione organica rifiuti solidi urbani (FORSU)	40-75	50-70	300-450	50-60	[5]
Letame bovino	11-25	65-85	200-300	60-65	[5]
Frazione organica rifiuti mercatali (OMW)	40-60	50-70	429-568	50-60	[6]

Numerosi sono i parametri su cui si può intervenire per incrementare la resa in metano del processo di FA, tra essi è presente anche la miscelazione del sistema; parametro estremamente importante in quanto da esso dipendono i fenomeni sintrofici che avvengono tra i microorganismi durante il processo di fermentativo e che garantiscono tutta una serie di reazioni chimiche che portano alla formazione del metano.

Oltre che a livello macroscopico, come nel caso della miscelazione del sistema, per incrementare la resa del processo è possibile intervenire anche a livello microscopico e, più precisamente a livello dei percorsi metabolici dei microrganismi coinvolti nella FA. A tal proposito, esistono studi recenti in letteratura che prendono in considerazione l'aggiunta di ferro zerovalente (Fe⁰) al sistema

fermentativo e che riportano risultati promettenti in termini di produttività di biogas e resa finale in metano [7].

Il presente lavoro ha dunque lo scopo di analizzare ed approfondire questi due aspetti attraverso una campagna di prove sperimentali che verranno illustrate più avanti.

1.1 RICHIAMI SULLA FERMENTAZIONE ANAEROBICA

Al fine di comprendere al meglio quanto verrà discusso nel presente lavoro è necessaria una trattazione preliminare per quanto riguarda il processo di fermentazione anaerobica (FA). La FA è un processo di tipo biologico, che avviene in assenza di ossigeno, nel quale le sostanze organiche contenute in materiali di origine animale e/o vegetale, vengono convertite in biogas attraverso un cammino metabolico, a più fasi, che coinvolge microrganismi di varia natura [5]. La FA è un processo estremamente complesso oggetto di continui studi, ed ha avuto un notevole sviluppo in termini di utilizzo di differenti biomasse; nel presente paragrafo verranno trattati i principali aspetti della FA a partire dai fondamenti.

1.1.1 LA RESPIRAZIONE CELLULARE

Si definisce respirazione cellulare come quel processo metabolico attraverso il quale le cellule producono energia necessaria al loro sostentamento a partire da composti complessi di varia natura [8]. Lo scopo della respirazione cellulare è quello di produrre, attraverso una serie di reazioni cataboliche/anaboliche, essenzialmente due elementi:

- Carbonio, necessario per sintetizzare quanto necessario al sistema cellulare per crescere e riprodursi;
- Energia, necessaria per ogni attività che avviene all'interno delle cellule.

La fonte di carbonio da cui viene prodotta tale energia può essere organica o inorganica ma, indipendentemente dalla natura del substrato, dalla sua degradazione all'interno della cellula, l'energia che si produce è legata agli elettroni rilasciati durante la rottura dei legami chimici. Nel processo di respirazione cellulare vero e proprio, tali elettroni vengono impiegati in una catena di trasporto che permette di immagazzinare l'energia sotto forma di ATP attraverso la reazione [9]:



Nel dettaglio questa catena di trasporto, rappresentata in forma generale in figura 1.1, è costituita da carrier elettronici, cioè molecole, che passando da uno stato ridotto ad uno stato ossidato trasportano gli elettroni da una condizione caratterizzata da un potenziale redox elevato ad un potenziale redox più basso; durante tali reazioni viene liberata dell'energia che viene immagazzinata dal sistema biologico secondo la relazione (1.1) [4], [9].

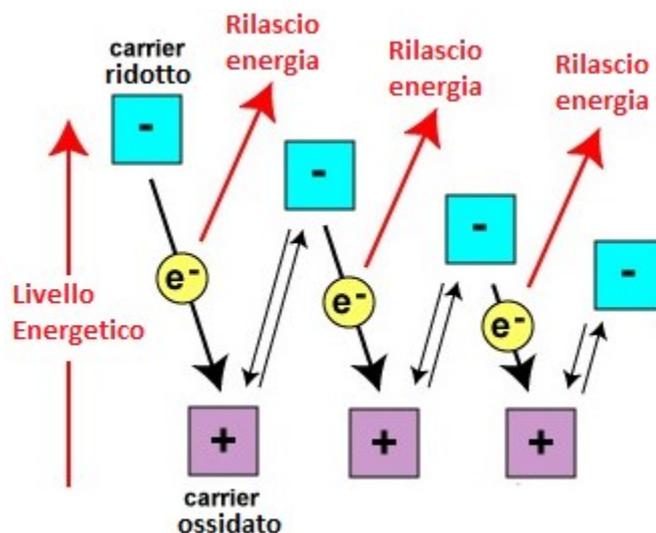


Figura 1.1 Schema generale catena di trasporto degli elettroni. Tratto da [10] con modifiche.

A seconda del tipo di accettore finale che si trova al termine della catena di trasporto di elettroni si ha una diversa tipologia di respirazione cellulare, osservando quanto riportato in Tabella 1.2 è possibile notare come la respirazione anaerobica di tipo fermentativo è un processo incompleto; questo da un punto di vista energetico sta a significare che rispetto la respirazione aerobica, quella anaerobica fermentativa estrae meno energia. Allo stesso tempo, l'energia richiesta dalla biofase anaerobica è minore rispetto a quella richiesta da una biofase aerobica.

Tabella 1.2 Tipologie di respirazione cellulare [9]

Tipo di Respirazione	Carrier elettronico finale	Reazione Biochimica	Processo	Prodotto Ridotto
Aerobica	O ₂	$CH_2O^* + O_2 \rightarrow CO_2 + H_2O$	Completo	H ₂ O
Anaerobica (Denitrificazione)	NO ₃ ⁻	$CH_2O^* + NO_3 \rightarrow CO_2 + H_2O + N_2 + N_2O$	Completo	N ₂ , N ₂ O
Anaerobica (Fermentazione)	Composti organici	$CH_2O^* \rightarrow CO_2 + H_2O + \text{acidi} + \text{alcoli}$	Incompleto	VFA
Anaerobica (Fermentazione)	CO ₂ /CO ₃ ²⁻	$CH_2O^* + CO_2 \rightarrow CH_4 + H_2O$	Incompleto	CH ₄

*Generico composto organico

In altre parole una respirazione cellulare completa ha come risultato quello di ossidare completamente il carbonio, derivante dal substrato, nella sua forma più ossidata rappresentata dalla CO₂. In quella incompleta invece, solo una quota parte del carbonio viene ossidato completamente a CO₂, la restante parte viene convertito in VFA e alcoli [9].

Un parametro estremamente importante nel processo di respirazione cellulare è rappresentato dal potenziale RedOx (ORP), il valore di ORP all'interno del sistema determina l'ordine con cui avvengono i processi ossidoriduttivi; l'ORP è quindi un indicatore delle capacità delle molecole di rilasciare (ossidazione) o acquistare (riduzione) elettroni. In genere più la differenza di potenziale esistente, tra donatori di elettroni ed accettori è elevata, maggiore è l'energia rilasciata sotto forma di elettroni ed immagazzinata in ATP [4]. L'ORP del sistema, come è possibile osservare in Tabella 1.3, va a definire la tipologia di respirazione cellulare; in particolare nel caso dei processi fermentativi il valore dell'ORP deve essere inferiore ai -300 mV nel caso in cui si voglia ottenere CH₄. Questo valore così restrittivo è necessario in quanto, a differenza dei microrganismi idrolitici e acidogenici coinvolti

nelle prime fasi del processo di FA, i microorganismi responsabili della sintesi di CH₄ sono strettamente anaerobici [9].

Tabella 1.3 ORP per Respirazione cellulare [9]

Tipo di Respirazione	RedOx Potential ORP (mV)	Carrier elettronico finale	Prodotto Ridotto
Aerobica	>+50	O ₂	H ₂ O
Anaerobica (Denitrificazione)	Da +50 a -50	NO ₃ ⁻	N ₂ , N ₂ O
Anaerobica (Fermentazione)	<-100	Composti organici	VFA
Anaerobica (Metanazione)	<-300	CO ₂ /CO ₃ ²⁻	CH ₄

1.1.2 LE FASI DELLA FERMENTAZIONE ANAEROBICA

Come introdotto nel paragrafo 1.1, la FA è un processo in cui, attraverso una catena trofica anaerobica, avviene la conversione di composti organici complessi in metano. La FA avviene essenzialmente in quattro fasi distinte ad ognuna delle quali partecipano una serie di microorganismi, che degradando il substrato in molecole più semplici, modificano gradualmente l'ambiente di reazione rendendolo adatto alla crescita e all'attività metabolica dei consorzi microbici che partecipano alle varie fasi del processo fermentativo.

Le quattro fasi in cui si svolge il processo di FA sono riportate in forma schematica in Figura 1.2, tali fasi, analizzate nel dettaglio di seguito, sono: idrolisi, acidogenesi, acetogenesi e metanogenesi [11]; da essa si evince che ogni gruppo microbico coinvolto nella FA agisce in un certo range di potenziale RedOx, scambiando elettroni in maniera sinergica.

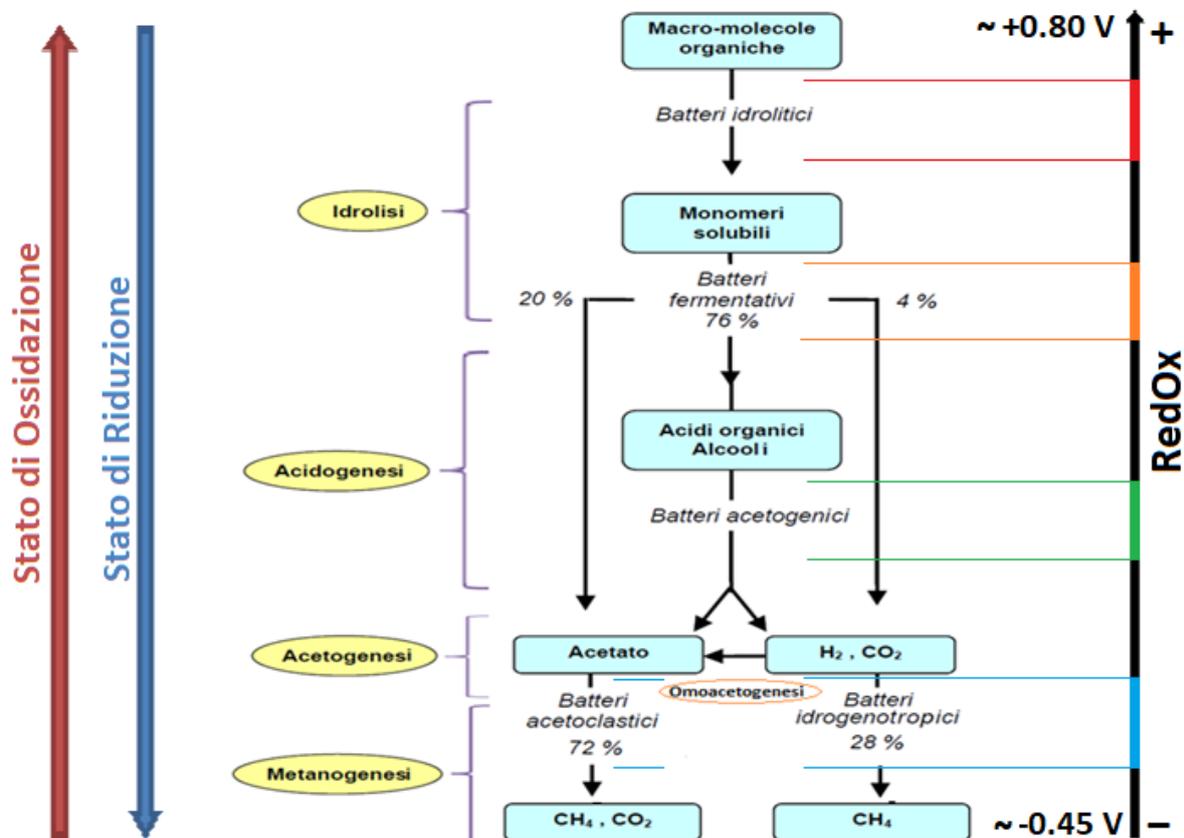


Figura 1.2 Schema del processo di FA. Tratto da [12] con modifiche.

1.1.2.1 IDROLISI

Il primo step che costituisce il processo di FA è la fase idrolitica, qui molecole complesse insolubili in acqua come cellulosa, proteine e grassi, vengono idrolizzate in molecole più semplici idrosolubili. Questo processo avviene grazie alla presenza, all'interno del sistema, di batteri idrolitici che producono un enzima esogeno, l'idrolasi, che va a rompere i legami chimici nelle macromolecole rilasciando i monomeri. La reazione con cui avviene è sotto riportata:[11]



La durata della fase idrolitica dipende molto dalla composizione iniziale della matrice da degradare, in particolare una matrice ricca in carboidrati verrà idrolizzata nel giro di poche ore; mentre un substrato ricco in composti lignocellulosici richiederà giorni e potrebbe non essere completamente degradato [11].

La popolazione batterica che opera in questa fase della FA è costituita da batteri anaerobi obbligati ed anaerobi facoltativi; di particolare importanza, oltre che dal punto di vista idrolitico, sono gli anaerobi facoltativi in quanto durante la loro attività biologica rimuovono l'O₂ presente nel sistema abbassando l'ORP e preparando l'ambiente fermentativo per le fasi successive del processo che coinvolgono specie batteriche strettamente anaerobiche [11].

1.1.2.2 ACIDOGENESI

L'acidogenesi è la seconda fase del processo di FA, qui vengono essenzialmente prodotti acidi organici a catena corta (C1-C5) a partire dai prodotti derivanti dalla fase idrolitica; come è possibile osservare in Figura 1.2 tali composti rappresentano la frazione preponderante dei prodotti della fase acidogenica. Oltre tali acidi organici vengono però prodotti altri composti come H₂, CO₂ e composti solforati derivanti dai residui proteici idrolizzati nella prima fase [11]. Tra gli acidi organici, che vengono a formarsi da tale fase, si ritrovano principalmente acido acetico, propionico e butirrico [13].

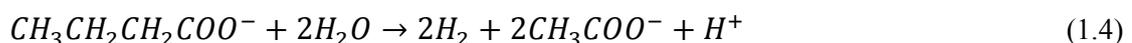
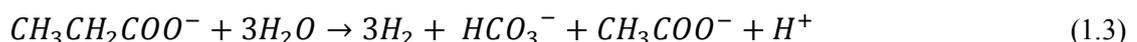
Anche in questa fase i consorzi microbici che partecipano al processo acidogenico sono costituiti da batteri anaerobi ed anaerobi facoltativi [11].

1.1.2.3 ACETOGENESI

In questa fase le molecole di acido prodotte in fase acidogenica vengono impiegate come substrato dai batteri acetogenici che le ossidano ad acido acetico e acetato. In questo caso i consorzi batterici coinvolti sono puramente anaerobi obbligati, per cui il valore di ORP da questo punto in poi del processo fermentativo diventa cruciale l'ambiente di fermentazione con valori <300mV [9].

L'acetogenesi, come riportato in Figura 1.2, può avvenire secondo due vie metaboliche differenti:

- La prima via, che sfrutta i prodotti della fase acidogenica, converte i VFA in acetato e H₂. A titolo di esempio qui di seguito sono riportate due di questa tipologia di reazione [11];



- La seconda via sfrutta invece H_2 e CO_2 derivanti da idrolisi e acidogenesi per sintetizzare acetato attraverso una via detta omoacetogenica. Qui di seguito è riportata la reazione con cui avviene questo processo [11];



Lo scopo di questa fase del processo di FA è quindi quello di produrre l'acetato necessario all'ultimo step della FA, la metanogenesi.

1.1.2.4 METANOGENESI

La metanogenesi rappresenta l'ultima fase del processo fermentativo e anch'essa avviene in condizioni strettamente anaerobiche ($ORP < 300$ mV) [9]. Le principali reazioni che avvengono in questa fase, che portano alla formazione di CH_4 , utilizzano i prodotti della fase acetogenica; esistono però altri composti, derivanti dalle restanti fasi del processo fermentativo che possono essere sfruttate da alcune tipologie di batteri metanigeni per sintetizzare metano. Tali substrati secondari possono essere ad esempio $HCOO^-$, CH_3OH , CH_3NH_3 , CH_3SH ed altri. Resta il fatto che il metano prodotto durante la FA deriva essenzialmente dall'utilizzo di:

- CH_3COO^- , da cui deriva circa il 72% del metano prodotto. Questo tipo di reazione è detta acetocalastica (eq 1.6) [11];
- CO_2 e H_2 , da cui deriva circa il 28% del metano prodotto. Questo tipo di reazione è detta idrogenotropica (eq 1.7) [11].

Qui di seguito sono riportate alcune reazioni che impiegano i composti sopra citati [11]:



Mentre le reazioni secondarie che portano comunque alla formazione di metano sono, ad esempio, le seguenti [11]:



1.1.3 I PRODOTTI DELLA FA: BIOGAS

Il biogas è una miscela gassosa infiammabile costituita per il 50-80% da metano mentre per il resto da CO_2 , H_2O , H_2 e composti contenenti zolfo [5]. Quanto appena affermato rappresenta un biogas ottenuto da un processo fermentativo completo che ha raggiunto e completato la fase metanogenica; infatti a seconda delle condizioni operative e del tipo di configurazione reattoristica impiegata nel processo di FA, come prodotto in uscita si può ottenere anche una miscela gassosa miscela gassosa ricca in H_2 , CO ed altri componenti in tracce. È quindi possibile andare a identificare i prodotti gassosi di un processo di FA come bio- H_2 e bio- CH_4 [4].

1.1.3.1 BIO-H₂

Ad oggi l'idrogeno prodotto per via fermentativa a partire da biomasse di varia natura rappresenta solo l'1% di tutto l'idrogeno prodotto. Esistono, infatti altre vie che vengono impiegate per ottenere questo gas; ne sono esempio la reazione di steam reforming che sfrutta il gas naturale (40% dell'H₂ prodotto), oli pesanti e nafta (30%), carbone (18%) e infine la via elettrolitica che rappresenta il 3% dell'idrogeno prodotto. Tutto questo interesse nei confronti dell'H₂ nasce dal fatto che, rispetto alla maggioranza dei combustibili ad oggi impiegati, presenta la maggior densità energetica $\Delta H_c^0=120,9$ MJ/kg [4].

A differenza della via fermentativa, tutti i metodi citati necessitano di una spesa energetica che il più delle volte non viene ripagata dal prodotto che si ottiene. La FA rappresenta una valida alternativa ai metodi sopra citati per la produzione di bio-H₂ in quanto:

- sfrutta come materia prima tutta una serie di rifiuti organici che, se non fossero impiegati in un processo fermentativo andrebbero smaltiti per altre vie in modo da abbattere il loro potere inquinante;
- l'assenza di atomi di carbonio nella sua formula rende l'H₂ un perfetto combustibile, in quanto rispetto ai combustibili fossili, la sua combustione non presenta la CO₂ tra i prodotti riducendo di conseguenza l'emissione di gas serra in atmosfera [4]. Bisogna comunque tener conto del fatto che questa affermazione non tiene considera la CO₂ emessa durante il processo fermentativo per cui è necessario fare un bilancio al netto della CO₂.

Come visto precedentemente nel paragrafo 1.2.2, l'H₂ è un intermedio importante nella degradazione di materiale organico ad opera di microrganismi anaerobi, in quanto è impiegato dai metanigeni per produrre CH₄ in un classico impianto di produzione di biogas [4]. Per comprendere in che modo operare, affinché da un processo fermentativo sia possibile ottenere bio-H₂, è necessario sapere che delle quattro fasi in cui si svolge il processo di FA la produzione di H₂ in grandi quantità si ha principalmente nelle prime due fasi: idrolisi e acidogenesi. Alla luce di ciò, numerose sono le vie che possono essere seguite per ottenere bio-H₂ e sono qui di seguito elencate:

- Facendo avvenire la FA in un sistema bistadio si riescono a separare le quattro fasi in due reattori distinti scindendo in questo modo la produzione dell'H₂ da quella del CH₄, in questo modo si ottimizza notevolmente la resa del processo fermentativo[4];
- Facendo avvenire la FA in un reattore continuo operante con colture miste, agendo sul tempo di permanenza all'interno del reattore si riesce a far avvenire le prime due fasi del processo fermentativo con conseguente produzione di H₂. Questo è possibile in quanto i batteri produttori di idrogeno (HPB) presentano un metabolismo molto più veloce dei batteri produttori di metano (HCB).

$$\frac{\mu_{MAX HPB}}{\mu_{MAX HCB}} \cong 4 - 5 \quad (1.11)$$

Lavorando quindi a valori intermedi di HRT si riesce ad ottenere bio-H₂ dal processo di FA, questa tipologia di controllo del processo è detto *controllo biocinetico* [4];

- Facendo avvenire la FA in un reattore batch operando opportuni trattamenti preliminari all'inoculo si vanno ad inibire gli HCB. Tali trattamenti sfruttano la caratteristica peculiare, che presentano la maggior parte dei batteri idrolitici e acidogenici, di formare spore quando si trovano in condizioni non idonee alla loro sopravvivenza. Gli HPB infatti, a differenza dei HCB presentano delle endospore, che in condizioni estreme vengono rilasciate a seguito della

morte del microorganismo; queste spore, sono estremamente resistenti e contengono tutte le informazioni genetiche del batterio [4].

Quando vengono a trovarsi in condizioni nuovamente favorevoli per il microorganismo le spore germinano riformando la cellula vegetativa in tutta la sua funzionalità. Il processo appena descritto è riportato in Figura 1.3.

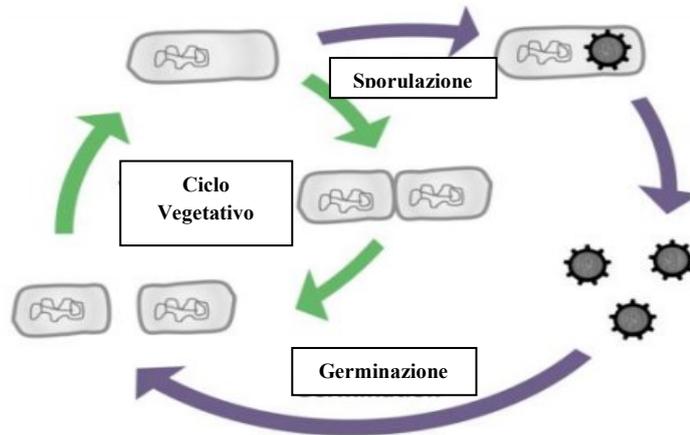


Figura 1.3 Processo di sporulazione/germinazione. Tratta da [14] con modifiche.

I trattamenti possibili che permettono di ottenere questo risultato sono molteplici, qui di seguito ne vengono riportati due a titolo di esempio:

- 1) Un trattamento termico ($T=100^{\circ}\text{C}$) che causa la morte dei HCB e il rilascio delle spore da parte dei HPB [15];
- 2) Un trattamento acido a $\text{pH}=3$ per 24h durante le quali si ha la morte dei HCB e il rilascio delle spore degli HPB [4].

Il processo che consente di ottenere bio- H_2 per via fermentativa prende il nome di Dark Fermentation.

1.1.3.2 BIO- CH_4

Facendo avvenire il processo fermentativo in tutte le sue quattro fasi, si ottiene un prodotto gassoso principalmente costituito da CH_4 , CO_2 e composti solforati in tracce; la miscela gassosa che si ottiene è quella che è da sempre definita come biogas. Il potere calorifico (PCI) del biogas è in genere più basso rispetto ai combustibili gassosi di solito impiegati a causa della presenza della CO_2 [5]. In Tabella 1.4 sono posti a confronto il PCI del biogas con i PCI di alcuni combustibili gassosi.

Tabella 1.4 Confronto PCI biogas e PCI combustibili gassosi

COMBUSTIBILE	PCI (MJ/m^3)
Biogas	10-27*
Metano	35,7
Propilene	88,1
Propano	97,6
Butano	121,6

* Il PCI del biogas è funzione della sua composizione

Nonostante un PCI più basso rispetto ad altri combustibili, il biogas presenta un certo potenziale economico per quanto riguarda il suo impiego come risorsa energetica. In particolare può essere impiegato nella produzione di energia elettrica e calore attraverso la sua combustione in impianti di

cogenerazione; in questo caso l'unico trattamento a cui il biogas deve essere sottoposto è un processo di desolfurazione [5]. Altre sue applicazioni prevedono il suo inserimento nel circuito del gas naturale o il suo impiego come carburante nel settore automotive; per questa tipologia di applicazione il biogas, oltre la desolfurazione, deve essere concentrato in CH₄ rimuovendo la CO₂ contenuta in esso [4].

1.1.4 SUBSTRATO

In questi anni i processi di FA, grazie al grande interesse mostrato da parte della comunità scientifica, hanno avuto un grande sviluppo e numerose sono state le esperienze nell'impiego di differenti biomasse. La scelta della biomassa, detta anche substrato, da impiegare va fatta seguendo una certa logica e tenendo conto di tutta una serie di aspetti di seguito brevemente analizzati [5]:

- la reperibilità delle biomasse;
- la possibilità di reperire sottoprodotti a costi contenuti impiegabili come substrato;
- il costo della matrice organica utilizzabile, tenendo conto però anche della resa in biogas che la matrice scelta presenta;
- la produttività della biomassa in termini di biogas.

Quando si va a scegliere un potenziale substrato, bisogna quindi tener conto degli aspetti appena elencati [5].

1.1.4.1 PARAMETRI CHE CARATTERIZZANO IL SUBSTRATO

Affinché il processo di FA risulti efficiente in termini di produttività in biogas è necessario che il substrato presenti determinate caratteristiche in termini di macronutrienti e micronutrienti; infatti un substrato con una composizione non opportunamente bilanciata genera tutta una serie di problemi che si ripercuotono sulla resa del processo fermentativo.

Un substrato, quindi, per poter essere impiegato con successo in un processo di FA deve presentare tutta una serie di caratteristiche che lo rendono idoneo alla fermentazione. Tali parametri sono brevemente descritti e analizzati di seguito.

1.1.4.1.1 SOLIDI TOTALI (TS) E SOLIDI VOLATILI (VS)

Le concentrazioni di TS e VS all'interno di un substrato sono due parametri che permettono di fare una stima della resa in biogas che ci si può aspettare dal processo fermentativo che impiega un determinato substrato [16]. Analizzando questi due parametri nel dettaglio si ha che:

- La concentrazione di solidi totali (TS) esprime la concentrazione di materia secca presente all'interno del substrato ed è espressa in genere come percentuale in peso rispetto a 1kg di substrato tal quale [16]. Questo parametro è molto importante in quanto in base al suo valore, il processo fermentativo può avvenire in tre condizioni operative differenti [5]. In Tabella 1.5 sono riportate le tipologie di FA in funzione del contenuto di TS all'interno del substrato.

Tabella 1.5 Tipologia di processo a differenti % di TS. Tratta da [5] con modifiche.

Tipologia di Processo	TS nella biomassa (%)
Wet	10-15
Semi-Dry	15-25
Dry	25-40

- La concentrazione di VS, a differenza dei TS, non tiene conto delle sostanze inerti (ceneri), ossia dà un'indicazione delle sostanze realmente fermentabili all'interno della biomassa [16]. Tali sostanze sono appunto definite solidi volatili e la sua concentrazione è espressa in genere come percentuale in peso rispetto alla misura di TS [5] o come concentrazione facendo riferimento al volume complessivo di substrato. La variazione della concentrazione dei VS durante il processo di FA fornisce informazioni riguardo al grado di degradazione della biomassa e può essere usata per stimare la resa in biogas del processo [16].

1.1.4.1.2 RAPPORTO CARBONIO AZOTO FOSFORO C/N/P

Il rapporto C/N è un parametro di estrema importanza per le biomasse in quanto deve rientrare in intervalli ben definiti per far sì che il processo di FA proceda in maniera efficiente. In genere il rapporto C/N deve essere compreso tra 16 e 25 [11]. Questo rapporto è estremamente importante in quanto da esso è fortemente influenzato un parametro di processo estremamente importante, il pH. Infatti:

- Un rapporto C/N troppo basso porta alla formazione di NH_3 in eccesso con conseguente incremento del pH che arriva a raggiungere valori tali da inibire la metanogenesi [11];
- Un rapporto C/N troppo alto equivale ad avere una carenza di azoto nel substrato; questo rappresenta un problema in quanto viene a mancare la fonte di azoto per sintetizzare proteine utili alla sopravvivenza popolazione batterica ed inoltre si ha un abbassamento del pH legato alla produzione di VFA in eccesso rispetto a quella di NH_3 [11].

Inoltre, è importante anche il rapporto esistente con il fosforo, che deve essere presente, in media, in proporzione al carbonio e all'azoto con il seguente rapporto C/N/P=20:1:5 [11].

1.1.4.1.3 MICRONUTRIENTI E SOSTANZE INIBENTI

Degli altri parametri importanti che caratterizzano i substrati sono le concentrazioni dei micronutrienti come Fe, Ni, Mg, Se, necessari, seppur in piccolissime quantità, ai microorganismi per il loro metabolismo. Tali elementi però insieme a composti solforati e fluorurati, se presenti in concentrazioni elevate possono risultare tossici per il sistema biologico inibendo così la FA [5].

1.1.4.2 TIPOLOGIE DI SUBSTRATO

Numerose sono le tipologie di substrato impiegabili nel processo di FA, ognuna delle quali è caratterizzata da un certa resa in biogas. Le biomasse sono essenzialmente costituite da carboidrati, proteine e grassi; ognuna di queste classi di composti contribuisce in maniera differente al processo fermentativo in termini di resa in biogas [5]. In Tabella 1.6 sono riportati i contributi in termini di resa in biogas delle classi di composti sopra elencate.

Tabella 1.6 Contributi delle diverse componenti organiche in termini di biogas[5]

Substrato	Biogas (m^3/kg)	CH_4 nel biogas (%)
Carboidrati	0,79	50%
Proteine	0,70	71%
Grassi	1,25	68%

Queste componenti organiche sono presenti in misura differenti nelle varie tipologie di substrato e vanno di conseguenza a definire il potenziale in termini di biogas della biomassa. Qui di seguito è riportato un *excursus* delle principali tipologie di substrati.

1.1.4.2.1 REFLUI ZOOTECCNICI

I reflui zootecnici sono la combinazione di deiezioni zootecniche, acque di lavaggio, peli, residui alimentari derivanti da un allevamento. A seconda delle condizioni fisiche e gestionali in cui si trovano i reflui possono essere definiti:

- Liquami e semi solidi se sono pompabili;
- Letami se sono “palabili”.

In Tabella 1.7 sono riportati alcuni tra i possibili reflui impiegabili e la loro capacità metanigena.

Tabella 1.7 Reflui zootecnici e relativa capacità produttiva [5]

	Tipo di Substrato	Solidi Totali (ST) (%)	Solidi Volatili (SV) (% di ST)	Resa in Biogas (m ³ /gSV)	CH ₄ in Biogas (%)
LETAME	Letame avicolo	60-80	75-85	400-500	60-65
	Letame suino	20-28	75-90	450-550	60-65
	Letame bovino	11-25	65-85	200-300	60-65
LIQUAME	Bovini da latte	10-16	75-85	300-550	60-65
	Suini	1,5-6	65-80	450-550	60-65
	Ovaiole	19-25	70-75	300-500	60-65

Questa tipologia di substrati presenta però, rispetto ad altre tipologie di biomasse, una minor resa metanigena; per questo motivo in genere i reflui zootecnici non vengono impiegati in processi fermentativi monomatrice ma vengono fermentati in presenza di altri substrati nella cosiddetta codigestione [5].

1.1.4.2.2 BIOMASSE DA COLTURE DEDICATE

In passato i terreni coltivabili erano adibiti alla produzione di generi agricoli alimentari, ad oggi sono invece sempre più diffuse le cosiddette colture energetiche (Energy Crops). Questa tipologia di colture impiega i suoi prodotti, in processi di codigestione, come biomassa fermentabile in biogas.

In Tabella 1.8 sono riportati alcune tra le possibili biomasse da colture dedicate e la loro capacità metanigena.

Tabella 1.8 Biomasse da colture dedicate e relativa capacità produttiva [5]

Tipo di Substrato	Solidi Totali (ST) (%)	Solidi Volatili (SV) (% di ST)	Resa in Biogas (m ³ /gSV)	CH ₄ in Biogas (%)
Insilato di mais	20-35	85-95	350-550	53-55
Segale integrale	30-35	92-98	500-600	53-55
Barbabietola da zucchero	21-25	90-95	450-550	53-55

Questa tipologia di biomasse presenta però alcuni inconvenienti in quanto i costi di tali substrati sono legati alle notevoli fluttuazioni di mercato delle materie prime.

1.1.4.2.3 SOTTOPRODOTTI E RIFIUTI

Da sempre si sa che la gestione dei rifiuti organici solidi e delle acque di vegetazione è un grande problema a causa dell'elevato potere inquinante che tali rifiuti possiedono. In Italia esistono numerosi impianti che sfruttano tali rifiuti per produrre biogas [2].

Tra i sottoprodotti e i rifiuti è possibile trovare, come possibile substrato impiegabile in un processo di FA, sia scarti agricoli che rifiuti veri e propri come scarti di macellazione, fanghi reflui, FORSU ed OMW. In Tabella 1.9 sono riportati alcuni di questi substrati.

Tabella 1.9 Sottoprodotti e rifiuti e relativa capacità produttiva

Tipo di Substrato	Solidi Totali (ST) (%)	Solidi Volatili (SV) (%diST)	Resa in Biogas (m ³ /gSV)	CH ₄ in Biogas (%)	Rif.
Acque di vegetazione	3,5-3,9	70-75	400-500	50-55	[5]
Scarti lavorazione ortofrutta	5-20	80-90	350-500	50-60	[5]
Melasso	80-90	85-90	300-450	50-55	[5]
OMW	40-60	50-70	429-568	50-60	[6]
Scarti di ristorazione	9-37	80-95	650-800	50-60	[5]
FORSU	40-75	50-70	300-450	50-60	[5]

Uno dei vantaggi derivanti dall'impiego di questa tipologia di rifiuti come substrato sta nel fatto che, rispetto alle altre tipologie di biomassa illustrate precedentemente, presentano un valore di SV più elevato; questa peculiarità si traduce in rese metanigene più elevate [5].

Nel caso di scarti organici vegetali sussistono però delle difficoltà nel processo di FA, dovute dal fatto che in tale tipologia di rifiuti sono presenti composti difficili da degradare e fermentare come cellulosa e lignina. Per queste ragioni in genere i substrati necessitano dei pretrattamenti allo scopo di rendere le molecole organiche più accessibili ai batteri fermentativi [4]. Tali pretrattamenti sono illustrati nel dettaglio nella sezione successiva.

1.1.4.3 PRETRATTAMENTI SULLE BIOMASSE

Nel paragrafo 1.1.4.2 sono state introdotte le principali tipologie di biomasse impiegabili in processi di FA. Tali substrati in genere sono estremamente complessi e di natura e composizione variabile; ne sono esempio gli OMW la cui composizione è strettamente legata alla stagionalità. Soprattutto in questa tipologia di biomassa, le frazioni lignocellulosica ed emicellulosica sono presenti in grandi quantità [17]. Queste due frazioni sono difficilmente metabolizzabili dai batteri fermentativi, si rendono dunque necessari dei pretrattamenti delle biomasse atte a rompere tali strutture complesse; i pretrattamenti delle biomasse presentano quindi le seguenti finalità [18]:

- Rendere biodisponibili le frazioni lignocellulosiche, andando a distruggere tali strutture complesse;
- Uniformare le biomasse;
- Aumentare la produttività del processo.

Esistono varie tipologie di pretrattamenti che permettono di rendere i substrati più "digeribili". Tali pretrattamenti possono essere suddivisi nelle seguenti categorie:

- *Pretrattamenti Fisici*

È una tipologia di pretrattamento di natura puramente meccanica che ha come scopo quello di ridurre le dimensioni delle particelle che costituiscono il substrato. In questo modo il substrato risulta essere più accessibile ai microrganismi grazie al maggior contatto che si viene a creare tra i due [18].

- Pretrattamenti Chimici

Sono pretrattamenti che sfruttano reagenti chimici acidi, basici ed ossidanti. Questa tipologia di trattamento è in genere accoppiata ad un trattamento termico con lo scopo di aumentare l'efficienza del pretrattamento. Tali pretrattamenti sfruttano reagenti come HCl e NaOH e durano alcune ore; risultato di tali pretrattamenti è un substrato parzialmente idrolizzato e più biodisponibile.

- Pretrattamenti Biologici

Sono pretrattamenti che sfruttano microrganismi in grado di produrre eso-enzimi in grado di idrolizzare parzialmente le componenti lignocellulosiche nel substrato; questo tipo di pretrattamento può essere svolto additivando direttamente l'enzima idrolitico puro [18]. Questo tipo di pretrattamento si verifica senza additivazione di enzimi, nel caso di sistemi di fermentazione bistadio, dove l'idrolisi delle macromolecole si verifica nel primo stadio dove si ha la produzione di bio-H₂.

1.1.5 PARAMETRI DI CONTROLLO DEL PROCESSO DI FA

Come si può facilmente intuire sulla base di quanto scritto fin ora, la FA è un processo dagli equilibri estremamente complesso; affinché quindi tale processo avvenga senza particolari problemi con rese accettabili è necessario controllare al meglio i parametri caratteristici della FA.

I parametri che possono influenzare un processo fermentativo sono innumerevoli. Di questi solo alcuni sono facilmente controllabili ed è proprio su tali parametri che bisogna agire in modo da mantenere il processo di FA sempre in condizioni ottimali [11].

1.1.5.1 TEMPERATURA

La temperatura è una dei parametri fondamentali che caratterizza il processo di FA in quanto influenza fortemente le popolazioni microbiche di batteri fermentativi presenti all'interno del sistema. I batteri, come tutti i sistemi viventi, presentano un range di temperatura ottimale all'interno del quale prosperano e svolgono la loro normale attività metabolica. Se tali condizioni di temperatura non vengono rispettate, a seconda di quanto ci si discosta dai valori di temperatura ottimale, le conseguenze possono essere più o meno gravi. In particolare:

- Piccoli discostamenti ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) dal valore fisiologico di temperatura causa la terminazione di ogni attività metabolica da parte dei microrganismi;
- Grandi discostamenti dal valore fisiologico di temperatura causano la morte dei microrganismi.

Tale valore ottimale di temperatura dipende dalla tipologia di batteri impiegati nel processo fermentativo. In media, nel caso di batteri:

- Mesofili, il range di temperatura ottimale è compreso tra i 32-42°C [11];
- Termofili, il range di temperatura ottimale è compreso tra i 50-58°C [11];

Entrambe le tipologie di microrganismi presentano, per quanto riguarda il processo di FA dei vantaggi e degli svantaggi (Tabella 1.10).

Tabella 1.10 Vantaggi e svantaggi tipologia di microrganismi[11]

Tipologia di Microrganismo	Vantaggi	Svantaggi
Mesofilo	Inibizione da NH ₃ minore	Tempi di fermentazione elevati
Termofilo	Tempi di fermentazione bassi	Dispendio di energia per mantenere le condizioni di T ottimali

1.1.5.2 pH

Un altro parametro cruciale nel processo di FA è il pH. L'importanza di questo parametro risiede nel fatto che a seconda del pH che il sistema fermentativo presenta, una stessa tipologia di microrganismi può presentare un diverso tipo di metabolismo; ne consegue che una variazione di pH può causare un cambio di via metabolica [4]. A seconda della fase del processo fermentativo in cui ci si trova, il range di pH ottimale da mantenere per favorire la fase in questione è differente. In particolare le fasi idrolitica ed acidogenica sono favorite a valori di pH tra 5,2-6,3; mentre la fase metanogenica si verifica solo per valori di pH tra 6,7-7,5. Tra i batteri metanigeni che partecipano al processo fermentativo uno dei pochi in grado di operare a pH minori di 6,5 è la specie dei *Methanosarcina* [11]. Durante il processo fermentativo, si vengono a formare in soluzione, tutta una serie di composti che portano alla creazione di buffer che tendono a mantenere il pH del sistema alle condizioni di pH ottimali [11].

1.1.5.3 POTEZIALE RED-OX

Come accennato già nel paragrafo 1.1.1 l'ORP è un parametro estremamente importante per il processo di FA, in quanto la sua misura (espressa in mV) fornisce un'indicazione dell'ossigeno presente nel sistema sia sotto forma di O₂ disciolto che sotto forma di NO₃⁻. La misura dell'ORP durante il proseguire della FA permette dunque di valutare l'anaerobicità del processo, necessaria, come ripetuto già numerose volte, alla sopravvivenza dei consorzi microbici metanigeni. Il valore di ORP ottimale per la fase metanogenica è < -300 mV [9], [11].

1.1.5.4 TIPO DI SUBSTRATO E SUE CARATTERISTICHE CHIMICO FISICHE

Argomento trattato in maniera approfondita nel paragrafo 1.1.4.

1.1.5.5 MISCELAZIONE

Nel caso di reattori biologici, come quelli impiegati nei processi di FA, il parametro della miscelazione risulta essere ancora più significativo rispetto al caso dei classici reattori chimici. Infatti a differenza di questi, nel caso di bioreattori quando si parla di mixing, bisogna tener conto del fatto che all'interno del sistema è anche presente un sistema vivente suscettibile agli sforzi derivanti dall'agitazione del sistema [11].

Alla luce di quanto appena affermato, è necessario dunque che la miscelazione del sistema non sia né troppo aggressiva, né troppo blanda; ma deve essere tale da [11]:

- Rifornire in maniera continuativa i microrganismi dei nutrienti necessari a svolgere la loro attività metabolica;
- Uniformare il sistema in modo da porre in contatto il substrato fresco con la biomassa;
- Uniformare la temperatura all'interno del reattore;

- Favorire il degasaggio del brodo di fermentazione, in quanto un suo eccessivo accumulo può inibire le reazioni biologiche;
- Evitare la formazioni di schiume e croste;
- Minimizzare il consumo energetico;
- Non andare a disturbare le possibili interazioni sintrofiche tra i microrganismi;
- Non generare sforzi di taglio tali da distruggere gli aggregati microbici.

È opportuno specificare però, che a seconda della fase del processo fermentativo in cui ci si trova, il regime di miscelazione necessario è differente. In particolare:

- Durante le fasi idrolitica e acidogenica è necessario rimuovere rapidamente l'H₂ che viene prodotto in quanto un suo accumulo all'interno del brodo di fermentazione tende ad inibire gli HPB. Per rendere possibile questo, in genere in tali fasi si lavora a velocità di agitazione che vanno dai 200-500 rpm [19].
- Durante la fase metanogenica invece, a causa dei fenomeni sintropici in atto tra i batteri acetogenici e metanogenici, è necessario lavorare in condizioni di agitazione più blande in modo da evitare di andare disturbare tale simbiosi ma allo stesso tempo favorire l'allontanamento del CH₄ dal sistema fermentativo. In genere si lavora a velocità di agitazione comprese tra 70-100 rpm [11].

Questi due aspetti verranno nel dettaglio analizzate in questa sede e supportati da prove sperimentali a conferma.

Per concludere in Tabella 1.11 sono riassunti i principali parametri operativi del processo fermentativi.

Tabella 1.11 Riepilogo parametri operativi FA. [11]

Parametro	Idrolisi/acidogenesi	Metanogenesi
Temperatura	25-35 °C	Mesofilici: 32-42°C Termofilici: 50-58°C
pH	5,2-6,3	6,7-7,5
C/N	10-45	20-30
ORP	+400 a -300 mV	<-250mV
Micronutrienti	-	Ni, Co, Se, Mo
Miscelazione	200-500 rpm	70-100 rpm

1.1.6 CONFIGURAZIONI REATTORISTICHE

Senza entrare particolarmente nel dettaglio, per completezza, qui di seguito sono riportate le principali tre tipologie di configurazioni reattoristiche adottate nei processi di FA [11].

- Reattore Batch: qui inoculo e substrato vengono inseriti all'interno del reattore a inizio fermentazione. La FA prosegue, producendo biogas, fino a esaurimento del substrato.
- Reattore Continuo: in questa tipologia reattoristica, si ha un'alimentazione continua di substrato fresco in modo da garantire un rinnovo continuo di nutrienti; è importante definire in maniera accurata tale configurazione in modo da evitare il washout della biofase. Qui a differenza del batch si ha una produzione continua di biogas.
- Sistema Bistadio: in questa configurazione, il processo di FA avviene in due reattori che separano le fasi idrolitica e acidogenica da quelle acetogenica e metanogenica. Il vantaggio di questa configurazione risiede nel fatto che si ha produzione sia di bio-H₂ che di bio-CH₄.

2 FUNZIONALITÀ DEI GRANULI MICROBICI NELLA FA

Il processo di conversione del materiale organico che avviene nel corso della FA, è reso possibile da un'attività metabolica perfettamente coordinata tra differenti tipologie di microrganismi, i quali possono essere inseriti all'interno di tre classi metaboliche

- Microrganismi idrolitici e fermentativi, che hanno il compito di convertire macromolecole organiche in composti più semplici;
- Microrganismi produttori di idrogeno (Hydrogen Producing Bacteria HPB), che hanno il compito di convertire gli acidi organici in H_2 ed acetato;
- Microrganismi metanogenici (Hydrogen Consuming Bacteria HCB), che convertono H_2 , CO_2 e acetato in CH_4 .

All'interno del processo di FA i HCB presentano quindi un ruolo centrale nella rimozione di H_2 e acetato e loro conversione in CH_4 . L'allontanamento continuo di queste due specie dal sistema fermentativo, oltre la produzione di CH_4 che ne deriva, presenta due vantaggi:

- Rimuovendo l'acetato si controlla il pH del sistema impedendo che il sistema shifti in campo acido, sfavorevole alla metanogenesi;
- Rimuovendo H_2 si indirizza il flusso elettronico verso la formazione di specie più ossidate migliorando così l'efficienza del sistema [20].

2.1 MICRORGANISMI COINVOLTI NEL PROCESSO DI FA

Le specie batteriche coinvolte all'interno del processo FA sono innumerevoli e possono essere essenzialmente suddivisi nelle tre classi metaboliche sopra descritte. In Tabella 2.1 sono riportati alcuni tra i principali batteri che partecipano al processo fermentativo e alcune informazioni riguardo al loro metabolismo, cioè quale substrato impiegano e quale metabolita generano. In Figura 2.1 sono riportate alcune micrografie di questi batteri.

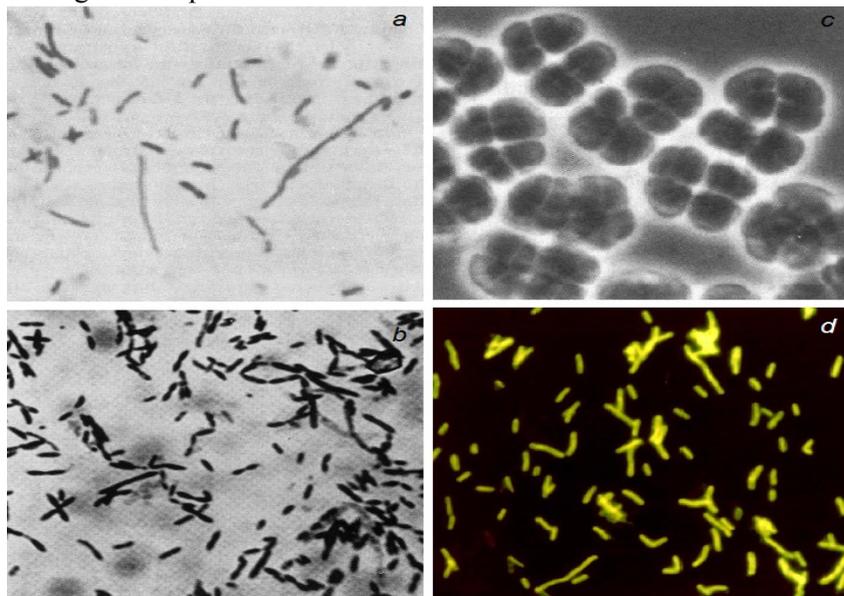


Figura 2.1 Phase-contrast micrographs di *D. desulfuricans* (a), *C. propionicum* (b), *Ms. bakeri* (c), *Mb. formicicum*(d) [21]–[23].

Tabella 2.1 Principali batteri partecipanti al processo fermentativo [11]

	Microrganismo		Metabolismo		Caratteristiche		
	Genere	Specie	Substrato	Metabolita	Gram	Sporigeno	Tolleranza O ₂
Idrolitici Acidogenici	<i>Clostridium</i>	<i>C. celerecrescens</i>	Cellulosa	Cellulosa idrolizzata	Positivi	SI	Anaerobi Obbligati
		<i>C. butyricum</i>	Amido, Pectina	Butirrato			
		<i>C. propionicum</i>	Amminoacidi, Lattato	Propionato, Butirrato, Acetato			
		<i>C. clostridiiformis</i>	Carboidrati	Acetato, Lattato, Formiato			
	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. pentosus</i>	Glucosio	Lattato	Positivi	NO	Anaerobi Facoltativi
		<i>L. plantarum</i>	Glucosio	Lattato			
Acetogenici	<i>Desulfovibrio</i>	<i>D. desulfuricans</i>	Acidi organici, Alcoli	Acetato	Negativi	NO	Anaerobi Obbligati
		<i>D. termitidis</i>	Acidi organici, Alcoli	Acetato			
	<i>Aminobacterium</i>	<i>A. colombiens</i>	Amminoacidi,	Acetato	Positivo	NO	Anaerobi Obbligati
Metanigeni	<i>Methanosarcina</i>	<i>Ms. bakeri</i>	Metanolo, CO ₂	Metano, CO ₂	Positivo	NO	Anaerobi Obbligati
		<i>Ms. siciliae</i>	Metanolo, CO ₂	Metano, CO ₂			
	<i>Methanosaeta</i>	<i>M. concili</i>	Acetato	Metano, CO ₂	Negativo	NO	Anaerobi Obbligati
		<i>M. harundinacea</i>	Acetato	Metano, CO ₂			
	<i>Methanobacterium</i>	<i>Mb. formicicum</i>	Formiato	Metano, CO ₂	Positivo	NO	Anaerobi Obbligati

2.1.1 CLASSIFICAZIONE METABOLICA

I microrganismi possono essere classificati in base al tipo di metabolismo che essi impiegano per ottenere energia e nutrimento necessari alla loro vita all'interno del sistema biologico. Una prima distinzione è possibile farla sulla base della natura della fonte di carbonio che essi utilizzano; in particolare si dicono:

- Autotrofi: se sintetizzano le molecole biologiche di cui hanno bisogno utilizzando fonti di carbonio inorganiche come la CO_2 e come fonti di azoto composti inorganici come l' NH_3 e i nitrati.
- Eterotrofi: se sintetizzano le molecole biologiche di cui hanno bisogno utilizzando come fonti di carbonio molecole organiche e come fonti di azoto proteine ed amminoacidi.

Una seconda classificazione può essere in fatta sulla base del tipo di energia che i microrganismi utilizzano per la loro attività. Si possono definire:

- Fototrofi: se utilizzano come fonte energetica l'energia posseduta dalle radiazioni luminose;
- Chemiotrofi: se utilizzano l'energia contenuta all'interno dei legami chimici delle sostanze che metabolizzano.

Combinando tra loro queste definizioni nascono le seguenti quattro categorie di microrganismi: Fotoautotrofi, Fotoeterotrofi, Chemioautotrofi, Chemioeterotrofi.

2.2 SINTROFIA

Come affermato più volte nei paragrafi precedenti, tra le classi di microrganismi partecipanti al processo di FA, ognuna caratterizzata dal proprio cammino metabolico, esistono delle interazioni senza le quali il processo fermentativo non potrebbe avvenire. È stato osservato in numerosi studi che, alcuni microrganismi per poter espletare al meglio la propria attività metabolica creano dei legami simbiotici con altri microrganismi; tale fenomeno prende il nome di Sintrofia [24].

In un contesto incentrato sul processo di FA è possibile dare la seguente definizione di sintrofia;

*Il termine SINTROFIA è usato per descrivere un comportamento termodinamico interdipendente esistente tra due specie differenti di microrganismi, che consiste in un **do ut des**, per mezzo del quale si rendono possibili delle reazioni altresì termodinamicamente sfavorite e mantenendo allo stesso tempo bilanciato il sistema in termini di concentrazione di reagenti [24].*

In un processo di FA si verificano principalmente due tipologie di sintrofie che coinvolgono differenti tipi di batteri:

- Un primo fenomeno sintrofico coinvolge batteri idrogenogenici (HPB) e batteri idrogenotrofici (HCB). In questo caso gli HCB, metabolizzando l' H_2 prodotto dagli HPB, creano delle condizioni termodinamiche tali da indurre questi ultimi a far avvenire processi ossidativi che, in assenza di HCB, non avverrebbero in quanto termodinamicamente sfavorite ($\Delta G_r^0 > 0$) [20]. Numerosi studi sono stati effettuati con lo scopo di comprendere il ruolo che l' H_2 ha all'interno del processo fermentativo e in che modo la sua produzione e il suo utilizzo vanno ad influenzare la resa della FA in termini di CH_4 . Iannotti et al. nel 1973 supposero che il ruolo regolatore dell' H_2 avvenisse attraverso un trasferimento interspecie di idrogeno (IHT), dove gli ioni H^+ fungevano da carrier elettronici [25]. La presenza di un trasferimento interspecie di idrogeno influenza fortemente tutto il sistema fermentativo in quanto, in queste condizioni, gli HCB pongono gli HFB in condizioni tali da catalizzare ulteriori reazioni

cataboliche, producendo H₂, che in condizioni normali, ovvero in assenza di batteri idrogenotrofici, sarebbero termodinamicamente sfavorite.

- Il secondo fenomeno sintrofico, che si verifica nel processo di FA, coinvolge invece i microrganismi partecipanti alla fase acetogenica e metanogenica. Sulla base di numerosi studi effettuati sull'interdipendenza tra batteri acetogenici e HCB è emerso che, se non ci fosse questa interazione sintrofica tra le due classi microbiche, le reazioni catalizzate dagli acetogenici non potrebbero avvenire. Tale impossibilità è legata al fatto che tali reazioni in condizioni standard sono endoergoniche ($\Delta G_r^0 > 0$) cioè termodinamicamente sfavorite [24]. In Tabella 2.2 sono riportate alcune di queste reazioni con il relativo valore di energia libera.

Tabella 2.2 Reazioni acetogeniche e relativa energia libera [26]

Tipo di reazione	Reazione	ΔG_r^0 (kJ/mol)
Ossidazione Propionato	$CH_3CH_2COOH + 2H_2O \rightarrow CH_3COOH + CO_2 + 3H_2$	+72
Ossidazione Butirrato	$CH_3CH_2CH_2COOH + 2H_2O \rightarrow CH_3COOH + 2H_2$	+48

L'endoergonicità di queste reazioni è legata al fatto che l'energia liberata, presente sotto forma di elettroni, viene impiegata attraverso una serie di reazioni di Red-Ox, supportate da enzimi e composti intermedi a potenziale ossidoriduttivo decrescente, fino a raggiungere un accettore finale che passa da uno stato ridotto ad ossidato. Tutto questo meccanismo, in presenza di soli microrganismi acetogenici, non è possibile in quanto manca l'accettore finale del flusso di elettroni generato dall'ossidazione dei VFA.

In presenza di HCB, che presentano reazioni termodinamicamente favorite (Tabella 2.3), tra le due classi di microrganismi si vengono a formare delle interazioni sintrofiche che indirizzano il flusso elettronico in una cascata a potenziale Red-Ox decrescente e rendono il processo complessivamente termodinamicamente favorito ($\Delta G_r^0 < 0$) [24].

Tabella 2.3 Reazioni HCB e relativa energia libera [26]

Tipo di reazione	Reazione	ΔG_r^0 (kJ/mol)
Via Acetoclastica	$CH_3COOH \rightarrow CO_2 + CH_4$	-36
Via Idrogenotropica	$4H_2 + CO_2 \rightarrow +2H_2O + CH_4$	-131

Il meccanismo attraverso cui vengono trasportati tali elettroni durante le varie reazioni sopra rappresentate, prende il nome di *trasferimento elettronico interspecie (IET)*.

2.2.1 TRASFERIMENTO ELETTRONICO INTERSPECIE (IET)

Come visto nei paragrafi precedenti, in un processo fermentativo, l'associazione tra HPB e HCB è il fattore chiave che permette di avere un sistema stabile e bilanciato all'interno del quale reazioni che in condizioni normali non avverrebbero, risultano essere termodinamicamente favorite.

In questo contesto il trasporto interspecie di elettroni (IET) gioca un ruolo cruciale tra i partner sintrofici nei processi ossidoriduttivi che portano alla formazione di CH₄ attraverso differenti percorsi metabolici [27]. Stams et al. nel 2006 analizzarono le diverse tipologie di IET che si verificano generalmente in un processo di FA. Il trasporto interspecie di elettroni, a seconda del meccanismo con cui si verifica, può essere classificato in[28]:

- Shuttled Interspecies Electron Transfer (SIET): è un meccanismo dove il trasporto elettronico è mediato da molecole shuttle che espletano la funzione di carrier elettronici; questi shuttle sono in genere H₂ e acido formico [28].
- Direct Interspecies Electron Transfer (DIET): è un meccanismo dove non sono presenti shuttle molecolari; qui il trasporto elettronico è espletato da citocromi, pili conduttivi, aggregati e materiale conduttivo [28].

I due meccanismi appena citati sono descritti nel dettaglio nei seguenti paragrafi.

2.2.1.1 SHUTTLED INTERSPECIES ELECTRON TRANSFER

In questa tipologia di trasporto interspecie, il trasferimento di elettroni dalla specie fermentativa alla specie metanogenica avviene senza che ci sia effettivamente un contatto diretto tra le due tipologie di micorganismi. Questo è reso possibile grazie a delle molecole che, riducendosi prelevano gli elettroni generati dall'HPB e li trasportano ai HCB dove li liberano ossidandosi. Tale processo è rappresentato in forma generica in Figura 2.2.

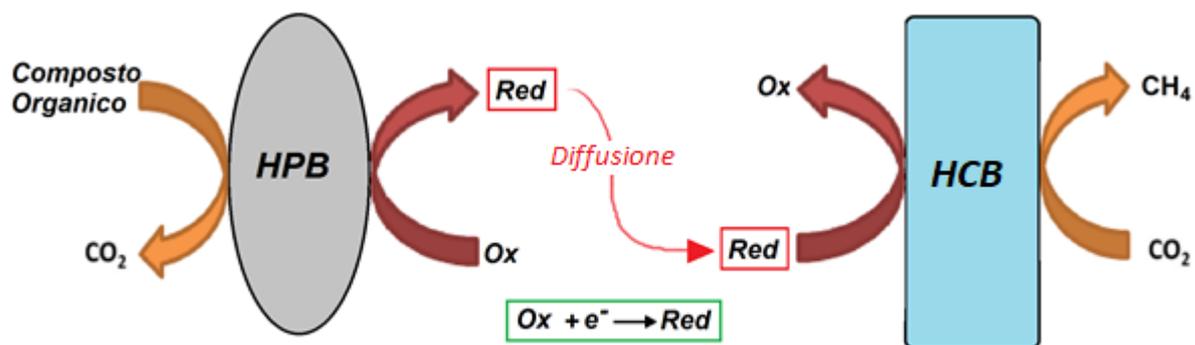


Figura 2.2 Meccanismo SIET generale

Le molecole shuttle partecipanti a questo tipo di meccanismo, all'interno del processo fermentativo, sono H₂ e l'acido formico (HCOOH). In particolare nel caso in cui il carrier elettronico sia:

- L'idrogeno, si parla di Trasferimento Interspecie di Idrogeno (IHT)
- L'acido formico, si parla di Trasferimento Interspecie di Formiato (IFT).

Dalla Figura 2.2 si vede come il fenomeno complessivo potrebbe essere controllato dalla diffusione ma, questo non può accadere; pertanto, affinché i fenomeni diffusivi, siano minimizzati, le due specie si portano ad una certa distanza.

L'idrogeno molecolare, nonostante sia uno dei componenti presenti in minor quantità all'interno del sistema fermentativo, è estremamente importante nel processo di trasporto elettronico interspecie [27]. In realtà però, la maggior parte degli HCB è in grado di utilizzare come carrier elettronico anche la molecola di HCOOH che passando per una serie di reazioni catalizzate dalla *formiato deidrogenasi* è in grado di compiere lo stesso compito svolto dall'idrogeno [27].

Nonostante questi due meccanismi, IFT e IHT, operino sostanzialmente nello stesso modo, in realtà, a seconda delle condizioni del sistema uno dei due meccanismi di trasporto prevale sull'altro, anche se non è da escludere una cooperazione. Questa loro diversa attività è legata al fatto che idrogeno e formiato sono composti aventi caratteristiche chimico-fisiche differenti.

In particolare l'idrogeno, rispetto al formiato, tende a creare elevati gradienti di concentrazione a causa della sua bassa solubilità. D'altra parte l'idrogeno presenta una velocità di diffusione, in acqua, trenta volte superiore di quella del formiato. Questi due aspetti fanno sì che:

- Quando la distanza tra le cellule batteriche è "grande", il meccanismo prevalente è l'IFT in quanto il formiato, diffondendo meno velocemente dell'idrogeno, riesce in questo modo a raggiungere la cellula di HCB [27];
- Quando la distanza tra le cellule è piccola, il meccanismo prevalente è l'IHT [27].

2.2.1.2 DIRECT INTERSPECIES ELECTRON TRANSFER

Il DIET è un tipo di trasferimento interspecie detto shuttle-free in quanto, pur basandosi sugli stessi principi del SIET, il trasferimento elettronico dal microrganismo donatore all'accettore è mediato da tutta una serie di "strutture" che creano un contatto diretto tra i vari partner simbiotici. Il DIET può dunque avvenire secondo i tre seguenti meccanismi [24].

- 1) Un primo meccanismo si ha per contatto diretto tra microrganismo donatore e microrganismo accettore; in questo caso il trasferimento è mediato dai citocromi presenti sulle membrane cellulari batteriche. In Figura 2.3 è riportata una rappresentazione di questo tipo di DIET [27].

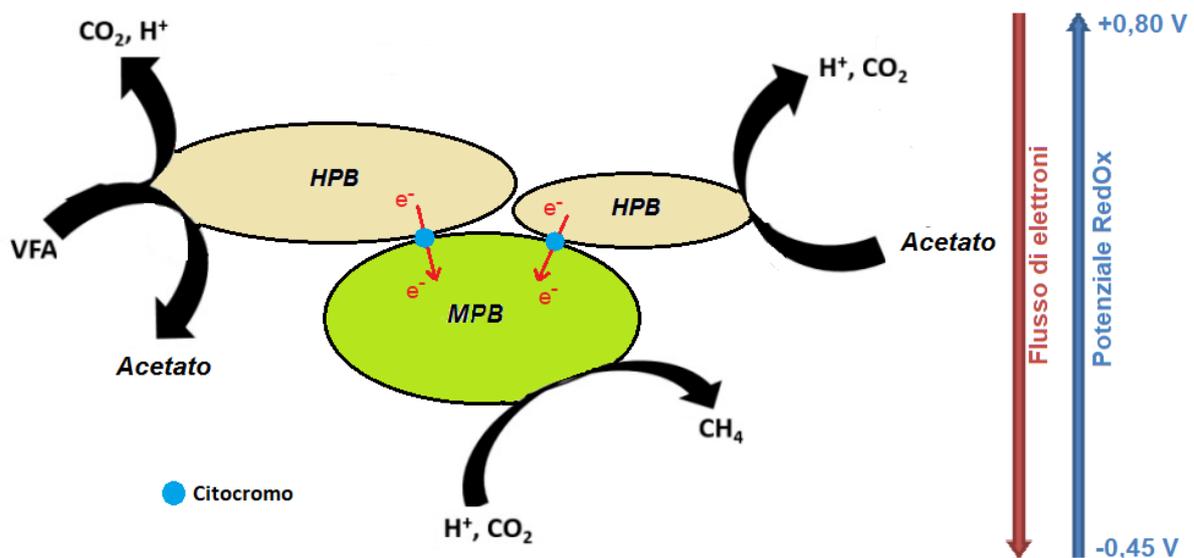


Figura 2.3 DIET mediato da citocromi. Tratta da [27] con modifiche.

- 2) Un altro possibile meccanismo DIET impiega, come mediatori nel trasporto elettronico, delle strutture filamentose conduttive dette *pili conduttivi*. Tale meccanismo è riportato in Figura 2.4 [27].

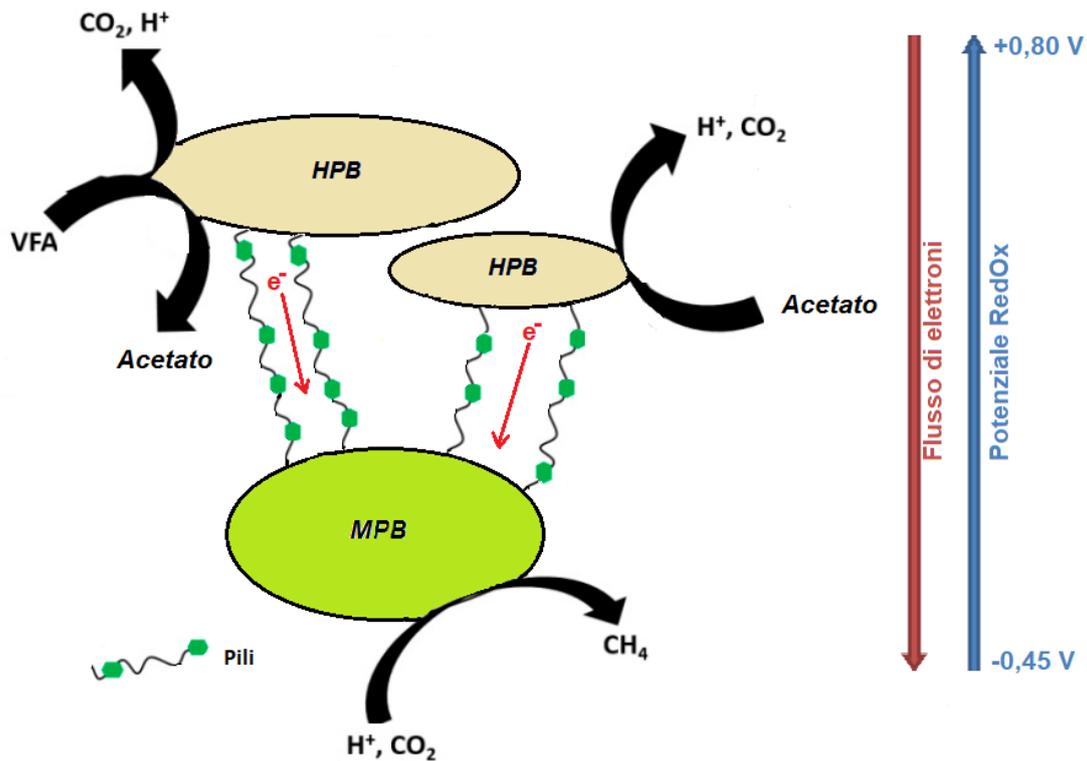


Figura 2.4 DIET mediato da pili conduttivi. Tratta da [27] con modifiche.

- 3) Il DIET può anche avvenire attraverso un materiale conduttivo non biologico come ad esempio un metallo. In questo tipo di meccanismo il mediatore metallico si pone tra il microrganismo donatore e il microrganismo accettore andando a creare un contatto elettrico vero e proprio attraverso il quale vengono trasmessi gli elettroni generati dalle reazioni catalizzate dagli HPB. In figura 2.5 è riportato il meccanismo in forma generica [27].

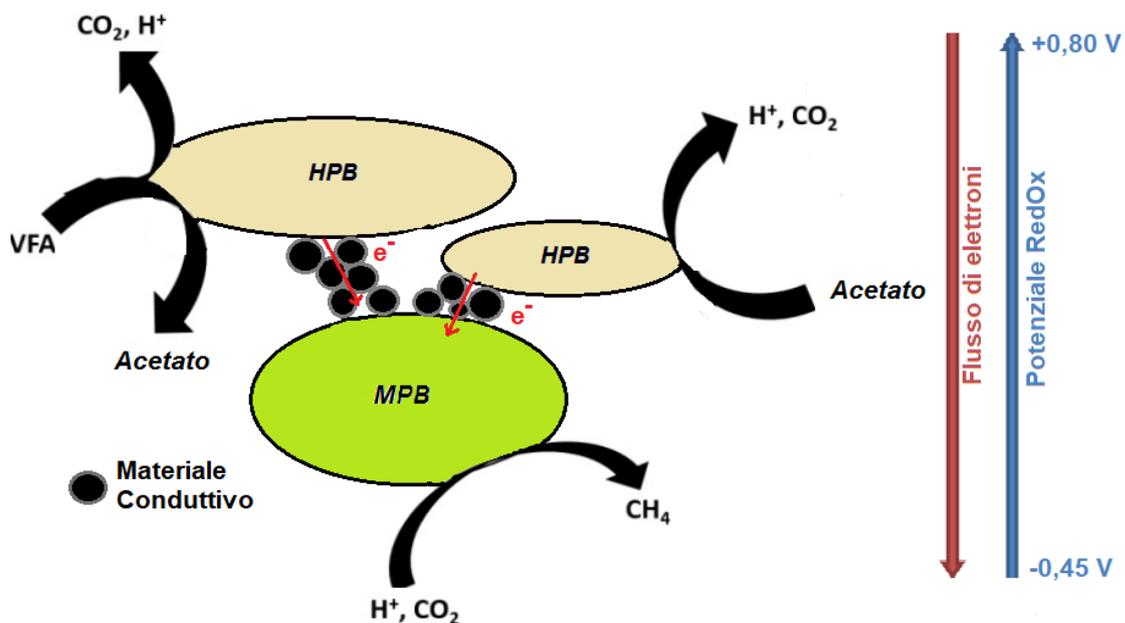


Figura 2.5 DIET mediato da materiale conduttivo non biologico. Tratta da [27] con modifiche.

In figura 2.6 sono riportate alcune micrografie elettroniche dei meccanismi sopra descritti.

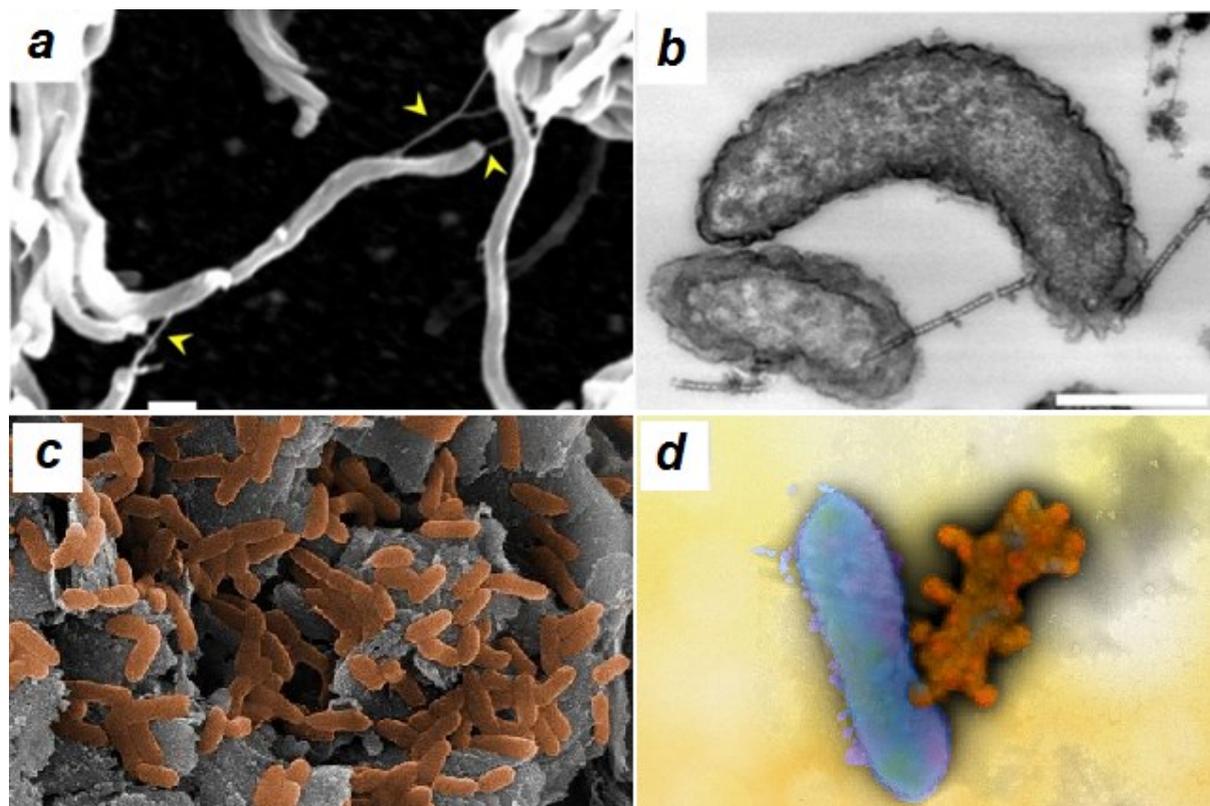


Figura 2.6 Immagini SEM di meccanismi DIET. (a,b) DIET mediato da pili conduttivi, (c) DIET mediato da materiale conduttivo non biologico, (d) DIET mediato da citocromi. Tratte da [29]–[31].

Quest'ultima tipologia di trasferimento elettronico interspecie, oggi è oggetto di interesse da parte della comunità scientifica, infatti numerosi studi suggeriscono che l'aggiunta di diversi materiali conduttivi al sistema abbia degli effetti positivi sulla resa del processo di FA. In particolare si sta studiando come l'aggiunta di Fe^0 al sistema influenzi le varie fasi del processo di FA. Quest'ultimo aspetto è analizzato nel paragrafo 2.4.

2.2.1.3 CONFRONTO TRA DIET E SIET

Il meccanismo DIET è stato di recente identificato come uno tra i più importanti meccanismi di trasporto elettronico interspecie tra i vari partner sintrofici partecipanti al processo di conversione dei VFA in CH_4 . Da numerosi studi è emerso che questa tipologia di meccanismo, rispetto al SIET, risulta essere più veloce e più efficiente dal punto di vista energetico. Il DIET, potrebbe dunque rappresentare una possibile via per incrementare la resa metanigena del processo [27].

Queste considerazioni nascono dal fatto che affinché il processo di metanogenesi avvenga correttamente, è necessario che non si verifichi accumulo di VFA, che in concentrazioni elevate risulta tossico per gli HCB. È noto infatti che, in condizioni di elevato carico organico, si ha un'elevata crescita di batteri acidogenici con conseguente accumulo di VFA e idrogeno; queste condizioni sono strettamente legate a fenomeni di rallentamento nel processo SIET, che possono derivare da problemi legati ai complessi enzimatici che operano in questo meccanismo, come l'idrogenasi e la formiato-deidrogenasi [27].

Questo problema non è presente nel DIET in quanto, in tale meccanismo non è necessario produrre alcun enzima poiché il trasporto elettronico avviene per contatto diretto e non tramite shuttle molecolari [27].

2.3 GRANULI MICROBICI

Alla luce di quanto detto fino ad ora, riguardo la simbiosi esistente tra i vari microrganismi partecipanti al processo di FA e i meccanismi attraverso i quali tale comportamento simbiotico si esplica, risulta ovvio come il fattore *distanza* acquisti importanza in un contesto strettamente legato ai trasferimenti interspecie.

Infatti allo scopo di favorire i fenomeni simbiotici, si è osservato che, i microrganismi coinvolti nei vari processi fermentativi, tendono a formare strutture compatte multistrato che pongono i vari partner simbiotici a stretto contatto tra loro. La formazione di questi aggregati hanno un forte impatto sull'efficienza dei meccanismi IET sia per quello che sfrutta shuttle molecolari che per il meccanismo che sfrutta strutture che pongono in contatto diretto le varie specie [24], [27].

Queste strutture, con una configurazione ben definita, vengono identificate con il nome di *granuli microbici o batterici*. Il processo che porta alla formazione di queste strutture è estremamente complesso e dipende da tutta una serie di parametri che comprendono: l'agitazione del sistema, il carico organico, la presenza o meno di materiale inerte, la tipologia di microrganismi coinvolti e le caratteristiche delle sostanze disciolte/disperse in fase liquida. Numerosi studi evidenziano come la formazione di queste strutture all'interno del sistema fermentativo, hanno un effetto positivo sull'efficienza del processo. Questo incremento delle prestazioni è legato al fatto che, aggregandosi in strutture granulari, i partner simbiotici ottimizzano la loro cooperazione essenzialmente per due ragioni [32]:

- I metaboliti devono diffondere per una distanza minore rispetto al caso di microrganismi liberi;
- I trasferimenti elettronici interspecie risultano essere facilitati.

2.3.1 CARATTERISTICHE CHIMICO-FISICHE DEI GRANULI MICROBICI

Le caratteristiche chimico-fisiche dei granuli microbici sono strettamente influenzate dalle condizioni operative del bioreattore: OLR, HRT, agitazione del sistema, composizione del brodo di fermentazione. I principali parametri che caratterizzano tali strutture granulari sono: sedimentabilità, permeabilità, morfologia del granulo, stabilità meccanica, porosità e produzione di sostanze polimeriche extracellulari (EPS) [33].

2.3.1.1 SEDIMENTABILITÀ

La sedimentabilità dei granuli batterici è un parametro molto importante nel caso di processi in cui si vuole successivamente separare la fase biotica dal resto del sistema. In genere i granuli presentano, grazie alla loro maggiore densità, una velocità di sedimentazione maggiore rispetto a processi che impiegano fasi biotiche in forma di fiocchi [33].

2.3.1.2 PERMEABILITÀ E POROSITÀ

I granuli microbici presentano una ridotta permeabilità legata alla presenza di EPS, avente un ruolo strutturale nella conformazione dei granuli, che va a occludere i pori degli aggregati intrappolando al loro interno una certa quantità di acqua. La presenza di acqua all'interno dei granuli è stata dimostrata attraverso la misurazione della velocità di sedimentazione degli aggregati, che è risultata più bassa della aspettative a causa dell'acqua intrappolata al loro interno [33].

La porosità dei granuli microbici è estremamente importante per quanto riguarda il trasporto di substrato e metaboliti all'interno di tali strutture [33].

2.3.1.3 MORFOLOGIA

La morfologia dei granuli è strettamente legata alle condizioni operative del sistema di fermentazione. In genere lavorando a bassi OLR si ottengono granuli di piccole dimensioni e molto compatti; viceversa in condizione di elevati OLR tali strutture risultano molto meno compatte e più simili a fiocchi che a granuli [33].

Un altro aspetto morfologico è il colore dei granuli microbici, infatti è stato osservato che i granuli di [33]:

- HPB sono di colore giallo tenue;
- HCB sono di colore nero a cause dei composti solforati che precipitano durante il processo.

2.3.1.4 STABILITÀ MECCANICA

Affinchè i granuli microbici formati all'interno del sistema fermentativo siano meccanicamente stabili, cioè mantengano la loro conformazione e struttura durante tutto il processo, è essenziale che tali aggregati siano estremamente resistenti e resistenti agli sforzi compressivi. Un altro parametro, che permette di valutare la forza dei granuli microbici, è rappresentata dalla resistenza di queste strutture agli sforzi di taglio. Da alcuni studi è emerso come la presenza di ferro all'interno dei granuli ne incrementa la resistenza agli sforzi di natura meccanica [33].

2.3.1.5 EPS

In particolari condizioni i microrganismi producono una matrice polimerica, costituita essenzialmente da polisaccaridi e proteine, in grado di farli aderire l'uno all'altro. L'EPS è estremamente importante per il processo di granulazione, in quanto tiene insieme i vari microrganismi e li protegge da eventuali condizioni sfavorevoli esterne [33].

2.3.2 STRUTTURA DEI GRANULI MICROBICI

I granuli microbici, come affermato precedentemente, sono strutture estremamente complesse generate dall'aggregazione di microrganismi anaerobi con lo scopo di incrementare le attività metaboliche da essi svolte. Prima di entrare nel dettaglio nell'analisi della struttura di queste conformazioni, è opportuno dare alcune definizioni e fare delle distinzioni tra le varie tipologie di aggregati che si possono formare all'interno di un reattore anaerobico. Le formazioni batteriche che possono venire a crearsi all'interno di un processo anaerobico sono tre [20]:

- *Fiocchi*: sono aggregati di batterici caratterizzati da una struttura molto delicata; queste strutture quando sedimentano tendono a formare un unico strato in cui non è possibile più distinguerli. Sono strutture estremamente suscettibili agli sforzi idrodinamici.
- *Pellets*: sono strutture più dense dei fiocchi e che sedimentando mantengono la propria individualità. Presentano una maggiore resistenza agli sforzi idrodinamici.
- *Granuli*: sono strutture simili ai pellets ma con una densità maggiore.

Una prima teoria vedeva i granuli come delle conformazioni, caratterizzate da strutture disordinate, all'interno delle quali i vari partner sintrofici si distribuivano casualmente [32]. Numerosi studi hanno successivamente dimostrato come in realtà tali conformazioni presentino delle strutture a strati, ognuno dei quali è costituito da una specie sintrofica [32], [34].

Tali studi identificano nella struttura granulare essenzialmente tre differenti strati, contenenti opportune specie microbiche, che svolgono differenti attività metaboliche in stretto contatto favorendo

in questo modo tutti i meccanismi simbiotici descritti nei paragrafi precedenti. In Figura 2.7 è riportata una rappresentazione schematica della struttura di un generico granulo microbico.

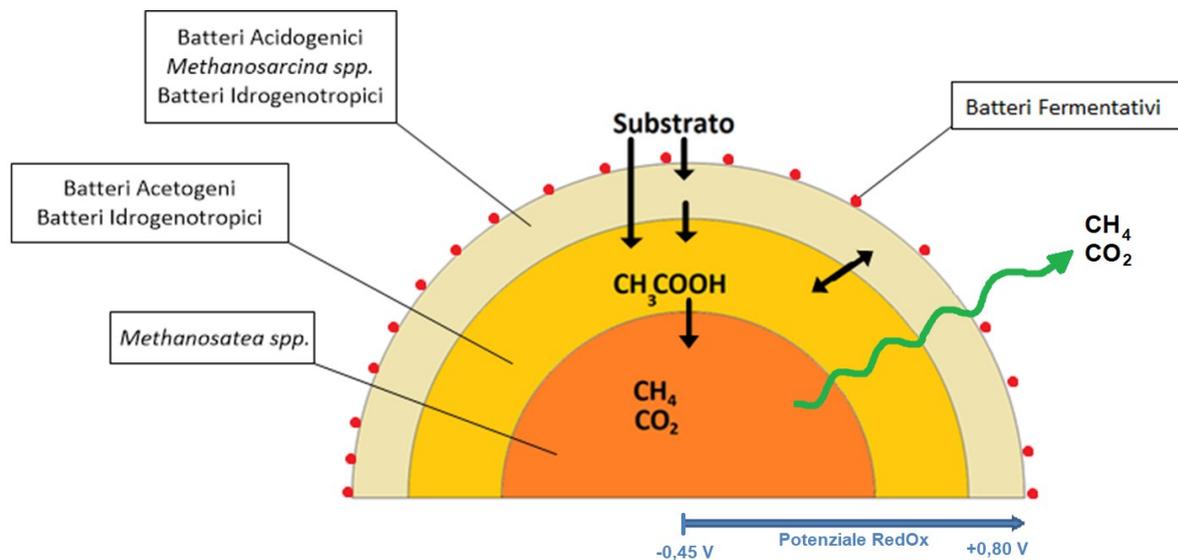


Figura 2.7 Possibile Struttura Granulo microbico. Tratto da [32] con modifiche.

Sulla base di varie misure di composizione dei tre strati sopra rappresentati, sono state fatte delle ipotesi sul possibile meccanismo di funzionamento dei granuli microbici e su come i vari metaboliti si muovono al suo interno. Quello che emerge da tali prove è che [32], [34]:

- Sulla superficie esterna dei granuli sono adesi dei piccoli consorzi formati da batteri fermentativi che idrolizzando in parte la biomassa alimentata al reattore, forniscono il substrato necessario al metabolismo delle specie batteriche contenute nel primo layer [32];
- Le molecole idrolizzate penetrano nel primo strato dove incontrano i batteri acidogenici che le convertono in VFA e H_2 . All'interno del primo strato sono presenti anche HCB, che convertono una quota parte di H_2 prodotta dalle reazioni acidogeniche in CH_4 [32];
- L'idrogeno rimanente insieme ai VFA penetrano nel secondo strato della struttura dove i VFA vengono convertiti in acetato ad opera dei batteri acetogenici. L' H_2 prodotto dalle reazioni acetogeniche insieme a quello derivante dal primo layer, viene in parte convertito in CH_4 da altri consorzi di HCB presenti in questo strato e in parte convertito in acetato attraverso una reazione di omoacetogenesi. La presenza di batteri metanigeni consumatori di H_2 all'interno di questi layer è estremamente importante in quanto impedisce un accumulo di H_2 , che come visto nei paragrafi precedenti, se presente in altre concentrazioni ha un effetto inibente sul processo acetogenico [32];
- L'acetato prodotto raggiunge infine il core del granulo, costituito per la maggior parte da batteri metanigeni, dove viene convertito in CH_4 e CO_2 [32];

Sulla base di quanto appena illustrato risultano evidenti i vantaggi che derivano, in termini di interazioni simbiotiche, dall'aggregazione di differenti partner simbiotici in strutture come i granuli.

Quanto detto fin ora prendeva in considerazione la struttura dei granuli microbici costituiti sia da HPB che da HCB; nel caso di granuli costituiti da soli HPB l'unica differenza riguarda la composizione di tali strutture, nelle quali è assente il core metanigeno.

2.3.3 PROCESSO DI GRANULAZIONE

La formazione dei granuli microbici è il processo nel quale i vari microrganismi presenti in un reattore si aggregano per formare delle strutture con contorni definiti detti granuli. Il meccanismo con cui si formano i granuli è estremamente complesso e dipende dalla tipologia di microrganismi e dai meccanismi con cui interagiscono tra loro [33]. Tali meccanismi sono essenzialmente:

- Meccanismi di natura cinetica, che favoriscono i fenomeni di aggregazione con conseguente crescita del granulo;
- Meccanismi di natura fluidodinamica, che favoriscono invece i processi di rottura degli aggregati.

In merito ai processi di granulazione esistono numerose teorie su come vengono a formarsi queste strutture e sui meccanismi coinvolti[35]. Tali teorie possono essere suddivise in tre macro-categorie, ognuna delle quali rappresenta il fattore centrale del processo di granulazione [35]:

- *Teorie Fisiche*, dove il fenomeno viene spiegato sulla base dei parametri chimico-fisici caratterizzanti il sistema fermentativo. Tali parametri possono essere ad esempio, solidi sospesi all'interno del sistema e gli sforzi in gioco all'interno del sistema fermentativo;
- *Teorie Microbiologiche*, spiegano il fenomeno della granulazione basandosi sulle caratteristiche dei microrganismi presenti nel sistema e impiegano come base di partenza le teorie fisiche;
- *Teorie Termodinamiche*, analizzano il processo di granulazione da un punto di vista energetico studiando le interazioni chimico-fisiche tra le pareti cellulari batteriche e superfici di diversa natura.

In Tabella 2.4 sono riportate in maniera sintetica le principali teorie di granulazione suddivise nelle tre categorie sopra descritte.

Tabella 2.4 Principali teorie di granulazione. Tratta da [35] con modifiche.

APPROCCIO		TEORIA*	DESCRIZIONE	Rif.
Approccio	Sottocategoria*			
Fisico	-	Selection pressure theory	Il processo di granulazione è legato alla pressione del sistema, la quale dipende dall'hydraulic loading rate e dal gas loading rate. Condizioni di pressione elevata favoriscono l'aggregazione dei batteri sotto forma di granuli. In condizioni di bassa pressione, la crescita dei microrganismi avviene in condizioni disperse, senza un evidente fenomeno di aggregazione	[36]
		Growth of colonized suspended solids	La granulazione si verifica grazie alla presenza di solidi sospesi e particelle derivati da fenomeni di attrito, che fungono da supporto per l'aggancio dei microrganismi e successiva loro crescita.	[37]
Microbiologico	Physiological	Cape Town hypotesis	Secondo questa ipotesi il processo di granulazione dipende principalmente dalla specie microbica <i>Methanobacterium</i> , la quale impiega come fonte energetica l'idrogeno. In condizioni di pressione parziale di idrogeno elevata il processo di granulazione risulta favorito. Secondo questa teoria il processo di granulazione è sfavorito in condizioni in cui è favorita la produzione di acetato e in sistemi perfettamente miscelati, in quanto si ha l'allontanamento dell'idrogeno prodotto.	[20] [38]
		Growth	Spaghetti theory	Qui il processo di granulazione viene attribuito alla presenza di <i>Methanosarcina</i> e <i>Methanotrix</i> e si svolge essenzialmente in due step: 1) I batteri formano dei piccoli aggregati le cui dimensioni sono funzione delle condizioni idrodinamiche del sistema. In questa fase gli aggregati non presentano una forma compatta e hanno un aspetto filamentoso; 2) Gli aggregati formati nella prima fase cominciano a compattarsi inglobando anche specie sintrofiche e formando il granulo batterico vero e proprio.
	Ecological	Bridging of microflocs	Il processo di granulazione parte dalla specie <i>Methanotrix</i> . Secondo questa teoria i <i>Methanotrix</i> formano aggregati filamentosi che vengono ricoperti da batteri acidogenici e acetogenici andando a formare dei fiocchi di dimensioni che vanno dai 10-50 µm. Questi fiocchi tendono mano a mano ad aggregarsi usando i filamenti come ponti andando a formare i granuli.	[41]
		Bundles of <i>Methanotrix</i>	I granuli si sviluppano a partire da un piccolo aggregato di <i>Methanotrix</i> e altri batteri. Sui filamenti di <i>Methanotrix</i> cominciano a svilupparsi gruppi di batteri che aggregandosi crescono di dimensione; raggiunta una certa taglia si staccano dalla matrice di <i>Methanotrix</i> andando così a formare i granuli.	[42]
		Three types of VFA degrading granules	La formazione di granuli, in questa teoria, è attribuita alle specie batteriche <i>Methanotrix</i> e <i>Methanosarcina</i> . In particolare la morfologia dei granuli che vengono a formarsi è strettamente legata alla composizione in termini di VFA del brodo di fermentazione.	[34] [43]

Tabella 2.4 Principali teorie di granulazione (continuazione)

APPROCCIO		TEORIA*	DESCRIZIONE	Rif.
Approccio	Sottocategoria*			
Termodinamico	-	Crystallized nuclei formation	Descrive la formazione e la crescita dei granuli attraverso un modello di crescita cristallina. Per valutare l'energia di interazione durante le varie fasi di crescita impiega la teoria DLVO .	[44]
		Surface tension model	Descrive il processo di granulazione per mezzo della termodinamica delle superfici. Secondo questa teoria la formazione dei granuli batterici avviene solo quando la tensione superficiale del liquido è tale da minimizzare l'energia libera di adesione. In particolare se la tensione superficiale è: - Sufficientemente bassa, sono favoriti i fenomeni di adesione di batteri idrofilici; - Sufficientemente alta, sono favoriti i fenomeni di adesione di batteri idrofobici.	[45]
		Proton traslocation-dehydration	Questa teoria descrive il processo di granulazione attraverso un meccanismo di tipo molecolare, basato sulla traslocazione dei protoni a livello dell'interfaccia membranale dei batteri. Secondo questo modello il processo di granulazione avviene in quattro fasi: 1) Deidratazione della superficie batterica; 2) Formazione di un "granulo embrionale"; 3) Maturazione del granulo; 4) Post-maturazione.	[46]

* Il nome del modello si è deciso di mantenerlo in inglese per non perderne il significato in traduzioni ambigue

Il numero di teorie, riportate in tabella 2.4, ci fa capire quanto ancora si sappia poco di quello che accade durante la formazioni dei queste strutture estremamente complesse. Indipendentemente da questo, il punto di incontro di tutte le teorie è rappresentato dal fatto che la formazione di tali strutture abbia dei benefici a livello di simbiosi e di trasferimento elettronico interspecie (IET).

2.4 EFFETTO DEL FERRO ZERO VALENTE SUL PROCESSO DI FA

All'inizio del capitolo si è visto come alla base delle reazioni che avvengono in un processo fermentativo, ci sia sempre un trasferimento di elettroni da una condizione di elevato potenziale RedOx ad una di basso potenziale RedOx con conseguente rilascio di energia. Andando ad agire sul flusso elettronico, facilitandolo (IET) e/o incrementandolo (fenomeni di ossidazione generano elettroni), sarebbe possibile dunque migliorare la resa del processo fermentativo in biogas.

Studi recenti, incentrati sull'incremento delle prestazioni dei processi di FA, indagano sugli effetti della supplementazione di metalli all'interno dei sistemi fermentativi [24]. Negli ultimi anni, sono sempre più gli studi che hanno come oggetto la valutazione degli effetti dell'aggiunta del ferro zero valente (ZVI) sulle prestazioni del processo fermentativo, in Tabella 2.5 sono riportati alcuni di questi studi con relative considerazioni.

Tabella 2.5 Studi sugli effetti dell'additivazione del ZVI sulla resa della FA

Titolo Pubblicazione	Specie metallica aggiunta	Condizioni	Risultati a seguito dell'	Rif
Enhanced anaerobic digestion of waste activated sludge digestion by the addition of zero valent iron	Fe ⁰ (ZVI)	Particelle di ferro con diametro di 0,2 mm a concentrazioni variabili 0-4 g/L di ZVI	- Accelerazione dei fenomeni idrolitici e acidogenici; - Aumento della produzione in metano del 43%.	[47]
Enhanced high-solids anaerobic digestion of waste activated sludge by the addition of scrap iron	ZVI Ferro di scarto	Particelle di ZVI con diametro di 0,2mm a varie concentrazioni. Particelle di ferro non trattato di dimensioni variabili a varie concentrazioni.	- Entrambi i tipi di ferro aggiunte danno un incremento nella resa in metano; - Il ferro di scarto presenta rese in metano maggiori.	[48]
Magnetite particles triggering a faster and more robust syntrophic pathway of methanogenic propionate degradation	Particelle di magnetite	Particelle di magnetite di dimensioni 100-150nm.	- incremento della produzione di metano grazie al DIET	[49]
Evaluation of nano zero valent iron effects on fermentation of municipal anaerobic sludge and inducing biogas production	Fe ⁰ nano strutturato (NZVI)	Particelle con diametro di 55nm a diverse concentrazioni.	- Incremento della produzione in metano del 20%	[7]

Nonostante, come riportato in Tabella 2.5, sia ormai assodato come l'aggiunta di ZVI al sistema fermentativo presenti dei benefici in termini incremento di prestazioni, il meccanismo con cui i sistemi biologici interagiscono con il Fe^0 sono ancora poco chiari.

La difficoltà nel comprendere i meccanismi con cui il ferro agisce nei diversi cammini metabolici, è dovuta al fatto che in un processo di FA il numero di specie microbiche impiegate è elevato ed ognuna reagisce alla presenza del ZVI in maniera differente; in particolare facendo riferimento alla suddivisione nelle quattro categorie illustrate nel capitolo 1, si ha che ogni gruppo di microrganismi (idrolitici, acidogenici, acetogenici, metanigeni), viene influenzato in modi diversi dall'additivazione di ferro.

Nella parte sperimentale di questo lavoro si andrà ad indagare sugli effetti del ferro nella prima parte della FA e si cercherà di quantificare tali benefici in termini di resa di produzione di bio- H_2 .

3 EFFETTI DELLA MISCELAZIONE SULLA FA

La miscelazione è un'operazione onnipresente in ogni tipo di processo chimico. Nonostante questo l'operazione di mixing è una delle pratiche meno standardizzabili nel mondo dell'ingegneria di processo, questa sua difficile riproducibilità è legata al fatto una minima variazione nel sistema agitato si ripercuote in maniera amplificata sul setup dell'operazione di mixing [50].

Per definizione:

“ La miscelazione è un'operazione che ha come scopo quello di ridurre le disuniformità spaziali presenti in uno spazio fisico ben definito. Tali disuniformità spaziali possono essere gradienti: di concentrazione, di temperatura e di quantità di moto.

Scopo del mixing è quindi quello di portare un sistema nelle condizioni di sistema perfettamente miscelato.”

La miscelazione avviene essenzialmente su due differenti livelli dimensionali, si parla infatti di:

- Macromiscelazione: rappresenta la miscelazione che avviene sulle grandi scale ed ha come risultato la movimentazione di masse fluide macroscopiche. Questo tipo di miscelazione introduce un campo accelerativo all'interno del sistema [51];
- Micromiscelazione: rappresenta la miscelazione sulle piccole scale (scale di Kolmogorov) ed è strettamente legata ai fenomeni di natura dispersiva e diffusiva. Questo tipo di miscelazione a differenza del macromixing introduce un campo di natura dimensionale (dimensione di Kolmogorov) [51].

In generale tanto più la miscelazione non è efficace tanto più il comportamento del sistema miscelato si allontana da quello ideale.

La miscelazione è un'operazione multi-scopo, in quanto, all'interno del concetto di uniformità del sistema rientrano tutta una serie di fenomeni:

- Sospensione di particelle in un liquido;
- Miscelazione di due liquidi immiscibili;
- Incremento del mass-transfer tra fasi distinte;
- Incremento dei fenomeni di scambio termico.

3.1 LA MISCELAZIONE NEI REATTORI BIOLOGICI

In un bioreattore la miscelazione, data la presenza di un sistema vivente, ha come scopo principale quello di garantire un apporto continuo e uniforme di nutrienti alla biofase, che nel caso di microrganismi aerobi comprende anche l'ossigeno. [52]

Nel caso dei bioreattori, il problema miscelazione, si complica ulteriormente in quanto bisogna tener conto anche degli stress di natura meccanica che tale operazione scarica sulla fase biotica. Il problema degli “sforzi” in ambito biotecnologico, è un problema cruciale a causa della delicatezza della biofase contenuta nel reattore. Questa tipologia di sforzi si presenta, oltre che nel campo della miscelazione, anche durante le più classiche operazioni unitarie: filtrazione, centrifugazione e movimentazione tramite pompe.

Sulla base di quanto detto fino ad ora è facile capire quanto la miscelazione, operazione già di per sé complessa, risulti ancora più complicata nel caso di bioreattori.

Numerosi sono i parametri da cui dipende l'efficienza di questa operazione, nel presente lavoro verranno analizzati alcuni dei principali parametri che sono stati studiati nel corso della fase sperimentale di tesi. Tali parametri sono essenzialmente:

- Forma e tipologia di agitatore;
- Rapporti geometrici tra agitatore e reattore;
- Potenza immessa nel sistema agitato;
- Composizione fasi brodo di reazione e caratteristiche reologiche.

Non essendo una tesi incentrata sul mixing, non verranno analizzati tutti gli aspetti del problema della miscelazione in ambito bioreattoristico ma, verranno presi in considerazione solo quei parametri utili alla descrizione del lavoro compiuto in fase di sperimentazione. Inoltre quanto verrà detto da questo punto in avanti riguarderà strettamente il contesto bioreattoristico.

3.1.1 TIPOLOGIA DI AGITATORI

Gli agitatori impiegati in operazioni di miscelazione sono innumerevoli; la loro scelta dipende da tutta una serie di parametri quali:

- Viscosità del brodo;
- Resistenza della biofase agli sforzi di taglio;
- Tipologia di fermentazione: aerobica o anaerobica.

Un prima distinzione può essere fatta sulla base della tipologia di flusso che essi generano, che può essere assiale o radiale. In Figura 3.1 è riportata una rappresentazione generica delle due tipologie di flusso.

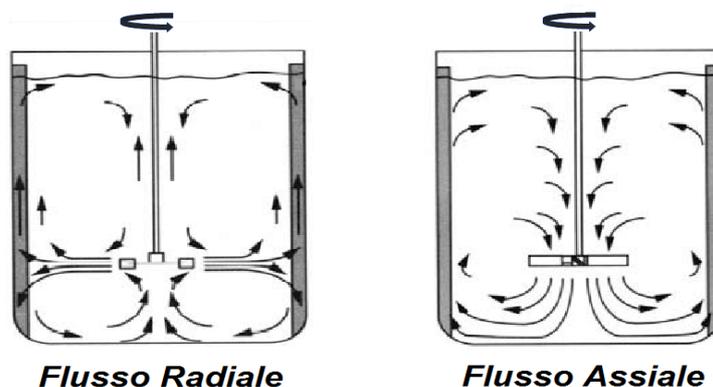


Figura 3.1 Tipologie di flusso (Flow Patterns). Tratto da [53] con modifiche.

Le principali tipologie di agitatore impiegate in ambito bioreattoristico sono essenzialmente: l'elica marina, l'ancora, la turbina Rushton, la Pitched Blade Turbine (PBT) e la vite elicoidale [54].

Uno dei primi parametri da prendere in considerazione per la scelta dell'agitatore è la viscosità del mezzo che deve essere miscelato; per garantire una corretta movimentazione del fluido è necessario che l'impeller abbia una conformazione opportuna. In figura 3.2 sono riportati alcuni degli agitatori sopra citati e il relativo range di viscosità in cui sono impiegabili.

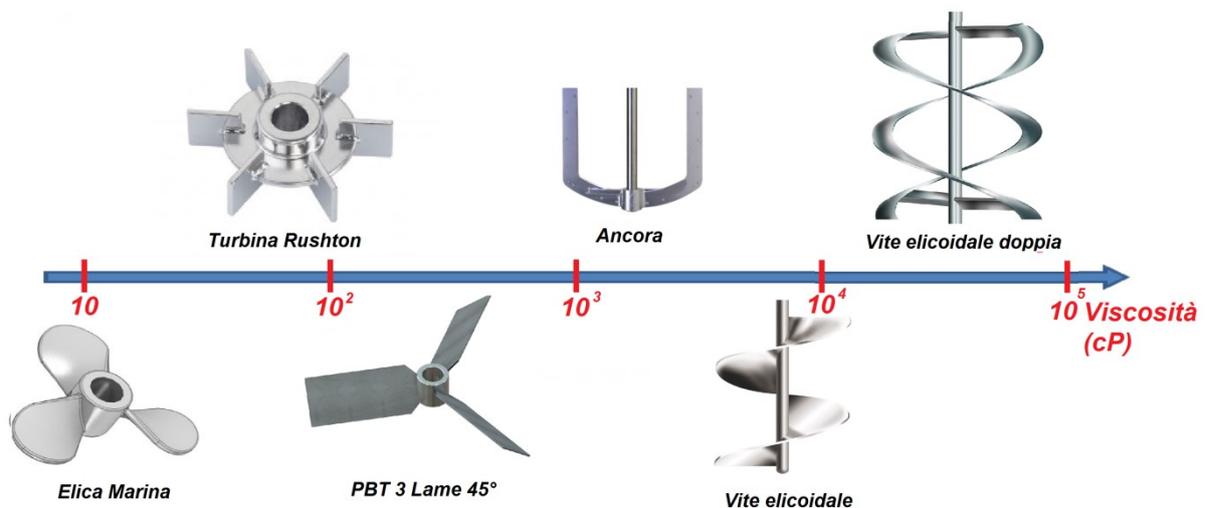


Figura 3.2 Tipologie di agitatore e range di viscosità in cui applicarli

Il processo di miscelazione, come accennato precedentemente, genera degli sforzi di taglio più o meno forti a seconda della tipologia di impeller impiegato. Questo aspetto, nella scelta del tipo di agitatore e specialmente in ambito bioreattoristico, rappresenta un punto critico a causa dell'elevata sensibilità agli sforzi di taglio della fase biotica. Gli sforzi di taglio sono funzione della velocità di taglio la quale dipende da innumerevoli parametri quali, gradienti di velocità, livello di turbolenza, conformazione dell'agitatore e viscosità del sistema [51].

Un modello semplificato per valutare la velocità di taglio è stato proposto da Metzner e Taylor nel 1960, nel caso di un fluido Newtoniano e in condizioni di non eccessiva turbolenza. Secondo tale modello, la velocità di taglio è proporzionale alla velocità di agitazione secondo l'equazione 3.1 anche detta di *Metzner-Otto*[51]:

$$\gamma = KN \quad (3.1)$$

Dove γ è la velocità di taglio in (s^{-1}) N è la velocità dell'agitatore espressa in (rpm), mentre K è la costante di proporzionalità. Tale costante varia in funzione: della distanza dall'agitatore e del tipo di impeller. [51]

In tabella 3.1 sono riportati i valori di K per le varie tipologie di agitatore, per la valutazione della velocità di taglio in prossimità dell'agitatore attraverso l'equazione 3.1.

Tabella 3.1 Valori di K per diversi tipi di impeller [55]

Agitatore	Elica Marina	Turbina Rushton	Ancora	Elica Doppia
K	10	12	25	30

La variazione della velocità di taglio γ al variare della distanza dal tipo dell'agitatore è rappresentata in Figura 3.3.

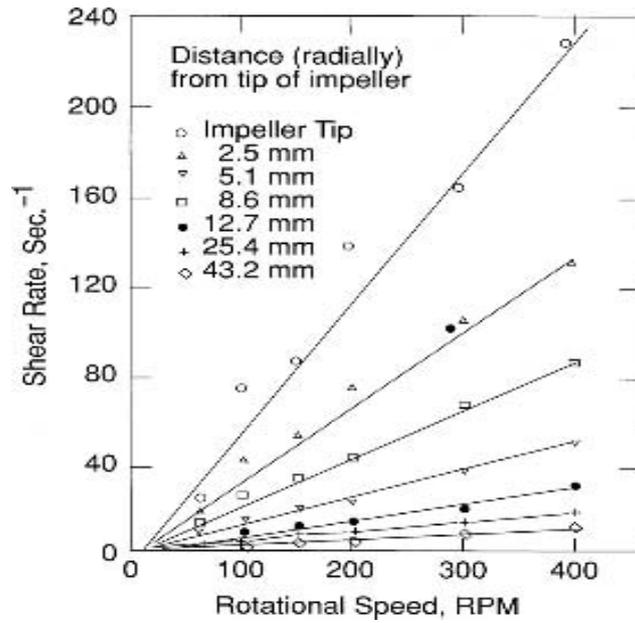


Figura 3.3 Variazione di $\dot{\gamma}$ in funzione della distanza dall'agitatore. Tratto da [55].

3.2 PARAMETRI CARATTERISTICI DEGLI AGITATORI E DEI SISTEMI AGITATI

I parametri che caratterizzano un sistema miscelato e che influenzano il suo comportamento fluidodinamico a livello macroscopico sono i seguenti[51]:

- Numero di Reynolds rotazionale (N_{Re});
- Velocità all'esterno della girante, detta anche Tip Velocity (V_{tip});
- Numero di Potenza (N_p);
- Numero di Portata o Pompaggio (N_Q);
- Tempi di miscelazione τ_m e tempo di circolazione τ_c .

Allo scopo di comprendere meglio quanto verrà illustrato, in Figura 3.4 è riportato uno schema generale di un vessel munito di agitatore.

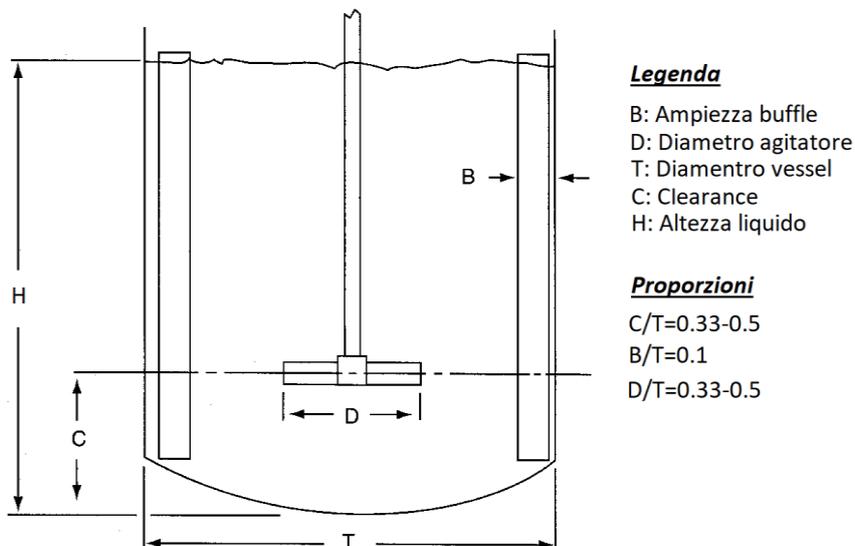


Figura 3.4 Schema generale reattore agitato. Tratto da [51] con modifiche.

3.2.1 NUMERO DI REYNOLDS ROTAZIONALE

Il numero di Reynold rotazionale è un numero adimensionati che fornisce informazioni riguardo al regime fluidodinamico all'interno del reattore agitato. Tale numero è definito come[51]:

$$N_{Re} = \frac{ND^2\rho}{\mu} \quad (3.2)$$

Dove:

- N è la velocità di rotazione dell'agitatore (1/s);
- D è il diametro dell'agitatore (m);
- ρ è la densità del liquido (kg/m^3);
- μ è la viscosità dinamica ($\text{Pa}\cdot\text{s}$).

In particolare se[51]:

- $N_{Re} < 10$, le forze viscosse prevalgono e ci si trova in regime lamiare;
- $10 < N_{Re} < 3000$, regime transitorio;
- $N_{Re} > 3000$, il regime è turbolento.

Questo numero adimensionato è estremamente importante in quanto da esso dipendono i due parametri N_p e N_Q .

3.2.2 TIP VELOCITY

La Tip Velocity rappresenta la componente tangenziale di velocità alla girante e corrisponde al massimo valore di velocità lineare raggiungibile dal fluido. Ha forma:

$$v_{Tip} = \pi ND \quad (3.3)$$

Dove:

- N è la velocità di rotazione dell'agitatore (1/s);
- D è il diametro dell'agitatore (m);

Questo parametro fornisce indicazioni preliminari sui massimi gradienti di velocità generati all'interno del sistema agitato [51].

3.2.3 NUMERO DI POTENZA

Il numero di potenza (N_p) è un parametro adimensionato che fornisce indicazioni sulla potenza dissipata all'interno del vessel. Ha forma[51]:

$$N_P = \frac{P}{N^3 D^5 \rho} \quad (3.4)$$

Dove:

- N è la velocità di rotazione dell'agitatore (1/s);
- D è il diametro dell'agitatore (m);
- ρ è la densità del liquido (kg/m^3);
- P è la potenza assorbita alla girante; in genere si assume che $P \approx 0.7 P_{tot}$ (W);
- P_{tot} potenza erogata dal motore collegato all'albero della girante (W).

Il numero di potenza è un parametro unico per ogni tipologia di agitatore.

3.2.4 NUMERO DI PORTATA

Il numero di portata (N_Q) è un parametro adimensionato che fornisce indicazioni sulla portata di liquido pompato dall'agitatore. Questo parametro ha forma [51]:

$$N_Q = \frac{Q}{ND^3} \quad (3.5)$$

Dove:

- N è la velocità di rotazione dell'agitatore (1/s);
- D è il diametro dell'agitatore (m);
- Q è la portata conferita al fluido (m^3/s);
- ND^3 è la capacità di pompaggio della girante (m^3/s)

Il numero di portata è un parametro unico per ogni tipologia di agitatore.

In Tabella 3.2 sono riportati i valori di N_Q e N_p per alcune tipologie di agitatore.

Tabella 3.2 N_p e N_Q per varie tipologie di agitatore

Agitatore	Flusso	D/T	n° pale	N_p	N_q	Rif
Rushton	Radiale	0,33	6	5,20	0,75	[51]
Rushton	Radiale	0,50	6	5,00	0,60	[51]
Elica Marina	Assiale	0,50	3	0,70	0,80	[56]
Elica Marina	Assiale	0,33	3	0,50	0,60	[56]
PBT-45°	Misto	0,33	4	1,27	0,79	[51],[57]
PBT-45°	Misto	0,40	3	1,30	0,79	[57], [58]

3.2.5 TEMPO DI MISCELAZIONE E DI CIRCOLAZIONE

I parametri visti sino ad ora sono significativi solamente in prossimità della girante, mano a mano che ci si allontana da essa, il valore di questi numeri non descrive più in maniera fedele quanto accade nel punto lontano dall'agitatore. All'allontanarsi dall'agitatore, bisogna infatti tener conto di tutta una serie di fenomeni che portano alla formazione di flussi indotti e flussi di ricircolo, all'interno del sistema, che vanno a sommarsi/sovrapporsi alla portata generata in prossimità della girante; ad ognuno di questi flussi è possibile inoltre associarvi un corrispondente numero di portata: N_{Qind} e N_{Qric} [59].

All'interno di un reattore agitato si vengono quindi a formare dei fenomeni circolatori la cui intensità (espressa in termini di velocità) è funzione della distanza dall'agitatore. A titolo puramente dimostrativo, in Figura 3.5 è riportata una rappresentazione di come variano le velocità di circolazione all'interno di un reattore agitato; i numeri riportati esprimono la velocità nei vari punti come frazione della tip velocity [60].

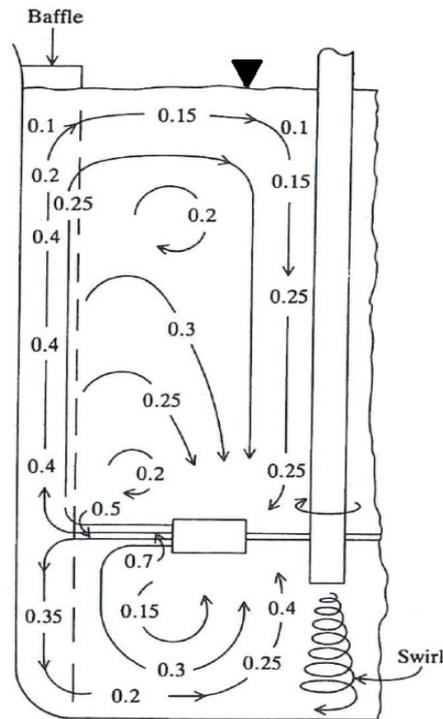


Figura 3.5 Variazione della velocità di circolazione in funzione della distanza dall'agitatore. misurato per turbina Rushton a 200 rpm. Tratto da [60].

Sulla base di quanto riportato in Figura 3.5 risulta evidente quanto possa essere complessa una descrizione accurata dei fenomeni circolatori; per non parlare del fatto che in genere questo tipo di valutazioni sono fini a se stesse, in quanto basta cambiare un particolare per ritrovarsi con un modello non più applicabile alla nuova situazione. Da un punto di vista pratico, conviene dunque affrontare il problema da un punto di vista macroscopico e questo lo si può fare attraverso i tempi di circolazione e miscelazione.

Nella pratica, queste due grandezze vengono in genere determinate sperimentalmente attraverso prove che prevedono l'impiego di traccianti, andando a misurare i tempi di risposta del sistema a queste perturbazioni attraverso varie metodologie di misura [51].

È possibile allora definire questi due parametri temporali come segue.

3.2.5.1 TEMPO DI MISCELAZIONE

Il tempo di miscelazione τ_m , può essere definito, analizzandolo da un punto di vista sperimentale, come il tempo necessario affinché il tracciante, impiegato nella prova di misurazione, venga uniformemente disperso all'interno del volume [61]. Tale condizione di omogeneità si definisce raggiunta quando il valore del parametro misurato, nella sua forma normalizzata, discosta dal valore stazionario di $\pm 5\%$ [51]. In Figura 3.6 è riportato il risultato di una generica prova dove viene messo in evidenza il raggiungimento del tempo di miscelazione.

Facendo riferimento a quanto affermato precedentemente sui fenomeni circolatori all'interno di un sistema agitato, è possibile definire il τ_m come il tempo necessario affinché, nel volume agitato, si stabilisca una certa distribuzione delle velocità (vedi Figura 3.5). Il tempo di miscelazione rappresenta dunque, da un punto di vista del profilo di velocità, una condizione di quasi stazionarietà.

3.2.5.2 TEMPO DI CIRCOLAZIONE

Il *tempo di circolazione* τ_c è il tempo necessario affinché un elemento di fluido, o una particella trasportata, parta dal punto A del campo di velocità e ritorni al punto A all'interno del volume agitato[51].

Da un punto di vista bioreattoristico il tempo di circolazione è estremamente importante in quanto fornisce un'idea, dell'intervallo di tempo che la fase biotica trascorre in condizioni di reazione ottimali. Questa informazione deriva dal fatto che a seconda della zona del vessel in cui la biomassa si trova, la velocità di rifornimento dei nutrienti (e ossigeno, se il processo è aerobico) e di conseguenza la velocità di reazione, è differente in quanto il campo di velocità segue all'incirca lo schema in Figura 3.5. Il tempo di circolazione fornisce dunque un' indicazione del tempo che la biomassa trascorre in condizioni sfavorevoli alla sua attività e, permette di intervenire agendo su una serie di parametri come la velocità di agitazione o il tipo di agitatore.

Il τ_c e il τ_m sono tra loro legati in quanto, come è possibile vedere in Figura 3.6, il tempo di circolazione è una frazione del tempo di miscelazione. La relazione che li lega è la seguente[51]:

$$\tau_m = n\tau_c \quad (3.6)$$

Dove il valore di n sulla base di dati riportati in letteratura, è un numero intero compreso tra $n=(4-6)$ [51], [53].

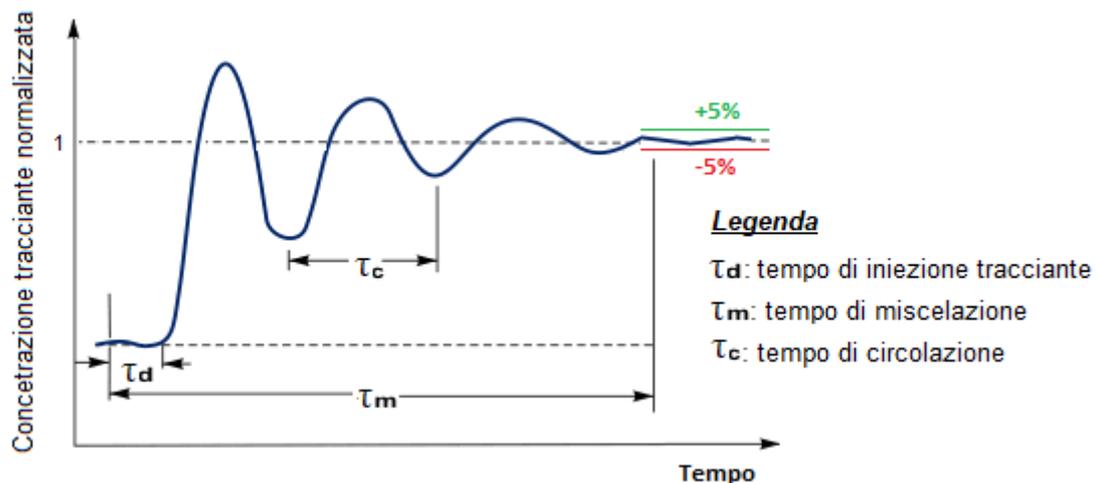


Figura 3.6 Risultati generica prova sperimentale misurazione tempo di miscelazione e tempo di circolazione. Tratto da [62] con modifiche.

Riprendendo in considerazione la definizione data inizialmente di tempo di circolazione, risulta evidente, come il τ_c non può essere unico, ma all'interno di uno stesso sistema agitato si possono avere differenti valori di tale parametro temporale; questo aspetto, come illustrato in Figura 3.7 è dovuto al fatto che l'elemento di fluido, che parte da A e ritorna ad A, per fare questo passaggio può compiere differenti percorsi all'interno del reattore, ognuno caratterizzato da un proprio tempo di circolazione.

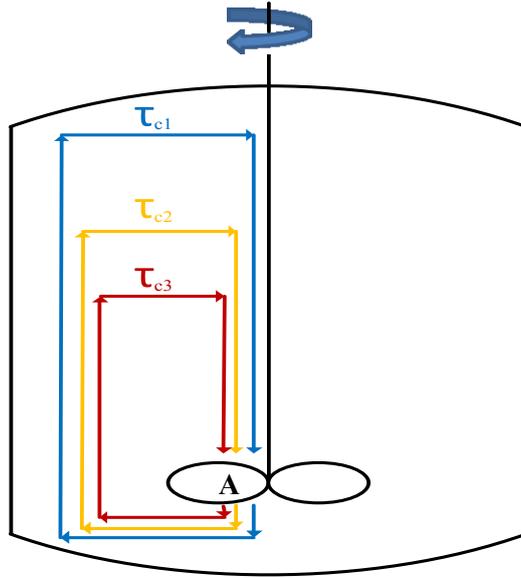


Figura 3.7 Possibili circolazioni all'interno del reattore agitato

Nota quindi che il τ_c non può essere unico, è possibile allora introdurre il concetto di *distribuzione dei tempi di circolazione* $\tau_c(t)$. Misurando sperimentalmente il tempo di circolazione in diversi punti del reattore è possibile ricavare un valore medio di tempo di circolazione indicato come $\bar{\tau}_c$ e definito come[51]:

$$\bar{\tau}_c = \frac{\sum_{i=1}^n \tau_{c_i}}{n} \quad (3.7)$$

E la relativa varianza σ_c definita come[51]:

$$\sigma_c = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\tau_{c_i} - \bar{\tau}_c)^2}{n}} \quad (3.8)$$

Dove:

- n è il numero delle misurazioni sperimentali;
- τ_{c_i} è il tempo di circolazione della prova i -esima.

Esprimendo la distribuzione dei tempi di circolazione $\tau_c(t)$ attraverso una distribuzione log-normale quello che si ottiene è[51]:

$$\tau_c(t) = \frac{1}{\sigma_e(2\pi)^{0,5}} \exp \left[-\frac{(\ln t - t_e)^2}{2\sigma_e^2} \right] \quad (3.9)$$

I cui parametri sono calcolabili risolvendo il sistema costituito dalle equazioni 3.10 e 3.11 [51].

$$\bar{\tau}_c = \exp \left(t_e + \frac{\sigma_e^2}{2} \right) \quad (3.10)$$

$$\sigma_c = \bar{\tau}_c^2 (\exp \sigma_e^2 - 1) \quad (3.11)$$

La circolazione è dunque un fenomeno di natura macroscopica, che ha come obiettivo quello di trasportare, nei vari punti del sistema, l'energia immessa attraverso l'agitatore.

3.2.5.3 MISURAZIONE DEL TEMPO DI CIRCOLAZIONE E DEL TEMPO DI MISCELAZIONE

I metodi che permettono di misurare i due parametri temporali appena descritti sono molteplici, tutti sfruttano l'aggiunta di un tracciante per andare a studiare il comportamento del sistema miscelato a fronte di una perturbazione generata dal tracciante [51].

Il tracciante impiegato in tali prove deve avere delle caratteristiche chimico fisiche ben definite, in particolare:

- Deve essere distinguibile dal resto del liquido all'interno del sistema miscelato;
- Deve trovarsi nella stessa fase del resto del liquido all'interno del sistema miscelato;

A seconda del metodo di misurazione adottato, il tracciante impiegato sarà differente. Quasi tutti i metodi che permettono di valutare questi due tempi sono metodi invasivi, in quanto necessitano l'inserimento di sonde all'interno del sistema miscelato per rilevare una variazione di proprietà; è quindi importante, indipendentemente dal metodo impiegato, impostare l'apparato di misura in modo da perturbare il meno possibile il sistema[51].

I principali metodi sono qui di seguito riportati:

- 1) Metodi colorimetrici: sfruttano come tracciante un agente decolorante. In pratica al sistema miscelato, precedentemente colorato per mezzo di un'opportuna sostanza, viene aggiunto al tempo $t=0$ un agente decolorante; il tempo che intercorre tra l'iniezione del tracciante e la scomparsa dell'ultima traccia di colore corrisponde al tempo di miscelazione. Questo metodo ha il vantaggio di non essere perturbato dalla presenza di sonde interne in quanto è l'operatore che rileva il cambiamento; allo stesso tempo la rilevazione da parte dell'operatore rende questa misura poco oggettiva [51].
Una possibile variante di questo metodo sfrutta come tracciante una base o un acido che vengono introdotti nel sistema miscelato preventivamente additivato di un opportuno indicatore[51].
Questi metodi, data la loro scarsa oggettività di misurazione, vengono in genere utilizzati nello studio preliminare del sistema miscelato.
- 2) Metodi di campionamento offline: sfruttano come tracciante una qualsiasi sostanza che presenti caratteristiche chimico-fisiche differenti dal bulk del liquido; questi metodi prevedono un continuo campionamento ad intervalli regolari del sistema miscelato allo scopo di valutare come variano le caratteristiche del liquido nel tempo ed estrapolare un tempo di miscelazione e di circolazione. Questo metodo a causa dei continui campionamenti è estremamente invasivo e trova poca applicabilità nel caso di sistemi caratterizzati da bassi valori di τ_m [51].
- 3) Metodi che sfruttano misure di conducibilità: sfruttano come tracciante un elettrolita che va a modificare la conducibilità nel sistema miscelato. Un elettrodo è inserito in posizioni opportune allo scopo di rilevare l'andamento della conducibilità all'interno del sistema permettendo di correlarlo a dei valori di τ_m e τ_c . È uno dei metodi più impiegati [51].
- 4) Metodi che sfruttano misure di pH: sfruttano come tracciante un acido o una base che va a modificare il pH nel sistema miscelato. Un elettrodo a pH è inserito in posizioni opportune allo scopo di rilevare l'andamento del pH all'interno del sistema permettendo di correlarlo a dei valori di τ_m e τ_c . Il problema di questa tipologia di misura è legata ai tempi di risposta

dell'elettrodo a pH che rispetto ad un elettrodo per la misura conducimetrica sono più lunghi[63].

- 5) *Metodi di misura PIV (Particle Image Velocimetry)*: è una tecnica di misura non invasiva basata su metodi ottici che sfrutta come tracciante un solido sospeso. Il sistema di rilevazione è costituito da un insieme di telecamere, una sorgente luminosa pulsante e un software di acquisizione ed elaborazione dati. Il suo principio di funzionamento si basa sull'analisi, per mezzo di immagini, degli spostamenti di tracciante solido all'interno del sistema miscelato[64].

3.3 MICROMIXING E TURBOLENZA

Quanto trattato fino ad ora riguarda il campo macroscopico della miscelazione, ovvero tutti quegli aspetti legati ai fenomeni di circolazione che si vengono a formare all'interno del sistema miscelato. Il fenomeno della miscelazione però, non avviene solamente a livello macroscopico, ma si manifesta anche a livello microscopico attraverso la turbolenza. Macromixing e micromixing, affinché ci sia miscelazione, devono coesistere.

3.3.1 TEORIA ISOTROPICA DELLA TURBOLENZA DI KOLMOGOROV

La descrizione della turbolenza e dei campi di moto di un sistema agitato è una questione, da un punto di vista quantitativo, estremamente complessa. Una teoria che permette di descrivere il fenomeno della turbolenza da un punto di vista abbastanza quantitativo è la *Teoria isotropica della turbolenza di Kolmogorov*, dove le tensioni turbolente di Reynolds sono espresse attraverso i parametri reologici ed energetici del sistema. La struttura dei fenomeni turbolenti può essere descritta attraverso spettri in cui, ogni segnale turbolento è visto come la sovrapposizione di segnali caratterizzati da una certa ampiezza e frequenza [65].

Secondo questa teoria, l'energia cinetica immessa in un fluido, attraverso il sistema di agitazione, si distribuisce nel fluido attraverso vortici, detti *eddies primari*, le cui dimensioni sono dello stesso ordine di grandezza del flusso generato dalla girante; questi eddies, essendo instabili, a seguito di azioni meccaniche, si disintegrano formando eddies più piccoli trasferendo energia cinetica. Per valori di Reynolds sufficientemente alti, questi eddies raggiungono una dimensione tale per cui gli *eddies intermedi* si rompono portando alla formazione dei cosiddetti *eddies terminali*, che a differenza delle prime due tipologie di vortici, presentano caratteristiche isotrope in quanto a causa dei continui urti con altri eddies perdono la loro condizione di unidirezionalità [65].

L'ipotesi fatta da Kolmogorov afferma che [65]:

A valori elevati di Reynolds, esiste un range di frequenze abbastanza elevato (Eddies Terminali) in cui si ha una dissipazione continua della turbolenza che non dipende dalle condizioni esterne (macroscopiche) ma, dipende esclusivamente dalla viscosità cinematica (ν) e dalla dissipazione di energia cinetica turbolenta per unità di massa (ϵ).

Questa teoria è quindi legata a due considerazioni [65]:

- 1) A elevati Reynolds le strutture fluidodinamiche, eddies, sono statisticamente isotrope. Questo si traduce in un sistema in cui gli effetti viscosi prevalgono su quelli inerziali;
- 2) Sulle piccole scale, eddies terminali, i flussi turbolenti sono indipendenti dalle caratteristiche macroscopiche del sistema e acquistano un significato di universalità.

Il parametro più importante, caratterizzante la condizione di isotropicità della turbolenza del sistema, ricavato sulla base di questa teoria, è la *Dimensione caratteristica di Kolmogorov*, rappresenta la dimensione minima degli eddies, oltre la quale la turbolenza è localmente isotropa[65]. Ha forma:

$$\eta = \left(\frac{\nu^3}{\varepsilon}\right)^{1/4} \quad (3.12)$$

Dove ν rappresenta la viscosità cinematica (m^2/s) e ε è la potenza dissipata per unità di massa ($\text{J}/\text{kg}\cdot\text{s}$). Esprimendoli come:

$$\varepsilon = \frac{P}{V\rho} \quad (3.13)$$

$$\nu = \frac{\mu}{\rho} \quad (3.14)$$

Dove P è la potenza immessa nel sistema (W), V è il volume di liquido nel sistema (m^3), ρ è la densità (kg/m^3) e μ è la viscosità dinamica ($\text{Pa}\cdot\text{s}$); è possibile riscrivere η come:

$$\eta = \frac{\mu^{3/4}}{\rho^{1/2}} \left(\frac{P}{V}\right)^{-1/4} \quad (3.15)$$

Per concludere questa breve trattazione sulla teoria isotropica della turbolenza di Kolmogorov, è possibile quindi affermare che [65]:

- Eddies con dimensioni più piccole di η si trovano in uno stato di dissipazione viscoso, detto sottorange viscoso dello stato di equilibrio universale.
- Eddies con dimensioni più grandi di η si trovano in uno stato di convezione inerziale.

3.4 INTERAZIONI FLUIDO/PARTICELLE

Come affermato nei paragrafi precedenti la miscelazione, rappresenta un punto nevralgico nel caso di processi che sfruttano una fase biologica. Da essa infatti dipendono:

- I fenomeni di trasporto che permettono ai nutrienti di raggiungere la biofase;
- I fenomeni di stress idrodinamici sulla biofase.

Questo paragrafo affronta gli aspetti che riguardano gli stress idrodinamici sulla biofase andando a valutare le interazioni tra fluido e particelle sospese; dove per particelle si intendono i granuli microbici, analizzati approfonditamente nel capitolo precedente.

Le interazioni fluido/particelle che si vengono a creare all'interno di un bioreattore sono estremamente importanti, in quanto generano tutta una serie di sforzi locali che influenzano fortemente la funzionalità del biocatalizzatore.

In regime turbolento, le interazioni che avvengono tra le particelle sospese e gli eddies in particolari condizioni operative, possono generare tutta una serie di sforzi sulla biofase che porta alla distruzione degli aggregati microbici [53].

Tali condizioni operative sono essenzialmente legate alla reologia dei bordi, alla potenza immessa nel sistema miscelato e la tipologia di impeller impiegato [66].

Tali sforzi esercitati sono essenzialmente sforzi di taglio il cui andamento è strettamente legato ai gradienti di velocità all'interno del reattore in regime turbolento, come riportato nell'equazione 3.16[65].

$$d\tau = -\mu^* \frac{dv}{dy} \quad (3.16)$$

Dove μ^* è una viscosità apparente legata alla reologia del brodo contenuto nel sistema; in generale il comportamento di un brodo di fermentazione è tutt'altro che newtoniano. Il suo comportamento reologico, a seconda della fase del processo fermentativo in cui si trova, può essere pseudoplastico o di Bingham[67].

L'intensità degli sforzi di taglio esercitati sulla biofase è strettamente legata alle dimensioni relative tra particelle sospese (ad esempio i granuli microbici) e gli eddies generati[53]. In particolare si ha che, se:

- le particelle presentano una dimensione inferiore agli eddies, vengono da loro catturate e trasportate senza subire sforzi di taglio tali da danneggiarli in quanto le velocità relative di scorrimento sono relativamente basse [53]. Questo fenomeno è rappresentato in maniera schematica in Figura 3.8.

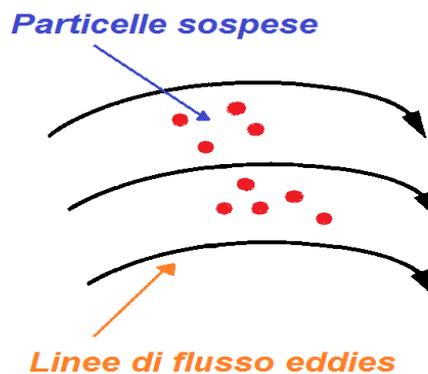


Figura 3.8 Interazione particelle sospese con eddies di grandi dimensioni.
Tratta da [53] con modifiche.

In tali condizioni, nel caso dei granuli microbici ad esempio, i microorganismi sono condizionati da fenomeni di mass transfer. In questa particolare condizione il processo di accrescimento dei granuli continua ad avvenire fino a raggiungere la dimensione degli eddies.

- le particelle presentano una dimensione relativa maggiore degli eddies generati dalle condizioni idrodinamiche del sistema. In questo caso gli eddies scivolano sulla superficie delle particelle generando un minimo sforzo che non porta alla distruzione dell'aggregato. In Figura 3.9 è riportata una generica rappresentazione del fenomeno.

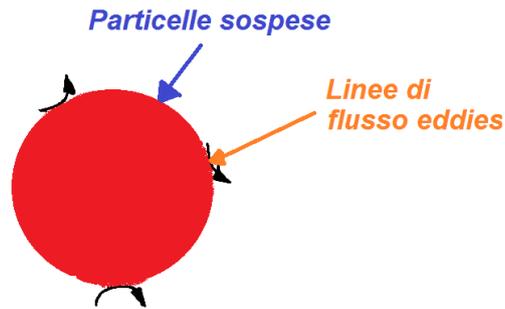


Figura 3.9 Interazione particelle sospese con eddies di piccole dimensioni.

- le particelle presentano dimensioni comparabili con quelle degli eddies generati, sono quelle sottoposte agli sforzi maggiori. Tali interazioni possono essere di varia natura (compressione, trazione e tribocompressione), variabili nel tempo e di indefinibile frequenza. Questa tipologia di interazioni genera degli sforzi tali sulle particelle sospese che porta alla fine alla distruzione dell'aggregato. Da prove sperimentali è risultato che quando il diametro dell'eddy è circa 2/3-1/3 il diametro dell'aggregato, si verifica quanto appena descritto [53]. In Figura 3.10 è riportato uno schema generico del fenomeno.

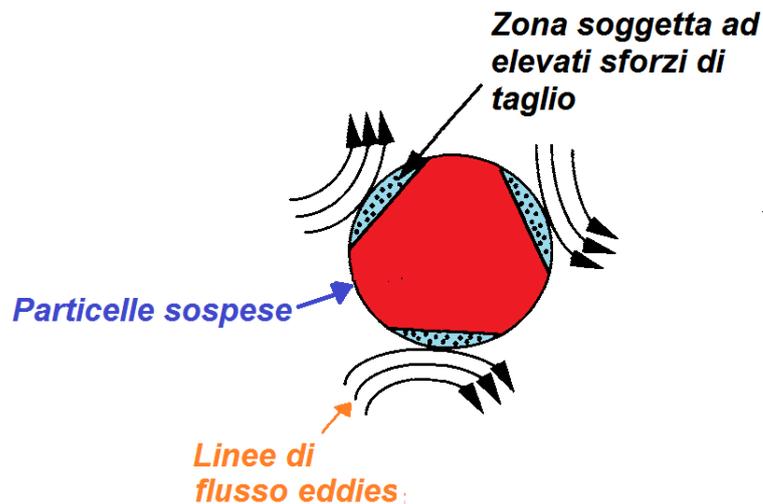


Figura 3.10 interazione tra particelle e eddies con dimensioni comparabili tra loro.
Tratto da [53] con modifiche.

Sulla base di quanto illustrato fino ad ora, si può affermare che il micromixing introduce delle forze, all'interno del sistema, che tendono a rompere gli aggregati facendo tendere la loro dimensione alla dimensione di Kolmogorov (η); questo fenomeno avviene però in competizione con tutti i processi, che hanno come fine la crescita degli aggregati. Tali fenomeni nel caso di un bioreattore sono essenzialmente: la crescita del numero di cellule e la produzione di materiale polimerico extracellulare (EPS).

In conclusione, da un punto di vista puramente qualitativo, è possibile affermare che le interazioni fluido/particella, generate dai vari regimi idrodinamici, vanno viste su una scala dimensionale; in particolare si ha che:

- particelle più piccole di η si trovano in regime viscoso e sono in grado di crescere aumentando di dimensione;

- particelle che raggiungono dimensioni comparabili a η si trovano in regime inerziale; in queste condizioni, le interazioni fluido/particella e particella/particella sono tali da portare alla distruzione dell'aggregato.

PARTE II: PARTE SPERIMENTALE

4 OBIETTIVI, PREPARAZIONI, PROCEDURE E METODI ANALITICI

Quanto riportato fino ad ora ha come obiettivo quello di fornire un background per poter spiegare in maniera chiara e comprensibile i risultati delle varie prove sperimentali svolte.

4.1 OBIETTIVI DEL LAVORO

L'obiettivo del presente lavoro è quello di andare a valutare come le condizioni idrodinamiche del sistema influenzano, a livello di produttività e morfologia delle specie batteriche, il processo di FA condotto attraverso prove batch e impiegando come substrato la frazione organica dei rifiuti mercatali (OMW). In particolare questo lavoro di tesi prevede:

- Lo studio delle condizioni idrodinamiche del sistema attraverso la valutazione dei tempi di circolazione e di miscelazione per differenti configurazioni del reattore;
- La valutazione degli effetti della miscelazione, effettuata a diversi valori di rpm, sulle prestazioni del sistema in termini di produttività di biogas. In particolare queste prove sono state condotte sia nel caso del bio-H₂ che del bio-CH₄;
- La valutazione degli effetti della miscelazione, effettuata a diversi valori di rpm, sulla morfologia dei granuli microbici confrontando la loro dimensioni con quella della microscala di Kolmogorov;
- La valutazione degli effetti dell'aggiunta di Fe⁰ al sistema fermentativo, allo scopo di quantificare i benefici del ZVI in termini di produttività, nel caso del bio-H₂.

4.2 METODI ANALITICI

Allo scopo di comprendere le procedure sperimentali adottate durante la fase di sperimentazione, qui di seguito sono riportati e descritti nel dettaglio tutti i metodi analitici impiegati durante la fase di sperimentazione.

4.2.1 MISURA DI SOLIDI VOLATILI (VS) E SOLIDI TOTALI (TS)

La procedura per la determinazione del valore di TS e VS per un generico campione è stata eseguita secondo *Metodo 1684* pubblicato dall'EPA [68]. Qui di seguito è riportata la procedura operativa adottata.

4.2.1.1 MISURA SOLIDI TOTALI

Un campione di 10 mL viene prelevato, mediante cilindro graduato, e posto all'interno di un crogiolo di materiale refrattario di cui si conosce la tara (T). Il peso del crogiolo contenente il campione viene registrato attraverso una bilancia analitica modello E42S (Gibertini Elettronica, Novate Milanese, Italia); il tutto viene posto in stufa alla temperatura di 105°C per 24 ore. Trascorso il tempo prestabilito il campione viene prelevato dalla stufa e inserito in un essiccatore per raffreddare; una volta raggiunta la temperatura ambiente, il sistema viene nuovamente pesato e si registra tale valore (P₁). La formula da utilizzare per ricavare i TS espressi in g/L è sotto riportata.

$$TS [g/L] = \frac{P_1 - T [g]}{\text{Volume Campione [ml]}} \cdot 1000 \quad (4.1)$$

4.2.1.2 MISURA SOLIDI VOLATILI

Il campione a seguito del trattamento per la misurazione dei TS, per valutare i VS viene posto in muffola per 6 ore alla temperatura di 550°C. Terminata la calcinazione il campione viene posto in un essiccatore per raffreddare; una volta raggiunta la temperatura ambiente, il sistema viene nuovamente pesato, tramite bilancia analitica, e si registra tale valore (P_2). La formula da utilizzare per ricavare i VS espressi in g/l è sotto riportata.

$$VS [g/l] = \frac{P_1 - P_2 [g]}{\text{Volume Campione [ml]}} \cdot 1000 \quad (4.2)$$

4.2.2 MISURA DI PH

La misura del pH è effettuata in continuo attraverso l'hardware implementato nel Minifors I (Infors HT, Bottmingen, Svizzera), e gestito tramite software IRIS V5 impiegando come elettrodo il modello 405-DPAS-SC-K8S/225 (Mettler Toledo S.p.A, Novate Milanese, Italia). Per misure in discontinuo e per la misurazione dell'andamento del pH nelle prove idrodinamiche, viene impiegato un pH-metro Consort P903 (Consort, Turnhout, Belgio) munito di elettrodo pH.

4.2.3 MISURA DEL ORP

La misura del potenziale Red-Ox viene effettuata in continuo attraverso un misuratore Red-Ox modello M99220 (Infors HT, Bottmingen, Svizzera), munito di elettrodo Pt4805-SC-DPAS-K8S/225 (Mettler Toledo S.p.A, Novate Milanese, Italia).

4.2.4 MISURA DEL GAS PRODOTTO

La misura del gas prodotto viene fatta in continuo mediante il contatore Ritter Milligascounter modello MGC-1 v3.2 (Dr.-Ing. RITTER Apparatebau GmbH & Co. KG, Bochum, Germania); questa apparecchiatura permette di misurare il volume di gas prodotte e la velocità di produzione di biogas. Le caratteristiche di questa apparecchiatura sono le seguenti:

- Portata minima rilevabile 1mL/h;
- Portata massima rilevabile 1L/h;
- Risoluzione 3mL;
- Accuratezza $\pm 3\%$.

Il sistema è posizionato all'interno dell'apparato sperimentale in serie dopo un battente idrostatico che permette di mantenere in pressione il reattore. Un ulteriore gasometro può essere posizionato, in serie al primo, interponendovi un assorbitore di CO₂, costituito da una soluzione di NaOH 3M, allo scopo di monitorare il gas scorporato della sua frazione di CO₂.

4.2.5 MISURA DI COMPOSIZIONE DEL GAS PRODOTTO

La composizione del gas prodotto, raccolto in sacche di plastica del volume di 10 litri e munite di valvola, è valutata off-line per mezzo di un gas cromatografo Micro-GC modello CP-4900 (Varian, Palo Alto, USA). Lo strumento è equipaggiato con due colonne operanti in diverse condizioni:

- una colonna poroplot U per la misurazione della CO₂, lavorante a 85°C e 200kPa di pressione impiegando argon come carrier;
- una colonna con meccanismo ad esclusione dimensionale per la misurazione di CH₄, H₂, O₂ e N₂, operante a 95°C e 200kPa di pressione impiegando elio come carrier.

Lo strumento impiega come rivelatore un TCD.

4.2.6 MISURA DI VISCOSITÀ

La misurazione della viscosità dinamica è effettuata alla temperatura di 35°C, impiegando un viscosimetro Brookfield modello KU-2 (Brookfield Engineering Laboratories INC, Middleboro, USA). La misura viene effettuata prelevando mezza pinta di campione (circa 237 mL) e immergendovi il sensore rotante del viscosimetro, che restituisce un valore di viscosità dinamica in cP.

4.2.7 ANALISI DI IMMAGINI

L'osservazione dei granuli microbici e la stima della loro dimensione è effettuata attraverso un microscopio ottico Olympus BH-2 (Olympus Italia S.r.l, Segrate, Italia) con il quale si effettuano fotografie degli aggregati microbici. La stima delle loro dimensioni, è successivamente effettuata analizzando le fotografie attraverso il software open-source ImageJ.

4.3 TRATTAMENTO DEI DATI SPERIMENTALI

Qui di seguito sono elencati le equazioni impiegate per il trattamento dei dati sperimentali.

4.3.1 ANALISI DELLE CURVE RELATIVE ALLA PRODUZIONE DI BIOGAS

Per analizzare i dati relativi alle varie prove di produzione di biogas, si è deciso di utilizzare l'equazione di Gompertz in quanto adatta alla descrizione di fenomeni di tipo saturativo come quelli studiati in sede di sperimentazione. Tale equazione ha la seguente forma:

$$G = G_{max} \cdot e^{-e^{\left[\frac{R_{max}}{G_{max}}(\lambda-t)+1\right]}} \quad (4.3)$$

Dove:

- G è la produzione totale di gas [NL/L];
- G_{max} è la produzione massima di biogas [NL/L];
- R_{max} è la velocità di produzione massima [NL/L·h];
- λ è la durata della fase di latenza [h];
- t è il tempo di avanzamento della prova [h];

Tale equazione può trovarsi anche scritta in forma parametrica come segue:

$$y = a \cdot e^{-e^{-\left[\frac{(x-x_0)}{b}\right]}} \quad (4.4)$$

Dove:

- $G=y$ [NL/L];
- $G_{max}=a$ [NL/L];
- $R_{max}= a/(\exp(1) \cdot b)$ [NL/L·h];
- $\lambda=x_0-b$ [h].

4.3.2 ANALISI STATISTICA DEI DATI

I parametri statistici impiegati in sede di calcolo per l'analisi dei dati sperimentali sono i seguenti:

- Calcolo della media: data una serie di dati $\{x_i\}$ con $i=1 \dots N$, la media di tali valori \bar{x} è definita come segue.

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^N x_i}{N} \quad (4.5)$$

- Calcolo della deviazione standard: la varianza di una misura è definita come segue.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N}} \quad (4.6)$$

- Calcolo della propagazione degli errori nella somma: nel caso di una somma l'incertezza del risultato di tale somma è data dalla somma delle incertezze dei singoli addendi.

4.3.3 ANALISI DEI DATI PROVE DI MISCELAZIONE

Al fine di rendere confrontabili i risultati ottenuti durante le prove idrodinamiche è necessario normalizzare i dati ottenuti da ogni prova. Di seguito è riportata la formula utilizzata:

$$X_i' = \frac{X_i - X_0}{X_\infty - X_0} \quad (4.7)$$

4.4 PROCEDURE SPERIMENTALI

Qui di seguito sono riportate nel dettaglio le varie procedure sperimentali adottate per ognuna delle prove effettuate in fase di sperimentazione.

4.4.1 PROVE IDRODINAMICHE

Questa campagna di prove è stata effettuata allo scopo di valutare i tempi di circolazione e di miscelazione all'interno del reattore operando a vari regimi di agitazione e utilizzando differenti tipologie di agitatore. Tali misurazioni sono state effettuate, in acqua, utilizzando uno dei metodi descritti nel paragrafo 3.2.5.3; il metodo impiegato sfrutta la misurazione di variazione di pH per quantificare τ_m e τ_c e utilizza come tracciante una soluzione di NaOH a concentrazione 2M.

Qui di seguito sono riportati nel dettaglio la configurazione dell'apparato sperimentale e la procedura adottata per le prove.

4.4.1.1 APPARATO SPERIMENTALE

Le prove idrodinamiche sono state condotte all'interno di un reattore Minifors I (Infors HT, Bottmingen, Svizzera) avente capacità totale di 2,5 litri e operando con un volume effettivo di 1,5 litri. Gli agitatori impiegati (Figura 4.1) sono due: un elica marina e una pitch blade turbine con tre palette inclinate a 45° (PBT-45°).

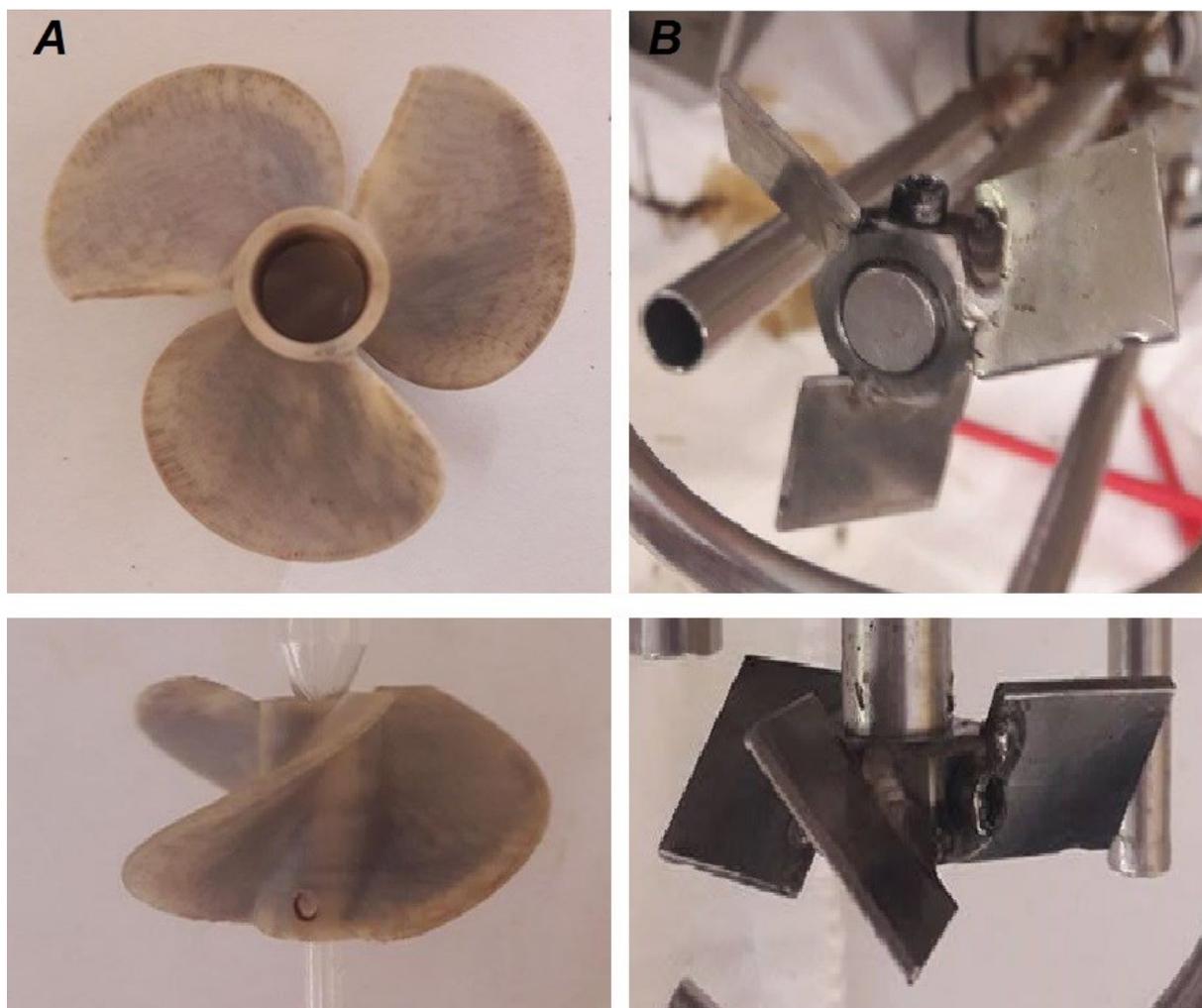


Figura 4.1 Agitatori impiegati nelle prove idrodinamiche: elica marina (A) e PBT-45° (B)

Le caratteristiche principali degli agitatori impiegati sono riportate in Tabella 4.1.

Tabella 4.1 Caratteristiche degli agitatori

Agitatore	D (mm)	n° pale	Np	Nq	Materiale
Elica marina	55	3	0,7	0,79	ABS
PBT-45°	55	3	1,27	0,79	AISI-304

La misurazione dell'andamento del pH nel corso delle prove è stata effettuata con un pHmetro Consort P903 (Consort, Turnhout, Belgio) munito di un elettrodo pH. I reagenti impiegati sono una soluzione di NaOH a concentrazione 2M e una di HCl a concentrazione 2M.

4.4.1.2 PROCEDURA SPERIMENTALE

Il reattore viene assemblato e riempito con 1,5 litri di acqua deionizzata e portato ad una temperatura di 35°C. Le prove per la misurazione di τ_m e τ_c vengono eseguite a tre diverse intensità di agitazione: 70, 120 e 200 rpm e per le due tipologie di agitatore sopra descritte. Per ognuna di queste velocità, le misurazioni sono state effettuate posizionando l'elettrodo in tre punti all'interno del volume del reattore allo scopo di ricavare un tempo medio di circolazione all'interno del sistema agitato; in Figura 4.2 sono riportate le tre configurazioni con la precisa posizione dell'elettrodo (parametro *probe*) all'interno del vessel.

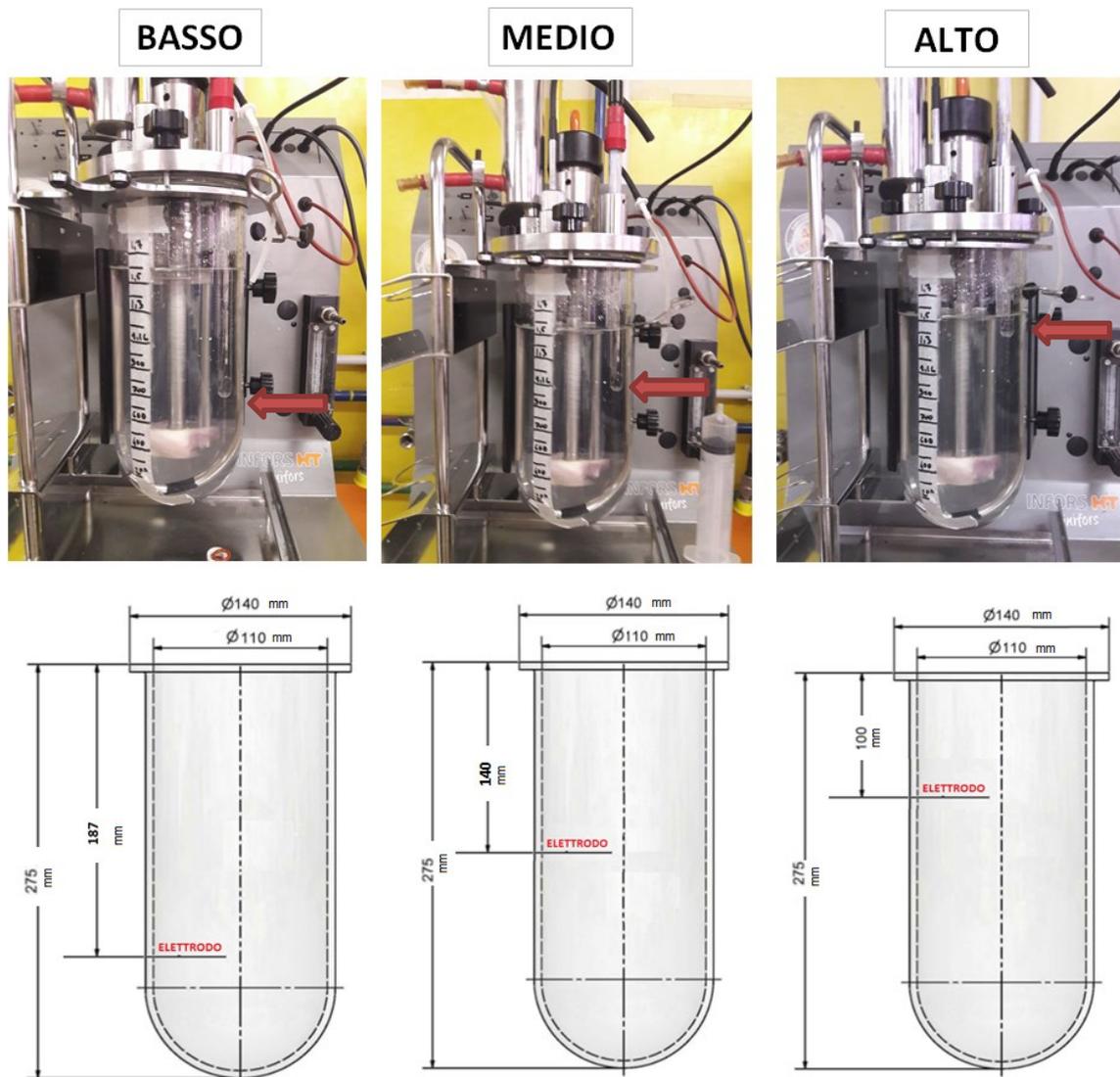


Figura 4.2 Configurazioni prove idrodinamiche: posizione elettrodo di misura

La procedura operativa di seguito riportata è valida per ognuna delle configurazioni del sistema: *agitatore/velocità agitatore/posizione elettrodo*.

Il reattore riempito di acqua e portato a 35°C viene agitato ad un determinato valore di rpm, il pH del sistema viene portato a pH=3 aggiungendo HCl 2M; una volta stabilizzatosi il valore di pH, 5 mL di NaOH 2M vengono iniettati nel minor tempo possibile, attraverso un tubicino situato in prossimità dell'agitatore. Nell'istante in cui si comincia ad iniettare la soda, si fa partire la registrazione dei dati con il pHmetro, impostando un tempo di campionamento di 1 secondo. La raccolta dati termina quando il pH è stabile da almeno 30 secondi. Terminata la prova, si riporta il pH del sistema nuovamente a pH=3 aggiungendo HCl 2M, si preleva dal reattore un volume necessario a riportare il volume complessivo a 1,5 litri e il sistema è pronto per poter effettuare una nuova misurazione. Prima di ogni nuova prova è necessario scaricare i dati raccolti con il pHmetro.

Al termine di ogni ciclo di prove caratterizzate dalla configurazione *agitatore/velocità agitatore/posizione elettrodo*, è opportuno rinnovare completamente il volume di reattore per evitare che un eccessivo accumulo di prodotti derivanti dalla reazione di neutralizzazione vada a interferire con la lettura dell'elettrodo.

Per la valutazione del tempo di miscelazione si assume che il sistema sia perfettamente miscelato quando il valore di pH registrato e normalizzato discosta dal valore stazionario di $\pm 5\%$.

4.4.2 PROVE DI FERMENTAZIONE

Tutte le prove di fermentazione sono state condotte all'interno del reattore Minifors I (Infors HT, Bottmingen, Svizzera) avente capacità totale di 2,5 litri, operando con un volume effettivo di 1,5 litri e lavorando ad una temperatura di 35°C. Tutte le prove utilizzano come agitatore una PBT-45° con tre pale e prevedono la presenza di un rompicrosta, un turbina Rushton a sei pale, posizionato all'altezza del pelo libero del liquido. Inoltre il sistema è fornito di:

- un elettrodo per la misura del pH 405-DPAS-SC-K8S/225 (Mettler Toledo S.pA, Novate Milanese, Italia), collegato ad un controllore ON/OFF che comanda due pompe peristaltiche rispettivamente collegate ad una soluzione di 2M di NaOH e HCl;
- un elettrodo per la misurazione del ORP Pt4805-SC-DPAS-K8S/225 (Mettler Toledo S.pA, Novate Milanese, Italia) che permette solamente di monitorare l'andamento del potenziale Red-Ox durante il processo di fermentazione;
- una termocoppia per il monitoraggio della temperatura, il quale avviene per mezzo di un controllore ON/OFF che aziona una camicia esterna al vessel.

Qui di seguito è riportata una foto del reattore a titolo di esempio (Figura 4.3)



Figura 4.3 Reattore Minifors I

La configurazione del sistema sperimentale, dal punto di vista delle apparecchiature impiegate è la stessa per tutte le prove di fermentazione, l'unica cosa che vengono cambiati sono i parametri operativi. In figura 4.4 è rappresentato uno schema semplificato dell'apparato sperimentale.

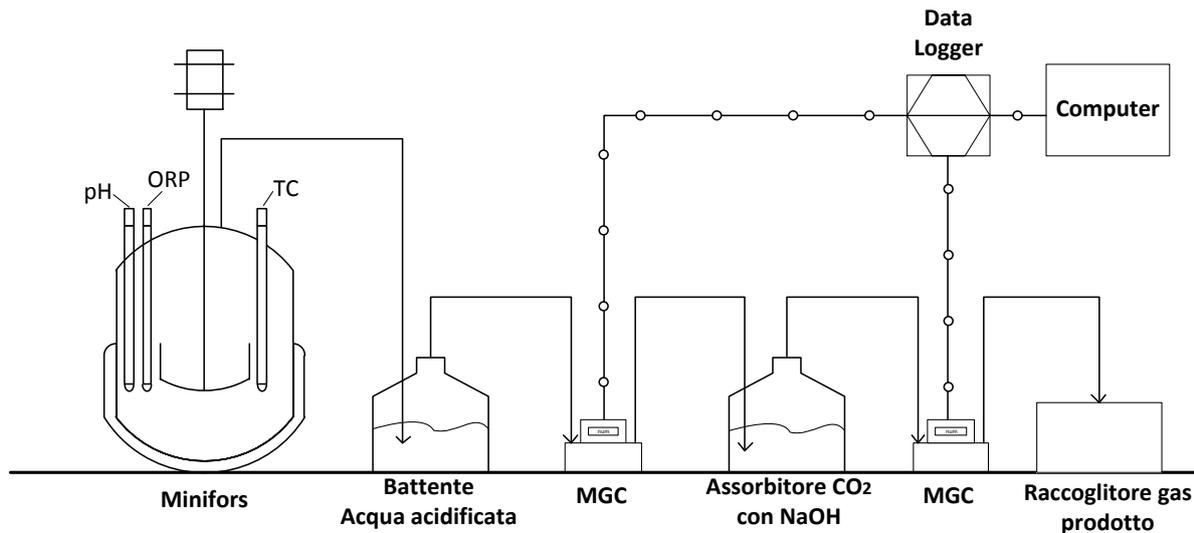


Figura 4.4 Schema apparato sperimentale

In tale configurazione sono presenti nel seguente ordine:

- il reattore, equipaggiato con i controlli sopra menzionati;
- un battente di acqua acidificata, per evitare che la CO₂ si assorba, che serve a mantenere una leggera sovrappressione all'interno del reattore;
- un primo milligascounter, che permette di misurare la totalità del gas prodotto dal sistema di fermentazione;
- un assorbitore di CO₂ contenente NaOH 3M, che permette di assorbire la CO₂ presente nel flusso gassoso;
- un secondo milligascounter, che permette di misurare la portata di gas prodotto, scorporata dalla CO₂;
- una busta di plastica munita di valvola per la raccolta del gas prodotto.

Tali prove di fermentazione sono tre e sono di seguito elencate:

- 1) Produzione di bio-H₂ a differenti regimi di agitazione, allo scopo di valutare l'influenza delle condizioni idrodinamiche sulla produttività del sistema in termini di H₂ e sulle dimensioni dei granuli batterici;
- 2) Produzione di bio-H₂ ad un determinato valore di rpm, allo scopo di valutare l'effetto dell'aggiunta al sistema fermentativo di ZVI sulla produzione di H₂;
- 3) Produzione di bio-CH₄ a differenti regimi di agitazione, allo scopo di valutare l'influenza delle condizioni idrodinamiche sulla produttività del sistema in termini di CH₄ e sulle dimensioni dei granuli batterici.

La procedura sperimentale per queste tre prove verrà descritta nel dettaglio nei prossimi paragrafi, prima verranno riportate nel dettaglio le procedure per la preparazione degli inoculi e del substrato impiegati per preparare il brodo di fermentazione.

4.4.2.1 INOCULO

A seconda della prova di fermentazione effettuata, l'inoculo impiegato è differente e di conseguenza le operazioni eseguite sono differenti. Qui di seguito sono riportate le procedure per la preparazione dell'inoculo per la prova di produzione di bio-H₂ e per la prova di produzione di bio-CH₄.

4.4.2.1.1 INOCULO PROVE DI PRODUZIONE DI BIO-H₂

Per tali prove come inoculo viene impiegato un consorzio di Hydrogen Producing Bateria (HPB). Questo inoculo, ricco in HPB, è ottenuto trattando un campione di brodo prelevato dal reattore CHEMAP con HCl, fino a pH 3 per circa 24 h a 35°C, allo scopo di eliminare tutti i possibili batteri metanigeni presenti al suo interno. Durante questo processo sopravvivono solo gli HPB, in particolare quelli appartenenti alla specie *Clostridium spp.*, in quanto presentano al loro interno delle endospore che vengono rilasciate quando le condizioni dell'ambiente diventano sfavorevoli alla sopravvivenza. In figura 4.5 si riporta una foto in cui sono messe in evidenza le endospore presenti all'interno dei microrganismi.

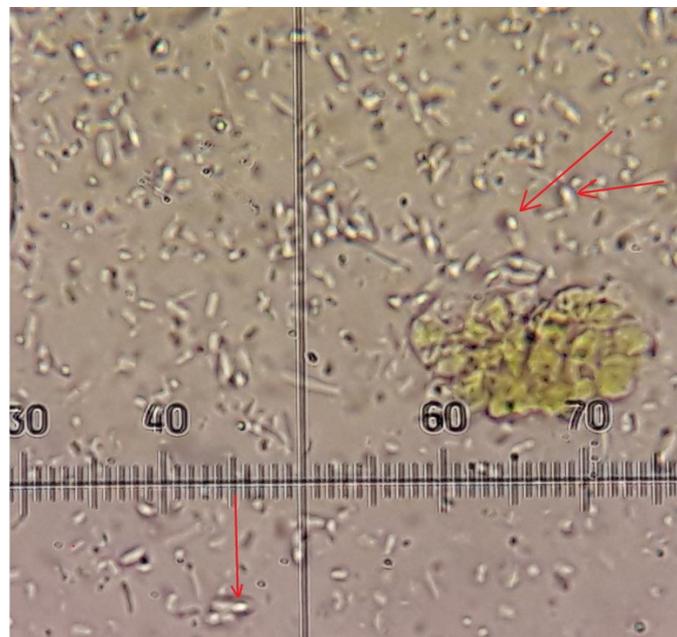


Figura 4.5 Inoculo HPB: endospore

Il campione così trattato è poi posto all'interno del Minifors in presenza di glucosio per una concentrazione di 6g/l allo scopo di incrementare la biomassa al suo interno da utilizzare successivamente come inoculo per le varie prove di fermentazione. Questa fase avviene a 35°C operando con un volume di 1,5 litri e a 200rpm ed ha una durata di 3 giorni. Terminata la fase di crescita della biomassa l'inoculo è conservato alla temperatura di 4°C fino al suo utilizzo. Questa fase di preparazione dell'inoculo prende il nome di pre-coltura; in figura 4.6 sono riportate due immagini rappresentanti l'inoculo prima e dopo il processo di pre-coltura. Come è possibile osservare si passa da una situazione in cui sono presenti le sole spore (A) a una situazione in cui le spore sono germinate e la biofase è cresciuta (B).

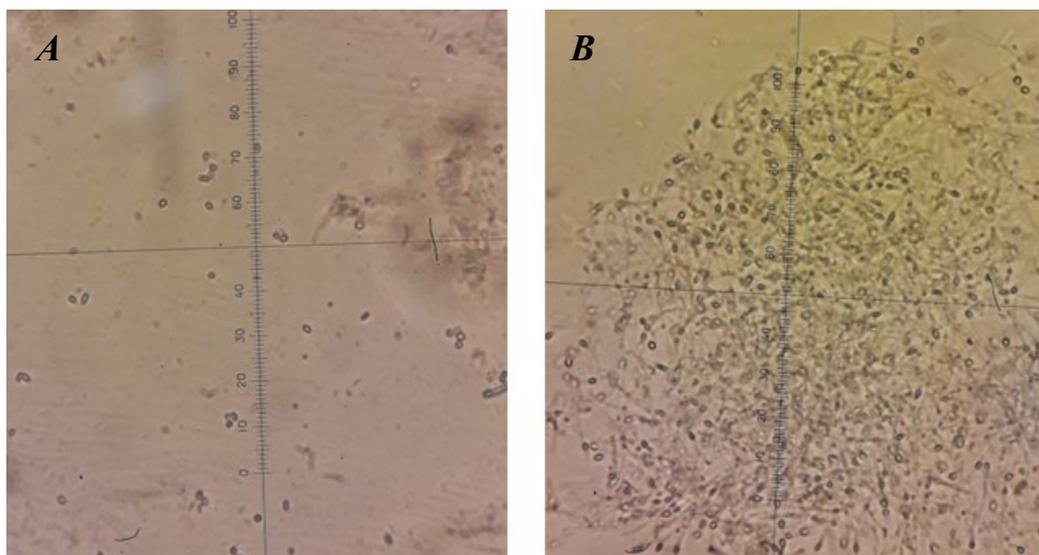


Figura 4.6 Inoculo prima (A) e dopo (B) la fase di pre-coltura

In tabella 4.2 sono riportati i dati relativi all'inoculo di HPB prima e dopo la fase di incremento di biomassa.

Tabella 4.2 Concentrazione biomassa inoculo HPB prima e dopo fase di crescita

	TS (g/L)	VS (g/L)
Inoculo prima della fase di crescita in glucosio	2,20 ± 0,25	1,04 ± 0,21
Inoculo dopo la fase di crescita in glucosio	6,62 ± 0,13	3,34 ± 0,29

Sulla base dei valori riportati in tabella 4.2 l'aumento di VS all'interno del brodo di fermentazione è correlabile con un incremento di biomassa. Il brodo di fermentazione ottenuto da questo processo è quello che viene impiegato in tutte le prove di produzione di bio-H₂.

4.4.2.1.2 INOCULO PROVE DI PRODUZIONE DI BIO-CH₄

L'inoculo per le prove di produzione di Bio-CH₄ è costituito da letame bovino e conservato tal quale (t.q.) all'interno di appositi contenitori alla temperatura di 4°C. Il letame è stato prelevato presso una fattoria in località Borgata Casaretto, Brozolo.

In figura 4.7 è rappresentato il luogo di raccolta dell'inoculo.



Figura 4.7 Raccolta inoculo per produzione di Bio-CH₄, presso Borgata Casaretto, Brozolo.

Per essere impiegato nelle prove di fermentazione tale inoculo richiede un pretrattamento che ha il fine di eliminare i residui di paglia presenti nel letame bovino derivanti dal processo di digestione. A tal proposito, 500g di letame t.q. vengono pesati su una bilancia tecnica 2200P (Tecnovetro, Monza Italia) e diluiti con acqua del rubinetto in rapporto 1:1; il liquame che si ottiene viene fatto passare all'interno di un setaccio di acciaio con maglie di 2mm allo scopo di eliminare la paglia in sospensione. Il filtrato viene raccolto in un contenitore, all'interno del quale durante l'operazione di setaccio veniva flussato azoto in modo da ridurre al minimo il contatto tra inoculo e ossigeno, viene sigillato e posto in un bagno termostatico per 24h a 35°C allo scopo di riattivare i microrganismi presenti al suo interno. Al termine di tale processo, l'inoculo è pronto per essere inserito all'interno del sistema fermentativo.

In tabella 4.3 sono riportati i valori di TS e VS per il letame t.q. e per il letame setacciato.

Tabella 4.3 TS e VS per letame bovino trattato e non trattato

	TS (g/L)	VS (g/L)
Letame tal quale	130,76 ± 5,56	117,15 ± 5,54
Letame setacciato	75,31 ± 2,13	55,54 ± 3,12

4.4.2.2 SUBSTRATO

Il substrato è stato preparato a partire dalla frazione organica dei rifiuti mercatali (OMW) raccolta presso il mercato di C.so Racconigi (Torino, Italia). Sono stati raccolti svariati campioni cercando di ottenere una composizione il più possibile fedele a quella di un generico rifiuto di natura mercatale. In figura 4.8 è riportato un esempio di quanto affermato.



Figura 4.8 Composizione di un ipotetico OMW

Le varie componenti dei campioni raccolti sono state lavate con acqua allo scopo di rimuovere polvere ed eventuali altre impurità; una volta asciugate sono state pesate per tipologia utilizzando una bilancia tecnica. Una volta registrato il peso di ogni tipologia di rifiuto che compone l'OMW, i campioni sono stati affettati finemente e frullati con un frullatore Imetec modello 84402 (Imetec, Azzano San Paolo, Italia). Per evitare di aggiungere acqua durante tale operazione, che causerebbe una riduzione di TS e VS, si è cominciato a frullare i rifiuti con il contenuto maggiore di acqua, tale frazione è stata poi utilizzata per i campioni più fibrosi allo scopo di facilitare l'operazione di comminazione e omogeneizzazione del rifiuto. Il composto ottenuto a termine di tale processo è stato filtrato, su un setaccio metallico con maglie da 2 mm, allo scopo di eliminare eventuali solidi sospesi non triturati che andrebbero a creare problemi di miscelazione durante il processo fermentativo.

La composizione dettagliata del substrato utilizzato è riportata in Appendice A.

Qui di seguito sono riportate rispettivamente:

- La composizione percentuale del substrato espressa in termini di contenuto d'acqua, frazione organica e frazione minerale (Figura 4.9)

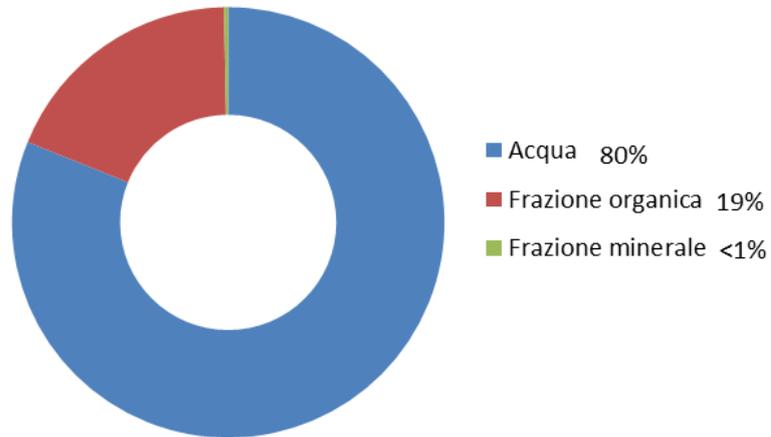


Figura 4.9 Composizione substrato espressa in termini di acqua, frazione organica e frazione minerale.

- La composizione della frazione organica di substrato su base secca, cioè senza considerare l'acqua (Figura 4.10).

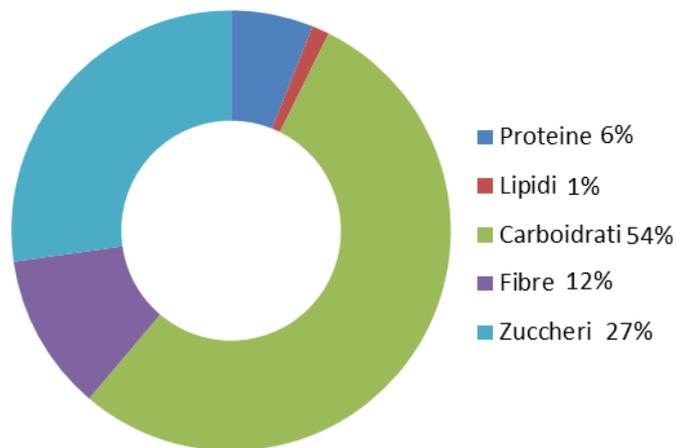


Figura 4.10 Composizione frazione organica substrato su base secca.

- La composizione della frazione minerale di substrato su base secca (Figura 4.11)

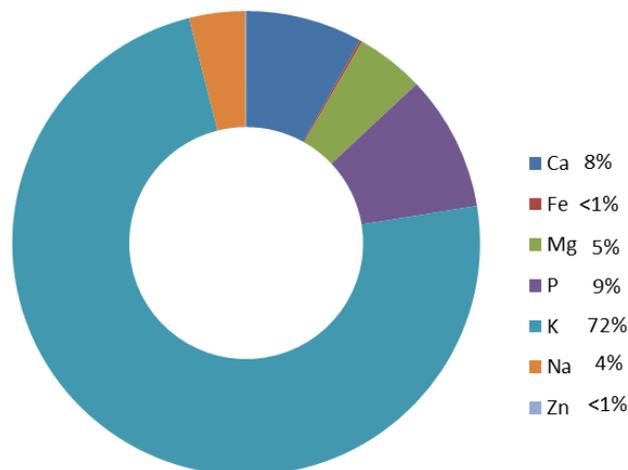


Figura 4.9 Composizione frazione minerale substrato su base secca.

Il substrato così ottenuto non può ancora essere utilizzato in quanto necessita di un pretrattamento che ha come obiettivo quello di andare a degradare le strutture complesse, presenti all'interno del substrato, per rendere più accessibili le molecole di substrato ai microorganismi e ridurre la durata del processo fermentativo. Tale pretrattamento, di natura basica, consiste nel portare a pH=12 il substrato aggiungendovi gradualmente, sotto decisa agitazione, del NaOH in perle misurando il pH costantemente; una volta raggiunto il valore necessario di pH si ferma l'agitazione e si lascia il substrato per 24 ore a 35°C. Trascorso tale periodo di tempo, il substrato viene neutralizzato fino a pH=7 aggiungendovi, sotto decisa agitazione, una soluzione di HCl 6M. Una volta neutralizzato il substrato, questo va conservato a 4°C fino al suo impiego nelle prove di fermentazione.

Il substrato ottenuto secondo questa procedura è stato impiegato per le prove di produzione di bio-H₂.

In tabella 4.4 sono riportati i valori di TS e VS per il substrato pretrattato e non.

Tabella 4.4 VS e TS per substrato pretrattato e non pretrattato

	TS (g/L)	VS (g/L)
Substrato non pretrattato	113,00 ± 0,83	107,20 ± 0,92
Substrato pretrattato	115,31 ± 1,15	103,81 ± 1,53

Il substrato per le prove di produzione di bio-CH₄, è stato ottenuto idrolizzando il substrato pretrattato; la sua preparazione è stata fatta all'interno di una spinning-flask in cui sono stati inseriti il substrato pretrattato e il 10% (v/v) di un inoculo ricco in HPB. Il sistema è stato poi posto in un bagno termostatico alla temperatura di 35°C e agitato due volte al giorno per favorire l'allontanamento dell'idrogeno dal sistema; la durata del processo idrolitico è stata di sei giorni. La composizione in termini di VS e TS del substrato idrolizzato è sotto riportata in tabella 4.5.

Tabella 4.5 VS e TS per substrato pretrattato e idrolizzato

	TS (g/L)	VS (g/L)
Substrato pretrattato	115,31 ± 1,15	103,81 ± 1,53
Substrato idrolizzato	104,51 ± 1,01	90,61 ± 1,36

Questo pretrattamento ulteriore è necessario in quanto, in questo modo, il substrato che si fornisce al sistema inoculato con HCB, è arricchito in VFA e la fase di produzione di idrogeno è praticamente

trascurabile. Tale substrato idrolizzato prima di essere impiegato nel processo fermentativo per la produzione di bio-CH₄ va neutralizzato, in quanto a seguito del processo idrolitico presenta un pH pari a 4.

4.4.3 PROVA DI FERMENTAZIONE: PRODUZIONE DI BIO-H₂ A DIVERSI REGIMI IDRODINAMICI

Questa tipologia di prova di fermentazione è stata condotta operando in modalità batch, all'interno del Minifors con un volume utile di 1,5 litri e in condizioni di mesofile (35°C). Questa parte sperimentale si costituisce di tre prove di fermentazione eseguite a tre differenti velocità di agitazione: 200 rpm, 500 rpm e 800 rpm. Qui di seguito sono riportate le procedure operative per ognuna delle tre prove.

4.4.3.1 PROVA A 200 RPM

All'interno del reattore vengono inseriti l'inoculo, con una concentrazione pari al 10% (v/v) del volume operativo (corrispondenti a 150 mL), e il substrato pretrattato fino a raggiungere un volume di 1,5L. Come inoculo è stato impiegato quello descritto nel paragrafo 4.4.2.1.1, dopo averlo preventivamente riportato a temperatura ambiente. Una volta riempito il reattore, al fine di garantire l'anaerobicità del processo fermentativo, si fa fluire N₂ all'interno del sistema per circa 10 minuti. Terminata l'operazione di flussaggio, si imposta la velocità di agitazione del sistema ad un valore di 200 rpm e si cominciano a registrare i dati di produttività. La registrazione avviene per mezzo dei due Ritter milligascounter posti in serie che, che permettono di valutare la produttività cumulativa e quella di solo bio-H₂. Attraverso i gasometri è inoltre possibile monitorare la velocità di produzione espressa in (L/h); sulla base di tale parametro, si considera la prova terminata quando il suo valore scende al di sotto di 0.001 L/h. Terminata la prova per mezzo di una pompa peristaltica, si preleva il brodo di fermentazione esausto facendo attenzione a lasciare il 10% (v/v) di brodo che fungerà da inoculo per la seconda prova.

Il brodo esausto prelevato viene analizzato e successivamente filtrato su un setaccio con maglie da 0,5 mm; una volta terminata questa operazione utilizzando il microscopio, si vanno a fare delle fotografie del filtrato e del ritentato, per valutare le dimensioni dei granuli microbici formati durante il processo fermentativo.

Solo la prima prova di questo set sperimentale presenta una procedura di avvio differente, le altre due prove condotte a 500 rpm e 800 rpm presentano invece la medesima procedura operativa.

4.4.3.2 PROVA A 500 RPM

In questa prova, l'inoculo è già presente all'interno del reattore, in quanto è rappresentato dai 150 mL lasciati intenzionalmente dalla prova precedente condotta a 200 rpm. A tale volume si aggiunge substrato pretrattato fino al raggiungimento del volume operativo di 1,5L. Al fine di ripristinare le condizioni di anaerobicità del processo, viene fatto fluire N₂ per 10 minuti all'interno del reattore; terminata questa operazione si imposta la velocità di agitazione a 500 rpm e si cominciano a registrare i dati di produttività. La registrazione avviene per mezzo dei due Ritter milligascounter. Attraverso i gasometri è inoltre possibile monitorare la velocità di produzione espressa in (L/h); sulla base di tale parametro, si considera la prova terminata quando il suo valore scende al di sotto di 0.001 L/h. Terminata la prova per mezzo di una pompa peristaltica, si preleva il brodo di fermentazione esausto facendo attenzione a lasciare il 10% (v/v) di brodo che fungerà da inoculo per la successiva prova.

Anche in questo caso il brodo esausto prelevato viene analizzato e successivamente filtrato su un setaccio con maglie da 0,5 mm; una volta terminata questa operazione utilizzando il microscopio, si

vanno a fare delle fotografie del filtrato e del ritentato, per valutare le dimensioni dei granuli microbici formati durante il processo fermentativo.

4.4.3.3 PROVA A 800 RPM

La procedura operativa per questa prova è identica alla prova condotta a 500 rpm, l'unica variazione è legata al regime di agitazione che in questo caso viene impostato a 800 rpm; inoltre anche qui l'inoculo è rappresentato dai 150 mL di brodo provenienti dalla prova condotta a 500 rpm.

Anche qui la prova si considera conclusa quando la velocità di produzione scende al di sotto di 0.001 L/h e il brodo esausto prelevato viene filtrato su un setaccio con maglie da 0,5 mm; una volta terminata questa operazione utilizzando il microscopio, si vanno a fare delle fotografie del filtrato e del ritentato, per valutare le dimensioni dei granuli microbici formati durante il processo fermentativo.

Al termine delle tre prove, le immagini ricavate al microscopio dal brodo esausto di ogni test sono state elaborate con il software open-source ImageJ per valutare la dimensione media (D_m) dei granuli formati durante il processo fermentativo.

4.4.4 PROVA DI FERMENTAZIONE: PRODUZIONE DI BIO- H_2 IN PRESENZA DI ZVI

Questa tipologia di prova di fermentazione è stata condotta operando in modalità batch, all'interno del Minifors con un volume utile di 1,5 litri e in condizioni di mesofile (35°C). Questa parte sperimentale è costituita da quattro prove di fermentazione eseguite tutte a 500 rpm, con lo scopo di valutare e quantificare i benefici derivanti dall'aggiunta di ZVI, al sistema fermentativo, in termini di produttività, di bio- H_2 .

Delle quattro prove effettuate, le prime due si svolgono in assenza di ZVI, al fine di far adattare l'inoculo al substrato impiegato e fornire dei dati di produttività di bio- H_2 da confrontare con i dati dei restanti due test svolti in presenza di ferro zero valente.

La procedura di seguito descritta è valida per ognuna delle quattro, fatta eccezione per:

- la prima prova di fermentazione dove come inoculo viene impiegato quello descritto nel paragrafo 4.4.2.1, che dopo essere stato preventivamente riportato a temperatura ambiente, viene inserito nel reattore con una percentuale in volume pari al 10% (v/v);
- la terza prova di fermentazione dove durante la fase di ripristino con substrato fresco, viene inoltre aggiunta una certa quantità di ZVI.

Per il resto la generica procedura operativa è la seguente.

4.4.4.1 PROCEDURA OPERATIVA

Al reattore contenente l'inoculo (10% (v/v)) proveniente da una prova precedente, o da quello preparato secondo quanto illustrato nel paragrafo 4.3.2.1.1, si aggiunge substrato pretrattato fino al raggiungimento del volume operativo di 1,5 L. Al fine di garantire le condizioni di anaerobicità del processo, viene fatto fluire N_2 per 10 minuti all'interno del reattore; terminata questa operazione si imposta la velocità di agitazione a 200 rpm e si cominciano a registrare i dati di produttività. La registrazione avviene per mezzo dei due ritter milligascounter posti in serie che, che permettono di valutare la produttività cumulativa e quella di solo bio- H_2 . Attraverso i gasometri è inoltre possibile monitorare la velocità di produzione espressa in (L/h); sulla base di tale parametro, si considera la

prova terminata quando il suo valore scende al di sotto di 0.001 L/h. Terminata la prova per mezzo di una pompa peristaltica, si preleva il brodo di fermentazione esausto facendo attenzione a lasciare il 10% (v/v) di brodo che fungerà da inoculo per la prova successiva.

4.4.5 PROVA DI FERMENTAZIONE: PRODUZIONE DI BIO-CH₄ A DIVERSI REGIMI IDRODINAMICI

Questa tipologia di prova di fermentazione è stata condotta operando in modalità batch, all'interno del Minifors con un volume utile di 1,5 litri e in condizioni di mesofile (35°C). Questa parte sperimentale si costituisce di tre prove di fermentazione eseguite a tre differenti velocità di agitazione: 70 rpm, 120 rpm e 200 rpm. Qui di seguito sono riportate le procedure operative per ognuna delle tre prove.

4.4.5.1 PROVA A 70 RPM

Data la minore velocità di crescita degli HCB rispetto agli HPB, al fine di avere un inoculo ugualmente concentrato in tutte e tre le prove effettuate, questa prima prova è stata eseguita due volte:

- Nella prima fermentazione, all'interno del reattore vengono inseriti l'inoculo, con una concentrazione pari al 10% (v/v) del volume operativo (corrispondenti a 150 mL), e il substrato pretrattato e idrolizzato fino a raggiungere un volume di 1,5L. Come inoculo è stato impiegato quello descritto nel paragrafo 4.4.2.1.2, dopo averlo preventivamente riportato a temperatura ambiente e riattivato per 24 ore a 35°C. Una volta riempito il reattore, al fine di garantire l'anaerobicità del processo fermentativo, si fa fluire N₂ all'interno del sistema per circa 10 minuti. Terminata l'operazione di flussaggio, si imposta la velocità di agitazione del sistema ad un valore di 70 rpm e si cominciano a registrare i dati di produttività. La registrazione avviene per mezzo dei due Ritter milligascounter posti in serie che, che permettono di valutare la produttività cumulativa e quella di solo bio-CH₄. Attraverso i gasometri è inoltre possibile monitorare la velocità di produzione espressa in (L/h); sulla base di tale parametro, si considera la prima fermentazione terminata quando il suo valore di produttività è massimo. In queste condizioni, per mezzo di una pompa peristaltica, si preleva il brodo di fermentazione esausto facendo attenzione a lasciare il 10% (v/v) di brodo che fungerà da inoculo per la seconda fermentazione.
- Nella seconda fermentazione, che costituisce la prova vera e propria, al volume lasciato dalla prima fermentazione si aggiunge substrato pretrattato e idrolizzato fino al raggiungimento del volume operativo di 1,5L. La procedura seguita in questa seconda fermentazione è la stessa della prima. In questo caso si considera la prova terminata quando il suo valore scende al di sotto di 0.001 L/h. Terminata la prova per mezzo di una pompa peristaltica, si preleva il brodo di fermentazione esausto facendo attenzione a lasciare il 10% (v/v) di brodo che fungerà da inoculo per la successiva prova.

Il brodo esausto prelevato viene analizzato e successivamente filtrato su un setaccio con maglie da 0,5 mm; una volta terminata questa operazione utilizzando il microscopio, si vanno a fare delle fotografie del filtrato e del ritentato, per valutare le dimensioni dei granuli microbici formati durante il processo fermentativo.

Solo la prima prova di questo set sperimentale presenta una procedura di avvio differente, le altre due prove condotte a 120 rpm e 200 rpm presentano invece la medesima procedura operativa.

4.4.5.2 PROVA A 120 RPM

In questa prova, l'inoculo è già presente all'interno del reattore, in quanto è rappresentato dai 150 mL lasciati intenzionalmente dalla prova precedente condotta a 70 rpm. A tale volume si aggiunge

substrato pretrattato e idrolizzato fino al raggiungimento del volume operativo di 1,5L. Al fine di ripristinare le condizioni di anaerobicità del processo, viene fatto fluire N_2 per 10 minuti all'interno del reattore; terminata questa operazione si imposta la velocità di agitazione a 120 rpm e si cominciano a registrare i dati di produttività. La registrazione avviene per mezzo dei due ritter milligascouter posti in serie. La prova si considera terminata quando il suo valore scende al di sotto di 0.001 L/h. Terminata la prova per mezzo di una pompa peristaltica, si preleva il brodo di fermentazione esausto facendo attenzione a lasciare il 10% (v/v) di brodo che fungerà da inoculo per la successiva prova.

Anche in questo caso il brodo esausto prelevato viene analizzato e successivamente filtrato su un setaccio con maglie da 0,5 mm; una volta terminata questa operazione utilizzando il microscopio, si vanno a fare delle fotografie del filtrato e del ritentato, per valutare le dimensioni dei granuli microbici formati durante il processo fermentativo.

4.4.5.3 PROVA A200 RPM

La procedura operativa per questa prova è identica alla prova condotta a 120 rpm, l'unica variazione è legata al regime di agitazione che in questo caso viene impostato a 200 rpm; inoltre anche qui l'inoculo è rappresentato dai 150 mL di brodo provenienti dalla prova condotta a 120 rpm.

Terminata la prova, il brodo esausto prelevato viene filtrato su un setaccio con maglie da 0,5 mm; una volta terminata questa operazione utilizzando il microscopio, si vanno a fare delle fotografie del filtrato e del ritentato, per valutare le dimensioni dei granuli microbici formati durante il processo fermentativo.

Al termine delle tre prove, le immagini ricavate al microscopio dal brodo esausto di ogni test sono state elaborate con il software open-source ImageJ per valutare la dimensione media (D_m) dei granuli formati durante il processo fermentativo.

5 RISULTATI PROVE SPERIMENTALI

In questo capitolo sono riportati i risultati delle varie prove sperimentali, le cui procedure sono state illustrate nel capitolo precedente.

5.1 PROVE IDRODINAMICHE

In questo paragrafo vengono riportati i risultati delle prove relative alla valutazione dei tempi di miscelazione e di circolazione per due diverse tipologie di impeller. In tabella 5.1 e tabella 5.2 sono riassunte le condizioni operative delle varie prove.

Tabella 5.1 Condizioni operative idrodinamiche elica marina

PARAMETRO	Valore								
Volume di lavoro (L)	1,5								
Tracciante	Na OH 2M								
Tipo di agitatore	Elica Marina								
Velocità di agitazione (rpm)	70			120			200		
Posizione misura parametro probe visiva	Basso	Medio	Alto	Basso	Medio	Alto	Basso	Medio	Alto
Posizione misura parametro probe misurato dal top del vessel (mm)	187	140	100	187	140	100	187	140	100

Tabella 5.2 Condizioni operative prove idrodinamiche PBT-45°

PARAMETRO	Valore								
Volume di lavoro (L)	1,5								
Tracciante	Na OH 2M								
Tipo di agitatore	PBT-45° 3 pale								
Velocità di agitazione (rpm)	70			120			200		
Posizione misura parametro probe visiva	Basso	Medio	Alto	Basso	Medio	Alto	Basso	Medio	Alto
Posizione misura parametro probe misurato dal top del vessel (mm)	187	140	100	187	140	100	187	140	100

Qui di seguito sono riportati a titolo esemplificativo alcune dei grafici ottenuti dalle varie prove e i relativi tempi di miscelazione e circolazione stimati. La totalità delle prove è riportata in Appendice B. Prima di entrare nei particolari è necessario fare due premesse:

- tutte le curve che verranno mostrate sono costituite da un certo numero di punti sperimentali, dato l'elevato numero di punti per ognuna delle curve, legato all'intervallo di campionamento di 1 secondo, al fine di rendere comprensibili tali grafici non verranno mostrati i punti ma le curve saranno rappresentate come un tracciato continuo;
- la stima dei tempi di circolazione ove possibile, è stata fatta misurando la distanza temporale che intercorreva tra un picco e l'altro del tracciato. Quando il tracciato non mostrava alcuna circolazione evidente si è assunto che il τ_m fosse pari a 4 volte il τ_c (paragrafo 3.2.5.2).

$$\tau_m \cong 4 \cdot \tau_c \quad (5.1)$$

5.1.1 PROVE ELICA MARINA E PBT-45°

Dalle prove idrodinamiche eseguite secondo le configurazioni mostrate in tabella 5.1 e 5.2, si sono ottenuti i seguenti risultati divisi per velocità di agitazione.

5.1.1.1 PROVE A 70 RPM

Dalle prove eseguite a 70 rpm, la media dei tempi di miscelazione e circolazione ricavati sono riportati in tabella 5.3 e 5.4; in figura 5.1 è riportato uno dei grafici ricavati durante tali prove a titolo di esempio.

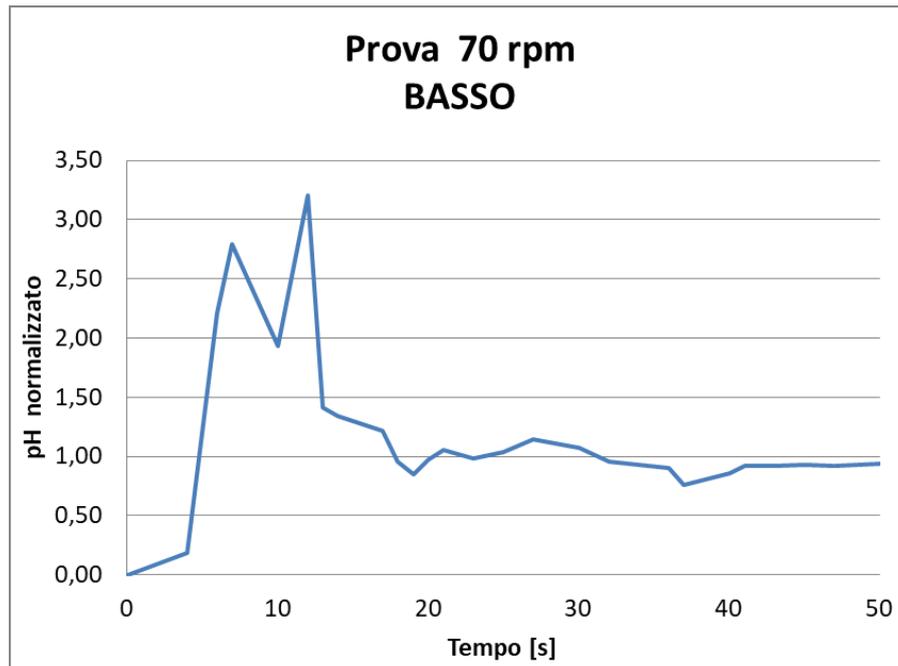


Figura 5.1 Prova a 70 rpm, BASSO, elica marina

Tabella 5.3 τ_m e τ_c ricavati dalle prove a 70 rpm con elica marina.

ELICA MARINA 70 RPM		
	Tempo di miscelazione (s)	Tempo di circolazione (s)
BASSO	50,00 ± 1,00	10,97 ± 1,85
MEDIO	82,00 ± 6,24	20,50 ± 1,56
ALTO	114,00 ± 2,65	28,50 ± 0,87

Tabella 5.4 τ_m e τ_c ricavati dalle prove a 70 rpm con PBT-45°.

PBT-45° 70 RPM		
	Tempo di miscelazione (s)	Tempo di circolazione (s)
BASSO	46,00 ± 2,65	7,22 ± 1,79
MEDIO	69,33 ± 1,89	9,67 ± 1,51
ALTO	74,00 ± 1,73	18,50 ± 0,43

5.1.1.2 PROVE A 120 RPM

Dalle prove eseguite a 120 rpm, la media dei tempi di miscelazione e circolazione ricavati sono riportati in tabella 5.5 e 5.6; in figura 5.2 è riportato uno dei grafici ricavati durante tali prove a titolo di esempio.

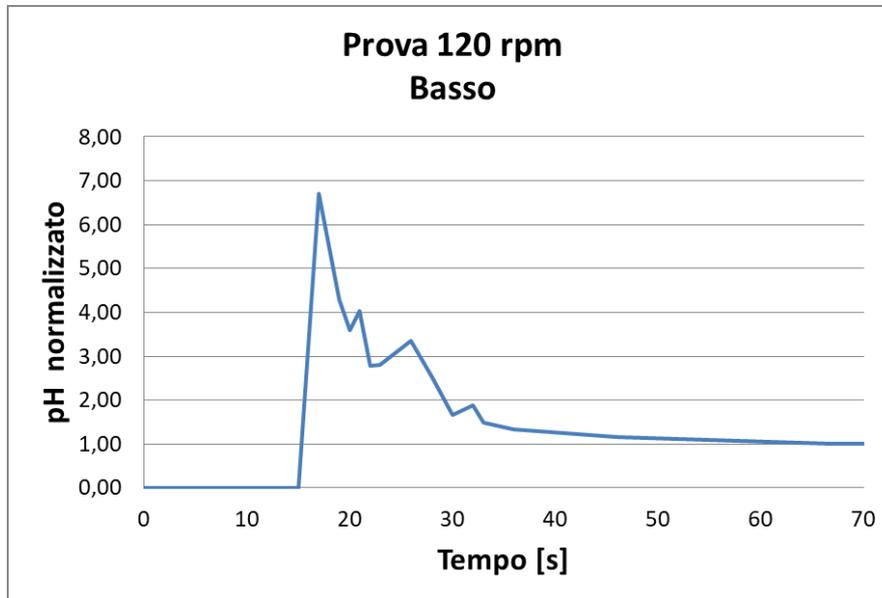


Figura 5.2 Prova a 120 rpm, BASSO, elica marina

Tabella 5.5 τ_m e τ_c ricavati dalle prove a 120 rpm con elica marina.

ELICA MARINA 120 RPM		
	Tempo di miscelazione (s)	Tempo di circolazione (s)
BASSO	31,33 ± 3,51	5,33 ± 1,65
MEDIO	58,33 ± 3,06	14,58 ± 0,76
ALTO	72,33 ± 2,52	18,08 ± 0,63

Tabella 5.6 τ_m e τ_c ricavati dalle prove a 120 rpm con PBT-45°.

PBT-45° 120 RPM		
	Tempo di miscelazione (s)	Tempo di circolazione (s)
BASSO	26,33 ± 2,31	6,58 ± 0,58
MEDIO	30,00 ± 1,73	7,50 ± 0,43
ALTO	47,33 ± 4,51	11,83 ± 1,13

5.1.1.3 PROVE A 200 RPM

Dalle prove eseguite a 200 rpm, la media dei tempi di miscelazione e circolazione ricavati sono riportati in tabella 5.7 e 5.8; in figura 5.3 è riportato uno dei grafici ricavati durante tali prove a titolo di esempio.

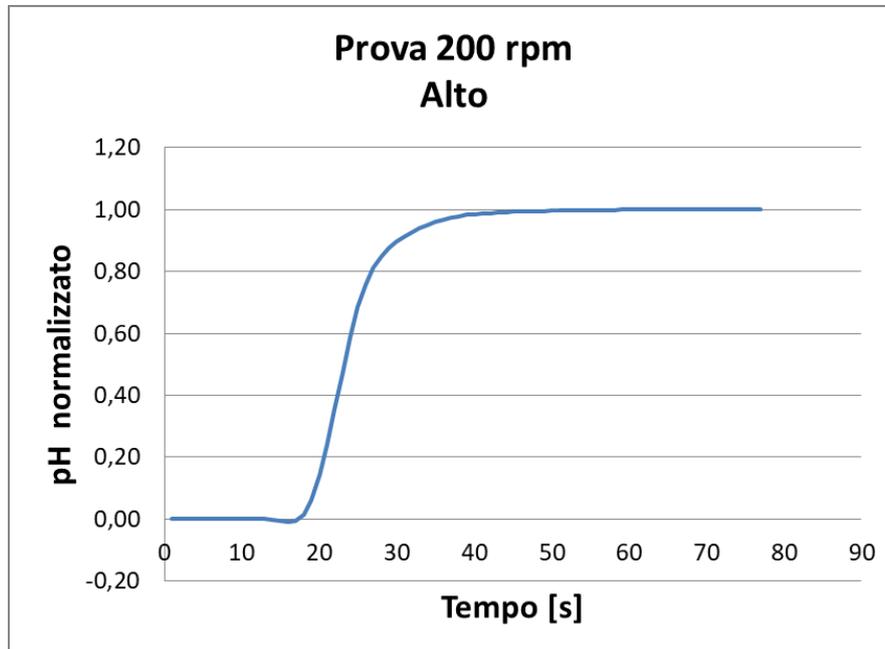


Figura 5.3 Prova a 200 rpm, ALTO, PBT-45°

Tabella 5.7 τ_m e τ_c ricavati dalle prove a 200 rpm con elica marina.

ELICA MARINA 200 RPM		
	Tempo di miscelazione (s)	Tempo di circolazione (s)
BASSO	13,00 ± 0,01	3,75 ± 0,87
MEDIO	29,80 ± 3,11	7,92 ± 0,58
ALTO	46,67 ± 6,43	11,67 ± 1,61

Tabella 5.8 τ_m e τ_c ricavati dalle prove a 200 rpm con PBT-45°.

PBT-45° 200 RPM		
	Tempo di miscelazione (s)	Tempo di circolazione (s)
BASSO	11,33 ± 0,58	2,83 ± 0,14
MEDIO	17,00 ± 2,65	4,25 ± 0,66
ALTO	20,00 ± 1,00	5,00 ± 0,25

5.2 PROVA DI FERMENTAZIONE: PRODUZIONE DI BIO-H₂ A DIVERSI REGIMI IDRODINAMICI

In questo paragrafo vengono riportati i risultati delle prove relative produzione di bio-H₂ a diversi regimi idrodinamici. In tabella 5.9 sono riassunte le condizioni operative delle varie prove.

Tabella 5.9 Condizioni operative prove produzione idrogeno a diversi rpm

Parametri	Prova		
	200 rpm	500 rpm	800 rpm
pH	5,6 ± 0,1	5,6 ± 0,1	5,6 ± 0,1
TS iniziali (g/L)	38,65 ± 0,59	39,25 ± 0,95	39,54 ± 0,79
TS finali (g/L)	33,67 ± 1,76	33,04 ± 0,52	34,06 ± 0,88
VS iniziali (g/L)	34,21 ± 0,93	34,74 ± 0,95	34,99 ± 1,03
VS finali (g/L)	25,56 ± 0,85	22,36 ± 1,01	23,79 ± 0,92
Viscosità dinamica iniziale (cP)	35 ± 0,35	35 ± 0,35	35 ± 0,35
Viscosità dinamica finale (cP)	10,0 ± 0,1	10,0 ± 0,1	10 ± 0,1
NaOH consumata (mL/Lbiogas)	10,2 ± 0,1	4,3 ± 0,1	6,2 ± 0,1
Volume cumulativo di biogas prodotto (L)	13,40 ± 0,40	17,75 ± 0,53	15,88 ± 0,48
Volume cumulativo di H ₂ prodotto (L)	6,48 ± 0,19	7,30 ± 0,22	5,29 ± 0,17
%H ₂ (v/v)*	48,3	41,1	37,8
%CO ₂ (v/v)*	51,7	58,9	62,2

* Tale percentuale è stata ricavata indirettamente dalle curve di produzione e confermata da analisi GC.

Di seguito sono riportate le curve di produzione delle tre prove effettuate, dove viene riportata la produzione di biogas espressa in litri per grammo di solido volatile iniziale [L/gVS] e la produzione del solo idrogeno scorporata dalla CO₂, anch'essa espressa in [L/gVS].

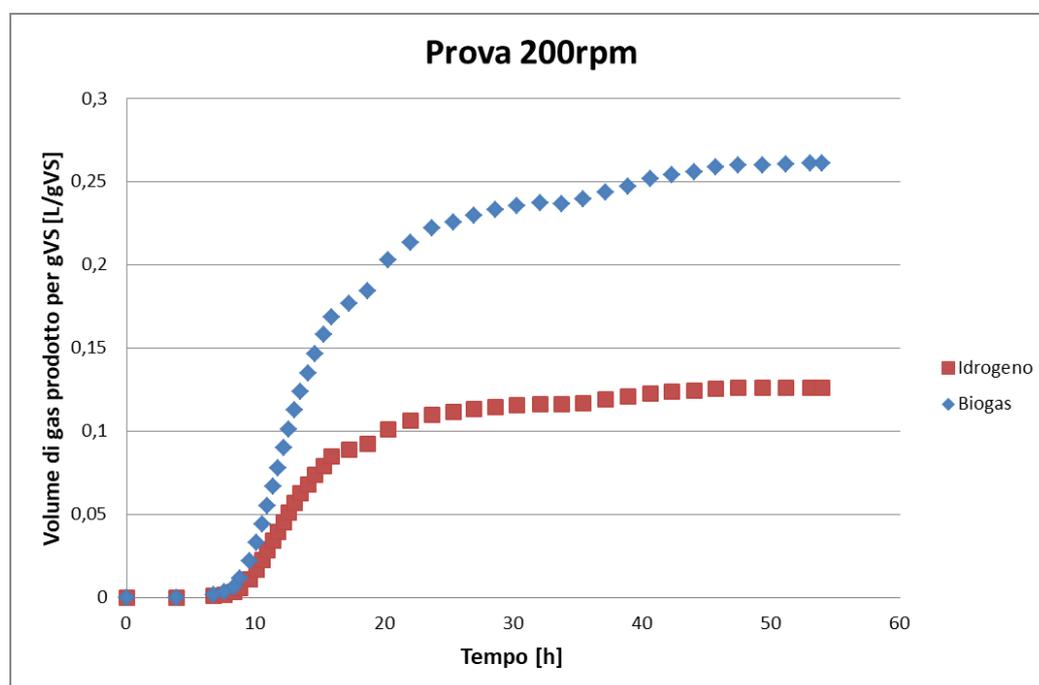


Figura 5.4 Curve di Produzione a 200 rpm per il bio-H₂

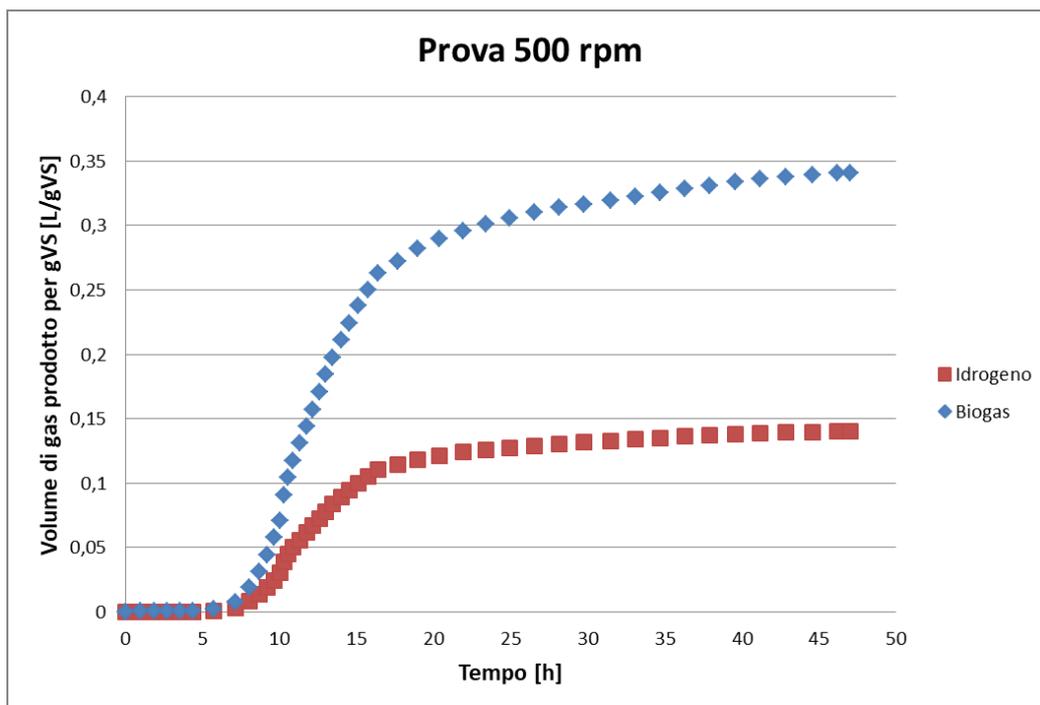


Figura 5.5 Curve di Produzione a 500 rpm per il bio-H₂

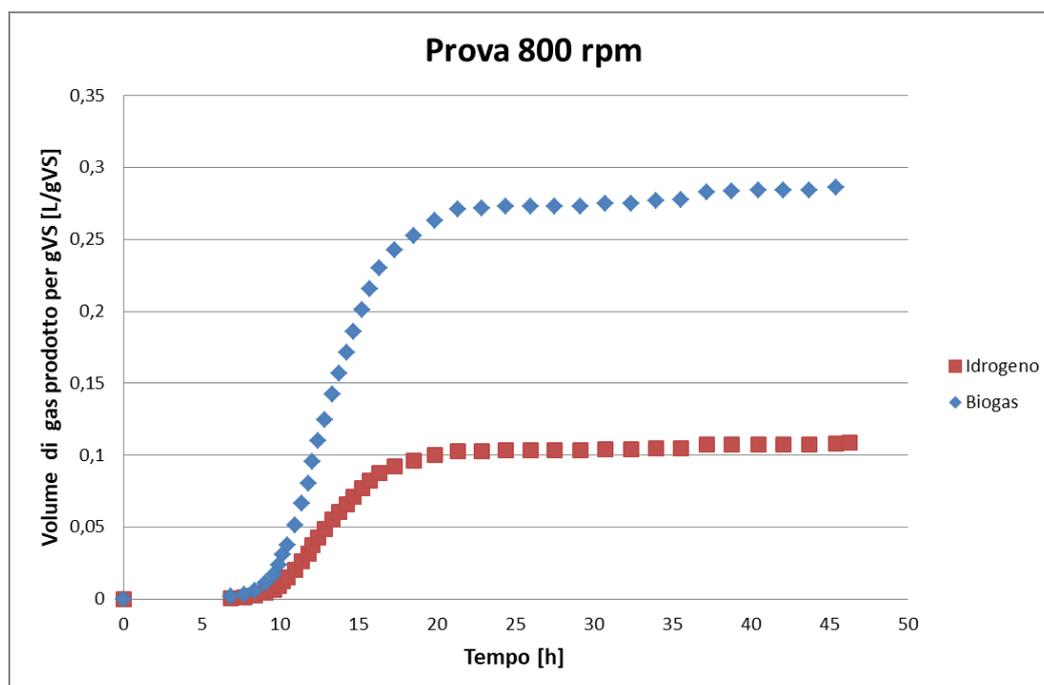


Figura 5.6 Curve di Produzione a 800 rpm per il bio-H₂

Al termine di ogni prova, i campioni prelevati dal reattore sono stati analizzati per valutare le dimensioni dei granuli di HPB formati durante il processo fermentativo.

In tabella 5.10 è riportata la dimensione media dei granuli batterici stimata attraverso le misure al microscopio. I valori di ogni singola misura sono riportati in Appendice C.

Tabella 5.10 Dimensione media granuli HPB

Velocità di agitazione (rpm)	Prova		
	200	500	800
Dimensione media granuli HPB, D_m (μm)	$450,37 \pm 13,41$	$255,35 \pm 8,34$	$178,44 \pm 5,41$

Di seguito sono riportate a titolo di esempio alcune immagini di tali misurazioni.

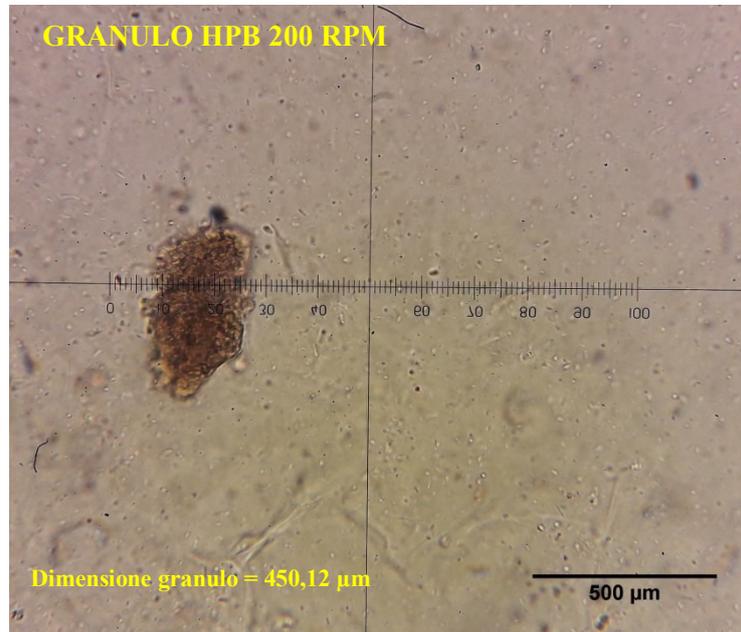


Figura 5.7 Granulo HPB Prova 200 rpm

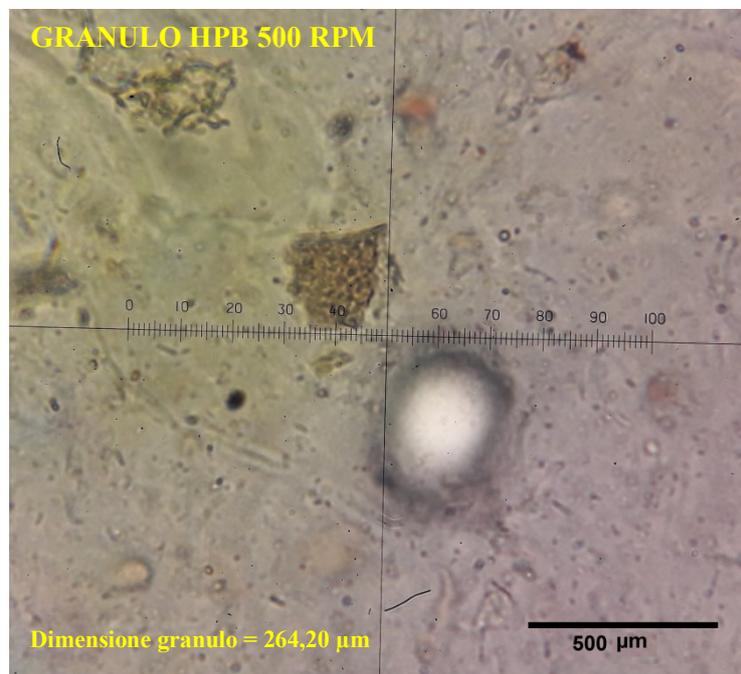


Figura 5.8 Granulo HPB Prova 500 rpm

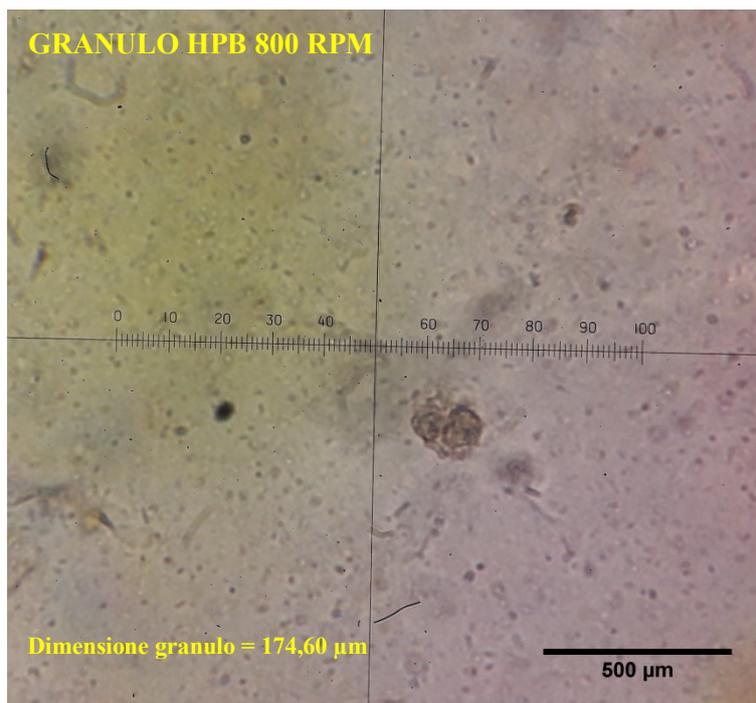


Figura 5.9 Granulo HPB Prova 800 rpm

5.3 PROVA DI FERMENTAZIONE: PRODUZIONE DI BIO-H₂ IN PRESENZA DI ZVI

In questo paragrafo vengono riportati i risultati delle prove relative produzione di Bio-H₂ in presenza di ZVI. In tabella 5.11 sono riassunte le condizioni operative delle varie prove.

Tabella 5.11 Condizioni operative prove produzione idrogeno in assenza e in presenza di ZVI

Parametri	Prova			
	1	2	3	4
pH	5,6 ± 0,1	5,6 ± 0,1	5,6 ± 0,1	5,6 ± 0,1
Velocità di agitazione (rpm)	200	200	200	200
TS iniziali (g/L)	44,06 ± 0,24	41,48 ± 0,75	42,28 ± 0,95	41,96 ± 0,54
TS finali (g/L)	39,08 ± 3,84	37,71 ± 0,23	38,71 ± 0,43	39,61 ± 0,85
VS iniziali (g/L)	34,81 ± 0,89	33,73 ± 0,94	32,74 ± 0,54	33,94 ± 0,63
VS finali (g/L)	26,25 ± 3,71	23,71 ± 0,10	21,54 ± 0,45	22,48 ± 0,74
Concentrazione Fe ⁰ (g/L)	0	0	0,5	0,5
NaOH consumata (mL/Lbiogas)	13,1 ± 0,1	4,8 ± 0,1	9,8 ± 0,1	5,2 ± 0,1
Volume cumulativo di biogas prodotto (L)	4,44 ± 0,13	9,89 ± 0,30	10,30 ± 0,32	11,52 ± 0,34
Volume cumulativo di H ₂ prodotto (L)	2,45 ± 0,07	3,82 ± 0,11	3,92 ± 0,12	5,35 ± 0,16
%H ₂ (v/v)*	55,1	36,7	38,1	49,4
%CO ₂ (v/v)*	44,9	66,3	61,9	50,9

* Tale percentuale è stata ricavata indirettamente dalle curve di produzione e confermata da analisi GC.

Di seguito sono riportate le curve di produzione delle quattro prove effettuate, dove viene riportata la produzione di biogas espressa in litri per grammo di solido volatile iniziale [L/gVS] e la produzione del solo idrogeno scorporata dalla CO₂, anch'essa espressa in [L/gVS].

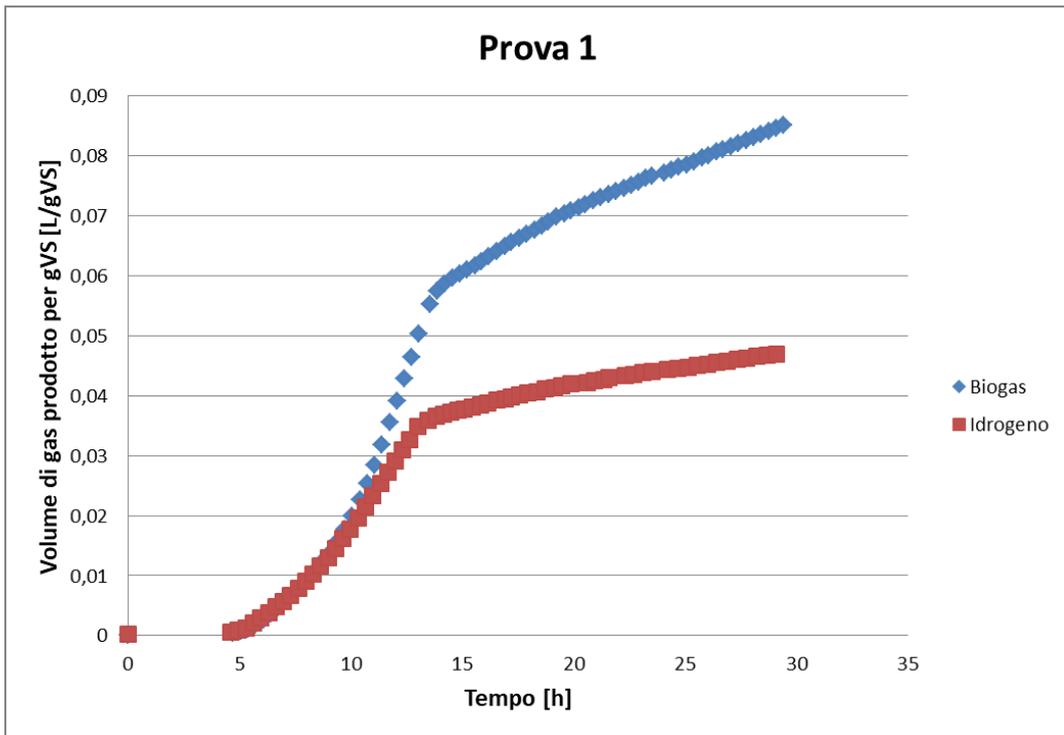


Figura 5.10 Curve di Produzione per il bio-H₂, Prova 1 in assenza di ZVI

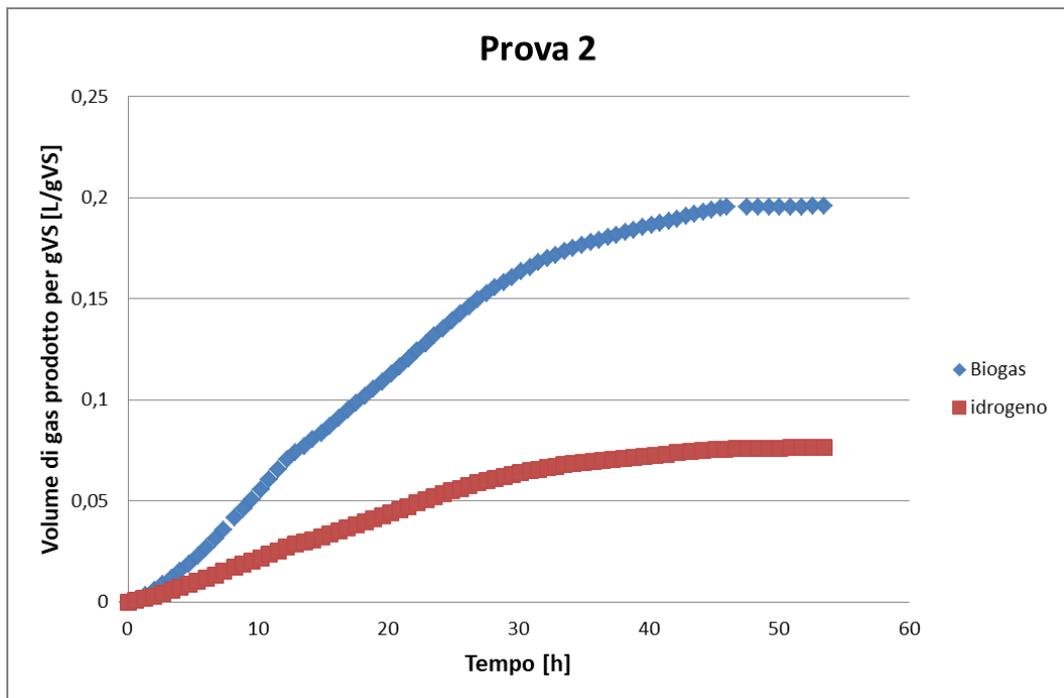


Figura 5.11 Curve di Produzione per il bio-H₂, Prova 2 in assenza di ZVI

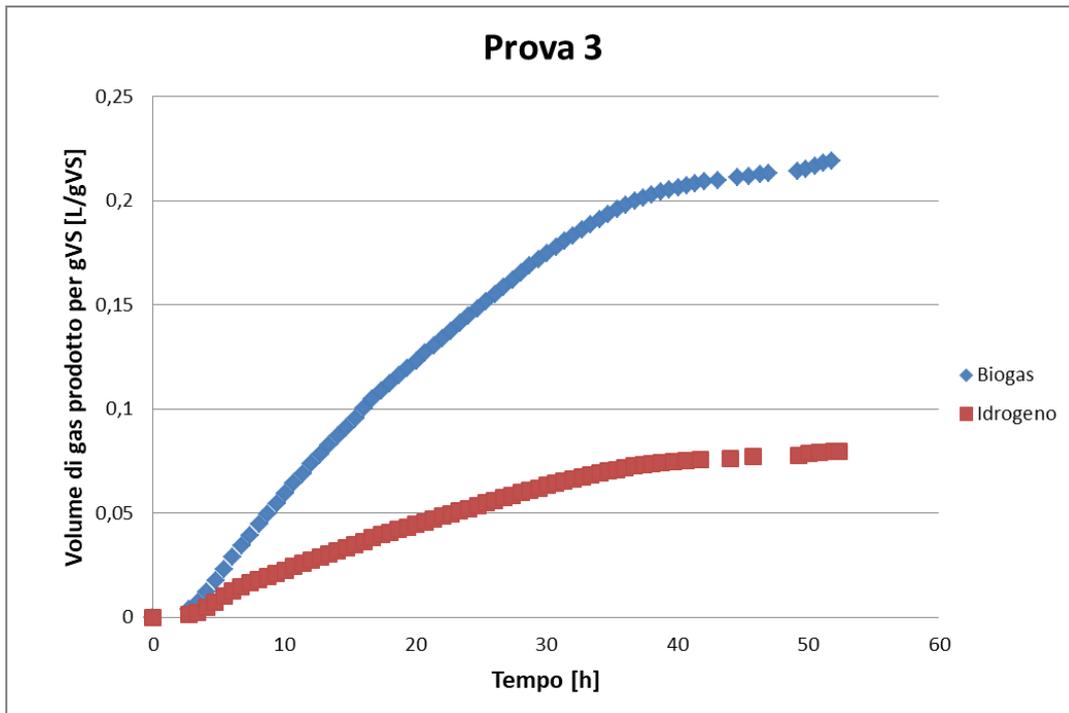


Figura 5.12 Curve di Produzione per il bio-H₂, Prova 3 in presenza di ZVI

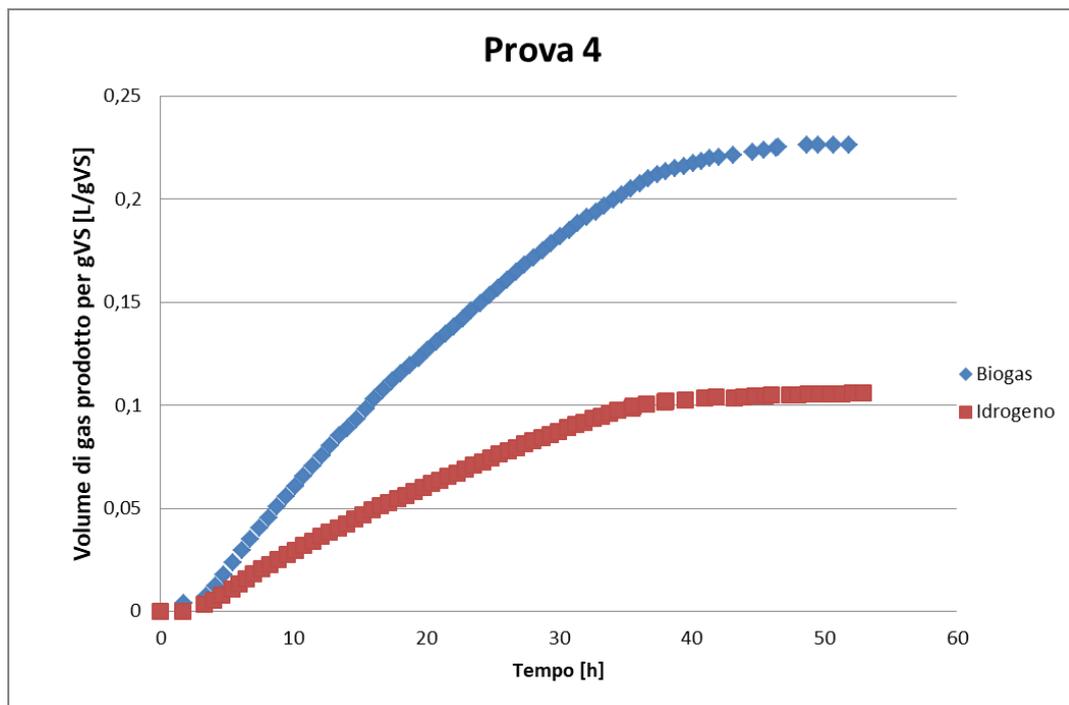


Figura 5.13 Curve di Produzione per il bio-H₂, Prova 4 in presenza di ZVI

5.4 PROVA DI FERMENTAZIONE: PRODUZIONE DI BIO-CH₄ A DIVERSI REGIMI IDRODINAMICI

In questo paragrafo vengono riportati i risultati delle prove relative produzione di bio-CH₄ a diversi regimi idrodinamici . In tabella 5.12 sono riassunte le condizioni operative delle varie prove.

Tabella 5.12 Condizioni operative prove produzione idrogeno a diversi rpm.

Parametri	Prova		
	70 rpm	120 rpm	200 rpm
pH	7,6 ± 0,1	7,6 ± 0,1	7,6 ± 0,1
TS iniziali (g/L)	40,29 ± 0,87	41,51 ± 0,75	42,21 ± 0,63
TS finali (g/L)	34,17 ± 0,71	36,30 ± 0,97	36,09 ± 0,71
VS iniziali (g/L)	34,95 ± 1,05	35,70 ± 1,11	36,31 ± 1,14
VS finali (g/L)	24,44 ± 0,94	26,18 ± 0,99	26,09 ± 0,99
Viscosità dinamica iniziale (cP)	38 ± 0,38	38 ± 0,38	38 ± 0,38
Viscosità dinamica finale (cP)	10 ± 0,1	10 ± 0,1	10 ± 0,1
NaOH consumata (mL/Lbiogas)	3,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,5 ± 0,1
Volume cumulativo di biogas prodotto (L)	15,19 ± 0,46	12,34 ± 0,37	5,79 ± 0,17
Volume cumulativo di CH ₄ prodotto (L)	9,87 ± 0,30	6,83 ± 0,21	2,73 ± 0,08
%CH ₄ (v/v)*	48,3	41,1	37,8
%CO ₂ (v/v)*	51,7	58,9	62,2

* Tale percentuale è stata ricavata indirettamente dalle curve di produzione e confermata da analisi GC.

Di seguito sono riportate le curve di produzione delle tre prove effettuate dove viene riportata la produzione di biogas espressa in litri per grammo di solido volatile iniziale [L/gVS] e anche la produzione del solo CH₄ scorporata dalla CO₂, anch'essa espressa in [L/gVS].

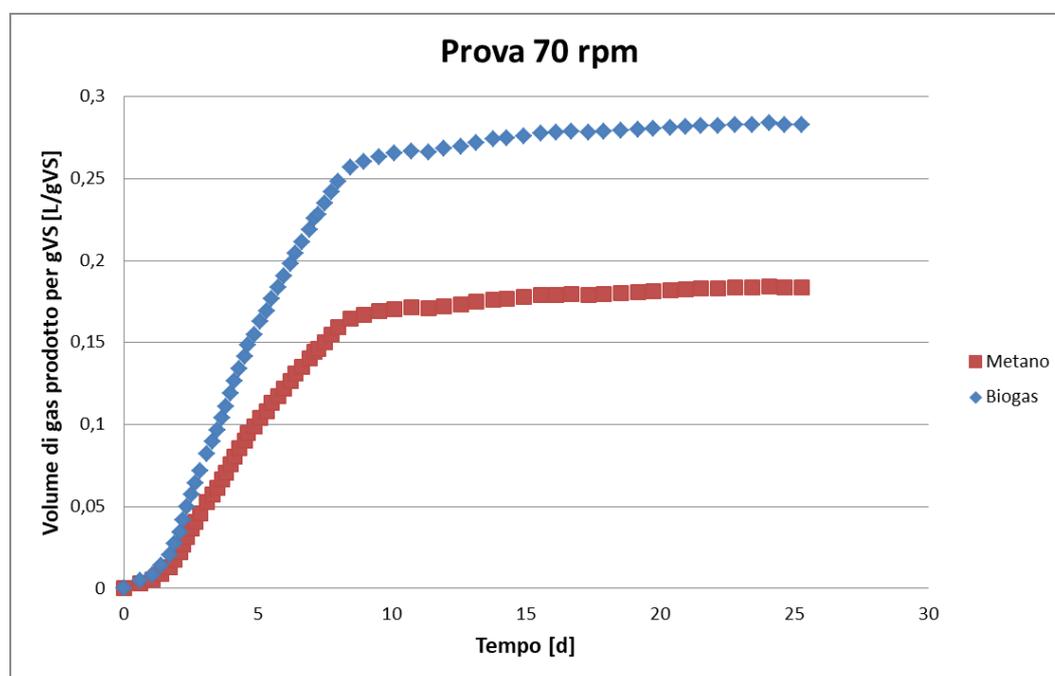


Figura 5.14 Curve di Produzione a 70 rpm per il bio-CH₄

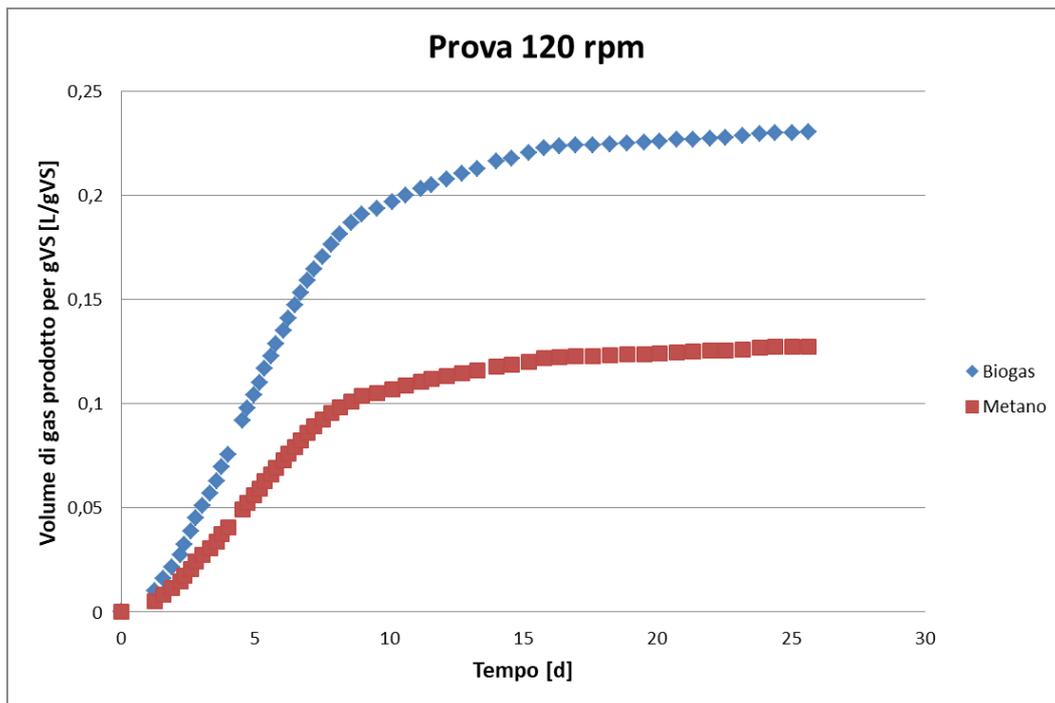


Figura 5.15 Curve di Produzione a 120 rpm per il bio-CH₄

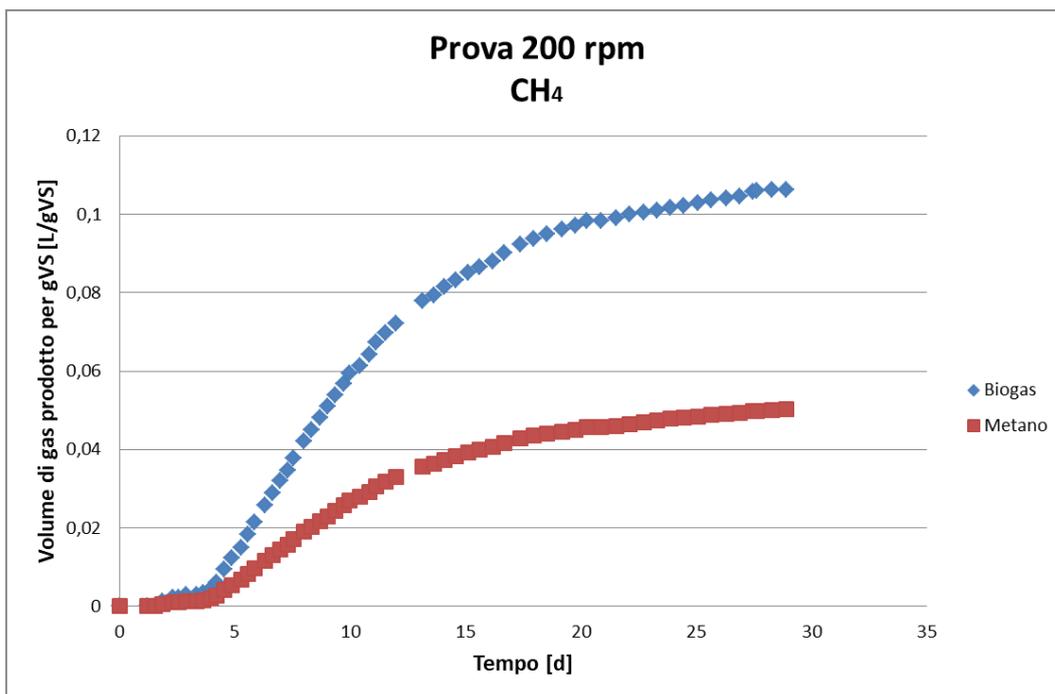


Figura 5.16 Curve di Produzione a 200 rpm per il bio-CH₄

Al termine di ogni prova, i campioni prelevati dal reattore sono stati analizzati per valutare le dimensioni dei granuli di HCB formati durante il processo fermentativo.

In tabella 5.13 è riportata la dimensione media dei granuli batterici stimata attraverso le misure al microscopio. I valori di ogni singola misura sono riportati in Appendice D.

Tabella 5.13 Dimensione media granuli HCB

Velocità di agitazione (rpm)	Prova		
	70	120	200
Dimensione media granuli HPB, D_m (μm)	$1.042,11 \pm 20,17$	$712,66 \pm 8,49$	$519,41 \pm 17,11$

Di seguito sono riportate a titolo di esempio alcune immagini di tali misurazioni.

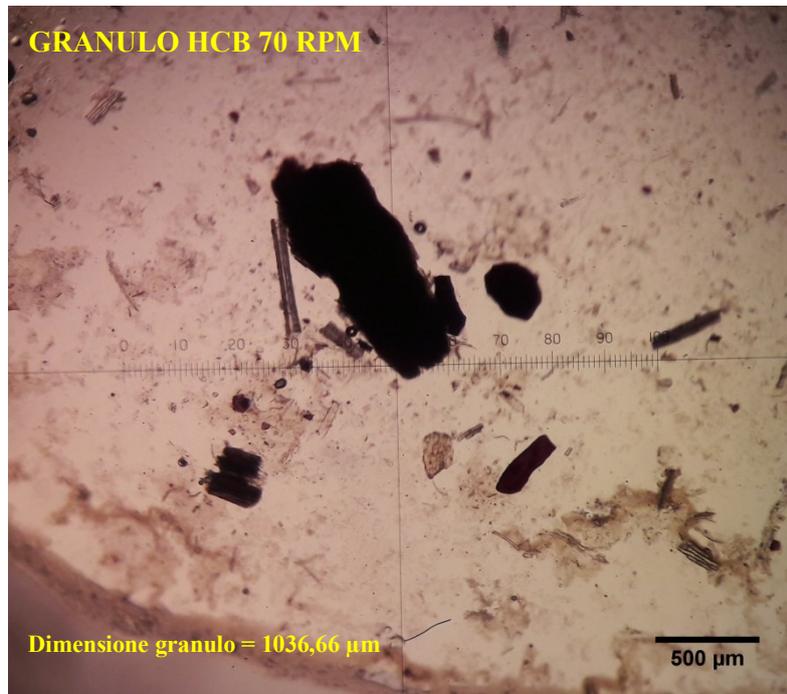


Figura 5.17 Granulo HCB Prova 70 rpm

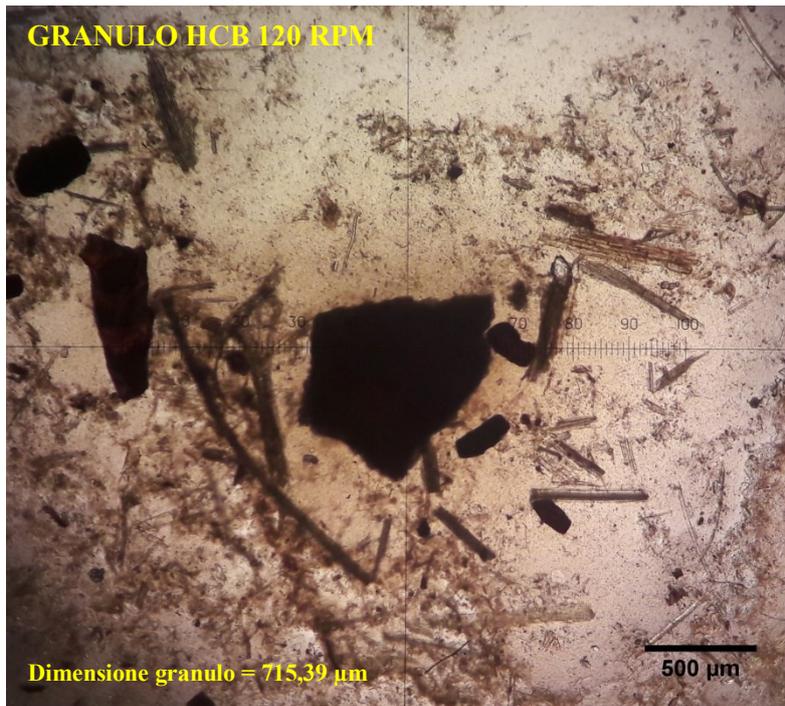


Figura 5.18 Granulo HCB Prova 120 rpm



Figura 5.19 Granulo HCB Prova 200 rpm

6 ANALISI DEI DATI SPERIMENTALI E CONSIDERAZIONI

In questo capitolo vengono analizzati e commentati i risultati delle varie prove sperimentali.

6.1 PROVE IDRODINAMICHE

6.1.1 PRESTAZIONI DEL SISTEMA DI MISCELAZIONE

Dalle varie prove effettuate a diversi regimi di agitazione e con diverse tipologie di impeller, si sono ottenuti una serie di risultati relativi ai tempi di miscelazione e di circolazione per il sistema studiato. Dall'elaborazione di tali dati, riportati nelle tabelle da 5.3 a 5.8, è stato possibile valutare l'efficienza di agitazione dei due tipi di impeller utilizzati.

La necessità di una tale analisi, è nata a seguito di alcuni problemi relativi all'omogeneizzazione del sistema fermentativo incontrati durante una prima prova di fermentazione effettuata impiegando come sistema di agitazione un' elica marina operando a 120 rpm. Il problema emerso in tale prova, iniziata e mai terminata, è riportato in figura 6.1; come è possibile notare dall'immagine il sistema, operante ad una concentrazione di TS di circa 40g/L, non riesce a raggiungere la condizione di perfetta miscelazione neanche dopo alcune ore.

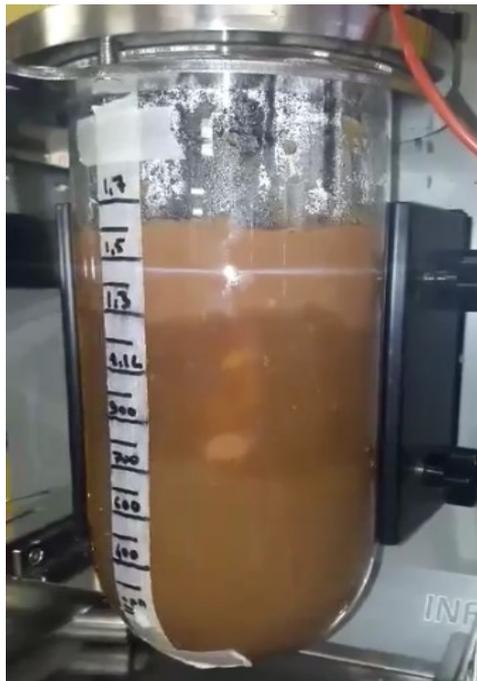


Figura 6.1 Miscelazione del sistema difficoltosa, elica marina a 120 rpm

In presenza di un tale problema, si è quindi deciso di testare una diversa tipologia di agitatore; in particolare si è optato per una *Pitch Blade Turbine con tre pale a 45°* (PBT-45°), le cui caratteristiche sono riportate in tabella 4.1. I risultati di questa scelta sono stati evidenti sin da subito ed è possibile apprezzarli osservando la figura 6.2.



Figura 6.2 Buona miscelazione del sistema, PBT-45° a 120 rpm

Sulla base di questo, si è quindi scelto di utilizzare come agitatore per tutte le prove effettuate la PBT-45°.

Allo scopo di supportare tale scelta, oltre che visivamente anche numericamente, sono state effettuate le prove di valutazione dei tempi di miscelazione e di circolazione, le cui procedure sono riportate nel Capitolo 4. Tali prove sono state effettuate in acqua e non in un brodo di fermentazione, a causa del relativamente elevato tempo di risposta dell'elettrodo a pH impiegato per tale misura; sono stati fatti dei tentativi di valutazione di in un brodo di fermentazione senza ottenere risultati consistenti. Per tale motivo si è scelto di operare utilizzando come mezzo l'acqua.

I risultati di tali misurazioni, effettuate in vari punti del reattore e con le due tipologie di agitatore, sono di seguito rappresentati. In figura 6.3 sono riportati i tempi di miscelazione per le due tipologie di agitatore in funzione della posizione dell'elettrodo all'interno del vessel e dell'intensità di agitazione.

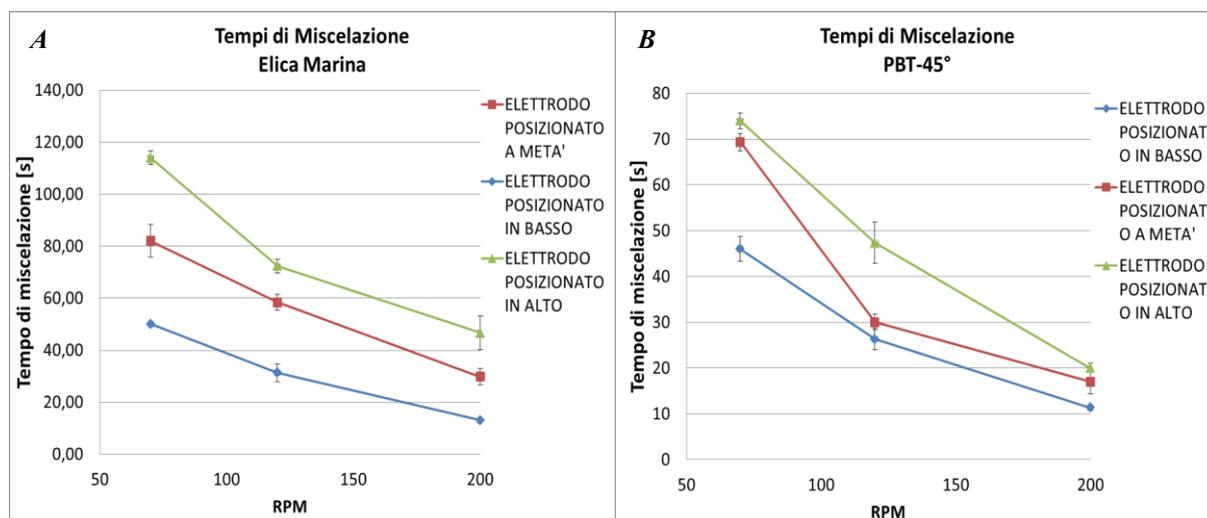


Figura 6.3 Tempi di miscelazione per elica marina (A) e PBT-45° (B)

Quello che si osserva da tali grafici è che la PBT-45° presenta dei nettamente inferiori a quelli dell'elica marina. Questo fatto lo si ritrova, come è possibile osservare in figura 6.4, anche nell'andamento dei tempi di circolazione ricavati per le due tipologie di agitatore.

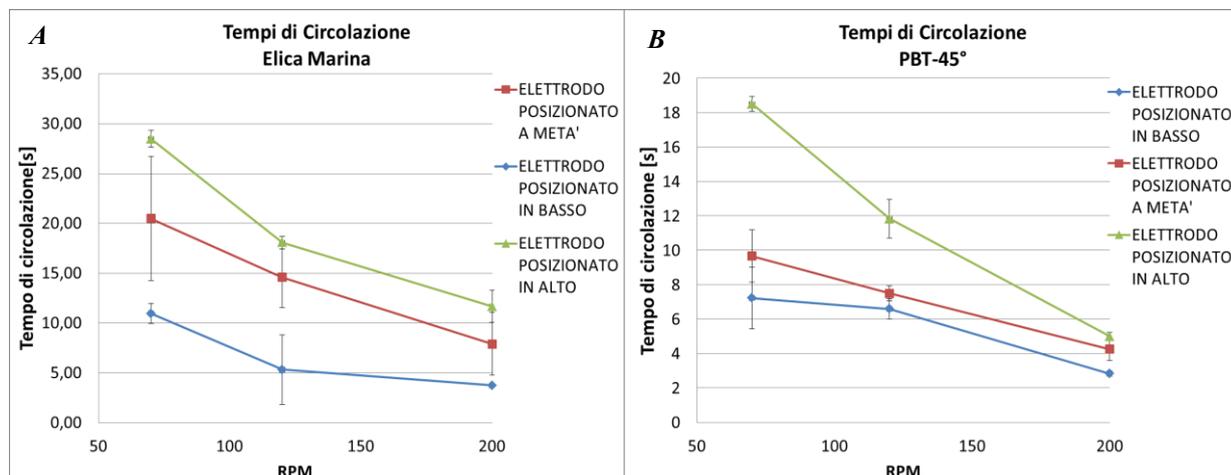


Figura 6.4 Tempi di circolazione per elica marina (A) e PBT-45° (B)

Sulla base di quanto riportato in figura 6.4 risulta quindi evidente, come affermato precedentemente nel paragrafo 3.2.5.2, che i tempi di circolazione, a parità di intensità di agitazione, non sono unici ma variano a seconda del percorso che l'elemento di fluido seguito compie all'interno del sistema. Alla luce di questo è possibile quindi stimare un valore di tempo di circolazione medio per ognuna delle velocità di agitazione. Tali valori sono riportati in tabella 6.1.

Tabella 6.1 Tempi medi di circolazione a vari regimi di agitazione

Velocità agitatore (rpm)	Tempi di Circolazione Medi $\bar{\tau}_c$ (s)	
	Elica Marina	PBT-45°
70	19,99 ± 4,28	11,80 ± 3,73
120	12,67 ± 3,04	8,64 ± 2,14
200	7,78 ± 3,05	4,03 ± 1,06

L'andamento dei tempi medi, al variare della velocità di agitazione, per le due tipologie di impeller è riportata in figura 6.5.

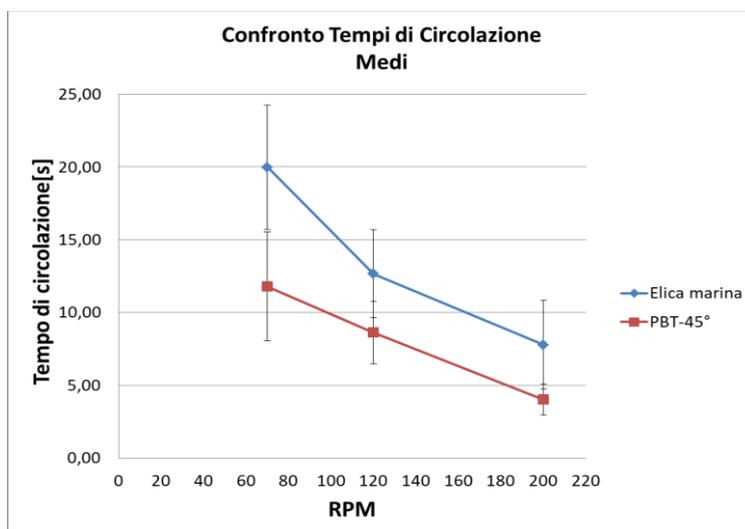


Figura 6.5 Confronto tempi medi di circolazione elica marina e PBT-45°

6.1.2 VALUTAZIONE DEL TEMPO DI CIRCOLAZIONE MEDIO NEL BRODO

I tempi medi di circolazione ricavati sperimentalmente non rappresentano minimamente i fenomeni circolatori che si verificano all'interno di un brodo di fermentazione, in quanto sono stati stimati per l'acqua per le motivazioni date nel paragrafo precedente. Una stima dei tempi di circolazione all'interno di un brodo fermentativo può essere fatta, a partire dai tempi ricavati per l'acqua, mettendo a confronto il comportamento reologico dei due sistemi: acqua e brodo. In particolare quello che si va a fare, è mettere a confronto i valori del Reynolds rotazionale per i due sistemi, per i diversi regimi di agitazione, quantificando in questo modo la proporzionalità esistente tra il sistema contenente acqua e quello contenente il brodo. In tabella 6.2 sono riportati i parametri caratterizzanti i due sistemi, e il corrispondente valore del Reynolds rotazionale calcolato.

Tabella 6.2 Reynolds rotazionali a confronto

	Acqua			Brodo		
Densità (kg/m ³)	1000			1000		
Viscosità dinamica a 35°C (cP)	0,765			10		
Tipo di agitatore	PBT-45°					
Np	1,27					
Diametro agitatore (mm)	55					
Volume (L)	1,5					
Velocità agitatore (rpm)	70	120	200	70	120	200
N _{Re}	4613	7909	13181	353	605	1008

Noti ora i valore del Reynolds rotazionale per i due sistemi ai vari regimi di agitazione, facendo il rapporto tra i valori, secondo l'equazione 6.1 è possibile stimare un fattore di proporzionalità (α) che lega i due tempi di circolazione secondo l'equazione 6.3.

$$\alpha = \frac{N_{Re_{Brodo}}}{N_{Re_{Acqua}}} \quad (6.1)$$

$$\bar{\tau}_{c_{Brodo}} = \frac{\bar{\tau}_{c_{Acqua}}}{\alpha} \quad (6.2)$$

In tabella 6.3 sono riportati i valori di α e di $\bar{\tau}_{c_{Brodo}}$.

Tabella 6.3 Stima dei tempi di circolazione medi per il brodo			
	Velocità agitatore (rpm)		
	70	120	200
α	0,0765	0,0765	0,0765
$\bar{\tau}_{c_{Brodo}}$	11,8 ± 3,73	8,64 ± 2.14	4,03 ± 1,06
$\bar{\tau}_{c_{Acqua}}$	154,25 ± 3,73	112,94 ± 2.14	52,68 ± 1,06

In figura 6.6 sono rappresentati graficamente questi due tempi messi a confronto.

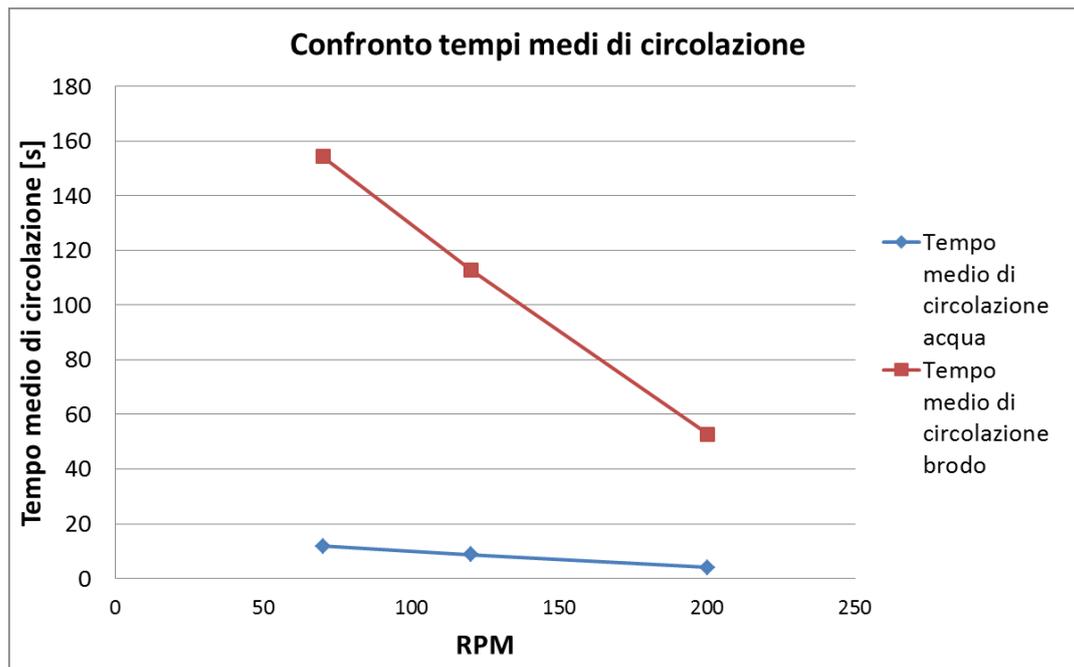


Figura 6.6 Confronto tra tempi medi di circolazione

Quello che emerge da questa analisi è che il tempo di circolazione medio all'interno del brodo è circa tredici volte quello stimato in acqua. Questo valore ricavato tornerà utile per alcune successive considerazioni.

6.2 PROVA DI FERMENTAZIONE: PRODUZIONE DI BIO-H₂ A DIVERSI REGIMI IDRODINAMICI

Sulla base dei dati di produzione di gas registrati nelle varie prove, rappresentati nelle figure 5.4, 5.5 e 5.6, attraverso il modello di Gompertz a tre parametri, è stato possibile valutare i parametri e il rendimento di produzione di Bio-H₂.

In tabella 6.4, sono riportati i parametri del modello impiegato, per le tre prove a diversa intensità di agitazione.

Tabella 6.4 Parametri modello di Gompertz per bio-H₂

	Velocità di agitazione (rpm)		
	200	500	800
G_{max} (L H₂/g_{vs})	0,1206	0,1375	0,1058
R_{max} (L H₂/g_{vs} h)	0,0116	0,0152	0,0150
λ – lag phase (h)	8,4656	7,7925	9,6239
R²	0,9928	0,9967	0,9991

Le curve modellate con Gompertz per le prove di produzione di bio-H₂ a diversi rpm sono riportate in Appendice E.

I parametri di efficienza del processo, a varie velocità di agitazione, sono messi a confronto per le varie configurazioni del sistema in figura 6.7.

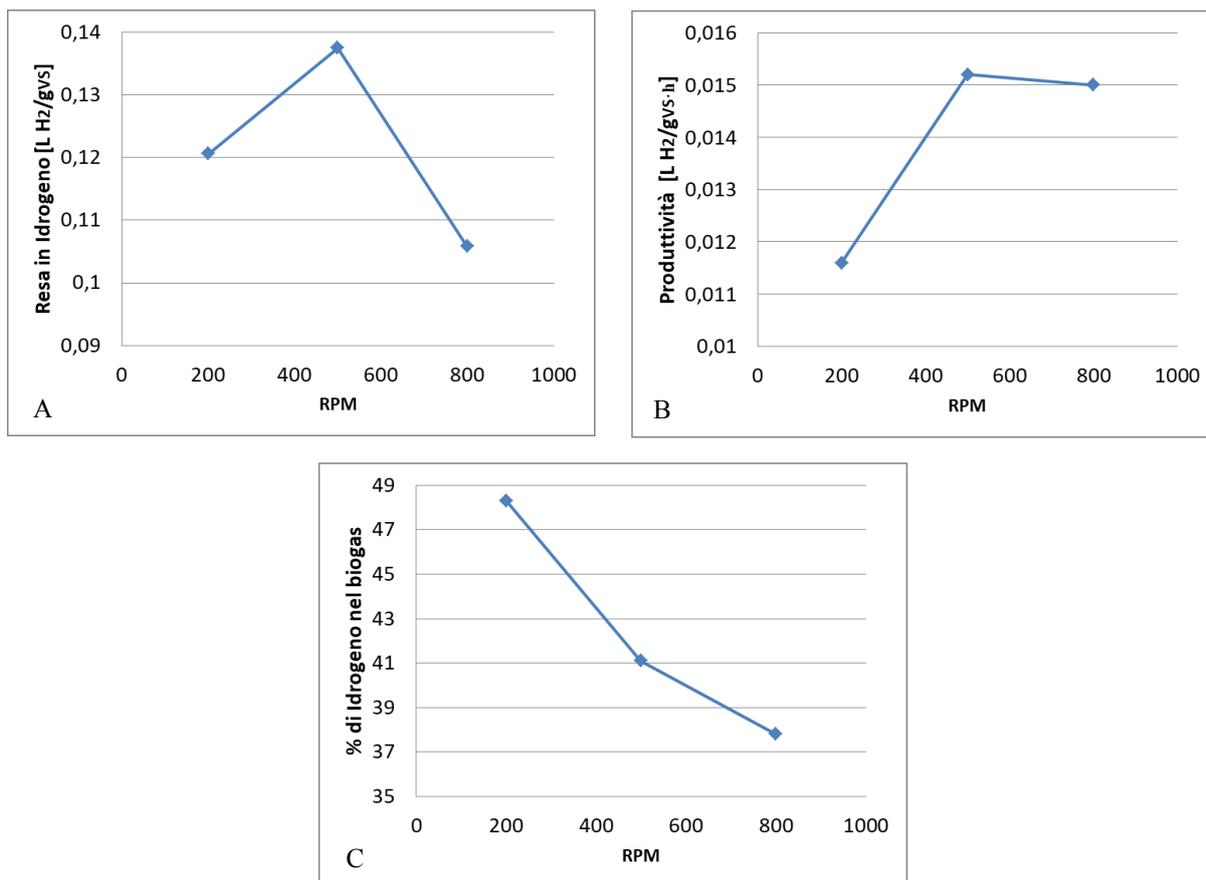


Figura 6.7 Parametri di efficienza del processo al variare del regime di agitazione. Resa in H_2 (A), Produttività massima (B) e $\%H_2$ nel biogas (C).

Sulla base dell'andamento dei diagrammi A e C è possibile osservare come l'intensità di agitazione influenzi fortemente l'efficienza del sistema fermentativo in termini di produzione di Bio- H_2 . Sempre da tali diagrammi si ricava come la condizione di agitazione intermedia tra quelle testate, 500 rpm, sia quella che garantisce i migliori risultati del processo in termini di resa in H_2 e produttività.

Questo risultato è legato al fatto che, come affermato nei capitoli precedenti, gli HPB sono estremamente sensibili alla pressione parziale di H_2 nel sistema; infatti un'eccessiva concentrazione di H_2 influisce negativamente sugli HPB, in quanto li inibisce. Sulla base di quanto appena asserito, risulta quindi ovvio come all'aumentare della velocità di agitazione, si favorisce il degassaggio del sistema impedendo di conseguenza di raggiungere valori critici di pressione parziale di H_2 ; all'aumentare della velocità di miscelazione migliorano inoltre i coefficienti di scambio di materia andando di conseguenza a favorire l'apporto di substrato alla biofase. D'altra parte però, un'eccessiva intensità di agitazione genera tutta una serie di sforzi idrodinamici all'interno del sistema che vanno a scaricarsi sulla biofase, la cui attività è estremamente suscettibile agli sforzi di taglio generati all'interno del sistema. L'influenza di un'eccessiva agitazione è possibile osservarla in tutti i diagrammi rappresentati in figura 6.9, in corrispondenza della velocità di agitazione di 800 rpm; a tale intensità di miscelazione si ha infatti un crollo delle prestazioni del sistema fermentativo sia in termini di resa in H_2 , produttività massima e $\%H_2$ nel biogas.

Tale comportamento del sistema fermentativo al variare dell'intensità di agitazione, può essere ulteriormente spiegato dal fatto che, come riportato nel Capitolo 2, i microrganismi all'interno di un sistema biologico qual si voglia non sono mai isolati ma, lavorano in stretto contatto con gli altri microrganismi allo scopo di favorire tutta una serie di processi che altrimenti non potrebbero avvenire;

tale comportamento prende il nome di sintrofia. Sulla base di questo i microrganismi, presenti all'interno del sistema fermentativo, tendono dunque a formare degli aggregati riducendo la distanza che intercorre tra i singoli batteri in modo da favorire i vari trasferimenti elettronici interspecie (DIET e SIET) per mezzo dei quali avvengono le varie reazioni di conversione del substrato in idrogeno.

Tali aggregati, detti granuli microbici, sono estremamente sensibili agli stress idrodinamici generati dal sistema di agitazione; questi sforzi, strettamente legati all'intensità di agitazione, vanno quindi ad agire sul processo di formazione dei granuli e sui granuli già esistenti, interferendo con i meccanismi di trasferimento elettronico interspecie instauratosi tra i batteri presenti nell'aggregato. In particolare per regimi di agitazione estremamente elevati (800 rpm), gli sforzi idrodinamici sono tali da distruggere gli aggregati ponendo fine alle interazioni tra i vari partner sintrofici.

In fase di sperimentazione sono state valutate le dimensioni dei granuli microbici formati a vari regimi idrodinamici, tali valori, riportati nel capitolo precedente, se confrontate con la scala di Kolmogorov, la quale fornisce un'indicazione della dimensione degli eddies presenti nel sistema agitato, presentano dei valori estremamente simili alla dimensione di Kolmogorov. I valori di η per i vari regimi di agitazione sono riportati in tabella 6.5, insieme alle dimensioni stimate dei granuli di HPB attraverso il microscopio.

Tabella 6.5 Confronto dimensioni Kolmogorov e dimensioni granuli HPB a vari rpm

	Prova		
Velocità di agitazione (rpm)	200	500	800
N_{Re}	1008	2521	4033
Dimensione di Kolmogorov η (μm)	501,72	252,35	177,38
Dimensione media granuli HPB, D_m (μm)	450,37 \pm 13,41	255,35 \pm 8.34	178,44 \pm 5.41

Tali valori sono riportati graficamente in figura 6.8.

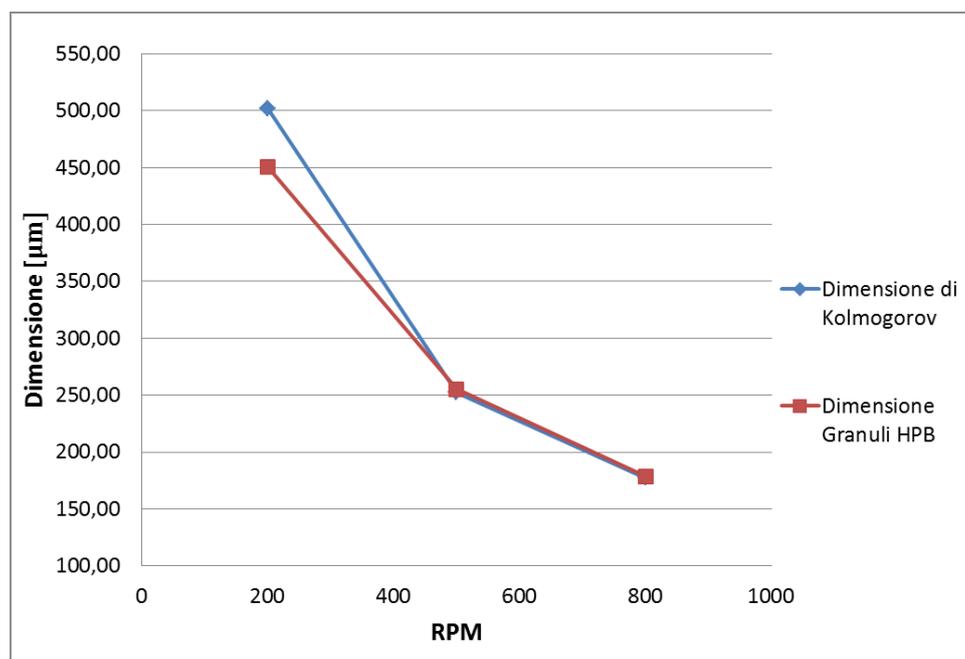


Figura 6.8 Confronto tra dimensione granuli HPB e scala di Kolmogorov

Sulla base dell'andamento riportato dalle due curve, risulta evidente come, fatta eccezione per il caso a 200 rpm, le dimensioni dei granuli di HPB tendano alla dimensione di Kolmogorov corrispondente ad una certa velocità di agitazione. Questo accade perché l'intensità degli sforzi di taglio esercitati sulla biofase è strettamente legata alle dimensioni relative tra i granuli di HPB e gli eddies generati. In particolare, come è possibile osservare nel grafico, per le velocità di 500 e 800 rpm, si ha che le dimensioni dei granuli sono praticamente coincidenti con la dimensione degli eddies; questa corrispondenza è legata al fatto che gli eddies impattando contro i granuli effettuano su di essi un'azione erosiva riducendo progressivamente le loro dimensioni. Tale meccanismo erosivo continua fino a quando i granuli non raggiungono la medesima dimensione degli eddies generati, una volta in queste condizioni gli aggregati vengono trasportati dagli eddies senza subire più alcuna azione di tipo disgregativo. Solo nel caso a 200 rpm, si è osservata una dimensione media dei granuli minore della dimensione di Kolmogorov. Una possibile motivazione di questo fatto potrebbe essere che, a causa delle prove fermentative di breve durata (48-56 ore), la biofase nella prima prova fermentativa non abbia avuto il tempo di crescere abbastanza per raggiungere la dimensione di Kolmogorov corrispondente a tale regime idrodinamico. Nelle altre prove invece, poiché partivano tutte utilizzando come inoculo una porzione del brodo di fermentazione proveniente dalla precedente prova, i granuli microbici in essa presenti presentavano inizialmente dimensioni maggiori di quelle degli eddies corrispondenti al valore di velocità di agitazione impostato che per il fenomeno sopra descritto si sono poi uniformate alla dimensione di tali eddies.

6.3 PROVA DI FERMENTAZIONE: PRODUZIONE DI BIO-CH₄ A DIVERSI REGIMI IDRODINAMICI

Sulla base dei dati di produzione di gas registrati nelle varie prove, rappresentati nelle figure 5.14, 5.15 e 5.16, attraverso il modello di Gompertz a tre parametri, è stato possibile valutare i parametri e il rendimento di produzione di Bio-CH₄.

In tabella 6.6, sono riportati i parametri del modello impiegato, per le tre prove a diversi rpm.

Tabella 6.6 Parametri modello di Gompertz per Bio-CH₄

	Velocità di agitazione (rpm)		
	70	120	200
G_{max} (L CH₄/g_{vs})	0,1811	0,1244	0,04900
R_{max} (L CH₄/g_{vs}·h)	0,02881	0,01605	0,004138
λ – lag phase (h)	33,2352	34,4088	88,0344
R²	0,9993	0,9983	0,9976

Le curve modellate con Gompertz per le prove di produzione di bio-CH₄ a diversi rpm sono riportate in Appendice F.

I parametri di efficienza del processo, a varie velocità di agitazione, sono messi a confronto per le varie configurazioni del sistema in figura 6.9.

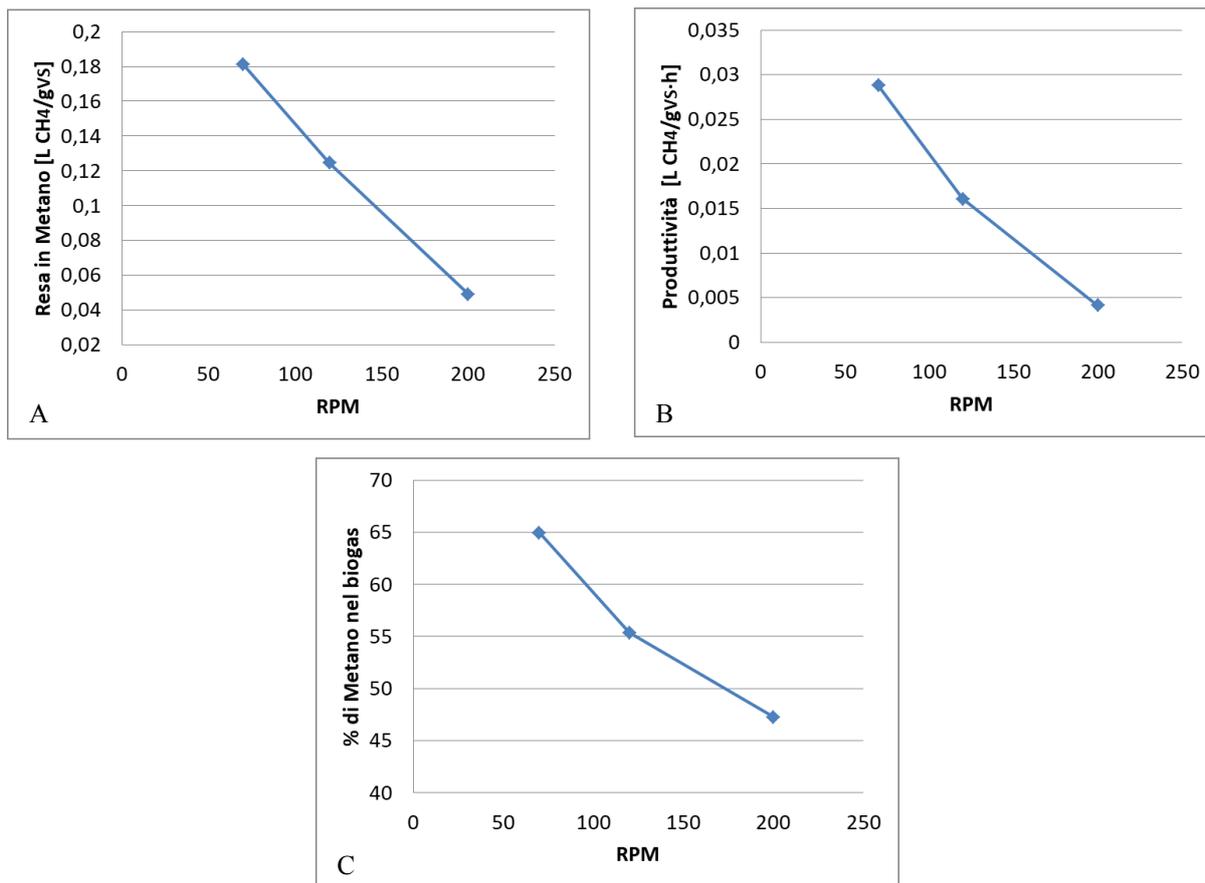


Figura 6.9 Parametri di efficienza del processo al variare del regime di agitazione. Resa in CH₄ (A), Produttività massima (B) e %CH₄ nel biogas (C).

Anche in questo caso, osservando i grafici sopra riportati, è possibile osservare come l'intensità di agitazione influenzi fortemente l'efficienza del sistema fermentativo in termini di produzione di Bio-CH₄; qui a differenza del caso precedente relativo alla produzione di Bio-H₂ si ha che con l'aumentare della velocità di agitazione, le prestazioni del sistema peggiorano progressivamente. Ne consegue che la migliore configurazione per la produzione di Bio-CH₄ è rappresentata da una velocità di miscelazione di 70 rpm.

Questo comportamento può essere giustificato facendo riferimento alla struttura dei granuli microbici metanigeni, descritti nel dettaglio nel paragrafo 2.3.2. Queste strutture, a differenza dei granuli di HPB sono estremamente più complesse e delicate a causa dei fenomeni sintrofici che vengono a formarsi tra le diverse tipologie di microrganismi, ognuna avente un compito ben definito e fondamentale nel processo di formazione di CH₄. Anche in questo caso all'interno di tali strutture si verificano tutta una serie di trasferimenti elettronici interspecie tra i vari partner sintrofici. Queste strutture, facendo riferimento al paragrafo 2.3.2, sono costituite da un nucleo più denso formato da HCB (ad esempio *Methanosarcina*) intorno al quale aderiscono, per mezzo di un biopolimero (EPS) i microrganismi acetogenici che forniscono acetato ai metanigeni nel bulk del granulo, i quali sono a loro volta legati ai HPB che forniscono idrogeno per la via omoacetogenica. Ne risulta quindi un sistema, con un equilibrio tra le varie specie presenti, estremamente delicato che al crescere degli sforzi idrodinamici tende a disgregarsi con conseguente diminuzione dell'attività metabolica.

Anche in questo caso dunque, in fase di sperimentazione sono state valutate le dimensioni dei granuli microbici formati a vari regimi idrodinamici, tali valori, riportati nel capitolo precedente, se confrontate con la scala di Kolmogorov, la quale fornisce un'indicazione della dimensione degli

eddies presenti nel sistema agitato, presentano dei valori estremamente simili alla dimensione di Kolmogorov. I valori di η per i vari regimi di agitazione sono riportati in tabella 6.7, insieme alle dimensioni stimate dei granuli di HCB attraverso il microscopio.

Tabella 6.7 Confronto dimensioni Kolmogorov e dimensioni granuli HCB a vari rpm

Velocità di agitazione (rpm)	Prova		
	70	120	200
N_{Re}	352,92	605,00	1008,33
Dimensione di Kolmogorov η (μm)	1102,57	735,95	501,72
Dimensione media granuli HCB, D_m (μm)	$1.042,11 \pm 16,46$	$712,66 \pm 8,49$	$519,41 \pm 17,11$

Tali valori sono riportati graficamente in figura 6.10.

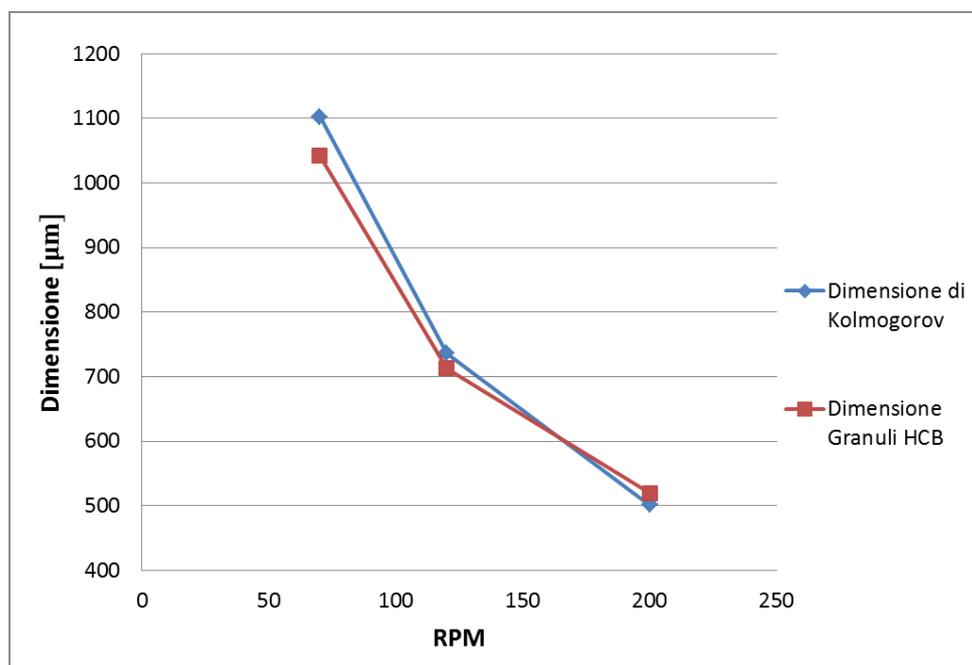


Figura 6.10 Confronto tra dimensione granuli HCB e scala di Kolmogorov

Anche in questo caso, osservando l'andamento riportato dalle due curve, risulta evidente come, fatta eccezione per il caso a 70 rpm, le dimensioni dei granuli di HCB tendano alla dimensione di Kolmogorov corrispondente ad una certa velocità di agitazione. Questo accade perché l'intensità degli sforzi di taglio esercitati sulla biofase è strettamente legata alle dimensioni relative tra i granuli di HCB e gli eddies generati. In particolare, come è possibile osservare nel grafico, per le velocità di 120 e 200 rpm, si ha che le dimensioni dei granuli sono praticamente coincidenti con la dimensione degli eddies. Questa corrispondenza è legata al fatto che gli eddies impattando contro i granuli effettuano su di essi un'azione erosiva, riducendo progressivamente le loro dimensioni, che continua fino a che i granuli non raggiungono la medesima dimensione degli eddies generati; una volta in queste condizioni gli aggregati vengono trasportati dagli eddies senza subire più alcuna azione di tipo disgregativo.

Anche qui, solo nel caso della condizione a minore velocità di agitazione si è osservata una dimensione media dei granuli minore della dimensione di Kolmogorov. Una possibile spiegazione può essere che, essendo la prima prova effettuata, la concentrazione di biofase non era tale da far raggiungere ai granuli tale dimensione nel corso della fermentazione; infatti è risaputo che gli HCB a differenza degli HPB presentano dei tempi di crescita estremamente più alti. Nelle altre prove

invece, come nel caso degli HPB, poiché partivano tutte utilizzando come inoculo una porzione del brodo di fermentazione proveniente dalla precedente prova, i granuli microbici in essa presenti presentavano inizialmente dimensioni maggiori di quelle degli eddies corrispondenti al valore di velocità di agitazione impostato che per il fenomeno sopra descritto si sono poi uniformate alla dimensione di tali eddies.

6.4 CONSIDERAZIONI: TEMPI MEDI DI CIRCOLAZIONE E DIMENSIONE DEI GRANULI MICROBICI

Fino ad ora, nel riportare i risultati delle dimensioni dei granuli microbici misurati si è sempre parlato di dimensione media degli aggregati (D_m); questa dicotomia lascia presupporre dunque che all'interno di un brodo fermentativo, caratterizzato da un certo regime idrodinamico, la dimensione dei granuli microbici segua una certa distribuzione dimensionale. Sulla base però di quanto detto nei due paragrafi precedenti, risulta ovvio che parlare di diametro medio dei granuli microbici non è propriamente corretto in quanto in realtà, supponendo di protrarre la prova per un tempo infinito, quello che si otterrebbe alla fine sarebbe un brodo contenente granuli aventi tutta la stessa dimensione e corrisponderebbe alla dimensione di Kolmogorov caratterizzante il sistema in analisi.

Quanto appena affermato può essere spiegato andando ad analizzare i fenomeni di crescita dei granuli su una scala temporale. Come già affermato precedentemente, ogni tipologia di microrganismo è caratterizzata da un certo tempo di crescita, in particolare rimanendo in questo contesto, gli HPB presentano dei tempi di crescita dell'ordine delle ore, mentre gli HCB presentano dei tempi di crescita dell'ordine dei giorni. Andando a confrontare tali tempi caratteristici con i tempi medi di circolazione all'interno di un bioreattore (in questo caso compresi tra i 50 s e i 150 s, a seconda del regime di agitazione) risulta evidente il motivo per cui il granulo non può crescere oltre la dimensione caratteristica di Kolmogorov, determinante la dimensione degli eddies nel sistema. Infatti, attribuendo alla crescita il fenomeno di AGGREGAZIONE e alla circolazione il fenomeno della DISGREGAZIONE, si ha che i fenomeni di aggregazione che portano alla crescita del granulo sono estremamente più lenti di quelli disgreganti in quanto la frequenza con cui si presentano i fenomeni disgreganti, collegati ai fenomeni circolatori, è maggiore della frequenza dei fenomeni di aggregazione. Poiché i fenomeni di circolazione sottopongono la biofase ad uno stress idrodinamico, si ha dunque una progressiva erosione dell'aggregato che termina quando quest'ultimo raggiunge la dimensione di Kolmogorov caratterizzante il sistema in questione.

6.5 PROVA DI FERMENTAZIONE: PRODUZIONE DI BIO- H_2 IN PRESENZA DI ZVI

Sulla base dei dati di produzione di gas registrati nelle varie prove, rappresentati nelle figure 5.10, 5.11, 5.12 e 5.13, è stato possibile effettuare, attraverso il modello di Gompertz a tre parametri, è stato possibile valutare i parametri e il rendimento di produzione di Bio- H_2 in assenza di ZVI (Prove 1 e 2) e in presenza di ZVI (Prove 3 e 4). In tabella 6.8, sono riportati i parametri del modello impiegato, per le quattro prove eseguite.

Tabella 6.8 Parametri modello di Gompertz per Bio- H_2 in presenza e in assenza di ZVI

	PROVA			
	1	2	3	4
G_{max} ($l H_2/g_{vs}$)	0,0449	0,0804	0,0833	0,1142
R_{max} ($l H_2/g_{vs} \cdot h$)	0,0051	0,0026	0,0025	0,0036
$\lambda - \text{lag phase (h)}$	6,6112	2,2882	2,7979	1,8678
R^2	0,9955	0,9983	0,9956	0,9965

Le curve modellate con Gompertz per le prove di produzione di bio-H₂ in presenza di ZVI sono riportate in Appendice G.

Al fine di confrontare tra loro i risultati in figura 6.11 sono riportate tutte e quattro le curve modellate con Gompertz a tre parametri.

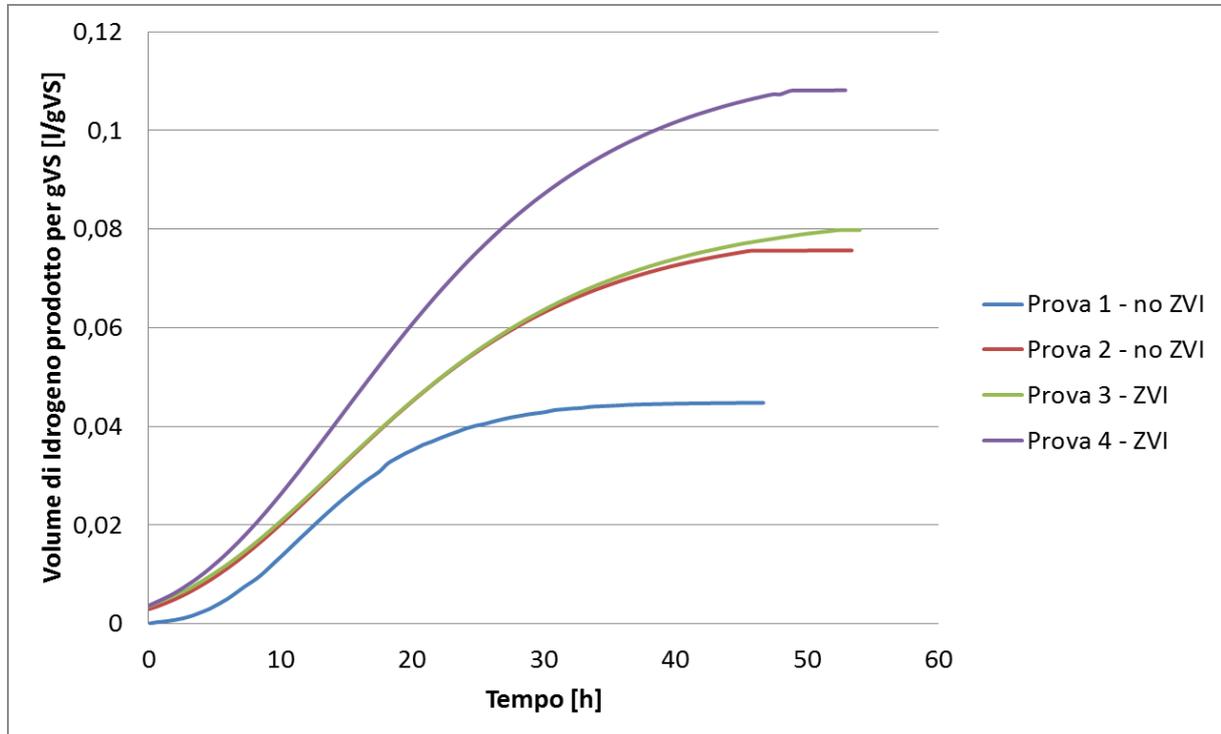


Figura 6.11 Curve modellate messe a confronto

Analizzando le singole prove è possibile fare le seguenti considerazioni:

- Nella prima prova, condotta in assenza di ZVI, si ha una modesta produzione di idrogeno legata molto probabilmente al fatto che la biofase non risulta ancora perfettamente adattata al sistema fermentativo;
- Nella seconda prova, condotta in assenza di ZVI, a seguito della crescita della biofase e al suo adattamento al sistema (tempo di latenza inferiore alla prova 1), la resa del processo in termini di idrogeno è più elevata;
- Nella terza prova, condotta in presenza di ZVI, si osserva un leggero incremento di produttività. In questa prova si osserva un aumento della fase di latenza, probabilmente legata al fatto che la biofase deve adattarsi alle nuove condizioni del sistema.
- Nella quarta e ultima prova, anch'essa condotta in presenza di ZVI, si può osservare un notevole miglioramento delle prestazioni del sistema. Che confrontata con i risultati della seconda prova permette di stimare un incremento di produzione di idrogeno di circa il 30%.

La differenza di prestazioni tra le ultime due prove può dipendere dal fatto che i microrganismi esposti al ZVI abbiano impiegato la terza prova per adattarsi alla presenza di ferro, riproducendosi e dando vita ad una generazione adattata a tale ambiente; solo dopo nella quarta prova si è poi potuto apprezzare tale incremento di prestazioni.

Come è possibile osservare sia dai dati riportati in tabella 6.8 che dall'andamento delle curve in figura 6.20, l'aggiunta di ferro zero valente al sistema fermentativo causa quindi un incremento in termini di resa di produzione di idrogeno.

Una possibile spiegazione, di quanto accaduto in tale prova sperimentale, può essere data andando a considerare come interagisce il ferro nella sua forma Fe^0 o in forma ossidata, a seguito di fenomeni di corrosione che avvengono all'interno del sistema, con i microrganismi fermentativi. Tra le numerose ipotesi esistenti in merito a questa faccenda, una vede il Fe^0 attivamente coinvolto nei fenomeni di trasferimento elettronico interspecie di tipo diretto (DIET), dove va a porsi tra le varie specie di microrganismi facendo da collegamento elettrico per il trasporto di elettroni che avviene durante le varie reazioni del processo fermentativo. Un'altra ipotesi vede il ferro coinvolto nella formazione di un mediatore RedOx che prende parte nel processo di fermentazione anaerobica, la Ferredoxina, la cui formazione è strettamente legata alla biodisponibilità del ferro all'interno del brodo di fermentazione.

Nel corso di questo lavoro non si è indagato ulteriormente sui meccanismi con cui il ferro partecipa al processo di fermentazione; l'obiettivo di questa prova era quello di effettuare uno studio preliminare sull'effetto dell'additivazione del ferro zero valente sulle prestazioni del sistema fermentativo in termini di produzione di bio- H_2 .

7 CONCLUSIONI

Nel corso di questo lavoro di tesi è stato studiato come le condizioni di miscelazione influiscono sulle prestazioni del processo di fermentazione anaerobica in termini di produzione di bio-H₂ e bio-CH₄.

Quello che è emerso da tale studio, a seguito di una serie di studi preliminari sull'idrodinamica del sistema miscelato, è che:

- Nel caso delle prove di produzione di bio-H₂ sono stati testati tre regimi di agitazione, 200, 500 e 800 rpm. Quello che si è osservato dalle varie prove effettuate, è che un primo aumento di agitazione da 200 rpm a 500 rpm provoca un aumento della resa di produzione di H₂. Tale aumento di produttività è giustificato dal fatto che incrementando l'agitazione del sistema si aumentano i coefficienti di scambio di materia e, allo stesso tempo si favorisce il degasaggio del sistema andando a ridurre in questo modo il quantitativo di idrogeno disciolto nel sistema, il quale se presente in concentrazioni troppo elevate ha un effetto inibente sull'attività microbica. Incrementando però ulteriormente la velocità di agitazione fino a 800 rpm l'efficienza di produzione del sistema crolla in quanto, gli stress idrodinamici generati sono tali da andare a distruggere gli aggregati microbici presenti nel sistema fermentativo andando a interferire con i fenomeni di trasferimento elettronico interspecie, il cui funzionamento è strettamente legato alla distanza tra i microrganismi coinvolti.
- Nel delle prove di produzione di bio-CH₄ sono stati testati tre regimi di agitazione differenti, 70, 120 e 200 rpm. In questo caso quello che si è osservato è che all'aumentare della velocità di agitazione del sistema, le prestazioni di quest'ultimo peggiorano progressivamente. Questa diminuzione progressiva di produzione di metano è strettamente legata alla configurazione degli aggregati di batteri metanigeni, i quali sono estremamente suscettibili agli stress idrodinamici in quanto, la loro struttura è costituita da specie batteriche presenti in un perfetto equilibrio tra loro. Ne consegue che la distruzione di tale equilibrio, di natura sintrofica, porta alla perdita totale di attività da parte dell'aggregato. Sulla base di tali prove si ha che per il caso della produzione di metano, il valore ottimale di miscelazione è pari a 70 rpm.
- In parallelo, per ognuna delle due campagne di prove sperimentali sopra menzionate, a conferma degli effetti legati agli sforzi idrodinamici, sono state valutate le dimensioni dei granuli microbici per diversi regimi di agitazione. Quello che è emerso da tali prove è che le dimensioni dei granuli tendono a uniformarsi nell'intorno della microscala di Kolmogorov calcolata per i diversi sistemi. Quanto osservato lascia quindi presupporre la presenza, all'interno del sistema, di fenomeni disgreganti, generati dall'interazione degli eddies con i granuli di dimensioni comparabili, che si oppongono ai fenomeni di crescita che tenderebbero a far aumentare di dimensione l'aggregato. Queste interazioni fanno sì che le dimensioni dei granuli tendano ad assumere un valore simile alle dimensioni degli eddies generati.

Infine, un'ultima prova di fermentazione è stata effettuata al fine di valutare gli effetti dell'aggiunta di ZVI al sistema fermentativo. Quanto emerso da questa prova è che in presenza di ferro, il sistema, dopo una prima fase di adattamento dove non si rilevano apprezzabili incrementi di prestazione, presenta un aumento di resa, in termini di produzione di bio-H₂ pari a circa il 30% rispetto al sistema operante in assenza di ZVI. Questo effetto può essere attribuito al fatto che:

- il ferro rendendosi biodisponibile all'interno del sistema fermentativo contribuisce ad aumentare la concentrazione di Ferredoxina, un mediatore RedOx coinvolto nel processo di fermentazione;
- il ferro in forma Fe^0 funge da carrier elettronico tra le diverse specie microbiche andando a incrementare il trasferimento elettronico interspecie diretto (DIET).

APPENDICE A

APPENDICE A: COMPOSIZIONE OMW

In Tabella A1 è riportata la composizione dettagliata della frazione organica dei rifiuti mercatali impiegata per la preparazione del substrato. Tali dati sono stati ricavati dall'USDA [69].

Tabella A.1 Composizione OMW

Costituenti	Massa [g]	Acqua contenuta [g]	Composizione per 100g di frutta						Minerali per 100g di frutta						
			Acqua [g]	Proteine [g]	Lipidi [g]	Carboidrati [g]	Fibre [g]	Zuccheri [g]	Calcio [mg]	Ferro [mg]	Magnesio [mg]	Fosforo [mg]	Potassio [mg]	Sodio [mg]	Zinco [mg]
Ananas	270,80	232,89	86,00	0,54	0,12	13,12	1,40	9,85	13,00	0,29	12,00	8,00	109,00	1,00	0,12
Peperone rosso	791,20	729,57	92,21	0,99	0,30	6,03	2,10	4,20	7,00	0,43	12,00	26,00	211,00	4,00	0,25
Banana	631,86	473,33	74,91	1,09	0,33	22,84	2,60	12,23	5,00	0,26	27,00	22,00	358,00	1,00	0,15
Patata	1164,40	922,79	79,25	2,05	0,09	17,49	2,10	0,82	12,00	0,81	23,00	57,00	425,00	6,00	0,30
Pomodoro	819,15	774,26	94,52	0,88	0,20	3,89	1,20	2,63	10,00	0,27	11,00	24,00	237,00	5,00	0,17
Mela	789,54	675,53	85,56	0,26	0,17	13,81	2,40	10,39	6,00	0,12	5,00	11,00	107,00	1,00	0,04
Kiwi	537,70	446,67	83,07	1,14	0,52	14,66	3,00	8,99	34,00	0,31	17,00	34,00	312,00	3,00	0,14
Melanzana	164,51	151,84	92,30	0,98	0,18	5,88	3,00	3,53	9,00	0,23	14,00	24,00	229,00	2,00	0,16
Carota	315,75	278,78	88,29	0,93	0,24	9,58	2,80	4,74	33,00	0,30	12,00	35,00	320,00	69,00	0,24
Limone	268,60	237,01	88,24	1,14	0,30	9,99	3,58	2,67	36,80	0,62	8,70	15,60	140,20	2,40	0,08
Cipolla	408,72	364,21	89,11	1,10	0,10	9,34	1,70	4,24	23,00	0,21	10,00	29,00	146,00	4,00	0,17
Sedano	389,84	372,02	95,43	0,69	0,17	2,97	1,60	1,34	40,00	0,20	11,00	24,00	260,00	80,00	0,13
Pera	413,70	347,34	83,96	0,36	0,14	15,23	3,10	9,75	9,00	0,18	7,00	12,00	116,00	1,00	0,10
Prugna	106,92	93,27	87,23	0,70	0,28	11,42	1,40	9,92	6,00	0,17	7,00	16,00	157,00	0,00	0,10
Lattuga verde	270,23	256,66	94,98	1,36	0,15	2,87	1,30	0,78	36,00	0,86	13,00	29,00	194,00	28,00	0,18

Costituenti	Massa [g]	Acqua contenuta [g]	Composizione per 100g di frutta						Minerali per 100g di frutta						
			Acqua [g]	Proteine [g]	Lipidi [g]	Carboidrati [g]	Fibre [g]	Zuccheri [g]	Calcio [mg]	Ferro [mg]	Magnesio [mg]	Fosforo [mg]	Potassio [mg]	Sodio [mg]	Zinco [mg]
Broccolo	502,24	464,82	92,55	3,17	0,49	2,85	2,70	0,38	108,00	2,14	22,00	73,00	196,00	33,00	0,77
Mandarino	461,22	392,82	85,17	0,81	0,31	13,34	1,80	10,58	37,00	0,15	12,00	20,00	166,00	2,00	0,07
Arancia	258,61	224,34	86,75	0,94	0,12	11,75	2,40	9,35	40,00	0,10	10,00	14,00	181,00	0,00	0,07
Fico d'india	136,06	121,39	89,22	0,12	0,11	10,17	5,30	1,02	180,00	0,20	69,00	11,00	130,00	4,00	0,14
Caco	376,37	302,30	80,32	0,06	0,19	18,59	3,60	12,53	8,00	0,15	9,00	17,00	161,00	1,00	0,11
Prezzemolo	211,93	185,88	87,71	2,97	0,79	6,33	3,30	0,85	138,00	6,20	50,00	58,00	554,00	56,00	1,07
Uva	241,51	203,57	84,29	0,81	0,47	13,93	3,90	8,16	37,00	0,26	14,00	24,00	203,00	1,00	0,11
Rapa	79,40	72,94	91,87	0,90	0,10	6,43	1,80	3,80	30,00	0,30	11,00	27,00	191,00	67,00	0,27
Zuchina	270,62	250,95	92,73	2,71	0,40	3,11	1,10	4,11	21,00	0,79	33,00	93,00	459,00	3,00	0,83
Cavolfiore	653,68	601,84	92,07	1,92	0,28	4,97	2,00	1,91	22,00	0,42	15,00	44,00	299,00	30,00	0,27

APPENDICE B

APPENDICE B: MISURE TEMPI DI MISCELAZIONE E TEMPI DI CIRCOLAZIONE

Qui di seguito sono riportate i risultati delle prove effettuate per la valutazione dei tempi di circolazione e miscelazione per l'elica marina e la PBT-45°.

Tabella B.1 Risultati prove elica marina

Velocità di agitazione (rpm)	Posizione elettrodo	Tempo di miscelazione (s)	Tempi di circolazione
70	BASSO	50,00	16,00
		51,00	6,00
		49,00	11,00
	MEDIO	80,00	20,00
		89,00	22,25
		77,00	19,25
	ALTO	112,00	28,00
		117,00	29,25
		113,00	28,25
120	BASSO	35,00	6,00
		31,00	5,00
		28,00	5,00
	MEDIO	55,00	14,00
		61,00	15,00
		59,00	15,00
	ALTO	75,00	19,00
		72,00	18,00
		70,00	18,00
200	BASSO	19,00	5,00
		13,00	3,00
		13,00	3,00
	MEDIO	29,00	7,00
		33,00	8,00
		33,00	8,00
	ALTO	54,00	14,00
		44,00	11,00
		42,00	10,50

Tabella B.2 Risultati prove PBT-45°

Velocità di agitazione (rpm)	Posizione elettrodo	Tempo di miscelazione (s)	Tempi di circolazione
70	BASSO	48,00	8,00
		43,00	8,00
		47,00	6,00
	MEDIO	69,00	9,00
		70,00	10,00
		69,00	11,00
	ALTO	76,00	19,00
		73,00	18,25
		73,00	18,25
120	BASSO	25,00	6,25
		29,00	7,25
		25,00	6,25
	MEDIO	32,00	8,00
		29,00	7,25
		29,00	7,25
	ALTO	43,00	10,75
		47,00	11,75
		52,00	13,00
200	BASSO	11,00	2,75
		12,00	3,00
		11,00	2,75
	MEDIO	19,00	4,75
		14,00	3,50
		18,00	4,50
	ALTO	20,00	5,00
		21,00	5,25
		19,00	4,75

APPENDICE C

APPENDICE C: MISURE DIMENSIONE GRANULI HPB

In tabella C.1 sono riportati i valori delle misure effettuate per la stima delle dimensioni dei granuli di HPB.

Tabella C.1 Dimensioni granuli HPB

Dimensione Granuli HPB		
(µm)		
200 rpm	500 rpm	800 rpm
438,86	246,92	173,35
438,07	250,43	171,91
470,92	251,40	187,08
472,58	247,93	173,00
442,65	261,57	180,77
455,93	253,48	177,25
456,13	255,49	173,37
462,01	256,96	177,31
444,72	259,09	187,00
445,27	256,65	179,66
437,20	269,45	171,41
462,26	251,72	171,91
428,92	248,02	182,04
455,52	255,46	186,31
454,03	256,49	186,31
457,72	253,78	177,06
440,34	269,46	175,09
446,20	243,33	180,88
438,15	266,32	180,29
461,46	243,26	171,64
429,82	267,02	176,73
430,61	268,49	184,80
466,98	268,59	185,37
467,90	263,88	176,51
474,50	253,19	179,99
440,71	245,44	171,09
433,75	241,49	178,91
447,10	254,61	187,58
451,65	251,94	173,94
459,08	248,56	174,75

APPENDICE D

APPENDICE D: MISURE DIMENSIONE GRANULI HCB

In tabella D.1 sono riportati i valori delle misure effettuate per la stima delle dimensioni dei granuli di HCB.

Tabella D.1 Dimensioni granuli HCB

Dimensione Granuli HCB (μm)		
70 rpm	120 rpm	200 rpm
1.033,68	717,14	497,69
1.024,82	705,40	502,31
1.062,70	702,62	507,28
1.034,92	711,20	520,95
1.040,99	726,36	546,61
1.003,60	722,76	502,77
1.056,87	700,64	498,16
1.066,01	711,04	522,55
1.043,90	722,44	497,78
1.044,48	714,93	533,40
1.065,74	705,45	502,62
1.032,48	724,06	544,31
1.055,38	725,94	514,61
1.056,18	700,58	514,69
1.060,63	716,40	544,19
1.030,34	709,69	508,83
1.051,44	708,24	513,80
1.012,79	723,29	531,22
1.039,47	723,63	501,62
1.050,88	711,43	544,09
1.056,83	702,25	544,39
1.019,88	718,47	503,97
1.025,78	710,38	540,51
1.051,54	715,00	528,13
1.039,16	704,09	538,96
1.068,73	701,35	497,23
1.032,79	723,96	530,49
1.037,44	708,95	521,40
1.038,89	703,44	524,38
1.024,97	708,61	503,33

APPENDICE E

APPENDICE E: CURVE MODELLATE PROVE DI PRODUZIONE DI BIO-H₂ A DIVERSI RPM

Qui di seguito sono riportate le curve sperimentali e modellate messe a confronto per le prove di produzione di bio-H₂ a diversi rpm.

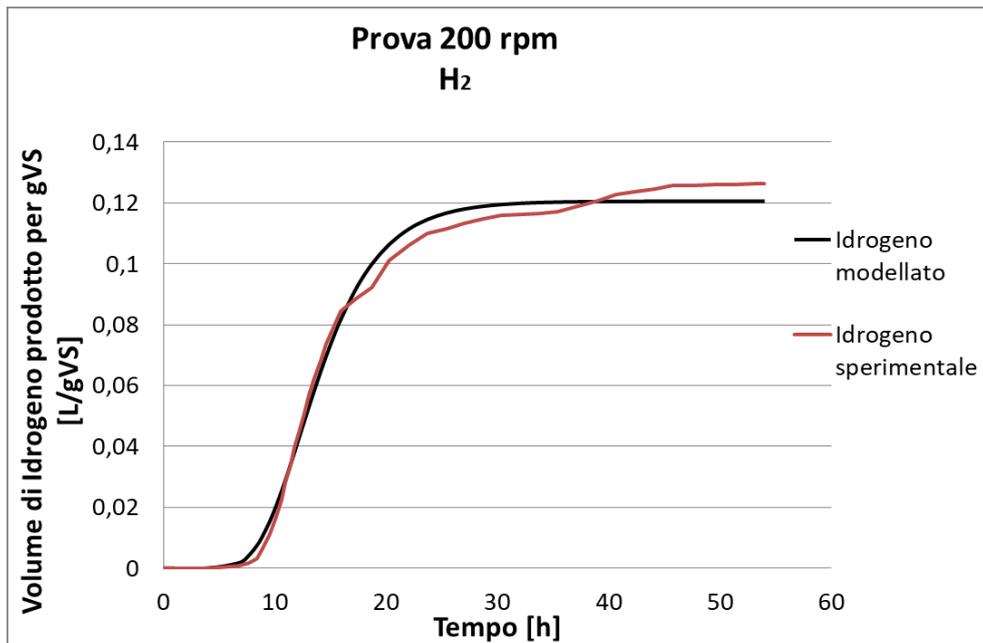


Figura E.1 Confronto curva sperimentale e modellata a 200 rpm per il bio-H₂

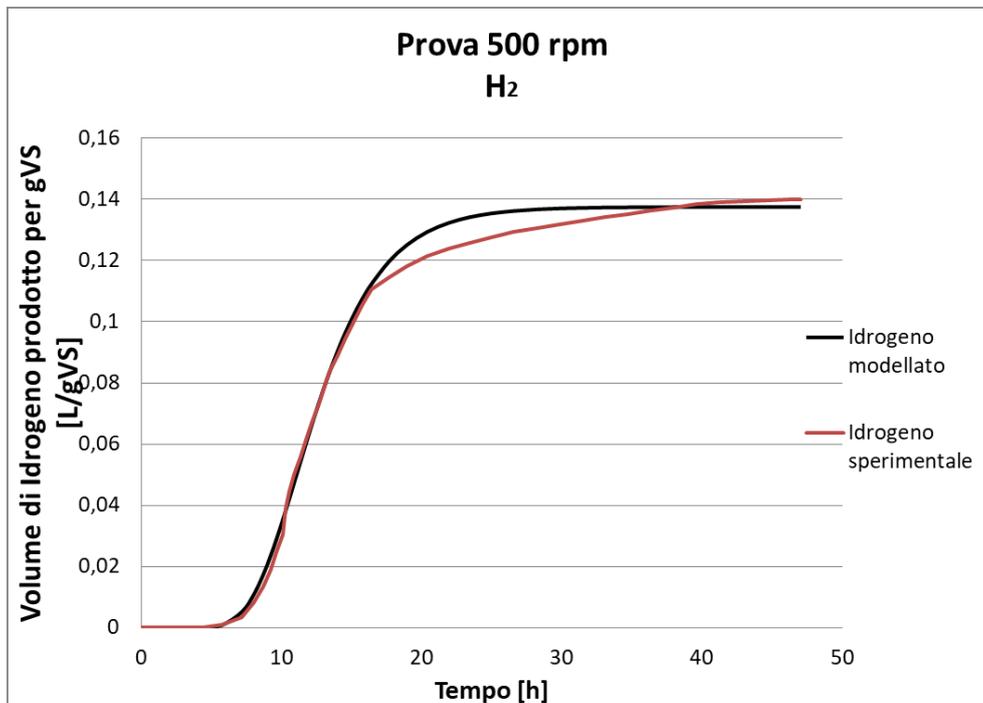


Figura E.2 Confronto curva sperimentale e modellata a 500 rpm per il bio-H₂

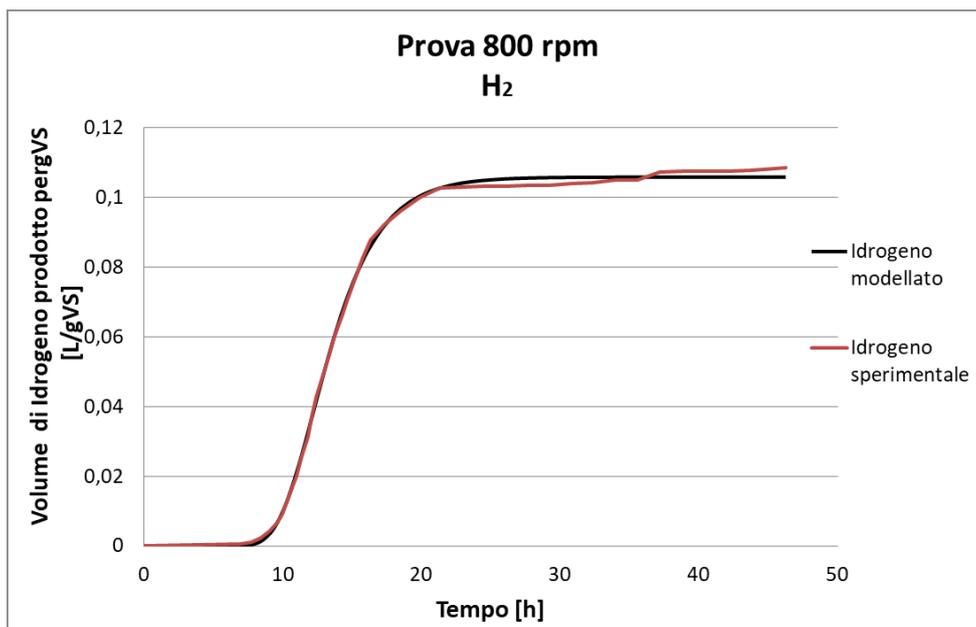


Figura E.3 Confronto curva sperimentale e modellata a 800 rpm per il bio-H₂

APPENDICE F: CURVE MODELLATE PROVE DI PRODUZIONE DI BIO-CH₄ A DIVERSI RPM

Qui di seguito sono riportate le curve sperimentali e modellate messe a confronto per le prove di produzione di bio-CH₄ a diversi rpm.

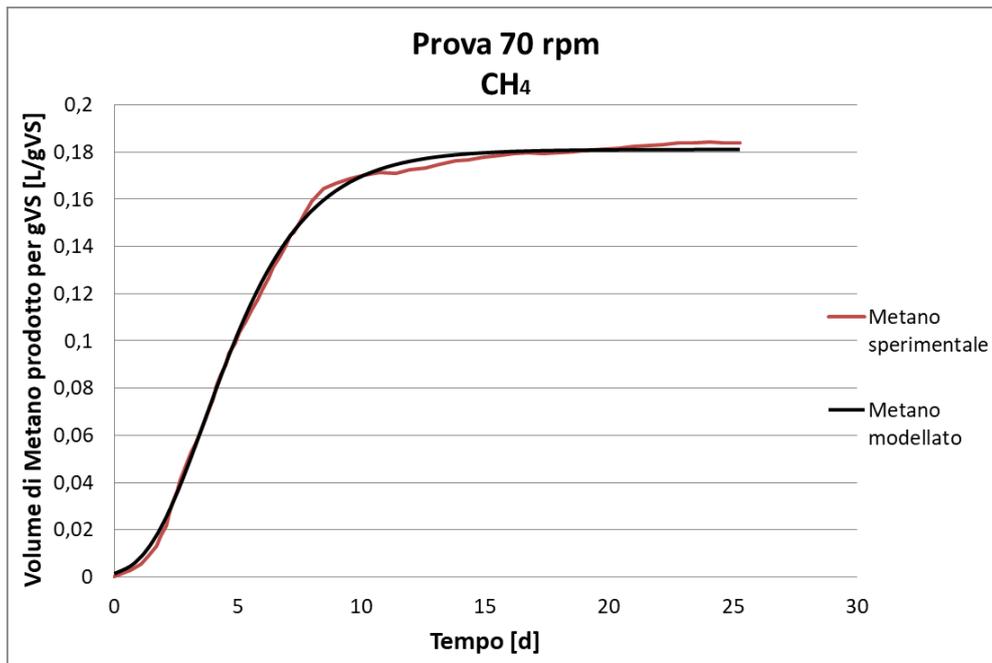


Figura F.1 Confronto curva sperimentale e modellata a 70 rpm per il Bio-CH₄

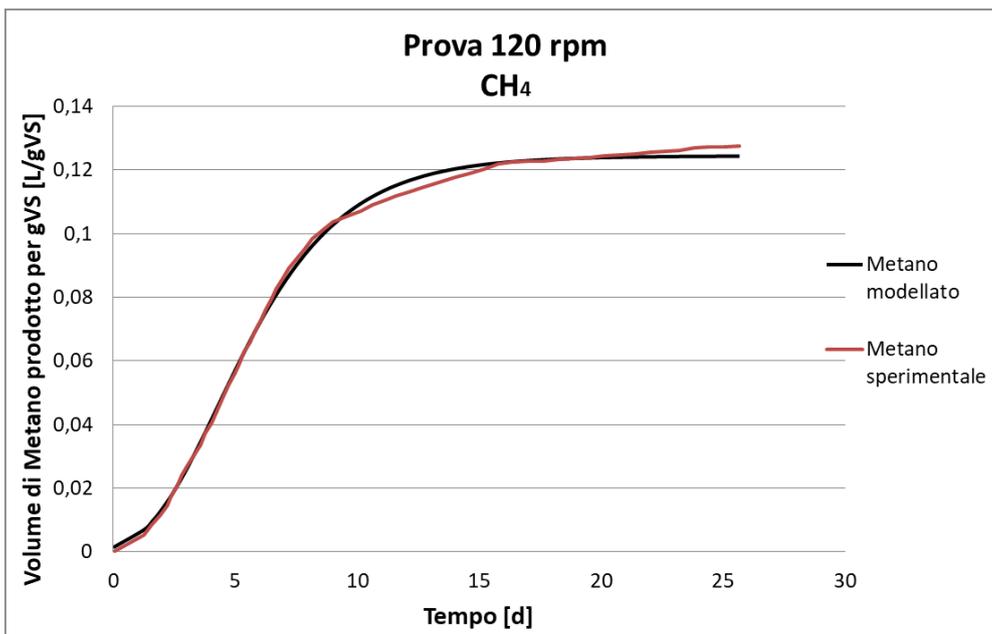


Figura F.2 Confronto curva sperimentale e modellata a 120 rpm per il Bio-CH₄

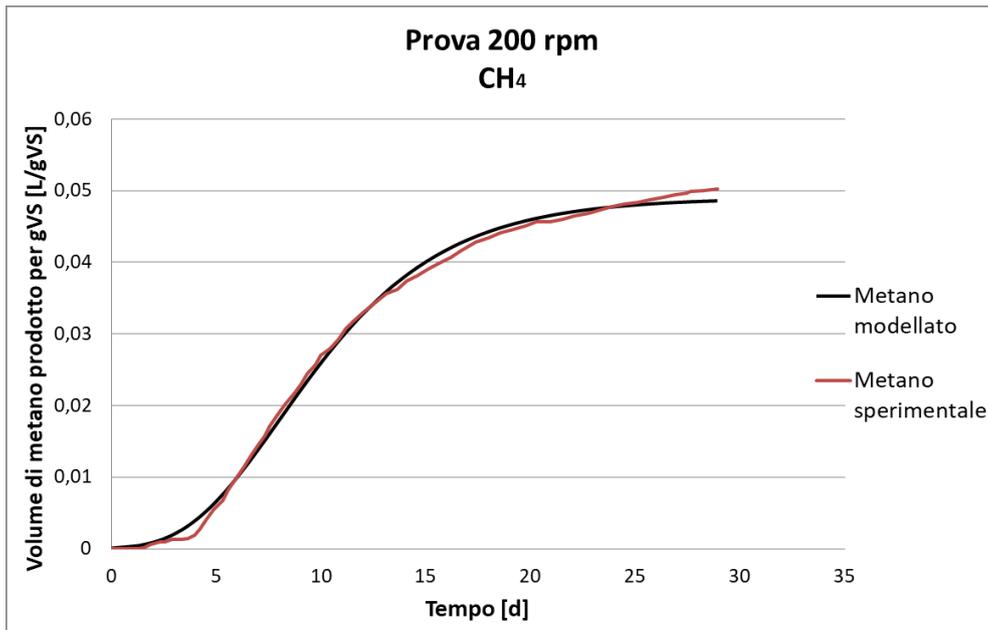


Figura F.3 Confronto curva sperimentale e modellata a 200 rpm per il Bio-CH₄

APPENDICE G: CURVE MODELLATE PROVE DI PRODUZIONE DI BIO-H₂ IN PRESENZA DI ZVI

Qui di seguito sono riportate le curve sperimentali e modellate messe a confronto per le prove di produzione di bio-H₂ in presenza di ZVI.

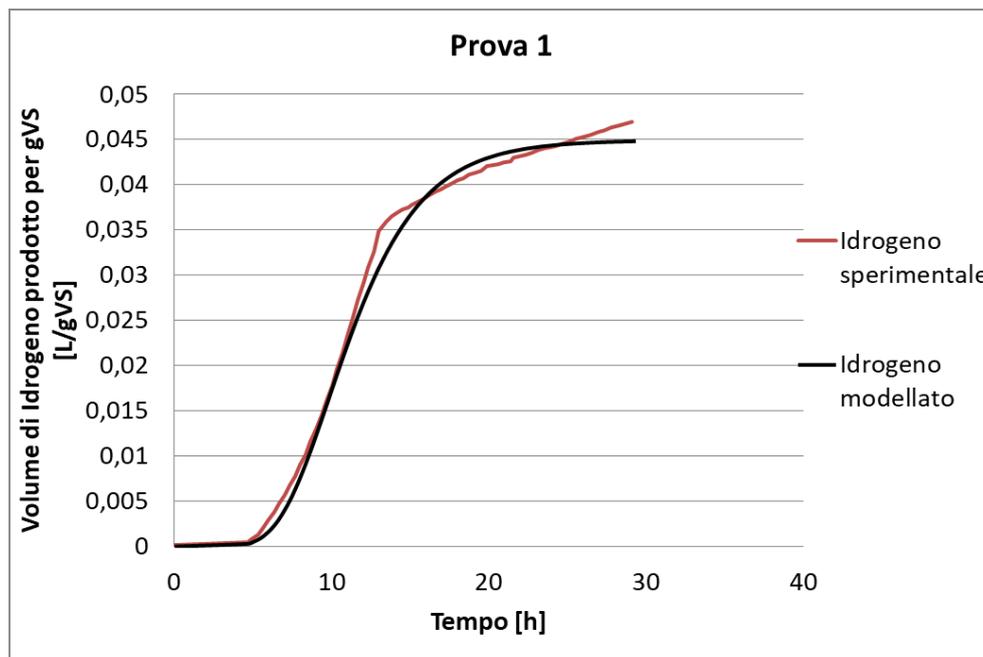


Figura G.1 Confronto curva sperimentale e modellata, in assenza di ZVI per il Bio-H₂

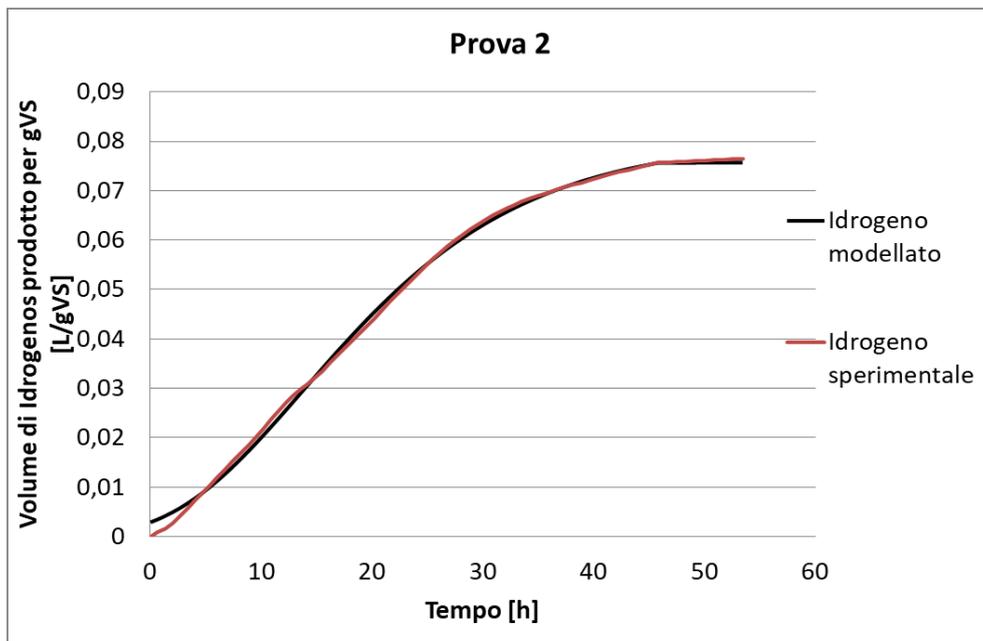


Figura G.2 Confronto curva sperimentale e modellata, in assenza di ZVI per il Bio-H₂

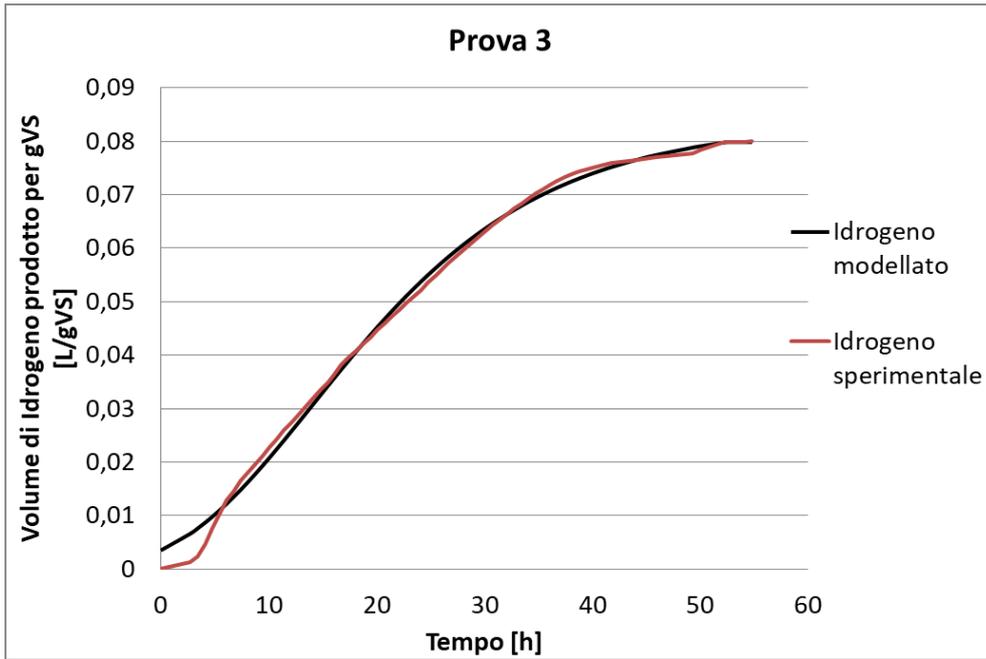


Figura G.3 Confronto curva sperimentale e modellata, in presenza di ZVI per il Bio-H₂

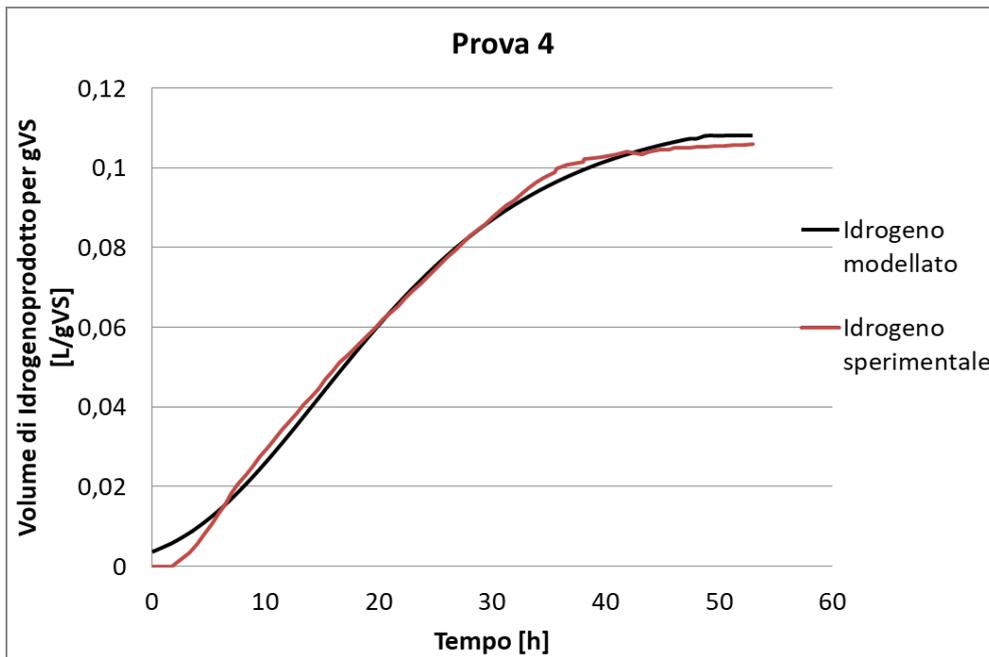


Figura G.4 Confronto curva sperimentale e modellata, in presenza di ZVI per il Bio-H₂

BIBLIOGRAFIA

- [1] C. Mao, Y. Feng, X. Wang, and G. Ren, "Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 45, pp. 540–555, 2015.
- [2] Observ'ER, "BIOGAS BAROMETER," *EUROBSERV'ER*, no. November, 2017 [Online] Available, <https://www.eurobserv-er.org/biogas-barometer-2017/> [Accessed: 23-Jun-2018].
- [3] Observ'ER, "BIOGAS BAROMETER," *EUROBSERV'ER*, no. November, pp. 104–119, 2010 [Online] Available . <https://www.eurobserv-er.org/biogas-barometer-2010/>, [Accessed: 23-May-2018].
- [4] B. Ruggeri, T. Tommasi, and S. Sanfilippo, *BioH2 & BioCH4 Through Anaerobic Digestion*. London: Springer London, 2015.
- [5] E. C. Bordoni Andrea, Romagnoli Emilio, Foppa pedretti Ester, Toscano Giuseppe, Rossini Giorgio, "La filiera del biogas," Regione Marche, pp. 1–49, 2010.
- [6] M. S. Rao, S. P. Singh, A. K. Singh, and M. S. Sodha, "Bioenergy conversion studies of the organic fraction of MSW: Assessment of ultimate bioenergy production potential of municipal garbage," *Appl. Energy*, vol. 66, no. 1, pp. 75–87, 2000.
- [7] T. W. M. Amen, O. Eljamal, A. M. E. Khalil, and N. Matsunaga, "Evaluation of nano zero valent iron effects on fermentation of municipal anaerobic sludge and inducing biogas production," *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, vol. 67, no. 1, 2017.
- [8] D.L.Nelson and M.MCox, *I principi di biochimica di Lehninger*, Zannichelli, 3th ed. Bologna, 2010.
- [9] M. H. Gerardi, "Bacteria," in *The Microbiology of Anaerobic Digesters*, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2003, pp. 11–16.
- [10] "18.3D: Electron Transport Chain and Chemisomosis," *Biology Libretexts*, 2018. [Online]. Available: [https://bio.libretexts.org/TextMaps/Microbiology/Book%3A_Microbiology_\(Kaiser\)/Unit_7%3A_Microbial_Genetics_and_Microbial_Metabolism/18%3A_Microbial_Metabolism/18.3%3A_Aerobic_Respiration/18.3D%3A_Electron_Transport_Chain_and_Chemisomosis](https://bio.libretexts.org/TextMaps/Microbiology/Book%3A_Microbiology_(Kaiser)/Unit_7%3A_Microbial_Genetics_and_Microbial_Metabolism/18%3A_Microbial_Metabolism/18.3%3A_Aerobic_Respiration/18.3D%3A_Electron_Transport_Chain_and_Chemisomosis). [Accessed: 23-Jun-2018].
- [11] D. Deublein and A. Steinhauser, *Biogas from Waste and Renewable Resources*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008.
- [12] ISPRA, "Processo di digestione anaerobica," 2010. [Online]. Available: www.isprambiente.gov.it/files/pubblicazioni/manuali-lineeguida/.../capitolo1.../file. [Accessed: 18-Jun-2018].
- [13] G. Dinopoulou, T. Rudd, and J. N. Lester, "Anaerobic acidogenesis of a complex wastewater: I. The influence of operational parameters on reactor performance," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 31, no. 9, pp. 958–968, 1988.
- [14] G. Di Bonaventura and D. Ph, "Spora batterica," 2016. [Online]. Available: http://www.ch.unich.it/med/papers/microbiologia2015/batteriologia_generale/2 MEDICINA - spora batterica.pdf.
- [15] J. H. Reith, R. H. Wijffels, and H. Barten, *Bio-methane & Bio-hydrogen: status and perspectives of biological methane and hydrogen production*. Dutch Biological Hydrogen Foundation - NOVEM, Hague 2003.
- [16] G. E. S. Ejiroghene Kelly Orhorhoro, Patrick Okechukwu Ebunilo, "Experimental Determination of Effect of Total Solid (TS) and Volatile Solid (VS) on Biogas Yield," *Am. J. Mod. Energy*, vol. 3, no. 6, pp. 131–135, 2017.
- [17] R. P. Chandra, R. Bura, W. E. Mabee, A. Berlin, X. Pan, and J. N. Saddler, "Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics," *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, vol. 108, pp.

67–93, 2007.

- [18] Y. W. Han and C. D. Callihan, “Cellulose fermentation: effect of substrate pretreatment on microbial growth.,” *Appl. Microbiol.*, vol. 27, no. 1, pp. 159–165, 1974.
- [19] L. Beckers, S. Hilgmsman, J. Masset, C. Hamilton, and P. Thonart, “Effects of hydrogen partial pressure on fermentative biohydrogen production by a chemotropic *Clostridium* bacterium in a new horizontal rotating cylinder reactor,” *Energy Procedia*, vol. 29, pp. 34–41, 2012.
- [20] J. Dolfing, “Microbiological aspects of granular methanogenic sludge.,” p. 78, 1987 [Online] Available <https://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/fulltext/201313>, [Accessed: 23-Jun-2018].
- [21] J. G. Zeikus, “The biology of methanogenic bacteria,” *Bacteriol. Rev.*, vol. 41, no. 2, pp. 514–541, 1977.
- [22] R. K. Porschen and P. Chan, “Anaerobic vibrio-like organisms cultured from blood: {*Idesulfovibrio*} {*Idesulfuricans*} and {*Succinivibrio*} species,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 5, no. 4, pp. 444–447, 1977.
- [23] B. P. Cardon and H. A. Barker, “Two New Amino-Acid-Fermenting Bacteria, *Clostridium propionicum* and *Diplococcus glycinophilus*,” *J. Bacteriol.*, vol. 52, no. 6, pp. 629–634, 1946.
- [24] C. E. Gomez Camacho and B. Ruggeri, “Syntrophic Microorganisms Interactions in Anaerobic Digestion (AD): a Critical Review in the Light of Increase Energy Production,” *Chem. Eng. Trans.*, vol. 64, no. April, 2018.
- [25] E. L. Iannotti, D. Kafkewit, M. J. Wolin, and M. P. Bryant, “Glucose Fermentation Products of *Ruminococcus-Albus* Grown in Continuous Culture with *Vibrio-Succinogenes* - Changes Caused by Interspecies Transfer of H_2 ,” *J. Bacteriol.*, vol. 114, no. 3, pp. 1231–1240, 1973.
- [26] R. K. Thauer, K. Jungermann, and K. Decker, “Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria.,” *Bacteriol. Rev.*, vol. 41, no. 1, pp. 100–180, 1977.
- [27] G. Baek, J. Kim, J. Kim, and C. Lee, “Role and potential of direct interspecies electron transfer in anaerobic digestion,” *Energies*, vol. 11, no. 1, 2018.
- [28] A. Stams, F. De Bok, C. Plugge, M. Van Eekert, J. Dolfing, and G. Schraa, “Exocellular electron transfer in anaerobic microbial communities,” *Environ. Microbiol.*, vol. 8, no. 3, pp. 371–382, 2006.
- [29] P. T. Ha *et al.*, “Syntrophic anaerobic photosynthesis via direct interspecies electron transfer,” *Nat. Commun.*, vol. 8, 2017.
- [30] S. Kato, K. Hashimoto, and K. Watanabe, “Microbial interspecies electron transfer via electric currents through conductive minerals,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 109, no. 25, pp. 10042–10046, 2012.
- [31] X. Deng, N. Dohmae, K. H. Neelson, K. Hashimoto, and A. Okamoto, “Multi-heme cytochromes provide a pathway for survival in energy-limited environments,” *Sci. Adv.*, vol. 4, no. 2, 2018.
- [32] S. R. Guiot, A. Pauss, and J. . Costerton, “A Structured Model of the Anaerobic Granule Consortium,” *Water Sci. Technol.*, vol. 27, no. 7, pp. 1–10, 1992.
- [33] X. W. Liu, G. P. Sheng, and H. Q. Yu, “Physicochemical characteristics of microbial granules,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 27, no. 6, pp. 1061–1070, 2009.
- [34] F. A. Macleod, S. R. Guiot, J. W. Costerton, and C. Hp, “Layered Structure of Bacterial Aggregates Produced in Anaerobic Sludge Bed and Filter Reactor Upflow,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 56, no. 6, pp. 1598–1607, 1990.
- [35] L. W. Hulshoff Pol, S. I. De Castro Lopes, G. Lettinga, and P. N. L. Lens, “Anaerobic sludge granulation,” *Water Res.*, vol. 38, no. 6, pp. 1376–1389, 2004.
- [36] L. W. Hulshoff Pol, W. J. De Zeeuw, C. T. M. Velzeboer, and G. Lettinga, “Granulation in UASB-reactors,” *Water Sci. Technol.*, vol. 15, no. 8–9, pp. 291–304, 1983.
- [37] J. H. F. Pereboom, “Size distribution model for methanogenic granules from full scale UASB and IC

- reactors,” *Water Sci. Technol.*, vol. 30, no. 12, pp. 211–221, 1994.
- [38] R. L. Loewenthal, P. L. Dold, and G. Marais, “Hypothesis for pelletisation in the Upflow Anaerobic Sludge Bed reactor,” *Water SA*, vol. 13, no. 2, pp. 69–80, 1987.
- [39] J. Chen and S. Y. Lun, “Study on mechanism of anaerobic sludge granulation in UASB reactors,” *Water Sci. Technol.*, vol. 28, no. 7, pp. 171–178, 1993.
- [40] W. M. Wiegant, “The ‘spaghetti theory’ on anaerobic sludge formation, or the inevitability of granulation,” *Granul. Anaerob. Sludge, Microbiol. Technol.*, pp. 146–152, 1987.
- [41] H. C. Dubourgier, G. Prensier, and G. Albagnac, “Structure and microbial activities of granular anaerobic sludge,” *Granul. Anaerob. sludge Microbiol. Technol.*, p. 18??3, 1987.
- [42] J. W. Morgan, L. M. Evison, and C. F. Forster, “The internal architecture of anaerobic sludge granules,” *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 50, no. 2, pp. 211–226, 1991.
- [43] B. Vanderhaegen *et al.*, “Acidogenesis in relation to in-reactor granule yield,” *Water Sci. Technol.*, vol. 25, no. 7, pp. 21–30, 1992.
- [44] Z. Jianrong, H. Jicui, and O. Xiasheng, “The bacterial numeration and an observation of a new syntrophic association for granular sludge,” *Water Sci. Technol.*, vol. 36, no. 6, pp. 133–140, 1997.
- [45] J. Thaveesri, D. Daffonchio, B. Liessens, P. Vandermeren, and W. Verstraete, “Granulation and sludge bed stability in upflow anaerobic sludge bed reactors in relation to surface thermodynamics,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 61, no. 10, pp. 3681–3686, 1995.
- [46] Z. P. Zhang, K. Y. Show, J. H. Tay, D. T. Liang, D. J. Lee, and W. J. Jiang, “Rapid formation of hydrogen-producing granules in an anaerobic continuous stirred tank reactor induced by acid incubation,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 96, no. 6, pp. 1040–1050, 2007.
- [47] Y. Feng, Y. Zhang, X. Quan, and S. Chen, “Enhanced anaerobic digestion of waste activated sludge digestion by the addition of zero valent iron,” *Water Res.*, vol. 52, pp. 242–250, Apr. 2014.
- [48] Y. Zhang, Y. Feng, Q. Yu, Z. Xu, and X. Quan, “Enhanced high-solids anaerobic digestion of waste activated sludge by the addition of scrap iron,” *Bioresour. Technol.*, vol. 159, pp. 297–304, May 2014.
- [49] C. Cruz Viggì, S. Rossetti, S. Fazi, P. Paiano, M. Majone, and F. Aulenta, “Magnetite Particles Triggering a Faster and More Robust Syntrophic Pathway of Methanogenic Propionate Degradation,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 48, no. 13, pp. 7536–7543, Jul. 2014.
- [50] S. Nagata, *Mixing - Principles and applications*. John Wiley & Sons Inc, 1th. ed., 1975.
- [51] E. L. Paul, V. a Atiemo-obeng, and S. M. Kresta, *Handbook of Industrial Mixing: Science and Practice*, WILEY & SONS, INC. 1th. ed. 2004.
- [52] M. L. Shuler and F. Kargi, *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*, 2nd ed. Prentice Hall PTR, 2002.
- [53] M. P. Doran, *Bioprocess Engineering Principles*. Elsevier Science & Technology Books 1th. ed., 1995.
- [54] P. R. Gogate, A. A. C. M. Beenackers, and A. B. Pandit, “Multiple-impeller systems with a special emphasis on bioreactors: A critical review,” *Biochem. Eng. J.*, vol. 6, no. 2, pp. 109–144, 2000.
- [55] A. B. Metzner and J. S. Taylor, “Flow patterns in agitated vessels,” *AIChE J.*, vol. 6, no. 1, pp. 109–114, Mar. 1960.
- [56] “Mixing Flow Patterns & Impeller Types,” *Dinamix Agitators*, 2013. [Online]. Available: <http://www.dynamixinc.com/mixing-101-the-basic-principles-of-mixing-and-impellers>. [Accessed: 27-Jun-2018].
- [57] “Impellers,” *Post Mixing: Optimization and Solutions*, 2013. [Online]. Available: http://www.postmixing.com/mixing_forum/impellers/impellers.htm. [Accessed: 27-Jun-2018].

- [58] T. Jirout and F. Rieger, "Impeller design for mixing of suspensions," *Chem. Eng. Res. Des.*, vol. 89, no. 7, pp. 1144–1151, Jul. 2011.
- [59] M. W. Chudacek, "Impeller Power Numbers and Impeller Flow Numbers in Profiled Bottom Tanks," *Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev.*, vol. 24, no. 3, pp. 858–867, 1985.
- [60] W. McCabe, J. Smith, and P. Harriott, *Unit operations of chemical engineering.*, McGraw-Hill Education ed.7th.,2005.
- [61] A. W. Harnby, N.; Edwards, M.F.; Nienow, *Mixing in the process industries.*,Elsevier, 1th ed. 1997.
- [62] J. M. Smith, "AGITATION DEVICES," *A-to-Z Guide to Thermodynamics, Heat and Mass Transfer, and Fluids Engineering*, 2011. [Online]. Available: <http://www.thermopedia.com/content/549/>. [Accessed: 27-Jun-2018].
- [63] A. Zhang, V. L. Tsang, R. Korke-Kshirsagar, and T. Ryll, "Effects of pH probe lag on bioreactor mixing time estimation," *Process Biochem.*, vol. 49, no. 6, pp. 913–916, Jun. 2014.
- [64] "Particle Image Velocimetry," *Velocimetry Knowledge United*, 2008. [Online]. Available: <http://www.velocimetry.net/principle.htm>. [Accessed: 27-Jun-2018].
- [65] E. Bird, B., Stewart, W., Lightfoot, *Transport phenomena*. Wiley,2th ed., 2007.
- [66] C. Coufort, C. Dumas, D. Bouyer, and A. Liné, "Analysis of floc size distributions in a mixing tank," *Chem. Eng. Process. Process Intensif.*, vol. 47, no. 3, pp. 287–294, Mar. 2008.
- [67] F. H. Deindoerfer and J. M. West, "Rheological Properties of Fermentation Broths," *Advances in Applied Microbiology*, Vol. 2, 1960, Pages 265-273
- [68] EPA, "METHOD 1684 Total, Fixed, and Volatile Solids in Water, Solids, and Biosolids," 2001. [Online]. Available: <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/P1002CZ8.PDF?Dockey=P1002CZ8.PDF>. [Accessed: 27-Jun-2018].
- [69] USDA, "USDA Food Composition Databases." [Online]. Available: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list>. [Accessed: 02-Feb-2018].

RINGRAZIAMENTI

Prima di tutto vorrei ringraziare il Professor Bernardo Ruggeri che durante questa “avventura”, iniziata a Ottobre 2017, è stata una figura sempre presente e disponibile sia per prendere un caffè, che per dubbi e chiarimenti. Un grazie anche a Carlos che mi ha formato nei primi mesi, preparandomi alla vita in laboratorio e mi ha dato sempre ottimi consigli ogni volta che si presentava un problema. Grazie anche ai miei due compagni di avventura Mauro e Stefano sempre pronti a scambiare consigli e opinioni.

Un ringraziamento va anche alla Professoressa Francesca Bosco, alla Dottoressa Chiara Mollea e alla Dottoressa Annalisa Casale per il loro supporto in laboratorio.

Ringrazio inoltre Luca, il mio “ufficiale” fornitore di inoculo e Andrea Peruccio, in arte INOXMAN senza il quale non avrei potuto portare a termine la costruzione del mio agitatore impiegato per le varie prove.

Ringrazio la mia famiglia e la mia fidanzata Gisella per essermi sempre stati accanto dandomi la forza di arrivare fin qui.

Ringrazio tutti i miei amici, in particolare Marco Venturini, Lorenzo Solida e Valerio Meola detto “Lello” per essermi sempre stati accanto nel momento del bisogno o anche solo per ascoltarmi.

Grazie a tutti!