

**ALMA MATER STUDIORUM**

**UNIVERSITÀ DI BOLOGNA**

**FACOLTÀ DI CHIMICA INDUSTRIALE**

**CORSO DI LAUREA IN**

**LAUREA MAGISTRALE in CHIMICA INDUSTRIALE**

**ALLESTIMENTO DI PROCESSI MULTISTADIO  
PER LA DIGESTIONE ANAEROBICA DEI REFLUI  
AGRO-INDUSTRIALI E CONFRONTO CON  
PROCESSO CONVENZIONALE.**

**CANDIDATO  
MATTEO MALERBA**

**RELATORE  
PROF. DAVIDE PINELLI**

**CORRELATORE  
PROF. LORENZO BERTIN**

**SESSIONE II  
ANNO ACCADEMICO 2010 - 2011**

# INDICE

## 1. INTRODUZIONE

1.1.	Le “biotecnologie bianche”	1
1.2.	Biogas	3
1.2.1.	Generalità	3
1.2.2.	Deassorbimento del biogas	3
1.3.	La digestione anaerobica	5
1.3.1.	Aspetti Generali	5
1.3.2.	Fasi del processo di digestione anaerobica	6
1.3.3.	Chimica-fisica del processo	9
1.3.4.	Influenza dei parametri operativi	9
1.3.5.	Esempi di applicazione della digestione anaerobica a matrici organiche di rifiuti	14
1.4.	Aspetti tecnologici del processo di digestione anaerobica	16
1.4.1.	Schemi di processo di digestione anaerobica	16
1.4.2.	Parametri di gestione del reattore	16
1.5.	Conduzione del processo: continuo o discontinuo	22
1.5.1.	Processi discontinui	22
1.5.2.	Processi continui	24
1.5.2.1	Processo in reattore continuo completamente miscelato senza ricircolo (CSTR)	26
1.5.2.2	Processo in reattore continuo con ricircolo	26
1.5.2.3	Processo continuo in reattore con flusso a pistone	27
1.5.2.4	Processo continuo con ricircolo in reattore con flusso a pistone	27
1.5.3	Coltivazione in modalità <i>fed-batch</i> ( <i>batch</i> alimentato)	28

1.6	Reattori impiegati	29
1.7	Co-digestione di diversi substrati	31
1.8	Ciclo integrato anaerobico-aerobico	32
1.9	La digestione anaerobica: lo stato dell'arte in Europa	34
1.10	Gestione dei rifiuti agro-industriali	35
1.10.1	Gestione del siero di latte	35
1.10.2	Gestione del letame	35
2.	SCOPO	37
3.	MATERIALI E METODI	39
3.1.	Parte sperimentale	39
3.1.1.	I substrati	39
3.1.2.	Gli inoculi	40
3.1.3.	Allestimento dei microcosmi	42
3.1.4.	Allestimento dei reattori	47
3.1.4.1.	Reattore CSTR monostadio	47
3.1.4.2.	Reattore multistadio a fasi successive	49
3.1.4.3.	Reattore multistadio a fasi concentriche	50
3.2.	Metodi analitici	53
3.2.1.	Solidi totali e solidi totali volatili	53
3.2.2.	Misura del COD (Chemical Oxygen Demand)	54
3.2.3.	Determinazione delle proteine: metodo con reattivo Bio-Rad	56
3.2.4.	Determinazione dei carboidrati totali: metodo Fenolo	57
3.2.5.	Misura della concentrazione di acidi grassi volatili	58
3.2.6.	Analisi del contenuto di anioni	59

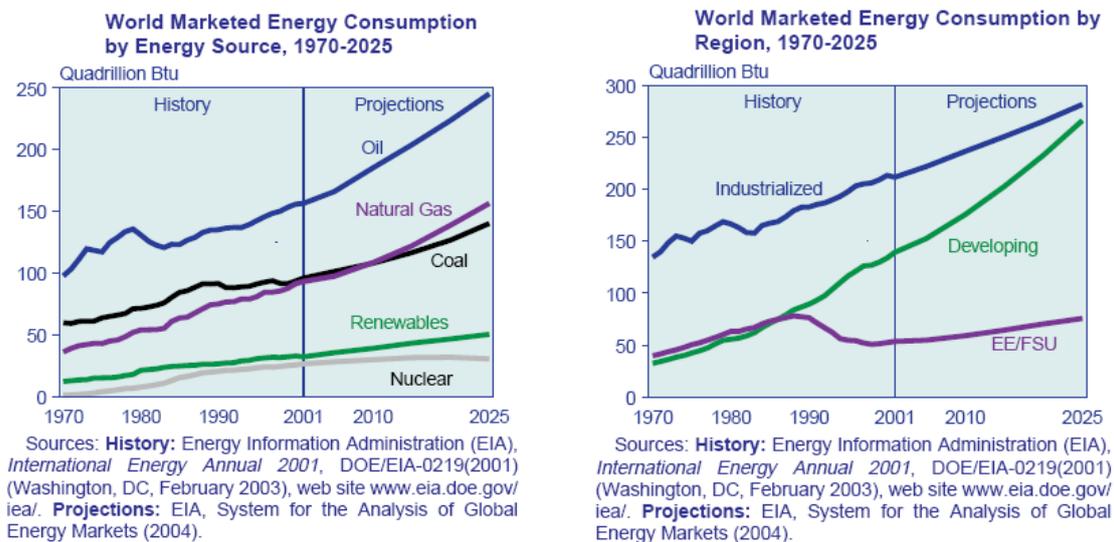
3.2.7.	Misura del volume di biogas prodotto	60
3.2.8.	Misura della composizione del biogas	61
3.2.9.	Determinazione del tempo di residenza idraulico	62
4.	RISULTATI E DISCUSSIONI	63
4.1.	Ricondizionamento degli inoculi	63
4.2.	Individuazione dell'inoculo e della matrice più performanti	65
4.3.	Individuazione del miglior rapporto tra letame e siero di latte	69
4.4.	Valutazione delle condizioni di lavoro ottimali della fase pre-acidificante	70
4.5.	Avviamento in batch	73
4.6.	Reattore CSTR monostadio	77
4.7.	Reattore multistadio a fasi successive	82
4.8.	Reattore multistadio a fasi concentriche	89
5.	CONCLUSIONI	95
	BIBLIOGRAFIA	101
	RINGRAZIAMENTI	103

# 1 INTRODUZIONE

## 1.1 Le “biotecnologie bianche”

Lo sviluppo tecnologico ed industriale degli ultimi decenni ha portato la società occidentale ad un relativo grado di benessere pagato però in termini di consumo energetico e produzione di enormi quantità di rifiuti. Poiché la domanda di energia continua ad aumentare si presenta il problema dell'esaurimento delle risorse non rinnovabili e quello dei danni causati all'ambiente.

Al giorno d'oggi la maggior parte dell'energia prodotta proviene da fonti non rinnovabili come il petrolio, il gas naturale e il carbone fossile.



**Figura 1.1.** Consumo energetico mondiale (1970-2025) e consumo energetico per tipo di combustibile.

Per ovviare ai problemi correlati al crescente fabbisogno energetico mondiale e all'esaurimento delle fonti non rinnovabili si stanno mettendo in pratica politiche volte alla riduzione dei consumi e si sta incentivando l'utilizzo di tecnologie alternative che utilizzano risorse rinnovabili. ([www.eia.doe.gov](http://www.eia.doe.gov))

Tra le tecnologie alternative, le “biotecnologie industriali” o “biotecnologie bianche” stanno riscuotendo sempre più interesse. Con queste due espressioni si intende l'uso di sistemi biologici per la produzione di molecole, materiali ed energia a partire da materiali rinnovabili o materiali di scarto prevedendo il ricorso ad enzimi (biocatalisi) o a microorganismi (processi fermentativi) come

agenti della trasformazione delle stesse in prodotto finito. (Soetaert and Vandamme, 2006 ).

Oltre alla crisi energetica, un'altro fattore che negli ultimi anni ha alimentato l'interesse nei confronti delle biotecnologie industriali è la loro sostenibilità ambientale: diversi casi studio hanno infatti mostrato le loro potenzialità nel ridurre le emissioni inquinanti, in un minore consumo di energia e di materie prime, nella minore produzione di scarti e nella biodegradabilità di questi ultimi.

In particolare i processi di biotrasformazione di materie prime rinnovabili non contribuiscono all'accumulo in atmosfera di CO<sub>2</sub> (e quindi all'effetto serra), essendo la quantità di CO<sub>2</sub> rilasciata dalla loro trasformazione/combustione pari a quella assorbita dall'atmosfera nei processi di sintesi delle stesse. (F. Sijbesma, Chairman 2003).

## 1.2 Biogas

### 1.2.1 Generalità

Il biogas prodotto dalla digestione anaerobica di reflui e rifiuti è costituito da metano (55-75%) e anidride carbonica (25-45%) con piccole quantità di  $H_2$ ,  $H_2S$  e  $NH_3$ . Il biogas ha un elevato potere calorifico (4000-5000 kcal/Nm<sup>3</sup>) e pertanto può essere convenientemente convertito in quasi tutte le forme di energia utili: calore, elettricità e cogenerazione (produzione congiunta di elettricità e calore). L'applicazione più frequente prevede la combustione in motori endotermici, e consente la produzione di energia elettrica e termica in quantità sensibilmente superiore agli autoconsumi dell'impianto, utilizzando apparecchiature dotate di elevata semplicità impiantistica e gestionale. Un'ulteriore alternativa consiste nella compressione, dopo purificazione e arricchimento del metano, per l'utilizzo come biocarburante in motori a combustione. (Manuali e linea guida ANPA13/2002).

### 1.2.2 Deassorbimento del biogas

Il biogas prodotto durante il processo di digestione anaerobica è formato da due componenti principali: il metano ( $CH_4$ ) e il biossido di carbonio ( $CO_2$ ) e da piccole quantità di  $H_2$ ,  $H_2S$  e  $NH_3$ . Il metano è praticamente insolubile e tende ad essere rilasciato nella fase gassosa. Il biossido di carbonio, invece, raggiunge un equilibrio dinamico tra fase liquida e gassosa e partecipa alla formazione di acido carbonico nel mezzo liquido determinando, insieme all'ammonio, la capacità tampone del sistema. L'idrogeno, prodotto in quantità inferiore, pur essendo insolubile, è generalmente utilizzato dai batteri metanigeni. (Manuali e linea guida ANPA13/2002).

La velocità di trasferimento di massa dalla fase liquida a quella gassosa si può esprimere attraverso questa relazione:

$$dG/dt = K_L a (S - P_P / H) \quad [5]$$

dove:

“ $dG/dt$ ” è la velocità di trasferimento del gas dal mezzo liquido alla fase gassosa esprimibile in  $(\text{massa} \cdot \text{x volume}^{-1} \cdot \text{x tempo}^{-1})$ ;

“ $S$ ” è la concentrazione di gas disciolto nel mezzo liquido  $(\text{massa} \cdot \text{x volume}^{-1})$ ;

“ $K_L$ ” è il coefficiente di trasferimento di massa globale, esprimibile come  $(\text{volume} \cdot \text{x superficie}^{-1} \cdot \text{x tempo}^{-1})$ ;

“ $a$ ” è la superficie della bolla di gas  $(\text{superficie} \cdot \text{x volume}^{-1})$ ;

“ $P_P$ ” è la pressione parziale del gas (pressione);

“ $H$ ” è la costante di Henry  $(\text{pressione} \cdot \text{x volume} \cdot \text{x massa}^{-1})$ .

## 1.3 La digestione anaerobica

### 1.3.1 Aspetti generali

La digestione anaerobica rientra tra le biotecnologie industriali. Essa determina la formazione di diversi prodotti, i più abbondanti dei quali sono due gas: il metano ed il biossido di carbonio e richiede l'azione combinata di differenti gruppi microbici interagenti fra loro: i batteri idrolitici, i batteri acidificanti (acetogeni ed omoacetogeni) e i batteri metanigeni.

Nel caso della stabilizzazione anaerobica di una matrice con formula bruta  $C_aH_bO_cN_d$ , la reazione stechiometrica complessiva può essere rappresentata dalla relazione:



con:

$$s = a - nw - m$$

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

Come si può vedere dalla relazione riportata, nel processo di digestione anaerobica si ha la parziale distruzione di materiale organico complesso con formazione di metano, biossido di carbonio, acqua ed ammoniaca.

L'industrializzazione biotecnologica di questo processo naturale ha consentito di sviluppare processi industriali per la produzione di biogas a partire da diversi substrati organici, quali ad esempio, acque derivanti dall'industria agro-alimentare, fanghi di supero degli impianti di trattamento acque reflue, deiezioni animali, biomasse di natura agricola, residui organici industriali e dalla frazione organica di rifiuti urbani. (Manuali e linea guida ANPA13/2002).

### 1.3.2 Fasi del processo di digestione anaerobica

La conversione di substrati organici complessi in metano avviene, come accennato, attraverso una catena trofica anaerobica alla quale partecipano gruppi metabolici distinti di microrganismi che si differenziano sia per i substrati che per i prodotti del loro metabolismo.

Il processo biodegradativo si compone di quattro fasi:

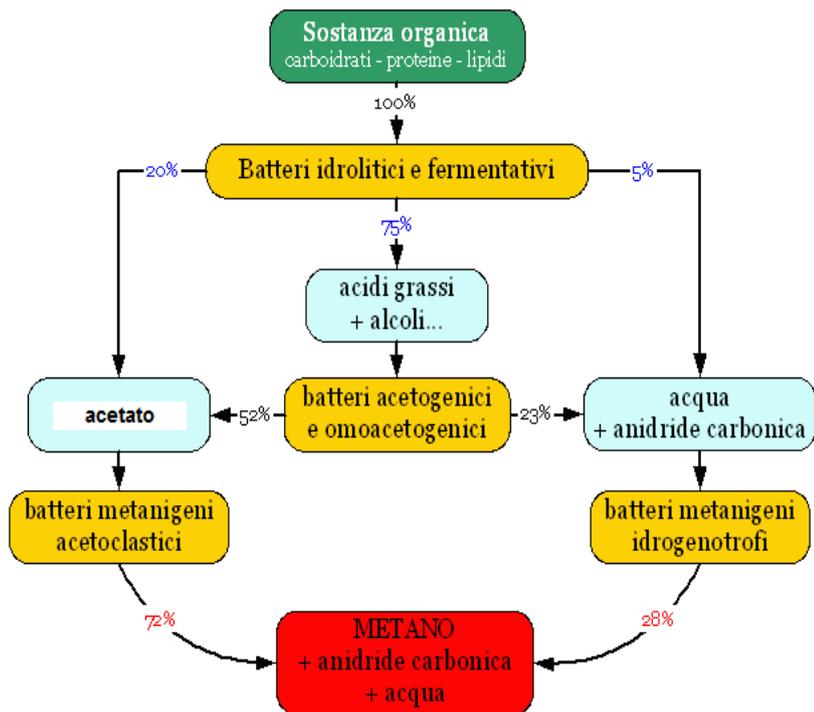
- *Fase idrolitica.* Durante questa fase le macromolecole vengono degradate in molecole più semplici rendendole biodisponibili per altri batteri. La fase idrolitica può rappresentare lo step limitante in processi di degradazione soprattutto per quelle matrici con un elevato contenuto di sostanza organica.
- *Fase acidogenica.* Chiamata così perché i batteri convertono zuccheri, acidi grassi e amminoacidi in anidride carbonica, idrogeno, ammoniaca, acidi organici prevalentemente a catena corta come piruvato, acido lattico, acidi grassi volatili e altri prodotti come etanolo e chetoni.
- *Fase acetogenica.* Durante questa fase, a partire dai prodotti formati nel corso della fase idrolitica e di acidificazione, i batteri acetogeni trasformano gli acidi organici in acido acetico con ulteriore produzione di idrogeno, ammoniaca e anidride carbonica.
- *Fase metanogenica.* La produzione di metano rappresenta la conclusione della catena trofica anaerobica; esso è infatti l'unico composto non reattivo nell'intero processo di digestione anaerobica e può essere considerato il prodotto finale dell'intero processo. Il metano è prodotto ad opera di batteri archea metanogeni e può avvenire essenzialmente attraverso due differenti vie di reazione:
  - o *via acetoclastica* che prevede la dismutazione anaerobica dell'acido acetico con formazione di metano e anidride carbonica ad opera di batteri acetoclastici

- *via idrogenotrofica* che avviene ad opera dei batteri idrogenotrofi, che operano la riduzione dell'anidride carbonica con idrogeno.

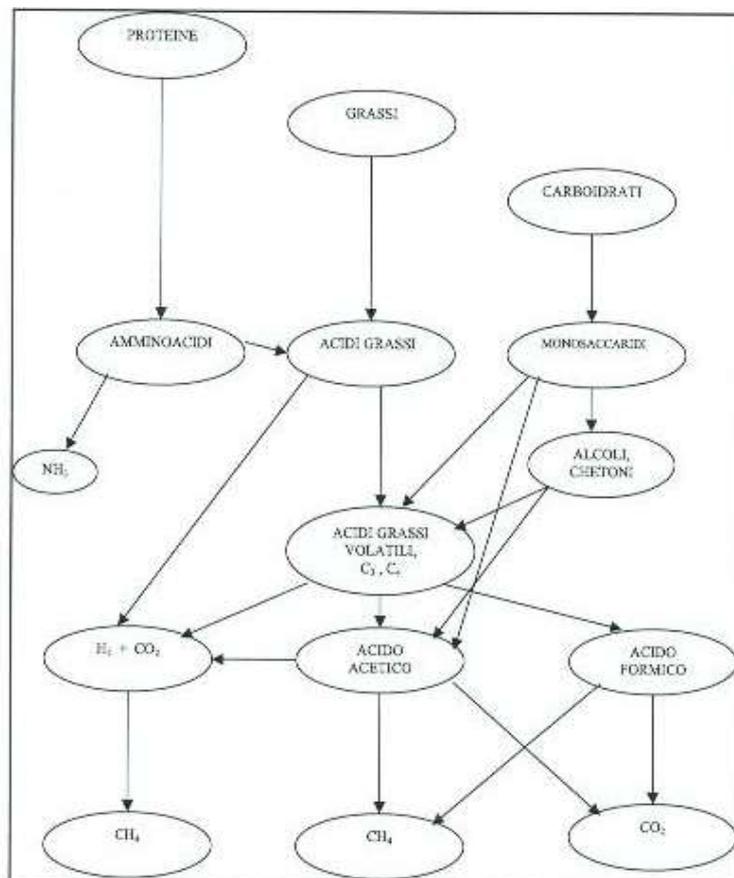
La maggior parte della produzione di metano avviene attraverso la prima via poiché la quantità di idrogeno disponibile per la via idrogenotrofica è limitata.

Con la loro attività i due ceppi batterici svolgono due importanti funzioni nell'ambito della catena trofica anaerobica: da un lato degradano l'acido acetico e quello formico a metano eliminando gli acidi dal mezzo ed impedendo l'inibizione dei fenomeni di degradazione di substrati organici per eccesso di acidità, dall'altro mantengono bassa la concentrazione di idrogeno così da consentire la conversione degli acidi grassi a catena lunga e degli alcoli ad acetato e idrogeno. Infatti, se la via idrogenotrofica è rallentata si osserva un accumulo di idrogeno che inibisce la produzione di metano, mentre la via acetoclastica può subire fenomeni di inibizione da substrato in presenza di elevate concentrazioni di acido acetico.

Il più importante dei fattori che controllano la possibilità di utilizzo dell'acetato da parte dei batteri metanigeni è rappresentato dalla forma chimica con cui tale substrato è presente nel mezzo. In particolare si ha che, se presente in forma indissociata, l'acido acetico può attraversare la membrana batterica e risultare quindi utilizzabile (questo fenomeno è favorito in un intervallo di pH piuttosto ristretto, generalmente compreso tra 6 e 8). A più elevati valori di pH l'acido acetico è presente sotto forma di acetato: ne deriva che la concentrazione della forma indissociata non è sufficiente a garantire un gradiente di concentrazione tale da garantire il trasporto trans membrana del metabolita. Nel caso di ambienti caratterizzati da pH relativamente bassi (inferiori a 5) si ha un'elevata concentrazione di acido indissociato che attraversa la membrana cellulare e la concentrazione dell'acido acetico può risultare superiore alla capacità di metabolizzazione cellulare con conseguente inibizione da eccesso di substrato. (Manuali e linea guida ANPA13/2002).



**Figura 1.2.** Schema generale del processo di digestione anaerobica. (Digestione anaerobica della frazione organica dei rifiuti solidi, APAT 2005).



**Figura 1.3.** Diagramma complesso delle diverse fasi coinvolte nel processo di digestione anaerobica. (Gujer e Zehnder, 1983 modificato).

### 1.3.3 Chimica-fisica del processo

Il metabolismo degradativo dei batteri, catabolismo, consiste essenzialmente in una serie di ossidazioni che trasformano le complesse molecole di sostanza organica di cui si nutrono in molecole più semplici.

Mentre i microrganismi aerobi utilizzano l'ossigeno molecolare come accettore finale di elettroni, nei processi ossidativi della sostanza organica, i microrganismi anaerobi utilizzano un metabolita intermedio del substrato organico che si ossida. L'ossidazione avviene essenzialmente a causa della perdita di una coppia di atomi di idrogeno da parte della sostanza organica ossidata (deidrogenazione); l'idrogeno è quindi trasferito alla specie ossidante (accettore di idrogeno). L'ossidazione di composti organici in ambiente anaerobico è catalizzata da enzimi ed avviene grazie all'intervento di coenzimi come  $\text{NAD}^+$  (Nicotinamide adenin dinucleotide) e  $\text{NADP}^+$  (Nicotinamide adenin dinucleotide fosfato).

L'accettore finale dell' $\text{H}_2$  non è il coenzima, che viene nuovamente ossidato e rigenerato, ma l'ossigeno, l'azoto e il carbonio legati originariamente alla sostanza organica che viene ossidata. E' proprio il passaggio attraverso queste reazioni che fornisce l'energia che viene immagazzinata sotto forma di ATP (adenosina trifosfato). (Manuali e linea guida ANPA13/2002).

### 1.3.4 Influenza dei parametri operativi

Obiettivo fondamentale di qualsiasi strategia di controllo di un processo è il mantenimento di condizioni operative ottimali e stabili.

Nel caso specifico della digestione anaerobica questo concetto diviene significativo dal momento che la fase controllante l'intero processo, cioè la metanogenesi, risulta particolarmente sensibile alle variazioni ambientali del mezzo di reazione.

Di particolare importanza risultano parametri quali la temperatura, il pH, la concentrazione di acidi grassi volatili (*VFA*, *Volatile Fatty Acids*), l'alcalinità, il rapporto tra acidi grassi volatili ed alcalinità, nonché la produzione e composizione del biogas.

Occorre comunque sottolineare che l'analisi di questi parametri deve essere complessiva: la variazione di un singolo parametro, se non accompagnata da un

monitoraggio complessivo di tutti gli altri parametri, risulta difficilmente interpretabile. (Manuali e linea guida ANPA13/2002).

- *Temperatura*

Dal momento che la velocità di reazione è il fenomeno che governa il processo di digestione anaerobica, la temperatura rappresenta un parametro estremamente importante. I tipici intervalli di temperatura sono lo psicrofilo (da 5°C a 25°C), il mesofilo (da 25°C a 40°C) e il termofilo (oltre i 40°C).

Dato che i processi di degradazione anaerobica sono determinati dall'attività di popolazioni microbiche eterogenee, l'effetto delle variazioni di temperatura è particolarmente importante. Ciò è imputabile al fatto che, al variare della temperatura, non si avrà un semplice rallentamento o accelerazione dei processi metabolici, ma la vera e propria sostituzione di popolazioni batteriche, che risultano presenti solo in alcuni ristretti intervalli di temperatura.

E' stato riscontrato che i processi di digestione anaerobica in regime mesofilo mostrano le migliori produzioni di biogas in intervalli di temperatura compresi tra i 30 ed i 35 °C, mentre nel caso di processi termofili l'intervallo si allarga e varia tra i 40 ed i 60 °C. In generale si può osservare che, all'interno dell'intervallo ottimale, la produzione di biogas e la rimozione di substrato incrementano al crescere della temperatura. (APAT 2005).

L'espressione per quantificare l'effetto delle variazioni di temperatura sulla cinetica di reazione è derivata dall'equazione di Arrhenius ed è esprimibile nella forma:

$$V_T = V_0^{a(T-T_0)}$$

dove:

$V_T$  = velocità di reazione ad una certa temperatura T;

$V_0$  = velocità di reazione alla temperatura di riferimento  $T_0$

$\alpha$  = coefficiente sperimentale che, negli usuali intervalli di temperatura di esercizio dei digestori, può essere assunto costante.

Benchè la massima resa si raggiunge tra i 35°C e i 37°C, attualmente si stanno ottimizzando processi per lavorare ad alte temperature, perché le condizioni termofile hanno il vantaggio di offrire una efficiente riduzione dei microrganismi patogeni e producono dei fanghi con una buona qualità igienica. (Manuali e linea guida ANPA13/2002).

- *pH*

Il mantenimento del pH sopra o vicino al valore 7, stabilizza il processo di digestione anaerobica. La metanogenesi avviene a bassa resa quando il pH è fuori dallo stretto range di pH ottimale compreso tra 6.5 e 7.5. Il valore del pH in un digestore è determinato essenzialmente dalla presenza di CO<sub>2</sub> nel mezzo liquido e dai valori di concentrazioni degli acidi grassi volatili e dell'ammoniaca. Normalmente, durante la digestione anaerobica, la CO<sub>2</sub> che si genera si discioglie parzialmente nella fase liquida dando acido carbonico che a sua volta, a seconda del pH, si dissocia dando ioni bicarbonato e ioni carbonato; quindi l'equilibrio dell'acido carbonico è sempre il sistema tampone predominante e la sua presenza assicura automaticamente un pH nel range appropriato.

Tuttavia, se per alcune ragioni, la fermentazione acida si sviluppa prima di quella metanigena, si ha la conseguenza dell'accumulo di acido acetico che riduce l'alcalinità e per questa ragione il pH può scendere a valori compresi tra il 4.5 e il 5.0. Quando si raggiunge un basso pH, la resa metanogenica cala e il reattore può tornare alla sua normale performance solo correggendo l'alcalinità dall'esterno.

E' quindi necessario associare al pH gli altri parametri di controllo fondamentali quali l'alcalinità del mezzo, la concentrazione di acidi grassi volatili e la composizione del biogas, e fare riferimento ai loro andamenti.

Problemi possono sorgere anche nel caso di innalzamenti eccessivi del pH nel reattore: in queste condizioni infatti l'equilibrio tra l'ammoniaca e la sua specie protonata, l'ammonio, si sposta a favore della prima. (Manuali e linea guida ANPA13/2002)

- *Acidi grassi volatili*

Gli acidi grassi volatili vengono rappresentati dalla formula generale:



In generale i batteri idrolitici ed acidificanti producono, nel corso del processo di digestione anaerobica, acidi grassi volatili in cui R contiene tra 0 e 3 atomi di carbonio (acidi grassi a catena corta).

Il livello di concentrazione degli acidi volatili, generalmente espresso in termini di acido acetico o di COD, dipende dal tipo di substrato trattato, e varia da circa 200 fino a 2000 mgAc/L. Di norma non è la concentrazione assoluta ad essere assunta come parametro di stabilità ma piuttosto la variazione di concentrazione: variazioni repentine con incremento della concentrazione indicano che il processo sta scivolando verso processi acidogenici piuttosto che metanogenici.

In generale si potrà osservare che un incremento degli acidi volatili è conseguente all'aumentato carico di substrato da trattare, che determina a sua volta l'accelerazione dei fenomeni idrolitici ed acidogenici, causando lo sbilanciamento della catena trofica e una variazione del sistema verso condizioni di basso pH a seguito dell'esaurimento della capacità tamponante del mezzo. (Manuali e linea guida ANPA13/2002).

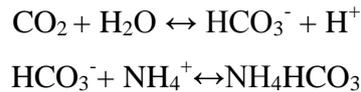
#### - *Alcalinità*

L'alcalinità rappresenta la capacità di un sistema di neutralizzare protoni ed è generalmente espressa in termini di concentrazione di carbonato di calcio.

Valori di alcalinità dell'ordine di 3000-5000 mg CaCO<sub>3</sub>/L sono tipici per i digestori anaerobici operanti in condizioni stabili. Questo parametro è di fondamentale importanza nei processi anaerobici; tenendo infatti presente che i tassi di crescita della biomassa metanigena sono estremamente ridotti può capitare che, in occasione di un incremento del carico organico, le aumentate capacità idrolitiche ed acidificanti del sistema determinino uno sbilanciamento della popolazione batterica a favore della componente acidogenica e quindi a sfavore della componente metanigena. Si osserverà, pertanto, una fase transitoria in cui si osserverà un incremento di concentrazione degli acidi grassi volatili. In questi casi risulta fondamentale la capacità tamponante del sistema, che deve essere in grado di neutralizzare l'abbassamento di pH determinato dall'accumulo degli acidi organici. L'alcalinità di un digestore anaerobico è determinata essenzialmente dalla presenza di un sistema tampone dovuto alla coesistenza di ammoniaca,

originata dalla degradazione di proteine, e di bicarbonato, derivante dalla dissoluzione del biossido di carbonio nel mezzo. L'interazione del biossido di carbonio con la fase liquida e la conseguente formazione del sistema tampone determinato dalla contemporanea presenza di acido carbonico ed ammonio prende il nome di sistema calco-acetico.

Si ha, in generale, la formazione di  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  secondo lo schema di reazione:



La presenza di questo sale disciolto in soluzione porta ad una elevata alcalinità del mezzo, con conseguente controllo del processo anche nel caso di un accumulo di acidi grassi volatili. (Manuali e linea guida ANPA13/2002).

#### - *Produzione e composizione del biogas*

Il monitoraggio della quantità e della composizione (almeno in termini di metano e biossido di carbonio) del biogas è di fondamentale importanza per il controllo della stabilità del processo di digestione anaerobica. Se il reattore sta operando in condizioni di stabilità la produzione e la composizione del biogas risultano circa costanti.

Una diminuzione nella produzione complessiva di biogas ed un aumento nella percentuale di  $\text{CO}_2$  possono indicare fenomeni di inibizione a danno della componente metanigena dovuti, ad esempio, all'eccessiva presenza di acidi grassi volatili. Ne consegue che l'analisi della produzione e della composizione percentuale del biogas dovrebbe sempre essere associata al controllo di parametri quali la concentrazione degli acidi grassi volatili e l'alcalinità del mezzo.

Si potrà osservare che, in presenza di eccessivi carichi di substrato, la percentuale di  $\text{CO}_2$  tende a crescere a scapito della presenza di metano.

Inoltre, altri fattori devono essere considerati ogni volta che si sviluppa un processo metanogenico. Tra questi, la presenza di macronutrienti nell'alimentazione e la presenza di sostanze che possono rivelarsi tossiche nei confronti del consorzio batterico. In particolare i microrganismi metanogenici sono considerati più sensibili alle condizioni dell'ambiente in cui crescono rispetto ai batteri acetogeni e acetoclasti. Essi hanno infatti la più bassa velocità di

crescita. Un caso particolare è la presenza di ossigeno disciolto, che è tossico per i metanogenici. L'eventuale ossigeno disciolto è rapidamente rimosso dai batteri acidificanti facoltativi presenti nel consorzio.

Il solfuro di idrogeno ( $H_2S$ ) è un altro prodotto della digestione anaerobica che può controllare il processo di decomposizione comportandosi da veleno per le cellule.  $H_2S$  si trova sia nel materiale organico che nel biogas e in presenza di acqua può essere convertito ad acido solforico ( $H_2SO_4$ ). L'acido solforico e il solfuro di idrogeno sono altamente corrosivi e possono provocare effetti indesiderati all'unità di cogenerazione, al motore e ai componenti delle tubazioni del gas. Lo zolfo è tuttavia un elemento in tracce indispensabile per i batteri.

Altre sostanze inibenti possono essere contenute nell'alimentazione, come ad esempio metalli pesanti, sali, pesticidi, etc.

Metalli pesanti come Hg, Cd, Zn, Cr, Ni etc. appartengono al gruppo dei veri tossici per i metanigeni, ma nei digestori anaerobici il loro effetto è spesso neutralizzato dal solfuro che forma sali insolubili con questi ioni metallici. Anche calcio e sodio possono risultare tossici soprattutto se vengono aggiunti assieme al fine di correggere il pH. (Manuali e linea guida ANPA13/2002).

### 1.3.5 Esempi di applicazione della digestione anaerobica a matrici organiche di rifiuto

Come precedentemente accennato (paragrafo 1.1), le attività microbiche che costituiscono il processo della digestione anaerobica vengono ampiamente sfruttate per lo smaltimento di reflui e altre matrici organiche di rifiuto; la possibilità di valorizzare mediante la produzione di un biocombustibile (biogas) substrati il cui smaltimento per mezzo di altri processi imporrebbe un costo alla società, conferisce alla digestione anaerobica un notevole rilievo nell'ambito delle biotecnologie ambientali ed industriali e rappresenta un forte impulso alla sua ulteriore diffusione e ottimizzazione.

Storicamente l'applicazione della digestione anaerobica al trattamento di reflui è stata spinta prevalentemente da fattori di natura tecnologica che le conferivano molteplici vantaggi rispetto ai metodi aerobici:

- bassi costi per la semplicità della tecnologia necessaria all'implementazione degli impianti e i bassi consumi energetici;
- può essere applicata in qualsiasi sito e in qualsiasi scala;
- possono essere applicati carichi volumetrici molto alti, riducendo le necessità di spazio dell'impianto;
- il volume del fango in eccesso prodotto è significativamente inferiore a quello prodotto nei sistemi aerobici;
- il fango in eccesso è generalmente ben stabilizzato dal punto di vista igienico;
- i microorganismi anaerobi possono essere mantenuti in assenza di nutrienti per lunghi periodi di tempo senza comprometterne la loro attività e le caratteristiche di sedimentabilità del fango;
- la digestione anaerobica può essere combinata a post-trattamenti da cui è possibile recuperare prodotti di interesse come ammonio o solfuri.

Per i suddetti vantaggi, la digestione anaerobica si è affermata come processo ampiamente utilizzato nel trattamento degli oltre 10 milioni di tonnellate di fanghi di supero prodotti annualmente in Europa .(Piccinini S. , 2004).

Allo stato attuale il processo della digestione anaerobica, viene normalmente utilizzato per il trattamento di molteplici matrici di rifiuto (S.Piccinini, 2004), individuabili in quattro principali categorie di scarti:

- fanghi prodotti durante il trattamento aerobico di reflui municipali;
- reflui agro-industriali;
- scarti zootecnici;
- frazione organica dei rifiuti solidi urbani (FORSU).

## 1.4 Aspetti tecnologici del processo di digestione anaerobica

### 1.4.1 Schemi di processo di digestione anaerobica

I processi anaerobici possono essere classificati in base ai seguenti criteri (Manuali e linea guida ANPA13/2002):

- numero di stadi: nel caso in cui tutte le fasi della digestione anaerobica avvengano nel medesimo reattore si parla di processo monostadio; nel caso in cui invece la fase idrolitico-fermentativa avvenga in un reattore separato rispetto a quella metanigena si parla di processo bistadio.
- regime termico: il processo di digestione anaerobica può essere condotto in regime mesofilo (35°C) o termofilo (55°C).
- tipo di rifiuto trattato.
- tenore di solidi contenuti nel rifiuto da trattare: i processi si distinguono in wet (solidi totali <10%) semi-dry (solidi totali compresi tra il 10% e il 20%) e dry (solidi totali <20%).

La complessità del processo di digestione anaerobica ha stimolato il ricorso a molteplici configurazioni di processo/impianto.

I principali parametri che permettono di dimensionare, valutare e gestire il processo di digestione anaerobica possono essere suddivisi in due gruppi: i parametri di gestione del reattore ed i parametri di stabilità del processo.

### 1.4.2 Parametri di gestione del reattore

I parametri di gestione del reattore (Manuali e linea guida ANPA13/2002) definiscono l'esercizio in termini di: *tempi di permanenza* della massa alimentata nel reattore, *concentrazione dei microrganismi* e *rese di produzione di biogas*, in relazione al volume del reattore ed alle caratteristiche del substrato trattato.

Il substrato può essere generalmente definito, nell'ambito dei processi di digestione, in termini di:

- solidi totali (TS, Total Solids). Essi rappresentano il contenuto in sostanza secca di un campione, determinato per essiccamento in stufa a 105°C per 24 ore. Questi esprimono, in prima approssimazione, la somma della frazione organica e di quella inerte del substrato.
- solidi totali volatili (TVS, Total Volatile Solids). Essi rappresentano la frazione di sostanza secca che risulta volatilizzata per combustione a 550°C. Questi esprimono in prima approssimazione la frazione organica della sostanza secca, calcolata come differenza dei valori di TS e solidi totali fissi (*TFS, Total Fix Solids*) che rappresentano la frazione inerte, costituita per lo più, da composti inorganici, misurata per pesata dopo il trattamento a 550°C.
- domanda chimica di ossigeno (COD, Chemical Oxygen Demand). Quantità di ossigeno consumato per l'ossidazione della sostanza organica, determinata attraverso l'utilizzo di un forte agente chimico ossidante in ambiente acido.
- BOD<sub>5</sub>. (Biological Oxygen Demand after 5 days). Quantità di ossigeno consumata in 5 giorni, in condizioni controllate, per l'ossidazione biologica della sostanza organica presente nel campione.

I parametri di gestione del reattore sono (Manuali e linea guida ANPA13/2002):

- Tempo medio di residenza idraulico (HRT, Hydraulic Retention Time). Esso è definito come il rapporto tra il volume del reattore e la portata di alimentazione del reattore:

$$\mathbf{HRT = V / Q}$$

dove:

HRT: tempo medio di residenza idraulico (giorni);

V: volume del reattore ( $m^3$ )

Q: portata in ingresso al reattore ( $m^3$ /giorno).

HRT rappresenta il tempo di permanenza di ogni elemento di fluido all'interno di un reattore. Più precisamente, ciò è vero in senso stretto per i soli reattori ideali, mentre nel caso di reattori reali assumerà il tempo di permanenza medio per i vari elementi di fluido, che rimarranno per tempi diversi all'interno del reattore in relazione alla sua geometria e ad altri parametri caratteristici.

- Tempo medio di residenza dei fanghi (SRT, Sludge Retention Time).

Esso è dato dal rapporto tra la massa totale di solidi volatili presenti nel reattore e la portata di solidi estratta dal reattore. Se la quantità di biomassa prodotta per crescita cellulare è pari alla quantità estratta dal reattore la concentrazione di biomassa attiva all'interno rimane costante nel tempo e si parlerà di condizioni di stato stazionario. Anche in questo caso valgono le considerazioni riportate per l'HRT in relazione al reattore ideale o reale.

Si avrà quindi:

$$SRT = V \times X / W$$

dove:

SRT: tempo medio di residenza dei fanghi (giorni)

V: volume del reattore ( $m^3$ )

X: concentrazione dei solidi volatili all'interno del reattore  
( $kgTVS/m^3$ )

W: portata di sostanza volatile estratta del reattore ( $kgTVS /$  giorno)

- Carico organico volumetrico (OLR, Organic Loading Rate). Il carico organico volumetrico di substrato applicato al reattore è definito come la quantità di substrato entrante nel reattore rispetto all'unità di volume del reattore stesso ed al tempo. Analiticamente:

$$\text{OLR} = Q \times S / V$$

dove:

OLR: fattore di carico organico volumetrico in termini di substrato riferito al volume del reattore ( $\text{kg substrato}/\text{m}^3_{\text{reattore}} \times \text{giorno}$ );

Q: portata influente ( $\text{m}^3/\text{giorno}$ )

S: concentrazione di substrato nella portata influente ( $\text{kg}/\text{m}^3$ )

V: volume del reattore ( $\text{m}^3$ )

Questo parametro viene di norma calcolato sulla base del volume utile del reattore e può essere riferito a diverse unità di misura analizzate per esprimere la concentrazione di biomassa (TS, TVS, COD, BOD).

- Carico organico riferito alla biomassa o ai solidi volatili nel reattore

Questo viene definito come la quantità di substrato entrante nel reattore rispetto alla quantità di sostanza volatile presente nel reattore nell'unità di tempo, cioè:

$$\text{CF} = Q \times S / (V \times X)$$

dove:

CF: fattore di carico organico in termini di substrato (riferito alla biomassa o ai solidi volatili nel reattore), ( $\text{kg substrato} / \text{kgTVS} \times \text{giorno}$ );

Q: portata influente ( $\text{m}^3/\text{giorno}$ );

S: concentrazione di substrato nella portata influente ( $\text{kgTVS}/\text{m}^3$ )

V: volume del reattore ( $\text{m}^3$ )

X: concentrazione dei solidi volatili all'interno del reattore ( $\text{kgTVS}/\text{m}^3$ )

Questo parametro è di difficile uso nella comparazione delle prestazioni dei diversi processi di digestione anaerobica in quanto è complesso distinguere il contenuto della sostanza volatile nel reattore associabile alla biomassa attiva rispetto al substrato.

- Produzione specifica di gas (SGP, Specific Gas Production). Rappresenta la quantità di biogas che viene prodotta per quantità di sostanza volatile alimentata al reattore; viene quindi espressa in termini di  $\text{m}^3_{\text{biogas}} / \text{kg}_{\text{substrato alimentato}}$ . Questo parametro, molto utilizzato per definire le rese dei processi di digestione anaerobica, è in realtà strettamente correlato alla biodegradabilità del substrato trattato piuttosto che alle proprietà del processo adottato. Dal punto di vista analitico è espresso come il rapporto:

$$\text{SGP} = \frac{Q_{\text{biogas}}}{Q \cdot S}$$

dove:

SGP: produzione specifica di biogas ( $\text{m}^3_{\text{biogas}}/\text{kg}_{\text{substrato alimentato}}$ );

$Q_{\text{biogas}}$ : portata di biogas prodotto ( $\text{m}^3/\text{giorno}$ );

Q: portata influente ( $\text{m}^3/\text{giorno}$ );

S: concentrazione di substrato nella portata influente ( $\text{kg}_{\text{substrato}}/\text{m}^3$ ).

- Velocità di produzione del biogas (GPR, Gas Production Rate). E' definita come la portata di biogas prodotto rispetto al volume del reattore ed al tempo:

$$\text{GPR} = \frac{Q_{\text{biogas}}}{V}$$

dove:

GPR: velocità di produzione del biogas ( $\text{m}^3_{\text{biogas}}/\text{m}^3_{\text{reattore}} \times \text{giorno}$ );

$Q_{\text{biogas}}$ : portata di biogas prodotto ( $\text{m}^3/\text{giorno}$ );

V: volume del reattore (m<sup>3</sup>).

- Efficienza di rimozione del substrato. Esistono diversi modi di esprimere l'efficienza di rimozione del substrato nel corso del processo di digestione anaerobica, non solo legati ai diversi parametri utilizzati per esprimere la sua concentrazione (sostanza solida totale, sostanza solida volatile, COD o BOD). I differenti metodi di valutazione adottati da ricercatori ed operatori del settore sono essenzialmente imputabili alla difficoltà di chiudere i bilanci di massa. In questo lavoro di tesi, l'efficienza di rimozione è stata valutata in base alla rimozione di COD e carboidrati totali. In generale, la più semplice relazione per la conversione del substrato in biogas viene espressa in termini percentuali tramite la seguente equazione:

$$\eta\% = (Q \times \text{COD}_{\text{in}} - Q \times \text{COD}_{\text{us}}) / (Q \times S) \times 100$$

dove:

$\eta\%$ : percentuale di COD rimosso

Q: portata influente ed effluente (m<sup>3</sup>/giorno);

COD<sub>in</sub>: concentrazione di COD nella portata influente (kg/m<sup>3</sup>);

COD<sub>us</sub>: concentrazione di COD nella portata effluente.

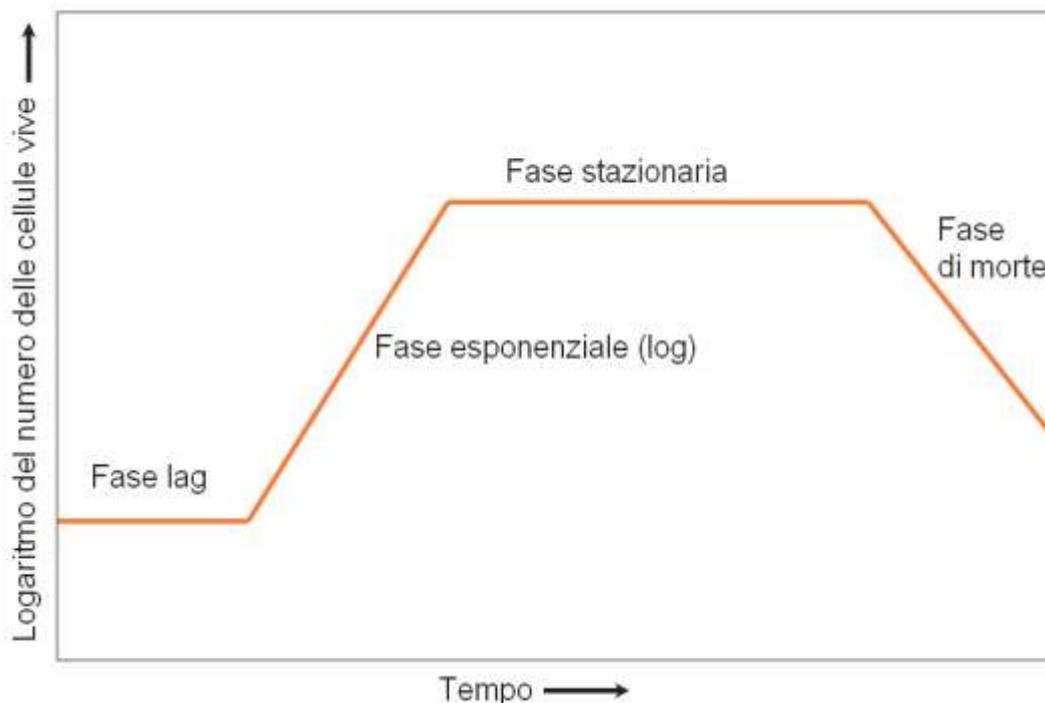
### **1.5 Conduzione del processo: continuo o discontinuo.**

In base alla frequenza con cui l'impianto viene alimentato, si distinguono processi discontinui (*batch*), processi continui e processi semicontinui (*fed-batch*).

### 1.5.1 Processi discontinui

Con processo discontinuo si intende un sistema alimentato in maniera cosiddetta "batch"; si avrà, cioè, l'alternanza di fasi quali l'alimentazione del reattore con il substrato ed un inoculo, l'avanzamento del processo e, giunti all'esaurimento del substrato, la fase di scarico del reattore.

Contemporaneamente alla crescita dei microrganismi, si ha il consumo del substrato. La crescita continua fino a quando non si esaurisce il substrato e si ha l'accumulo di composti tossici nell'ambiente di reazione in quantità tale da inibire la crescita.



**Figura 1.4.** Profilo temporale di una coltivazione in batch. (Tesi Valentina Costa 2009-2010).

È possibile suddividere il processo batch/discontinuo in quattro fasi:

1) fase di latenza (*lag phase*): fase a concentrazione costante, in cui i microrganismi adattano il loro metabolismo alle nuove condizioni esterne. Dopo

questa fase inizierà la formazione di nuove cellule, e la concentrazione di biomassa aumenterà.

2) fase di crescita esponenziale (*log phase*): i microrganismi crescono al massimo della velocità e l'insieme della coltura aumenta esponenzialmente. La crescita esponenziale deve interrompersi a causa dell'esaurimento di un substrato limitante.

3) fase stazionaria: il numero di cellule vive e quello di cellule morte si equivalgono. Le cellule consumano i nutrienti liberati dalla lisi di altre cellule esclusivamente per il metabolismo di base, con riproduzione quiescente.

4) fase di morte cellulare: prevalgono le cellule morte

Il reattore è produttivo solo durante la *log-phase*, che è quindi l'unica fase di interesse; inoltre, dato che la *lag-phase* costituisce solo voci di costo, è bene che sia la più breve possibile. Questo obiettivo può essere raggiunto immettendo nel reattore un'alta concentrazione di cellule che si trovino già in fase di crescita esponenziale, cioè già adattate a quel medium di coltura. In ogni caso, non conviene mai far proseguire il processo oltre la fase stazionaria.

Mentre in reattori di tipo CSTR (*Continuos Stirred Tank Reactor*) il processo viene operato in un punto stabile della curva di crescita della coltura, nel caso di reattori batch si sfrutta tutta la curva di crescita, dall'inizio alla fine.

In reattori di questo tipo il tempo di permanenza è definito come il rapporto tra la variazione di concentrazione del substrato e la velocità di reazione; analiticamente:

$$\mathbf{HRT} = \frac{C - C_0}{rc}$$

dove:

HRT: tempo medio di residenza idraulico (giorni);

C: concentrazione di substrato dopo un intervallo di tempo t (kg x m<sup>-3</sup>);

C<sub>0</sub>: concentrazione iniziale di substrato (kg x m<sup>-3</sup>);

rc: velocità di reazione di utilizzo del substrato C ( $\text{kg} \times \text{m}^{-3} \times \text{giorno}^{-1}$ ).

La modalità di coltura *batch* è poco costosa e semplice da implementare e da gestire, ma è anche poco produttiva. (Manuali e linea guida ANPA13/2002).

### 1.5.2 Processi continui

Per processo continuo si intende un sistema alimentato in modo continuo con un tempo di permanenza medio del substrato nel reattore espresso dal tempo di residenza idraulico (HRT).

Questo sistema consente di aumentare molto la produttività rispetto alla modalità *batch*, poiché prevede un'entrata e un'uscita attive che consentono l'espulsione dei composti tossici e l'immissione di nuovo substrato.

Inizialmente il processo viene attivato in modalità *batch* ma, prima che la velocità di crescita inizi a calare si aprono gradualmente sia l'ingresso sia l'uscita, fino a raggiungere una situazione ottimale di crescita esponenziale. Questa condizione è difficile da raggiungere e da mantenere; infatti, quando viene immesso nuovo substrato, i microrganismi avvertono un aumento di concentrazione e hanno bisogno di tempo per adattarsi. Contemporaneamente, essendo aperto anche lo scarico, la concentrazione di cellule microbiche nel reattore diminuisce. Tale diminuzione si protrae fino a che la popolazione non si è adattata alla nuova concentrazione di substrato e comincia di nuovo a proliferare, compensando la quantità di cellule in uscita dal reattore.

Mantenendo quindi una portata costante e uguale di carico e scarico, i microrganismi continuano a crescere a una certa velocità senza limiti, e si raggiunge uno stato stazionario.

Poiché però ad una velocità di crescita maggiore è associata una maggiore produttività, si cerca di massimizzare le portate in ingresso e in uscita. Nel fare questo bisogna prestare molta attenzione, perché da un certo punto in poi ad un importante aumento di concentrazione di substrato corrisponde un blando aumento della velocità di crescita. I microrganismi non riescono più a contrastare la diluizione e si ha il fenomeno del *wash-out*, cioè la biomassa viene dilavata dal reattore, ed è quindi necessario ri-implementare tutto il processo dall'inizio.

Per tutelarsi da questo rischio è bene effettuare un ricircolo della biomassa, in modo da avere la certezza che in ingresso al reattore vi sia sempre una certa quantità di biomassa con le caratteristiche adeguate.

In questa tipologia di processo, la concentrazione di substrato è bassa perché il microorganismo si trova alla massima capacità di consumo, e aumenta solo in condizioni di wash-out.

A seconda della soluzione adottata, i processi continui possono essere ad una o due fasi. Come riportato precedentemente (paragrafo 1.4.1) nei processi a fase unica le fasi biologiche della digestione, idrolisi/acidogenesi, acetogenesi e metanogenesi, hanno luogo nel medesimo reattore e contemporaneamente, pertanto, la fase più lenta del processo costituisce l'elemento di dimensionamento del reattore.

Nei processi a due fasi si hanno due reattori distinti, posti in serie tra loro, ciascuno dedicato ad una serie di reazioni: nel primo hanno luogo i fenomeni di idrolisi/acidogenesi ed acetogenesi mentre nel secondo si sviluppa la fase metanigena. Ciò permette di associare il tempo di residenza nel reattore alle diverse cinetiche dei ceppi microbici connessi alle due diverse fasi del processo di digestione.

Come già riportato, le condizioni ottimali di crescita per i batteri idrolitici/acidificanti e per quelli metanigeni sono differenti, il che farebbe della separazione delle fasi in reattori distinti una soluzione ideale per incrementare le rese dei due processi.

Lo schema complessivo di processo prevede una prima fase, quella di idrolisi ed acidificazione, che avviene in reattori di dimensioni più ridotte, dal momento che i tempi di ritenzione possono essere bassi (anche alcune ore), seguita poi da una seconda fase, in reattori di dimensioni maggiori, in cui si ha la metanogenesi. I due reattori possono essere del tipo completamente miscelato o con flusso a pistone o un sistema ibrido. Lo scarico del primo rappresenta l'alimentazione del secondo. (Manuali e linea guida ANPA13/2002).

#### 1.5.2.1 Processo in reattore continuo completamente miscelato senza ricircolo (CSTR)

In questo tipo di reattore la concentrazione del substrato, dei prodotti e della biomassa nell'effluente è uguale a quella nel reattore, il cui contenuto è assunto omogeneo. (Manuali e linea guida ANPA13/2002). Questo tipo di processo, che è generalmente utilizzato per la stabilizzazione dei fanghi prodotti negli impianti di depurazione o per processi wet o semi-dry di digestione di rifiuti organici è caratterizzato dall'eguaglianza del tempo di ritenzione idraulica e del tempo di ritenzione dei solidi (e quindi dei microrganismi):

$$\mathbf{HRT = SRT = V / Q \frac{V}{Q}}$$

dove:

HRT: tempo medio di residenza idraulico (giorni);

SRT: tempo medio di residenza dei fanghi (giorni);

Q: portata effluente (m<sup>3</sup>/giorno);

V: volume del reattore (m<sup>3</sup>).

#### 1.5.2.2 Processo in reattore continuo con ricircolo

Il ricircolo viene generalmente inserito con lo scopo di intensificare l'efficienza dei processi di stabilizzazione; consente infatti di reintrodurre nel reattore parte della biomassa attiva estratta con l'effluente, garantendo quindi maggiori concentrazioni della stessa all'interno del reattore ed un tempo di residenza dei solidi (microrganismi) diverso da quello idraulico. Il ricircolo viene generalmente implementato separando la frazione liquida da quella solida e, appunto, ricircolando quest'ultima all'interno del reattore. La separazione solido/liquido può essere ottenuta con sistemi più o meno sofisticati, a partire dalla semplice sedimentazione, mentre lo spurgo dei fanghi in eccesso può essere effettuato dal flusso di ricircolo o direttamente dal reattore.

In genere, per una rappresentazione analitica del processo, si adotta la semplificazione che la sede della reazione è il solo volume del reattore, mentre

nella fase di separazione non avvengono reazioni. (Manuali e linea guida ANPA13/2002).

Analiticamente l'espressione che descrive i parametri del sistema è:

$$\mathbf{HRT \neq SRT}$$

#### 1.5.2.3 Processo continuo in reattore con flusso a pistone

In questo tipo di processo una delle dimensioni del reattore è generalmente maggiore dell'altra: si potranno quindi avere reattori sviluppati lungo l'asse orizzontale o lungo quello verticale.

Il processo ideale prevede una alimentazione (con flusso continuo o semi-continuo) da un lato del reattore con successivo avanzamento lungo uno degli assi del reattore verso l'uscita, senza subire mescolamenti lungo questa direzione; l'unico mescolamento possibile è quello in direzione ortogonale rispetto all'asse di avanzamento del substrato.

Il tempo di residenza di ogni elemento di liquido corrisponde effettivamente al tempo di residenza idraulico, e la concentrazione dei composti lungo l'asse di avanzamento sarà quindi variabile. L'effettivo esercizio di una tale configurazione è possibile solamente se si ammette la presenza di biomassa nel flusso influente, cioè che sia  $X_0 \neq 0$ .

Diversamente sarà necessario il ricircolo della biomassa, ed è questa seconda soluzione che in genere viene utilizzata nelle applicazioni reali. (Manuali e linea guida ANPA13/2002).

#### 1.5.2.4 Processo continuo con ricircolo in reattore con flusso a pistone

Questo schema di processo viene particolarmente utilizzato nel caso si trattino substrati caratterizzati da un elevato contenuto in sostanza solida dal momento che, in questo modo, si superano le difficoltà legate ad una corretta miscelazione.

In questo caso, in analogia con i processi CSTR, è prevista la separazione solido/liquido dell'effluente: la parte solida verrà parzialmente o totalmente

ricircolata all'interno del reattore, così da poter disporre di un efficace inoculo e controllare la concentrazione della biomassa attiva all'interno del reattore. Può tuttavia essere previsto il ricircolo dell'effluente senza ricorrere ad alcuna separazione. (Manuali e linea guida ANPA13/2002).

### 1.5.3 Coltivazione in modalità *fed-batch* (*batch* alimentato)

Il sistema *fed-batch* (sistema chiuso alimentato) permette di prolungare il tempo di crescita dei microrganismi prima di raggiungere lo stato stazionario. Il terreno viene infatti continuamente addizionato alla coltura. È una modalità di coltivazione avente caratteristiche intermedie tra il *batch* e il continuo. In particolare, una tecnica *fed-batch* molto diffusa è la cosiddetta modalità di coltivazione SBR (*Sequencing Batch Reactor*). Anche in questo caso si parte da un *batch*, in cui però dopo aver lasciato il sistema chiuso per un certo periodo di tempo, si rimuove parte del contenuto del reattore, si immette substrato fresco e il sistema viene nuovamente chiuso. Il processo descritto viene poi ripetuto diverse volte. Esiste anche la variante RSBR (*Repeated Short-time Batch Reactor*), in cui i *batch* successivi sono di breve durata.

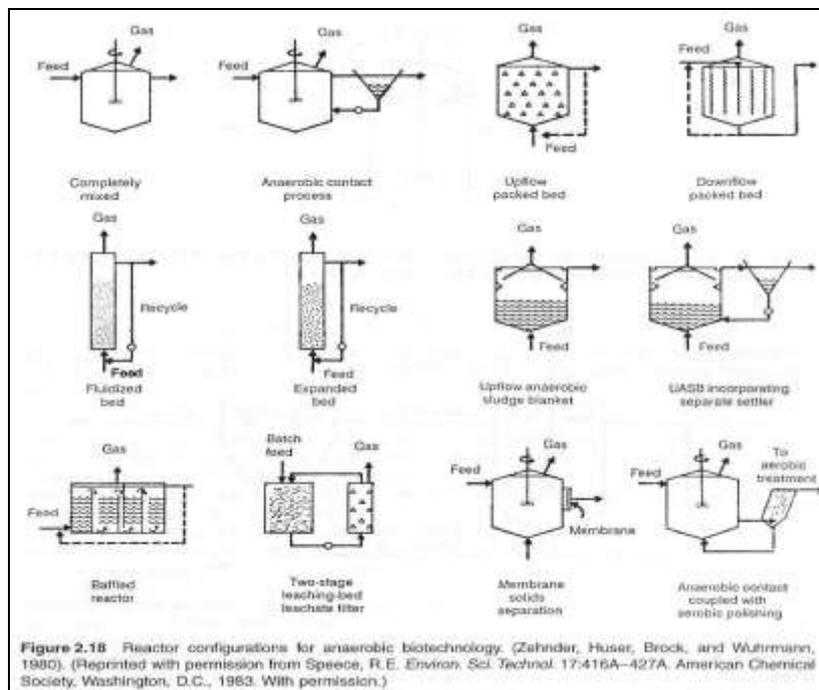
Il sistema *fed-batch* presenta diversi vantaggi, sia rispetto al *batch* sia rispetto al continuo: innanzitutto si elimina la fase di latenza e non si rischia il *wash out*, e contemporaneamente si raggiunge una produttività maggiore rispetto a quella della modalità *batch*.

A differenza del sistema continuo, la concentrazione di substrato in ingresso non rimane costante: i microrganismi sono sottoposti a cicli di abbondanza e di carenza di substrato, e questo li rende più flessibili dal punto di vista metabolico, e di conseguenza più produttivi e resistenti.

Il sistema di coltivazione *fed-batch* è particolarmente indicato quando il processo in continuo non funziona o presenta elevato rischio di *wash out*, o quando si voglia raggiungere una produttività maggiore rispetto a quella data dal *batch*. (Manuali e linea guida ANPA13/2002).

## 1.6 Reattori impiegati

Le configurazioni dei reattori utilizzati nella digestione anaerobica di reflui e scarti (normalmente con valori di umidità dell'85% o superiori) si basano su diverse tipologie di sistemi atti ad ottenere un'elevata ritenzione della biomassa all'interno dei reattori stessi. I reattori del tipo UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Reactor*) si basano ad esempio sull'intrinseca sedimentabilità di matrici fangose in assenza di una forte agitazione meccanica. La biomassa attiva viene così mantenuta nel reattore sotto forma di granuli di fango.



**Figura 1.5.** Possibili configurazioni di reattori per digestione anaerobica

Tale configurazione, riportata tra quelle in figura 1.5, è ampiamente utilizzata per il trattamento di reflui di distillerie, industrie alimentari, concerie e reflui urbani, presenta lo svantaggio di richiedere lunghi periodi di *start-up* e una sufficiente quantità iniziale di fango già sedimentato in granuli.

Una variante dei reattori UASB è ottenibile applicando portate maggiori che provocano una “espansione” (fluidificazione) del fango, aumentandone il contatto con il refluo trattato, tale configurazione è detta EGSB (*Expanded Granular Sludge Reactor*).

Un'altra modalità di ritenzione della biomassa nei reattori consiste nel ricorso a materiali inerti per l'immobilizzazione della stessa: nei reattori a letto fluidizzato (**FB** – *fluidized bed*) l'adesione della biomassa al supporto sottoforma di un biofilm consente di operare a maggiori carichi organici e di ottenere una maggiore resistenza a composti inibitori presenti nel refluo (Rajeshwari et al., 2000). Esistono inoltre materiali che anziché promuovere la formazione di un biofilm, “intrappolano” la biomassa sottoforma di granuli macroscopici, a questi ci si riferisce con l'espressione “filtri anaerobici” (**AF** – *anaerobic filter*).

Il carico organico applicabile ai digestori anerobici dipende strettamente dalla configurazione impiantistica scelta e dalla presenza o meno di sistemi di immobilizzazione della biomassa. La tabella 1.1 mostra infatti come il carico organico tipicamente applicato aumenti passando da sistemi perfettamente miscelati (CSTR -*continuous stirred tank reactors*) a sistemi con minore miscelazione (UASB -*upflow anaerobic sludge reactor*) e supporti per “l'intrappolamento” (AF - *anaerobic filter*) o l'immobilizzazione della biomassa (FB - *fluidized bed*).

Configurazione del reattore	Carico organico tipico (kgCOD/m <sup>3</sup> /giorni)
CSTR	0.25 - 3
UASB	10 - 30
AF	1 - 40
FB	1 - 100

**Tabella 1.1.** Carichi organici tipicamente applicati a diverse configurazioni di reattori. (Manuali e linea guida ANPA13/2002).

La presenza di ioni nella matrice trattata rappresenta un ulteriore parametro critico non solo per le esigenze nutrizionali dei metanigeni ma anche perché influenza il processo della formazione dei granuli in reattori di tipo UASB. (Manuali e linea guida ANPA13/2002).

## 1.7 Co-digestione di diversi substrati

La co-digestione consiste nella digestione anaerobica simultanea di una miscela di due o più substrati organici (Sosnowski et al., 2003); tale operazione presenta molteplici vantaggi: maggiori stabilità ed efficienza del processo, per il migliore rapporto tra i diversi nutrienti, in particolare carbonio e azoto (Sosnowski et al., 2003), diluizione di composti potenzialmente tossici, effetti sinergici tra differenti gruppi microbici e maggiori carichi di sostanza organica biodegradabile (Sosnowski et al., 2003). L'applicabilità del processo di co-digestione è stata studiata per diverse miscele di substrati: fanghi di supero e FORSU (Sosnowski et al., 2007), fanghi primari e scarti agroalimentari separati dalla FORSU (Gómez et al., 2006), fanghi di supero e letame suino (Murto et al., 2004), fanghi di supero e scarti di torrefazione (Neves et al., 2006), acque di vegetazione e letame di pollame (Gelegenis et al., 2007).

Facendo particolare riferimento alla co-digestione di letame e siero di latte, che è stata studiata in questo lavoro di tesi, Gelegenis et al. , (2006) sperimentarono un CSTR alimentato con letame e mantenuto ad una concentrazione di COD costante attraverso l'aggiunta di aliquote di siero di latte. Impostando un HRT di 18 giorni e lavorando a 35°C con un carico organico di 4.9g COD/  $L_{reattore}$  per giorno, la produzione di biogas aumentò da 1.5 a 2.2 L /  $L_{reattore}$  per giorno e attribuirono questo risultato alla maggiore biodegradabilità dei carboidrati (principale costituente del siero di latte) rispetto a quella dei lipidi (principale costituente del letame) e all'aumento del rapporto tra carbonio e azoto.

## 1.8 Ciclo integrato anaerobico-aerobico

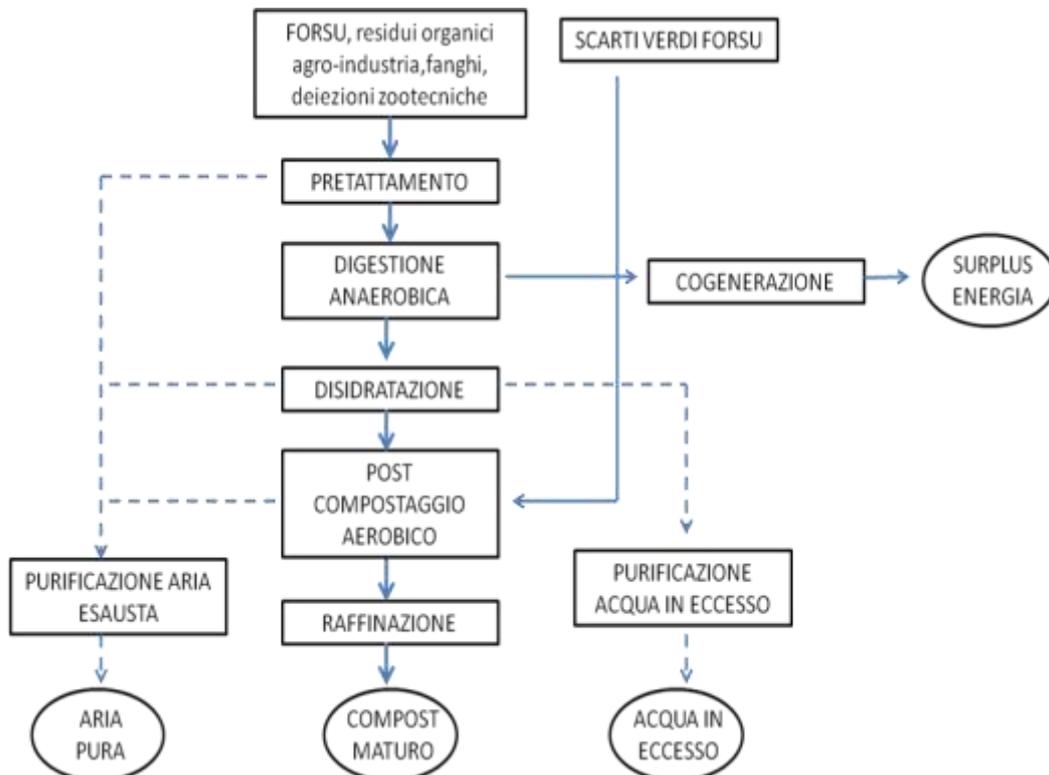
Negli ultimi anni il fatto che, a fronte del consolidamento del ruolo del compostaggio aerobico, anche la digestione anaerobica stia ottenendo sempre maggiore attenzione tra le tecnologie per il trattamento di rifiuti organici, ha invogliato sempre più i progettisti ad esaminare le possibili integrazioni dei due processi al fine di ottimizzarne i rispettivi pregi e minimizzarne gli svantaggi. (S.Piccinini, 2004).

I principali vantaggi e svantaggi dei due processi possono essere così sintetizzati:

- la digestione anaerobica produce energia rinnovabile (biogas) a fronte del compostaggio aerobico che consuma energia;
- gli impianti anaerobici sono in grado di trattare tutte le tipologie di rifiuti organici indipendentemente dalla loro umidità, a differenza del compostaggio che richiede un certo tenore di sostanza secca nella miscela di partenza;
- gli impianti anaerobici sono reattori chiusi e quindi non vi è rilascio di emissioni gassose maleodoranti in atmosfera, come può avvenire durante la prima fase termofila del compostaggio;
- nella digestione anaerobica si ha acqua di processo in eccesso che necessita di uno specifico trattamento, mentre nel compostaggio le eventuali acque di percolazione possono essere riciclate come agente umidificante sui cumuli in fase termofila;
- gli impianti di digestione anaerobica richiedono investimenti iniziali maggiori rispetto a quelli di compostaggio;
- la qualità del digestato, in uscita dalla digestione anaerobica, comporta un uso agronomico diverso rispetto al compost aerobico.

L'integrazione dei due processi può portare dei notevoli vantaggi, in particolare:

- si migliora nettamente il bilancio energetico dell'impianto, in quanto nella fase anaerobica si ha in genere la produzione di un surplus di energia rispetto al fabbisogno dell'intero impianto;
- si possono controllare meglio e con costi minori i problemi olfattivi: le fasi maggiormente odorigene sono gestite in reattore chiuso e le "arie esauste" sono rappresentate dal biogas (utilizzato e non immesso in atmosfera). Il digestato è già un materiale semi-stabilizzato e, quindi, il controllo degli impatti olfattivi durante il post-compostaggio aerobico risulta più agevole;
- si ha un minor impegno di superficie a parità di rifiuto trattato, pur tenendo conto delle superfici necessarie per il post-compostaggio aerobico, grazie alla maggior compattezza dell'impiantistica anaerobica;
- si riduce l'emissione di CO<sub>2</sub> in atmosfera



**Figura 1.6.** Schema del ciclo di trattamento integrato anaerobico/aerobico. (S.Piccinini, 2004)

## 1.9 La digestione anaerobica: lo stato dell'arte in Europa

In Europa la diffusione della digestione anaerobica, è incominciata nel settore della stabilizzazione dei fanghi di depurazione e, attualmente, è ampiamente utilizzata nel trattamento della frazione organica dei rifiuti urbani in miscela con altri scarti organici industriali e con liquami zootecnici (co-digestione).

E' stato stimato che nel 2008, i paesi della EU abbiano prodotto 7542ktep (87TWh) di biogas di cui, più di 1/3, deriva da discariche di RSU (Rifiuti Solidi Urbani). Poiché nel 2003 la produzione di biogas era pari a 3219 ktep (37 TWh), nell'arco di 5 anni si è assistito ad un aumento del 134%. Lo stesso lavoro prevede che entro il 2020 la produzione di biogas salirà a 17987 ktep (circa 209 TWh)

Il paese europeo nel quale la digestione anaerobica ha avuto il maggior impulso è la Germania che, grazie anche ad una politica di incentivazione del Governo tedesco, nel 2008 aveva una produzione di biogas pari a 3676ktep.(European Biogas Association, 2010).

Per quel che riguarda l'Italia, è stato stimato che nel 2007 la produzione di biogas è stata di 406,2 ktep (circa 4,7TWh) di cui, oltre l'85%, è stata ottenuta dal recupero del biogas prodotto dalle discariche di rifiuti solidi urbani.

Nel Dicembre 2008, un censimento degli impianti presenti nel nostro paese mostrava 241 impianti presenti sul territorio nazionale di cui 57 in costruzione. La maggior parte degli impianti censiti, ovvero 202, operava con liquami zootecnici, scarti agricoli, residui agroindustriali e colture energetiche ed la quasi totalità degli impianti erano localizzati nelle regioni del nord ( Lombardia , Emilia-Romagna,Veneto e Trentino-Alto Adige).( CRPA 2009).

Rispetto a un precedente censimento effettuato nel 1999 (S.Piccinini, 2004), il numero degli impianti, se si considerano anche quelli in costruzione, è aumentato del 180%.

## 1.10 Gestione dei rifiuti agro-industriali

I principali rifiuti prodotti dal settore agricolo sono: *fanghi da operazioni di lavaggio e pulizia, scarti animali, scarti vegetali, rifiuti di plastica* (esclusi imballaggi), *rifiuti agrochimici contenenti sostanze pericolose, feci animali, urine e letame* (comprese le lettiere usate), *effluenti raccolti separatamente e trattati fuori sito, rifiuti della silvicoltura e rifiuti non specificati altrimenti.*

I rifiuti da attività agricole e agro-industriali sono classificati, ai sensi dell'art. 184 del D.Lgs. n.152 del 3 aprile 2006, come rifiuti speciali e gli imprenditori agricoli, al pari degli altri produttori di rifiuti sono tenuti, a norma dell'art.10 del D.lgs. 22/97, a farsi carico delle operazioni di gestione dei medesimi.(ANPA, 2001).

### 1.10.1 Gestione del siero di latte

Il primo sottoprodotto, derivante dai processi di lavorazione del formaggio, è, il siero il cui fattore di produzione è stato stimato pari a circa 5.900 chilogrammi per tonnellata di formaggio prodotto. Esso viene utilizzato, nella maggior parte dei casi, per la produzione della ricotta e talvolta scremato per la produzione di panna e burro. Nel caso in cui il caseificio non produca ricotta, il siero viene utilizzato per l'alimentazione animale, rappresentando comunque un onere per l'azienda.

Il quantitativo totale di siero ottenuto, considerando una quantità di prodotto principale pari a 1.023.811 t/a, è stato stimato in circa 6.092.000 t/a. delle quali 3.730.000 t/a sono destinate alla zootecnia e allo smaltimento.

Tra le forme di smaltimento, sta riscuotendo sempre più interesse la possibilità di utilizzarlo in co-digestione anaerobica con altri scarti organici.(ANPA, 2001).

### 1.10.3 Gestione del letame

Gran parte delle problematiche relative alle deiezioni zootecniche derivano dal fatto che gli allevatori, per una serie numerosa di motivazioni, tendono a “non gestire” letame e liquame o meglio a trattarli in modo non corretto. I presupposti per una cattiva gestione si ravvisano, nel caso del letame, già nell'impiego deficitario di paglia, cui consegue la messa in concimaia di un materiale nel quale difficilmente avranno sviluppo le trasformazioni aerobiche necessarie per

l'ottenimento di un buon ammendante e il suo stoccaggio all'aperto, senza protezione dalle acque meteoriche, contribuisce a peggiorarne le caratteristiche e può determinare fenomeni importanti di rilascio dei nutrienti.

La tipologia di trattamento delle deiezioni è essenzialmente legata alla loro composizione: deiezioni ricche in acqua mal si prestano ad un trattamento aerobico quale il compostaggio, sostenibile solamente in presenza di un'abnorme quantità di materiale ligno-cellulosico come coadiuvante strutturale del processo. Per questa tipologia appare senz'altro più conveniente la via anaerobica.(Rivista terra trentina, 2002).

## 2.1 SCOPO

Il presente lavoro sperimentale, condotto presso i laboratori del *Dipartimento di Ingegneria Civile, Ambientale e dei Materiali (DICAM)* della Facoltà di Ingegneria, si inserisce in un contesto di attività finalizzate al biorisanamento e alla valorizzazione di rifiuti secondo principi di sostenibilità ambientale.

Scopo del lavoro è stato elaborare una tecnica di digestione anaerobica a due fasi per la produzione di biogas ricco in metano a partire da una miscela costituita da letame bovino e siero di latte, trasformando così dei rifiuti di natura agroindustriale in risorsa energetica “pulita” favorendone al contempo l’igienizzazione, la diminuzione in volume e, di conseguenza, agevolandone lo smaltimento.

I sistemi a due fasi dovrebbero garantire migliori risultati rispetto a quelli monostadio perché in quest’ultimi le condizioni non sono ottimali sia per i microrganismi idrolitici-acidogenici che per quelli metanogenici. (Ince O., 1998) Infatti, le due classi di microrganismi hanno differenti caratteristiche di crescita e in un digestore monostadio non è possibile implementare delle condizioni che ne favoriscano contemporaneamente la crescita di entrambe. Condizioni quali brevi *HRT* e bassi pH, favorevoli ai batteri idrolitici-acidogenici, risulterebbero inibitorie per quelli metanigeni. (Desai M. et al, 1994)

Nei sistemi a due stadi invece, controllando indipendentemente le condizioni di ciascuna fase, è possibile selezionare differenti batteri in ognuno dei due digestori. Ai fini dello scopo sopra menzionato, inizialmente è stato effettuato un lavoro di screening attraverso l’allestimento di prove *batch* condotte in micro-reattori (denominati microcosmi) contenenti circa 50 mL di substrato al fine di:

- individuare l’inoculo (vedi paragrafo 3.1.2) più performante
- valutare il *potenziale di biometanazione (BMP)* delle due matrici di scarto;
- valutare le condizioni ottimali di lavoro per la fase acidogenica in termini di temperatura, pH e *HRT*.

Al termine del periodo di screening, sono stati messi in opera una serie di reattori anaerobici metanogenici allo scopo di confrontarne le performance. I reattori impiegati sono:

- un reattore da 500 mL operante in continuo secondo modalità “monostadio” e classificabile come *CSTR*;
- un reattore del tutto simile al precedente ma preceduto da un ulteriore *PFR* anaerobico da 120 mL operante in condizioni acidogeniche, di modo che l'intero processo fosse costituito da due stadi consecutivi, quali il digestore pre-acidificante dal volume di 120 mL e il *CSTR* metanogenico dal volume di 500 mL;
- un reattore a due compartimenti concentrici (fasi concentriche) costruito in maniera tale che l'effluente della prima fase acidogenica (pre-acidificante), relativa al comparto interno scaricasse per troppo pieno nel comparto esterno (mantenuto ad un livello tale da garantire un volume operativo di circa 800 mL e rimescolato giornalmente servendosi di un flusso di azoto), nel quale la digestione anaerobica avveniva in condizioni metanogeniche. La fase acidogenica era assimilabile ad un *PFR* e aveva un volume di 120 mL.

I processi sono stati monitorati in termini di produzione volumetrica e composizione di biogas, *COD*, carboidrati totali, concentrazione di acidi grassi volatili e pH.

Il lavoro di ricerca proseguirà con la caratterizzazione biologica dei consorzi microbici sviluppatisi all'interno di ciascun reattore. Ciò darà una visione più completa del funzionamento dei processi e consentirà una maggiore ottimizzazione alla luce delle classi di batteri presenti.

## **3 MATERIALI E METODI**

### **3.1 Parte sperimentale**

#### **3.1.1 I substrati**

In questo lavoro è stato studiato il trattamento biologico dei seguenti rifiuti agro-industriali:

- Letame bovino
- Siero di latte (liquido di risulta dalla produzione del formaggio)

Il letame bovino non è stato utilizzato tal quale ma è stato trattato in maniera tale da poter essere facilmente usato negli impianti descritti al paragrafo 3.1.4. Infatti trattandosi di un solido, sarebbe stato impossibile pomparlo all'interno degli impianti utilizzando le pompe peristaltiche a disposizione.

Quindi, in questo lavoro, col termine "letame" in realtà si intende una soluzione di letame/acqua in rapporto 1:2 in volume, omogeneizzata con un mixer ad immersione e filtrata con un setaccio avente luce di 0.053mm.

I rifiuti di cui sopra sono stati caratterizzati in termini di: densità, COD solubile, solidi totali e volatili, proteine e carboidrati totali (vedi tabella 3.1).

### 3.1.2 Gli inoculi

Al fine di produrre biogas dai substrati di cui al paragrafo 3.1.1 sono stati utilizzati tre diversi inoculi:

- inoculo ACQUE di VEGETAZIONE
- inoculo LETAME
- inoculo REATTORE

I primi due inoculi rappresentano rispettivamente campioni di acque di vegetazione della spremitura delle olive e letame bovino mantenuti in condizioni di anaerobiosi fino al raggiungimento, dei consorzi microbici naturalmente presenti, di condizioni metanogeniche.

L'inoculo REATTORE (il nome deriva dal fatto che è stato utilizzato per inoculare una serie di reattori anaerobici allestiti precedentemente a questo lavoro di tesi) è stato ottenuto presso i laboratori del *DICAM* da un reattore RSBR (*Repeated Short-time Batch Reactor*) termostato e alimentato con letame bovino e percolato prodotto dalla frazione organica separata meccanicamente dai rifiuti solidi urbani (*Mechanical Selected-Organic Fraction of Municipal Solid Waste, MS-OFMSW*). All'interno del reattore i consorzi microbici hanno così avuto il tempo di acclimatarsi e giungere in fase metanogenica.

Gli inoculi sono stati caratterizzati in termini di densità, COD solubile, solidi totali e volatili, proteine e carboidrati totali (vedi tabella 3.1).

	<b>In. Acque Vegetazione</b>	<b>In. Letame</b>	<b>In. Reattore</b>	<b>Letame</b>	<b>Siero di latte</b>
<b>Densità (g/mL)</b>	<b>0.999±0.023</b>	<b>1.057±0.040</b>	<b>1.022±0.019</b>	<b>0.989±0.032</b>	<b>0.994±0.002</b>
<b>COD (g/L)</b>	<b>10.2±2.3</b>	<b>10.4±2.4</b>	<b>22.6±4.7</b>	<b>10.2±3.8</b>	<b>58.4±3.1</b>
<b>Solidi Totali (% w/w)</b>	<b>1.15±0.04</b>	<b>2.32±1.02</b>	<b>3.18±0.95</b>	<b>2.59±0.07</b>	<b>4.46±3.17</b>
<b>Solidi Volatili (% w/w)</b>	<b>0.49±0.01</b>	<b>1.32±0.71</b>	<b>1.46±0.31</b>	<b>1.77±0.04</b>	<b>0.43±0.17</b>
<b>Proteine (g/L)</b>	<b>n.p.</b>	<b>n.p.</b>	<b>n.p.</b>	<b>0.4±0.4</b>	<b>0.9±0.4</b>
<b>Carboidrati (g/L)</b>	<b>n.p.</b>	<b>n.p.</b>	<b>n.p.</b>	<b>1.1±0.2</b>	<b>14.6±2.3</b>

**Tabella 3.1.** Caratterizzazione degli inoculi e dei substrati. N.B. I valori riportati sono le medie calcolate su tre misurazioni e applicando il test T di Student con intervallo di fiducia del 95%. Le sigle %w/w (dall'inglese weight/weight) indicano una percentuale peso su peso.

### 3.1.3 Allestimento dei microcosmi

In questo lavoro con il termine microcosmo si intende una prova in batch eseguita in apposite bottiglie in vetro da circa 125mL munite di tappo in gomma e ghiera (vedi figura 3.1).



**Figura 3.1.** Alcuni microcosmi allestiti durante la sperimentazione

I microcosmi sono stati utilizzati per effettuare le seguenti prove:

A) Ricondizionamento degli inoculi; volta a portare quest'ultimi in condizioni metanogeniche poiché erano da tempo conservati in frigo (5°C) o in incubatore (35°C).

A tale scopo è stata preparata la seguente serie di microcosmi:

Sigla	Inoculo	Substrato
IA1	In. Acqua Vegetazione	Acqua Vegetazione
IA2	In. Acqua Vegetazione	Acqua Vegetazione
IL1	In. Letame	Letame
IL2	In. Letame	Letame
IR1	In. Reattore	Purea
IR2	In. Reattore	Purea

**Tabella 3.2.** Gli inoculi al punto A.

Inoculo e substrato di crescita sono stati mescolati in rapporto 1:1 volume/volume per una quantità totale di circa 50mL.

B) Individuazione dell'inoculo e della matrice più performanti. A tale scopo è stata preparata la seguente serie di microcosmi:

Sigla	Inoculo	Substrato	Sigla	Inoculo	Substrato
L1A	In. Acqua Vegetazione	Letame	501A	In. Acqua Vegetazione	Letame(50%)/ Siero(50%)
L2A	In. Acqua Vegetazione	Letame	502A	In. Acqua Vegetazione	Letame(50%)/ Siero(50%)
L1L	In. Letame	Letame	501L	In. Letame	Letame(50%)/ Siero(50%)
L2L	In. Letame	Letame	502L	In. Letame	Letame(50%)/ Siero(50%)
L1R	In. Reattore	Letame	501R	In. Reattore	Letame(50%)/ Siero(50%)
L2R	In. Reattore	Letame	502R	In. Reattore	Letame(50%)/ Siero(50%)
S1A	In. Acqua Vegetazione	Siero Latte	LETAME1	NO INOCULO	Letame
S2A	In. Acqua Vegetazione	Siero Latte	LETAME2	NO INOCULO	Letame
S1L	In. Letame	Siero Latte	SIERO1	NO INOCULO	Siero Latte
S2L	In. Letame	Siero Latte	SIERO2	NO INOCULO	Siero Latte
S1R	In. Reattore	Siero Latte	50 1	NO INOCULO	Letame(50%)/ Siero(50%)
S2R	In. Reattore	Siero Latte	50 2	NO INOCULO	Letame(50%)/ Siero(50%)

**Tabella 3.3.** Elenco e composizione della serie di microcosmi al punto B.

Da tabella 3.3 si nota che alcuni microcosmi non sono stati inoculati. (LETAME1, LETAME2 , SIERO1 , SIERO2 ,50-1 e 50-2). Essi rappresentano microcosmi di controllo volti a valutare se l'aggiunta dell'inoculo (10% del volume totale di circa 50mL) ai substrati contenuti negli altri microcosmi, consenta o meno una variazione in termini di produzione e composizione di biogas.

C) Determinazione del miglior rapporto tra siero di latte e letame. Dalla prova al punto B è risultato che, utilizzando un *mix di letame e siero* inoculato con *l'inoculo reattore*, si ottiene una maggior produzione di metano rispetto agli altri casi. Al fine di determinare il mix ottimale, è stata allestita la serie di microcosmi di figura 3.4.

Sigla	Inoculo	Substrato	Sigla	Inoculo	Substrato
101R	In. Reattore	Letame(90%) / Siero(10%)	502R	In. Reattore	Letame(50%) / Siero(50%)
102R	In. Reattore	Letame(90%) / Siero(10%)	601R	In. Reattore	Letame(40%) / Siero(60%)
201R	In. Reattore	Letame(80%) / Siero(20%)	602R	In. Reattore	Letame(40%) / Siero(60%)
202R	In. Reattore	Letame(80%) / Siero(20%)	701R	In. Reattore	Letame(30%) / Siero(70%)
301R	In. Reattore	Letame(70%) / Siero(30%)	702R	In. Reattore	Letame(30%) / Siero(70%)
302R	In. Reattore	Letame(70%) / Siero(30%)	801R	In. Reattore	Letame(20%) / Siero(80%)
401R	In. Reattore	Letame(60%) / Siero(40%)	802R	In. Reattore	Letame(20%) / Siero(80%)
402R	In. Reattore	Letame(60%) / Siero(40%)	901R	In. Reattore	Letame(10%) / Siero(90%)
501R	In. Reattore	Letame(50%) / Siero(50%)	902R	In. Reattore	Letame(10%) / Siero(90%)

**Tabella 3.4.** Elenco e composizione della serie di microcosmi al punto C.

Tutte le prove sono state eseguite in doppio sperimentale.

In tutti i casi, al termine del riempimento dei micro-reattori, è stato misurato il pH, che ha mostrato una tendenza all'acidità a causa della presenza del siero di latte; qualora il valore misurato fosse stato al di fuori dal range ottimale per la crescita dei metanigeni (6.5 – 7.5) si è provveduto a riportarlo entro tale range mediante l'aggiunta di una soluzione di NaOH 10M.

I microcosmi appena descritti sono stati conservati in incubatore a 35°C effettuando periodicamente un monitoraggio in termine di volume di biogas prodotto (utilizzando il sistema Boyle-Mariotte di cui al paragrafo 3.2.7), composizione biogas e CODsolubile. Ad ogni campionamento è stato misurato il valore di pH, e corretto all'occorrenza. L'utilizzo di un flusso continuo di azoto, ha consentito di mantenere il sistema in condizioni anaerobiche durante tutta la fase di campionamento e misura.

Poiché lo scopo di questo lavoro è rappresentato dallo studio di processi anaerobici a due stadi, nei quali la fase metanogenica è preceduta da una fase pre-acidificante, è stato necessario allestire una quarta serie di microcosmi:

D) Valutazione delle condizioni di lavoro ottimali (temperatura, pH, HRT, presenza o meno dell'inoculo) della fase pre-acidificante. Anche in questo caso, le prove sono state eseguite in doppio sperimentale. In tabella 3.5 è riportato l'elenco dei microcosmi allestiti per questa prova.

sigla	inoculo	substrato
25°C NO pH A	NO INOCULO	Letame(50%)/ Siero(50%)
25°C NO pH B	NO INOCULO	Letame(50%)/ Siero(50%)
25°C pH A	NO INOCULO	Letame(50%)/ Siero(50%)
25°C pH B	NO INOCULO	Letame(50%)/ Siero(50%)
35°C pH A	NO INOCULO	Letame(50%)/ Siero(50%)
35°C pH B	NO INOCULO	Letame(50%)/ Siero(50%)
35°C NO pH A	NO INOCULO	Letame(50%)/ Siero(50%)
35°C NO pH B	NO INOCULO	Letame(50%)/ Siero(50%)
135°C pH A	In. Reattore	Letame(50%)/ Siero(50%)
135°C pH B	In. Reattore	Letame(50%)/ Siero(50%)
135°C NO pH A	In. Reattore	Letame(50%)/ Siero(50%)
135°C NO pH B	In. Reattore	Letame(50%)/ Siero(50%)
125°C pH A	In. Reattore	Letame(50%)/ Siero(50%)
125°C pH B	In. Reattore	Letame(50%)/ Siero(50%)
125°C NO pH A	In. Reattore	Letame(50%)/ Siero(50%)
125°C NO pH B	In. Reattore	Letame(50%)/ Siero(50%)

**Tabella 3.5.** Elenco e composizione della quarta serie di microcosmi al punto D.

Con le sigle “25°C” e “35°C” si indica la temperatura alla quale è stato mantenuto il microcosmo; la sigla “pH” indica che il pH è stato mantenuto nel range ottimale per la fase acidogenica (tra 5.5-6.5), mentre la sigla “NO pH” indica che non è stato prevista la correzione del pH.

### 3.1.4 Allestimento dei reattori

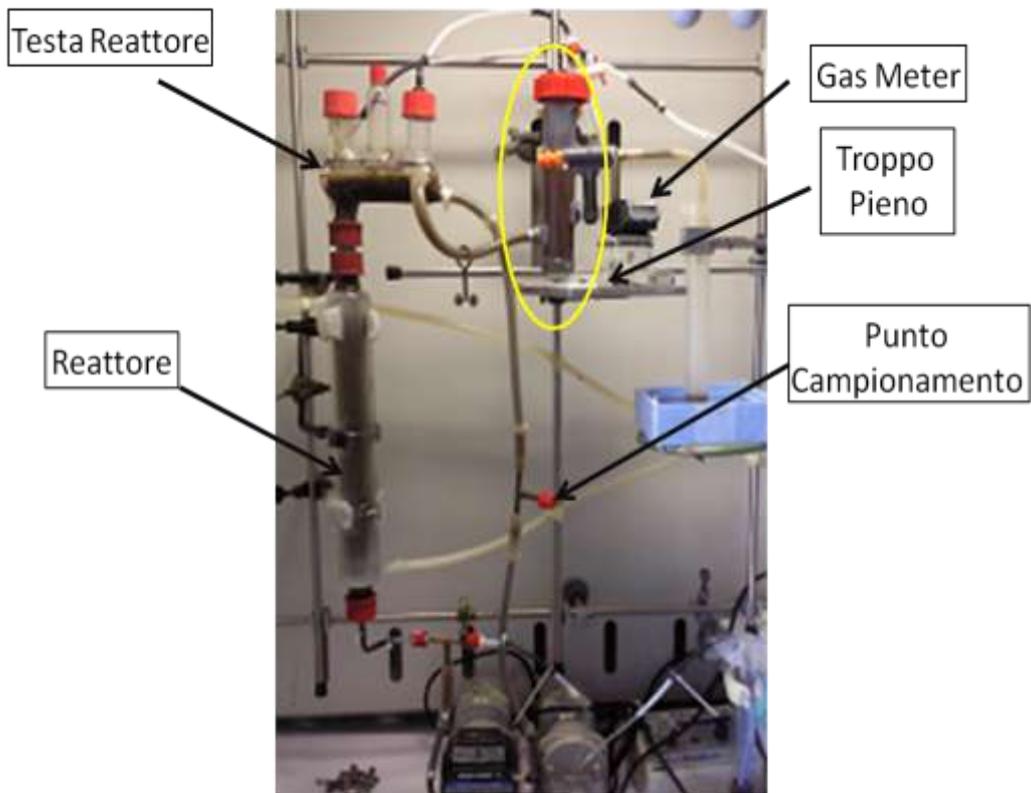
Al termine della fase di screening di cui al paragrafo 3.1.3, al fine di valutare le prestazioni dei processi a due stadi rispetto a quello monostadio, sono stati allestiti tre reattori (in scala da banco) riempiti con lo stesso substrato e inoculati allo stesso modo.

I reattori allestiti sono: un *reattore CSTR monostadio*; un *reattore multistadio a fasi successive* e un *reattore multistadio a fasi concentriche*.

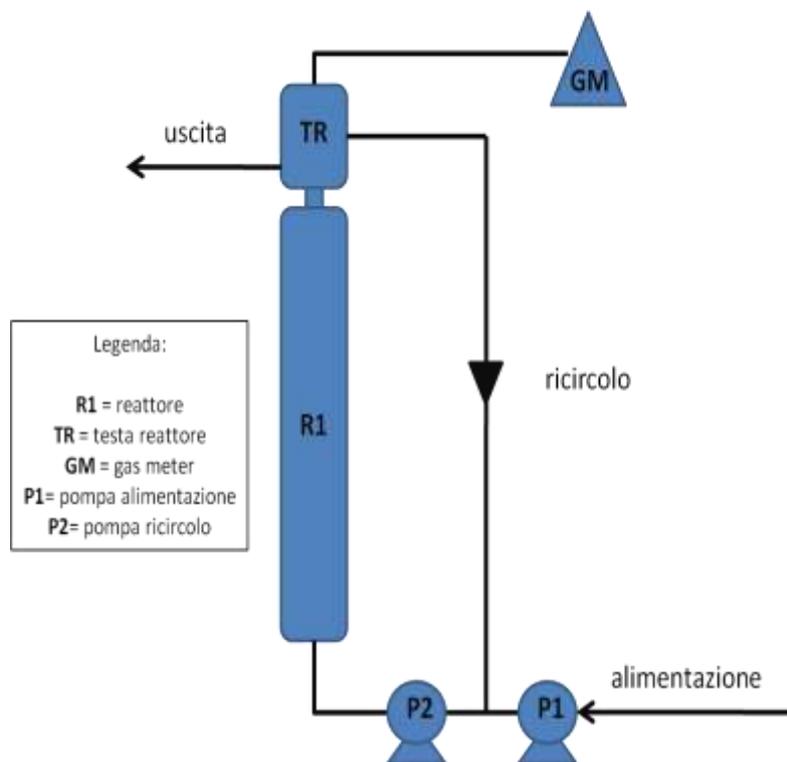
#### 3.1.4.1 Reattore CSTR monostadio.

Il reattore CSTR monostadio è stato allestito utilizzando un cilindro di vetro alto circa 30 cm e di diametro 4 cm, munito di camicia esterna per il passaggio di acqua calda termostata (35°C); sopra di esso è stato montato un apparato (che in questo lavoro sarà indicato come “*testa reattore*”) anch’esso in vetro sul quale sono collocate diverse aperture utilizzabili al fine di collegare la tubazione per l’uscita, quella per il ricircolo e la linea di captazione del gas. (Vedi figura 3.2 e 3.3).

L’alimentazione avveniva dal basso verso l’alto grazie ad una pompa peristaltica. A seguito della scarsa disponibilità di pompe, l’uscita, è stata garantita mediante un sistema in plastica da me costruito che, sfruttando il principio dei vasi comunicanti, scaricava per troppo pieno. (Vedi parte evidenziata in giallo in figura 3.2).



**Figura 3.2.** Immagine del reattore CSTR monostadio



**Figura 3.3.** Schema di funzionamento del reattore CSTR monostadio.

In realtà il reattore ha funzionato come un PFR con ricircolo infinito che equivale ad un CSTR.

Il volume complessivo del sistema di figura 3.2 e 3.3 era di circa 500 mL (il volume del troppo pieno non deve essere considerato).

Un tubo a "T" in vetro montato sulla linea ricircolo(indicato in figura 3.2 come "punto di campionamento") consentiva il periodico prelievo di campioni che venivano poi analizzati in termini di COD solubile, VFA, carboidrati totali, anioni e solidi totali volatili.

Il campionamento giornaliero del biogas veniva effettuato aspirando con una siringa da un setto perforabile posto sulla testa reattore, preventivamente avvinata con il biogas da estrarre, e iniettando il gas così aspirato in una vial chiusa nella quale era stata eliminata l'aria presente per mezzo di insufflaggio di azoto e contemporanea aspirazione.

Il biogas contenuto nella vial è stato analizzato come descritto al paragrafo 3.2.8.

#### 3.1.4.2 Reattore multistadio a fasi successive

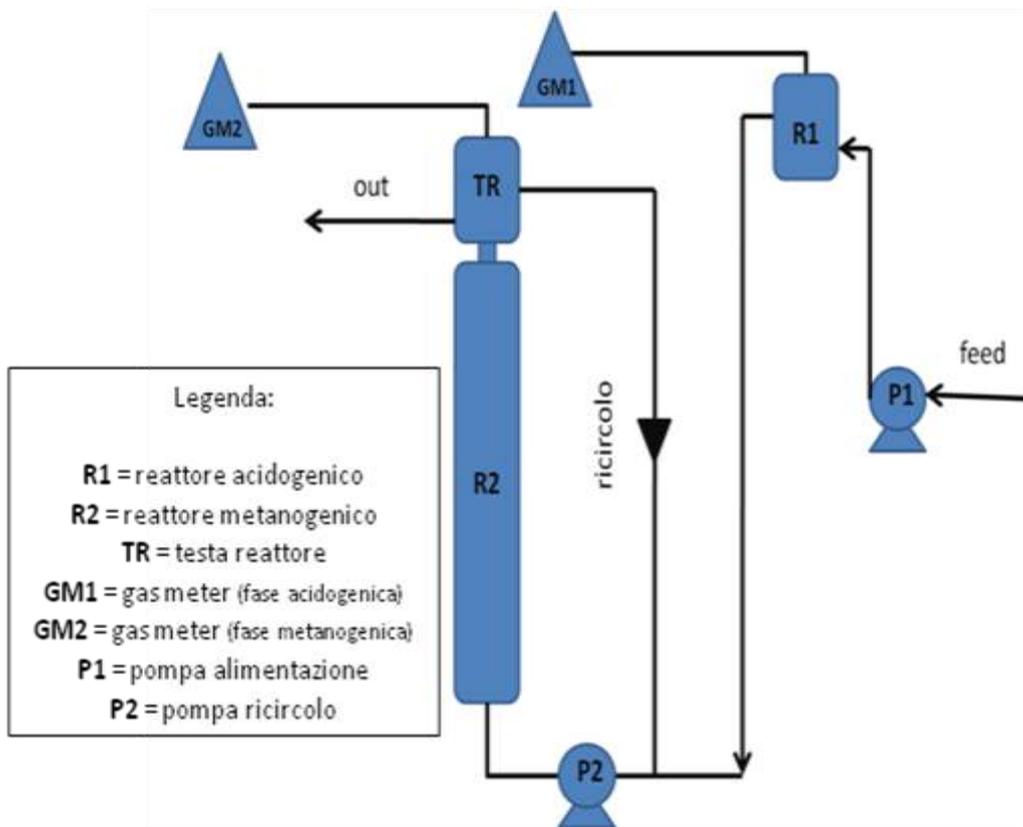
Il reattore multistadio a fasi successive era costituito da una fase metanogenica del tutto paragonabile al reattore di cui al punto 3.1.4.1 (funzionante dunque come un CSTR) preceduta da una fase acidogenica costituita da un sorta di piccola bottiglia in vetro dotata di alcune aperture utilizzabili al fine di collegare la tubazione per l'alimentazione, quella per l'uscita (che rappresenta quella di alimentazione della fase metanogenica) e la linea gas. Il volume della fase acidogenica era di 125 mL circa ed operava come un PFR.

Al fine di mantenere la fase acidogenica ad una temperatura costante, il digestore rappresentato dalla bottiglia appena descritta, è stato avvolto con del tubo in gomma dentro il quale circolava acqua alla temperatura di 35°C.

Il prelievo dei campioni di fango dal reattore, avveniva da un'apertura presente sulla bottiglia per quanto riguarda la fase acidogenica e sulla linea di ricircolo per quanto riguarda la fase metanogenica.

Il campionamento del biogas è stato effettuato allo stesso modo di quello descritto nel caso del reattore di cui al paragrafo 3.1.4.1

In figura 3.4 è riportato una schema del reattore appena descritto.



**Figura 3.4.** Schema di funzionamento del reattore multistadio a fasi successive.

### 3.1.4.3 Reattore multistadio a fasi concentriche

Il reattore multistadio a fasi concentriche (di cui lo schema di funzionamento e una sua foto presente all'avviamento sono riportati rispettivamente in figura 3.5 e figura 3.6) consisteva nella separazione delle fasi di aceto genesi e metanogenesi in due cilindri concentrici in vetro. Il cilindro centrale acidogenico aveva un volume di circa 120 mL, era munito di un'apertura sul fondo dalla quale effettuare l'alimentazione e aperto superiormente. Esso operava come un PFR. Il secondo cilindro, o meglio la corona metanogenica, era più alto del primo e la chiusura era garantita da un coperchio in vetro assicurabile con una cinghia metallica. Il coperchio era dotato di aperture dalle quali poter effettuare i campionamenti e collegare l'uscita del biogas.

La fase metanogenica è stata mantenuta ad un livello tale da assicurare un volume operativo di circa 800 mL.

Il sistema è stato mantenuto alla temperatura di 35°C mediante del tubo in gomma che avvolgeva l'intero reattore ed entro il quale circolava acqua a 35°C.

Il mescolamento della fase metanogenica è stato effettuato giornalmente durante la fase di alimentazione e scarico, usando un flusso di azoto. La procedura prevede l'apertura dell'uscita del gas sulla testa del reattore (V1) e della linea di ricircolo del gas (V2) dalla testa del reattore alla parte inferiore della fase metanogenica, seguita dall'apertura di V3 che permette l'ingresso del flusso di azoto. In futuro il rimescolamento sarà garantito da un sistema che sfrutta lo stesso biogas prodotto dal sistema.

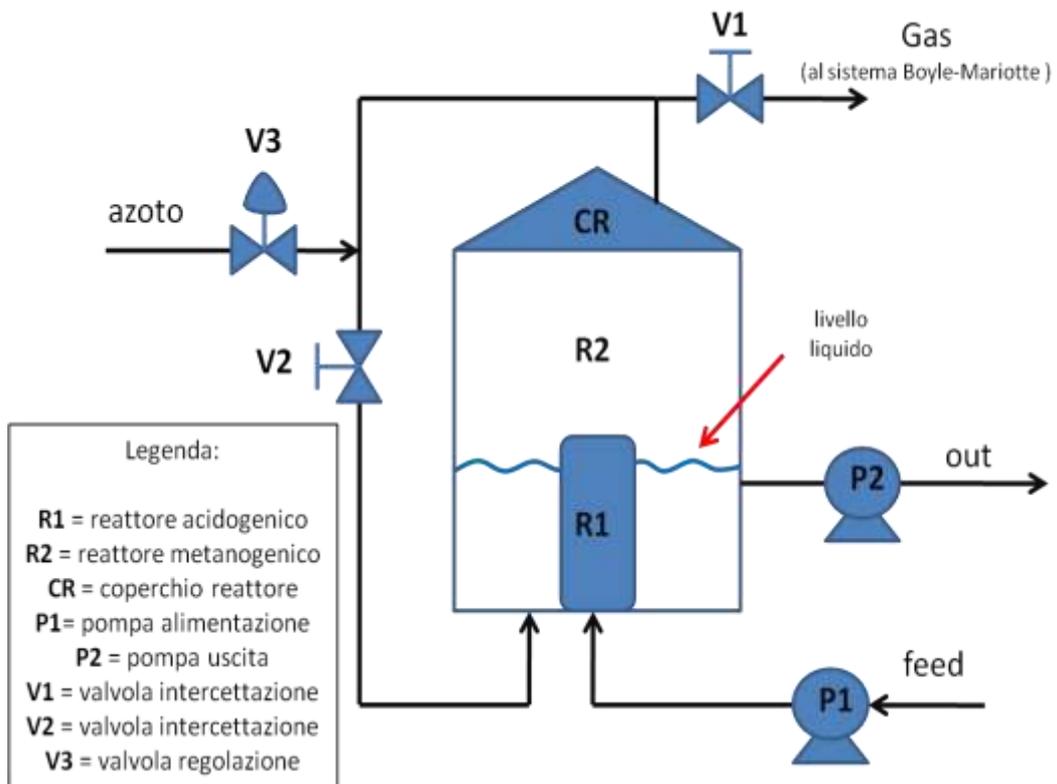
Il prelievo di campioni di fango dalla fase metanogenica e da quella acidogenica, nel primo caso avveniva da un'apertura posta sulla superficie laterale mentre, nel secondo, avveniva da una delle aperture poste sul coperchio del sistema.

Diversamente dal reattore di cui al paragrafo 3.1.4.2, per il quale sono stati tracciati due grafici di produzione di biogas, nel caso di questo reattore, per via di come era costruito, è stato impossibile separare il gas prodotto da ciascuna fase e quindi è stato tracciato un solo grafico che è il contributo di entrambe.

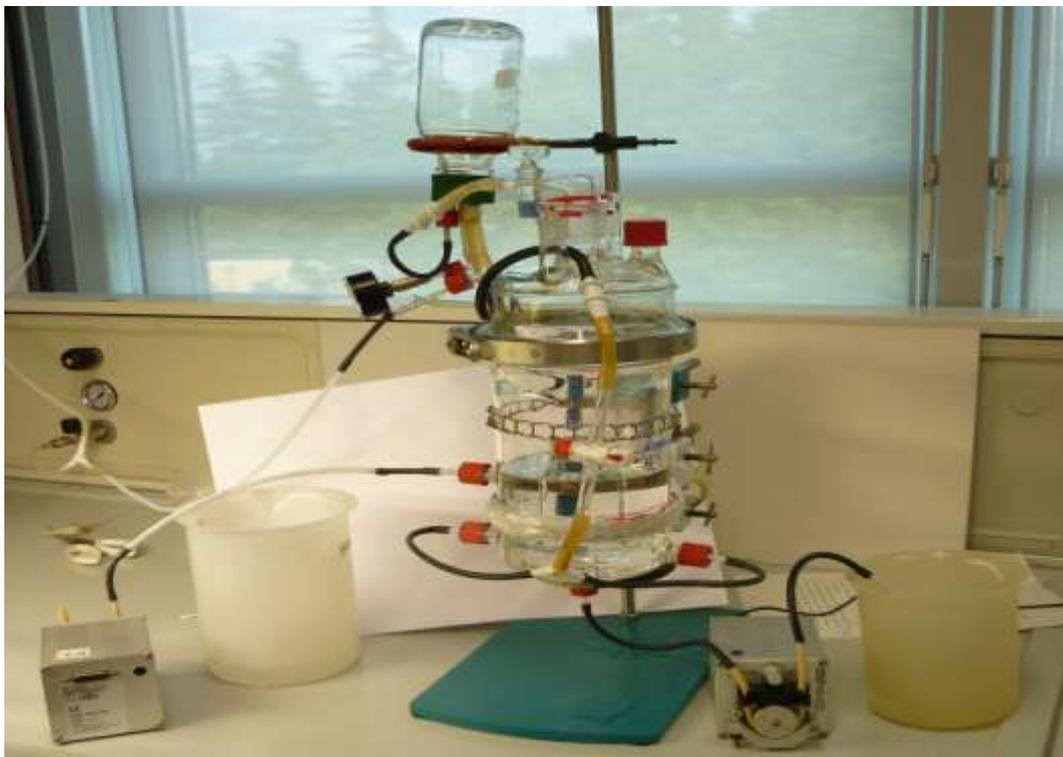
Causa la scarsa disponibilità di misuratori di gas, in questo caso la produzione di biogas non è stata misurata in continuo (usando appunto un gasometro) ma utilizzando un sistema Boyle-Mariotte

Il monitoraggio della produzione di biogas avveniva dopo aver collegato il sistema Boyle Mariotte alla linea di uscita del gas (V1), dopodichè si procedeva all'apertura di V1 consentendo così la misurazione del biogas raccolto dentro il reattore e prodotto nell'arco di tempo intercorso dall'ultima misurazione (da 24 ore durante la settimana, a 72 ore nel fine settimana).

Sulla linea gas era presente un setto perforabile dal quale poter prelevare campioni di biogas.



**Figura 3.5.** Schema di funzionamento del reattore multistadio a fasi concentriche



**Figura 3.6.** Immagine del reattore multistadio a fasi concentriche

## 3.2 Metodi analitici

### 3.2.1 Solidi totali e solidi totali volatili

Assieme al COD, il contenuto in solidi totali (*TS, Total Solids*) e in solidi totali volatili (*TVS, Total Volatile Solids*) sono alcuni dei parametri utilizzati per descrivere e definire i substrati utilizzati nei processi di digestione anaerobica. In particolare essi rappresentano:

- TS (Total Solids): contenuto in sostanza secca di un campione, determinato per essiccamento in stufa a 105°C fino a peso costante del materiale residuo. Questi rappresentano, in prima approssimazione, la somma della frazione organica e di quella inerte del substrato in esame.
- TVS (Total Volatile Solids): frazione di sostanza secca che risulta volatilizzata per combustione a 550°C. Questi rappresentano in prima approssimazione la frazione organica della sostanza secca, calcolata come differenza tra i valori di TS e TFS (*Totale Fix Solids*) che rappresentano la frazione inerte, costituita per lo più, da composti inorganici, misurata per pesata dopo il trattamento a 550°C.

In questo lavoro di tesi il valore di TVS, spesso usato per standardizzare la produzione di metano, è stato determinato sia sul substrato in ingresso che sul fango dei reattori; in questo secondo caso al fine di stimare la quantità di biomassa attiva operante entro i reattori e controllare che rimanesse costante.

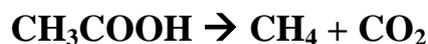
### 3.2.2 Misura del COD (*Chemical Oxygen Demand*)

La misura del COD consente di misurare la quantità di sostanze che nel tempo possono consumare l'ossigeno disciolto in un corpo d'acqua. Infatti, l'ossigeno è fondamentale per lo sviluppo della vita acquatica e in sua assenza si avrebbe la produzione di gas ridotti.

La richiesta di ossigeno è dovuta generalmente a 3 classi di sostanze:

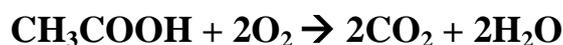
- *composti organici*, i cui atomi di carbonio vengono utilizzati dai microrganismi come alimento per le varie attività vitali;
- *composti ossidabili dell'azoto* utilizzati come fonte di energia da batteri specifici (es. *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*).
- *sostanze inorganiche* (es. *Fe II*; *solfori e solfiti*) facilmente ossidate dall'ossigeno presente nelle acque (processi generalmente solo chimici).

Inoltre, la misura del COD è fondamentale per valutare l'efficienza del processo di metanogenesi; in letteratura, infatti, è riportato che la massima produzione specifica di metano teorica è uguale a 0.35 NL CH<sub>4</sub>/g COD degradato. Infatti, dalla reazione di dismutazione dell'acido acetico (reazione 1) risulta che per ogni mole di acetico degradato, si ha la produzione di 1 mole di CH<sub>4</sub> che, in condizioni di temperatura e pressione standard (STP; 0°C e 1 atm), occupa un volume di 22.4L.



**Reazione 1.** Dismutazione dell'acido acetico

Poiché la dismutazione rappresenta un abbattimento di COD che consuma due moli di ossigeno (reazione 2)



**Reazione 2.** Ossidazione dell'acido acetico.

si ha che per 2 moli di ossigeno consumato, si produce una mole di CH<sub>4</sub> da cui:

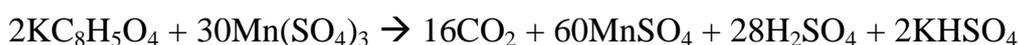
$$\text{L CH}_4 / \text{g COD}_{\text{degradato}} = 22,4\text{L} / (32\text{g} \times 2) =$$

$$\mathbf{0.35 \text{ L CH}_4 / \text{g COD}_{\text{degradato}}}$$

La determinazione del COD solubile è stata effettuata per via spettrofotometrica, dopo reazione acida a caldo, usando kit-test per l'analisi del COD (tubed DCO Manganese III, 20-2000 mg/L, *Hach Lange GmbH*, Germania) contenenti, come agente ossidante, solfato di manganese III in acido solforico.

La retta di calibrazione è stata tracciata usando sei soluzioni standards di potassio idrogeno ftalato (KHP, 99.95%, *Sigma-Aldrich*) dalle seguenti concentrazioni: 20 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L, 500 mg/L, 1000 mg/L.

Nelle provette avviene la seguente reazione:



**Reazione 3.** Reazione di riduzione del solfato di manganese III.

Di seguito è riportata la procedura seguita per la misurazione del COD solubile dei campioni.

Innanzitutto utilizzando una centrifuga Beckman Coulter Microfuge 18, i campioni sono stati centrifugati a 12000 rpm per 15 minuti e il surnatante così ottenuto è stato opportunamente diluito con acqua deionizzata e introdotto (aliquote da 500microlitri) nelle specifiche provette. Inoltre è stata preparata una provetta contenente solo acqua distillata, da usare come bianco. Il tutto viene poi scaldato a 148°C per un'ora in un apposito termostato per analisi COD prodotto dalla I.S.CO. s.r.l (*modello RECOD 19/test*).

Una volta raffreddate, il contenuto delle fialette è stato analizzato mediante spettrofotometro; lo strumento utilizzato in questa sede è il *Cary 100 Scan UV-visible (Varian)*. La lettura è stata effettuata alla lunghezza d'onda di 510 nm.

### 3.2.3 Determinazione delle proteine: metodo con reattivo Bio-Rad

Il contenuto di proteine rappresenta uno dei tanti parametri usati al fine di caratterizzare una matrice.

Per valutarne la concentrazione è stata utilizzata la procedura Bio-Rad Protein test (*Bio-Rad*) basata sul metodo di Bradford per la determinazione della concentrazione di proteine solubilizzate.

Di seguito è riportata la procedura eseguita nel presente lavoro di tesi per la misurazione di tale parametro.

In una provetta di vetro sono stati versati 4 mL di acqua distillata ed 1 mL di reagente *Bio-Rad* e, dopo aver agitato, si aggiungono 100  $\mu$ L di campione opportunamente diluito. Si agita e dopo 5 minuti e prima di un'ora, si effettua la lettura allo spettrofotometro a 595 nm.

I campioni così preparati presentano una marcata colorazione (blu-azzurro/verde)

Al fine di tracciare una retta di calibrazione, è stata preparata una serie di soluzioni di albumina nell'intervallo 50-2000 mg/L come riportato in figura 3.7.

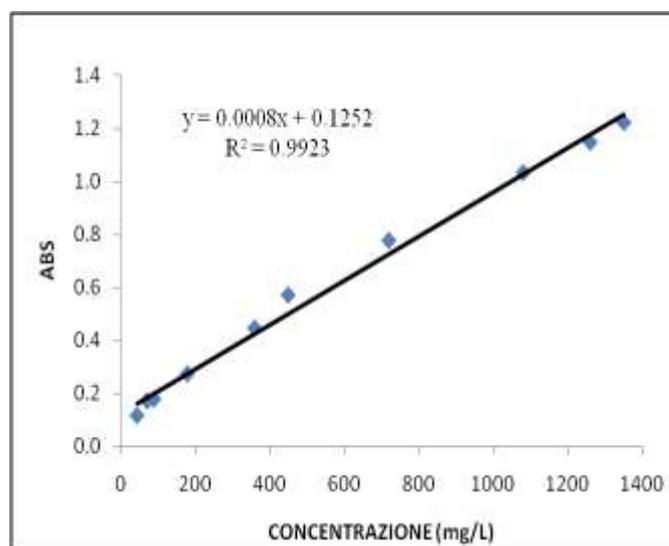


Figura 3.7. Retta di calibrazione proteine

### 3.2.4 Determinazione dei carboidrati totali: metodo Fenolo

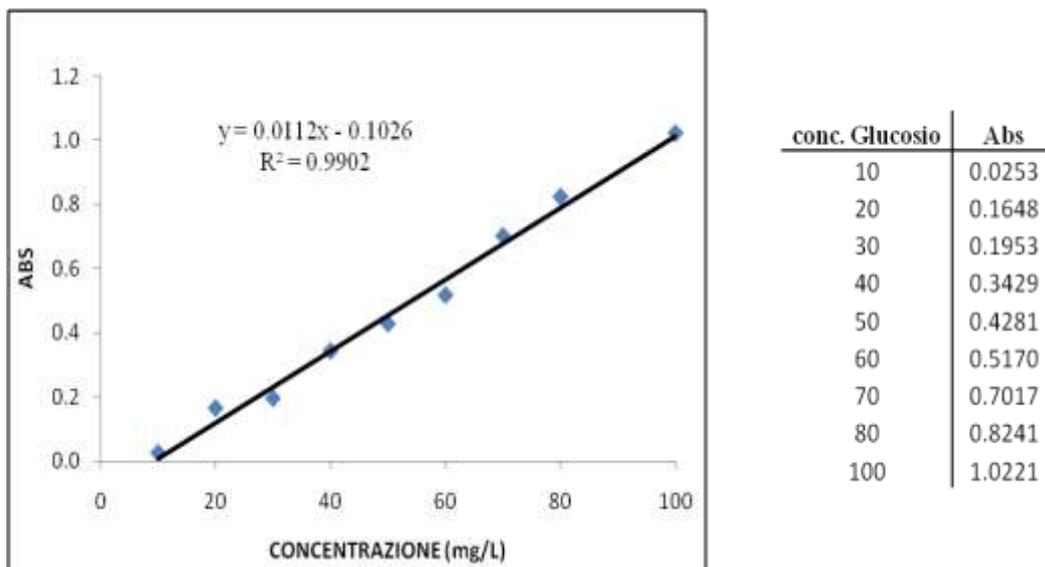
La determinazione dei carboidrati totali è stata eseguita per poter valutare il contenuto di zuccheri della matrice in esame e monitorare l'andamento della riduzione della concentrazione di lattosio (proveniente dall'idrolisi delle catene polisaccaridiche), contenuto nel siero di latte, utilizzato come substrato nella sperimentazione.

Per valutarne la concentrazione è stata utilizzata la procedura che si basa sul metodo fenolo/acido solforico (DuBois et al., 1956) che permette la rilevazione della concentrazione di diversi carboidrati presenti nel substrato in esame, mediante una tecnica spettrofotometrica.

Di seguito è riportata la procedura eseguita per la misurazione di tale parametro.

In una provetta di vetro vengono versati 500µL di campione opportunamente diluito, 500 µL di fenolo e 2.5 mL di acido solforico concentrato. Dopo aver agitato, si lascia reagire per 30 minuti al termine dei quali si esegue la lettura spettrofotometrica a 488 nm. I campioni presentano una colorazione gialla/arancio.

Per quanto riguarda la sperimentazione oggetto di questa tesi, la concentrazione è stata determinata sulla base di una retta di taratura costruita con soluzioni di glucosio nell'intervallo 10-100 mg/L (Fig. 3.8) e lettura spettrofotometrica a  $\lambda=488$  nm.



**Figura 3.8 .** Retta di calibrazione carboidrati totali

### 3.2.5 Misura della concentrazione di acidi grassi volatili

Anche la concentrazione di acidi grassi volatili (*Volatile Fat Acids, VFA*) è uno degli indici usati per valutare l'efficienza del processo di metanogenesi, poiché come già ampiamente descritto in precedenza (paragrafo 1.3.4), gli acidi grassi prodotti durante lo stadio di acidogenesi, particolare quelli a catena corta, costituiscono il substrato per i metanigeni.

Il contenuto di acidi grassi volatili è stato analizzato tramite un gascromatografo Agilent Technologies modello 7890 A, con colonna capillare Agilent J&W GC Column, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, e detector di tipo FID (*Flame Ionization Detector*, ovvero rivelatore a ionizzazione di fiamma).

Le specifiche del metodo utilizzato sono le seguenti:

- Range di temperatura: da 40 °C a 260 °C
- Temperatura della colonna: 170 °C
- Temperatura dell'iniettore: 250 °C
- Temperatura del detector: 280 °C
- Pressione: 5 psi
- Carrier gas: idrogeno
- Fase fissa: HP – Innowax
- Flusso: 37.3 cm/s o 1.1 mL/min

Il campione destinato all'analisi dei VFA è stato centrifugato a 1200 rpm per 15 minuti e il surnatante ottenuto è stato opportunamente diluito con una soluzione di acido ossalico (60 mM).

### **3.2.6 Analisi del contenuto di anioni**

Nel caso della digestione anaerobica, risulta particolarmente interessante conoscere il contenuto di solfati del rifiuto o refluo trattato, in quanto essi sono indicativi della presenza di batteri solfato-riduttori; questi infatti competono con quelli metanigeni per il substrato. Un livello alto di solfato nel campione può quindi essere indice di uno squilibrio nel consorzio microbico, e può andare ad influire negativamente sull'efficienza del processo di digestione anaerobica di interesse.

Il contenuto di ioni è stato analizzato con una tecnica di cromatografia a scambio ionico. La preparazione dei campioni è stata effettuata nel seguente modo: i campioni sono stati centrifugati per 15 minuti a 12000 rpm; è stato prelevato il surnatante, che è stato opportunamente diluito con acqua deionizzata, e la soluzione così ottenuta è stata analizzata.

Lo strumento utilizzato è il *Dionex DX-120 Ion Chromatograph* con colonna *AS14A Analytical 4x250 mm* (gruppo funzionale ammonio alchilico quaternario; idrofobicità moderata) e soppressore *Anion Self Regenerating Suppressor (ASRS® ULTRA II, 4 mm)*. Il rivelatore utilizzato è di tipo conduttimetrico. Le specifiche del metodo impiegato sono le seguenti:

- Flusso: 1.0 mL/min
- Temperatura: 30 °C
- Intensità di corrente: 100 mA
- Volume di iniezione: 10 µL
- gas inerte: azoto.

### **3.2.7 Misura del volume di biogas prodotto**

Al fine di valutare il volume di biogas prodotto, sono stati usati:

- il sistema Boyle-Mariotte;
- dei misuratore di gas (*Ritter MGC-1 V3.0*).

In particolare il sistema Boyle-Mariotte (Fig. 3.9), è stato impiegato per la misurazione del biogas prodotto dai microcosmi e dal reattore multistadio a fasi concentriche rispettivamente descritti ai paragrafi e 3.1.3 e 3.1.4.3. Invece, gasometri (Fig. 3.10), sono stati utilizzati per la misurazione del biogas prodotto dagli impianti relativi ai paragrafi 3.1.4.1 e 3.1.4.2.



**Figura 3.9** . Esempio di sistema Boyle-Mariotte applicato ad un reattore.



**Figura 3.10** . Gasometro (Ritter MGC-1 V3.0)

### **3.2.8 Misura della composizione del biogas**

La misura della composizione del biogas è stata effettuata utilizzando un gascromatografo (vedi figura 3.11 ) sul quale è montato un TCD (*Thermal Conductivity Detector*) in grado di rilevarne la composizione percentuale.

Il metodo utilizzato ai fini dell'analisi è il seguente:

- Temperatura della pre-colonna = 90°C
- Temperatura della colonna = 60°C
- Pressione = 25psi
- Gas carrier = N<sub>2</sub>
- Tempo di analisi = 44s

Relativamente al metodo utilizzato nel presente lavoro di tesi, la composizione del gas è stata determinata sulla base di una calibrazione di anidride carbonica, idrogeno, metano e ossigeno.

La procedura di analisi è diversa nel caso in cui si debba analizzare un microcosmo piuttosto che il gas prodotto dai reattori. Nel primo caso, il microcosmo viene collegato direttamente al gas cromatografo forando, con l'ago di cui è munito lo strumento, il tappo del microcosmo. Nel secondo caso invece, si è proceduto come descritto al paragrafo 3.1.4.1 e cioè aspirando con una siringa in vetro da un setto perforabile posto sulla testa reattore e iniettando il gas così aspirato in una vial chiusa e nella quale è stata eliminata l'aria per mezzo di insufflaggio di azoto e contemporanea aspirazione.



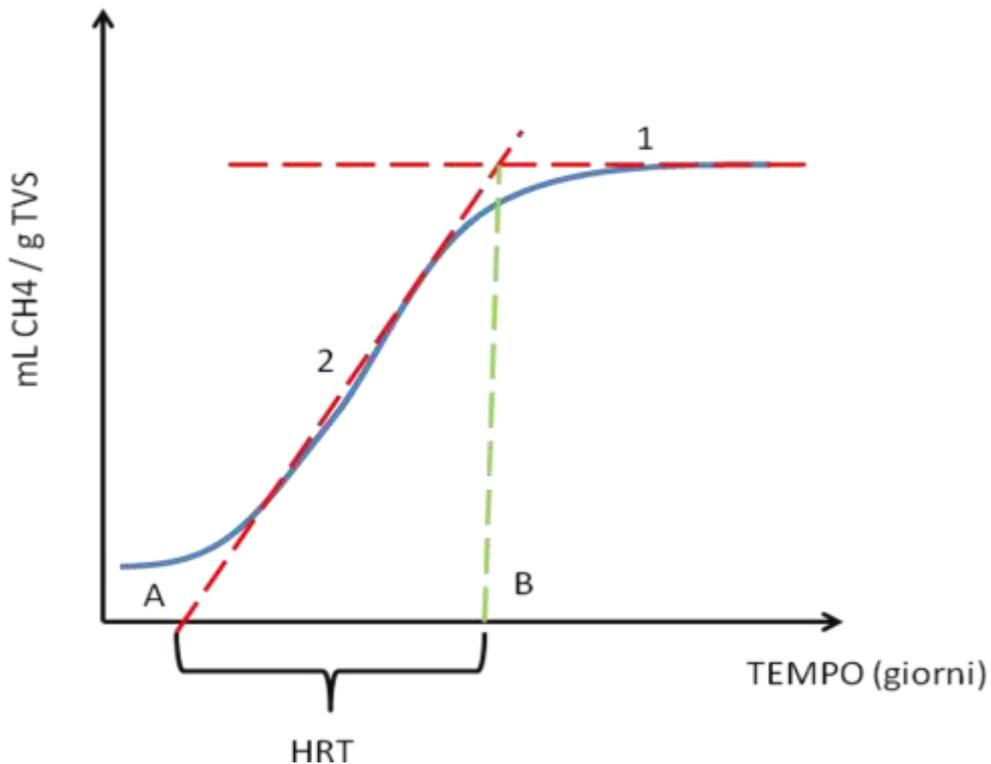
**Figura 3.11 .** Agilent Technologies 3000 micro GC

### **3.2.9 Determinazione del tempo di residenza idraulico**

La determinazione del tempo di residenza idraulico del rettore CSTR monostadio descritto al paragrafo 3.1.4.1 e della fase metanogenica dei reattori multistadio (paragrafi 3.1.4.2 e 3.1.4.3) è stata effettuata a partire dai dati di produzione cumulativa di metano in rapporto al contenuto di solidi totali volatili ottenute nel caso dei microcosmi più performanti: 501R e 502R.

Il tempo di residenza idraulico è pari al periodo di tempo (individuato sull'asse delle ascisse) compreso tra il punto A che risulta dall'intersezione tra la retta 2 e l'asse delle ascisse e il punto B che corrisponde all'ascissa del punto di intersezione tra la retta 1 e 2.

Le rette 1 e 2 rappresentano, rispettivamente, la tangente al punto di massimo della curva di produzione specifica di metano e la tangente al punto di massima pendenza della stessa.



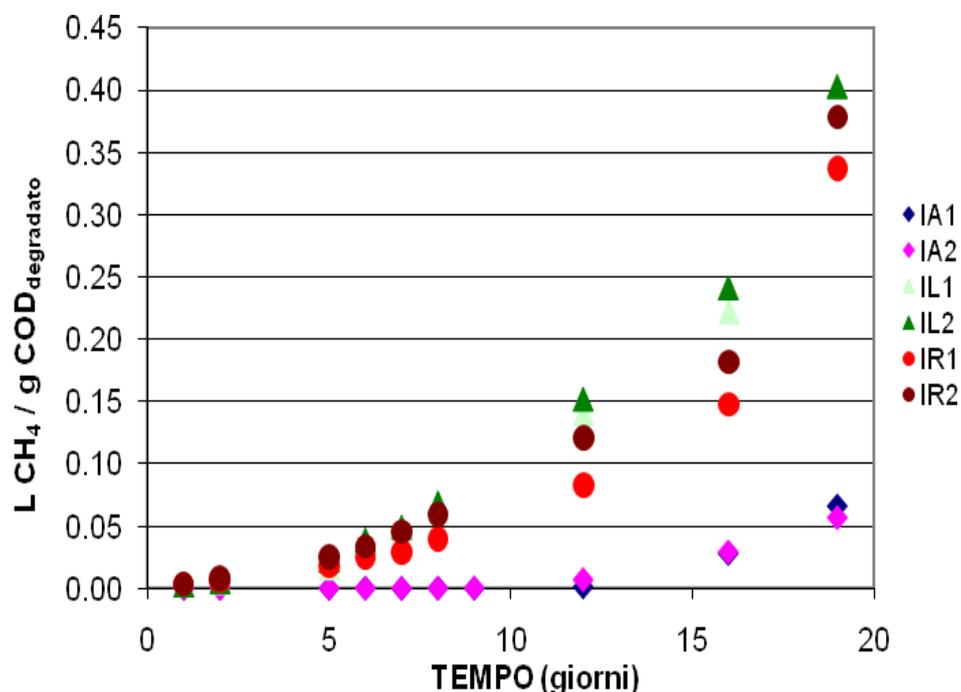
**Figura 3.12.** Procedura per la determinazione del tempo di residenza idraulico.

## 4 RISULTATI

Nel presente capitolo sono presentati e discussi i risultati maggiormente significativi ottenuti nel corso dell'intera attività sperimentale iniziata a Dicembre 2010 e terminata ad Agosto 2011.

### 4.1 Ricondizionamento degli inoculi

Come descritto al punto A del paragrafo 3.1.3, al fine di procedere con la fase sperimentale relativa all'allestimento dei reattori, si è resa necessaria una fase di ricondizionamento degli inoculi volta a portare quest'ultimi in fase metanogenica. A tale scopo è stata preparata la serie di microcosmi di cui in tabella 3.2 valutandone il rapporto tra metano prodotto e COD degradato (figura 4.1). Tale parametro infatti, è usato per valutare l'efficienza del processo di metanogenesi in relazione alla massima produzione teorica di metano pari a  $0.35 \text{ NL}_{\text{CH}_4}/\text{gCOD}_{\text{degradato}}$ . (Vedi paragrafo 3.2.2).



**Figura 4.1.** Rapporto tra produzione cumulativa di metano e  $\text{COD}_{\text{degradato}}$ . N.B. Monitoraggio effettuato in condizioni diverse da quelle standard ( $0^\circ\text{C}$ ; 1atm).

Osservando la figura 4.1 si evince che:

I campioni IL e IR hanno raggiunto la massima produzione in termini di metano infatti, dopo 19 giorni di mantenimento in condizioni di anaerobiosi e alla temperatura di 35°C, sono stati misurati valori prossimi o di poco superiori a 0.35 NL<sub>CH<sub>4</sub></sub>/gCOD<sub>degradato</sub>. E' importante sottolineare che, se sono stati ottenuti valori superiori alla massima produzione teorica di metano, è perché le misurazioni sono state effettuate in condizioni di temperatura e pressione diverse da quelle standard. Infatti al momento del monitoraggio, i microcosmi si trovavano ad una temperatura variabile tra i 35°C (temperatura dell'incubatore) e quella ambiente.

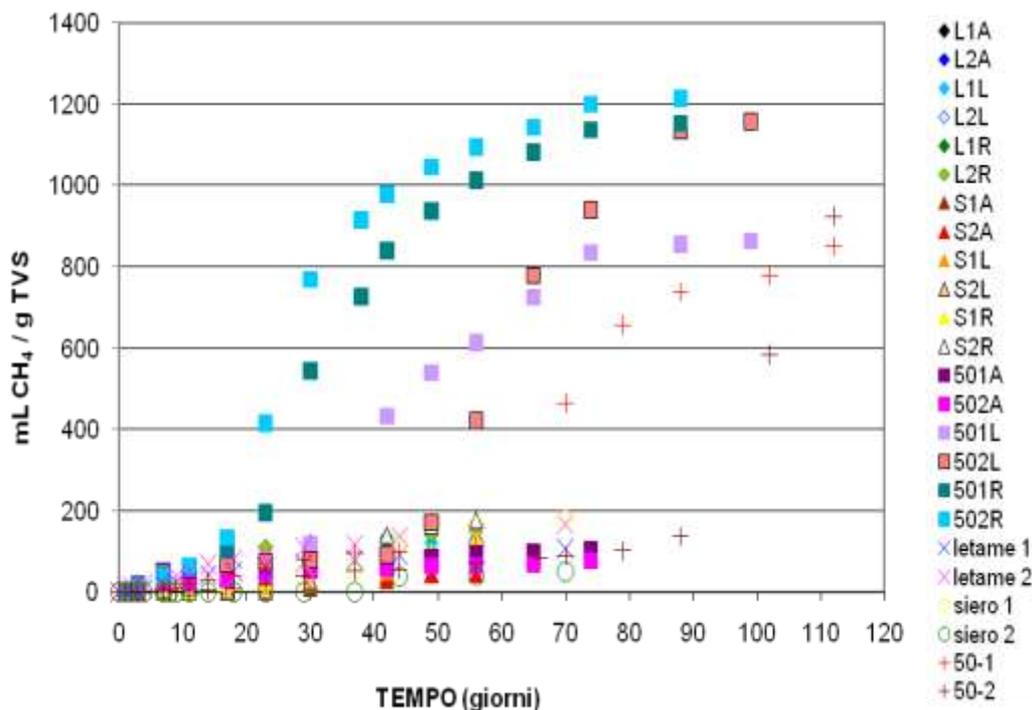
I campioni IL e IR erano dunque “entrati” in fase metanogenica e in condizioni ottimali per essere utilizzati come inoculi dei microcosmi allestiti per le prove di cui ai punti B e C del paragrafo 3.1.3.

Nel caso dei campioni IA, dopo 19 giorni di sperimentazione, è stato raggiunto un valore compreso tra 0.05-0.10 L CH<sub>4</sub> / g COD<sub>degradato</sub>.

Nonostante solo gli inoculi IR e IL fossero in condizioni di massima attività metanogenica e pronti per essere utilizzati come inoculi nelle prove sopraindicate, al fine di un ulteriore confronto tra tutti e tre gli inoculi si è proceduto con la seconda fase utilizzando anche gli IA, come se fossero in piena fase metanogenica.

## 4.2 Individuazione dell'inoculo e della matrice più performanti

Al fine di determinare quale fosse l'inoculo più performante e se siero e letame producano una maggior quantità di biogas se digeriti singolarmente o in co-digestione, è stata preparata la serie di microcosmi di cui al punto B del paragrafo 3.1.3. La performance è stata valutata sulla base del volume di metano prodotto normalizzato per il contenuto di TVS di ciascun campione. I dati ottenuti sono riportati in figura 4.2.

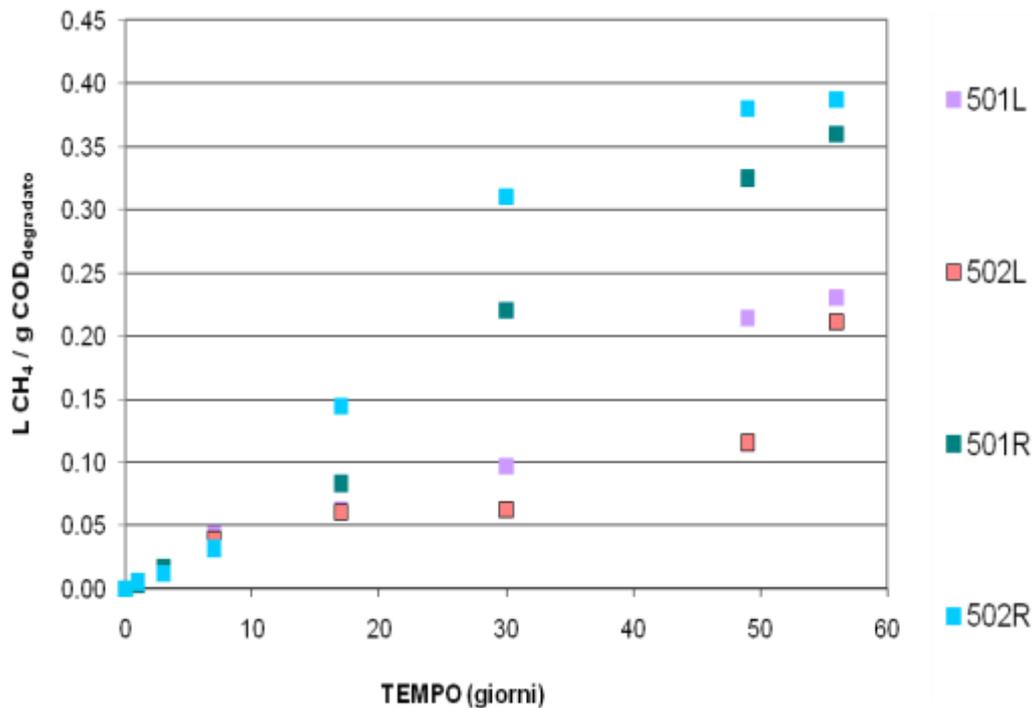


**Figura 4.2.** Produzione cumulativa di metano normalizzata per il contenuto di solidi totali volatili.

N.B. Monitoraggio effettuato in condizioni diverse da quelle standard (0°C; 1atm).

Da figura 4.2 risulta che, nel caso dei campioni costituiti dal mix letame/siero si possano produrre quantità di metano anche di circa 1200 mL/gTVS. In letteratura (Angelidaki e Sanders 2004) non è riportato alcun substrato con tali rese metanogene e ciò fa pensare ad un errore nella valutazione della produzione di metano. I relativi dati riferiti al rapporto tra produzione di metano e COD<sub>degradato</sub> sono invece risultati accettabili come dimostrato in figura 4.3 dove si riportano, a titolo di esempio, alcuni dei campioni esaminati. Questo significa che non sono

stati fatti errori nella stima del metano prodotto ma, se le rese metanigene sono risultate superiori a quelle riportate in letteratura, è perché le misurazioni sono state fatte in condizioni diverse da quelle standard.



**Figura 4.3.** Rapporto tra produzione cumulativa di metano e  $\text{COD}_{\text{degradato}}$  riferito ai campioni 501R, 502R, 501L e 502L. N.B. Monitoraggio effettuato in condizioni diverse da quelle standard ( $0^{\circ}\text{C}$ ; 1atm).

Prendendo in considerazione i soli andamenti di figura 4.2 e non i valori assoluti, risulta che:

- tendenzialmente, le matrici inoculate hanno prodotto una quantità di metano superiore, o comunque hanno iniziato a produrre metano molto prima, rispetto alle stesse non inoculate (campioni di controllo). Quanto detto si osserva soprattutto nel caso dei campioni costituiti dal mix letame/siero, infatti i campioni 50-1 e 50-2 producono significative quantità di metano non prima di 50 giorni; mentre per i campioni 501L, 502L, 501R e 502R ciò è avvenuto entro i primi 30 giorni di test.

Probabilmente ciò accade perché nelle matrici tal quale i microrganismi metanogenici hanno bisogno di un maggior tempo per acclimatarsi e per prevalere sui microrganismi competitori; l'aggiunta dell'inoculo in avanzata metanogenesi, consente di eliminare questa fase di latenza.

- I campioni più performanti sono risultati i 501R e 502R (in tabella 4.1 ne è stata valutata la resa di produzione di metano sulla base di quella massima teorica), quelli cioè contenenti siero e letame in ugual misura e inoculati con l'inoculo del reattore. Quanto osservato è probabilmente dovuto da un lato al fatto che la co-digestione garantisce il giusto apporto di nutrienti e capacità tamponanti, dall'altro dall'utilizzo di un inoculo acclimatato. Relativamente alla co-digestione infatti, il siero (tabella 3.1) è risultato ricco di carboidrati (14.6 g/L) ed assieme al letame ha un discreto contenuto di proteine (0.4 g/L il letame e 0.9 g/L il siero). Questo fa pensare che il mix abbia un rapporto carbonio e azoto prossimo a quello ottimale che è stato valutato essere compreso tra 13-28 a 1. (Burton C. et al., 2003).

	501R	502R
[COD] iniziale	32.0g/L	32.0g/L
COD iniziale	1.8g	1.8g
[COD] 56° giorno	4.2g/L	4.2g/L
COD 56° giorno	0.2g	0.2g
COD rimosso	1.6g	1.6g
%COD rimosso	89%	89%
CH <sub>4</sub> teorico	564mL	564mL
CH <sub>4</sub> prodotto	527mL	560mL
RESA CH <sub>4</sub>	93%	99%

**Tabella 4.1.** Valutazione delle performances dei campioni 501R e 502R. La resa è valutata come mL CH<sub>4</sub> prodotto / mL CH<sub>4</sub> teorico.

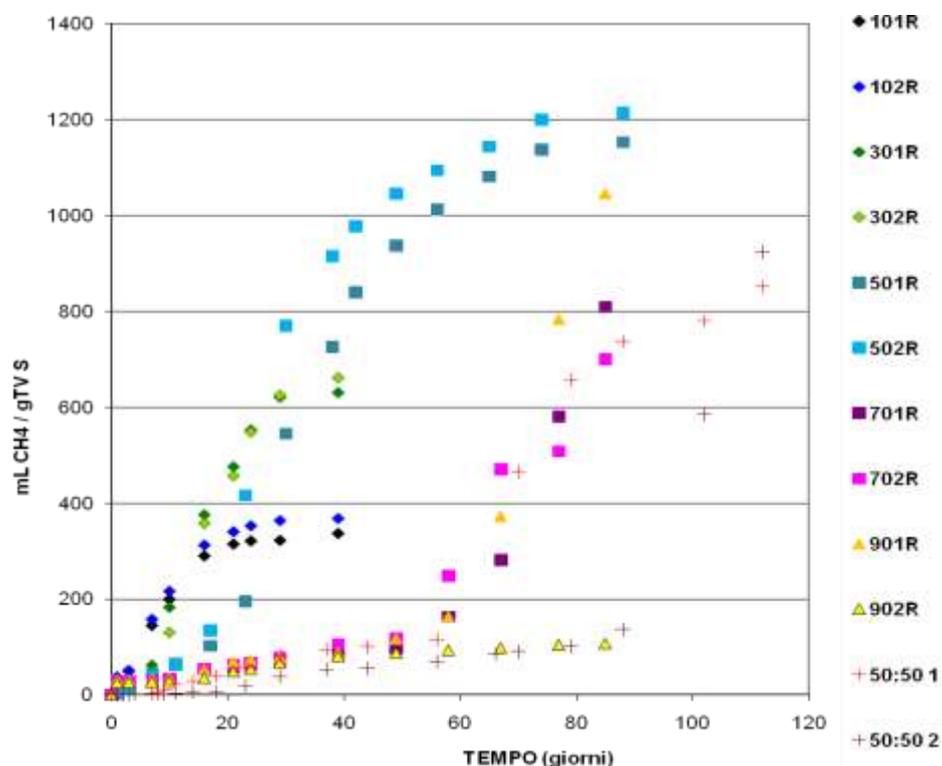
Poiché è risultato che la co-digestione ha consentito produzioni metanogene migliori, al fine di determinare il rapporto ottimale tra siero e letame, è stata preparata una serie di microcosmi contenenti i due substrati in differenti rapporti. I microcosmi sono stati inoculati utilizzando l'inoculo del reattore (IR) poiché è risultato il più performante. Esso infatti consente, a parità di substrato trattato, una

maggiore produzione di metano rispetto a quella ottenuta con *l'inoculo acque di vegetazione* e *l'inoculo del letame* (comportamento ben evidenziato in figura 4.3 nel caso dei campioni letame/siero).

### 4.3 Individuazione del miglior rapporto tra letame e siero di latte

Appurato che i risultati migliori si ottengono dalla co-digestione di siero di latte e letame inoculati con l'inoculo reattore, è stato necessario individuare il giusto rapporto tra i due substrati. Per farlo, è stata preparata la serie di microcosmi di cui in tabella 3.4.

Per ragioni di leggibilità del grafico, in figura 4.4 sono riportati solo alcuni dei risultati ottenuti ed in particolare quelli più significativi.



**Figura 4.4.** Produzione cumulativa di metano normalizzata per il contenuto di solidi totali volatili. N.B. Monitoraggio effettuato in condizioni diverse da quelle standard (0°C; 1atm).

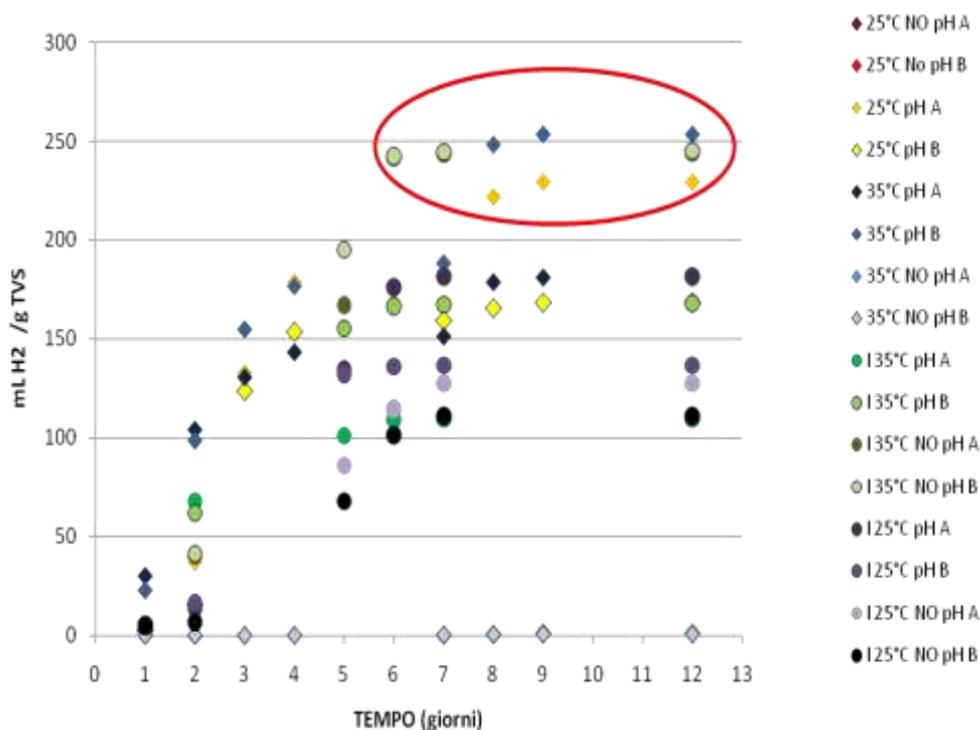
Da figura 4.4 si evince che la massima produzione di metano per grammo di TVS si è ottenuta per i campioni 501R e 502R. Quanto osservato è probabilmente dovuto al fatto che solo i campioni contenenti siero e letame in egual misura garantiscono un giusto rapporto tra carbonio e azoto; in tutti gli altri tale rapporto è squilibrato. Per questo motivo, i reattori di cui ai paragrafi 3.1.4.1, 3.1.4.2 e

3.1.4.3 sono stati avviati usando come substrato un mix in egual misura tra siero e letame e sono stati inoculati con *l'inoculo reattore*.

#### 4.4 Valutazione delle condizioni di lavoro ottimali della fase pre-acidificante.

Nell'ottica di sviluppare un processo a due stadi è indispensabile valutare le condizioni ottimali in termini di durata (e dunque tempi di permanenza), pH e temperatura della fase pre-acidificante. A tale scopo sono stati preparati i microcosmi di tabella 3.5 valutandone la produzione cumulativa di idrogeno e di VFA.

I dati ottenuti relativi alla produzione specifica di idrogeno sono riportati in figura 4.5.



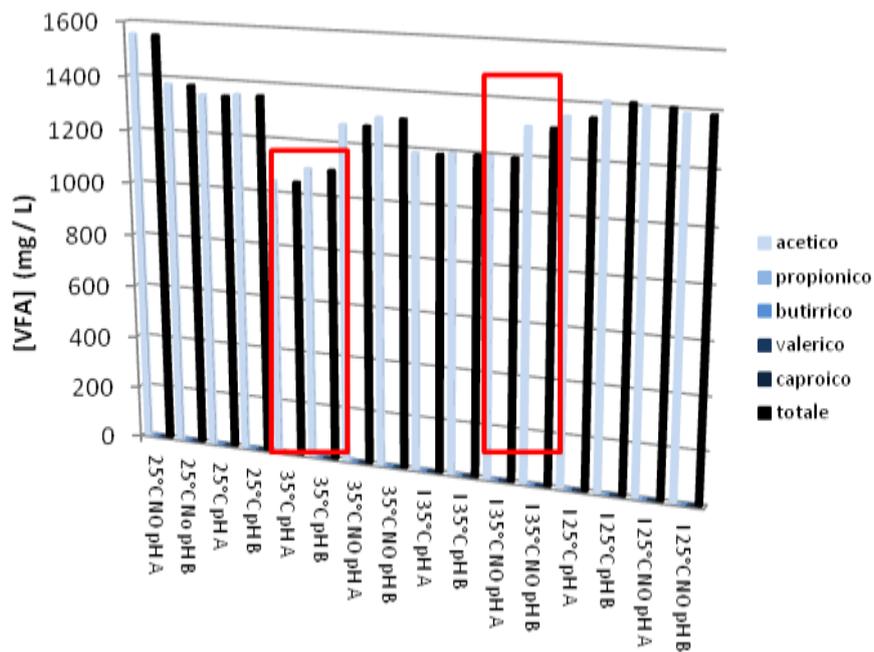
**Figura 4.5.** Produzione cumulativa di H<sub>2</sub> normalizzata per il contenuto di STV.

In accordo con risultati riportati in letteratura (Giordano et al., 2011) il grafico 4.5 relativo alla produzione specifica di idrogeno (mL H<sub>2</sub>/gTVS), evidenzia come la prova per definire le migliori condizioni operative della fase acidogenica possa essere valutata entro circa 7 giorni di test in batch; dopo questo intervallo di tempo, infatti per tutti i campioni gli andamenti hanno evidenziato un plateau. Gli andamenti della produzione cumulativa di idrogeno (fig. 4.5) indicano che le migliori prestazioni sono state ottenute alle condizioni operative dei microcosmi

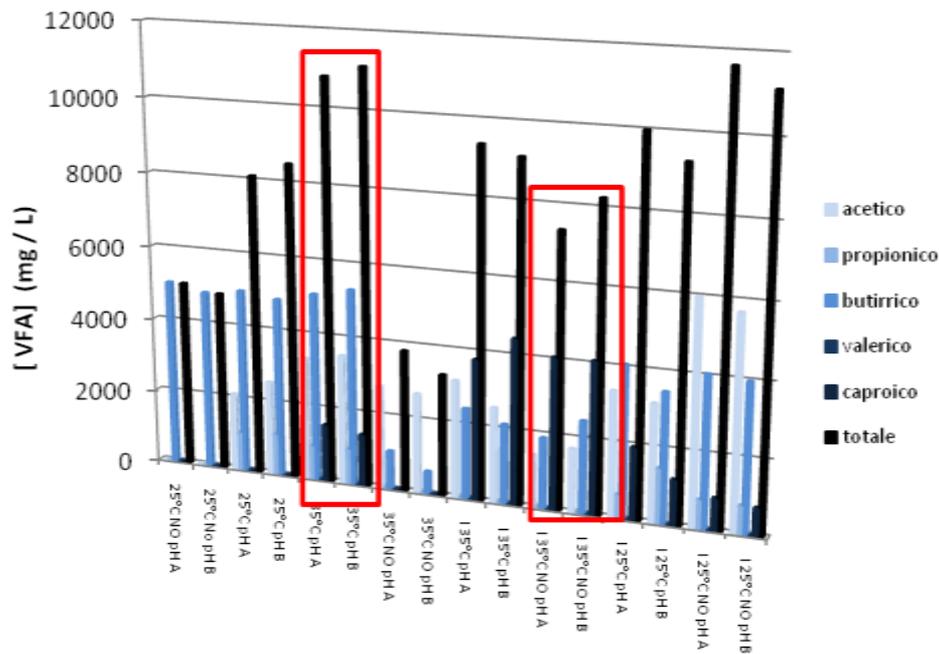
“135°C NO pH”(valore medio pari a 244 mL H<sub>2</sub>/gTVS), seguiti dai campioni “35°C pH” (valore medio pari a 217 mL H<sub>2</sub> / gTVS) le cui prove in doppio hanno evidenziato risultati meno ripetibili. (Vedi zona evidenziata in figura 4.5).

Successivamente si è passati alla valutazione della produzione di VFA, con particolare riferimento alle condizioni più performanti ottenute in termini di produzione cumulativa di idrogeno “135°C NO pH” e “35°C pH”

I risultati della produzione di VFA dopo 24 ore di test e dopo 7 giorni sono riportate rispettivamente nelle figure 4.6 e 4.7.



**Figura 4.6.** Concentrazione di VFA dopo 24 ore di test dei microcosmi fase pre-acidificante



**Figura 4.7.** Concentrazione di VFA dopo 7 giorni di test in batch dei microcosmi fase pre-acidificante.

In figura 4.6 si osserva che dopo 24 ore di test acidogenico la produzione media di VFA totali è risultata maggiore nei campioni “I35°C NO pH” (circa 1250 mg/L) rispetto a quella nei campioni e “35°C pH” (circa 1100 mg/L). Al termine della acidogenesi, valutata essere in corrispondenza dell’inizio del plateau di produzione di idrogeno (quindi entro 7 gg), gli stessi campioni hanno evidenziato, valori di produzione media di VFA pari a circa a 8000 mg/L i primi e non superiori a 11000 mg/L i secondi.

In conclusione, sulla base delle condizioni operative selezionate e privilegiando come condizione più performante la produzione cumulativa di idrogeno, al fine di avviare la fase acidogenica dei due reattori a fasi separate (paragrafi 3.1.4.2 e 3.1.4.3) si è optato per la scelta delle condizioni applicate ai microcosmi “I35° NO pH” A e B e precisamente:

- siero e letame in egual quantità
- inoculati
- mantenuti a 35°C
- pH non controllato

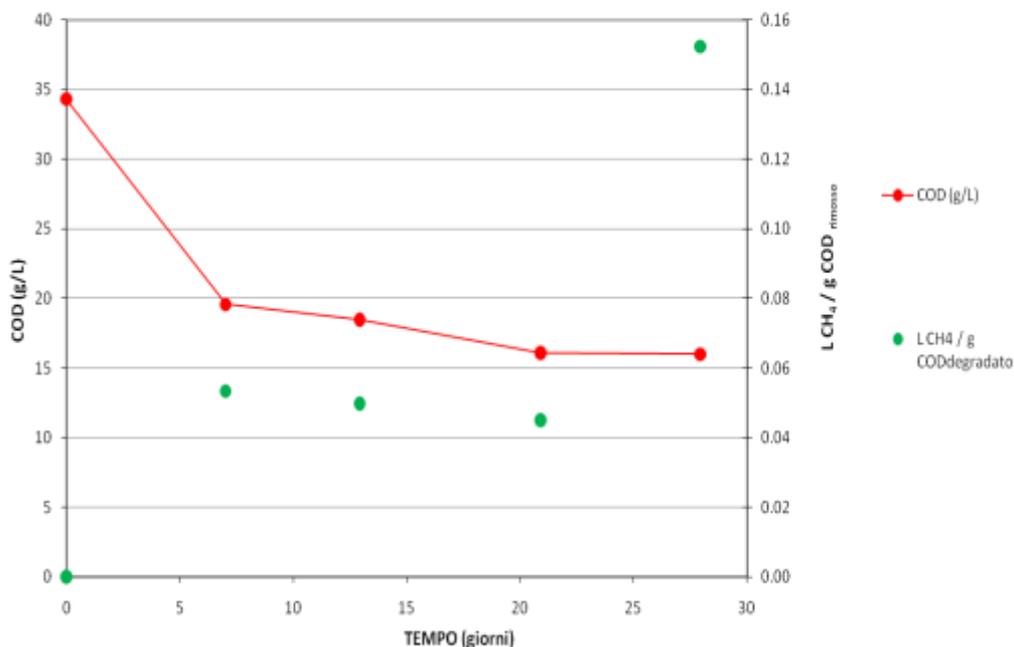
#### 4.5. Avviamento in batch

La conduzione di un reattore in continuo deve necessariamente passare per una fase batch.

La durata di tale fase è stata definita in tempo reale sulla base dell'andamento dei principali parametri monitorati: biogas/metano prodotto, concentrazione di COD solubile, di VFA e di anioni. Al raggiungimento di condizioni di stabilità in termini dei parametri appena elencati si è deciso di procedere con l'avviamento del reattore in condizioni continue. La fase batch è stata condotta per 28 giorni ed ha anche previsto la misura dei TS e TVS del fango contenuto nel reattore.

Di seguito sono riportati:

- il grafico della produzione cumulativa di metano e abbattimento COD solubile (figura 4.8)
- il grafico della concentrazione di VFA nel tempo (figura 4.9)
- il grafico concentrazione solfati nel tempo (figura 4.10).



**Figura 4.8.** Abbattimento del COD e produzione specifica di metano.

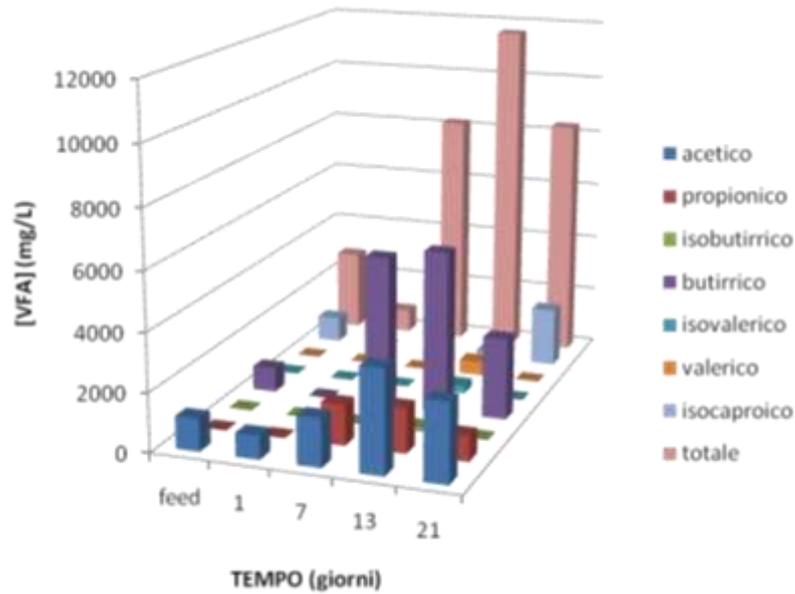
Da figura 4.8 risulta che durante la conduzione in fase batch si è ottenuto un progressivo abbattimento di COD fino a 53.5% (tabella 4.2). La produzione

specifica di metano ( $0.150 \text{ L/gCOD}_{\text{degradato}}$ ) è risultata lontana dal valore massimo teorico causa la presenza di perdite nella linea gas che hanno determinato una sottistima nella produzione cumulativa di metano. A causa delle perdite infatti, è stata misurata una produzione di soli 1394mL di metano (resa pari a 43.3%) nettamente inferiore a quella che si sarebbe potuta misurare ammettendo che il reattore abbia mantenuto le stessa performance dei microcosmi di tabella 4.1, (pari a 96%). Se così fosse stato infatti, la produzione di cumulativa di metano sarebbe stata pari a 3090 mL.

In tabella 4.2 (così come in tutte le tabelle in cui sono riportate le performance dei vari reattori), il COD solubile e i carboidrati totali relativi all'alimentazione corrispondono alla media pesata dei corrispondenti parametri del siero di latte e del letame riportati in tabella 3.1.

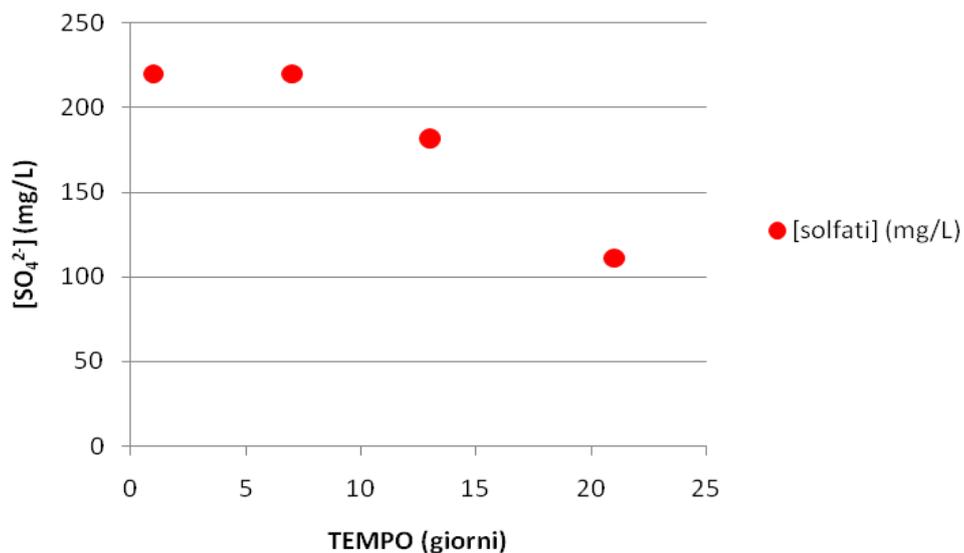
	valore
[COD] iniziale	34.3 g/L
COD iniziale	17.2 g
[COD] 28° giorno	16.0 g/L
COD 28° giorno	8.0 g
COD rimosso	9.2 g
%COD rimosso	53.5 %
CH <sub>4</sub> teorico	3220 mL
CH <sub>4</sub> prodotto	1394 mL
RESA CH <sub>4</sub>	43.3 %

**Tabella 4.2.** Reattore batch: valutazione della performance.



**Figura 4.9.** Concentrazione di VFA nell'alimentazione e nel reattore durante la fase batch.

La figura 4.9 riporta la concentrazione di VFA all'interno del reattore rispetto a quella nell'alimentazione. Essa mostra che entro il 13° giorno, si ha una elevata produzione di VFA (il reattore è dunque in fase acidogenica); la concentrazione inizia a calare tra il 13° e 21° giorno. Ciò significa che entro questo periodo si è verificato il passaggio dalla fase acidogenica a quella metanogenica.



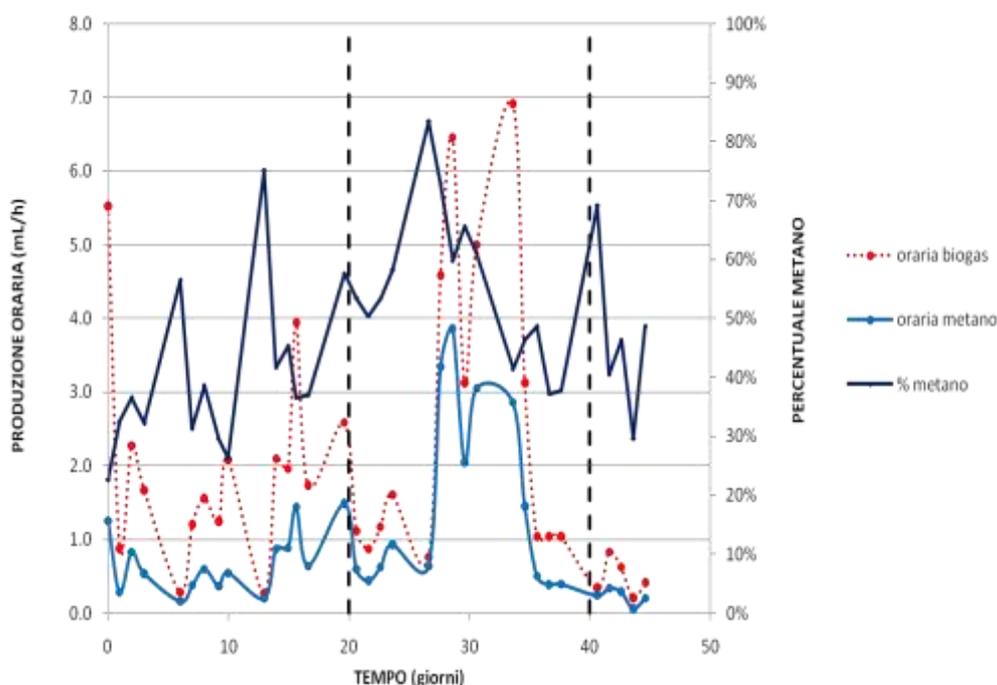
**Figura 4.10.** Concentrazione dei solfati all'interno del reattore in fase batch

Il grafico di figura 4.10 mostra che, durante la fase batch, si ha una graduale riduzione della concentrazione di solfati. Questo comportamento può essere ricondotto alla competizione tra batteri solfato riduttori e batteri metanogeneci che avviene all'instaurarsi della fase metanogenica.

#### 4.6 Reattore CSTR monostadio

Da figura 4.8 risulta che dopo 28 giorni di conduzione in batch, il sistema raggiunge uno stato stazionario in termini di CODsolubile; è stata così avviata la sperimentazione in fase continua impostando una portata di alimentazione pari a 25 mL/giorno tale da garantire un HRT pari a 20 giorni. Poiché la sperimentazione ha avuto una durata superiore al tempo di ritenzione idraulica, per ragioni di più facile chiarezza, tutti i grafici riferiti a questo reattore sono stati suddivisi in periodi di 20 giorni.

Di seguito sono riportati i grafici relativi al monitoraggio in termini di produzione oraria di biogas e metano, della concentrazione di COD solubile, dei carboidrati totali e dei VFA del reattore in esame. Nei grafici relativi agli andamenti della concentrazione di COD solubile, carboidrati totali e VFA sono riportati valori ottenuti da un'analisi statistica di misurazione effettuate in triplo da cui è stato ottenuto il valore medio e l'intervallo di fiducia applicando il test T di Student con un valore di confidenza del 95%.



**Figura 4.11.** Produzione oraria di metano e biogas del reattore CSTR monostadio.

Osservando la figura 4.11 si nota che le produzioni orarie di biogas e metano, si sono mantenute, rispettivamente, al di sotto di e 4.0 mL/h e 2.0 mL/h salvo il periodo compreso tra 28° e 34° giorno, in cui si è registrato un significativo incremento della produzione di gas fino a 7 mL/h di biogas e 4 mL/h di metano. Queste fluttuazioni e picchi di produzione sono dovuti da un lato allo stock di alimentazione, che seppur conservata alla temperatura di 5°C giorno per giorno variava la sua concentrazione in termini di nutrienti e soprattutto di sostanza organica prontamente biodegradabile; dall'altro a caratteristiche intrinseche dell'impianto: durante i giorni non lavorativi, al fine di assicurare l'alimentazione giornaliera, pur collegando la pompa di alimentazione ad un timer, la quantità di substrato alimentato non si è mai mantenuta costante. Talvolta infatti, la pompa non si è avviata oppure la velocità impostata non ha garantito portate costanti. Al fine di ottenere una stima della produzione oraria di biogas e metano, è stato calcolato un valore medio tra il 1° e il 27° giorno (tali valori sono riportati in tabella 4.3). Durante questo periodo infatti, le fluttuazioni in termini di produzione oraria di biogas e metano erano abbastanza contenute.

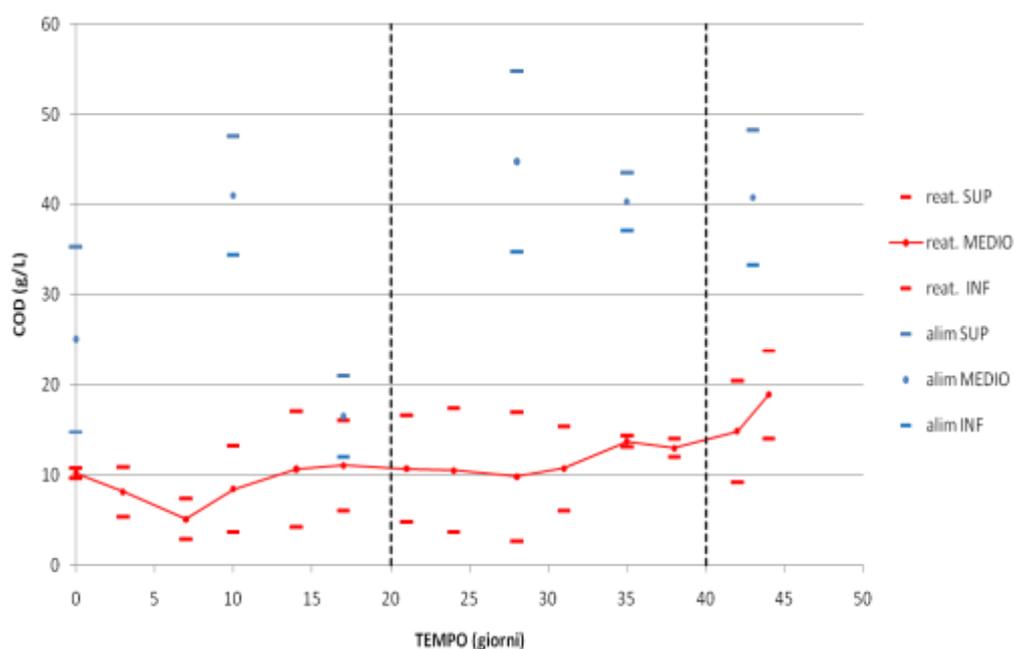
### Performance reattore CSTR

Produzione oraria e giornaliera biogas	1.7mL/h – 41.8mL/giorno
SGP ( $\text{m}^3$ biogas / kg substrato alimentato)	$1.7 \times 10^{-3}$
GPR ( $\text{m}^3$ biogas / $\text{m}^3$ reattore / giorno)	$8.4 \times 10^{-2}$
Produzioni oraria e giornaliera metano	0.7mL/h – 16.6mL/giorno
Carico organico giornaliero (g COD/giorno)	0.9 g/giorno
Produzione teorica giornaliera metano	315 mL/giorno
Resa processo	5%
[COD] <sub>alimentazione</sub>	34.3 g/L
[COD] <sub>reattore</sub>	11.4 g/L
rimozione (g/L)	22.9 g/L
% rimozione	67 %
[carboidrati] <sub>alimentazione</sub>	7.85 g/L
[carboidrati] <sub>reattore</sub>	0.35 g/L
rimozione (mg/L)	7.50 mg/L
% rimozione	95%

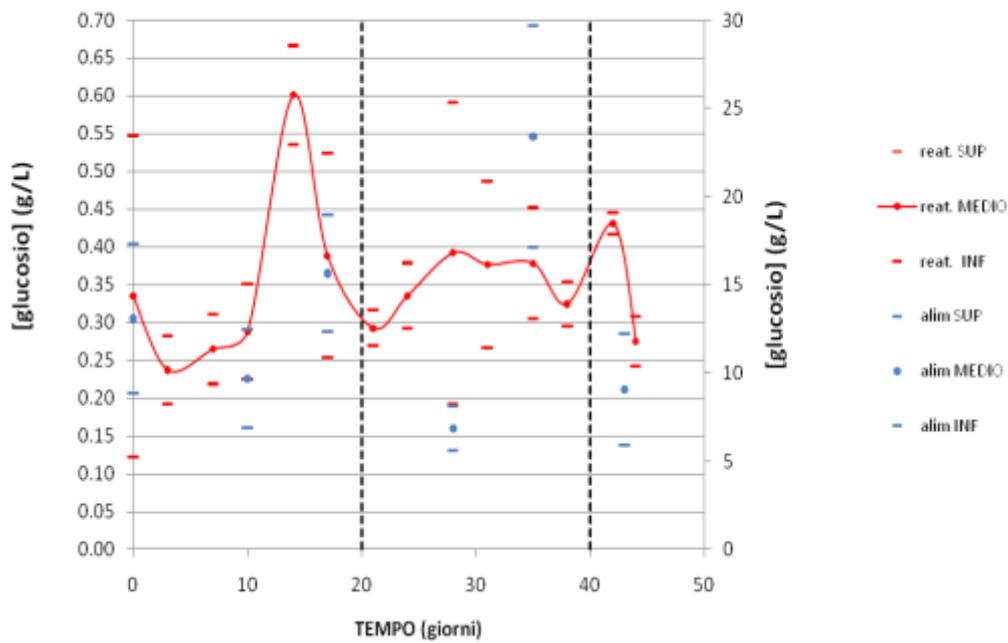
**Tabella 4.3.** Reattore CSTR monostadio: valutazione delle performance.

La tabella 4.3 riporta che l'efficienza di rimozione dei carboidrati (95%) è risultata superiore a quella del COD (67%).

Risulta interessante notare che il processo ha una elevata capacità biologica di rimozione nei confronti dei carboidrati mentre non tutto il COD biodegradabile è rimosso da questo processo anaerobico; questo risultato è confermato dal rapporto in peso tra COD e glucosio che passa da un valore di circa 4 a 32, rispettivamente dall'ingresso al reattore. Quindi gran parte del COD solubile rimosso è dovuto alla degradazione dei carboidrati.

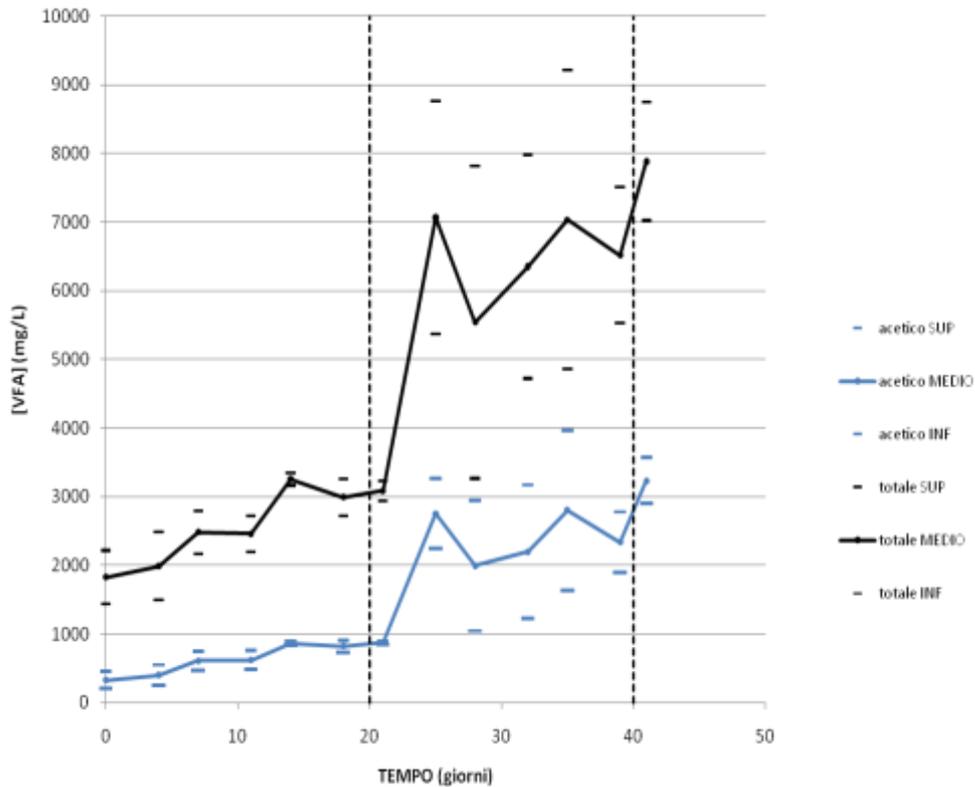


**Figura 4.12.** Andamento del COD solubile nel reattore CSTR monostadio.



**Figura 4.13.** Andamento dei carboidrati totali nel CSTR monostadio. I dati relativi al reattore e all'alimentazione fanno riferimento, rispettivamente, all'asse delle ordinate di sinistra e di destra.

Le figure 4.12 e 4.13 mostrano che trascorsi 20 giorni di sperimentazione, sia la concentrazione di zuccheri che di COD solubile sono rimaste stazionarie; la stazionarietà non si riflette però in termini di produzione di biogas. Quest'ultima infatti ha avuto minimi e massimi di produzione dovuti alle cause precedentemente descritte. (Vedi figura 4.11).



**Figura 4.14.** Monitoraggio dei VFA nel reattore CSTR monostadio.

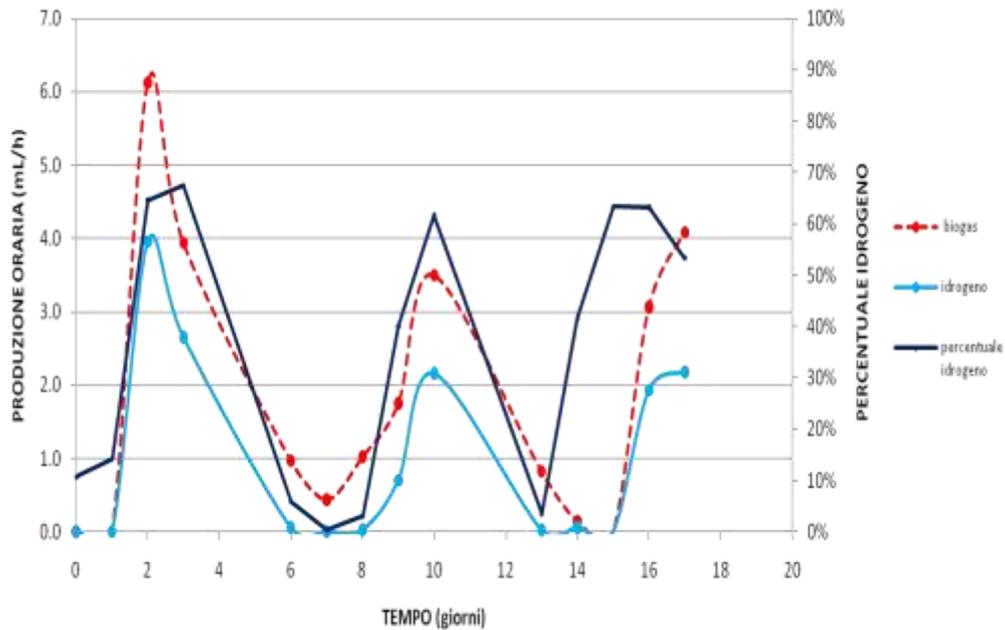
Per ragioni di leggibilità del grafico, in figura 4.14 sono riportate le sole concentrazioni di acido acetico e totale di VFA (sommatoria di acido acetico, propionico, isobutirrico, butirrico, isovalerico, valerico, isocaproico e caproico). E' stato scelto di riportare la sola concentrazione di acido acetico perché questo acido è il substrato della via acetoclastica che è la principale via di produzione del metano.

La figura 4.14 mostra un progressivo aumento in termini di produzione di VFA imputabile ad peggioramento delle condizioni metanogeniche in favore di quelle acidogeniche. Quanto osservato è una ulteriore causa dell'instabilità del processo dal punto di vista delle produzioni di biogas e metano riportate in figura 4.11.

#### 4.7 Reattore multistadio a fasi successive

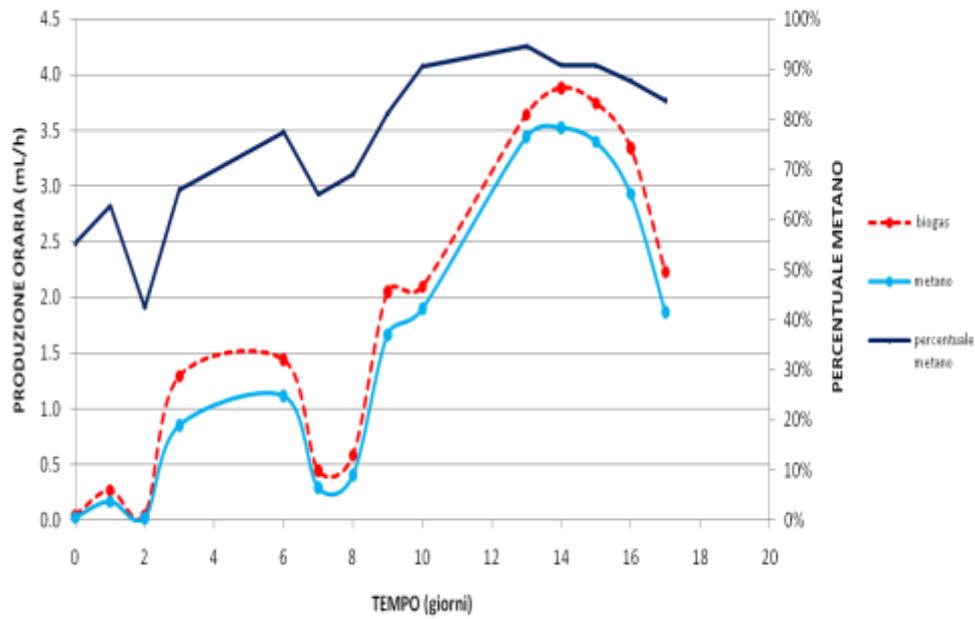
Come descritto al paragrafo 3.1.4.2, questo reattore è costituito dalle due fasi di acidogenesi e metanogenesi separate tra loro. Pertanto si riportano l'andamento della produzione oraria di biogas e idrogeno della fase pre-acidificante (figura

4.15) e l'andamento della produzione di biogas e metano della fase metanogenica (figura 4.16).



**Figura 4.15.** Produzione oraria di idrogeno e di biogas della fase pre-acidificante del reattore multistadio a fasi successive.

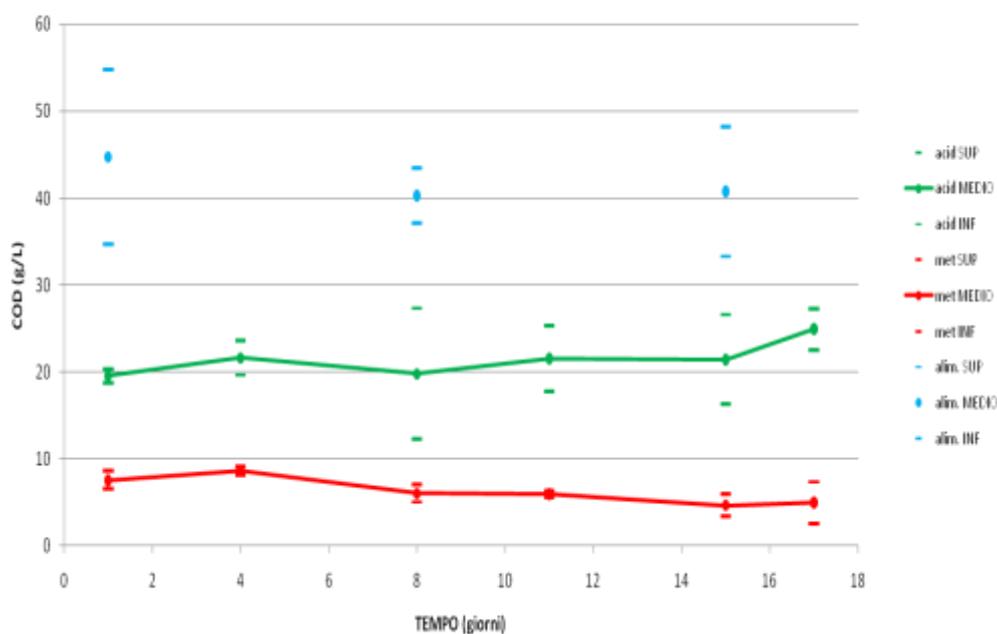
La figura 4.15 mostra che le produzioni orarie di biogas e idrogeno della fase pre-acidificante sono risultate tutt'altro che stabile, ma anzi sono state caratterizzate da cicli di circa sette giorni che dipendevano dall'impossibilità di alimentare l'impianto durante i giorni non lavorativi (in accordo con i problemi descritti al paragrafo 4.6). Ammettendo una produzione continua e costante, che si attesti in corrispondenza dei picchi, si avrebbe una produzione di circa 4mL/h di biogas e 2mL/h di idrogeno.



**Figura 4.16.** Produzione oraria di metano e biogas della fase metanogenica del reattore multistadio a fasi successive

Per le stesse ragioni descritte in commento a figura 4.15, anche la fase metanogenica non è risultata stazionaria in termini sia di produzione di metano che di biogas. Diversamente da figura 4.15, in figura 4.16 non sono individuabili dei cicli di 7 giorni. Ciò accade perché la fase metanogenica risente meno della mancata alimentazione in quanto da un lato il processo di metanogenesi è più lungo di quello di acidogenesi e dall'altro la seconda vasca (metanogenica) ha un volume maggiore della prima (acidogenica)

Al fine di ottenere una stima della produzione oraria di biogas e metano, è stato calcolato un valore medio sull'intero periodo di sperimentazione. Tali valori sono riportati in tabella 4.4.

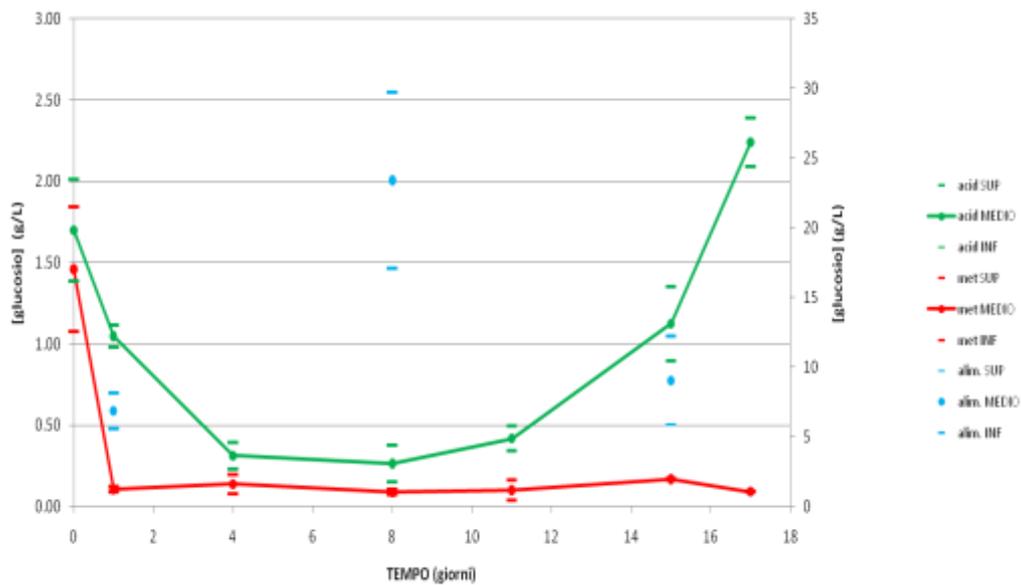


**Figura 4.17.** Andamento del COD solubile nel reattore multistadio a fasi successive.

Seppure entrambe le fasi non sono risultate stazionarie in termini di produzione di biogas (vedi figura 4.15 e 4.16), lo erano in termini di concentrazione di COD solubile all'interno di ciascuna fase. In particolare il COD (medie calcolate su tutto il periodo di sperimentazione) è risultato pari a 21.5 g/L per la fase pre-acidificante e pari a 6.3 g/L per quella metanogenica

Dal confronto tra le gli andamenti del COD figure 4.12 e figura 4.17 risulta che il reattore a due stadi ha consentito un maggiore abbattimento del CODsolubile rispetto al reattore CSTR monostadio. Nel caso del reattore monostadio infatti, la concentrazione del CODsolubile all'interno del reattore nel periodo di maggiore stabilità (compreso tra il giorno 20 e il giorno 40) era di 11.4 g/L: quasi il doppio di quella nella fase metanogenica del reattore multistadio che risultava essere pari a 6.3 g/L.

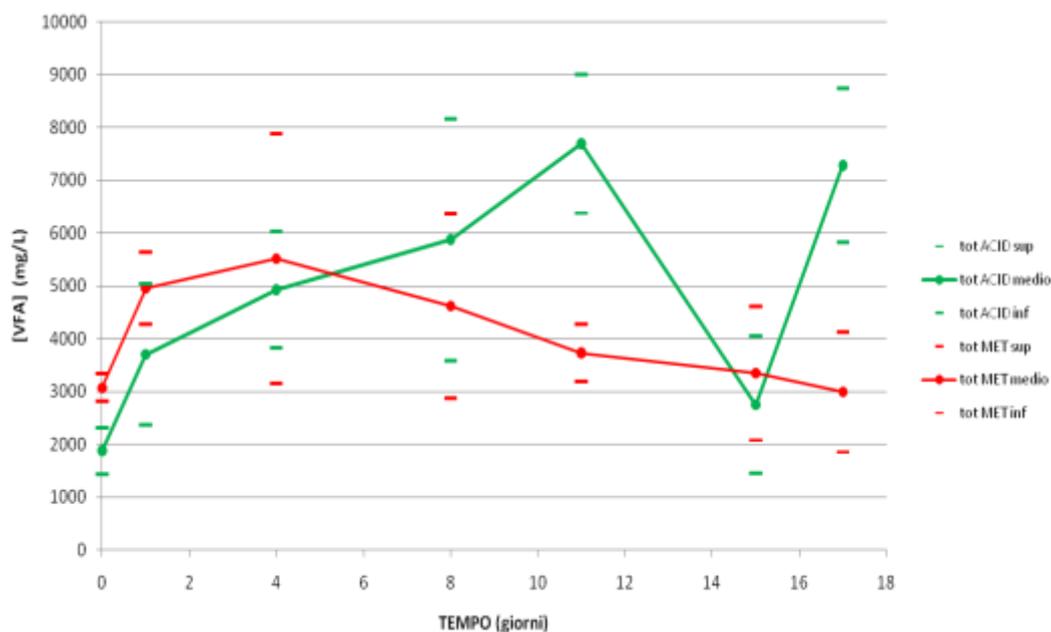
Dal confronto di tabella 4.3 con tabella 4.4 risulta che il reattore monostadio ha consentito un abbattimento di COD pari a circa 23.9 g/L (67%) mentre il reattore multistadio ha consentito un abbattimento di 28.0 g/L (82%). In particolare risulta che la fase acidogenica ha rimosso circa 13 g/L (differenza tra 34.3g/L dell'alimentazione e 21.5g/L della fase acidogenica) pari al 38% mentre la fase metanogenica ha abbattuto circa 15g/L (differenza tra 21.5g/L e 6.3g/L) pari al 44%.



**Figura 4.18.** Monitoraggio dei carboidrati totali in reattore multistadio a fasi successive. I dati relativi alle due fasi e all'alimentazione fanno riferimento, rispettivamente, all'asse delle ordinate di sinistra e di destra.

Osservando la figura 4.18, si nota che la concentrazione di carboidrati totali è rimasta costante nella fase metanogenica mentre tendeva ad aumentare nella fase acidogenica. Nella fase acidogenica dunque è aumentato il grado di idrolisi in accordo anche con l'aumento della concentrazione dei VFA (salvo punto al 15° giorno) mostrato in figura 4.17.

Dal confronto di figura 4.18 con figura 4.13 si nota che il reattore a due fasi ha consentito una maggior rimozione di carboidrati rispetto al monostadio. Nel reattore monostadio infatti la concentrazione di carboidrati entro il reattore era pari a 0.35g/L per una rimozione del 95% (tabella 4.3); nel caso del reattore multistadio, la concentrazione entro la fase metanogenica era di 0.12g/L per una rimozione pari al 98% (tabella 4.4).



**Figura 4.19.** Monitoraggio dei VFA in reattore multistadio a fasi successive.

Da figura 4.19 si deduce che il processo di acidogenesi che quello di metanogenesi hanno avuto un progressivo miglioramento nel tempo in quanto per la prima si osserva un incremento della concentrazione di VFA che, in accordo con l'andamento relativo agli zuccheri osservato in figura 4.18, è imputabile ad un miglioramento del grado di idrolisi; mentre per la seconda si osserva un progressivo calo imputabile dunque ad un miglioramento delle condizioni di metanogenesi che come descritto produce metano dalla degradazione dei VFA.

Dal confronto tra figura 4.14 e l'andamento della concentrazione di VFA della sola fase metanogenica di figura 4.19, si evince che la concentrazione di VFA entro la fase metanogenica (tendente a valori  $< 3\text{g/L}$ ) era di gran lunga inferiore rispetto alla concentrazione degli stessi entro il reattore CSTR (valori compresi tra  $2\text{g/L}$  e  $8\text{g/L}$  a causa della difficoltà nel mantenere le condizioni favorevoli per la crescita dei microrganismi metanogenici). Questo conferma che nei reattori multistadio, la possibilità di controllare indipendentemente le condizioni di ciascuna vasca, si traduce in un miglioramento del processo di digestione anaerobica.

## Performance reattore multistadio a fasi successive

<b>T a b el la 4. 4. P er fo r m a n c e d el re at to re m ul ti st a di o a fa si s u ccessive.</b>	Fase acidogenica	Produzione oraria/giornaliera idrogeno	2.0mL/h – 48.0mL/giorno
		Produzione oraria/giornaliera biogas	4mL/h – 96.0mL/giorno
		SGP ( $m^3$ biogas / kg substrato alimentato)	$3.8 \times 10^{-3}$
		GPR ( $m^3$ biogas / $m^3$ reattore / giorno)	0.8
	Fase metanogenica	Produzione oraria e giornaliera biogas	1.8mL/h – 43.2mL/giorno
		SGP ( $m^3$ biogas / kg substrato alimentato)	$1.7 \times 10^{-3}$
		GPR ( $m^3$ biogas / $m^3$ reattore / giorno)	$8.6 \times 10^{-2}$
		Produzioni oraria e giornaliera metano	1.5mL/h – 36.0mL/giorno
		Carico organico giornaliero (g COD/giorno)	0.9 g/giorno
		Produzione teorica giornaliera metano	315mL/giorno
		Resa processo	11%
		[COD] <sub>alimentazione</sub>	34.3 g/L
		[COD] <sub>reattore</sub>	6.3 g/L
		rimozione (g/L)	28.0 g/L
		% rimozione	82 %
		[carboidrati] <sub>alimentazione</sub>	7.85 g/L
		[carboidrati] <sub>reattore</sub>	0.12 g/L
		rimozione (mg/L)	7.73 g/L
		% rimozione	98 %

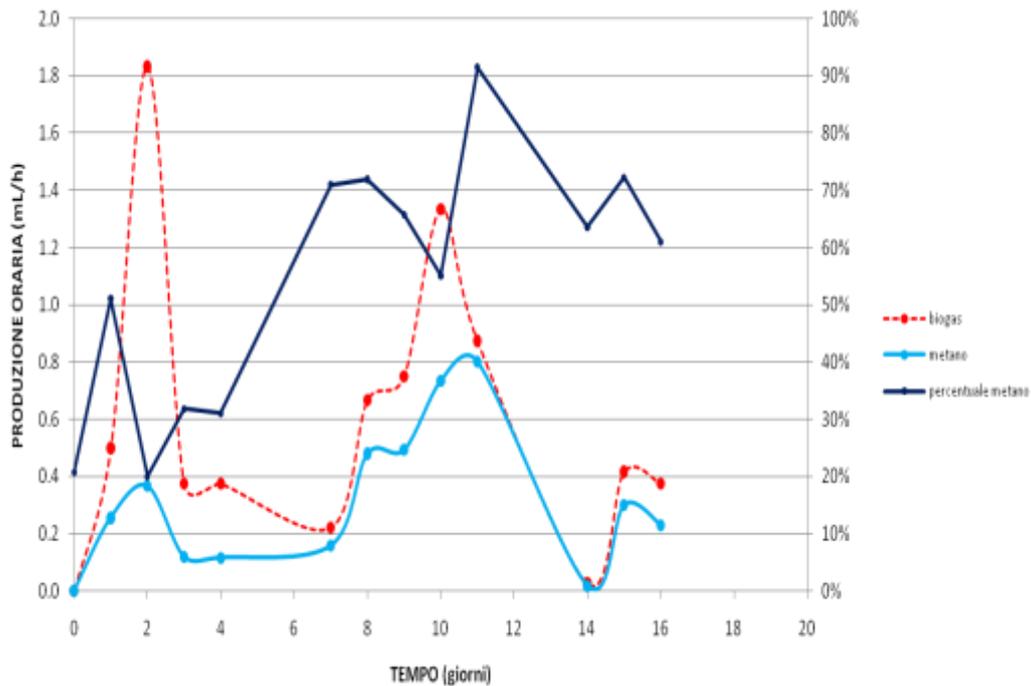
Come nel caso del reattore monostadio, anche per il reattore multistadio, la rimozione dei carboidrati (98%) è risultata superiore a quella del COD (82%).

Il processo ha mostrato dunque una elevata capacità biologica di rimozione nei confronti dei carboidrati mentre non tutto il COD biodegradabile è rimosso; ciò è in accordo con il rapporto in peso tra COD e glucosio che passa da un valore di circa 4 a 54, rispettivamente dall'ingresso al reattore.

Poiché il rapporto tra COD solubile e glucosio entro il reattore multistadio è pari a 54, mentre nel caso del reattore monostadio lo stesso rapporto è pari a 32, nuovamente viene confermato che il reattore multistadio è più performante del monostadio in termini di rimozione del carico inquinante.

## 4.8 Reattore multistadio a fasi concentriche

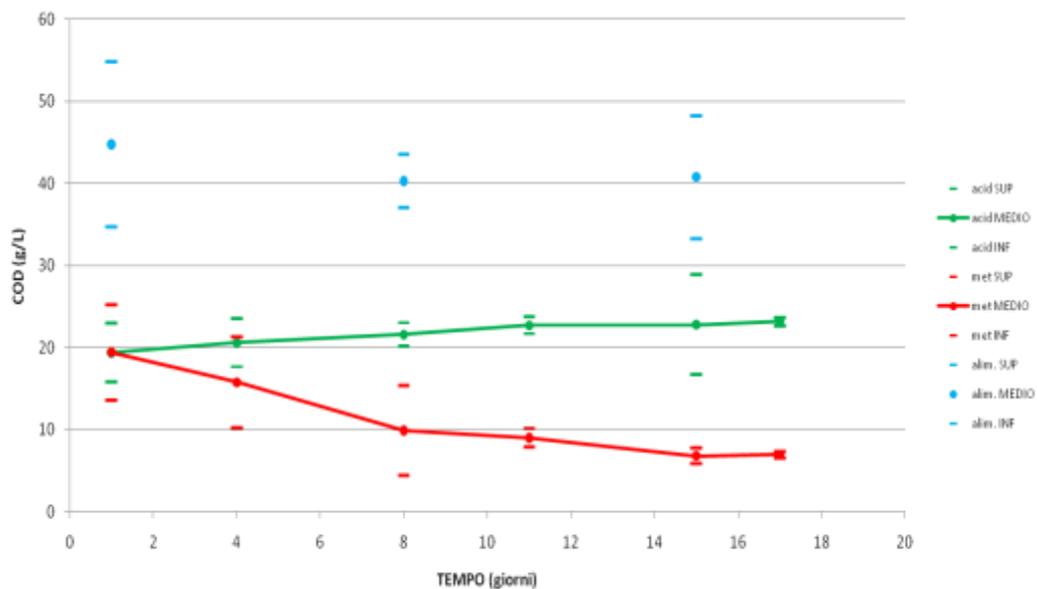
Di seguito sono riportati i risultati dei principali andamenti ottenuti dal reattore multistadio a fasi concentriche descritto al paragrafo 3.1.4.3.



**Figura 4.20.** Produzione oraria di biogas e di metano relative al reattore multistadio a fasi concentriche.

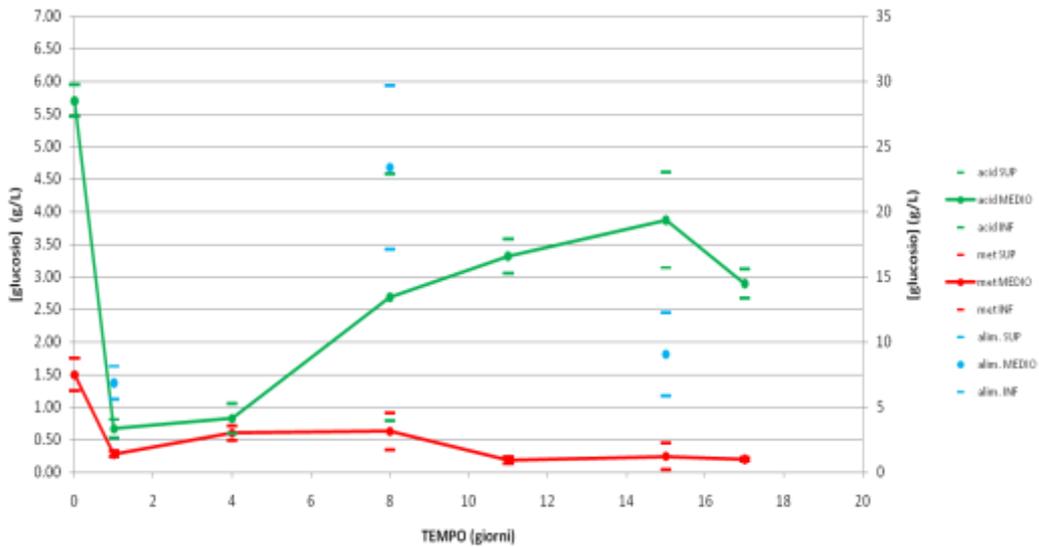
Anche in questo studio, come precedentemente spiegato, l'impossibilità di effettuare in modo costante l'alimentazione giornaliera, ha determinato una discontinuità in termini di produzioni orarie di metano e biogas. (Figura 4.20).

E' stato comunque calcolato un valore medio di produzione al fine di poter fare un confronto con le efficienze di trattamento ottenute con gli altri reattori. Tali valori sono riportati in tabella 4.5.



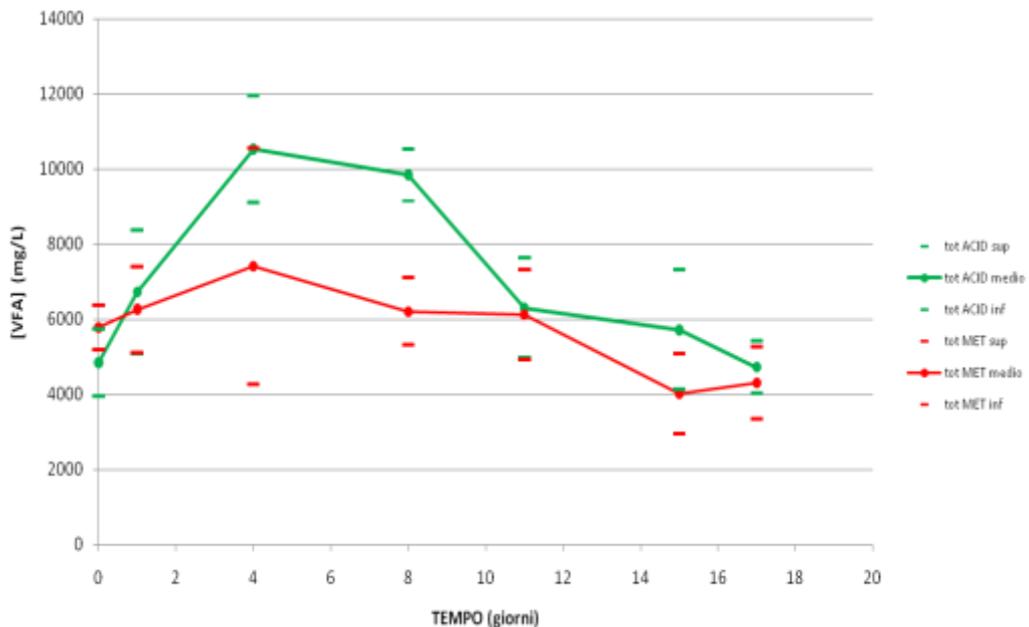
**Figura 4.21.** Andamento del COD solubile nel reattore multistadio a fasi concentriche.

L'andamento del COD solubile relativo all'alimentazione e alle due fasi del reattore (figura 4.21) mostra che in fase acidogenica si ha una concentrazione costante pari a 21.7 g/L (valore medio calcolato su tutti i punti). In fase metanogenica, invece, il COD cala fino ad attestarsi a circa 6.8 g/L negli ultimi giorni di monitoraggio. Il confronto tra la figura appena descritta con la figura 4.12 relativa al reattore CSTR, conferma che nei reattori multistadio si ha un miglioramento del processo di digestione anaerobica per gli stessi motivi descritti al paragrafo 4.7. Nel caso del reattore monostadio infatti, la concentrazione del COD all'interno della vasca nel periodo di maggiore stabilità (compreso tra il giorno 20 e il giorno 40) era pari a 11.4g/L: quasi il doppio di quella raggiunta negli ultimi giorni di monitoraggio dalla fase metanogenica del reattore multistadio che è risultata essere pari a 6.8 g/L.



**Figura 4.22.** Andamento dei carboidrati totali nel reattore multistadio a fasi concentriche. I dati relativi alle due fasi e all'alimentazione fanno riferimento, rispettivamente, all'asse delle ordinate di sinistra e di destra.

Come nel caso del precedente reattore a 2 fasi, nella fase metanogenica la concentrazione di carboidrati totali si è mantenuta costante (valore medio pari a 0.28g/L).



**Figura 4.23.** Andamento dei VFA in reattore multistadio a fasi concentriche.

La figura 4.23 mostra che in fase metanogenica si ha una progressiva diminuzione della concentrazione di VFA fino a giungere a valori prossimi a

quelli misurati nella fase metanogenica del reattore a fasi successive (pari a circa 3000mg/L come mostrato in figura 4.19).

### Performance reattore multistadio a fasi concentriche

Produzione oraria e giornaliera biogas	0.6mL/h – 14.4mL/giorno
SGP ( $\text{m}^3$ biogas / kg substrato alimentato)	$3.6 \times 10^{-4}$
GPR ( $\text{m}^3$ biogas / $\text{m}^3$ reattore / giorno)	$1.8 \times 10^{-2}$
Produzioni oraria e giornaliera metano	0.3mL/h – 7.2mL/giorno
Carico organico giornaliero (g COD/giorno)	0.9g/giorno
Produzione teorica giornaliera metano	315mL/giorno
Resa processo	2%
[COD] <sub>alimentazione</sub>	34.3g/L
[COD] <sub>reattore</sub>	6.8g/L
rimozione (g/L)	27.5g/L
% rimozione	80%
[carboidrati] <sub>alimentazione</sub>	7.85g/L
[carboidrati] <sub>reattore</sub>	0.28g/L
rimozione (mg/L)	7.57g/L
% rimozione	96%

**Tabella 4.5.** Performance del reattore multistadio a fasi concentriche.

Da tabella 4.5 risulta che l'efficienza di rimozione è pari al 80% in termini di COD solubile mentre è pari al 96% in termini di carboidrati rimossi. E' dunque nuovamente confermato che gran parte della rimozione del COD solubile è attribuibile alla degradazione degli zuccheri.

Confrontando tra loro i due reattori multistadio (tabella 4.4 e tabella 4.5) risulta che, dal punto di vista della rimozione di COD e carboidrati, essi sono paragonabili tra loro. Il reattore multistadio a fasi successive consente infatti un abbattimento di COD solubile pari al 82% e di carboidrati totali pari al 98%. Il reattore multistadio a fasi concentriche consente di abbattere l'80% di COD e il 96% di carboidrati.

## 5.1 CONCLUSIONI

La digestione anaerobica rappresenta, senza dubbio, una tecnologia efficace nell'ambito della soluzione del problema dei rifiuti, poiché permette di trattare il rifiuto riducendone volume e patogenicità, e contemporaneamente di produrre biogas, una forma di energia "pulita".

Il presente lavoro è stato finalizzato allo sviluppo di una tecnica di digestione anaerobica a due fasi per la produzione di biogas ricco in metano a partire da una miscela costituita da letame bovino e siero di latte.

I sistemi a due fasi dovrebbero garantire migliori risultati rispetto a quelli monostadio perché in quest'ultimi le condizioni non sono ottimali sia per i microrganismi idrolitici-acidogenici che per quelli metanogenici. Infatti le due classi di microrganismi hanno differenti caratteristiche di crescita e in un digestore monostadio non è possibile implementare delle condizioni che ne favoriscano il contemporaneo sviluppo. Nei sistemi a due stadi invece, controllando indipendentemente le condizioni di ciascuna fase, è possibile selezionare differenti batteri in ognuno dei due digestori.

Ai fini dello scopo sopra menzionato, inizialmente è stato effettuato un lavoro di screening attraverso l'allestimento di prove *batch* condotte in micro-reattori (denominati microcosmi ) dal volume di circa 50 mL al fine di:

- individuare l'inoculo più performante;
- valutare se siero e letame producano una maggior quantità di biogas se presi singolarmente o in mix;
- valutare le condizioni ottimali di lavoro per la fase acidogenica in termini di temperatura, pH e HRT.

Dalla fase di screening è risultato che:

- se ai substrati viene aggiunto un inoculo che si trova in condizioni di avanzata metanogenesi, si osserva che, rispetto agli stessi substrati non inoculati, la produzione di biogas ha inizio in tempi più brevi e si ha una maggior produzione di metano. Probabilmente ciò accade perché i batteri metanogenici presenti nei substrati tal quali hanno bisogno di un maggior tempo per acclimatarsi e per prevalere sui batteri competitori mentre, l'aggiunta dell'inoculo in avanzata metanogenesi, consente di eliminare

questa fase di latenza. Tra i tre inoculi testati, quello più performante è risultato essere quello denominato *inoculo reattore (IR)*.

- i campioni (microcosmi denominati 501R e 502R) contenenti letame e siero di latte in rapporto 1:1 e inoculati con l'inoculo del reattore hanno raggiunto le migliori performances in termini produzione di metano e abbattimento di COD solubile.

Al paragrafo 3.2.2 è riportato che la produzione specifica di metano è pari a 0.350L CH<sub>4</sub> / g COD degradato. Poiché nei campioni sopra menzionati, a fronte di una rimozione di 1.6g COD solubile, sono stati ottenuti in media 540mL di metano, si evince che è stata ottenuta una resa in metano pari a circa il 96%. (vedi tabella 4.1).

- Dalle prove volte ad individuare le condizioni ottimali in termini di durata, temperatura, pH della fase pre-acidificante (paragrafo 4.4) risulta che, privilegiando come condizione più performante la produzione cumulativa di idrogeno, le condizioni migliori sono quelle applicate ai microcosmi "135° NO pH" A e B e precisamente:
  - siero e letame in egual quantità
  - inoculati
  - mantenuti a 35°C
  - pH non controllato.

Tali microcosmi, al termine della fase acidogenica valutata essere in corrispondenza dell'inizio del plateau di produzione di idrogeno (dopo 7 secondo figura 4.5), hanno raggiunto una produzione di idrogeno maggiore rispetto a tutti gli altri testati e pari a 244 mL H<sub>2</sub> / g TVS.

Al termine della fase di screening si è proceduto con l'allestimento dei seguenti reattori:

- *reattore CSTR monostadio*
- *reattore multistadio a fasi successive*
- *reattore multistadio a fasi concentriche*

descritti rispettivamente ai paragrafi 3.1.4.1 , 3.1.4.2 e 3.1.4.3 che utilizzavano come substrato per la digestione anaerobica un mix 1:1 tra letame e siero, inoculati con l' "inoculo del reattore" e operanti in condizioni mesofile (35°C). Queste erano infatti le condizioni più performanti in termini di produzione di metano risultate dalle prove effettuate coi microcosmi.

Al fine di confrontare i risultati ottenuti da ciascun reattore, il CSTR e le fasi metanogeniche dei reattori multistadio, operavano con un HRT pari a 20giorni.

Le fasi acidogeniche dei reattori multistadio operavano come un PFR e nelle condizioni di temperatura, pH,...risultate migliori dalla prova descritta al paragrafo 4.4.

I risultati in termini di produzione metano, abbattimento COD solubile e carboidrati totali raggiunti dai 3 reattori, sono riportati in tabella 5.1. Nella stessa tabella sono stati riportati anche i risultati relativi fase batch di avviamento del reattore CSTR.

	<b>Reattore BATCH</b>	<b>Reattore CSTR monostadio</b>	<b>Reattore multistadio a fasi successive</b>	<b>Reattore multistadio a fasi concentriche</b>
<b>SGP</b> ( $\text{m}^3_{\text{biogas}}/\text{Kg}_{\text{substato alimentato}}$ )		$1.7 \times 10^{-3}$	$1.7 \times 10^{-3}$	$3.6 \times 10^{-4}$
<b>GPR</b> ( $\text{m}^3_{\text{biogas}} \text{m}^{-3}_{\text{reattore}} \text{giorno}^{-1}$ )		$8.4 \times 10^{-2}$	$8.6 \times 10^{-2}$	$1.8 \times 10^{-2}$
<b>Carico organico giornaliero</b> (g COD/ giorno)		0.9 g COD/giorno	0.9 g COD/giorno	1.4 g COD /giorno
<b>Produzione teorica metano</b>	3220 mL	315 mL/giorno	315 mL/giorno	490 mL/giorno
<b>Produzione metano e resa</b>	1394mL (43%)	16.0 mL/giorno (5%)	36.0 mL/giorno (11%)	7.2 mL/giorno (2%)
<b>% COD rimosso</b>	53.5%	67%	82%	80%
<b>% carboidrati rimossi</b>		95%	98%	96%

**Tabella 5.1.** Confronto tra le performance dei reattori.

Da tabella 5.1 si evince che:

- dal punto di vista della resa in produzione in metano, soltanto nel caso del reattore batch si ottiene un discreto valore (43%). Va comunque sottolineato che la produzione di metano e quindi la resa sono state sottostimate a causa della presenza di perdite sulla linea gas come precedentemente descritto al paragrafo 4.5.
- I reattori continui hanno raggiunto rese in metano molto basse non ha causa di inefficienza del processo di digestione anaerobica ma, come precedentemente descritto al paragrafo 4.6, da un lato a causa della degradazione subita dallo

stock di alimentazione e dall'altro dell'impossibilità di alimentare gli impianti durante i giorni non lavorativi.

- I reattori continui consentono una maggior rimozione di COD solubile rispetto al reattore batch. Nel caso di quest'ultimo infatti, la rimozione è pari al 53% mentre nel caso del CSTR, del reattore multistadio a fasi successive e di quello a fasi concentriche, essa è pari, rispettivamente, al 67% , 83% e 80%.
- Confrontando tra loro i reattori continui, si evince che i multistadio sono ugualmente performanti in quanto le rese di rimozione di COD solubile e di carboidrati totali sono simili attestandosi rispettivamente attorno all'80% e al 97%. Essi risultano invece di gran lunga più performanti rispetto al CSTR in quanto quest'ultimo ha raggiunto una rimozione rispetto ai parametri appena citati pari rispettivamente al 67% e al 95%.
- In tutti i casi si è ottenuto una rimozione di carboidrati maggiore rispetto a quella di COD solubile. Ciò implica che i processi studiati hanno una elevata capacità biologica di rimozione nei confronti dei carboidrati (quasi totalmente attribuibili al siero) mentre non consentono di rimuovere tutto il COD biodegradabile; questo risultato è confermato dal rapporto in peso tra COD e glucosio che passa da un valore di circa 4 a 32-54, rispettivamente dall'ingresso al reattore. Quindi gran parte del COD solubile rimosso è dovuto alla degradazione dei carboidrati.
- Seppur entrambi i reattori a due fasi hanno raggiunto scarse rese di produzione in metano, quello a fasi concentriche è potenzialmente più interessante dal punto di vista economico in quanto è un sistema che prevede un solo volume essendo, la vasca acidogenica, al centro di quella metanogenica.

## **BIBLIOGRAFIA**

ANPA; “Il trattamento anaerobico dei rifiuti Aspetti progettuali e gestionali”.  
Manuali e linee guida ANPA 13/2002

ANPA; “I rifiuti del comparto Agroalimentare”, **2001**

APAT; “Digestione anaerobica della frazione organica dei rifiuti solidi”, **2005**

Burton C. , Turner C.; “Manure management”, Silsoe Research Institute, **2003**

CRPA; “Il biogas in italia: situazione e prospettive”, **2009**

Desai M. , Patel V. , Madamwar D.; “Effect of temperature and retention time on biometanation of cheese whey-poultry waste-cattle dung”, **1994**

European Biogas Association; “Agroenergie per lo sviluppo sostenibile”, **2010**

Fraraccio S. ; “Development and microbiological characterization of anaerobic biotechnological processes for the biomethanization of organic wastes” ,Tesi di laurea in *Biotechnologie Molecolari e Industriali LM*, **2010**).

Gelegenis J. , Angelidaki I. , Christopoulou I. , Goumenaki N. ; “Optimization of biogas production from olive-oil mill wastewater, by codigesting with diluted poultry-manure”, **2007**

Gelegenis J. , Georgakakis D., Angelidaki I. , Mavris V. ; “Optimization of biogas production by co-digesting whey with diluted poultry manure”,**2006**

Giordano, Cantu, Spagni; “ A Monitoring the biochemical hydrogen and methane potential of the two-stage dark-fermentative process” , **2011**

Gómez X. , Cuetos M.J. , Cara J. ; “Anaerobic co-digestion of primary sludge and the fruit and vegetable fraction of the municipal solid wastes - Conditions for mixing and evaluation of the organic loading rate”, **2006**

Gujer W. and Zehnder A. J. B.; “Conversion processes in anaerobic digestion”.  
*Wat. Sci. Tech.*, **15**, 127-167; **1983**

Ince O.; “Performance of a two-phase anaerobic digestion system when treating dairy wastewater”,**1998**

Murto M. , Bjornsson L. , Mattiasson B. ; “Impact of food industrial waste on anaerobic co-digestion of sewage sludge and pig manure”, **2004**

Neves L. , Oliveira R. , Alves MM. ; “Anaerobic co-digestion of coffee waste and sewage sludge”, **2006**

Piccinini; “La digestione anaerobica dei rifiuti organici e di altre biomasse: situazione e prospettive in Europa e in Italia”, **2004**

Rajeshwari K.V. , Balakrishnan M., Kansal A. , Kusum Lata, Kishore V.V.N. ; “State-of-the-art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment”, **2000**.

Rivista terra trentina; “Possibili soluzioni per una gestione sostenibile dei liquami e letame”, **2002**

Sijbesma F. and Chairman; “White Biotechnology: Gateway to a More Sustainable Future”, **2003**

Soetaert and Vandamme; “Industrial Biomass: Source of Chemicals, Materials, and Energy”, **2006**

Sosnowski, P. , Wieczorek A. , Ledakowicz S. ; “ Anaerobic co-digestion of sewage sludge and organic fraction of municipal solid wastes”, **2003**

[www.eia.doe.gov](http://www.eia.doe.gov)

Zehnder, Huser and Brock; “Reactor configuration for anaerobic biotechnology”, **1980**

## **RINGRAZIAMENTI**

Un grazie speciale a tutto il DICASM che mi ha accolto e dato l'opportunità di svolgere la tesi presso i suoi laboratori.

Un grazie a Selene che mi ha aiutato soprattutto nella stesura della tesi.

Grazie ai miei genitori che mi hanno sostenuto durante tutti questi lunghi anni di studio.

Grazie a Francesco, Raffaele e al Colorificio Adriatico S.r.l. che offrendomi rispettivamente un lavoro come fruttivendolo, pizzaiolo e apprendista operaio hanno fatto sì che potessi sostenermi gli studi.