

The logo for ENEA, consisting of the letters 'E', 'N', 'E', and 'A' in a bold, stylized, sans-serif font.

Ente per le Nuove tecnologie,  
l'Energia e l'Ambiente



*Ministero dello Sviluppo Economico*

**RICERCA SISTEMA ELETTRICO**

---

## **Digestione anaerobica a singolo e doppio stadio di scarti e residui agricoli e zootecnici**

**A. Poletti, R. Pomi, G. Giordano, A. Pantano, L. Galeotti, G. Carucci**





Ente per le Nuove tecnologie,  
l'Energia e l'Ambiente



*Ministero dello Sviluppo Economico*

## RICERCA SISTEMA ELETTRICO

Digestione anaerobica a singolo e doppio stadio di scarti e residui  
agricoli e zootecnici

*A. Poletti, R. Pomi, G. Giordano, A. Pantano, L. Galeotti, G. Carucci*



DIGESTIONE ANAEROBICA A SINGOLO E DOPPIO STADIO DI SCARTI E RESIDUI AGRICOLI E ZOOTECNICI

A. Polettini, R. Pomi, G. Giordano, A. Pantano, L. Galeotti, G. Carucci (Dipartimento di Idraulica, trasporti e strade dell'Università di Roma La Sapienza)

Maggio 2009

Report Ricerca Sistema Elettrico

Accordo di Programma Ministero dello Sviluppo Economico - ENEA

Area: Produzione e fonti energetiche

Tema: Celle a combustibile per applicazioni stazionarie cogenerative

Responsabile Tema: Angelo Moreno, ENEA







# Indice

Premessa.....	8
Capitolo 1.....	10
1 Materiali e Metodi.....	10
1.1 Condizioni sperimentali.....	10
1.1.1 Prove batch.....	10
1.1.2 Prove in semi-continuo.....	15
1.2 Metodi analitici.....	20
1.2.1 Solidi totali.....	20
1.2.2 Solidi totali volatili.....	20
1.2.3 pH.....	20
1.2.4 Acidi grassi volatili.....	21
1.2.5 Costituenti del biogas.....	22
1.2.6 Etanolo.....	23
1.2.7 Proteine.....	24
1.2.8 Grassi.....	24
1.2.9 Carboidrati.....	24
1.2.10 Descrizione matematica del processo di produzione del biogas.....	25
Capitolo 2.....	26
2 Risultati e discussione.....	26
2.1 Digestione del refluo da suinicoltura.....	26
2.1.1 Produzione di biogas.....	27
2.1.2 Analisi della cinetica di produzione del biogas.....	29
2.1.3 Evoluzione dei VFA.....	32
2.1.4 Rimozione del COD.....	33
2.2 Digestione della FORSU.....	34
2.2.1 Primo set di prove.....	36
2.2.2 Secondo set di prove.....	45
2.2.3 Terzo set di prove.....	51
2.2.3.1 Prova con controllo automatico del pH.....	51
2.2.3.2 Prova con condizionamento con Mg metallico.....	55
2.2.4 Quarto set di prove (in semi-continuo).....	58
2.3 Confronto tra le prove effettuate.....	64

2.3.1	Confronto tra le prove di digestione su refluo da suinicoltura e su FORSU	64
2.3.2	Confronto tra le prove su FORSU con e senza condizionamento del pH71	
2.4	Conclusioni .....	72
	Bibliografia .....	74

## Premessa

---

Il presente rapporto costituisce la relazione dettagliata delle attività sperimentali condotte sino al mese di marzo 2009 nell'ambito dell'Accordo di Collaborazione tra ENEA e Dipartimento di Idraulica, Trasporti e Strade dell'Università degli Studi di Roma "La Sapienza" per un'attività di ricerca sul tema "Sviluppo di tecnologie innovative per le applicazioni stazionarie cogenerative delle celle a combustibile", all'interno dell'Accordo di Programma MSE-ENEA (Tema di ricerca 5.2.5.11 "Celle a combustibile per applicazioni stazionarie cogenerative").

Oggetto dell'attività di ricerca condotta presso il laboratorio di Ingegneria Sanitaria-Ambientale del Dipartimento di Idraulica, Trasporti e Strade è l'individuazione delle condizioni ottimali per la produzione combinata di H<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub> mediante digestione anaerobica di substrati organici biodegradabili, ai fini di un successivo impiego del biogas in celle a combustibile.

L'attività di ricerca è stata condotta secondo una serie di prove sperimentali in scala di laboratorio, articolate nelle seguenti fasi:

1. Preparazione dei substrati:
    - 1.1. Campionamento e caratterizzazione dei substrati organici e dell'inoculo
    - 1.2. Formulazione delle miscele e prove preliminari di biodegradabilità
    - 1.3. Verifica degli effetti di eventuali pre-trattamenti
    - 1.4. Prove di digestione anaerobica a singolo e doppio stadio
    - 1.5. Esecuzione di un insieme di prove in reattori batch
    - 1.6. Trasferimento delle esperienze in reattori in semi-continuo
  2. Elaborazione dei risultati e redazione del report finale
- secondo l'articolazione temporale indicata nel prospetto seguente.

Mese	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>1. Preparazione dei substrati</b>								
<i>Campionamento e caratterizzazione dei substrati organici</i>								
<i>Formulazione miscele e prove preliminari di biodegradabilità</i>								
<i>Verifica degli effetti di eventuali pre-trattamenti</i>								
<b>2. Prove di digestione anaerobica a singolo e doppio stadio</b>								

<i>Esecuzione di un insieme di prove in reattori batch</i>							
<i>Trasferimento delle esperienze in reattori in semi-continuo</i>							
<b>3. Elaborazione dei risultati e redazione del report finale</b>							

Verranno nel seguito descritti gli apparati sperimentali utilizzati, le metodiche analitiche impiegate, i test sperimentali effettuati nonché i principali risultati delle prove eseguite su due diversi substrati reali (refluo da suinicoltura, frazione organica dei rifiuti urbani), oltre ad un substrato sintetico (glucosio) utilizzato come riferimento teorico.

Il gruppo di lavoro che ha condotto le attività di ricerca sperimentale è costituito da:

- Prof. Alessandra Poletti, professore associato in Ingegneria Sanitaria-Ambientale presso il Dipartimento di Idraulica, Trasporti e Strade dell'Università degli Studi di Roma "La Sapienza"
- Prof. Raffaella Pomi, ricercatore in Ingegneria Sanitaria-Ambientale presso il Dipartimento di Idraulica, Trasporti e Strade dell'Università degli Studi di Roma "La Sapienza"
- Ing. Gianluca Giordano, contrattista di ricerca presso il Dipartimento di Idraulica, Trasporti e Strade dell'Università degli Studi di Roma "La Sapienza"
- Ing. Alessandro Pantano, contrattista di ricerca presso il Dipartimento di Idraulica, Trasporti e Strade dell'Università degli Studi di Roma "La Sapienza"
- Dott. Luigi Galeotti, responsabile del laboratorio di Ingegneria Sanitaria-Ambientale del Dipartimento di Idraulica, Trasporti e Strade dell'Università degli Studi di Roma "La Sapienza"
- Dott.ssa Gloria Carucci, tecnico presso il laboratorio di Ingegneria Sanitaria-Ambientale del Dipartimento di Idraulica, Trasporti e Strade dell'Università degli Studi di Roma "La Sapienza"

# Capitolo 1

---

## 1 Materiali e Metodi

In questo capitolo viene fornita una descrizione delle apparecchiature utilizzate per la sperimentazione presso il laboratorio di Ingegneria Sanitaria-Ambientale del Dipartimento Idraulica Trasporti e Strade dell'Università degli Studi di Roma "La Sapienza".

Vengono poi descritte le procedure analitiche e le metodiche sperimentali applicate per lo svolgimento del presente studio.

### 1.1 Condizioni sperimentali

Le prove sperimentali di digestione anaerobica in scala di laboratorio sono state eseguite impiegando diversi set-up sperimentali, i quali sono stati modificati sia in funzione delle condizioni della prova (in batch o in semi-continuo; con o senza controllo automatico del pH), sia in funzione delle specifiche esigenze operative che si sono manifestate durante la sperimentazione al fine di migliorare i rendimenti del processo.

Lo studio dell'evoluzione dei processi metabolici durante il processo di digestione ha infatti consentito man mano di chiarire l'influenza e l'importanza relativa dei diversi parametri operativi coinvolti, nonché di individuare le necessità di ottimizzazione dell'apparato sperimentale al fine di migliorare l'affidabilità del sistema e la riproducibilità e rappresentatività dei risultati sperimentali. Per tale ragione, sia le caratteristiche e la configurazione del set-up sperimentale sia le condizioni operative sono state modificate nel corso della sperimentazione sulla base delle indicazioni fornite dalle prove precedenti così da ottimizzare il funzionamento del sistema.

La sperimentazione è stata organizzata secondo una serie di prove in batch e in semi-continuo nelle condizioni che verranno descritte nei paragrafi successivi

#### 1.1.1 Prove batch

Le prove in reattore batch sono state condotte allo scopo di definire le condizioni ottimali per la produzione combinata di  $H_2$  e  $CH_4$  e studiarne la relativa cinetica di produzione.

Le unità principali costituenti la postazione sperimentale sono state:

- bagno termostatico in plexiglas coibentato, atto a mantenere condizioni di temperatura in

campo mesofilo;

- bottiglie in pirex<sup>®</sup> da 500 ml, usate come digestori batch in scala di laboratorio;
- eudiometri da 1 l, utilizzati come sistema di stoccaggio e misura del volume di biogas prodotto
- sistema di titolazione automatica Titrino Metrohm<sup>®</sup> 718 STAT

Le bottiglie da 500 ml in pirex<sup>®</sup>, chiuse con tappi dotati di appositi sottotappi in gomma di butile atti a garantirne la tenuta e a consentire il campionamento del biogas prodotto, sono state collegate agli eudiometri mediante tubi in tygon<sup>®</sup>, materiale impermeabile all'aria, per poter misurare il volume di gas prodotto mediante una misura diretta dello spostamento del livello del liquido in essi contenuto.

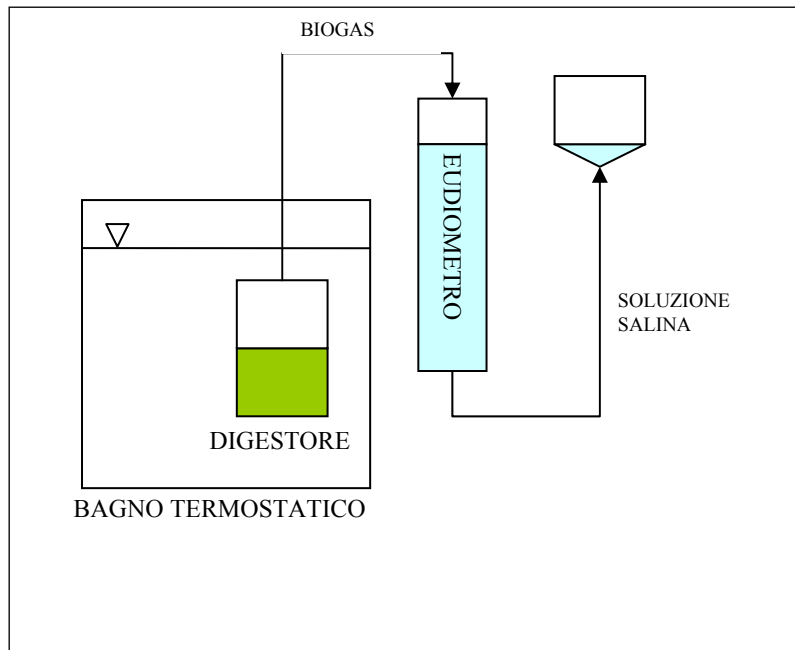
Per effettuare il collegamento con gli eudiometri e per consentire il campionamento del digestato, i reattori batch sono stati muniti di due portagomma, uno posto nella parte superiore ed utilizzato per l'estrazione del biogas, ed uno a sfioro sul fondo impiegato per il campionamento della miscela digerita.

Il sistema di titolazione automatica è stato impiegato nell'ultima fase delle prove in batch al fine di consentire la regolazione in continuo del pH della miscela al valore desiderato. A tal fine è stata impiegata quale soluzione titolante NaOH 1 M. In tali prove sia l'elettrodo di misura del pH che il tubo di alimentazione della soluzione sono stati inseriti all'interno del reattore di digestione attraverso un foro praticato nel tappo e nel sottotappo che è stato poi adeguatamente sigillato onde assicurare la tenuta al gas.

Al fine di evitare la dissoluzione del biogas all'interno del liquido utilizzato negli eudiometri per la misura del volume di gas attraverso lo spostamento del livello liquido, questi sono stati riempiti con una soluzione salina acida, ottenuta come soluzione acquosa satura in cloruro di sodio (NaCl) acidificata a pH = 2 mediante aggiunta di acido cloridrico (HCl) al 35% (v/v). La soluzione così preparata è stata successivamente colorata con blu di metilene ai fini di una più accurata misura visiva dello spostamento del livello del liquido all'interno di ciascun eudiometro.

Gli eudiometri erano dotati in testa di due rubinetti, l'uno (di regola mantenuto aperto durante le prove) atto a consentire l'ingresso del biogas dal digestore, l'altro (di regola mantenuto chiuso) utilizzato sia per il campionamento periodico del gas sia per le operazioni di sfiato dell'eudiometro stesso ogniqualvolta la produzione cumulata di biogas era tale da esaurirne la capacità totale.

Gli schemi del set-up sperimentale impiegato nelle prove batch di digestione anaerobica con e senza controllo in continuo del pH sono riportati in Figura 1, mentre in Figura 2 è riportata una rappresentazione fotografica dell'apparato stesso.



**Figura 1 – Rappresentazione schematica della postazione sperimentale utilizzata**



**Figura 2 – Postazione sperimentale**

In tale prima fase di indagine sperimentale le prove condotte hanno avuto lo scopo di individuare le condizioni ottimali per la produzione di H<sub>2</sub> da substrati organici di diversa provenienza e caratteristiche. In tale ambito sono state eseguite prove di digestione anaerobica su tre diversi substrati organici:

- frazione organica dei rifiuti solidi urbani (FORSU)
- refluo da attività suinicola
- refluo sintetico prontamente biodegradabile costituito da glucosio monoidrato.

Ogni prova è stata eseguita su una quantità pari a 300 grammi di miscela, costituita da uno dei substrati suindicati, un inoculo costituito da fango aerobico da un impianto di trattamento di reflui civili e per alcune prove anche acque di vegetazione. I componenti della miscela da avviare a digestione sono stati aggiunti in percentuali diverse in funzione della tipologia di prova condotta. Il contenuto di solidi totali per le diverse prove effettuate è risultato variabile tra il 7 e il 10% in peso. Per quanto riguarda le prove eseguite utilizzando come substrato la FORSU, la composizione delle miscele è stata scelta in base ad un'indagine su precedenti risultati sperimentali disponibili in letteratura, sui risultati di un primo set di prove, nonché sulle caratteristiche dei costituenti le miscele stesse.

La FORSU è stata preparata miscelando diverse frazioni merceologiche, in particolare:

- 25% pasta e riso
- 35% verdura
- 20% frutta
- 10% carne
- 10% pane.

Tale composizione percentuale è quella tipica di FORSU prodotta in centri urbani di medio-grandi dimensioni, già impiegata in precedenti sperimentazioni (De Gioannis et al., 2007).

Preliminarmente a ciascuna prova di digestione la FORSU è stata sottoposta a pretrattamento meccanico al fine di ridurne la pezzatura, incrementando così la superficie esposta all'attacco microbico e semplificando le operazioni di alimentazione ai reattori.

Le acque di vegetazione utilizzate come co-substrato sono costituite dal residuo della molitura delle olive e sono state campionate presso l'azienda olearia "Beata Solitudo" di Palombara Sabina.

Per le prove sul refluo da attività suinicola sono state utilizzate deiezioni suine prelevate allo sbocco del collettore fognario nel pozzetto di raccolta, presso l'azienda "Benini & Baldassarri" di Anguillara Sabazia.

Come inoculo è stato utilizzato fango aerobico proveniente dalla linea di ricircolo dell'unità a fanghi attivi dell'impianto di trattamento delle acque reflue ACEA di Roma Nord. Successivamente al campionamento il fango è stato sottoposto ad ispessimento per gravità per 24 ore. Nella quasi totalità delle prove il fango ha subito, inoltre, un pretrattamento termico a 110 °C per circa 30 minuti avente lo scopo di eliminare la biomassa metanigena<sup>1</sup>, effettuando una selezione nei riguardi dei microrganismi idrogeno-produttori che sono in grado di dar luogo alla formazione di endospore in condizioni sfavorevoli<sup>2</sup> (Kim et al., 2004).

---

<sup>1</sup> Il pretrattamento termico è necessario in quanto la biomassa metanigena risulta predominante rispetto a quella idrogenogenica.

<sup>2</sup> Le endospore si formano in risposta a condizioni ambientali squilibrate, come ad esempio temperature non ottimali o scarsa presenza di nutrienti e di acqua. Durante lo sviluppo di un'endospora l'accrescimento vegetativo o la divisione cellulare si arrestano. La spora formata viene espulsa dalla cellula dopo una lisi della parete cellulare; in questa forma la spora è in uno stato di dormienza, ovvero il suo metabolismo è quasi impercettibile; rimane in

La composizione delle miscele sottoposte alle prove di digestione anaerobica è riportata in Tabella 1.

**Tabella 1 – Composizione delle miscele investigate**

Prove	Tipologia substrato	Acque vegetazione [% in peso]	Substrato [% in peso]	Inoculo [% in peso]	pH iniziale
pH 4.5	Refluo da suinicoltura	---	80	20	4.5
pH 5.5	Refluo da suinicoltura	---	80	20	5.5
pH 7	Refluo da suinicoltura	---	80	20	7
pH 8	Refluo da suinicoltura	---	80	20	8
B1	FORSU	10	70	20	5.5
B2	FORSU	10	70	20	5.5
B3	FORSU	10	70	20	5.5
B4	FORSU	10	70	20	5.5
B5	FORSU	10	70	20	5.5
S1	FORSU	10	35	55	5.5
S2	FORSU	10	35	55	5.5
S3	FORSU	10	35	55	5.5
S4	FORSU	10	35	55	5.5
S5	FORSU	---	45	55	5.5
Titr1	FORSU	---	45	55	5.5*

\* pH mantenuto costante nel corso dell'intera prova a mezzo di sistema di titolazione automatica

Per quanto riguarda l'indagine sperimentale, sono state effettuate prove al fine di comprendere l'influenza del pre-trattamento termico dell'inoculo, ed è stato verificato come questo risulti indispensabile per ottenere migliori rese in termini di produzione di bioidrogeno.

Ove necessario, prima dell'avvio della prova si è provveduto a correggere il pH iniziale delle miscele al valore 5.5 tramite aggiunta di HCl al 35% (v/v) o di NaOH al 30% (p/v). Tale valore del pH iniziale è stato scelto in base ai risultati di prove preliminari condotte sul refluo da attività suinicola, confermati da studi effettuati da diversi autori su substrati di diversa natura (cfr. ad es. Lay, 2000) e sembrava essere il valore ottimale.

Dopo le operazioni di alimentazione ciascun reattore e ciascun eudiometro sono stati flussati con azoto a pressione di 0.5 atm per 30 minuti, al fine di eliminare eventuali tracce di ossigeno all'interno del sistema garantendo in tal modo l'instaurarsi delle condizioni anaerobiche. Gli eudiometri sono stati quindi sfiatati per riportare il livello del liquido nella posizione di zero.

I reattori sono stati quindi inseriti in un bagno termostatico regolato ad una temperatura operativa pari a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Con cadenza quotidiana sono stati controllati sia la temperatura del bagno termostatico, ripristinando ove necessario la quantità persa per evaporazione, sia i valori di pH del digestato.

I campionamenti di biogas sono stati eseguiti utilizzando siringhe gas-tight o, al fine di ottenere un campionamento più omogeneo, siringhe da 20 ml modificate con parafilm ed inserite, dopo il campionamento e fino al momento dell'iniezione nel cromatografo, all'interno di tappi in gomma per garantirne la tenuta al gas.

La miscelazione del contenuto dei reattori è stata effettuata, al fine di garantire l'uniformità delle condizioni all'interno, mediante sistemi di agitazione magnetica nel caso delle prove eseguite sulle miscele a minor contenuto in solidi, e mediante agitazione manuale ogni 3 ore, e comunque sempre prima di ogni prelievo del digestato, nel caso delle miscele per le quali l'elevato contenuto in solidi non consentiva l'impiego di sistemi automatici.

queste condizioni fino a che le condizioni esterne non ritornano favorevoli.

Onde consentire una maggiore omogeneità all'interno dei reattori di digestione, nella prova in batch con controllo automatico del pH si è provveduto al miglioramento delle condizioni di miscelazione, ricorrendo ad una miscelazione meccanica a mezzo di un tumbler verticale. Ciò ha altresì consentito una più veloce ed uniforme dissoluzione dell'NaOH utilizzata come agente titolante, garantendo un più accurato controllo del pH del sistema di digestione.

Il prelievo del digestato dai reattori di digestione è stato effettuato con frequenza pari a circa 4 ore mediante una pinza di Hoffman posta sulla tubazione di uscita dai reattori stessi. Ad ogni campionamento è stato prelevato un volume di digestato pari a circa 10 ml, il quale è stato successivamente sottoposto a caratterizzazione analitica per la determinazione del pH e delle concentrazioni di solidi totali, solidi totali volatili ed acidi grassi volatili.

### 1.1.2 Prove in semi-continuo

Le prove in semicontinuo sono state effettuate allo scopo di valutare la stabilità del processo di produzione di bioidrogeno in condizioni di funzionamento prolungato del sistema. Data la scala ridotta dei sistemi di digestione anaerobica impiegati nella sperimentazione, non sarebbero risultate applicabili modalità di alimentazione dei reattori in continuo, per cui si è scelto di adottare una configurazione di funzionamento in semi-continuo.

Le unità principali costituenti la postazione sperimentale sono state in tal caso:

- bagno termostatico in plexiglas coibentato, atto a mantenere condizioni di temperatura in campo mesofilo;
- reattori in pirex<sup>®</sup> da 1000 ml, usati come digestori a miscelazione continua funzionanti in semicontinuo;
- eudiometri da 3 l per lo stoccaggio e la misurazione del biogas prodotto
- elettrodo di pH Hanna HI 1090
- amplificatore di segnale Hanna HI 98143
- hardware di acquisizione dati National Instrument CompactDAQ
- pompa peristaltica Mysui GMS-PS8
- software Labview versione 8.6

Rispetto alle prove in batch, l'esecuzione di quelle in semi-continuo ha previsto un significativo miglioramento della configurazione del sistema, che in particolare è consistito nell'automatizzazione del sistema di controllo, regolazione e registrazione di alcuni parametri operativi quali il pH e il volume di soluzione titolante, nonché nella realizzazione di un sistema di agitazione meccanica della miscela interno al reattore di digestione al fine di garantire l'omogeneità delle condizioni nel reattore stesso prevenendo al contempo possibili difficoltà legate alla mancanza di tenuta al gas.

Nella configurazione ottimizzata, i reattori in vetro pirex<sup>®</sup>, di forma cilindrica e volume pari a 100 ml, sono stati forniti di due uscite alla base per l'alimentazione e il campionamento del digestato ed una superiore collegata attraverso tubi in tygon<sup>®</sup> agli eudiometri per la misura del volume di biogas prodotto. Il volume degli eudiometri è stato incrementato per tali prove a 3 l, al fine di garantire un sufficiente volume di stoccaggio del gas prodotto, che, a seguito dell'individuazione di migliori valori dei parametri operativi del processo di digestione e della maggiore stabilità dello stesso

conseguente all'accresciuta affidabilità dell'apparato sperimentale, nonché dei maggiori quantitativi di miscela sottoposti a digestione, risultava significativamente superiore rispetto alle precedenti prove batch.

La tenuta al gas del sistema è stata assicurata tramite l'impiego di quattro barre di acciaio filettate che comprimevano – attraverso un coperchio posto sulla sommità del reattore – uno strato di guttaperca sul bordo dello stesso.

Il sistema di agitazione meccanica della miscela all'interno del reattore era costituito da un motore elettrico a spazzole e due barre di alluminio facenti funzione di elica, alloggiato all'interno del reattore su di un supporto in plexiglas.

La sonda di pH ed il tubo dosatore della soluzione di NaOH sono stati inseriti attraverso un foro praticato nel coperchio del reattore, che si è provveduto successivamente a sigillare accuratamente al fine di evitare possibili fughe di biogas.

Il sistema di controllo automatico del pH durante le prove di digestione ha previsto l'utilizzo di una serie di componenti per l'acquisizione, la trasmissione, la trasformazione in digitale e il processamento del segnale di corrente misurato dall'elettrodo di misura del pH per il trasferimento del comando al sistema di correzione del pH.

Per l'acquisizione e la trasmissione del segnale di corrente rilevato dall'elettrodo di pH è stato impiegato un amplificatore di segnale in grado di trasmettere in uscita un segnale di intensità 4-20 mA, proporzionale al segnale in ingresso ma indipendente da variazioni del carico. Tale segnale è stato trasferito al sistema di elaborazione dati mediante hardware di acquisizione dati National Instrument CompactDAQ, composto da uno chassis con connettività USB 2.0 e da moduli input/output (I/O) che consentono la conversione analogico/digitale e digitale/analogico dei dati.

Il processamento dei dati acquisiti è stato effettuato mediante software LabVIEW (**L**aboratory **V**irtual **I**nstrumentation **E**ngineering **W**orkbench) versione 8.6, diffusamente impiegato per scopi sia scientifici che industriali per la programmazione grafica di sistemi di misura e automazione.

Il sistema di controllo del pH è stato messo a punto tramite l'integrazione di diversi moduli all'interno del software LabVIEW, specificamente implementati allo scopo e costituiti da:

- modulo di taratura del pH sulla base dell'intensità del segnale di corrente inviato dal sistema di misura e amplificazione e acquisito mediante il CompactDAQ
- modulo per la registrazione su file dei valori di pH misurati (1 valore/6 min)
- modulo per l'automazione delle operazioni di regolazione del pH in retroazione negativa proporzionale-integrativo-derivativo (PID) utilizzato per l'automazione del sistema di dosaggio della soluzione titolante di NaOH
- modulo per la registrazione su file dei volumi di soluzione titolante dosati (4 valori/s)

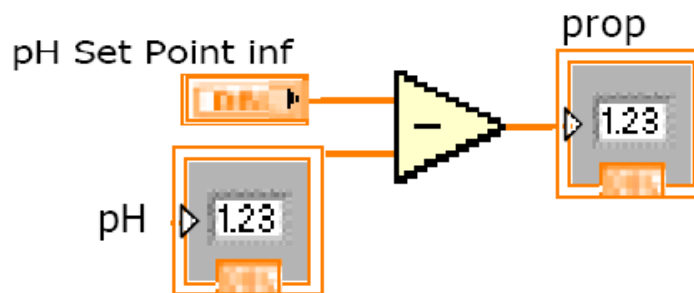
Il sistema di controllo è stato implementato in maniera da acquisire in ingresso il valore istantaneo di pH misurato e confrontarlo con il valore di set point assegnato. In base alla differenza istantanea fra tali valori, definita come funzione di scarto nel tempo  $e(t)$ , il sistema di regolazione PID agisce assegnando un valore specifico alla corrente generata nei moduli I/O per definire la velocità di rotazione di una pompa dosatrice, mantenendo in tal modo il pH al valore desiderato. La pompa dosatrice impiegata è una pompa peristaltica specifica per acidi e basi, gestita da un microcontrollore a portata regolabile nell'intervallo 0-0.75 l/h proporzionalmente ad un segnale di controllo 4-20 mA.

Il sistema di regolazione PID è costituito essenzialmente da una funzione di tre diversi contributi in parallelo, rappresentati da un blocco di tipo proporzionale (un semplice *gain*), uno di tipo derivativo (un derivatore) e uno di tipo integrale (integratore). Nel dominio del tempo il controllo è rappresentato da una funzione del tipo:

$$C(t) = k_p \cdot e(t) + k_d \cdot \frac{de(t)}{dt} + k_i \cdot \int_0^t e(\tau) d\tau$$

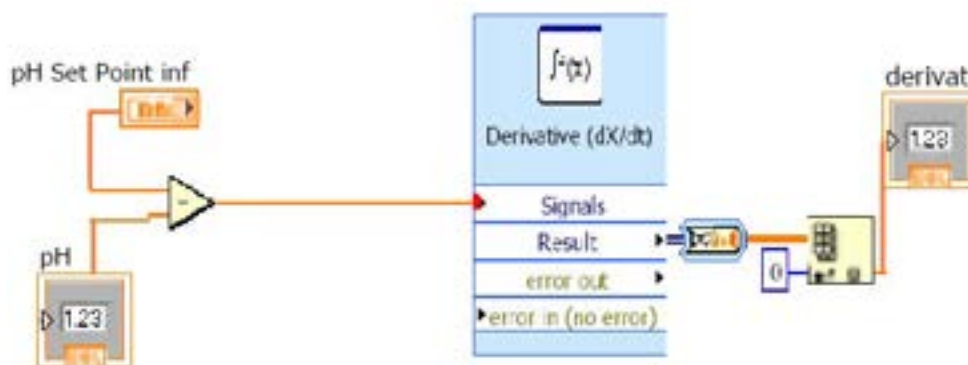
con  $k_p$ ,  $k_d$  e  $k_i$  coefficienti moltiplicativi rispettivamente dei termini proporzionale, derivativo e integrale, dipendenti dalle caratteristiche del sistema e determinabili per via empirica.

Nel linguaggio G, il linguaggio di programmazione di LabVIEW, i tre termini che compaiono nell'equazione precedente sono stati implementati come di seguito descritto. Il blocco proporzionale rappresenta il contributo del segnale in uscita proporzionale allo scarto all'istante considerato (cfr. Figura 3).



**Figura 3 – Modulo del sistema di regolazione relativo al controllo proporzionale**

Il blocco derivativo rappresenta il contributo del segnale proporzionale alla variazione istantanea dello scarto nel tempo (cfr. Figura 4). Quest'ultimo può costituire un termine positivo o negativo, a seconda che lo scarto tenda ad aumentare o a diminuire nel tempo. La presenza del termine derivativo consente dunque di ridurre l'intensità del segnale in uscita dal blocco di controllo PID nel caso in cui il sistema tenda ad avvicinarsi al valore di set point prefissato, riducendo dunque in tal caso il dosaggio di titolante richiesto.



**Figura 4 – Modulo del sistema di regolazione relativo al controllo derivativo**

Il blocco integrale rappresenta infine il contributo al segnale in uscita proporzionale all'integrale dello scarto nel tempo (cfr. Figura 5).

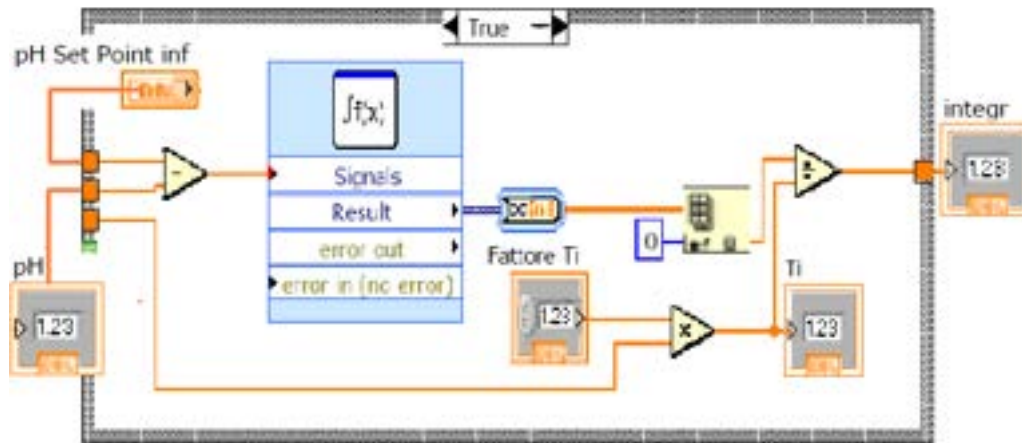


Figura 5 – Modulo del sistema di regolazione relativo al controllo integrale

Il segnale di corrente in uscita viene ottenuto come somma dei tre contributi proporzionale, derivativo e integrale, ciascuno moltiplicato per il rispettivo coefficiente  $k_p$ ,  $k_d$  e  $k_i$ , che permette di attribuire ad essi un peso differente a seconda delle caratteristiche specifiche del sistema considerato (*tuning*) (cfr. Figura 6).

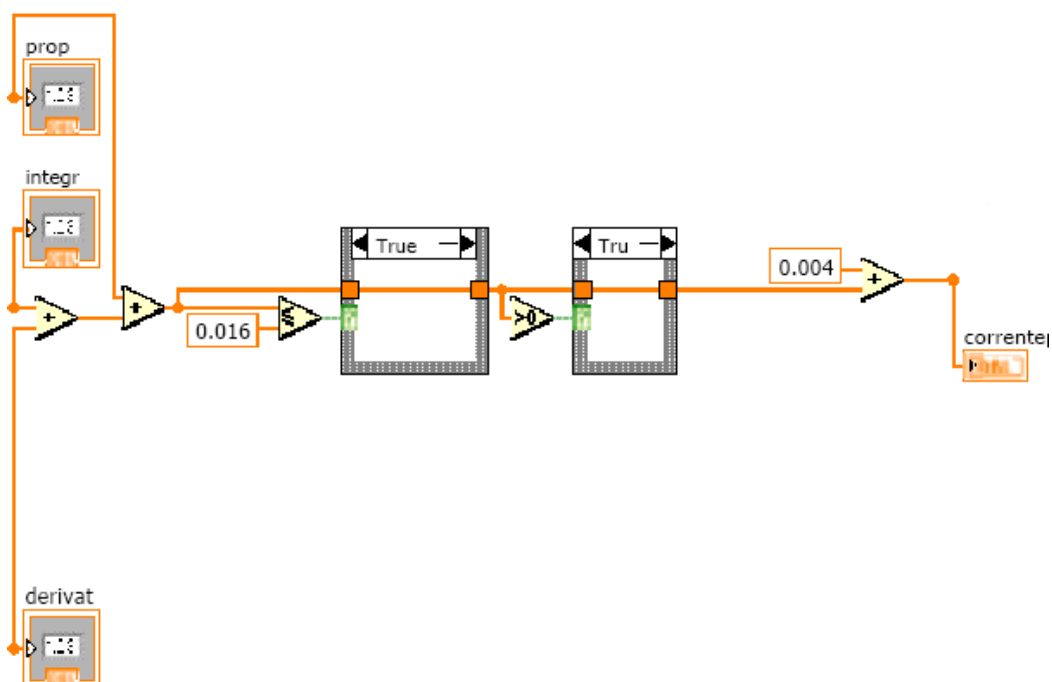


Figura 6 – Modulo del sistema di regolazione relativo alla combinazione dei moduli proporzionale, derivativo e integrale

Il valore della temperatura scelto per le prove in semicontinuo è stato quello di  $39 \pm 2^\circ\text{C}$ .  
 Il fango aerobico impiegato come inoculo è stato sottoposto anche in questo caso ad ispessimento per gravità per 24 ore e pretrattamento termico a  $110^\circ\text{C}$  per 30 minuti allo scopo di selezionare la biomassa idrogenogenica,  
 Il materiale sottoposto alle prove di digestione in semi-continuo era costituito da FORSU avente la medesima composizione e concentrazione in secco utilizzate nelle precedenti prove in batch.

Esclusivamente all'inizio della prova in semi-continuo si è provveduto a effettuare un inoculo con fango aerobico nelle medesime proporzioni (rispettivamente 45 e 55% in peso) utilizzate nelle precedenti prove in batch, al fine di garantire l'instaurarsi della biomassa necessaria per il processo di digestione anaerobica. Le maggiori volumetrie dei reattori di digestione impiegati per le prove in semi-continuo hanno consentito di incrementare il volume della miscela al valore di 600 ml, garantendo in tal modo una maggiore rappresentatività dei risultati sperimentali grazie alla possibilità di campionare quantitativi maggiori di materiale da sottoporre alle successive determinazioni analitiche.

Per quanto riguarda il tempo di residenza cellulare relativo alle prove in semi-continuo, considerando che dalle precedenti prove in batch risultava una durata del periodo di produzione di idrogeno pari a 48 ore, si è provveduto ad alimentare con cadenza giornaliera un volume di miscela pari al 50% di quello presente nel reattore.

## 1.2 Metodi analitici

Nel seguito verrà fornito il dettaglio delle principali metodiche analitiche utilizzate nel corso della sperimentazione e verranno descritte le caratteristiche tecniche e le condizioni operative delle apparecchiature analitiche impiegate.

### 1.2.1 Solidi totali

I solidi totali rappresentano il residuo secco ottenuto in seguito all'evaporazione a  $105 \pm 5$  °C di un campione fino a costanza di peso.

La determinazione del contenuto di solidi totali è stata effettuata sia sul materiale di partenza che sul digestato per diversi tempi di digestione.

La procedura seguita consiste nel pesare un contenitore di ceramica, preventivamente posto in stufa a 105 °C per 30 minuti, e porre al suo interno circa 5 grammi di campione.

Una volta pesato il contenitore con il campione, questo è stato messo in una stufa a 105 °C sotto cappa. Dopo 24 ore si è provveduto alla determinazione del peso finale del campione dopo raffreddamento dello stesso all'interno di un essiccatore.

Il contenuto in solidi totali (ST) e l'umidità (U) sono stati espressi come percentuali in peso sul campione totale mediante le seguenti formule:

$$ST(\%) = \frac{P^{105^{\circ}C}}{P^{umido}} \times 100$$

$$U(\%) = 100 - ST(\%)$$

### 1.2.2 Solidi totali volatili

Dopo la determinazione del contenuto in solidi totali, il campione è stato posto in muffola a 550 °C per 2 ore, determinando per pesatura al termine di tale periodo le ceneri. Per differenza è stato ricavato il contenuto di solidi totali volatili, espresso come percentuale in peso sui solidi totali, a mezzo della seguente formula:

$$SVT(\%) = \frac{(P^{105^{\circ}C} - P^{550^{\circ}C})}{P^{105^{\circ}C}} \times 100$$

### 1.2.3 pH

Il pH è stato misurato utilizzando un elettrodo potenziometrico, preventivamente tarato con soluzioni standard a pH = 4 e pH = 7.

## 1.2.4 Acidi grassi volatili

La determinazione delle concentrazioni di acidi grassi volatili (volatile fatty acids, VFA) è stata condotta utilizzando un gascromatografo modello VARIAN 3600 CX dotato di una colonna capillare e di detector a ionizzazione di fiamma (FID).

La metodica analitica adottata ha previsto una temperatura iniziale della colonna pari a 140 °C, mantenuta per 8 minuti, seguita da una prima rampa di riscaldamento di 3 °C/min fino a 165 °C, e da una successiva rampa di riscaldamento di 30 °C/min fino a 230 °C; tale valore di temperatura è stato mantenuto per 3 minuti al fine di consentire il completo spurgo della colonna stessa.

L'apparecchiatura utilizza elio come gas carrier ad una pressione pari a 30 psi, con un flusso di 22 ml/sec, ed è collegata ad un generatore di idrogeno che alimenta la fiamma del FID.

Per la preparazione del campione sono stati utilizzati 10 ml di campione, preventivamente sottoposti a centrifugazione per 30 minuti. Dopo la centrifugazione sono stati prelevati tramite pipetta Pasteur 0.5 grammi di surnatante, i quali sono stati diluiti in 6 grammi di acqua ultrapura ed infine addizionati con 0.2 grammi di soluzione contenente clorofenolo, utilizzato come standard interno.

Nel gascromatografo è stato iniettato 1 µl della soluzione così ottenuta.

Gli acidi grassi volatili di cui è stata determinata analiticamente la concentrazione sono di seguito elencati:

- acido acetico
- acido propionico
- acido iso-butyrico
- acido butyrico
- acido iso-valerico
- acido valerico

Tali acidi sono stati misurati in quanto noti come quelli più comunemente presenti come prodotti del metabolismo fermentativo (Wang et al., 1999).

In Figura 7 è riportato un esempio di cromatogramma ottenuto per uno dei campioni sottoposti a determinazione analitica, mentre in Figura 8 sono rappresentate le curve di calibrazione utilizzate per la quantificazione delle concentrazioni dei diversi analiti.

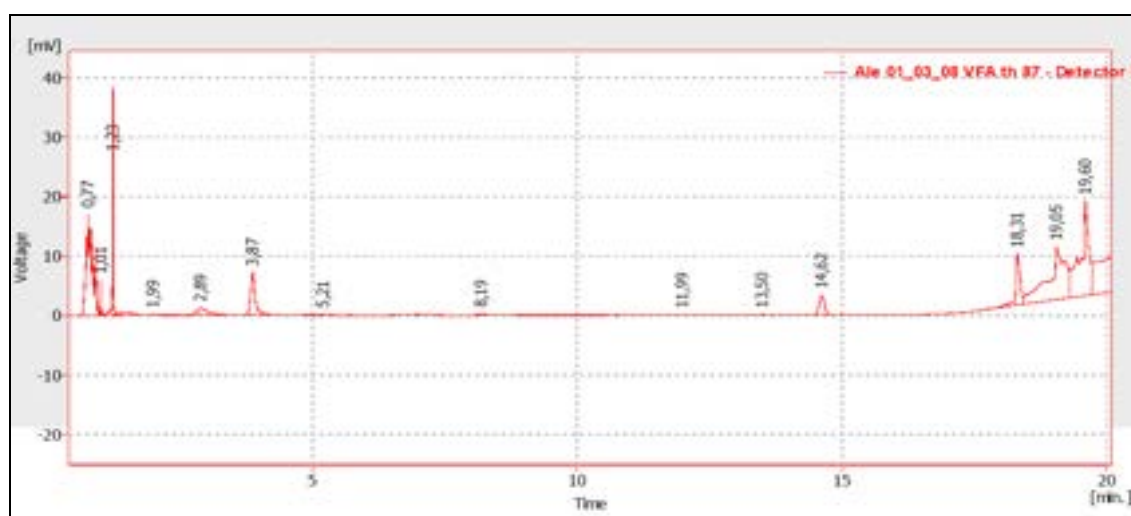


Figura 7 – Esempio di cromatogramma per la determinazione dei VFA

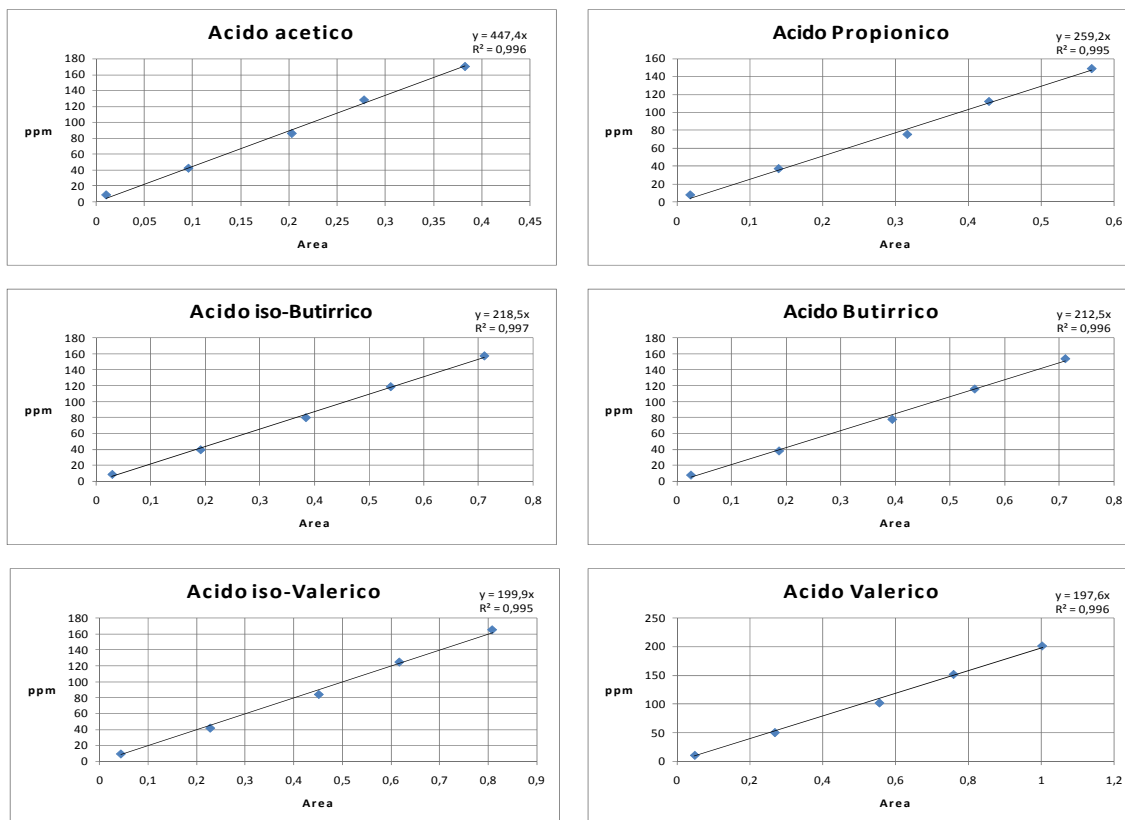


Figura 8 – Curve di calibrazione dei VFA

### 1.2.5 Costituenti del biogas

La composizione del biogas prodotto è stata determinata con lo stesso gascromatografo usato per gli acidi grassi volatili, che è munito di una seconda colonna impaccata, collegata ad un detector a termoconduttività elettrica (TCD), idonea alla separazione di:

- idrogeno
- ossigeno
- azoto
- monossido di carbonio
- metano
- anidride carbonica.

La metodica usata per la determinazione della composizione del biogas ha previsto una temperatura iniziale della colonna pari a 80 °C, mantenuta per 2 minuti, seguita da una rampa di riscaldamento di 2.5 °C/min fino ad una temperatura di 100 °C, mantenuta per 5 minuti.

Non è stato necessario prelevare un volume di campione esatto, in quanto il gascromatografo è munito di un loop automatico che estrae esattamente 25 µl dal gas iniettato.

La determinazione delle concentrazioni dei costituenti del biogas, che si è verificato essere esclusivamente H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, è stata effettuata mediante le curve di calibrazione riportate in Figura 9 e in Figura 10.

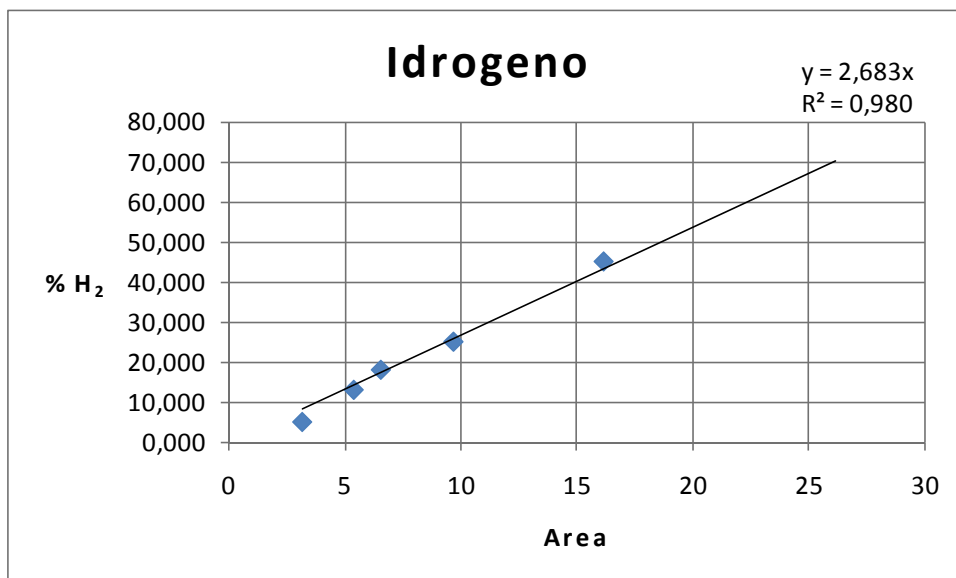


Figura 9 – Curva di calibrazione dell'H<sub>2</sub>

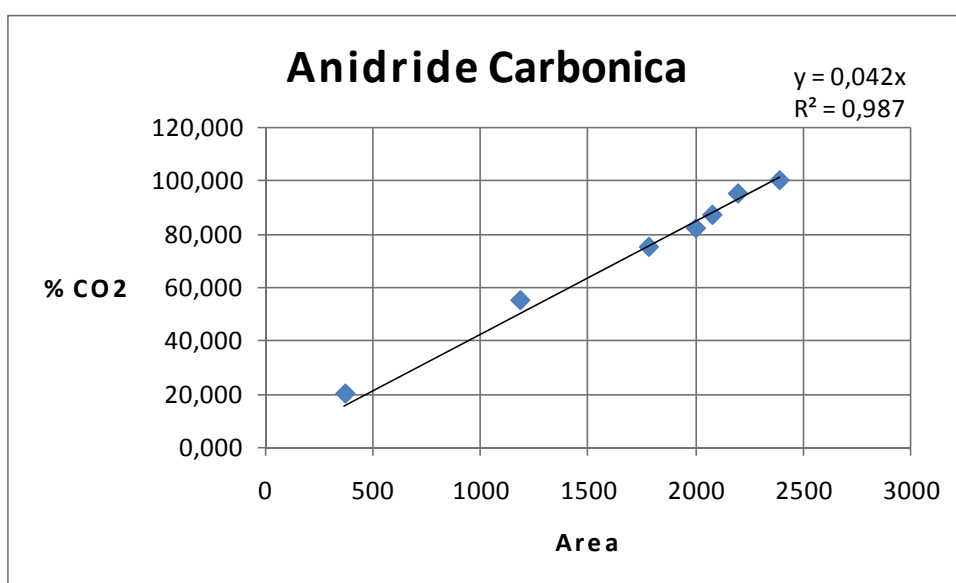
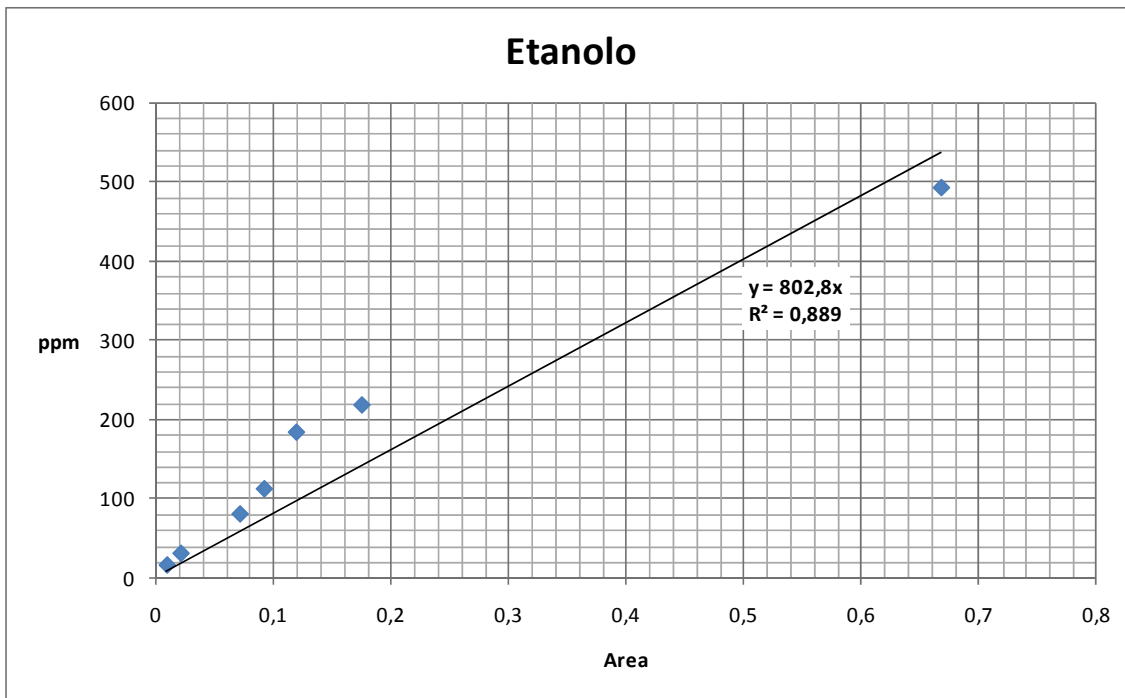


Figura 10 – Curva di calibrazione della CO<sub>2</sub>

### 1.2.6 Etanolo

Durante alcune delle prove sperimentali è stata riscontrata una produzione di etanolo crescente con il tempo di digestione. È stato pertanto ritenuto opportuno quantificare tale produzione, utilizzando anche in questo caso determinazioni analitiche gascromatografiche.

La curva di calibrazione ottenuta in tal caso è riportata in Figura 11.



**Figura 11 – Curva di calibrazione dell’etanolo**

### 1.2.7 Proteine

La concentrazione delle proteine nella fase liquida è stata ricavata per differenza fra le concentrazioni dell’azoto totale e ammoniacale ottenute tramite determinazioni spettrofotometriche delle soluzioni preparate utilizzando kit di analisi dedicati.

### 1.2.8 Grassi

Le concentrazioni delle sostanze oleose nella fase liquida è stata ricavata acidificando ed estraendo il campione in esame con una miscela contenente n-esano (80%) e metil-tert-butiletere (20%). L’estratto, raccolto in un recipiente ed evaporato, fornisce un residuo che è stato determinato per via gravimetrica.

### 1.2.9 Carboidrati

La concentrazione dei carboidrati è stata determinata attraverso il metodo fenol-solfonico di Dubois et al. (1958). Il campione, al quale viene aggiunta una soluzione di fenolo 5%, viene acidificato con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrato. La concentrazione dei carboidrati nella soluzione così ottenuta viene poi determinata mediante misure spettrofotometriche ad una lunghezza d’onda di 488 nm.

### 1.2.10 Descrizione matematica del processo di produzione del biogas

I dati sperimentali relativi ai volumi cumulati di biogas prodotto misurato durante il corso delle prove sperimentali in batch sono stati elaborati utilizzando l'equazione di Gompertz modificata, la quale ha consentito di descrivere la cinetica del processo di digestione anaerobica valutando le rese di produzione del biogas:

$$H = P \exp \left\{ - \exp \left[ \frac{R_m * e}{P} * (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$$

dove  $H$  è la produzione cumulata di idrogeno,  $\lambda$  è il tempo di acclimatazione,  $P$  è il potenziale di produzione di biogas,  $R_m$  è il tasso massimo di produzione di biogas,  $t$  il tempo di digestione, ed  $e$  la base neperiana (= 2.718).

## Capitolo 2

### 2 Risultati e discussione

#### 2.1 Digestione del refluo da suinicoltura

È noto che le condizioni di pH instaurate all'interno del sistema di digestione risultano in grado di influenzare in maniera significativa le rese di produzione di  $H_2$ , determinando la natura dei percorsi metabolici propri della biomassa anaerobica. I risultati degli studi sperimentali fino ad oggi condotti hanno tuttavia mostrato come la dipendenza della produzione di  $H_2$  dalle condizioni di pH del sistema risulti a sua volta funzione del tipo di substrato da degradare e delle caratteristiche specifiche della biomassa operante la digestione anaerobica, e sia dunque strettamente dipendente dalle condizioni del particolare processo di digestione considerato. Per tale ragione, si è ritenuto opportuno valutare l'influenza esercitata dal pH sulle rese del processo di degradazione anaerobica nelle condizioni sperimentali di interesse, ovverosia nel caso di substrato costituito da refluo da suinicoltura. Alla luce di quanto emerso dalla analisi dettagliata della letteratura di settore e in particolare dei risultati ottenuti utilizzando substrati simili al refluo da suinicoltura, si è deciso di effettuare una campagna sperimentale che permettesse di valutare l'influenza di diverse condizioni iniziali di pH del sistema. A tal fine, questo è stato controllato ai seguenti valori: pH = 4.5, 5.5, 7 e 8 unità.

La caratterizzazione del substrato è stata eseguita secondo le procedure standard utilizzate per le acque reflue (IRSA – CNR), in accordo a quanto descritto nel capitolo precedente.

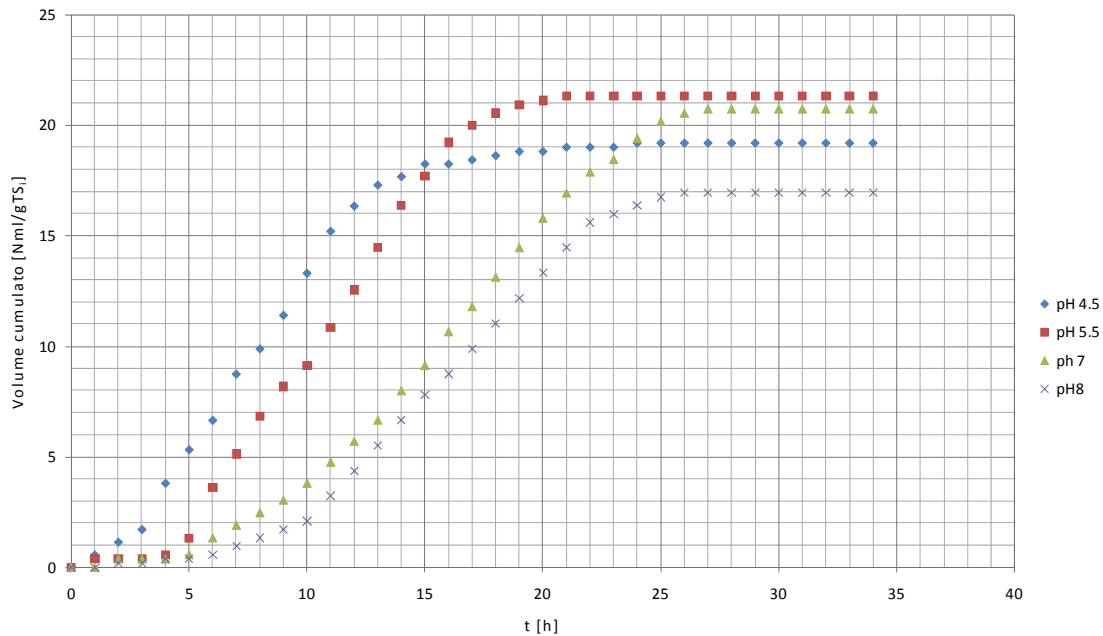
La miscela da sottoporre a digestione possiede un pH naturale pressoché neutro ed esibisce una capacità tampone particolarmente elevata.

Tabella 2 – Caratterizzazione del refluo da suinicoltura

Parametro	Valore
COD (mg/l)	54900
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/l)	800
Solidi totali, TS (% peso)	4.4
Solidi volatili totali, SVT (% TS)	80.8
pH	7.10

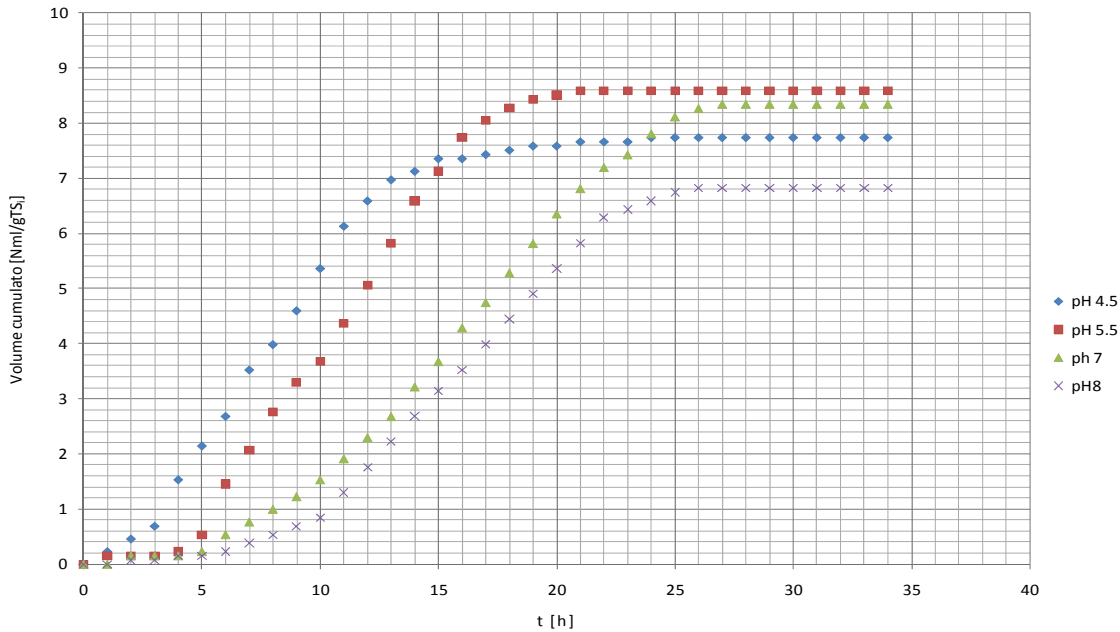
### 2.1.1 Produzione di biogas

In Figura 12 e seguenti si riportano gli andamenti della produzione cumulata di biogas, rapportata alla concentrazione iniziale di ST ( $\text{Nml/gST}_i$ ), al variare delle condizioni iniziali di pH. Gli andamenti riportati rappresentano la media dei risultati ottenuti dalla esecuzione in doppio delle prove di digestione.



**Figura 12 - Produzione cumulata di biogas in funzione del pH iniziale delle miscele (refluo da suinicoltura)**

Le curve rappresentanti la produzione cumulata di  $\text{H}_2$  (espressa in  $\text{Nml/gST}_i$ ), ottenute a partire dalla produzione di biogas e dalla concentrazione misurata di  $\text{H}_2$  nello stesso, sono riportate in Figura 13.

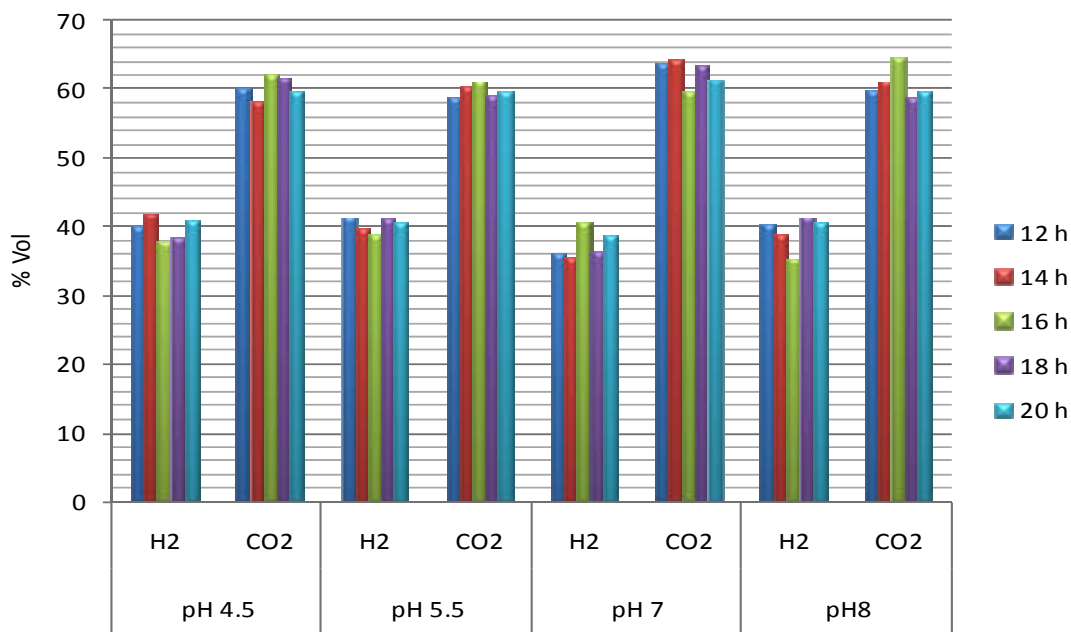


**Figura 13 – Produzione di H<sub>2</sub> in funzione del pH iniziale delle miscele (refluo da suinicoltura)**

Si può notare che ai fini delle rese di produzione di H<sub>2</sub>, il valore ottimale del pH iniziale risulta pari a 5.5 unità.

La produzione di H<sub>2</sub>, inoltre, diminuisce circa del 20% all'aumentare del pH dal valore ottimale pari a 5.5 unità al valore 8.

Se si fa riferimento alla concentrazione di H<sub>2</sub> nel biogas, si osserva che essa risulta pressoché indipendente sia dal tempo che dalle diverse condizioni iniziali di pH analizzate, così come mostrato in Figura 14.



**Figura 14 – Composizione del biogas nel corso delle diverse prove di digestione (refluo da suinicoltura)**

## 2.1.2 Analisi della cinetica di produzione del biogas

Sulla base dei risultati dell'interpolazione effettuata utilizzando l'equazione di Gompertz modificata (Figura 15), sono stati ricavati i parametri  $P_s$ ,  $R_m$  e  $\lambda$ , della curva teorica interpolante al variare delle condizioni iniziali di pH, i quali sono riportati in Tabella 3.

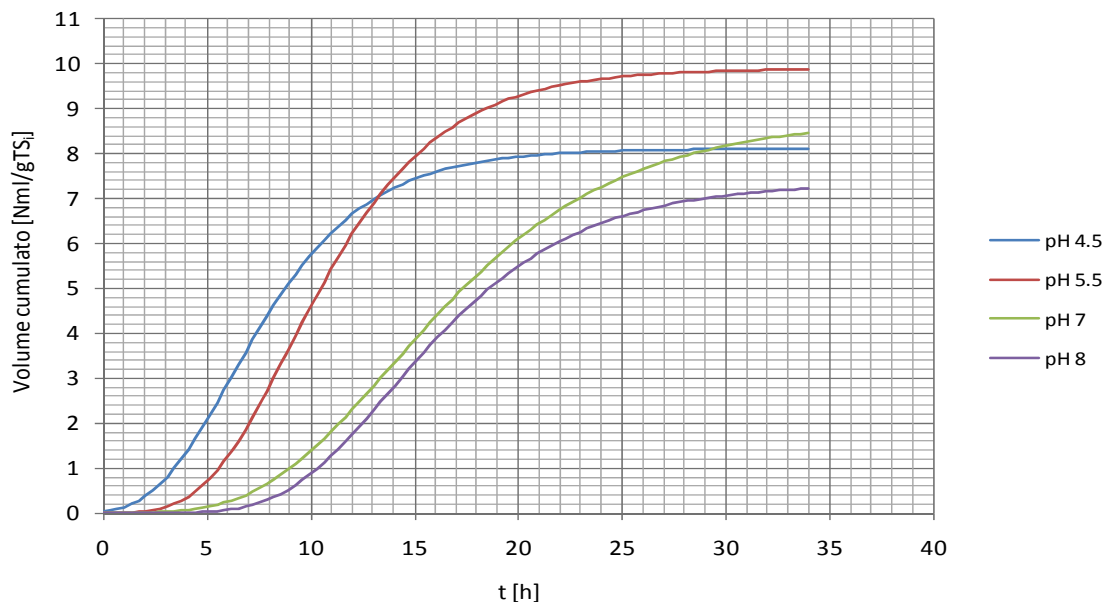


Figura 15 – Produzione di H<sub>2</sub> ottenuta applicando l'equazione di Gompertz modificata (refluo da suinicoltura)

Tabella 3 – Parametri dell'equazione di Gompertz al variare delle condizioni di pH (refluo da suinicoltura)

	pH 4.5	pH 5.5	pH 7	pH 8
<b>P<sub>s</sub> (NmL)</b>	8.11	9.89	8.79	7.36
<b>R<sub>m</sub> (NmL/h)</b>	0.48	0.50	0.32	0.32
<b>λ(h)</b>	2.49	4.91	7.67	8.82

È possibile notare come la prova condotta a pH pari a 4.5 unità, seppur caratterizzata da un valore di massima produzione del biogas,  $P_s$ , inferiore a quello della prova a pH 5.5, risulti comunque caratterizzata da un tempo di acclimatazione dei microrganismi,  $\lambda$ , inferiore a quello osservato nella prova corrispondente a condizioni iniziali di pH pari a 5.5 unità.

Un risultato di siffatto genere è spiegabile considerando che per raggiungere il valore di pH pari a 4.5 unità è stato necessario aggiungere quantità più elevate di acido, il che ha probabilmente favorito il processo di idrolisi chimica rispetto alle altre prove. Il processo di idrolisi ha però anche dato luogo al conseguente rapido accumulo di VFA nel sistema, così come evidente laddove si consideri la riduzione dei valori di pH misurati nel corso della prova e attestati ben al di sotto del valore pari a 4.5 unità. Un siffatto accumulo ha probabilmente sfavorito l'avvio delle successive fasi del processo di digestione anaerobica operata dalla comunità di microrganismi, ostacolando di fatto

il processo di conversione del substrato in idrogeno, con una produzione finale che risulta addirittura inferiore a quella della prova condotta in condizioni di pH pari a 7 unità. Del resto, anche gli altri valori dei parametri sembrano confermare una siffatta ipotesi.

Nelle figure seguenti si riporta l'andamento dei parametri stimati attraverso l'applicazione del modello di Gompertz al variare delle condizioni di pH instauratesi nel sistema. Come si vede, il parametro  $P_s$  assume il valore massimo per valori di pH compresi nell'intervallo 5 - 6, mentre il parametro  $\lambda$  sembra crescere quasi linearmente con il pH, ciò a confermare ancora una volta il duplice effetto della stimolazione del processo di idrolisi acida nel caso di substrato da suinocoltura. Per quanto attiene al parametro che esprime la velocità massima di produzione di  $H_2$ ,  $R_m$ , la relazione tra il valore che esso assume e le condizioni di pH appare ancora una volta confermare l'effetto dell'idrolisi chimica.

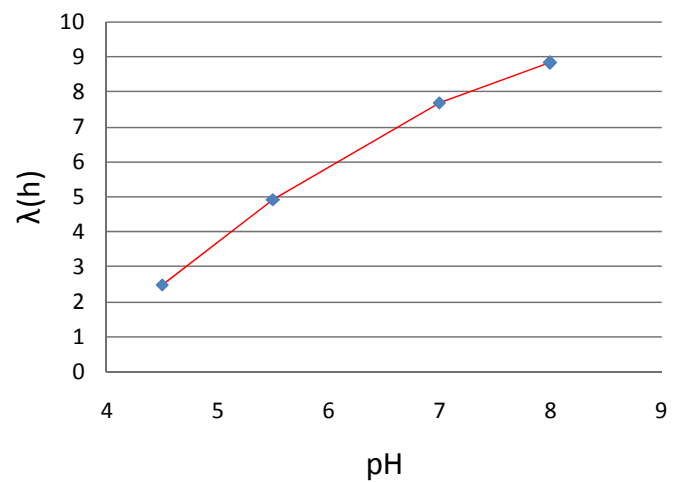
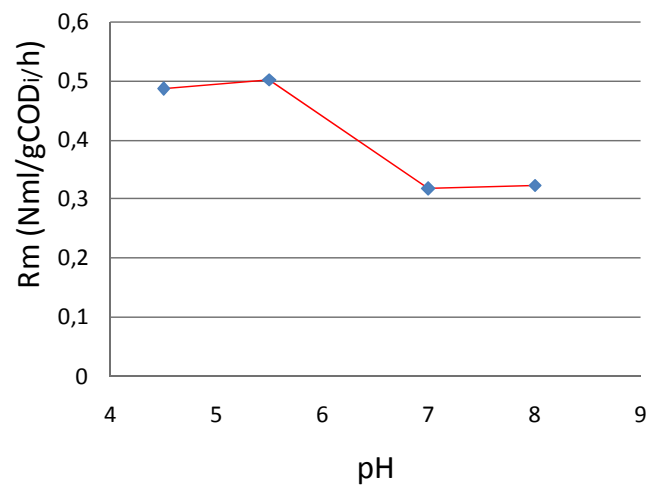
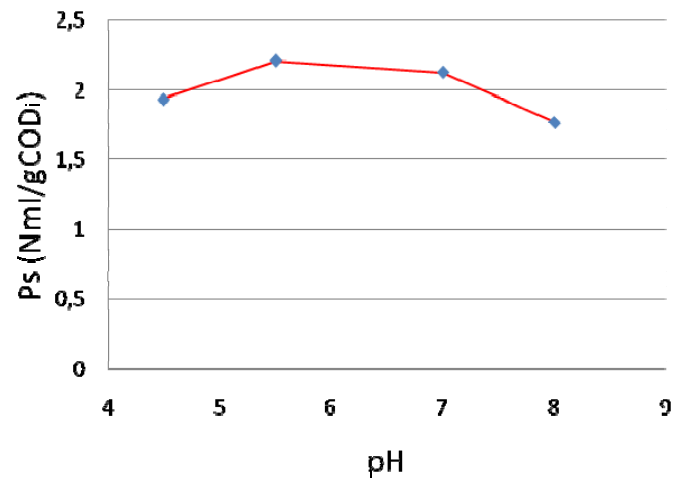


Figura 16 – Andamento dei parametri caratteristici dell'equazione di Gompertz al variare delle condizioni iniziali di pH (refluo da suinicoltura)

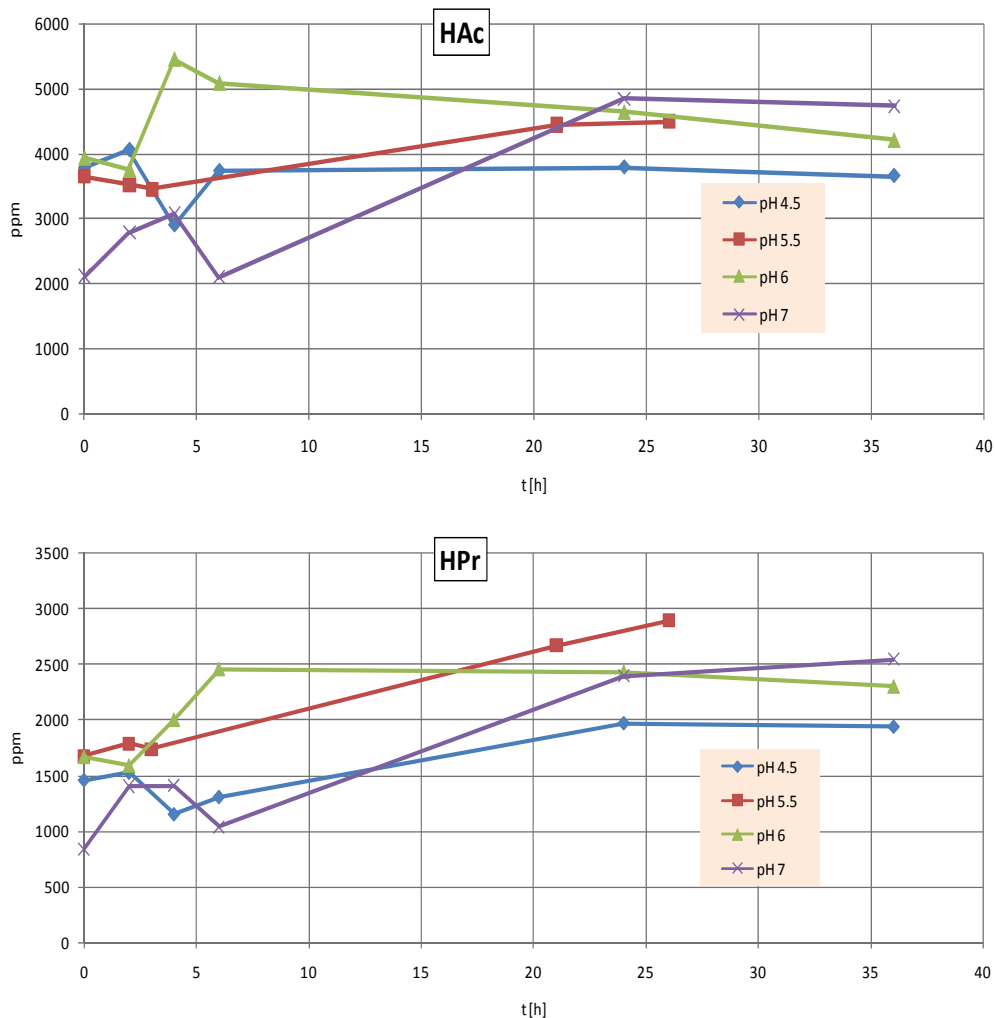
### 2.1.3 Evoluzione dei VFA

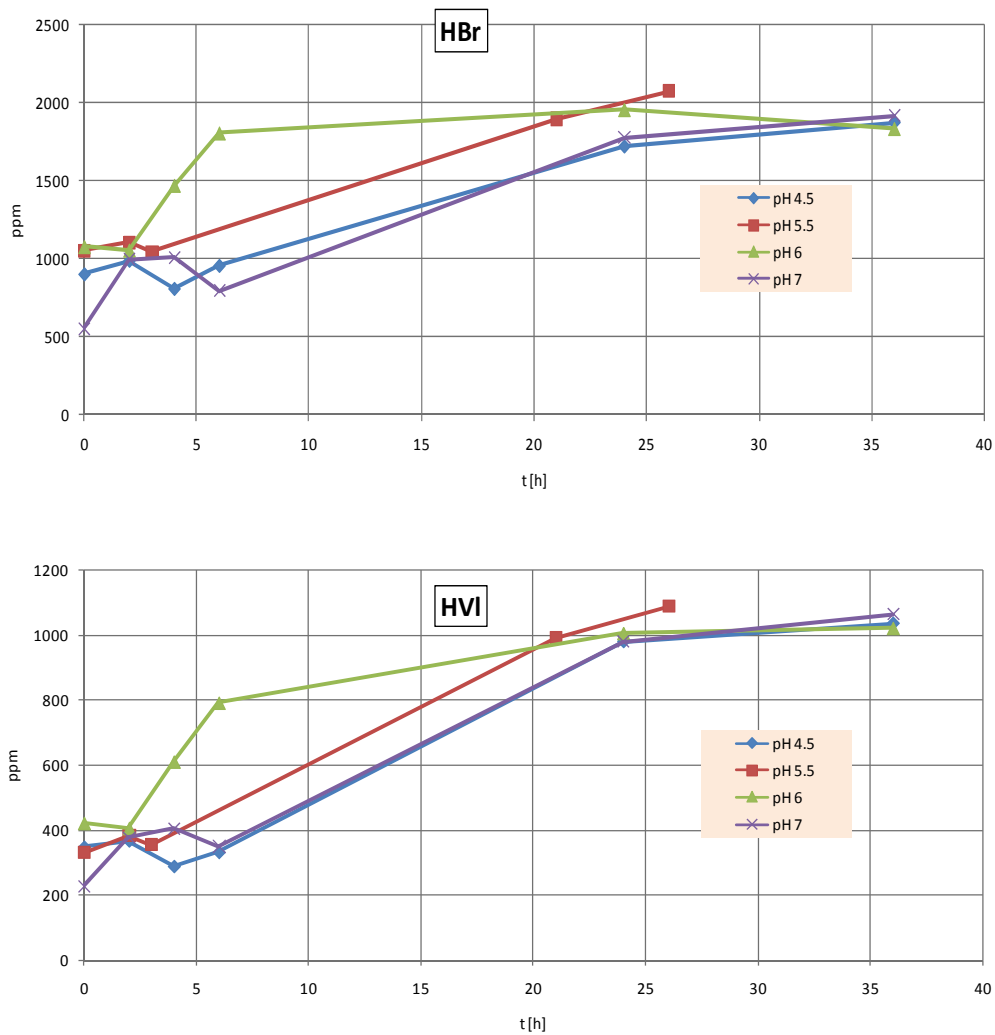
L'analisi dell'andamento dei VFA, come già considerato nei capitoli precedenti, rappresenta un parametro fondamentale per la comprensione e il monitoraggio del processo di digestione anaerobica.

Non deve stupire il fatto che i VFA siano già presenti in alte concentrazioni nel refluo da suinicoltura tal quale, poiché va considerato che tale substrato ha già subito una serie di processi metabolici nell'organismo dell'animale che hanno portato alla conseguente produzione di VFA.

Occorre comunque osservare che nelle prove caratterizzate da condizioni iniziali di pH = 4.5 unità, così come in quelle condotte a pH iniziale pari a 5.5, la concentrazione iniziale dei VFA in corrispondenza del tempo iniziale  $t_0$  risulta diversa, e in particolare modo superiore, a quella riscontrata nelle prove caratterizzate da pH iniziale pari a 7 e 8 unità, rispettivamente. Ciò è spiegabile considerando la possibilità che all'interno del sistema si siano innescati fenomeni di idrolisi conseguenti all'aggiunta della soluzione acida, essendo proprio la quantità di acido aggiunto l'unica differenza tra le diverse prove batch.

I risultati ottenuti vengono riportati nei grafici successivi di Figura 17.





**Figura 17 - Concentrazione dei VFA nella miscela al variare delle condizioni iniziali di pH (refluo da suinicoltura)**

L'acido acetico risulta presente in concentrazione maggiore, seguito dall'acido propionico e dall'acido butirrico.

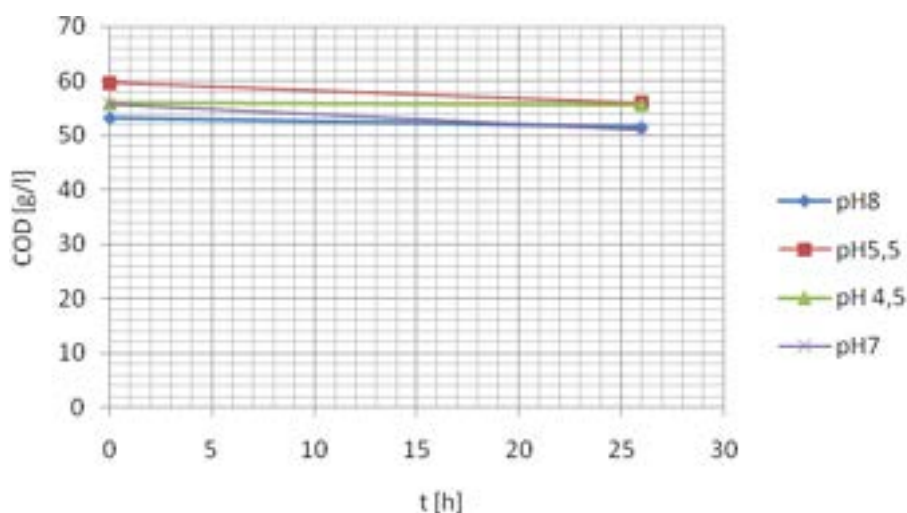
L'acido valerico, di contro, risulta presente in concentrazione alquanto modesta in tutte le prove eseguite.

### 2.1.4 Rimozione del COD

È stata di fatto riscontrata un'esigua rimozione del COD, conseguenza della bassa produzione di biogas.

Questo comportamento era comunque prevedibile poiché è noto che nei processi di digestione anaerobica di tipo convenzionale, l'abbattimento del COD avviene soprattutto durante la fase di metanogenesi, cui è associata la formazione di considerevoli quantità di CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>.

Nel grafico di Figura 18 vengono riportati gli andamenti della rimozione del COD.



**Figura 18 – Andamento della rimozione di COD (refluo da suinicoltura)**

L'efficienza di abbattimento del substrato organico carbonioso risulta essere prossima al 3%. Nella Tabella 4 vengono riportati i valori di COD in corrispondenza dell'istante iniziale della prova e al termine di questa.

**Tabella 4 – Concentrazione di COD all'inizio e al termine della prova di digestione e al variare delle condizioni iniziali di pH (refluo da suinicoltura)**

tempo h	COD (g/l)			
	pH 4.5	pH 5.5	pH 7	pH 8
0	55.1	58.7	54.2	54.6
26	57.9	57.4	51.9	52.9

## 2.2 Digestione della FORSU

Il principale obiettivo di tale insieme di prove è consistito nell'ottimizzazione del processo di digestione anaerobica di un substrato complesso come la frazione organica di rifiuti urbani (FORSU), che ha permesso di individuare i parametri operativi fondamentali per conseguire l'incremento della produzione di bioidrogeno.

I substrati utilizzati in questa parte della campagna sperimentale sono stati:

- FORSU ricostituita in laboratorio;
- acque di vegetazione, residuo della molitura delle olive, provenienti dall'azienda "Beata Solitudo" di Palombara Sabina;
- fango aerobico dell'impianto di trattamento delle acque reflue di Roma Nord.

Le acque di vegetazione ed il fango aerobico sono stati scelti sia per ottenere una prima regolazione del pH della miscela iniziale, sia per garantire il necessario apporto di specie batteriche che hanno una comprovata capacità di produzione di idrogeno.

Infatti, per quanto riguarda le acque di vegetazione, vengono studiate per ottenere idrogeno sfruttando batteri fotosintetici (Eroglu et al., 2004); per quanto riguarda invece l'inoculo, esperienze più remote (Ueno et al., 1994) hanno dimostrato che in condizioni anaerobiche il fango aerobico produce un biogas più ricco di idrogeno rispetto a quello prodotto da un fango anaerobico. Ciò è dovuto alla scarsa presenza di batteri metanigeni nel fango aerobico, che sono batteri anaerobi obbligati e dominanti rispetto agli idrogeno-produttori.

Per garantire l'assenza di biomassa metanigena nel fango utilizzato, visto che questa non è in grado di resistere alle alte temperature, al contrario dei *Clostridia*, è stato effettuato un pretrattamento termico a 110 °C del fango stesso. Tale procedura si è rivelata valida, in quanto in tutte le prove effettuate non è mai stata riscontrata la presenza di metano.

La sperimentazione che ha avuto per oggetto la FORSU è stata articolata in diverse fasi:

- Inizialmente è stata eseguita la caratterizzazione del substrato, che consiste in una serie di determinazioni analitiche necessarie per assicurarsi l'idoneità dei substrati al processo di digestione anaerobica. Principalmente sono stati analizzati il contenuto di umidità, solidi totali (ST), solidi volatili (SVT) e ceneri, per poter ipotizzare i quantitativi dei diversi substrati da utilizzare nelle prove senza correre il rischio di produrre un sovraccarico del sistema. Inoltre è stato monitorato il pH di ogni substrato al fine di migliorare la resa in funzione di questo parametro.
- Una serie di prove preliminari ha consentito di determinare il periodo di acclimatazione della biomassa ai substrati forniti e di fissare successivamente la concentrazione delle acque di vegetazione nella miscela iniziale al 10% in peso del totale.
- Nella prima fase di sperimentazione vera e propria, sono state effettuate prove di digestione anaerobica di tipo convenzionale in batch su miscele formate da diverse percentuali in peso di FORSU ed inoculo. Nello specifico, sono stati investigati il contenuto in SVT, la produzione di biogas, ed il pH, parametri necessari per comprendere le cinetiche di degradazione del processo; sono quindi stati messi a confronto i diversi valori trovati per capire quale fosse il rapporto di miscelazione che garantisse una produzione maggiore di idrogeno. Dall'elaborazione dei risultati ottenuti sono stati quindi dedotti i valori dei parametri operativi necessari per la progettazione di un sistema di digestione anaerobica in semicontinuo.
- È stata inoltre studiata la possibilità di non trattare termicamente l'inoculo, opzione che, ovviamente, migliorerebbe l'efficienza energetica complessiva del processo.
- Si è poi deciso di indagare le rese di produzione a pH controllato in continuo al valore di 5.5 unità in condizioni di batch perché si è constatato, sia da studi di letteratura sia durante le sperimentazioni precedenti, che l'eccessivo accumulo di acidi grassi e di conseguenza i valori di pH estremamente bassi assunti dalla miscela durante la fermentazione hanno sfavorito i metabolismi idrogenogenici.

- È stata condotta un'ulteriore prova con un metodo di condizionamento della miscela attraverso l'aggiunta di Mg metallico. Lo scopo di tale trattamento di condizionamento risulta ancora quello di impedire lo shift metabolico che si registra per valori di pH prossimi a 4.5 e fornire un contributo aggiuntivo di natura chimica alla produzione di idrogeno per via biologica.
- Sono state condotte prove in semi-continuo nelle condizioni sperimentali individuate dai precedenti test in batch, al fine di valutare la stabilità del processo nel caso di funzionamento prolungato, individuando eventuali problematiche di natura operativa e gestionale in vista di un successivo scale-up del sistema di digestione.

La FORSU è stata ricostituita, in base a dati di letteratura, al fine di ottenere la seguente composizione: 25% pasta e riso, 35% verdura, 20% frutta, 10% pane e 10% carne.

Tutte le prove sono state condotte in doppio, o in triplo. Nella Tabella 5 vengono riportate le caratteristiche dei diversi substrati indagati.

**Tabella 5 – Caratterizzazione dei substrati utilizzati**

	<b>FORSU</b>	<b>Acque di vegetazione</b>	<b>Inoculo</b>
<b>Solidi totali, TS [% in peso]</b>	25.1	3.7	2.6
<b>Solidi totali volatili, SVT [% TS]</b>	97.6	86.8	46.2
<b>Densità [kg/l]</b>	0.8 <sup>3</sup>	1	1
<b>pH</b>	5.5	5.5	7

### 2.2.1 Primo set di prove

La prima serie di prove di digestione anaerobica in batch è stata impostata per investigare la biodegradabilità della miscela dei substrati in funzione dei diversi rapporti in peso tra i costituenti.

Durante la digestione anaerobica in campo mesofilo, garantito da un bagno termostatico regolato sulla temperatura di 35 °C, sono state effettuate le seguenti analisi: controllo pH, temperatura, solidi totali e volatili, volume e concentrazione del gas sviluppato.

Inizialmente le prove sono state eseguite utilizzando la seguente composizione della miscela iniziale:

- 70% FORSU
- 10% acque di vegetazione
- 20% inoculo

Dopo la miscelazione dei tre substrati, è stato sempre misurato il valore iniziale di pH con apposita sonda.

---

<sup>3</sup> La densità della FORSU risente del pretrattamento di riduzione dimensionale, che arricchisce il materiale di minute bolle d'aria.

La composizione utilizzata in questo set di prove non ha reso necessaria alcuna correzione di acidità, poiché sono sempre stati misurati valori di pH pari a  $5.5 \pm 0.1$ .

La flora batterica ha manifestato un tempo di acclimatazione di circa 6 ore, seguito da una fase di produzione di biogas molto rapida, della durata di circa 12 ore. Dunque, la durata di ogni singola prova è stata di circa 18 ore, tuttavia si è ritenuto opportuno prolungarle fino a raggiungere almeno 36 ore di residenza, al fine di ottenere più informazioni possibili sul metabolismo batterico.

Le prove B1, B2 e B3, si riferiscono alla stessa prova condotta in triplo. Si può notare la congruenza degli andamenti sia della produzione cumulata di biogas, che delle concentrazioni di idrogeno all'interno dello stesso.

Già da questa prima serie di prove si può osservare come la zona utile di maggior produzione di idrogeno si collochi tra le 6 e le 12 ore dall'inizio della digestione.

Spingendosi a tempi di ritenzione maggiori si è riscontrato un incremento del volume di biogas prodotto, ma un andamento opposto per quanto attiene alla concentrazione di idrogeno. Il biogas prodotto per tempi di residenza superiori alle 12 ore è composto quasi esclusivamente da  $\text{CO}_2$ .

Grazie ad un approfondimento condotto consultando la letteratura disponibile al riguardo, è stato possibile attribuire questo cambiamento nella produzione di biogas ad uno shift metabolico, che ha luogo quando il pH nei reattori scende al di sotto di 4.5, ciò a conferma di quanto osservato anche nel caso di refluo da suinicoltura (cfr. Paragrafo 2.1). Tale valore di pH determina il passaggio dalla fermentazione butirrica alla fermentazione alcolica (che secondo alcuni studi [Lay, 2000; Cheong e Hansen, 2006] avviene a pH compresi tra 4.5 e 5) o, in caso di carenza di ferro, alla fermentazione di tipo misto. Il passaggio alla fermentazione alcolica è stato dimostrato anche dalla presenza di notevoli concentrazioni di etanolo nel digestato.

Si ipotizza anche la concomitante presenza di una fermentazione lattica, poiché in alcuni casi l'aggiunta di una soluzione nutriente contenente ferro e magnesio, ha consentito il ripristinarsi della produzione. Tuttavia non è stato possibile individuare la presenza di acido lattico nel digestato con il tipo di colonna montato nel gascromatografo utilizzato. Di seguito si riportano i grafici relativi alla produzione di biogas.

Un ulteriore effetto del pH che si ritiene possa avere un ruolo sul processo di produzione biologica di  $\text{H}_2$  è rappresentato dalla sua influenza sugli equilibri di dissociazione degli acidi volatili. E' noto infatti (van Ginkel e Logan, 2005; Zheng e Yu, 2005) come la forma indissociata di tali acidi sia in grado di penetrare la membrana cellulare, dissociandosi successivamente all'interno della cellula a causa dei maggiori valori di pH ivi esistenti; i protoni rilasciati a seguito di tale dissociazione producono un disequilibrio nella forza motrice protonica incrementando così il consumo di energia da parte della cellula per mantenere invariato il pH interno, a discapito della crescita cellulare.

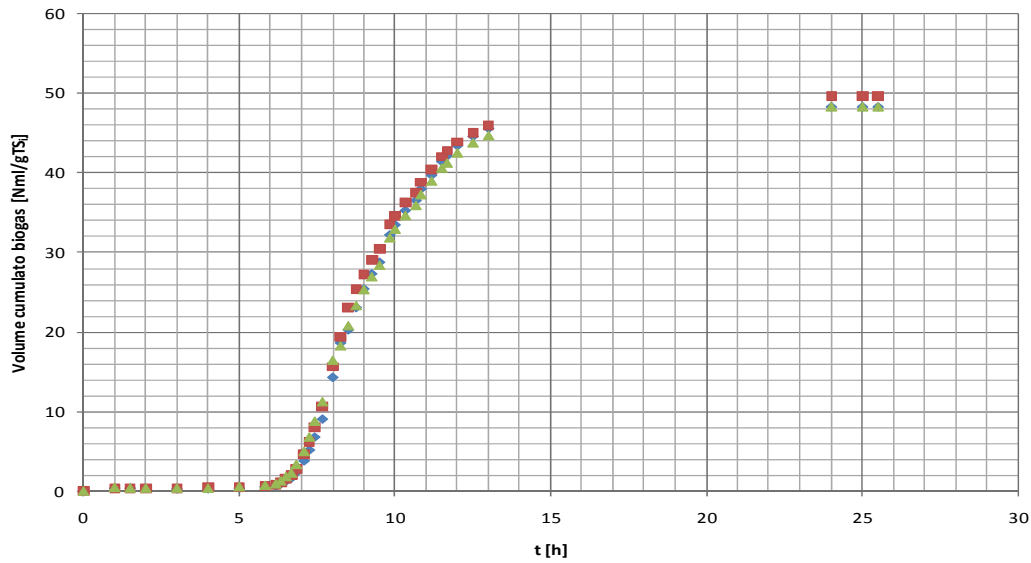


Figura 19 – Volume cumulo di biogas (FORSU)

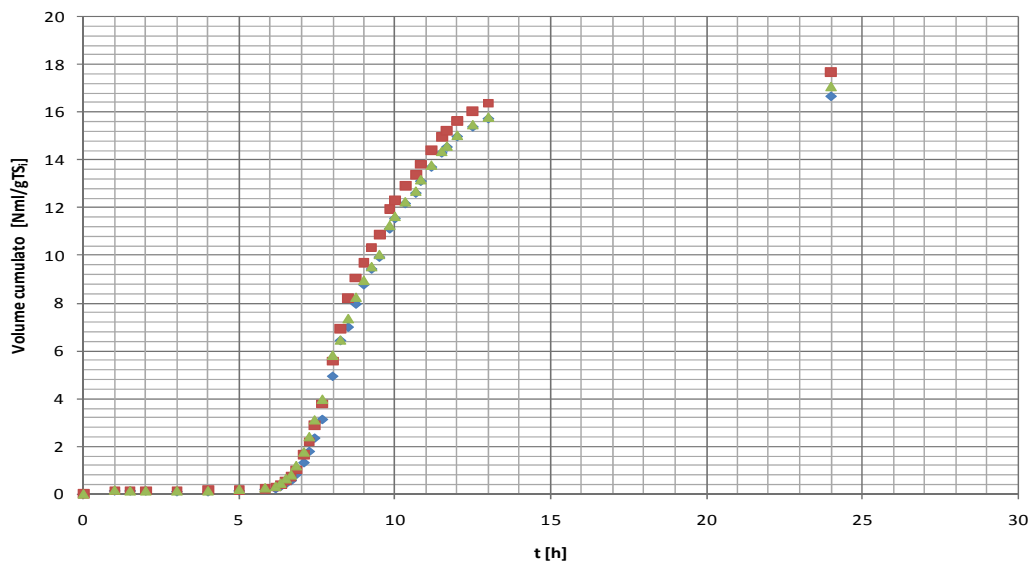
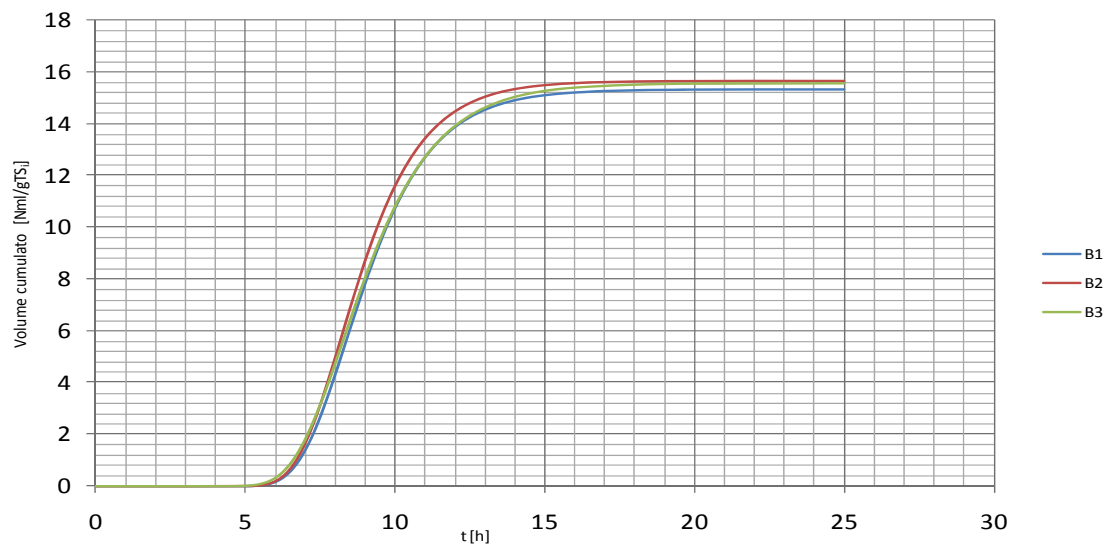


Figura 20 - Volume cumulo di H<sub>2</sub> (FORSU)

Dall'interpolazione è stato possibile ottenere la produzione cumulata di idrogeno, prendendo in considerazione la media delle concentrazioni misurate durante il periodo di maggiore attività.

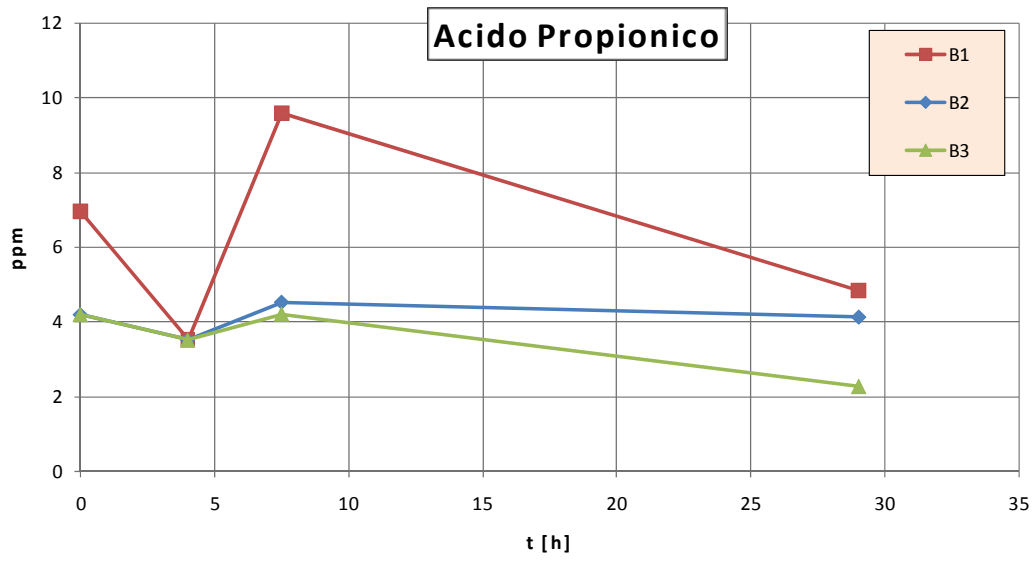
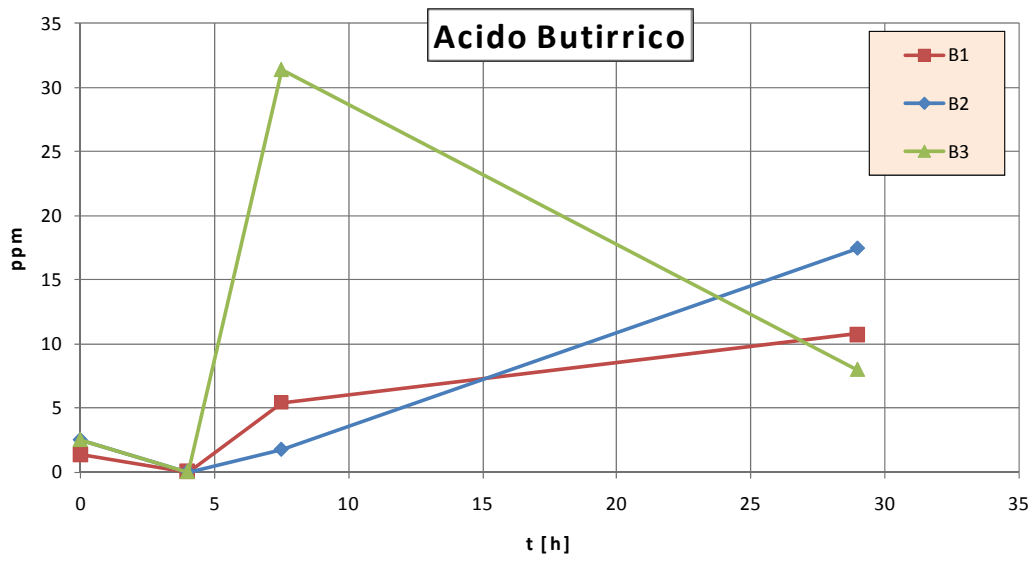
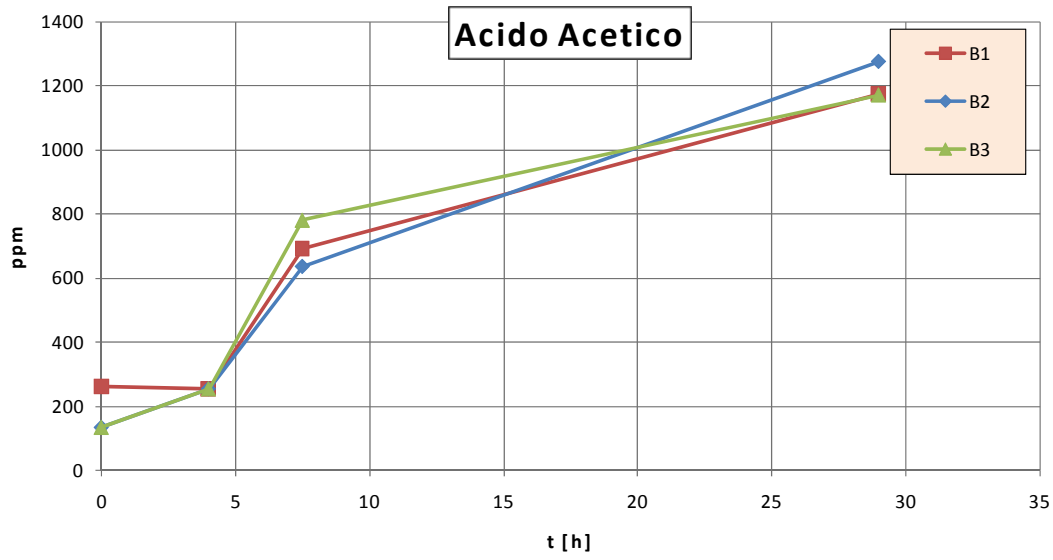


**Figura 21 – Andamento teorico del volume cumulado di idrogeno (FORSU)**

Periodicamente sono stati effettuati anche prelievi del digestato, dai quali è stato possibile effettuare le analisi per determinare gli acidi grassi volatili prodotti durante la digestione.

Quando possibile, è stata determinata anche la concentrazione di etanolo presente nel liquame.

Di seguito si riportano gli andamenti delle concentrazioni di VFA nel tempo per quanto riguarda le prove B1, B2 e B3.



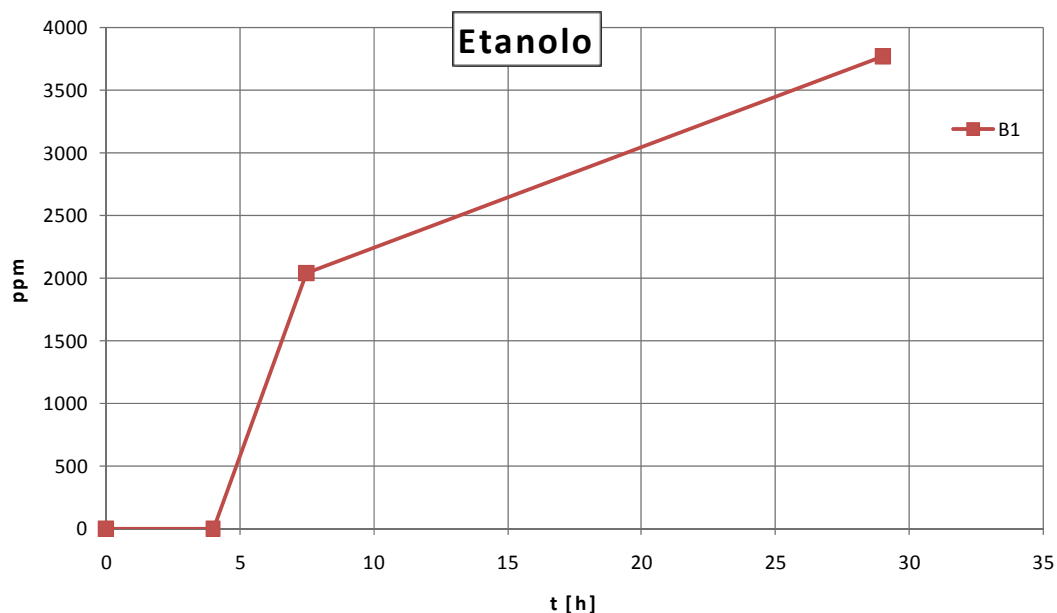
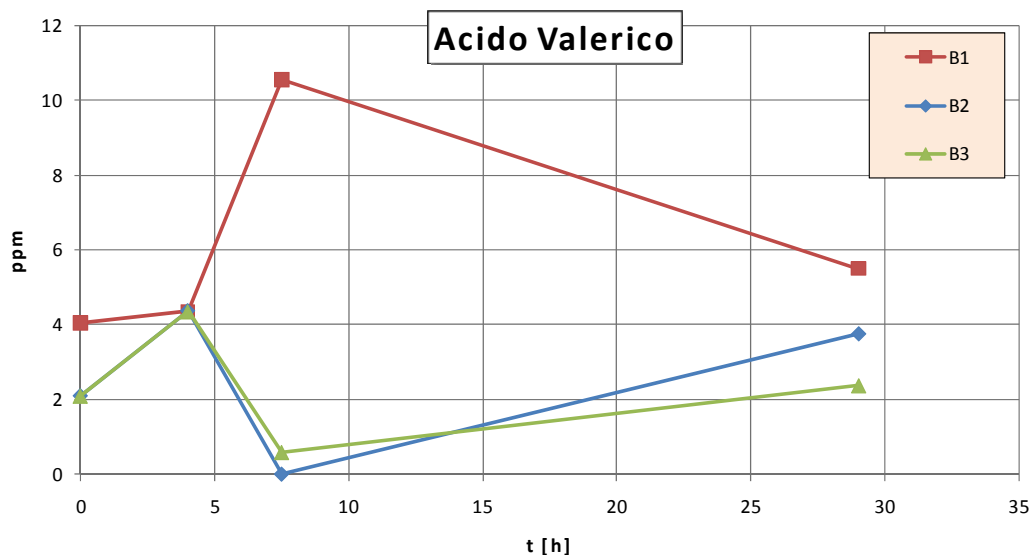


Figura 22 – Andamento degli acidi grassi volatili e dell’etanolo nelle prove B1, B2 e B3 (FORSU)

Per questa miscela è stata condotta, a qualche mese di distanza, un’altra prova in doppio (prove B4 e B5), utilizzando nuovo inoculo, per verificare l’influenza dell’età del fango sull’andamento della digestione.

Di seguito si riportano i grafici del volume cumulato di biogas e di idrogeno prodotto, l’andamento delle concentrazioni e del pH nel tempo e le interpolazioni effettuate applicando l’equazione di Gompertz.

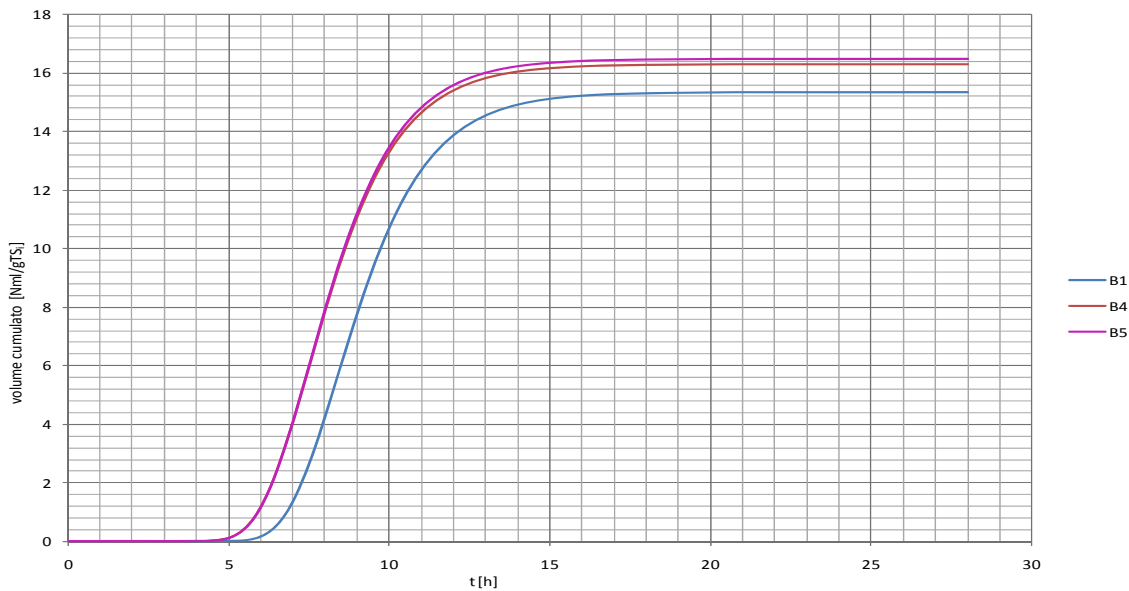
Tabella 6 – Andamento del pH nelle prove B4-B5 (FORSU)

$\theta_H$	pH	
	B4	B5
0	5.79	5.8
4	5.74	5.7
8	5.13	5.1

12	4.08	3.95
28	3.54	3.56

**Tabella 7 – Produzioni massime di biogas ed idrogeno in funzione delle concentrazioni di ST e SVT iniziali (FORSU)**

	<b>B1</b>	<b>B2</b>	<b>B3</b>	<b>B4</b>	<b>B5</b>
<b>Produzione totale biogas (Nml)</b>	2650	2616	2628	2984	3026
<b>Produzione totale H<sub>2</sub> (Nml)</b>	913	933	928	974	987
<b>Produzione totale specifica biogas (Nml/g ST)</b>	44.3	43.8	44.0	49.9	50.5
<b>Produzione totale specifica biogas (Nml/g SVT)</b>	46.4	45.8	46.1	52.3	52.9
<b>Produzione totale specifica H<sub>2</sub> (Nml/g ST)</b>	15.3	15.6	15.5	16.3	16.5
<b>Produzione totale specifica H<sub>2</sub> (Nml/g SVT)</b>	16.0	16.3	16.3	17.1	17.2



**Figura 23 – Produzione cumulata di biogas per fango conservato per tempi inferiori prima della prova di digestione (FORSU)**

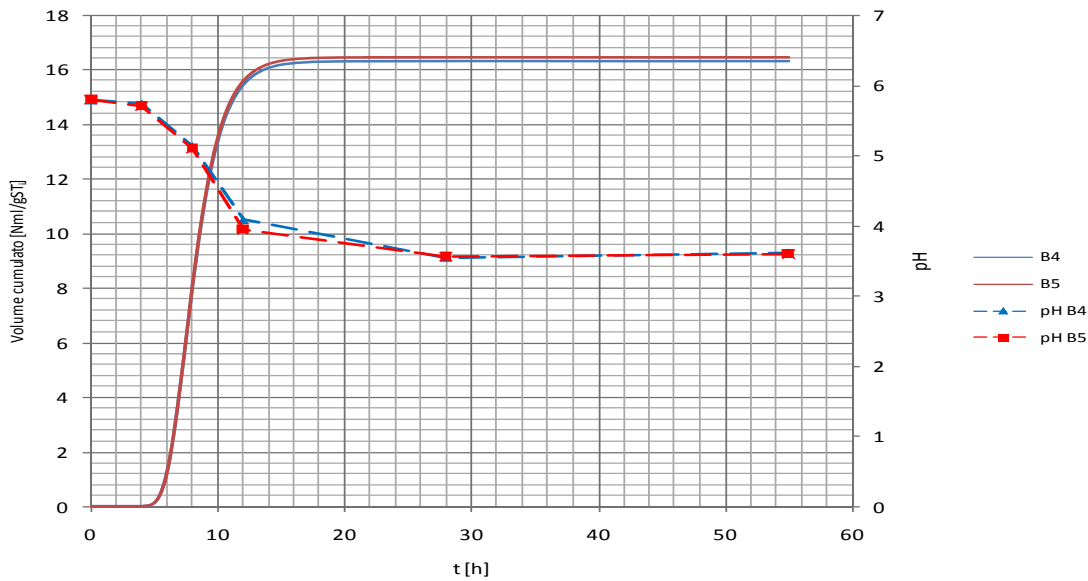


Figura 24 – Produzione di idrogeno ed andamento del pH nelle prove B4 e B5 (FORSU)

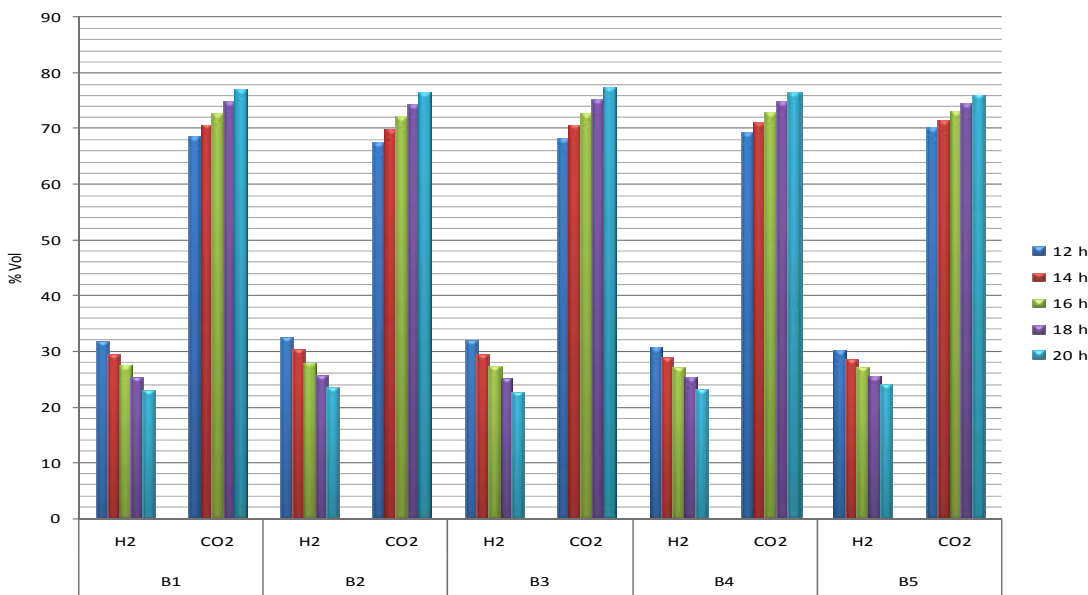


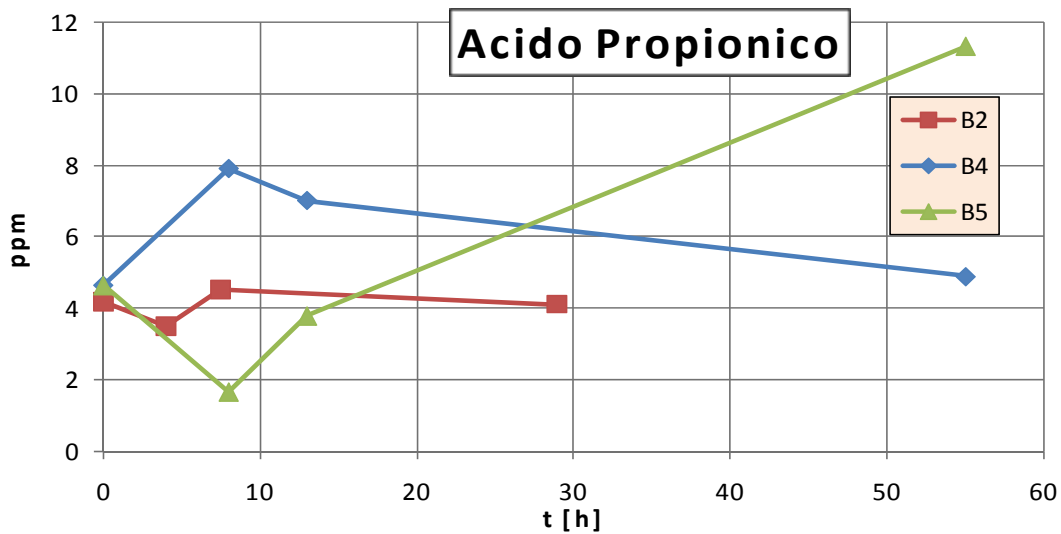
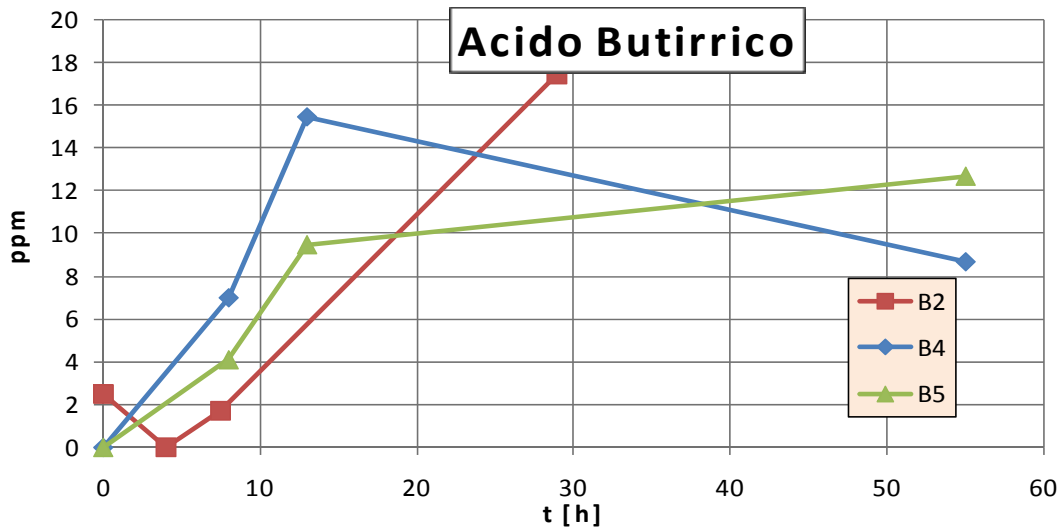
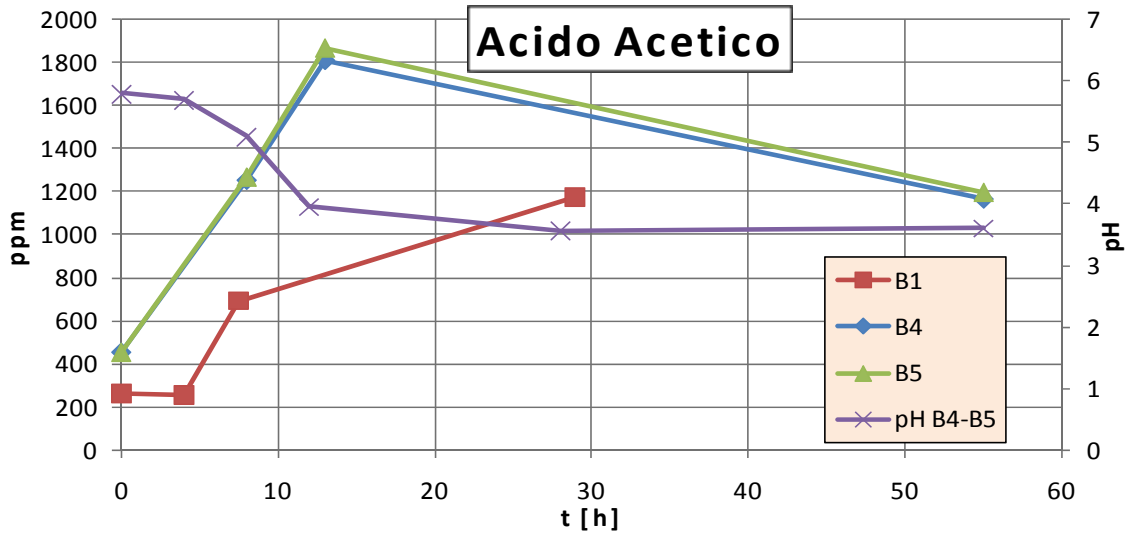
Figura 25 – Composizione del biogas nel corso delle diverse prove di digestione (FORSU)

Dal grafico di Figura 23 si può notare come l'uso di inoculo più fresco determini produzioni più elevate sia di biogas che di idrogeno. Si ritiene che questo effetto sia dovuto all'instaurarsi di condizioni anaerobiche all'interno del fango più vecchio, che inibiscono in parte lo sviluppo della biomassa idrogeno-produttrice.

Inoltre, risulta evidente come la produzione di idrogeno sia accoppiata allo sviluppo di VFA che rendono il liquame sempre più acido, riducendo il pH da 5.8 a 3.6 unità.

In particolare, gli acidi che vengono prodotti in maggiori quantità sono l'acido acetico e l'acido butirrico, a conferma del fatto che il tipo di fermentazione più favorevole allo sviluppo di idrogeno è la fermentazione butirrica. Tale aspetto è confermato anche dal confronto riportato in Figura 26, dalla quale si nota come, a fronte di una produzione maggiore di idrogeno, le prove B4 e B5, che si

differenziano dalle B1, B2 e B3 solo per l'inoculo utilizzato, sviluppino una quantità di acido acetico e butirrico più marcata.



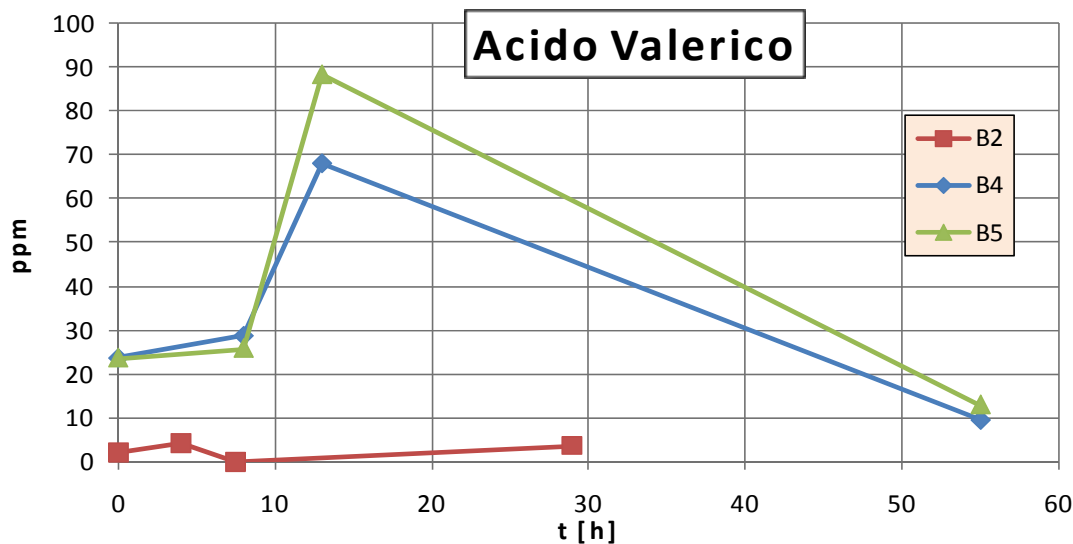


Figura 26 – Confronto della concentrazione di VFA prodotti nelle prove con vecchio e nuovo inoculo (FORSU)

### 2.2.2 Secondo set di prove

La seconda composizione studiata per le miscele contenenti FORSU è stata la seguente:

- 35% FORSU
- 10% acque di vegetazione
- 55% inoculo

Questa composizione, dato il più elevato contenuto di inoculo, ha richiesto una correzione del pH iniziale, che così è stato riportato dal valore 6 al valore 5.5, mediante aggiunta di alcune gocce di HCl.

In Figura 27 e in Figura 28 sono illustrati gli andamenti temporali della produzione di biogas totale e di H<sub>2</sub> ottenuti nel corso delle prove effettuate, che differivano esclusivamente per le caratteristiche dell'inoculo utilizzato, campionato presso il medesimo impianto di trattamento delle acque reflue ma in periodi diversi.

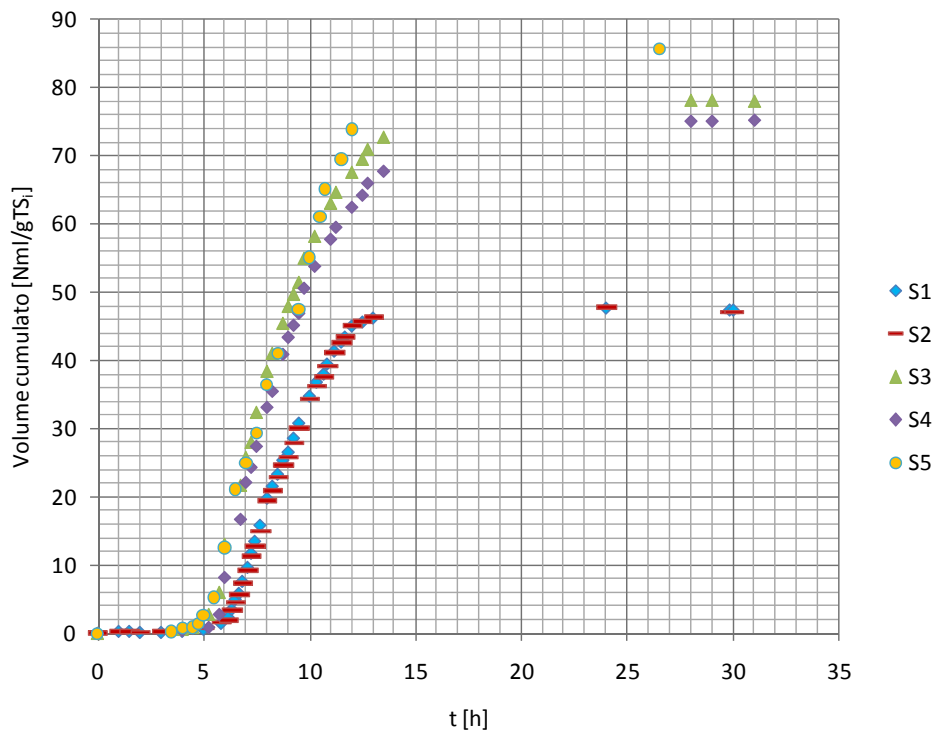


Figura 27 – Volume cumulado di biogas (FORSU)

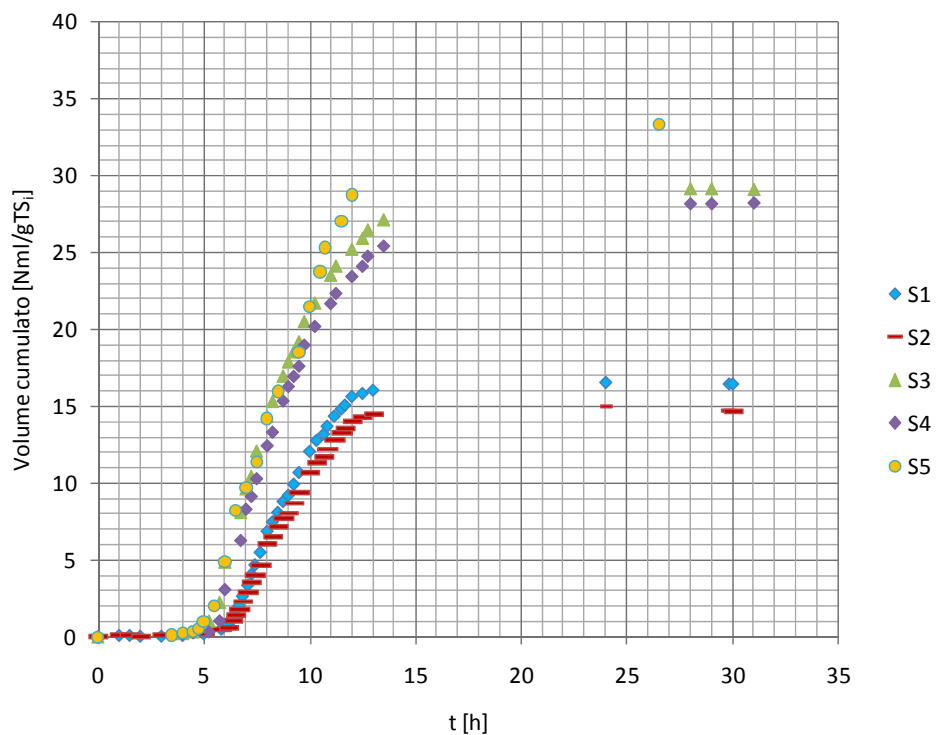
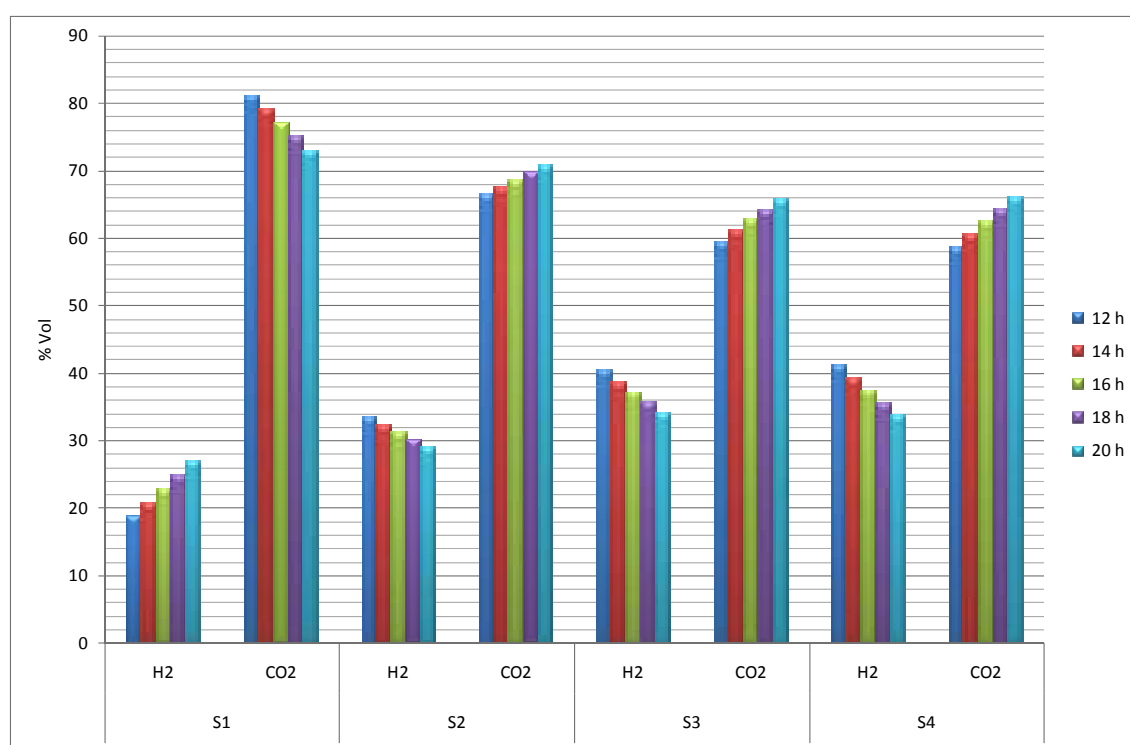


Figura 28 – Volume cumulado di H<sub>2</sub> (FORSU)

Anche per questo set di prove è ben visibile l'effetto dell'inoculo utilizzato, con un effetto positivo dell'inoculo più fresco (prove S3, S4 ed S5) rispetto a quello campionato in precedenza (prove S1 ed S2) sulla produzione complessiva di idrogeno. Tuttavia, è opportuno osservare come le differenze tra le produzioni di idrogeno misurate nelle prove S1 – S5 possano essere anche attribuite al fatto che, in assenza di un controllo accurato di parametri operativi quali il pH, l'andamento delle condizioni di processo è risultato piuttosto variabile da una prova all'altra e dunque scarsamente ripetibile. Ciò ha suggerito, per le successive prove, la necessità di indagare con maggiore dettaglio l'evoluzione del processo di digestione anaerobica in condizioni sperimentali più attentamente controllate.

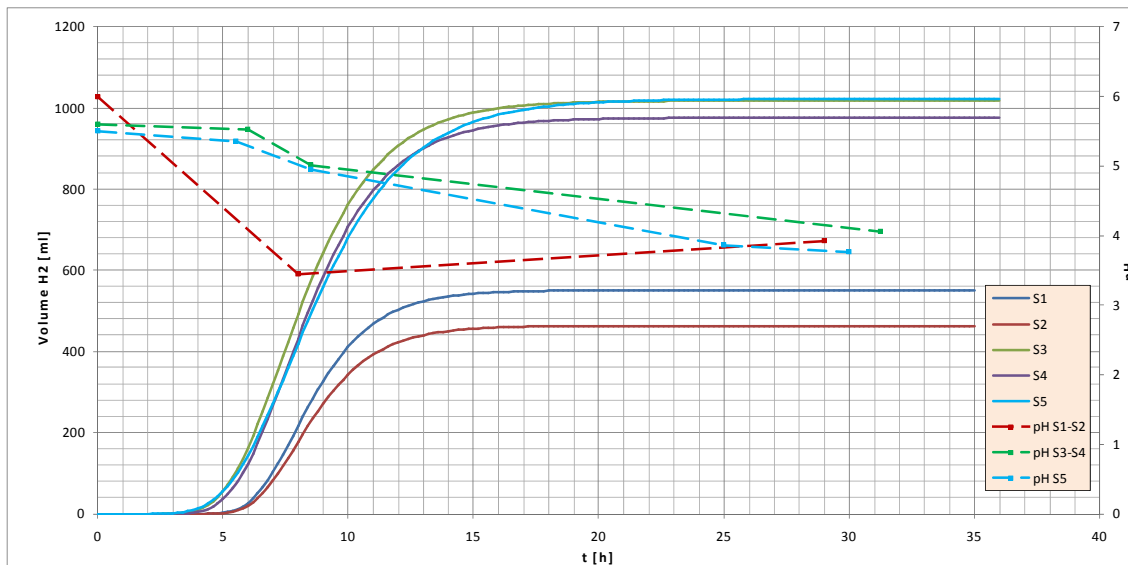
Per quanto riguarda la composizione del biogas prodotto nel corso delle prove, i risultati ottenuti sono riportati in Figura 29. In Tabella 8 sono invece mostrati gli andamenti temporali del pH del digestato, desunti dalle analisi effettuate sui campioni periodicamente prelevati dai digestori. In Figura 30 è infine indicato un confronto grafico tra tali grandezze per le diverse prove effettuate.



**Figura 29 - Andamento delle concentrazioni di idrogeno nel biogas prodotto dalle prove S1, S2, S3, S4 ed S5 (FORSU)**

**Tabella 8 - Andamento del pH nelle prove S1-S5 (FORSU)**

$\theta_H$	pH				
	S1	S2	S3	S4	S5
0	6.02	6	5.35	5.6	5.65
6			5.47	5.53	
7					5.05
8	3.95	3.45	4.97	5.02	
11,5					4.83
29	3.92	3.93			
31			3.77	4.06	



**Figura 30 – Effetto dell'inoculo fresco sulla produzione cumulata di H<sub>2</sub> e andamento del pH nelle prove S1-S5 (FORSU)**

Si può notare come le prove S1 ed S2, che hanno sviluppato una quantità di idrogeno inferiore di circa il 45% rispetto alle S3, S4 ed S5 (463 e 561 Nml H<sub>2</sub> delle S1 ed S2, contro i 1017, 976 e 1022 Nml H<sub>2</sub> delle S3, S4 ed S5), siano state caratterizzate anche da un andamento del pH anomalo, con una brusca riduzione da 6 a 3.9 nel corso delle prime 8 ore, causando un'eccessiva acidificazione del sistema, negativa ai fini della produzione di idrogeno.

Onde consentire un più corretto confronto tra i dati di produzione di biogas totale e di H<sub>2</sub> ottenuti nelle diverse prove, i volumi misurati sperimentalmente sono stati espressi per unità di solidi totali e solidi totali volatili iniziali, dando luogo ai valori di produzione massima specifica riportati in Tabella 9. Gli stessi valori sono riportati graficamente, per chiarezza di rappresentazione, anche in Figura 31.

**Tabella 9 – Produzioni massime di biogas totale e H<sub>2</sub> (valori assoluti e specifici) (FORSU)**

	S1	S2	S3	S4	S5
<b>Produzione totale biogas (Nml)</b>	1611	1602	2424	2287	2725
<b>Produzione totale H<sub>2</sub> (Nml)</b>	551	463	1018	976	1022
<b>Produzione totale specifica biogas (Nml/g ST)</b>	50.7	50.1	76.0	71.2	84.9
<b>Produzione totale specifica biogas (Nml/g SVT)</b>	31.4	31.2	47.2	44.5	53.1
<b>Produzione totale specifica H<sub>2</sub> (Nml/g ST)</b>	17.3	14.5	31.9	30.4	31.9
<b>Produzione totale specifica H<sub>2</sub> (Nml/g SVT)</b>	19.3	16.1	35.6	33.7	35.4

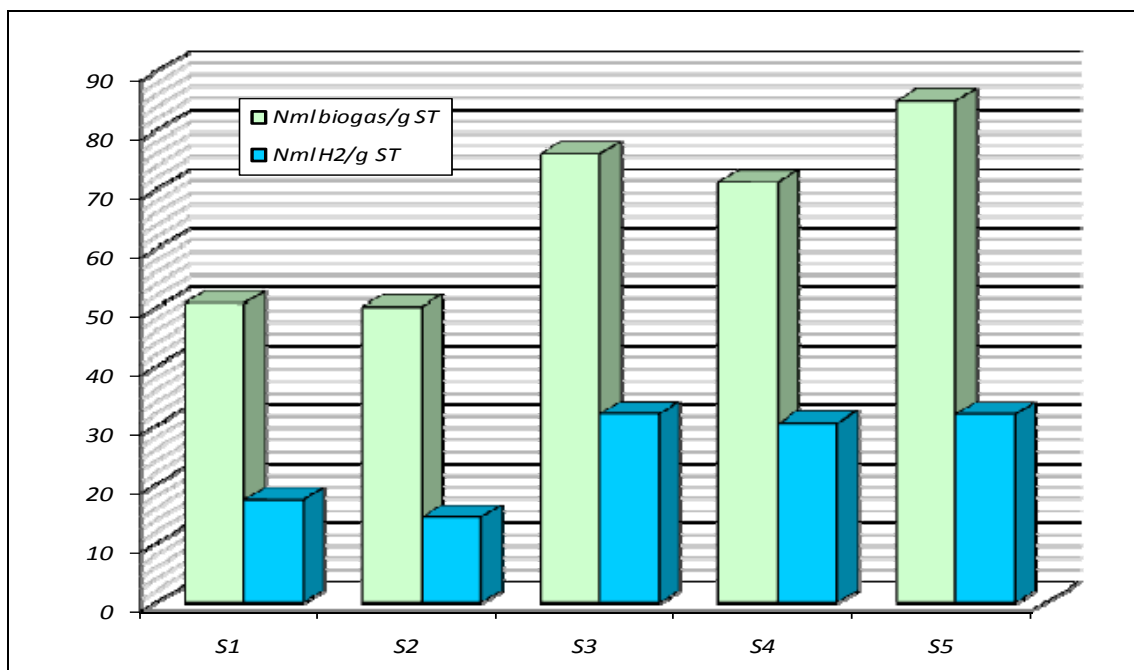
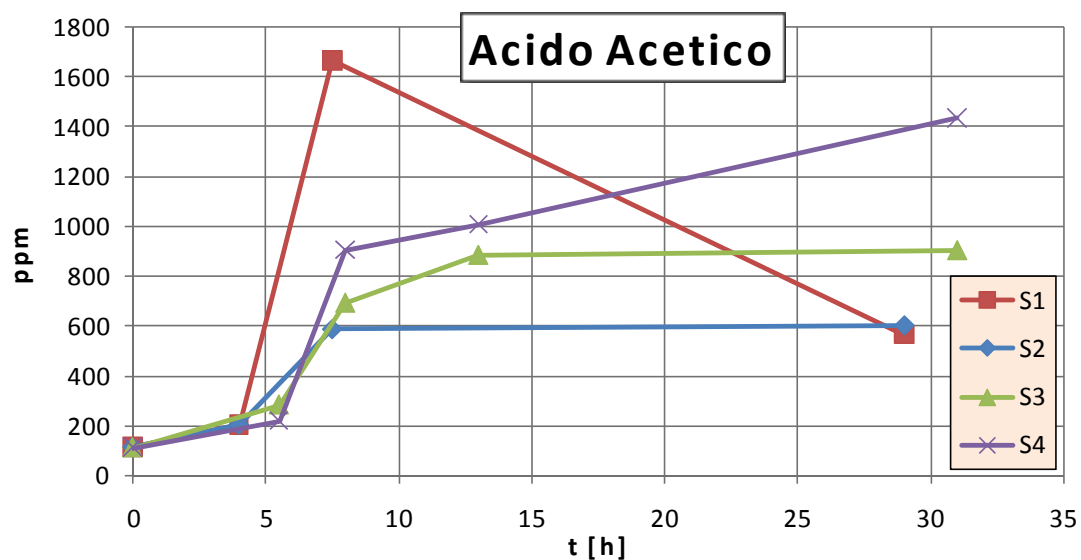


Figura 31 – Produzione specifica di biogas totale e di H<sub>2</sub> per le diverse prove effettuate (FORSU)

In Figura 32 sono riportati gli andamenti temporali delle concentrazioni di VFA nelle prove S.



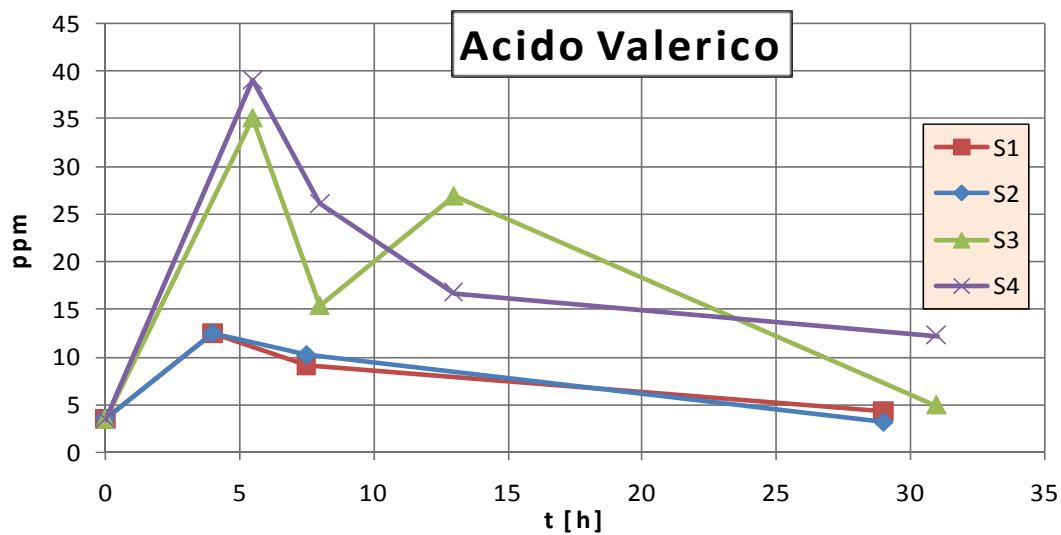
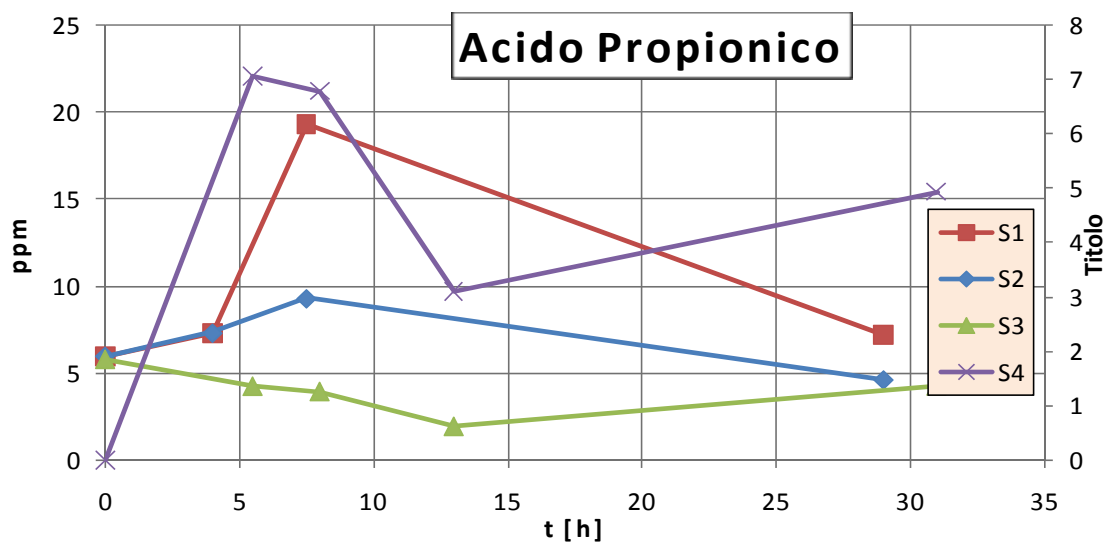
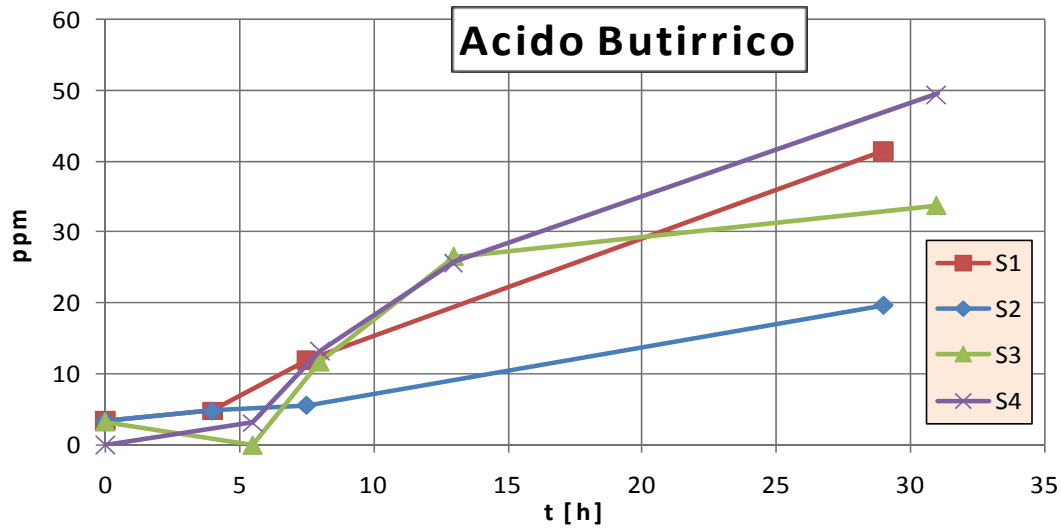


Figura 32 – Andamento temporale dei VFA per le prove S (FORSU)

### 2.2.3 Terzo set di prove

Un ulteriore set di prove è stato condotto su una miscela di soli FORSU e fango aerobico, al fine di valutare la possibilità di migliorare le rese di produzione di idrogeno in assenza dei potenziali effetti di acidificazione esercitati dalle acque di vegetazione.

Come già illustrato in termini generali, nell'ambito di tale set di prove sperimentali si è provveduto a condurre un test in batch con controllo in continuo del pH a mezzo di un titolatore automatico ed un test in batch con condizionamento iniziale con Mg metallico. I risultati di tali prove sono illustrati nei paragrafi successivi.

#### 2.2.3.1 Prova con controllo automatico del pH

La prova batch su FORSU con controllo in continuo del pH è stata realizzata al fine di migliorare le rese di produzione di  $H_2$  evitando i fenomeni di inibizione dei processi di idrogenogenesi in condizioni acide che erano stati osservati nelle precedenti prove sperimentali. Nelle prove condotte su miscele di FORSU senza controllo di pH si era infatti constatato come alla naturale diminuzione del pH in campo acido dovuta alla formazione di acidi volatili corrispondesse una riduzione del tasso di produzione dell'idrogeno, fino a giungere a produzioni nulle quando il pH scendeva al di sotto della soglia di circa 4.5 unità.

Si è pertanto deciso di condurre una prova con controllo automatico in continuo del pH al valore di set point di 5.5 unità durante lo stadio di idrogenogenesi, valore individuato come ottimale nelle prove condotte sul refluo da attività suinicola (cfr. § 2.1). Si ritiene che l'aggiunta della soluzione titolante, oltre ad esercitare un effetto positivo diretto sui processi metabolici attraverso la regolazione del pH, possa aver evitato eventuali fenomeni di inibizione della biomassa causati da un accumulo di acidi volatili nel sistema.

Durante tale prova allo stadio di produzione di idrogeno ne è stato aggiunto a valle un secondo, volto al completamento delle reazioni di digestione anaerobica dell'effluente dal primo stadio, con produzione di  $CH_4$ . Ciò al fine di valutare le rese complessive di produzione di biogas dalla miscela considerata. Al fine di garantire lo sviluppo della biomassa metanigena nel secondo stadio del processo, al termine della prima fase si è provveduto a riportare il pH in condizioni corrispondenti alla neutralità, consentendo successivamente l'evoluzione naturale di tale variabile per effetto dei processi biologici.

La composizione della miscela sulla quale è stata condotta tale prova di digestione era la seguente:

- 45% FORSU
- 55% fango aerobico

L'andamento della produzione complessiva di biogas nel corso dell'intera prova a pH controllato è riportato in Figura 33 in termini di volumi assoluti di gas prodotti e relativi valori specifici rispetto alla quantità di SVT alimentati al reattore. È possibile osservare una variazione del tasso di produzione del biogas dopo circa 70 ore dall'inizio della prova, dovuta alle modifiche subite dalle trasformazioni metaboliche nel passaggio dal primo al secondo stadio del processo di digestione.

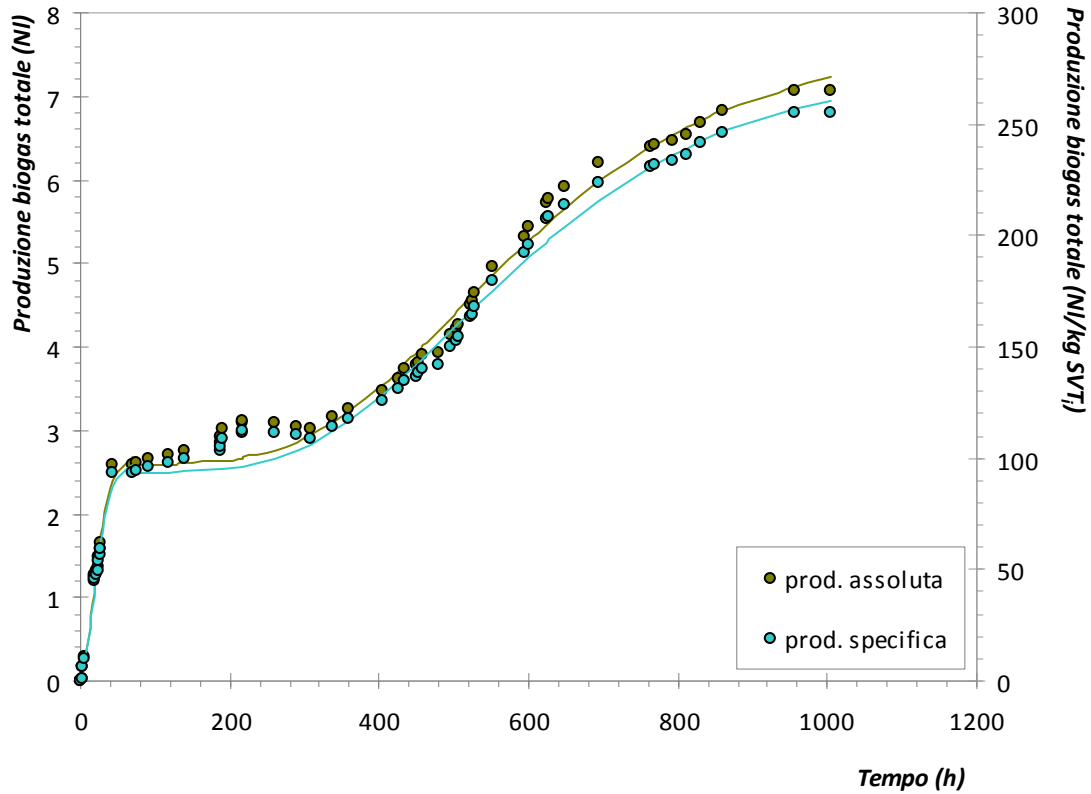
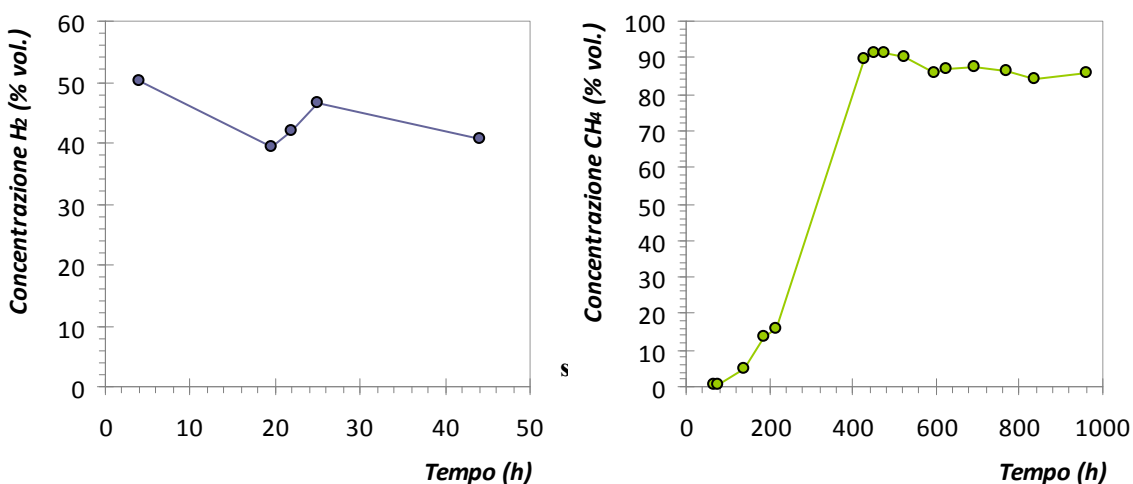
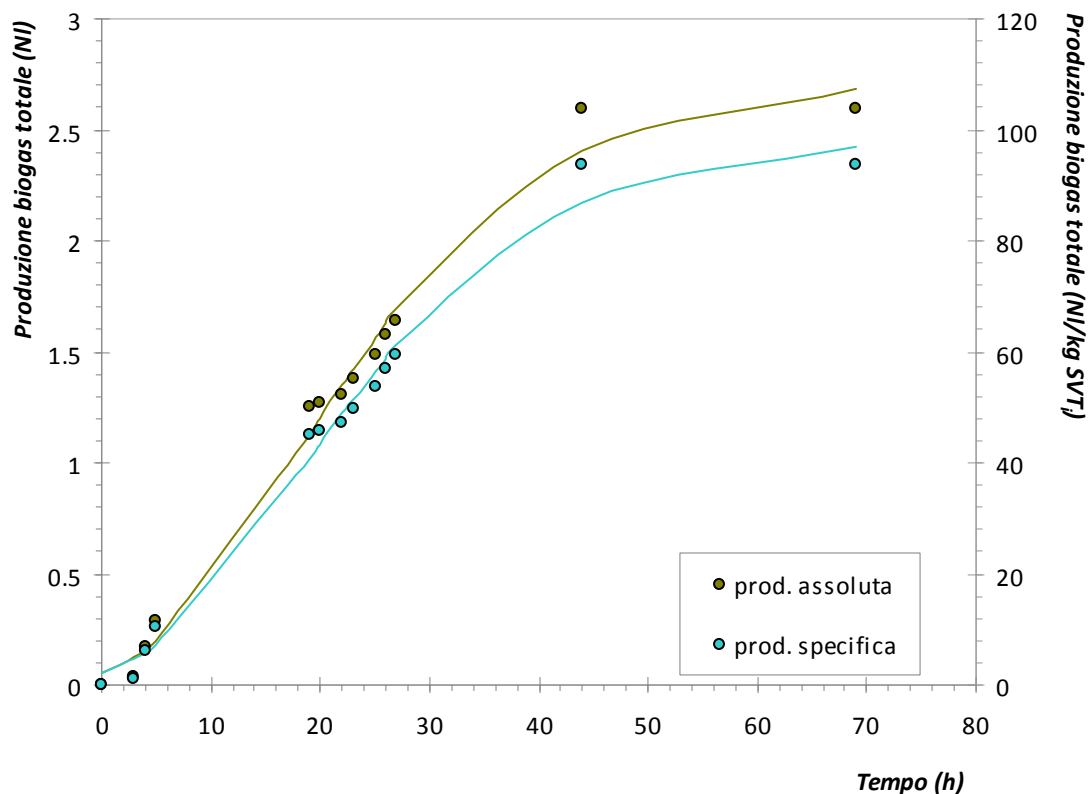


Figura 33 – Produzione assoluta e specifica di biogas totale nella prova a pH controllato (FORSU)

In Figura 34 sono riportati i valori delle concentrazioni in volume di idrogeno e metano all'interno del biogas rispettivamente nel primo e nel secondo stadio della prova sperimentale. Nel primo stadio si è osservata la presenza di soli  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$  (quest'ultimo ad una concentrazione media di circa il 44% in volume) per un periodo pari a circa 44 ore, trascorso il quale la produzione di biogas risultava trascurabile. Nel secondo stadio, dopo una fase iniziale di latenza della durata di circa 14 giorni nella quale non si è osservata alcuna apprezzabile produzione di gas, il biogas è risultato invece composto esclusivamente da  $\text{CO}_2$  e  $\text{CH}_4$ . La fase metanigena si è protratta approssimativamente per 28 giorni dall'istante di comparsa del biogas nel secondo stadio, con concentrazioni di  $\text{CH}_4$  che si sono attestate intorno ad un valore medio dell'88% in volume nella fase di massima produzione.



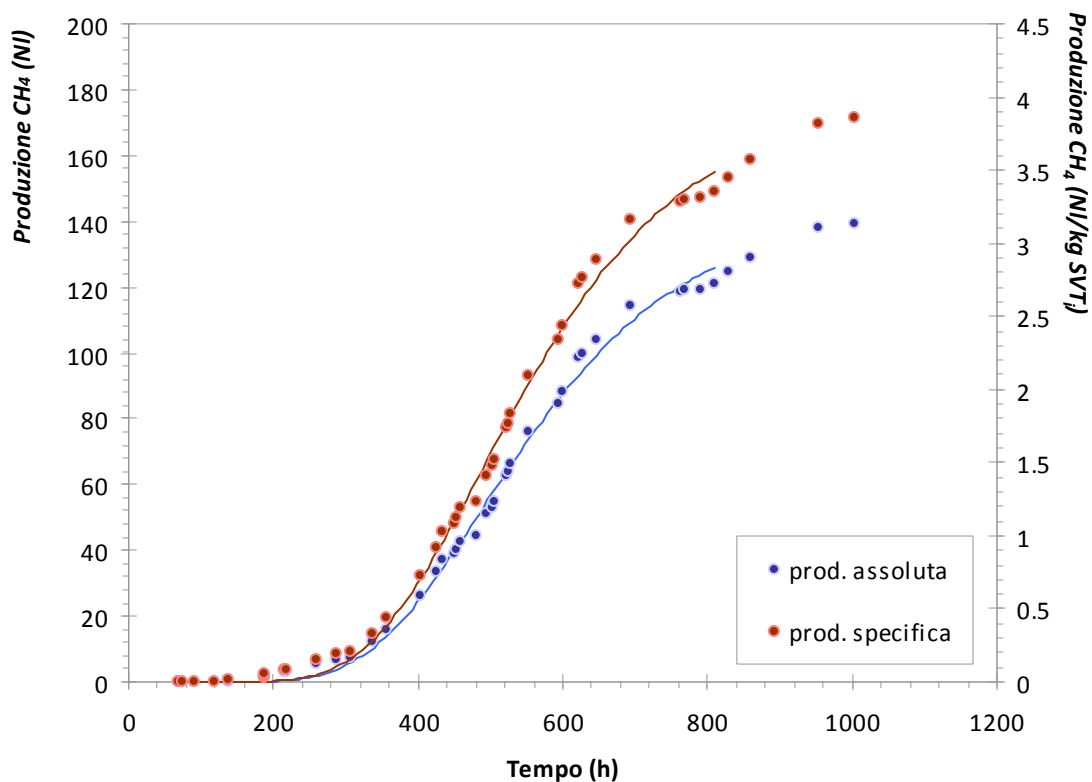
Onde meglio evidenziare l'evoluzione del processo in ciascuno degli stadi di digestione, in Figura 35 è rappresentato l'andamento della produzione assoluta e specifica (ovvero espressa rispetto ai SVT iniziali) di idrogeno osservata durante la sperimentazione nel primo stadio del processo.



**Figura 35 – Produzione assoluta e specifica di H<sub>2</sub> nel primo stadio della prova a pH controllato (FORSU)**

Come già precedentemente accennato, è possibile osservare come il processo di produzione dell'idrogeno in tale prova abbia una durata dell'ordine di 44 ore ed una produzione totale specifica pari a 41 NI H<sub>2</sub>/kg SVT. Rispetto alla prova condotta sulla medesima miscela FORSU + fango aerobico senza controllo in continuo del pH, sia la durata del processo che la produzione totale di idrogeno risultano dunque aver avuto un incremento prossimo al 300%.

La produzione cumulata di metano nel secondo stadio del processo è riportata in Figura 36 ancora in termini di valori cumulati assoluti e specifici. È possibile in tal caso osservare come la produzione di metano nel secondo stadio del processo di digestione abbia avuto una durata di circa 38 giorni (al netto della prima fase di produzione di idrogeno), raggiungendo un valore complessivo specifico pari a circa 140 NI CH<sub>4</sub>/kg SVT.



**Figura 36 – Produzione assoluta e specifica di CH<sub>4</sub> nel secondo stadio della prova a pH controllato (FORSU)**

Risulta interessante analizzare l'andamento dei VFA, mostrato in Figura 36 accanto a quello del pH, da cui si nota come durante la fase di acetogenesi, che corrisponde alle prime 44 ore della prova, si abbia un forte accumulo di VFA nel sistema, mentre durante la fase di metanogenesi si abbia, come atteso, un consumo di tutti i VFA analizzati, ad eccezione dell'acido propionico, la cui concentrazione tende ad aumentare nella fase finale del processo.

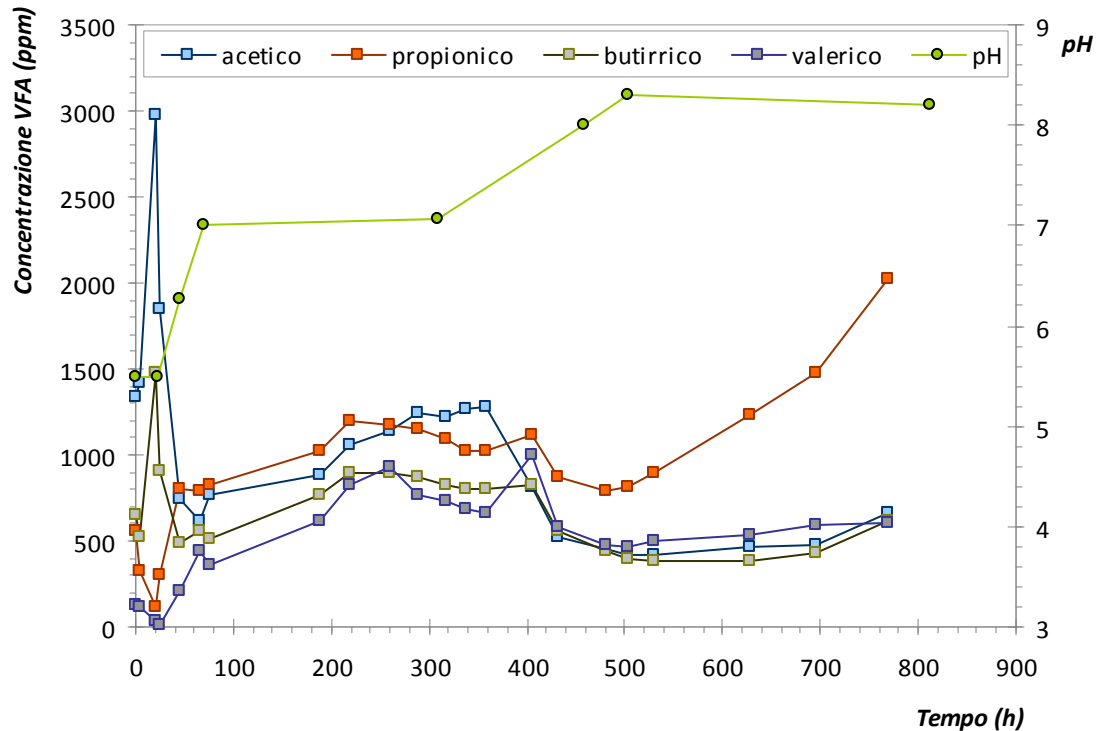
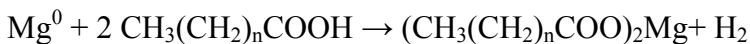


Figura 37 – Andamento dei VFA e del pH nella prova a pH controllato (FORSU)

### 2.2.3.2 Prova con condizionamento con Mg metallico

La prova batch condotta sulla miscela di FORSU effettuando un condizionamento con Mg metallico è stata realizzata con il duplice scopo di garantire il controllo del pH evitando una sua eccessiva diminuzione durante la fase di idrogenogenesi, nonché di limitare i fenomeni di accumulo di VFA nel sistema che potrebbero dar luogo all'inibizione della biomassa.

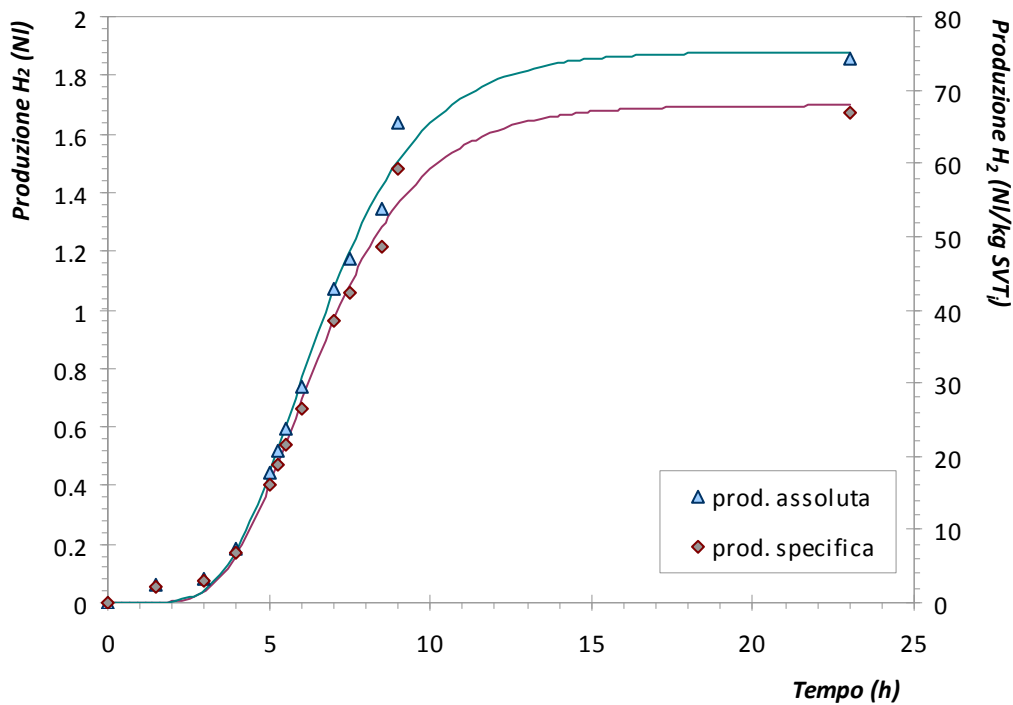
L'aggiunta del Mg allo stato metallico dà luogo a una reazione di ossidoriduzione che coinvolge i VFA e porta alla formazione dei corrispondenti sali di Mg e di H<sub>2</sub>, fornendo dunque un contributo aggiuntivo di natura chimica alla produzione di idrogeno per via biologica:



La composizione della miscela sulla quale è stata eseguita la prova era analoga a quella della precedente prova con controllo in continuo del pH, ovvero:

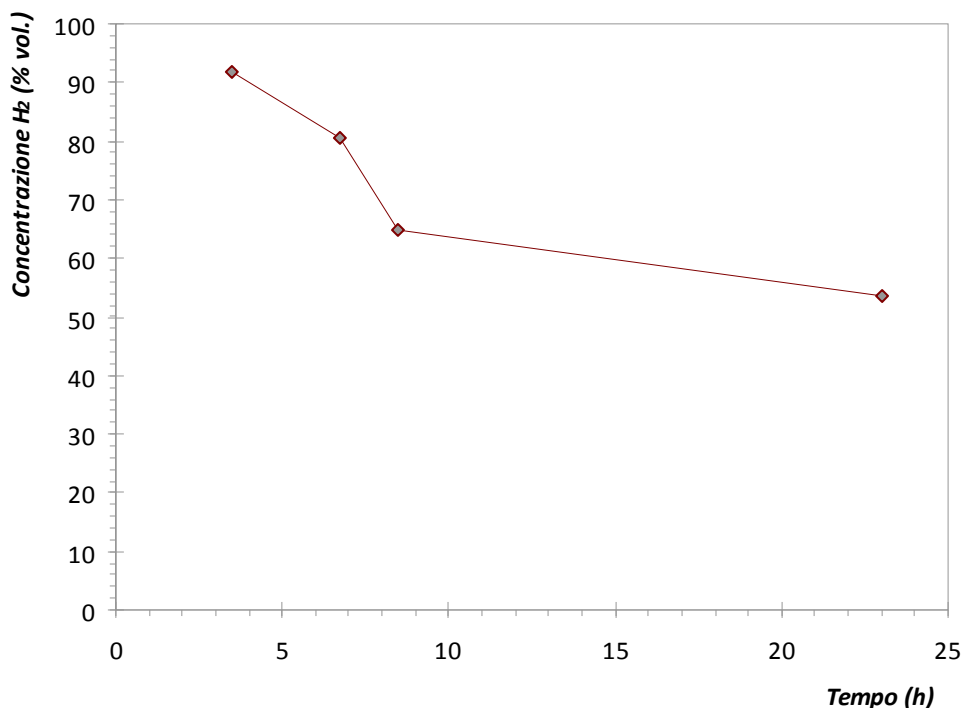
- 45% FORSU
- 55% fango aerobico

A tali costituenti è stato aggiunto Mg metallico in quantità pari allo 0,33% in peso della miscela. In Figura 38 sono riportati gli andamenti della produzione assoluta e specifica (ovvero rapportata alla quantità di SVT alimentati) di idrogeno osservati nel corso di tale prova sperimentale. È possibile evidenziare come la produzione totale di H<sub>2</sub> risulti notevolmente superiore rispetto a quella misurata nell'omologa prova con controllo in continuo di pH (67 NI H<sub>2</sub>/kg SVT<sub>i</sub> contro 41 NI H<sub>2</sub>/kg SVT<sub>i</sub>), con una cinetica notevolmente più rapida (durata del periodo di produzione di idrogeno pari a circa 12 ore contro 44 ore del precedente test).



**Figura 38 – Produzione assoluta e specifica di H<sub>2</sub> nella prova con condizionamento con Mg (FORSU)**

L'andamento delle concentrazioni di H<sub>2</sub> misurate nel biogas è mostrato in Figura 39, dalla quale è possibile notare i valori particolarmente elevati (tra l'80 e il 92% vol.) riscontrati entro le prime 7 ore del test (durata corrispondente approssimativamente dal periodo a massimo tasso di produzione di H<sub>2</sub>), da attribuire presumibilmente alla cinetica particolarmente veloce di formazione dell'idrogeno per ossidazione del Mg metallico. Nelle ore successive della prova la concentrazione di H<sub>2</sub> tende a diminuire, fino ad un valore di circa il 53% vol. (dunque simile ai valori misurati nelle precedenti prove sperimentali) dopo circa 23 ore dall'inizio del test; ciò evidentemente è correlato sia alla progressiva riduzione del tasso di produzione di idrogeno per via biologica, sia alla minore disponibilità di Mg metallico da impiegare nella reazione redox precedentemente riportata.



**Figura 39 – Concentrazione di H<sub>2</sub> nel biogas nella prova con condizionamento con Mg (FORSU)**

Per quanto riguarda l'andamento del pH nel corso della prova, è possibile riconoscere un'influenza positiva del trattamento di condizionamento adottato, con valori del pH che si sono mantenuti tra 6.7 e 7.0 unità nelle prime ore del test fino a decrescere a valori intorno a 5.0 unità al termine della prova. Ciò indica che l'aggiunta di Mg metallico al sistema di digestione è in grado di esercitare un'azione tampone significativa con un miglioramento apprezzabile delle rese di conversione in bioidrogeno.

L'andamento della concentrazione dei VFA (cfr. Figura 40) risultano analogo a quello osservato nelle prove precedenti.

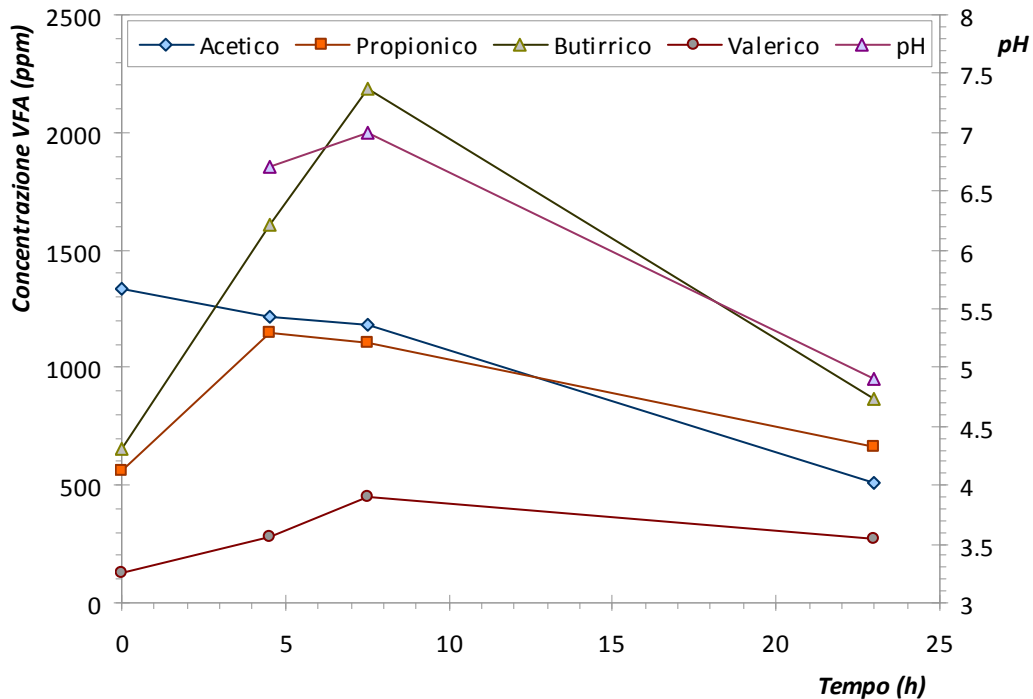


Figura 40 – Andamento della concentrazione di VFA nella prova con condizionamento con Mg (FORSU)

## 2.2.4 Quarto set di prove (in semi-continuo)

Al fine di ricavare le informazioni necessarie per un successivo scale-up del processo di digestione anaerobica studiato, è stato condotto un ulteriore set di prove nelle quali l'alimentazione del reattore biologico è stata effettuata in semi-continuo secondo le modalità già descritte al § 1.1.2 e si è provveduto ad un controllo automatico del pH mediante aggiunta di soluzione di soda per mezzo di un sistema di regolazione comandato da PLC.

Una prima prova è stata condotta, sulla scorta dei positivi risultati forniti dal corrispondente test in batch, ad un valore di set point di pH pari a 5.5. Dopo una prima fase della durata di circa 48 ore nella quale sono stati confermati i risultati già ottenuti per il test in batch, si è osservata una variazione delle caratteristiche delle reazioni metaboliche, con una produzione di biogas composto prevalentemente da CO<sub>2</sub>, fatta eccezione per le fasi in cui il pH risultava aumentare naturalmente (il sistema di regolazione del pH utilizzato era infatti di tipo unidirezionale nel verso acido → basico, ragion per cui non era possibile effettuare un controllo del pH nel caso in cui esso tendesse a superare il valore di set point). Nelle occasioni in cui il pH della miscela ha superato il valore di set point pari a 5.5, si è notata una nuova variazione della composizione del biogas, con la comparsa di idrogeno in piccole percentuali sul volume di gas prodotto. Ciò ha suggerito che i fenomeni di acclimatazione che, a differenza delle prove in batch, hanno potuto aver luogo nella prova in semi-continuo hanno prodotto nelle condizioni sperimentali indagate una progressiva selezione di biomassa non idonea alla produzione di idrogeno. Ciò ha suggerito l'opportunità di modificare le condizioni di pH all'interno del reattore verso valori più elevati, al fine di verificare la possibilità di ristabilire le condizioni ottimali per lo sviluppo dei microrganismi idrogenogenici.

Per le ragioni suesposte, si è scelto di effettuare una prova in semi-continuo, della durata di circa 8 giorni, nella quale si è provveduto ad incrementare il valore di set point del pH dal valore 5.5 al valore 6. Il legame esistente tra il pH del sistema e la concentrazione di idrogeno nel biogas

prodotto è evidente dal grafico mostrato in Figura 41; anche in questo caso si è osservata una tendenza al naturale incremento del pH del sistema al di sopra del valore di set point, incremento al quale sono risultati generalmente associati maggiori valori della concentrazione di idrogeno.

Ciò ha suggerito di effettuare ulteriori prove dello stesso tipo nelle quali il pH è stato mantenuto, per una durata di circa una settimana ciascuna onde consentire la stabilizzazione del sistema nelle nuove condizioni operative, a valori pari rispettivamente a 6.5, 7.0 e 7.5 unità.

I risultati delle diverse prove effettuate sono riportati nei grafici di Figura 42 e Figura 43 in termini di produzione specifica rispettivamente di biogas e di idrogeno. Nei grafici le linee verticali sono state tracciate in corrispondenza degli istanti in cui è stata effettuata l'alimentazione del reattore. Si nota come le maggiori produzioni di idrogeno si siano riscontrate nelle prove a pH = 7.0, con valori medi prossimi a 118 NI H<sub>2</sub>/kg SVT, rispetto a valori medi dell'ordine di 70, 78 e 64 NI H<sub>2</sub>/kg SVT misurati nelle prove con controllo del pH rispettivamente a 6.0, 6.5 e 7.5.

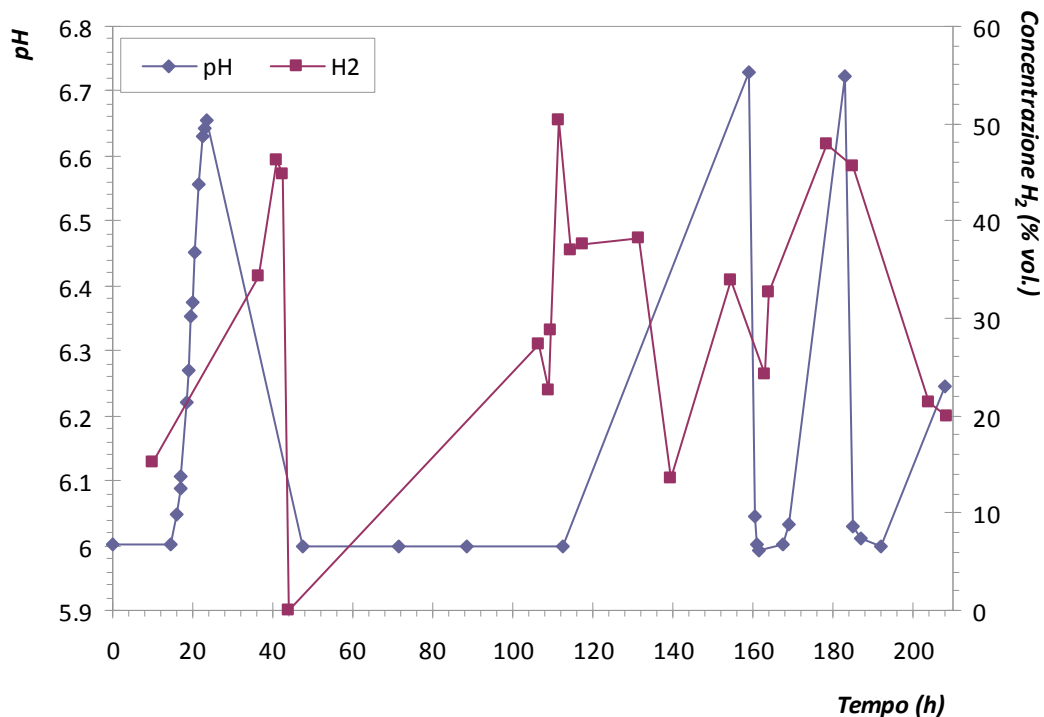


Figura 41 – Andamento della concentrazione di H<sub>2</sub> e del pH nella prova in semi-continuo (set point a pH = 6)

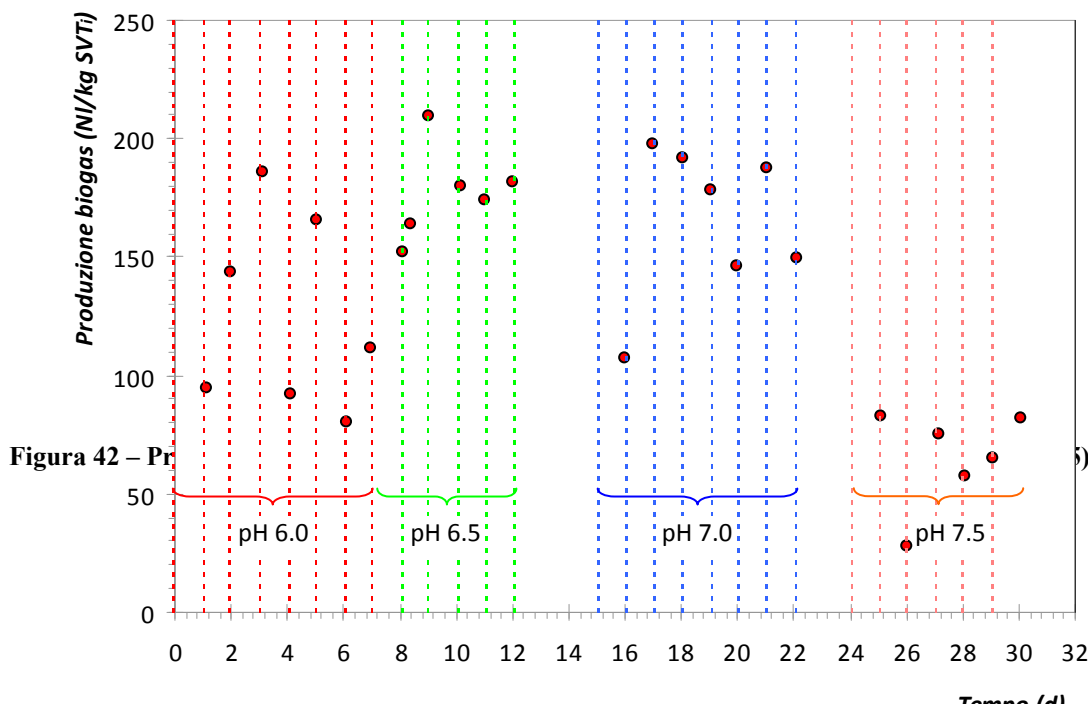


Figura 42 – Pr

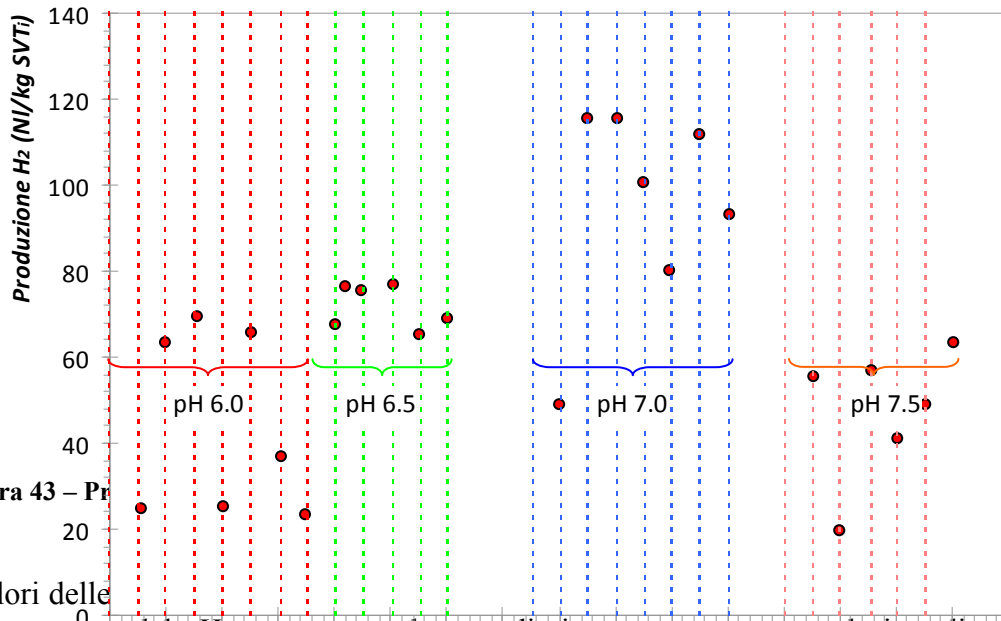


Figura 43 – Pr

I valori delle  
 all'aumentare del pH mantenuto nel corso di ciascuna prova, con valori medi pari al 29, 36, 58 e 73% in volume rispettivamente per le prove a pH 6.0, 6.5, 7.0 e 7.5. Tuttavia, considerando il volume totale di biogas prodotto nelle diverse prove sperimentali, la maggior produzione di idrogeno è stata ottenuta nella prova a pH 7.0, la quale era caratterizzata da concentrazioni di idrogeno nel biogas apprezzabili, ma a cui corrispondeva una produzione volumetrica di biogas sensibilmente superiore a quella misurata nella prova a pH 7.5.

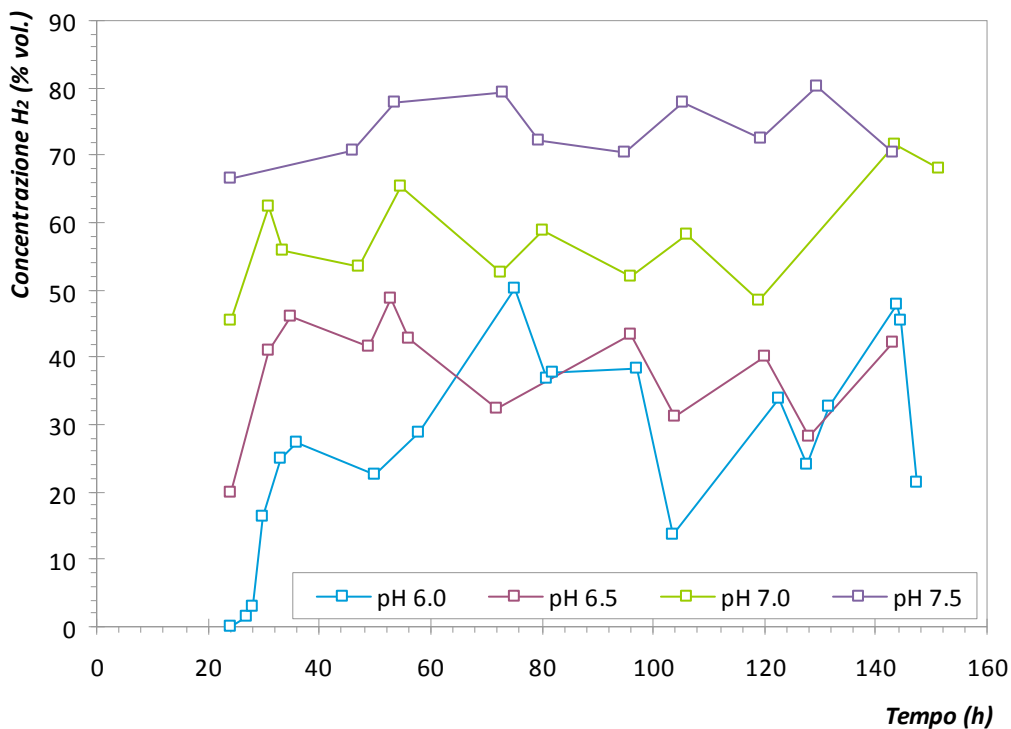


Figura 44 – Concentrazione di H<sub>2</sub> nel biogas nelle prove in semi-continuo (set point a pH = 6, 6.5, 7.0 e 7.5)

L'andamento delle concentrazioni dei VFA in fase liquida, riportato in Figura 45 per le singole specie analizzate e in Figura 46 per la concentrazione totale di acidi volatili, mostra come sia stato

possibile riscontrare la presenza in quantità apprezzabili dei soli acido acetico, propionico e butirrico.

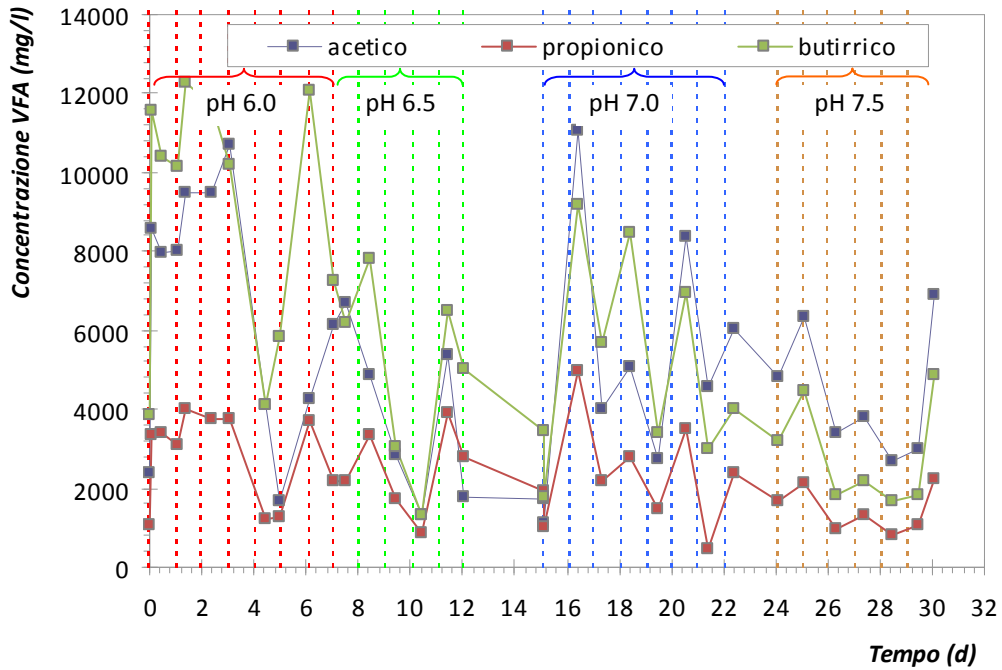


Figura 45 – Andamento della concentrazione di VFA nelle prove in semi-continuo (set point a pH = 6, 6.5, 7.0 e 7.5)

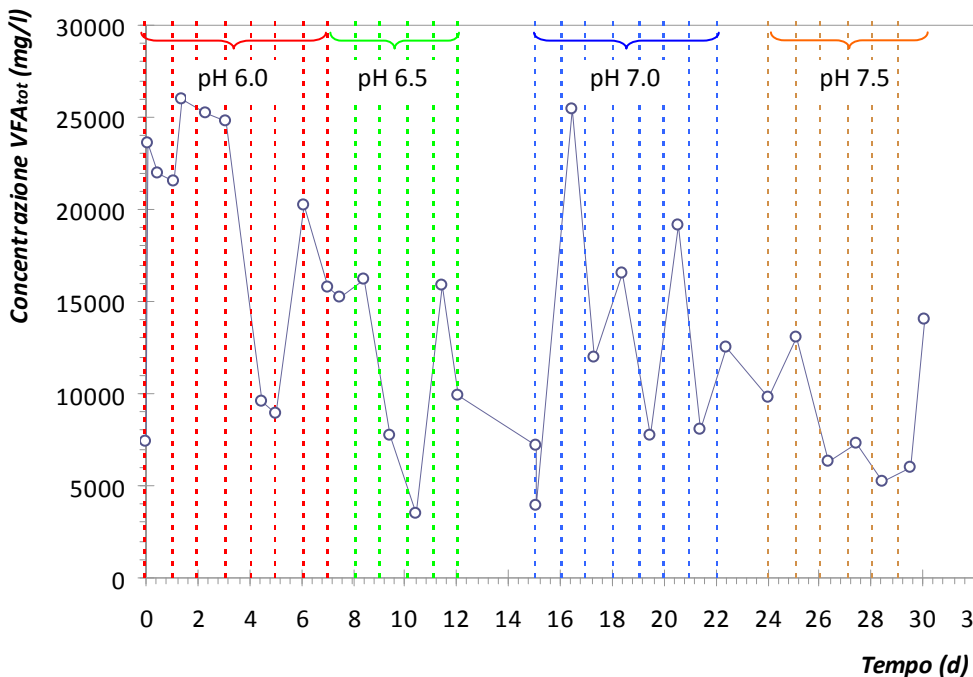
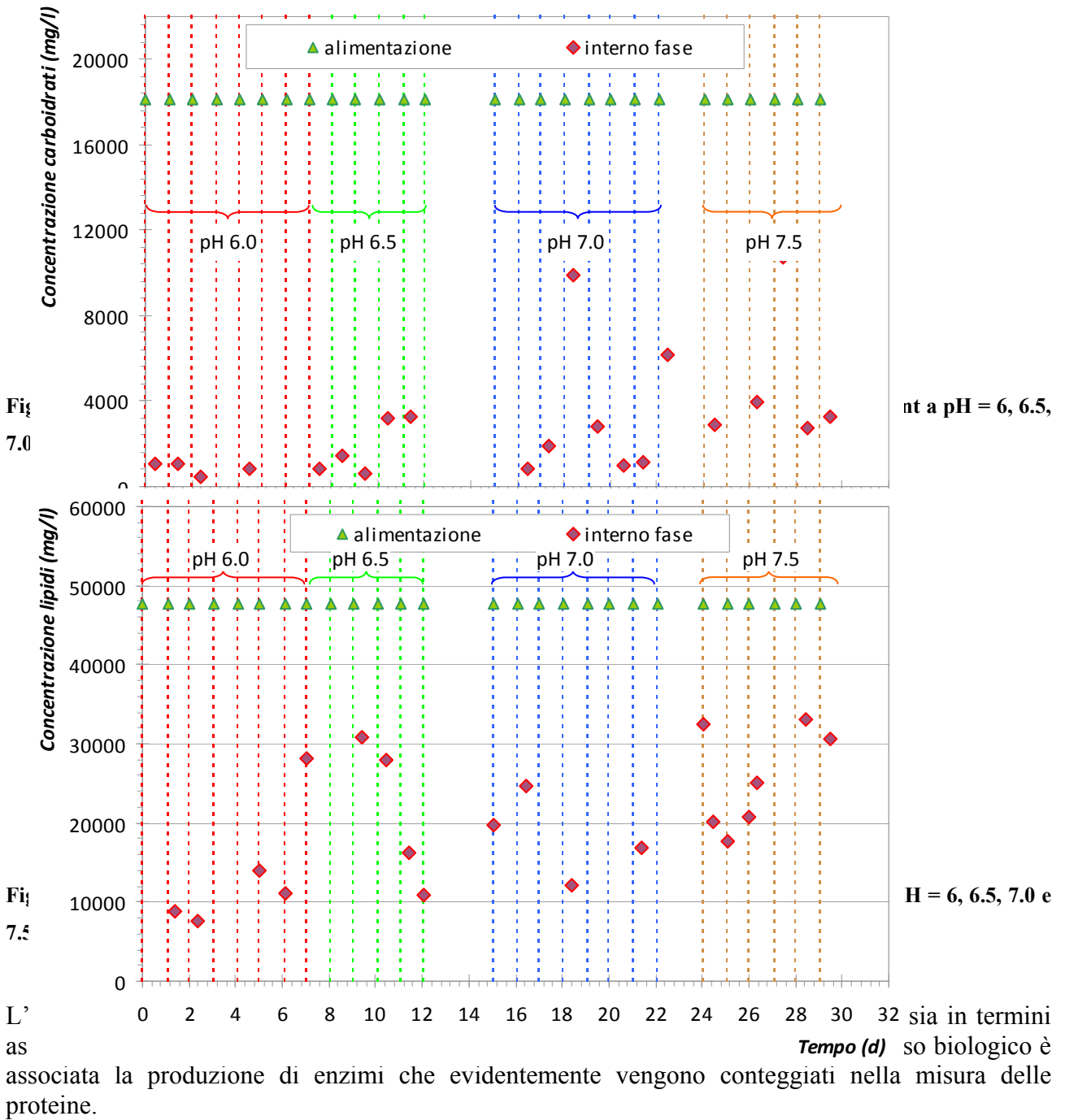


Figura 46 – Andamento della concentrazione di VFA\_tot nelle prove in semi-continuo (set point a pH = 6, 6.5, 7.0 e 7.5)

Gli ε sono da della miscela possibile osservare come, tra le specie esaminate, i carboidrati sono quelli caratterizzati dalle maggiori efficienze di degradazione, con valori medi superiori al 95% per le prove a pH = 6.0, e pari rispettivamente all'88, 81 e 73 % per le prove a pH = 6.5, 7.0 e 7.5 a partire da un valore in alimentazione prossimo a 18 000 mg/l.

Anche nel caso dei lipidi l'entità della degradazione, seppur inferiore rispetto ai carboidrati, risulta apprezzabile, con valori pari al 71, 55, 62 e 46% misurati rispettivamente nelle prove a pH 6.0, 6.5, 7.0 e 7.5 a partire da un valore in alimentazione prossimo a 50000 mg/l.



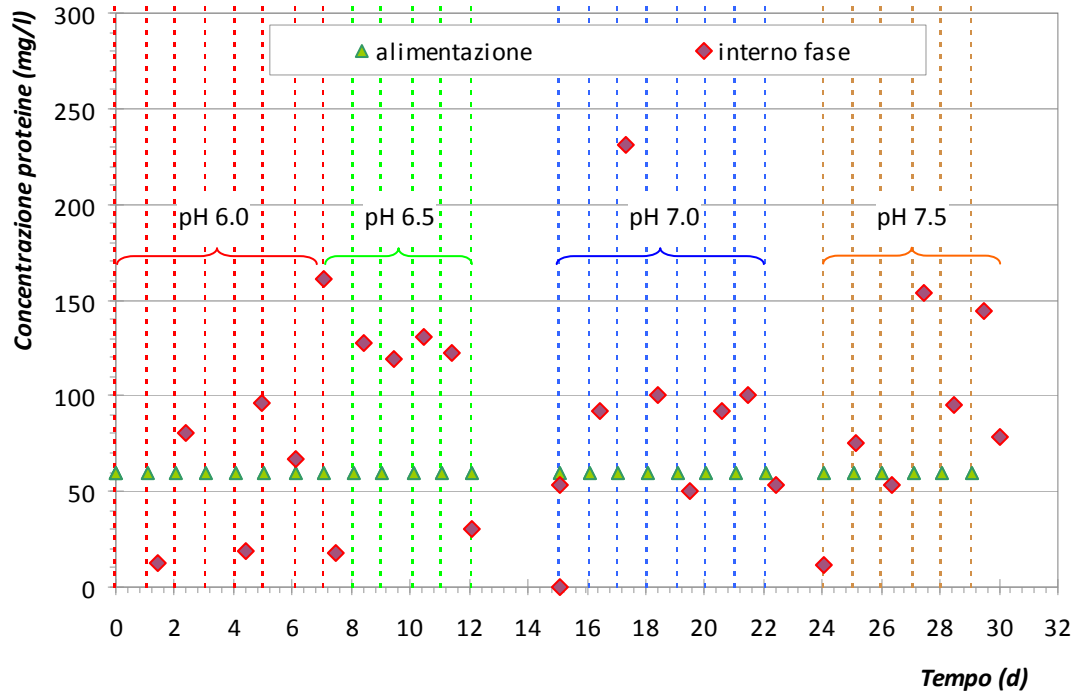


Figura 49 – Andamento della concentrazione di proteine nelle prove in semi-continuo (set point a pH = 6, 6.5, 7.0 e 7.5)

La correlazione esistente tra le concentrazioni di carboidrati e lipidi e quelle dei VFA totali, mostrata in Figura 50 e in Figura 51, conferma l'evoluzione del processo biologico di acetogenesi, con formazione di acidi volatili a partire dai prodotti dell'idrolisi delle molecole presenti nel substrato in alimentazione.

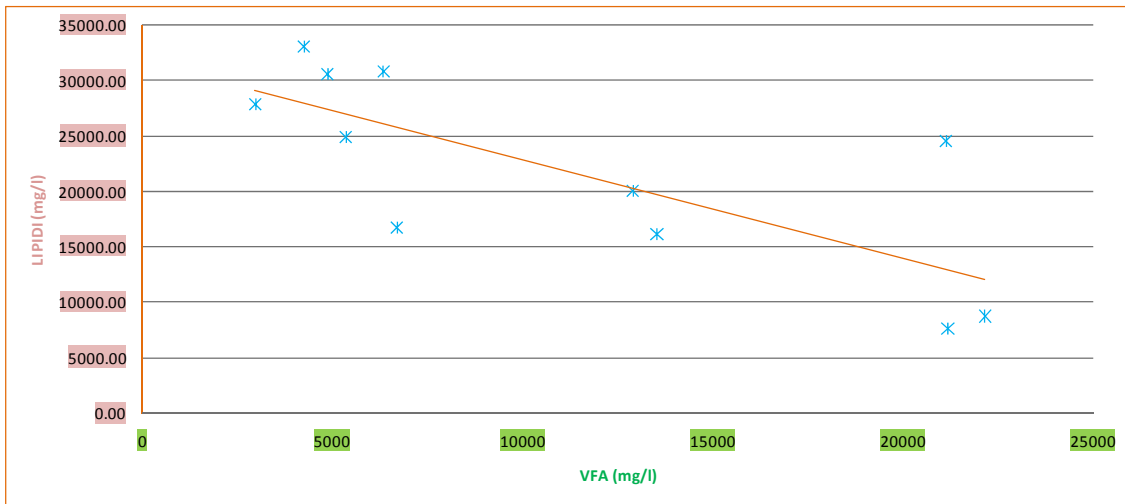
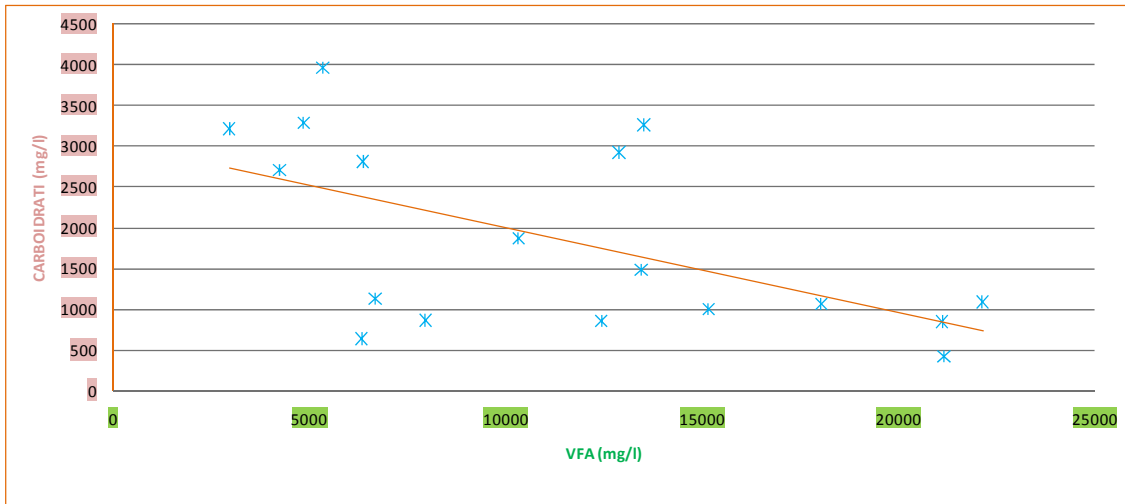


Figura 50 – Correlazione tra concentrazione di lipidi e concentrazione di VFA nelle prove in semi-continuo (set point a pH = 6, 6.5, 7.0 e 7.5)



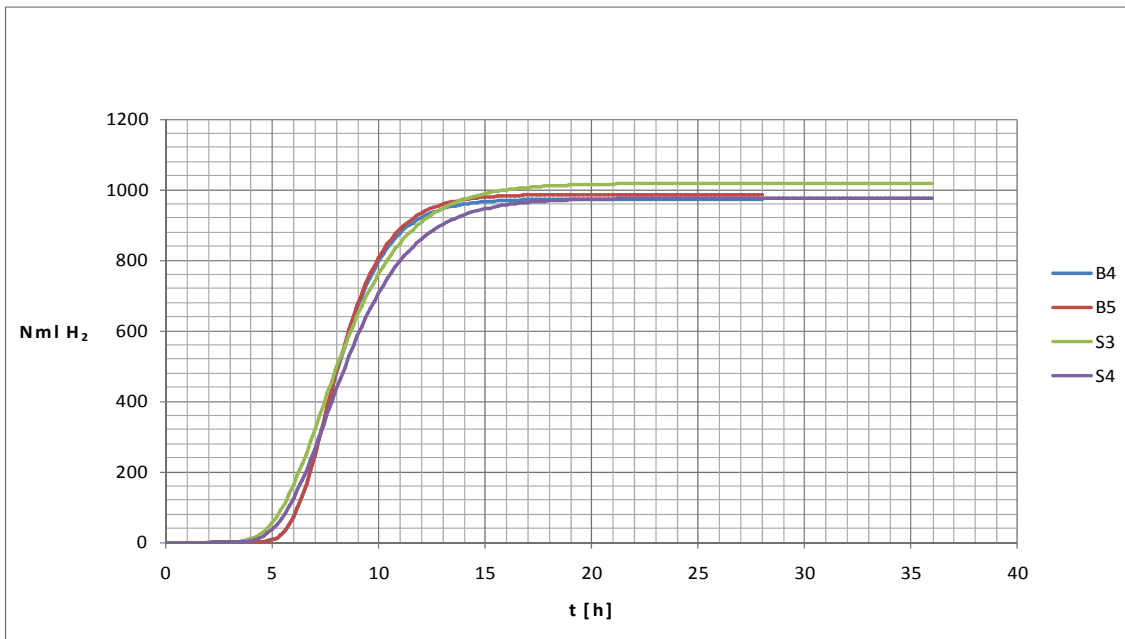
**Figura 51 – Correlazione tra concentrazione di carboidrati e concentrazione di VFA nelle prove in semi-continuo (set point a pH = 6, 6.5, 7.0 e 7.5)**

## 2.3 Confronto tra le prove effettuate

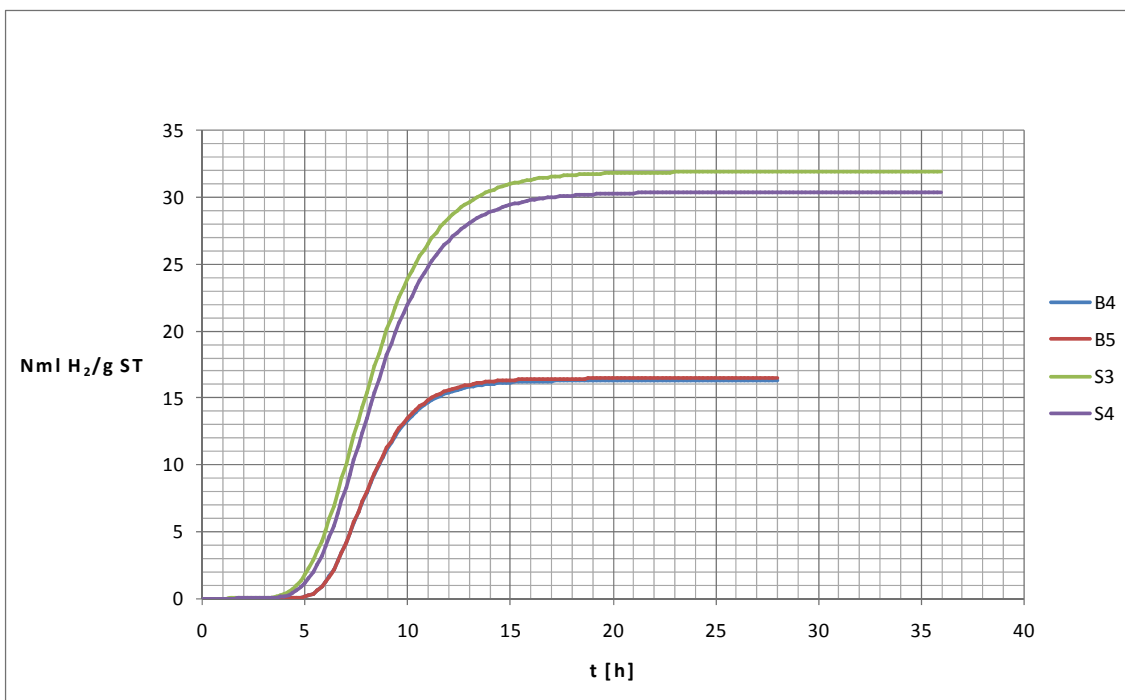
In ciò che segue verrà effettuato un confronto tra i risultati delle diverse prove sperimentali condotte su substrati differenti e in diverse condizioni operative, al fine di individuare le principali variabili di processo di interesse ai fini del processo di produzione biologica di idrogeno.

### 2.3.1 Confronto tra le prove di digestione su refluo da suinicoltura e su FORSU

Risulta interessante raffrontare direttamente le prove B4-B5 con le S3-S4, che hanno prodotto complessivamente circa lo stesso quantitativo di idrogeno, ma presentano produzioni specifiche rispetto ai ST molto diverse (cfr. Figura 52 e Figura 53).

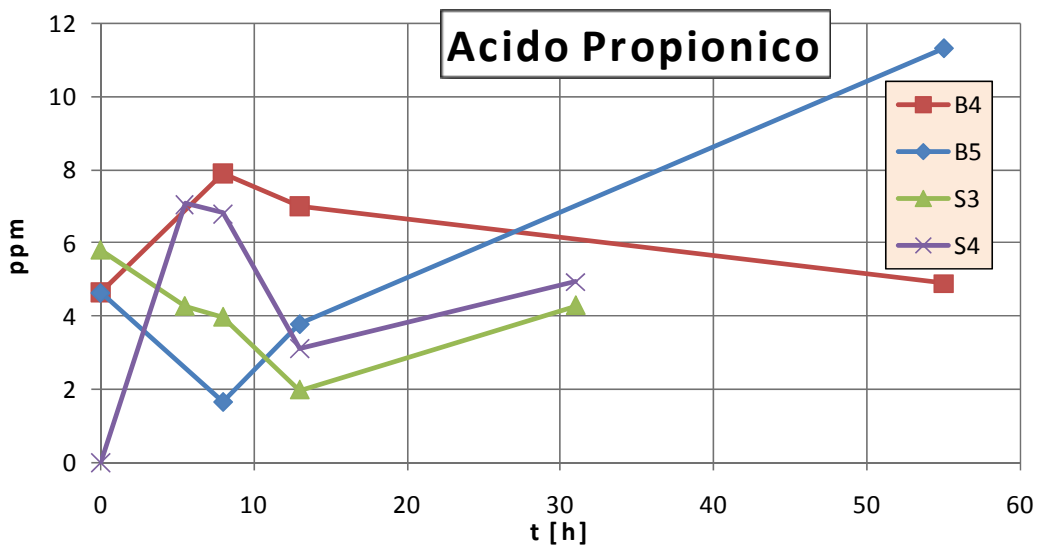
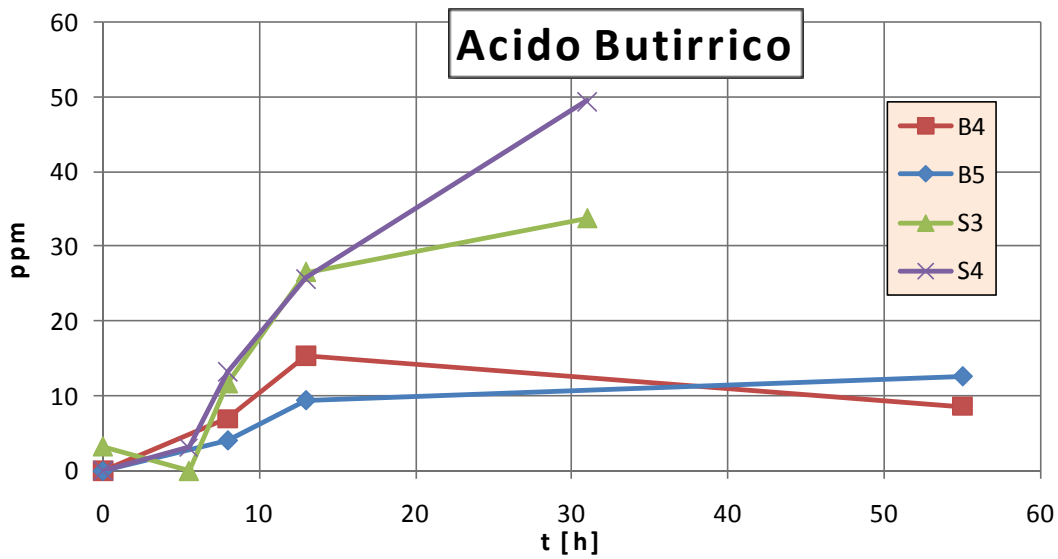
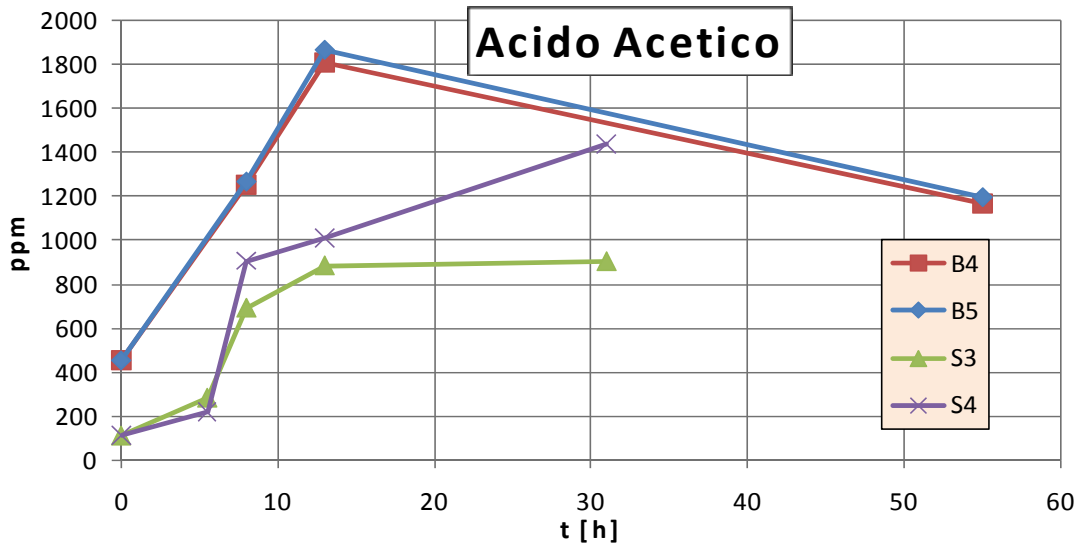


**Figura 52 – Produzione cumulata di idrogeno delle prove B4-B5 e S3-S4 (FORSU)**



**Figura 53 – Produzione specifica di idrogeno delle prove B4-B5 e S3-S4 (FORSU)**

Nel grafico di Figura 54 si riporta anche il confronto tra i VFA prodotti nelle prove S3-S4 e B4-B5.



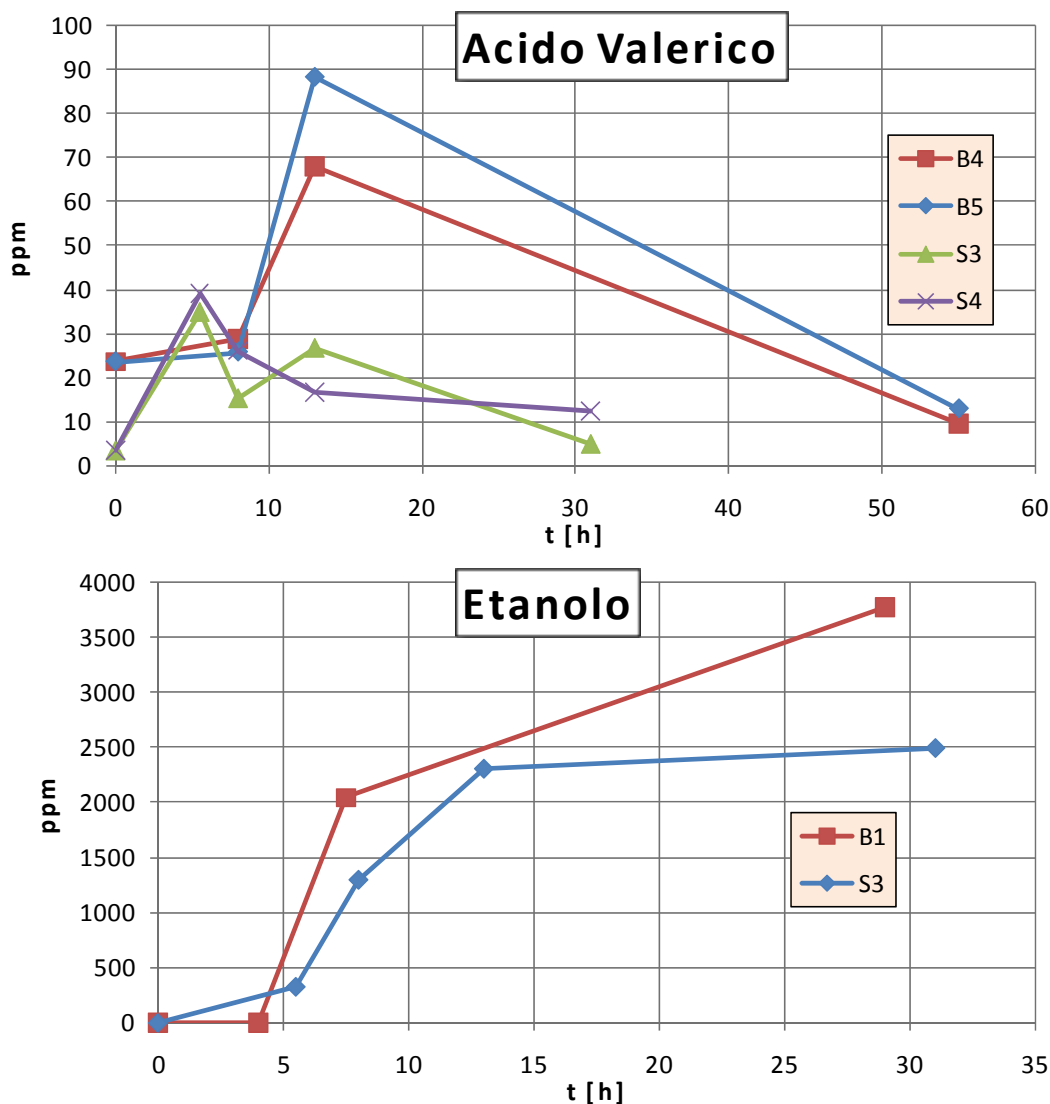


Figura 54 – Confronto dei VFA e dell’etanolo prodotti nelle prove S e B (FORSU)

Tale risultato può essere spiegato considerando un eccessivo carico organico nelle prove B4-B5, che contenevano il 70% di FORSU, contro il 35% delle prove S3-S4.

Infatti, le prove B4 e B5 hanno prodotto rispettivamente 2770 e 2809 Nml di biogas, mentre la produzione delle prove S3 ed S4 è stata di 2448 e 2336 Nml di biogas. Tuttavia, il contenuto medio di idrogeno, nella zona attiva di produzione, si attesta sul 32% nelle prove B, mentre arriva al 42% nelle prove S.

Inoltre, gli andamenti del pH (cfr. Figura 55) denotano una più rapida acidificazione dell’ambiente nelle prove B.

Appare chiaro, quindi, come condurre il processo di digestione anaerobica con valori eccessivi del carico organico porti ad uno scompensamento del processo con il conseguente spostamento della via metabolica verso fermentazioni che producono CO<sub>2</sub> ed altri metaboliti, diversi dall’acido acetico e butirrico, quali l’etanolo, tipico prodotto della fermentazione alcolica.

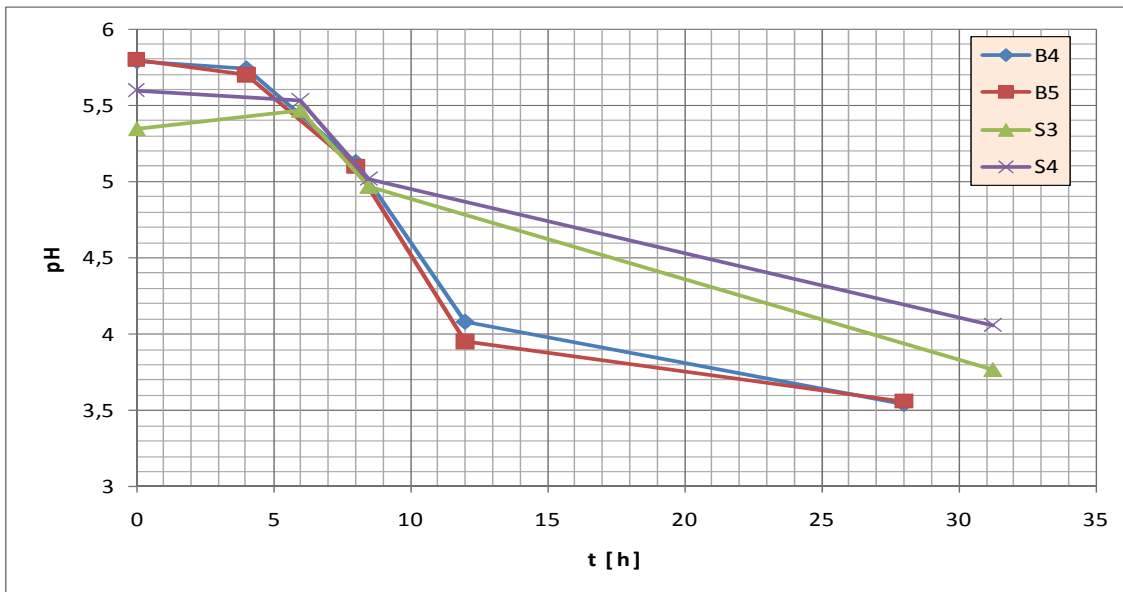


Figura 55 – Andamento del pH nelle prove B4-B5 e S3-S4 (FORSU)

Si riportano di seguito i risultati dell'interpolazione dei dati sperimentali della produzione cumulata specifica di idrogeno tramite l'equazione di Gompertz, sulla base della quale sono stati ricavati i parametri  $P_s$ ,  $R_m$  e  $\lambda$ , riportati in Tabella 10 e rappresentati nel grafico di Figura 57. È interessante notare come tutte le prove condotte siano caratterizzate da un tempo di acclimatazione simile, nonostante le diverse tipologie di substrato utilizzato.

Risulta evidente che il tasso specifico di produzione nel caso di refluo da suinicoltura è notevolmente inferiore, probabilmente a causa di una minore biodegradabilità del substrato.

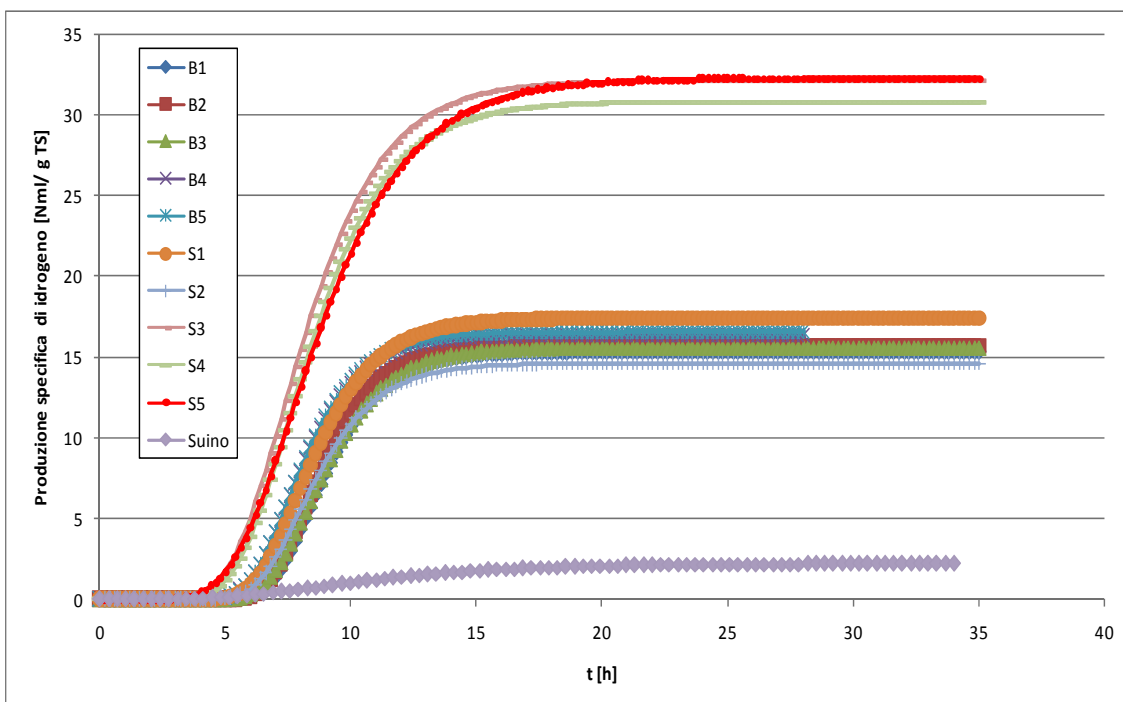
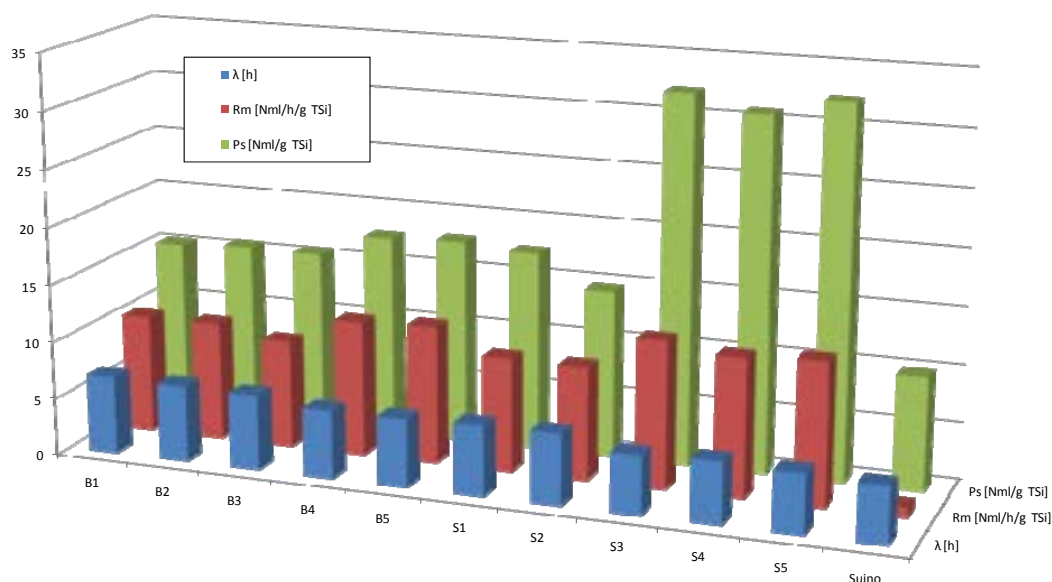


Figura 56 – Produzione cumulata specifica di idrogeno (FORSU e refluo da suinicoltura)

**Tabella 10 – Parametri del modello cinetico di Gompertz (FORSU e refluo da suinicoltura)**

	B1	B2	B3	B4	B5	S1	S2	S3	S4	S5	Suino
$\lambda$ [h]	6,8	6,67	6,58	5,93	5,95	6,15	6,2	5,13	5,37	5,18	4,91
Rm [Nml/h/g TSi]	10,4	10,4	9,44	11,8	12	9,96	9,89	12,8	12,1	12,5	0,9
Ps [Nml/g TSi]	15,3	15,7	15,6	17,6	17,8	17,4	14,6	32,1	30,8	32,3	9,89



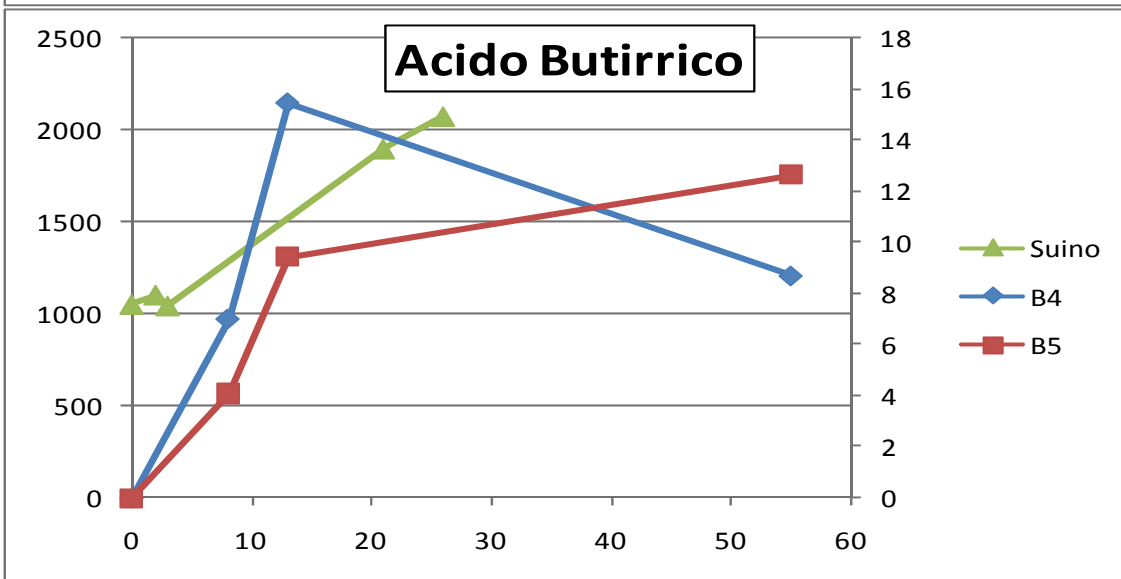
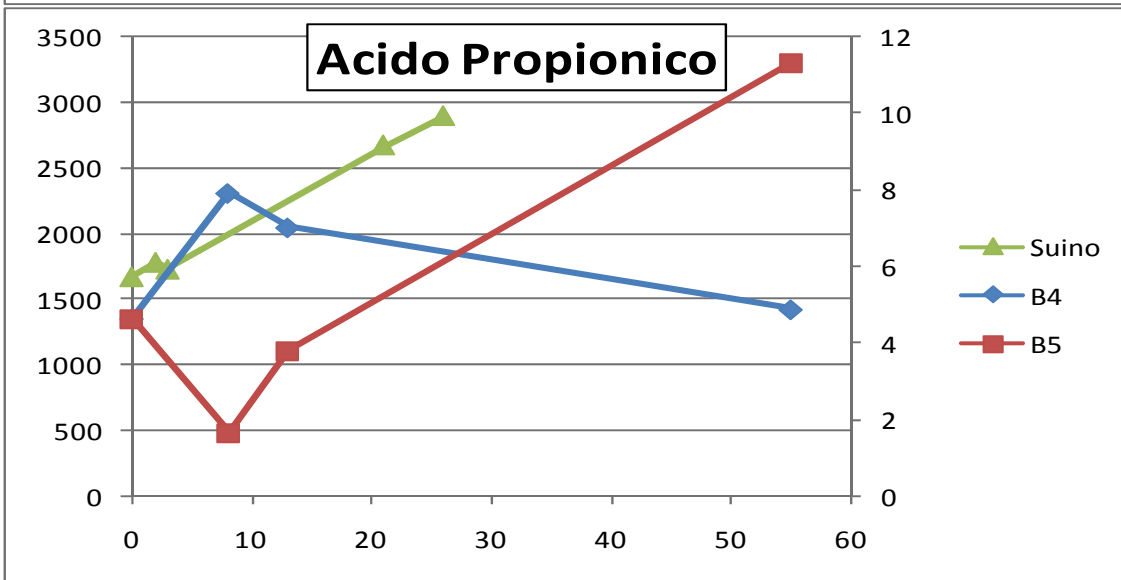
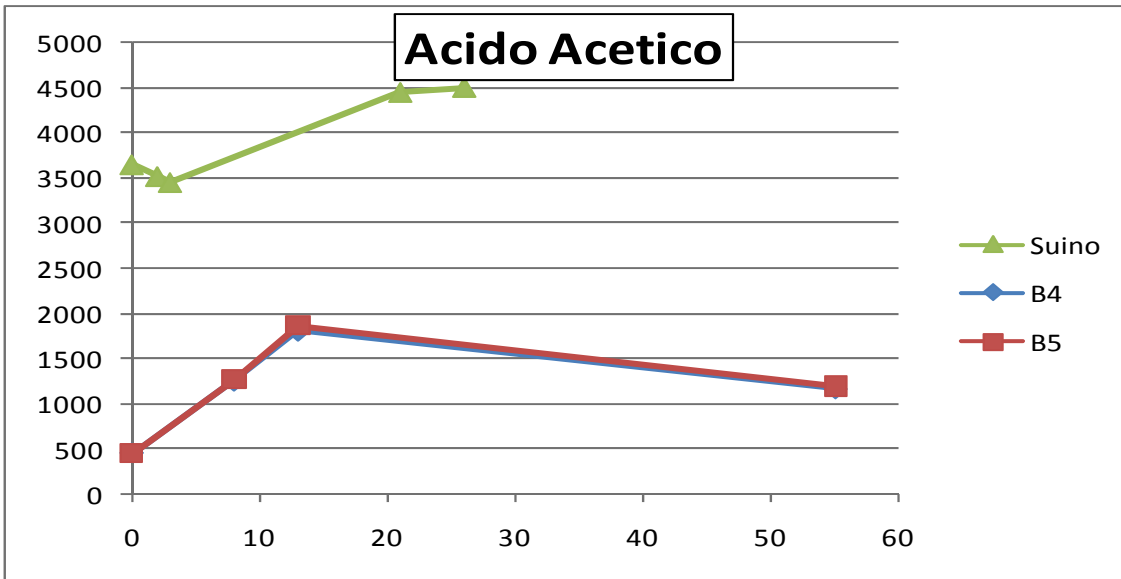
**Figura 57 – Rappresentazione dei parametri della curva di Gompertz**

Per quanto riguarda l'andamento della concentrazione degli acidi grassi volatili nel caso dei due differenti substrati, si è deciso di mettere a confronto le prove B4 e B5 con la prova condotta a pH 5.5 su refluo da suinicoltura, viste le identiche condizioni sperimentali (pH, concentrazione dell'inoculo e del substrato).

Dai dati riportati in Figura 58 è possibile osservare valori di concentrazione molto contenuti per l'acido valerico, il butirrico e il propionico nel caso delle prove condotte su FORSU, e valori confrontabili solo nel caso dell'acido acetico, che si attestano a valori di circa 4500 mg/l nel caso di refluo da suinicoltura e di circa 2000 mg/l nel caso della FORSU.

I più ridotti valori della concentrazione degli acidi a catena più lunga nel caso della FORSU sono probabilmente dovuti alla fermentazione acetica, che risulta prevalere sulle altre tipologie di fermentazione (propionica, butirrica e acido-mista).

Nel caso di refluo da suinicoltura, invece, le alte concentrazioni di tutti i VFA analizzati lasciano supporre che la tipologia di fermentazione prevalente sia quella acido-mista.



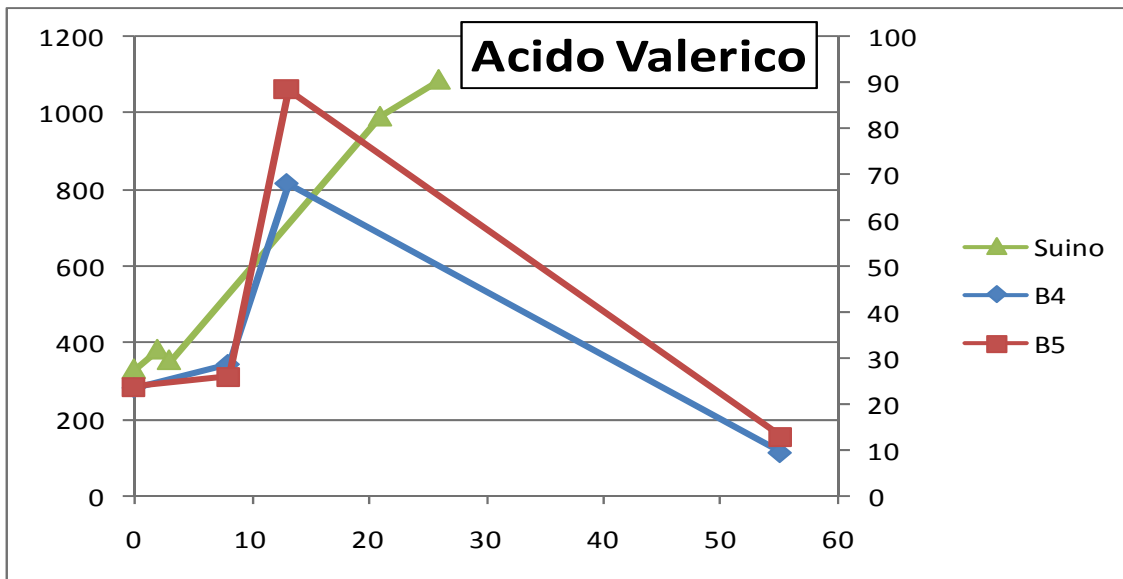


Figura 58 – Andamento delle concentrazioni dei VFA (FORSU e refluo da suinicoltura)

### 2.3.2 Confronto tra le prove su FORSU con e senza condizionamento del pH

Si intende nel presente paragrafo effettuare un confronto tra i risultati ottenuti nelle prove di digestione delle miscele contenenti FORSU in assenza e in presenza di azioni di condizionamento volte ad evitare un'eccessiva riduzione del pH durante il processo di digestione (prova con controllo in continuo del pH mediante sistema di titolazione automatica e prova con condizionamento per aggiunta di Mg metallico). La Figura 59 riporta un confronto tra le rese di produzione complessiva di biogas totale e di idrogeno per le tre prove di interesse.

La sperimentazione eseguita ha dimostrato come il controllo del pH della miscela al valore 5.5 sia in grado di produrre, rispetto alla prova senza correzione automatica del pH, un incremento della produzione cumulata di idrogeno da FORSU, sebbene tale incremento risulti di entità non particolarmente elevata (41 NI H<sub>2</sub>/kg SVT contro 38.5 NI H<sub>2</sub>/kg SVT). È opportuno tuttavia evidenziare che la regolazione in continuo del pH della miscela consente di garantire una stabilità del processo di digestione anaerobica sensibilmente migliore, assicurando la riproducibilità e la rappresentatività dei risultati sperimentali necessarie ai fini del trasferimento del processo stesso su scala maggiore.

Per quanto riguarda la prova di digestione in batch con condizionamento mediante aggiunta di Mg<sup>0</sup>, si è osservata una produzione cumulata di idrogeno pari a 67 NI H<sub>2</sub>/kg SVT, dunque con un significativo incremento rispetto ai migliori risultati delle prove batch precedentemente eseguite. Ovviamente tale guadagno nella produzione di idrogeno non è esclusivamente ascrivibile al processo biologico, ma è piuttosto da intendersi come risultato combinato di meccanismi di natura chimica e biologica.

È possibile, sulla base di un calcolo stechiometrico relativo al contributo della produzione chimica di H<sub>2</sub> a seguito del processo di ossidazione dell'Mg<sup>0</sup> a Mg<sup>2+</sup> e dell'associata riduzione dell'H<sup>+</sup> ad H<sub>2</sub>, valutare che la completa ossidazione del magnesio fornito durante la prova produrrebbe un volume di idrogeno gassoso pari a circa 34 NI H<sub>2</sub>/kg SVT; ne risulta pertanto prodotta per via biologica una quantità di 33 NI H<sub>2</sub>/kg SVT. Tale valore risulta pressoché analogo a quello ottenuto nella prova senza correzione di pH (pari a 38.5 NI H<sub>2</sub>/kg SVT). Si può pertanto concludere che il

guadagno in termini di produzione di idrogeno ottenuto nella prova con condizionamento con il magnesio metallico deve essere essenzialmente attribuito al contributo delle reazioni chimiche.

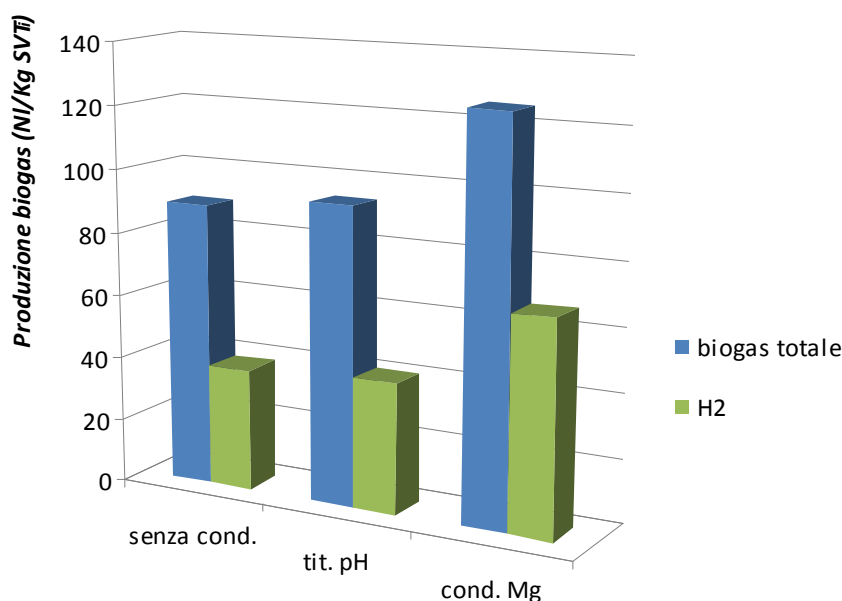


Figura 59 – Confronto tra produzione specifica di biogas nelle prove con e senza condizionamento del pH

## 2.4 Conclusioni

Dalla sperimentazione condotta si deduce che fra i substrati analizzati quello più idoneo ai fini della produzione di idrogeno mediante digestione anaerobica in due stadi, è rappresentato, nelle condizioni sperimentali investigate, la FORSU poiché questa risulta costituita in buona parte da macromolecole prontamente biodegradabili quali zuccheri ed aminoacidi che invece risultano praticamente assenti nel refluo da suinicoltura. Quest'ultimo è d'altro canto il risultato di una serie di prolungate degradazioni di materiale organico, e le elevate concentrazioni di VFA nel materiale non trattato costituiscono la conferma di precedenti processi acidogenici.

Si è verificata nel corso della sperimentazione la necessità di adottare, nel caso in cui si voglia studiare l'applicabilità del processo di produzione di idrogeno mediante digestione anaerobica di FORSU, un sistema di controllo automatico in continuo del pH. Questo ha infatti consentito di ottenere una maggiore stabilità del processo attraverso un'attenta regolazione dei processi metabolici, a cui è corrisposta una migliore ripetibilità dei risultati sperimentali.

Le elevate produzioni specifiche di idrogeno ottenute nelle prove in semi-continuo a pH controllato, che hanno raggiunto valori superiori a 110 NI H<sub>2</sub>/kg SVT alimentati nel caso della prova a pH = 7.0, indicano la potenziale applicabilità del processo di digestione anaerobica in due stadi della FORSU ai fini della produzione di idrogeno. Ciò anche in considerazione del fatto che, nelle migliori condizioni operative investigate, i tempi di residenza cellulare richiesti per ottenere i suddetti rendimenti di conversione in H<sub>2</sub> risultano piuttosto ridotti (dell'ordine di 48 ore) se confrontati con i tempi richiesti per la fase di digestione (dell'ordine di 15 giorni). Di conseguenza, l'introduzione di uno stadio dedicato per la produzione di idrogeno in uno schema di digestione

anaerobica tradizionale, implicando la necessità di volumetrie ridotte, comporterebbe per la sua realizzazione in piena scala costi di impianto relativamente contenuti.

È opportuno in ogni caso sottolineare come la possibilità di pervenire a valutazioni conclusive circa la fattibilità di un trasferimento in piena scala del processo richieda una serie di elaborazioni aggiuntive, quali l'esecuzione di bilanci di materia e di energia, il confronto tra le efficienze di conversione in biogas in schemi tradizionali a singolo stadio e a doppio stadio, e l'effettuazione di prove sperimentali su reattori pilota atte ad evidenziare eventuali problematiche connesse al passaggio di scala del processo.

## Bibliografia

---

- [1] Cheong D.-Y., Hansen C.L. (2006). Acidogenesis characteristics of natural, mixed anaerobes converting carbohydrate-rich synthetic wastewater to hydrogen. *Process Biochem.*, 41, 1736-1745.
- [2] Ciccoli R., De Gioannis G., Giordano G., Muntoni A., Poletini A., Pomi R. (2008). Batch and semi-continuous anaerobic digestion of biodegradable residues for biohydrogen production, In: Proc. SIDISA 2008, Simposio Internazionale di Ingegneria Sanitaria e Ambientale, Firenze, 24-27 giugno 2008.
- [3] De Gioannis G., Massi E., Moreno A., Muntoni A., Poletini A., Pomi R. (2007). Hydrogen production through anaerobic digestion of different solid and liquid waste: batch and semi-continuous tests, In: Proc. Sardinia 2007, Eleventh International Waste Management and Landfill Symposium, S. Margherita di Pula (CA), 1-5 ottobre 2007, session H1 (su CD ROM).
- [4] Eroğlu E., Gündüz U., Yücel M., Türker L., Eroğlu E. (2004). Photobiological hydrogen production by using olive mill wastewater as a sole substrate source. *Int. J. Hydrogen Energ.*, 21, 163-171.
- [5] Fan Y., Li C., Lay J.J., Hou H., Zhang G. (2004). Optimization of initial substrate and pH levels for germination of sporing hydrogen-producing anaerobes in cow dung composting. *Bioresource Technol.*, 91, 189-193.
- [6] Fang H.H.P., Liu H. (2002). Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresource Technol.*, 82, 87-93.
- [7] Gavala H.N., Skiadas I.V., Ahring B.K., Lyberatos G. (2006). Thermophilic anaerobic fermentation of olive pulp for hydrogen and methane production: modelling of the anaerobic digestion process. *Water Sci. Technol.*, 53, 271-279.

- [8] Gomez X., Moran A., Cuetos M.J., Sanchez M.E. (2006). The production of hydrogen by fermentation of municipal solid waste and slaughterhouse waste: a two-phase process. *J. Power Sources*, 157, 727-732.
- [9] Han S.K., Kim S.H., Kim H.W., Shin H.S. (2005). Pilot-scale two-stage process: a combination of acidogenic hydrogenesis and methanogenesis. *Water Sci. Technol.*, 52, 131-138.
- [10] Hawkes F.R., Dinsdale R., Hawkes D.L., Hussy I. (2002). Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimisation. *Int. J. Hydrogen Energ.*, 27, 1339-1347.
- [11] Hawkes F.R., Hussy I., Kyazze G., Dinsdale R., Hawkes D.L. (2007). Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophylic microflora: principles and progress. *Int. J. Hydrogen Energ.*, 32, 172-184.
- [12] Khanal S.K., Chen W.S., Li L., Sung S. (2004). Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products, *Int. J. Hydrogen Energ.*, 29, 1123-1131.
- [13] Kim I.S., Hwang M.H., Jang N.J., Hyun S.H., Lee S.T. (2004). Effect of low pH on the activity of hydrogen utilizing methanogen in bio-hydrogen process, *Int. J. Hydrogen Energ.*, 29, 1133-1140.
- [14] Kim S.H., Han S.K., Shin H.-S. (2004). Feasibility of biohydrogen production by anaerobic co-digestion of food waste and sewage sludge. *Int. J. Hydrogen Energ.*, 29, 1607-1616.
- [15] Lay J.J. (2000). Modelling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen. *Biotechnol. Bioeng.*, 68, 269-278.
- [16] Lay J.J., Lee Y.J., Noike T. (1999) Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste. *Water Res.*, 33, 2579-2586.
- [17] Levin B.D., Pitt L., Love M. (2004). Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *Int. J. Hydrogen Energ.*, 29, 173-185.
- [18] Lin C.Y., Lay C.H. (2004). Carbon/nitrogen ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. *Int. J. Hydrogen Energ.*, 29, 41-45.
- [19] Liu D., Liu D., Zeng R.J., Angelidaki I. (2006). Hydrogen and methane production from household solid waste in the two-stage fermentation process. *Water Res.*, 40, 2230-2236.
- [20] Oh S.E., Ginkel S.V., Logan B.E. (2003). Relative effectiveness of pH control and heat treatment for enhancing biohydrogen gas production. *Environ. Sci. Technol.*, 37, 5186-5190.
- [21] Okamoto M., Miyahara T., Mizuno O., Noike T. (2000). The relative effectiveness of pH control and heat treatment for enhancing biohydrogen gas production. *Water Sci. Technol.*, 41, 25-32.
- [22] Ting C.H., Lee D.J. (2007). Production of hydrogen and methane from wastewater sludge

using anaerobic fermentation. *Int. J. Hydrogen Energ.*, 32, 677-682.

- [23] Valdez-Vazquez I., Rios-Leal E., Esparza-Garcia F., Cecchi F., Poggi-Varaldo H.M. (2005a). Semi-continuous solid substrate anaerobic reactors for H<sub>2</sub> production from organic waste: mesophilic versus thermophylic regime. *Int. J. Hydrogen Energ.*, 30, 1383-1391.
- [24] Valdez-Vazquez I., Sparling R., Risbey D., Rinderknecht-Seijas N., Poggi-Varaldo H.M. (2005b). Hydrogen generation via anaerobic fermentation of paper mill wastes. *Bioresource Technol.*, 96, 1907-1913.
- [25] van Ginkel S., Logan B.E. (2005). Inhibition of biohydrogen production by undissociated acetic and butyric acids. *Environ. Sci. Technol.*, 39, 9351-9356.
- [26] van Ginkel S., Sung S. (2001). Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. *Environ. Sci. Technol.*, 35, 4726-4730.
- [27] Wang Q., Kuninobu M., Ogawa H.I., Kato Y. (1999). Degradation of volatile fatty acids in highly efficient anaerobic digestion, *Biomass Bioenerg.*, 16, 407-416.
- [28] Zheng X.J., Yu H.Q. (2005). Inhibitory effects of butyrate on biological hydrogen production with mixed anaerobic cultures, *J. Environ. Manage.*, 74, 66-70.