



**SAPIENZA**  
UNIVERSITÀ DI ROMA

---

**TESI DI DOTTORATO DI RICERCA IN INGEGNERIA ELETTRICA**  
*Scuola di Dottorato in Scienze e Tecnologie per l'Innovazione Industriale*

**XXV Ciclo**

**Analisi ed ottimizzazione del processo di produzione di energia elettrica mediante una cella a combustibile microbiologica (microbial fuel cell, MFC) alimentata da liquami zootecnici**

**Candidato**

Ing. Gianluca Petroni

**Coordinatore**

Prof.ssa Maria Sabrina Sarto

**Tutors**

Prof. Alberto Geri

Prof. Fabio Massimo Gatta

---

**Seconda Sessione del 2013**

*Tesi di Dottorato di Ricerca dell'Ing. Gianluca Petroni*  
*Dedica*

*alla mia mamma, Adriana*

## Indice della Tesi di Dottorato

Indice della Tesi di Dottorato .....	1
Introduzione.....	1
<b>Capitolo 1 - Principio di funzionamento delle celle a combustibile microbiche, Microbial Fuel Cells (MFC) .....</b>	<b>11</b>
1.1 La storia delle MFC .....	11
1.2 Pila a combustibile microbiologica .....	12
1.1.1 Pila a combustibile microbiologica con mediatore.....	13
1.1.2 Pila a combustibile microbiologica senza mediatore.....	13
1.2 Generazione di energia con la cella a combustibile microbiologica .....	14
1.2.1 Generazione dell'elettricità.....	14
1.2.2 Ulteriori usi .....	16
1.3 Processo Anodo: ossidazione microbica del substrato .....	17
1.4 Energia disponibile per la generazione di energia elettrica .....	18
1.4.1 Schema dei campi elettrici all'interno di una MFC.....	25
1.4.2 I parametri biologici, chimici ed elettrici utilizzati per valutare le prestazioni di una MFC.....	27
1.4.3 I tipi di celle a combustibile microbiche.....	33
1.5 Tabelle di confronto dei vari parametri delle MFC.....	35
<b>Capitolo 2 - I batteri e le comunità microbiche elettrogeniche.....</b>	<b>44</b>
2.1 Il biofilm .....	44
2.2 Molti batteri formano biofilm.....	46
2.3 I batteri e le comunità elettrogeniche .....	47
2.4 Metodi di studio dei biofilm.....	48
2.5 Biofilm microbico.....	49

2.6 Meccanismi di trasferimento degli elettroni sugli elettrodi .....	50
2.6.1 I modelli per i meccanismi di trasferimento degli elettroni che si verificano in un bioanodo.....	51
2.7 Andamento dei gradienti all'interno di un biofilm di <i>Geobacter</i> <i>sulfurreducens</i> elettrogeneratore .....	52
2.8 Biofilm sulle MFC in laboratorio.....	54
2.8.1 Analisi effettuate sul biofilm .....	55
2.9 Problematiche legate alla formazione di biofilm negli impianti industriali.....	58
2.9.1 Come i microrganismi formano biofilm, quorum-sensing.....	59
2.9.2 Adesione alla superficie .....	60
2.9.3 Formazione di microcolonie .....	61
2.9.4 Maturazione del biofilm .....	62
<b>Capitolo 3 - Impiego delle comunità batterica elettrogenica del <i>Geobacter</i> <i>sulfurreducens</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> nelle MFC .....</b>	<b>63</b>
3.1 Al via una banca batterica per conservare le specie più efficienti nella produzione di energia elettrica, dal <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ed oltre.....	63
3.2 Le cellule procariote.....	64
3.3 Molti tipi di procarioti sono mobili.....	68
3.4 Dalla respirazione dei batteri si può trarre energia con il trasferimento di elettroni agli accettori esterni.....	70
3.5 Fabbisogno di energia e risorse energetiche dei batteri .....	73
3.6 Sviluppo del biofilm di <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	74
<b>Capitolo 4 - Utilizzo delle biomasse per la produzione di energia elettrica .....</b>	<b>76</b>
4.1 Usare le biomasse come fonte di energia .....	76
4.2 Il trattamento delle deiezioni zootecniche in Italia .....	78

4.3 Il ciclo produttivo zootecnico .....	80
4.3.1 Impiego agricolo del compost .....	80
4.4 La biodigestione e la produzione di energia .....	82
4.5 Il processo di digestione anaerobica .....	83
4.5.1 Tipologie di digestori .....	86
4.5.2 Caratterizzazione ed utilizzo agronomico del digestato.....	87
4.5.3 Benefici agronomici nell'uso del digestato .....	88
4.5.4 Tecnologie per il trattamento del digestato .....	88
4.6 Caso studio: cogenerazione da BRUNI Enrico e Aldo SOC.AGR. S.S. Sutri (VT) .....	90
4.6.1 Caratteristiche di gestione e tipologia di finanziamenti .....	93
4.7 Inquadramento normativo del digestato .....	94
4.8 Incentivi economici per i produttori di energia.....	95
4.8.1 Tariffa onnicomprensiva .....	95
4.8.2 Certificati verdi .....	96
4.8.3 Potenzialità per lo sfruttamento a fini energetici delle biomasse ....	96
4.9 Il mercato del biogas In Italia .....	97
<b>Capitolo 5 - Azione di denitrificazione da parte delle MFC .....</b>	<b>99</b>
5.1 Il ciclo dell'azoto .....	99
5.2 I procarioti svolgono un ruolo importante nel suolo e nelle raccolte d'acqua.....	101
5.3 Trasformazioni organiche dell'azoto.....	101
5.4 L'azoto atmosferico può essere utilizzato direttamente da pochissimi organismi .....	103
4.8.1 Fissazione dell'azoto da parte dei microrganismi .....	105
5.5 Chimica del ciclo dell'azoto in natura .....	106
5.5.1 La catena alimentare .....	108

5.5.2	Geochimica isotopica e ciclo dell'azoto .....	108
5.6	Mineralizzazione .....	109
5.6.1	Nitrificazione .....	109
5.6.2	Denitrificazione.....	110
5.6.3	Nitrogenasi .....	111
5.7	I microorganismi azotofissatori anaerobi .....	111
<b>Capitolo 6 - Impianti industriali con MFC.....</b>		<b>113</b>
6.1	Impianto pilota di celle a combustibile microbiche alla Foster's Brewery, in Australia. ....	114
6.1.1	Il circuito idraulico .....	116
6.2	La MFC Mud Watt .....	121
6.2.1	I componenti che formano il circuito elettrico.....	124
6.2.2	Percorso e fasi di generazione della corrente in una MFC MudWatt .....	131
<b>Capitolo 7 - Analisi e commento dei dati sperimentali.....</b>		<b>134</b>
7.1	Funzionamento del potenziostato.....	134
7.1.1	Elettrodo di riferimento.....	136
7.2	Analisi e commento dei dati sperimentali-fase I: elettrodo a spazzola.....	137
7.2.1	Procedura sperimentale seguita nell'allestimento delle MFC .....	138
7.2.2	Misura delle grandezze elettriche: potenza elettrica prodotta e corrente erogata .....	148
7.2.3	Rimozione dei nutrienti.....	158
7.2.4	Analisi dei frammenti di restrizione.....	160
7.2.5	Altri parametri operativi: concentrazione di ossigeno, pH .....	162
7.3	Analisi e commento dei dati sperimentali-fase II: elettrodi piani in grafite e in gomma siliconica.....	162

7.3.1	Parametri chimici operativi: potenziale redox catodico, pH .....	178
7.3.2	Rimozione della sostanza organica .....	183
7.4	Analisi e commento dei dati sperimentali-fase III: variazione della concentrazione e del tipo del terreno di coltura .....	186
7.4.1	Andamento nel tempo delle grandezze elettriche .....	193
7.5	Analisi e commento dei dati sperimentali-fase IV: studio del catolita .....	206
7.5.1	Misura dei potenziali redox .....	212
7.5.2	Stazione di misura che consente di effettuare la misura delle grandezze elettriche su una microbial fuel cell .....	214
7.5.3	Misura della resistenza interna di una microbial fuel cells .....	216
7.5.4	Fenomeno del power overshoot .....	219
7.6	MFC con altri ceppi elettrogenici: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	224
7.7	Analisi e commento dei dati sperimentali-fase IV: analisi dei picchi.....	227
7.7.1	Voltammetrie cicliche e analisi dei picchi .....	230
7.7.2	Efficienza coulombica con la tecnica potenziometrica cronopotenziometrica.....	235
7.7.3	Voltammetria a scansione lineare .....	243
7.7.4	Spettroscopia di impedenza elettrochimica.....	247
7.8	Sperimentazione su un bio-reattore .....	251
7.8.1	Rimozione di azoto da digestato nel bio-reattore.....	270
7.8.2	Le curve di potenza e di polarizzazione del bio-reattore.....	273
7.8.3	Gli spurghi nelle camere del bio-reattore.....	281
7.8.4	Le voltammetrie cicliche del bio-reattore .....	287
	Conclusioni .....	290
	Riferimenti Bibliografici .....	294

## Introduzione

Il 28 gennaio del 2008 [1] la UE approva il pacchetto *clima-energia-ambiente* noto come protocollo “20-20-20” che fissa per il 2020 il raggiungimento di una riduzione del 20% delle emissioni di CO<sub>2</sub>, un aumento del 20% della quota di energia prodotta da fonti rinnovabili e un miglioramento del 20% dell’efficienza energetica. Per il nostro paese è previsto un taglio del 13% delle emissioni di CO<sub>2</sub> nei settori non inclusi nel sistema di scambio delle emissioni, un obiettivo vincolante per le fonti rinnovabili pari al 17% dei consumi nazionali e un miglioramento del 20% dell’efficienza energetica. Il 10 giugno 2010 il Ministero dello Sviluppo Economico, in ottemperanza alla direttiva 2009/28/CE, ha presentato il Piano di Azione Nazionale (PAN) per le energie rinnovabili e, nella parte dedicata agli obiettivi, il Ministero ha delineato anche la linea di azione del governo in merito alle fonti energetiche rinnovabili (FER), stabilendo che lo “sviluppo delle fonti rinnovabili è tra le priorità della sua politica energetica, insieme alla promozione dell’efficienza energetica”. Il PAN prevede pertanto che le FER debbano coprire il 6,38% del consumo energetico del settore dei trasporti, il 15,83% dei consumi per riscaldamento-raffreddamento e il 28,97% del fabbisogno di energia elettrica (EE). Rispetto al 2005, anno di riferimento per il protocollo “20-20-20”, è previsto quindi un incremento della produzione di EE da FER del 88%. Per quanto riguarda, specificatamente, il contributo delle biomasse nella produzione di EE, si dovrà passare dal 1,35% nel 2005, al 5,74% del 2020, con un incremento percentuale di poco inferiore al 350% (cfr. Tabella 1):

*Tabella 1 - Produzione di EE da FER: il contributo delle biomasse [2].*

Produzione di EE da FER	2005			2020		
	MW	GWh	%	MW	GWh	%
	18220	56349	16,29%	45885	105950	28,97%
<b>Biomasse</b>	<b>1990</b>	<b>4674</b>	<b>1,35%</b>	<b>4650</b>	<b>21000</b>	<b>5,74%</b>

Dal rapporto statistico del Gestore Servizi Energetici, GSE relativo all’anno 2009, risulta che nel bilancio elettrico nazionale la copertura del fabbisogno lordo ottenuta con le FER ha raggiunto il 21,20% del totale. Il dato piuttosto confortante delle FER non deve però trarre in inganno, perché nell’anno 2009 due fattori hanno contribuito in modo determinante a questo risultato: in primo luogo la riduzione del 6% dei consumi rispetto al 2008, dovuto alla crisi economica; in secondo luogo, le favorevoli condizioni di idraulicità registrate nel 2009, che hanno portato ad un incremento della produzione idroelettrica del 18% rispetto all’anno precedente.



Tabella 2 - Bilancio elettrico nazionale in TWh e fonti rinnovabili [2], anno 2009.

<b>CONSUMI</b>	Agricole	1,90%	5,70		
	Domestiche	23,00%	68,90		
	Industriali	43,50%	130,50		
	Terziario	31,60%	94,80	93,63%	299,90
<b>PERDITE</b>				6,37%	20,40
<b>FABBISOGNO</b>	<b>(-6% rispetto al 2008)</b>			<b>TWh</b>	<b>320,30</b>
<b>PRODUZIONE</b>	Convenzionali			64,70%	207,30
<b>Fonti Rinnovabili</b>	<b>Biomasse</b>	<b>2,20%</b>	<b>7,20</b>		
	Eolica	2,00%	6,50		
	Geotermica	1,60%	5,00		
	<b>Idrica</b>	<b>15,20%</b>	<b>48,60</b>		
	Solare	0,20%	0,70	21,20%	68,00
<b>IMPORT</b>				14,10%	45,00

Le biomasse hanno contribuito solo per il 2,20% alla copertura del fabbisogno complessivo, beneficiando anch'esse, in termini percentuali, della riduzione dei consumi registrata nel 2009. Ancora lontano e quindi l'obiettivo del 5,74% previsto dal PAN per il 2020, che imponga un trend di crescita per i prossimi 10 anni di circa 1300 GWh per anno (Fig. 1).

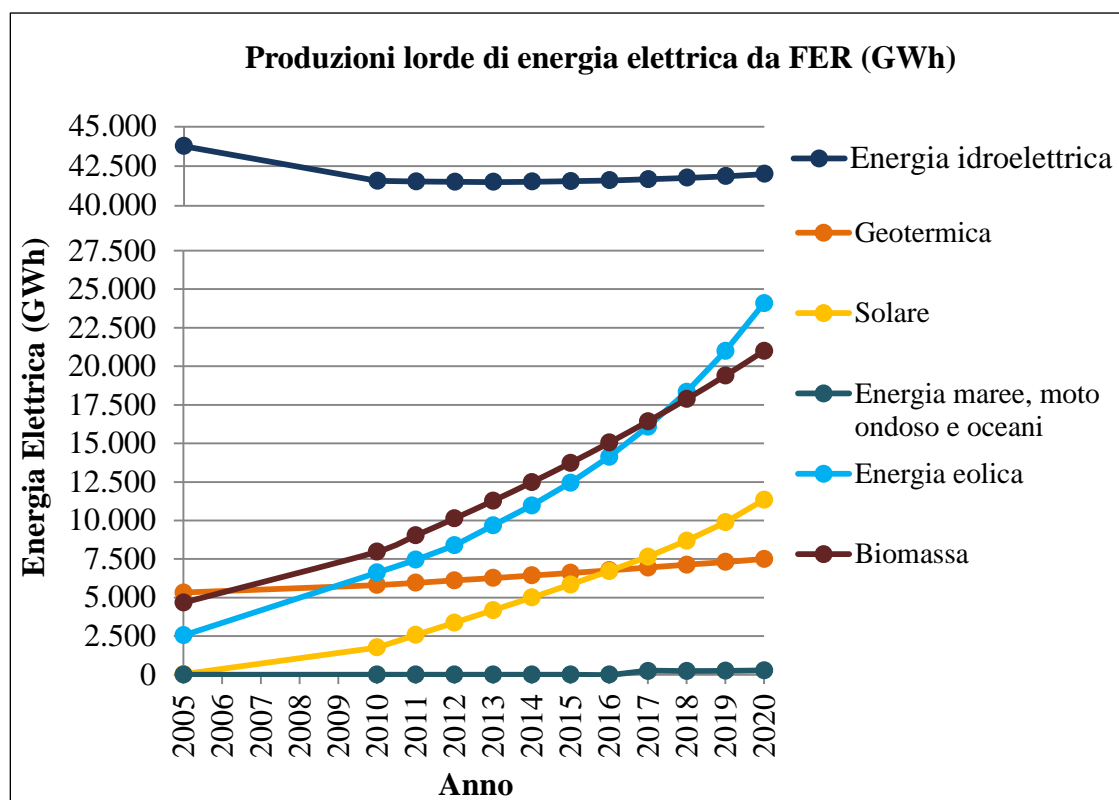


Figura 1 - Trend di crescita atteso per la produzione di EE da FER: periodo 2010-2020 [3].

Analizzando più in dettaglio l'universo delle biomasse<sup>1</sup>, in relazione alle specifiche connotazioni ed alla natura dei materiali che le compongono, si possono individuare tre filiere principali: delle biomasse solide, delle biomasse liquide e di quelle gassose. Nello specifico, gli impianti a biomasse solide sono alimentati dalla frazione organica dei rifiuti solidi urbani (RSU) oppure da prodotti o residui di natura forestale, agricola o dell'industria; gli impianti a bioliquidi sono alimentati da oli vegetali grezzi/raffinati o da altri bioliquidi; gli impianti a biogas sono alimentati da gas generati ad esempio da depuratori, discariche, da processi di digestione anaerobica (di deiezioni, colture dedicate, scarti ecc.). L'attuale peso percentuale delle tre filiere, con gli obiettivi di produzione lorda di EE riferiti al 2020 e fissati dal PAN, sono riportati nella Tabella 3:

*Tabella 3 - Produzione lorda di EE degli impianti alimentati da FER [2].*

FONTE	2009			2020		
	MW	GWh	%	MW	GWh	%
<b>Produzione EE da FER</b>	<b>26519</b>	<b>69330</b>	<b>20,80%</b>	<b>45885</b>	<b>105950</b>	<b>28,97%</b>
<b>Idraulica</b>	17721	49137	14,74%	15732	42000	11,49%
<b>Eolica</b>	4898	6543	1,96%	16000	24095	6,59%
<b>Solare</b>	1144	677	0,20%	8500	11350	3,10%
<b>Geotermica</b>	737	5342	1,60%	1000	7500	2,05%
<b>Biomasse</b>	2019	7631	2,29%	4650	21000	5,74%
<i>Solide</i>	1256	4444	1,33%	3000	11500	3,14%
<i>Biogas</i>	378	1739	0,52%	750	3200	0,88%
<i>Bioliquidi</i>	385	1448	0,43%	900	6300	1,72%

Mentre nella Tabella 4 sono quantificate la diffusione e la consistenza degli impianti a biomasse, suddivisi per le tre tipologie, unitamente alle variazioni percentuali rispetto al 2008:

*Tabella 4 - Diffusione e consistenza degli impianti alimentati a biomasse [2].*

BIOMASSE		IMPIANTI		POTENZA		ENERGIA	
		N°	(09-08)%	MW	(09-08)%	TWh	(09-08)%
<b><i>Solide</i></b>		<b>122</b>	<b>10,90</b>	<b>1.255,41</b>	<b>17,50</b>	<b>4,44</b>	<b>3,30</b>
	RSU	69	6,20	781,96	26,20	1,62	3,90
	Solide	53	17,80	473,44	5,40	2,83	3,00
<b><i>Biogas</i></b>		<b>273</b>	<b>13,80</b>	<b>378,18</b>	<b>3,40</b>	<b>1,74</b>	<b>8,80</b>
	Rifiuti	194	0,50	299,25	-2,50	1,45	6,80
	Fanghi	20	81,80	9,92	70,40	0,02	35,50

<sup>1</sup> Secondo il D.Lgs. 29 Dicembre 2003, N. 387 la biomassa è "la parte biodegradabile dei prodotti, rifiuti e residui provenienti dall'agricoltura (comprendente sostanze vegetali ed animali) e dalla silvicoltura e dalle industrie connesse, nonché la parte biodegradabile dei rifiuti industriali ed urbani".

	Deiezioni	28	47,40	17,17	35,40	0,09	26,70
	Agricoltura	31	93,80	51,84	29,00	0,18	15,00
	<b>Bioliquidi</b>	<b>42</b>	<b>250,00</b>	<b>384,97</b>	<b>217,60</b>	<b>1,45</b>	<b>2144,10</b>
	Oli	35	337,50	302,54	455,00	1,05	3394,90
	Altro	7	75,00	82,42	23,60	0,40	1054,90

Dal censimento degli impianti a biogas è emerso un dato significativo: il trend di crescita estremamente elevato (soprattutto nelle regioni del centro-nord) degli impianti a biogas di taglia medio-piccola (0,1-1 MW) abbinati a digestori anaerobici (e.g., alimentati con reflui zootecnici integrati da biomasse vegetali agricole, perché ritenuti i più vantaggiosi). I motivi della crescente diffusione di questi impianti sono:

- non necessitano di investimenti importanti rispetto ad esempio agli impianti a biomasse solide;
- sono relativamente facili da realizzare e da gestire, oltre ad avere ridotti costi di gestione;
- si prestano ad installazioni di tipo micro-imprenditoriale o addirittura "domestico".

In funzione della taglia dell'impianto e del tipo di alimentazione, si hanno tempi di rientro degli investimenti di 5-12 anni, calcolati con la tariffa onnicomprensiva, TO di 0,22 €/kWh (attualmente la TO è invece di 0,28 €/kWh, il che riduce ulteriormente i tempi di rientro rendendo più remunerativo l'investimento). Si osservi che questi impianti hanno costi stimati di generazione dell'energia elettrica che si attesta sui 0,18-0,22 €/kWh, che salgono a 0,27 €/kWh abbinando il teleriscaldamento (a causa degli elevati costi degli impianti), scendono invece a 0,195 €/kWh se la generazione elettrica si accoppia al riscaldamento delle serre, e addirittura si riducono a 0,162 €/kWh in impianti cogenerativi industriali.

Un esempio di schema di principio di un generico impianto a biogas abbinato ad un digestore anaerobico è illustrato in figura 2: una o più fasi di idrolisi (fermentatori tubolari orizzontali con agitatori), che lavorano in ambiente mesofilo, sono seguite da una fase di igienizzazione e di disintegrazione termica, installata a livello intermedio, e da una fase di metanizzazione (digestori secondari verticali), che opera in ambiente termofilo, il metano così prodotto viene inviato ad un gruppo termoelettrico convenzionale a recupero di calore. La realizzazione di impianti realizzati con più stadi in cascata interconnessi consente di ottenere una produttività specifica di energia considerevolmente maggiore.

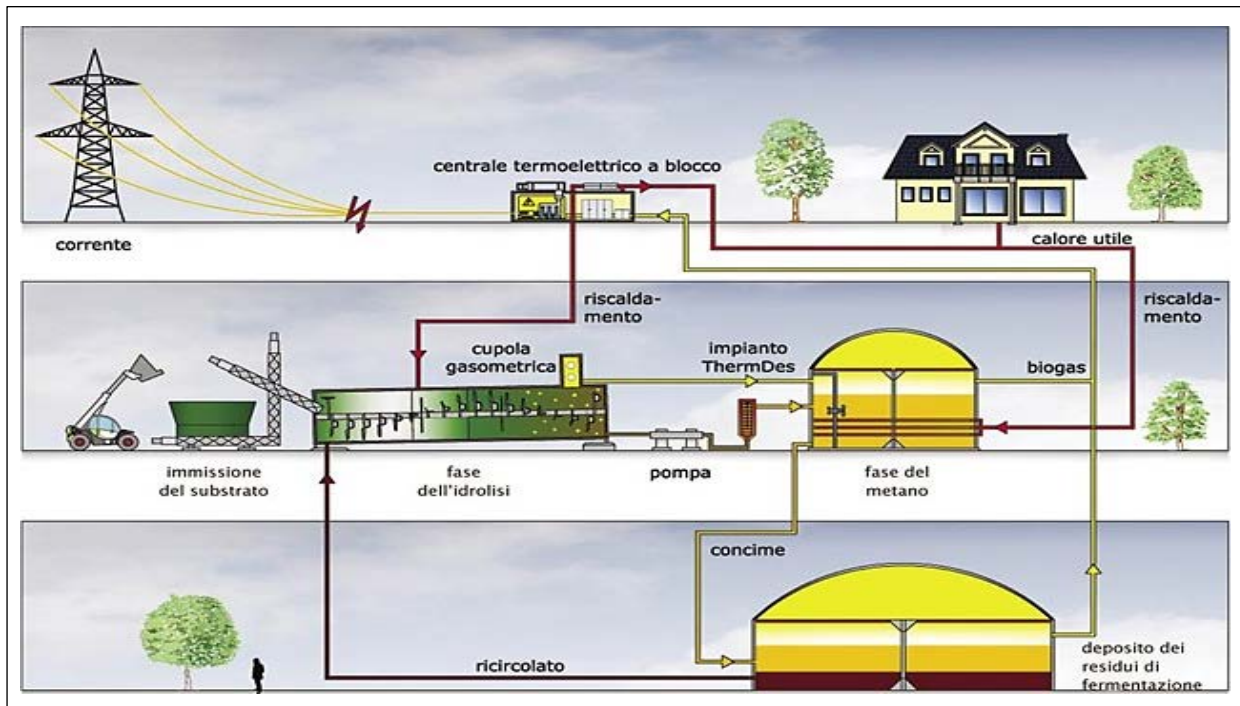


Figura 2 - Schema di principio di un biodigestore anaerobico per la produzione combinata di energia elettrica e calore, da 500 kW. Fonte: Archea Italia Srl.

I biodigestori anaerobici sono ormai impianti tecnologicamente maturi che presentano anche una buona redditività; tuttavia, alcune intrinseche criticità funzionali ancora ne penalizzano le performance e ne limitano le possibilità d'impiego:

– in relazione all'efficienza del/dei fermentatore/fermentatori la componente organica del digestato può non essere trascurabile (ovvero, non tutta l'energia disponibile nell'alimentazione alla fine risulta convertita in energia elettrica e calore, si possono infatti stimare rendimenti massimi di conversione pari a circa 80%);

– in relazione al tipo di alimentazione (e.g., alimentazione mediante biomasse vegetali e liquami zootecnici, in particolare suinicoli) ed alle dimensioni dell'azienda, le concentrazioni dei nitrati nel digestato possono non essere compatibili (> 170-210-340 kgN/ha/a) con uno suo diretto utilizzo come ammendante agricolo.

È attualmente allo studio l'introduzione di una nuova tecnologia che potrebbe migliorare sensibilmente l'efficienza e l'efficacia dei biodigestori anaerobici. Questa tecnologia si basa sull'impiego delle celle a combustibile microbiologiche (MFCs, Microbial Fuel Cells).

Una MFC è un sistema bio-elettrochimico che converte direttamente energia chimica in energia elettrica durante le attività cataboliche in anaerobiosi di consorzi microbici elettrogenici (Fig. 3).



Figura 3 - Consorzio microbico elettrogenico: costituito da *Geobacter sulfurreducens*. In evidenza il flagellum (i.e. il “baffo” che si estende dal corpo del batterio) mediante il quale il batterio si àncora alla superficie elettrodica formando il biofilm, ed attraverso il quale trasferisce all’anodo gli elettroni prodotti durante il processo catabolico.

La cella è costituita da un comparto anodico (anaerobico) ed uno catodico (aerobico) separati o meno da una membrana a scambio protonico. Nel comparto anodico un substrato organico (glucosio, acetato, reflui civili, zootecnici, od industriali, ecc.) viene ossidato da un consorzio microbico elettrogenico, generando elettroni e protoni.

Gli elettroni, trasferiti all’anodo dal consorzio batterico, raggiungono il catodo (generando una corrente elettrica) attraverso un circuito elettrico esterno; mentre, i protoni passano (attraverso una membrana o direttamente) nel comparto catodico, dove insieme agli elettroni vengono ridotti, combinandosi con l’ossigeno, per formare acqua (Fig. 4).

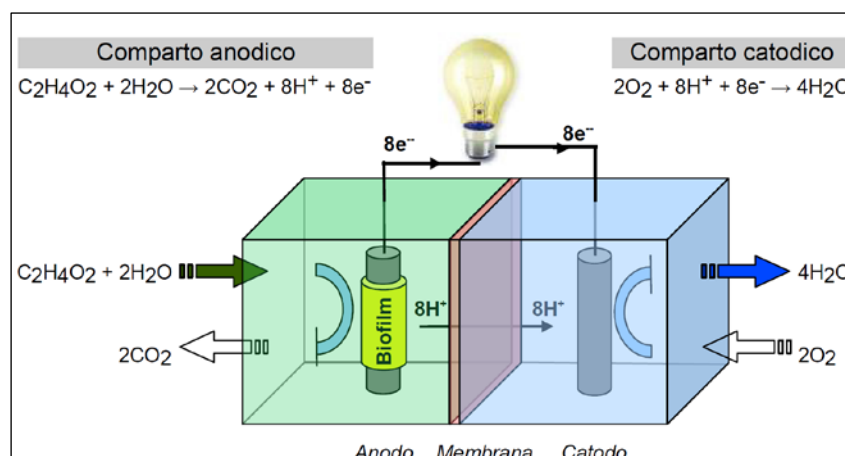


Figura 4 - Principio di funzionamento di una cella a combustibile microbiologica (MFC) alimentata con una soluzione acquosa di acetato [1].

L'evoluzione delle conoscenze su queste celle ebbe inizio nel 1912, quando M. C. Potter, professore di botanica alla Durham University, evidenziò l'esistenza e le proprietà dei batteri elettrogenici. Solo nel 1931, Barnet Cohen, impiegando il batterio *Escherichia coli*, riuscì a realizzare una prima semi-cella capace di produrre 2 mA a 35 V. Un ulteriore passo avanti nelle conoscenze su queste celle si ebbe nel 1963, quando Del Duca riuscì, con il batterio *Clostridium butyricum*, a produrre, per la prima volta, idrogeno in modo instabile mediante la fermentazione del glucosio. Solo nel 1976 Suzuki riuscì però a stabilizzare la produzione di idrogeno e, nell'anno successivo, propose anche la prima cella a combustibile microbiologica nella concezione attuale. Infine, negli anni '80, H. Peter Bennetto, del King's Collage of London, concepì la cella come un possibile metodo per produrre energia elettrica, ed i suoi lavori fecero chiarezza su molteplici aspetti del suo funzionamento. Dagli anni '80 ad oggi le MFC sono state oggetto di un crescente interesse da parte della comunità scientifica internazionale, testimoniato dagli innumerevoli studi apparsi sulle più importanti riviste di settore, nonché dai finanziamenti comunitari concessi per promuovere direttamente e/o indirettamente ricerche di base e/o applicate su queste celle a combustibile. Attualmente esistono anche alcuni tentavi di impieghi industriali delle MFC, ne è un esempio l'impianto pilota realizzato dall' "Advanced Water Management Centre" per il trattamento delle acque reflue della birreria Foster, che ha un volume di 1 m<sup>3</sup>, ripartiti in 12 moduli, ed una potenza presunta di 1 kW (Fig. 5).



*Figura 5 - Impianto pilota realizzato presso le birrerie Foster. Fonte: The University of Queensland, Australia, 4.12.2008.*

La conversione dell'energia chimica del substrato organico in energia elettrica, operata nelle celle MFC dai batteri elettrogenici, viene effettuata direttamente, ovvero senza combustione, e

quindi senza produzione di CO<sub>2</sub> (se non quella legata al naturale processo di respirazione batterica). Un altro aspetto particolarmente interessante di questa tecnologia è che le celle consentono la rimozione, praticamente quantitativa, dei nitrati presenti nel substrato di alimentazione dell'impianto, quindi i batteri elettrogenici svolgono anche una funzione denitrificante (Fig. 6).

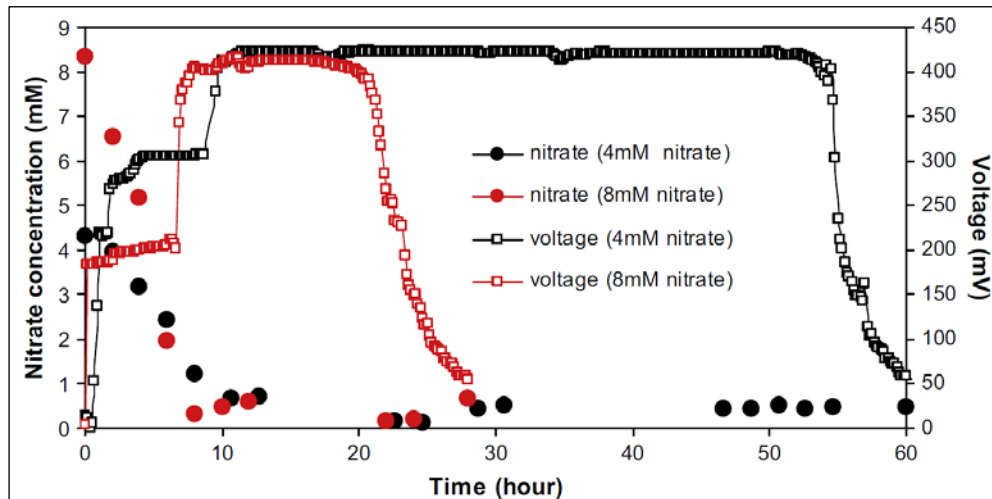


Figura 6 - Rimozione quantitativa dei nitrati dal substrato di alimentazione con tempi di ritenzione di 12-24 ore per concentrazioni di 4 mM e di 8 mM; la tensione generata dalla cella è di 400-450 mV per entrambe le concentrazioni [4].

Tuttavia, essendo ancora nella fase di sperimentazione ed ingegnerizzazione, il sistema presenta ancora alcune criticità funzionali, legate principalmente all'elevata resistenza interna, che ne limita l'efficienza elettrica. Attualmente, la comunità scientifica internazionale, al fine di migliorare le prestazioni di questi sistemi, sta indirizzando gli sforzi nel:

- ripensare le configurazioni delle celle (potrebbe essere una soluzione l'impiego di piccole unità fra loro interconnesse);
- utilizzare materiali e fluidi (e.g., acqua salmastra) conduttivi;
- selezionare opportuni consorzi microbici (i batteri elettrogenici possono ridurre la resistenza interna della cella, che dipende anche dalla facilità con cui vengono ceduti elettroni all'anodo);
- pre-assemblare il bio-elettrodo (precostituire all'anodo un biofilm con opportuni consorzi batterici elettrogenici).

Gli obiettivi che la comunità scientifica internazionale si è posta nel breve-medio periodo sono:

- il trattamento delle acque reflue caratterizzate da 0,1-10 kg/m<sup>3</sup>·giorno di COD;
- di raggiungere potenze specifiche per unità di volume dell'ordine di 1,25 kW/m<sup>3</sup> (gli attuali valori sono di 0,1-0,15 kW/m<sup>3</sup>);

– di contenere i costi di questi impianti a circa € 4.000 al m<sup>3</sup> di comparto anodico con una potenza specifica di 1 kW/m<sup>3</sup> (si osservi che questi costi possono ancora essere fino a 10 volte quelli di un biogas attuale, ma questi sistemi operano a temperatura ambiente).

Sebbene sia estremamente accattivante l'idea di una conversione diretta in energia elettrica della frazione organica dei reflui zootecnici e biomasse vegetali (elevati rendimenti a zero emissioni), da quanto sopra esposto appare evidente che, allo stato attuale, questa tecnologia non è ancora matura per proporsi come una valida alternativa tecnica-economica ai biodigestori anaerobici. Tuttavia, le MFC possono vantaggiosamente integrarsi con gli attuali impianti a biogas.

L'installazione di impianti MFC come unità bottom repowering di biodigestori anaerobici presenta infatti due indiscutibili vantaggi:

- valorizzazione energetica della frazione organica ancora presente nel digestato (~20%);
- rimozione quantitativa dei nitrati.

Quanto sopra esposto è stato il punto di partenza della Tesi di Dottorato che poi si è sviluppata ed il lavoro è stato strutturato in 8 Capitoli:

□ nel Capitolo 1 si è illustrata la storia delle MFC ed è stato fornito un quadro generale delle principali tipologie di pile a combustibile microbiologica, in particolare quelle con e senza mediatore; sono state presentate considerazioni generali sulla generazione di energia e gli ulteriori usi delle MFC ed è stata affrontata la descrizione dei loro principi di funzionamento relativi agli aspetti chimici ed elettrici, nonché dei parametri biologici; viene infine riportata un confronto dei vari parametri delle MFC;

□ nel Capitolo 2 si sono analizzati i batteri e le comunità microbiche, in relazione alla produzione biologica di elettricità; viene spiegato cos'è il biofilm batterico ed è stata analizzata la sua formazione e tutti i fattori che ne concorrono, ed inoltre gli attuali metodi di investigazione del biofilm; si è riportato come è avvenuta la crescita del biofilm sugli elettrodi nelle MFC in laboratorio;

□ nel Capitolo 3 ci si è concentrati sulle comunità microbiche elettrogeneratrici, spiegando il loro impiego nelle batterie biologiche, in particolare il ceppo del *Geobacter sulfurreducens* e dello *Pseudomonas aeruginosa*, che sono stati quelli impiegati nelle MFC in scala di laboratorio;

□ nel Capitolo 4 viene approfondito l'utilizzo nei sistemi di trattamento biologico dei processi di trattamento dei reflui e vengono fatte anche delle considerazioni generali sull'efficienza energetica degli impianti di trattamento delle deiezioni zootecniche. Sono stati riportati degli schemi di impianto a digestori e il loro processo di digestione anaerobica, ed anche le tecnologie



ed i benefici agronomici per il trattamento del digestato; si è trattato del caso-studio di cogenerazione da biomassa, oggetto di un'indagine sperimentale, con la valutazione dei consumi energetici in un impianto in scala industriale; infine si è riportato l'inquadramento normativo, gli incentivi economici per la produzione della fonte energetica rinnovabile, FER e le potenzialità per lo sfruttamento a fini energetici delle biomasse ed il mercato del biogas in Italia;

□ nel Capitolo 5 è stata approfondita l'azione di denitrificazione da parte delle MFC, con il ruolo che viene svolto dai batteri procarioti e le trasformazioni dell'azoto; viene illustrato anche il ciclo dell'azoto, la fissazione da parte dei diversi tipi di microrganismi, la loro importanza con tutte le conseguenze sulla catena alimentare;

□ nel Capitolo 6 vengono riportati 2 esempi di impianti con MFC; del primo, della Foster's Brewery, nel Queensland in Australia sono elencati e spiegati tutti i parametri di funzionamento, mentre il secondo sistema è la Mud Watt, dedicato alla generazione distribuita dell'energia elettrica che impiega il fango come alimentazione ed è commercializzata dalla KeegoTech, un'azienda canadese;

□ nel Capitolo 7 si riportano tutti i risultati ottenuti durante le 4 fasi di sperimentazione (fasi I-II-III-IV), espressi sia in termini di efficienze di rimozione che in termini di produzione di energia elettrica. Sono riassunte le attività sperimentali svolte sulle diverse MFC realizzate in laboratorio, durante la fase I di sperimentazione (elettrodo a spazzola), i risultati ottenuti nella determinazione dei parametri elettrici; per la fase II di sperimentazione (elettrodi piani in grafite e in gomma siliconica) sono riportati i parametri chimici operativi e le rimozioni della sostanza organica per quelle stesse MFC; per la fase III di sperimentazione (variazione della concentrazione e del tipo del terreno di coltura) sono riportati i grafici con gli andamenti nel tempo delle grandezze elettriche, i valori dei potenziali redox delle MFC; per la fase IV di sperimentazione (analisi dei picchi) vengono passate in rassegna le tecniche elettrochimiche, riferendole a quelle potenziostatiche, attuate per studiare le MFC in sperimentazione. Si riporta anche la sperimentazione su un bio-reattore, con tutti i risultati della caratterizzazione della biomassa presente nel bio-reattore mediante analisi chimiche e di tutte le grandezze elettriche;

□ nel Capitolo 8, infine, sono presentate le conclusioni sulle bioenergie cui si è giunti con il presente lavoro.

## Capitolo 1

### Principio di funzionamento delle celle a combustibile microbiche, Microbial Fuel Cells (MFC)

#### 1.1. La storia delle MFC

All'inizio dello scorso secolo venne concepita l'idea di usare cellule microbiologiche per cercare di produrre elettricità. M. C. Potter fu il primo a lavorare sull'argomento nel 1912. Potter fu un professore di botanica alla Durham University e fu in grado di produrre elettricità dall'*Escherichia coli*, ma il suo lavoro non fu seguito più di tanto. Nel 1931 tuttavia Barnet Cohen rivolse più attenzione all'argomento quando costruì alcune mezze pile a combustibile microbiologiche che, quando connesse in serie, erano in grado di produrre oltre 35 V, Volt anche se con una corrente di soli 2 mA, milliAmpere [1]. Un ulteriore lavoro sul soggetto venne con uno studio [6] che usò l'idrogeno prodotto dalla fermentazione del glucosio fatta dal *Clostridium butyricum* come reagente all'anodo di una pila a combustibile a idrogeno e aria. Sfortunatamente, anche se la pila funzionava, si scoprì essere inaffidabile a causa della natura instabile della produzione di idrogeno dai microorganismi [6]. Anche se questo problema fu in seguito risolto dal lavoro [7], il progetto di produrre corrente dalla pila a combustibile microbiologica fu realizzato un anno dopo, con un altro lavoro [8]. Anche se quando Suzuki lavorò al progetto alla fine degli anni settanta si capiva poco del funzionamento di queste pile microbiologiche, l'idea fu raccolta e studiata in seguito in maggiore dettaglio prima da M. J. Allen e poi da H. Peter Bennetto, entrambi del King's College London. Bennetto vide nella pila un metodo possibile per la generazione di elettricità nei paesi del terzo mondo [9]. Il suo lavoro, cominciato all'inizio degli anni ottanta, aiutò nella comprensione del funzionamento delle pile a combustibile e fino alla sua pensione fu visto da molti come la maggiore autorità nell'argomento.

A metà del 1990, B-H. Kim ed i suoi colleghi presso l'Istituto Koreano di Scienza e Tecnologia (KIST) ha mostrato che il batterio *Shewanella oneidensis* (ex *Shewanella putrefaciens*) Fe (III)-riduttore, era elettrochimicamente attivo: per esempio, potrebbe generare energia elettrica in una cella a combustibile microbico senza aggiunta di mediatori di elettroni. Questo gruppo di ricerca ha anche dimostrato che in un dispositivo elettrochimico a cella a combustibile microbico potrebbero essere utilizzati combustibili organici per arricchire i microbi elettrochimicamente

attivi che quindi ossidano i diversi materiali organici. Da allora l'attività elettrochimica è stata osservata in molti ceppi batterici diversi, e diversi disegni di celle a combustibile sono state testate utilizzando colture pure e colture miste arricchite. Si ritiene che nei batteri elettrochimicamente attivi il trasferimento di elettroni faccia parte del normale metabolismo di elettroni attraverso citocromi nella membrana citoplasmatica, periplasma e la membrana esterna.

## 1.2 Pila a combustibile microbiologica

Una pila a combustibile microbiologica (*microbial fuel cell, MFC*) [150] o *pila a combustibile biologica* è un sistema bio-elettrochimico che genera corrente imitando le interazioni batteriche che si trovano in natura. I microrganismi catabolizzano composti come il glucosio [10], l'acetato, il butirato [11] o le acque reflue [12]. Gli elettroni ottenuti con questa ossidazione vengono trasferiti su di un anodo, dal quale passano attraverso un circuito elettrico prima di arrivare al catodo e da qui vengono trasferiti a un accettore di elettroni ad alto potenziale come l'ossigeno. Mentre la corrente scorre grazie alla differenza di potenziale, la potenza viene generata direttamente dal biocarburante tramite l'attività catalitica dei batteri [23]. Una pila a combustibile microbiologica è uno strumento che converte l'energia chimica in energia elettrica tramite la reazione catalitica dei microorganismi [9]. Una pila microbiologica tipica consiste in un compartimento anodico e uno catodico separati da una membrana semipermeabile per i cationi. Nel compartimento dell'anodo il carburante viene ossidato dai microorganismi, generando elettroni e protoni. I protoni vengono trasferiti al catodo attraverso la membrana; elettroni e protoni vengono consumati nel comparto del catodo, combinandosi con l'ossigeno per formare acqua. Le pile a combustibile biologiche prendono il glucosio e il metanolo dagli scarti di cibo e li convertono in idrogeno e cibo per i batteri. In essa, infatti, i microrganismi degradano la materia organica presente producendo elettroni: ciò determina la possibilità di realizzare contemporaneamente la produzione di energia elettrica e la depurazione di liquami [13], [14]. Lo sviluppo di processi che possono utilizzare i batteri per produrre energia elettrica rappresenta un sistema vantaggioso per la produzione di bioenergia soprattutto in virtù del fatto che i batteri si auto-riproducono e, quindi, tali catalizzatori dell'ossidazione della materia organica, sono in grado di auto-sostenersi [15].

Le celle a combustibile microbiche (MFC), di cui è riportato uno schema generale in Figura 7, differiscono dalle altre celle operanti a bassa temperatura in due principali aspetti: utilizzano come combustibile molti tipi di biomassa, al posto dell'idrogeno, ed impiegano biofilm batterici

per la catalisi dell'ossidazione del combustibile sull'anodo e della riduzione dell'ossigeno al catodo, al posto di catalizzatori chimici:

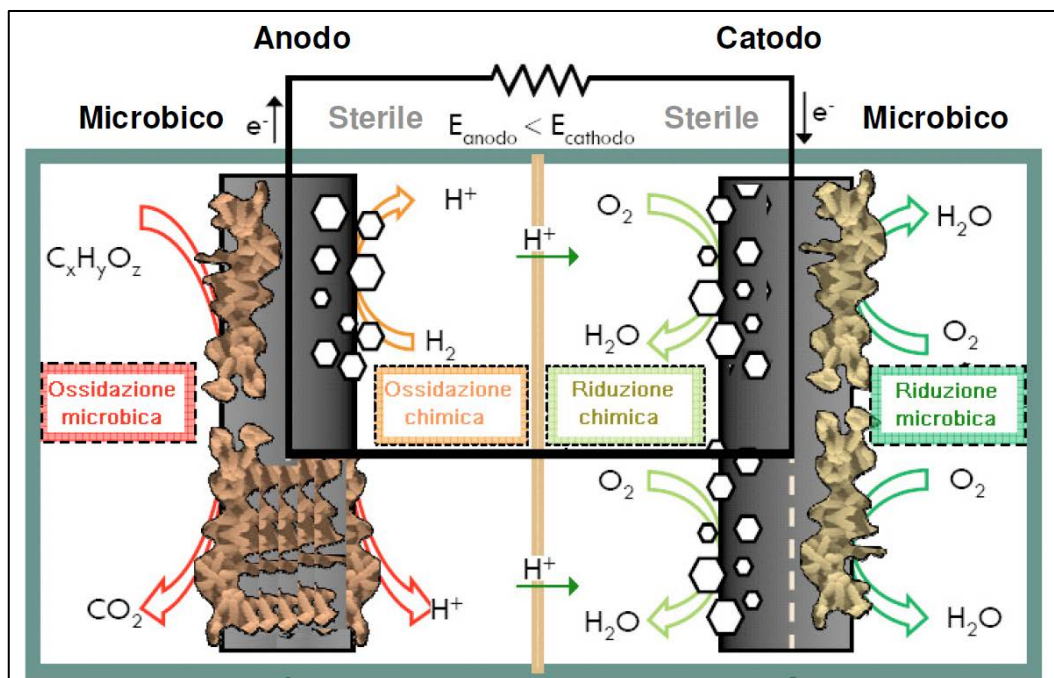


Figura 7 - Schema di una cella a combustibile microbica (parte in colore), con anodo e catodo sterile, e paragone con una cella a combustibile chimica (riquadro nero). Il catodo di una cella a combustibile microbica può essere sterile o microbico.

In generale esistono due tipi di pile a combustibile microbiologiche, con e senza mediatore.

### 1.1.1 Pila a combustibile microbiologica con mediatore

La maggior parte delle cellule microbiologiche sono elettrochimicamente inattive. Il trasferimento di elettroni da tali cellule all'elettrodo è facilitato da mediatori come la tionina, il paraquat, il blu di metilene, l'acido umico, il rosso toluilene e così via [16], [17]. La maggior parte dei mediatori disponibili sono costosi e tossici.

### 1.1.2 Pila a combustibile microbiologica senza mediatore

Le pile a combustibile microbiologica senza mediatore sono state progettate nel Korea Institute of Science and Technology da un gruppo diretto da Kim, Byung Hong. Tali pile a combustibile non necessitano di un mediatore, ma usano batteri attivi elettrochimicamente per trasferire gli elettroni all'elettrodo (vengono trasportati direttamente dall'enzima respiratorio dei batteri

all'elettrodo). Tra i batteri elettrochimicamente attivi ci sono *Shewanella putrefaciens* [18], *Aeromonas hydrophila* [19] e altri.

Le pile senza mediatore sono uno sviluppo molto recente e a causa di questo i fattori che influiscono sul buon funzionamento, come i batteri usati nel sistema, il tipo di membrana ionica e le condizioni generali come la temperatura ed il pH, non sono sufficientemente interpretati. I batteri nelle pile senza mediatore hanno solitamente enzimi riduttori elettrochimicamente attivi, come i citocromi nella loro membrana esterna, che sono in grado di trasferire elettroni a materiali esterni [20].

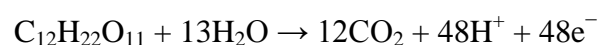
## 1.2 Generazione di energia con la cella a combustibile microbiologica

Le pile a combustibile microbiologiche hanno molti usi potenziali. Il primo e più ovvio è usare l'elettricità prodotta come sorgente energetica. Virtualmente si può usare qualsiasi materia organica per alimentare la pila, che potrebbe essere installata nei depuratori idrici dentro le acque di scarico. I batteri consumerebbero i materiali di scarto nell'acqua e produrrebbero energia supplementare per gli impianti. Il vantaggio di tutto questo è che questo tipo di pile sono un metodo pulito ed efficiente per la produzione energetica, infatti le loro emissioni sono molto al di sotto dei valori fissati dalle leggi specifiche [21]. Le pile microbiologiche usano l'energia molto efficientemente, in teoria una pila di questo tipo è in grado di avere un'efficienza energetica molto superiore al 50% [22].

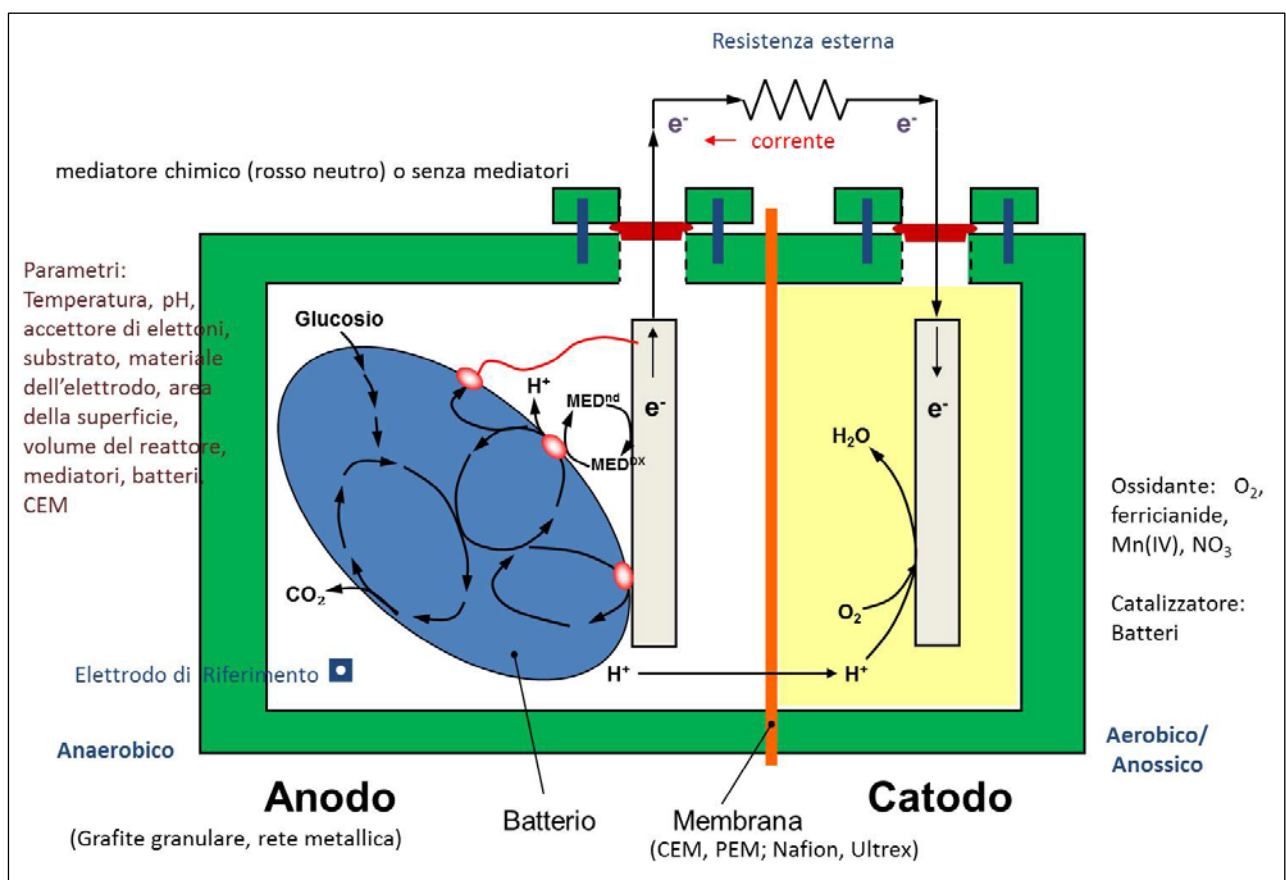
Tuttavia le MFC non necessitano di essere usate in larga scala, poiché gli elettrodi possono essere in alcuni casi spessi soltanto 7  $\mu\text{m}$  e lunghi 2 cm [23]. I vantaggi nell'uso di tali pile in questa situazione al posto di normali batterie è che utilizzano una forma rinnovabile di energia e non vanno ricaricate nel modo in cui sono caricate quelle chimiche. In aggiunta a questo, le pile opererebbero bene in condizioni miti, tra i 20 °C e i 40 °C, e con pH attorno al 7 [19].

### 1.2.1 Generazione dell'elettricità

Quando i microorganismi consumano un substrato come lo zucchero in condizioni aerobiche, producono anidride carbonica e acqua. Tuttavia quando l'ossigeno non è presente, essi producono anidride carbonica, protoni ed elettroni, come descritto di seguito [20]:



Le pile microbiologiche usano mediatori inorganici per entrare nella catena di trasporto degli elettroni tra le cellule e per sottrarre quelli che vengono prodotti. Il mediatore attraversa le membrane esterne di lipidi e il muro di plasma; comincia poi a liberare gli elettroni dalla loro catena di trasporto che sarebbe normalmente occupata dall'ossigeno o altri intermediari. Il mediatore, ora ridotto, esce dalla cellula carico di elettroni che vengono portati a un elettrodo dove vengono depositati; questo elettrodo diventa l'anodo elettro-generatore (l'elettrodo negativo). Il rilascio degli elettroni riporta il mediatore nel precedente stato ossidato, pronto a ripetere il processo; è importante notare che il processo può avvenire soltanto in condizioni anaerobiche poiché, se fosse presente l'ossigeno, esso raccoglierebbe tutti gli elettroni a causa della sua maggiore elettronegatività rispetto al mediatore.



*Figura 8 – Schema di una cella a combustibile microbica (microbial fuel cell, MFC); all'anodo sono schematizzati tre meccanismi possibili per il trasferimento di elettroni all'elettrodo: per passaggio diretto, tramite mediatori (MED) o producendo sostanze che reagiscono con l'elettrodo [25].*

Nel secondo compartimento della pila vi è un'altra soluzione e un altro elettrodo. Questo elettrodo, chiamato catodo, è carico positivamente ed è equivalente al pozzo di ossigeno alla fine della catena di trasporto degli elettroni, solo che è esterno alla cellula biologica. La soluzione è

un agente ossidante che raccoglie gli elettroni al catodo e questo agente potrebbe essere fatto di diversi tipi di molecole, come l'ossigeno. Tuttavia tale gas non è particolarmente pratico da usare, poiché ne sarebbe richiesto un grande volume. Una opzione più conveniente è usare una soluzione di un agente ossidante solido.

A collegare i due elettrodi vi è un filo (o un qualsiasi altro elemento conduttivo che potrebbe includere un qualche strumento elettrico, come una resistenza a filo metallico), e a completare il circuito collegando i due comparti vi è un ponte salino o una membrana che permette lo scambio di ioni. Quest'ultima caratteristica permette ai protoni prodotti di passare dal comparto dell'anodo a quello del catodo.

Il mediatore ridotto porta gli elettroni dalle cellule all'elettrodo; da qui il mediatore si ossida mentre deposita gli elettroni. Questi poi scorrono attraverso il filo verso il secondo elettrodo, da qui poi passano in un materiale ossidante.

### 1.2.2 Ulteriori usi

Un ulteriore potenziale utilizzo della tecnologia delle MFC è nella realizzazione di sensori per l'analisi delle sostanze inquinanti e nel monitoraggio e controllo dei processi in situ [26], [27]. La correlazione proporzionale tra l'efficienza coulombica delle MFC e la concentrazione di materiale organico presente in un liquame fa sì che le MFC possano essere utilizzate come metodo accurato per valutare la domanda biologica di ossigeno, BOD (Biochemical Oxygen Demand) di un effluente. Siccome la corrente generata da una pila a combustibile microbiologica è direttamente proporzionale all'organicità delle acque reflue usate come carburante, una pila di questo tipo può essere usata per misurare tale organicità [28] che viene valutata come valori di BOD. Tali valori sono determinati incubando campioni per 5 giorni con sorgenti adatte di microbi, solitamente fanghi attivi raccolti dalle fognature. Quando i valori di BOD vengono usati come parametro di controllo in tempo reale, 5 giorni di incubazione sono troppi. Un sensore BOD del tipo della pila microbiologica può essere usato per misurare i valori BOD istantanei. L'ossigeno e i nitrati sono accettori preferiti dagli elettroni, riducendo quindi la corrente generata dalla pila; un tale sensore, in presenza di questi accettori, sottostima i valori del BOD. Il problema può essere evitato inibendo la respirazione aerobica e dei nitrati nella pila usando inibitori dell'ossidasi come cianuro e azide. È stata dimostrata [24], [29] l'esistenza di una buona relazione lineare tra la efficienza coulombica e la concentrazione di un'acqua di scarico in un

range di concentrazioni di BOD abbastanza ampio. Tuttavia, un'elevata concentrazione di BOD richiede un tempo di risposta lungo poiché l'efficienza coulombica può essere calcolata solo dopo che il BOD si sia esaurito, a meno che la soluzione non venga diluita. Numerosi sforzi sono stati compiuti per migliorare la risposta dinamica nelle MFC utilizzate come biosensori [30].

Un sensore per bassi valori di BOD può anche ricavare tali valori in base alla corrente massima, dato che i valori di corrente aumentano linearmente con i valori di BOD in un sistema MFC oligotrofico (povero di nutrienti); in tal caso la reazione anodica è limitata dalla concentrazione di substrato. Questa modalità di monitoraggio può essere applicata per determinare in tempo reale il BOD di acque superficiali, effluenti secondari o campioni di acque reflue opportunamente diluite [32]. Le MFC utilizzate come sensori di BOD hanno il vantaggio, rispetto ad altri biosensori, di avere un'eccellente stabilità operativa, associata ad una buona riproducibilità ed affidabilità. Questo tipo di sensore BOD è già disponibile in commercio.

Secondo una ulteriore classificazione, una variante delle MFC è costituita dalle EFC (celle a combustibile enzimatiche), nelle quali sono coinvolti enzimi specifici isolati piuttosto che l'intero microrganismo.

### 1.3 Processo Anodo: ossidazione microbica del substrato

La gamma dei substrati [146] utilizzati nelle MFC vanno dai carboidrati (glucosio, saccarosio, cellulosa, amido), acidi grassi volatili (formiato, acetato, butirato), alcool (etanolo, metanolo), amminoacidi, proteine e anche elementi inorganici, quali solfuri o acidi presenti nei drenaggi [11], [32], [33], [34], [35], [37], [38], [39], [40]]. Riferendoci ai nuovi componenti per le MFC, la configurazione dei reattori o alle condizioni operative, l'acetato è comunemente usato come substrato a causa della sua inerzia verso le conversioni microbiche alternative (fermentazioni e metanogenesi) a temperatura ambiente. Questo si traduce in una elevata efficienza coulombica fino al 98% [41] e una potenza elettrica in uscita elevata, fino a  $115 \text{ W}\cdot\text{m}^{-3}$  [42] per le culture miste anodofile. Sebbene l'uso di un singolo substrato puro permetta di studiare i processi metabolici e i prodotti di conversione durante la conversione microbica, non è conveniente da un punto di vista economico aumentare la scala della potenza delle MFC con i substrati puri. In questa prospettiva, l'uso di bio-carburanti di seconda generazione o il percolato dei rifiuti organici è molto promettente, in quanto permette di combinare il trattamento effettivo del percolato dei rifiuti con la generazione di energia. Una gamma di sostanze organiche più complesse, che contengono una grande varietà di molecole differenti, facilmente e non facilmente degradabili, come le acque reflue domestiche [43], acque reflue delle industrie



birrarie [44], acque reflue del riciclaggio di carta [45] o l'effluente dei digestori anaerobici [46] hanno dimostrato di poter generare energia elettrica in una MFC. Tuttavia se vengono utilizzate le acque reflue, le potenze elettriche prodotte sono circa 10 volte inferiori rispetto a quelle ottenute con i substrati puri [46], [47]. Inoltre, un fattore che ha una forte incidenza sulla potenza prodotta da una MFC è la composizione delle acque reflue. Come è stato già constatato [41] un mescolamento delle acque reflue con acetato ha portato ad un aumento della potenza, che indica che maggiore è la frazione rapidamente biodegradabile all'interno delle acque reflue e, maggiore sarà la potenza elettrica prodotta.

Il tipo di substrato che alimenta una MFC potenzialmente ha un impatto sulla struttura del biofilm e la composizione della comunità microbica; più il substrato viene ridotto, più energia è disponibile da dividersi in tutta la comunità microbica.

#### 1.4 Energia disponibile per la generazione di energia elettrica

La quantità di energia (Joule) ottenuta dal processo elettrochimico di una MFC può essere calcolata a partire dalla potenza e dalla durata del processo:  $E=P \cdot t$ , dove le grandezze vanno espresse nelle opportune unità di misura, che per la potenza  $P$  debbono essere i watt e corrispondentemente per il tempo  $t$  sono i secondi. La potenza  $P$  dipende sia dalla tensione  $V$  che dalla corrente  $I$ :  $P=V \cdot I$ . Questi ultimi due fattori sono legati dalla resistenza della cella a combustibile  $R$  dalla legge di Ohm:  $V= R \cdot I$  in cui  $R$  rappresenta la resistenza (Ohm). La tensione  $V$  ai capi della resistenza, può essere descritta come:

$$V = \Delta V - \Delta V_{\text{conc}} - \Delta V_{\text{act}} - \Delta V_{\text{ohm}} = E^0 - \eta_a - \eta_c - R \cdot I$$

dove:

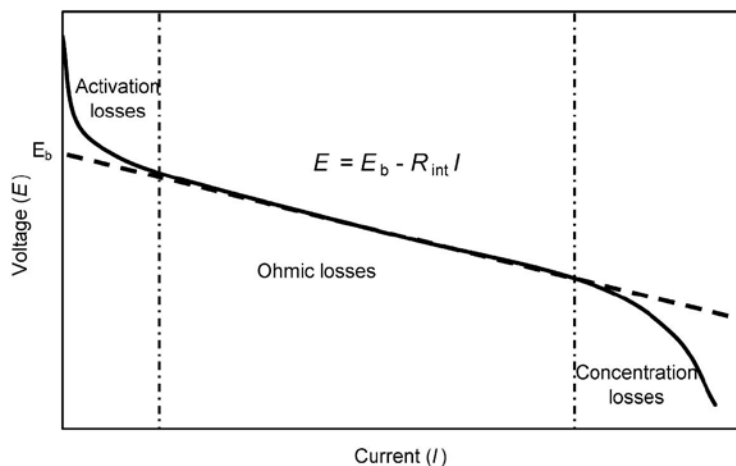
- $\Delta V$  è un termine costante, che dà il valore della d.d.p. della cella a circuito aperto (con  $I=0$ ).  $\Delta V_{\text{conc}}$  è un termine (sovratensione di diffusione o di concentrazione), che rappresenta la perdita dovuta alla variazione di disponibilità dei reagenti all'interfaccia, e diventa importante per alti valori di corrente; è dovuta a fenomeni di trasporto di massa che ostacolano le reazioni agli elettrodi.
- $\Delta V_{\text{act}}$  è un termine (sovratensione di attivazione) che rappresenta una perdita correlata alla cinetica della reazione dovuta all'energia di attivazione necessaria ad instaurare la reazione elettrochimica, ed è importante per bassi valori di corrente; è connessa alla velocità delle reazioni elettrochimiche. Nel caso di reazioni elettrochimiche è dell'ordine 50-100 mV. La polarizzazione di attivazione è collegata allo stadio lento della reazione; contribuiscono a

questo tipo di polarizzazione processi che implicano adsorbimento di reagenti, con il trasferimento di elettroni attraverso il doppio strato, di adsorbimento di prodotti.

- $\Delta V_{ohm}$  è un termine che rappresenta la caduta ohmica dovuta alla resistenza elettrica di elettrolita, elettrodi e conduttori:

$$\Delta V_{ohm} = I \cdot R$$

in cui R è la resistenza totale di cella, denominata Resistenza interna,  $R_{int}$ .



*Figura 9 - Curva di polarizzazione di una MFC, nella quale si mettono in evidenza tutte le perdite ed i loro effetti, al variare della corrente [49].*

La perdita più significativa è quella che si verifica nell'elettrolita e può venire ridotta diminuendo la distanza tra gli elettrodi e utilizzando elettroliti ad elevata conducibilità ionica. Le polarizzazioni agiscono sempre nel senso di elevare il potenziale dell'elettrodo al quale decorre la reazione di ossidazione (anodo) e di abbassare il potenziale dell'elettrodo al quale decorre la reazione di riduzione (catodo), e riportando ciò in formule:

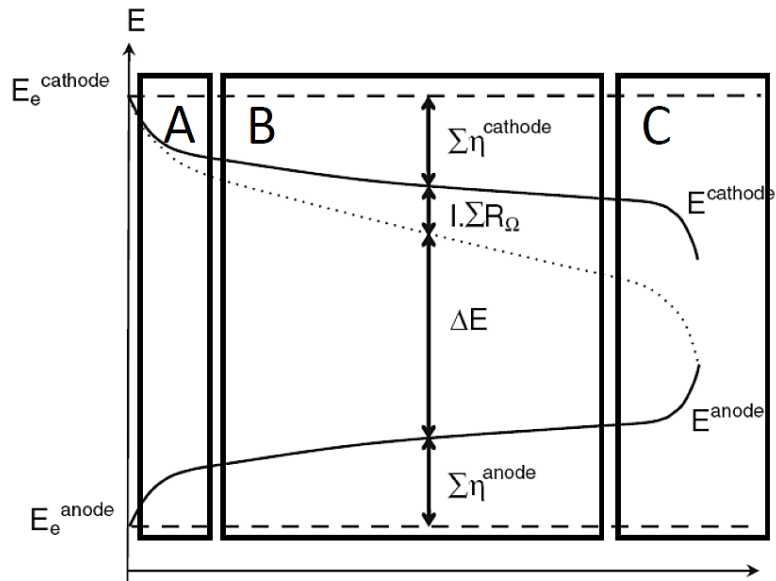
Anodo: 
$$V_a = E_a + |\eta_a|$$

Catodo: 
$$V_c = E_c - |\eta_c|$$

e gli altri termini dell'espressione rappresentano invece:

- $E^0$  è la massima tensione di cella, denominata anche Open Circuit Voltage, OCV;
- $\eta_a$  ed  $\eta_c$  sono la sovratensione e le perdite agli elettrodi, rispettivamente nell'anodo e nel catodo;
- $R \cdot I$  è la perdita a causa della resistenze dell'elettrolita, degli elettrodi e conduttori per i collegamenti elettrici.

L'insieme delle perdite appena annoverate vengono rappresentate sulla curva di polarizzazione, andando a rappresentare separatamente i potenziali anodici ( $E_e^{anode}$ ) e catodici ( $E_e^{cathode}$ ). Nella figura 10 vengono indicate le regioni nelle quali si ha la presenza delle diverse perdite: la regione di perdite di attivazione (regione A), le perdite ohmiche (regione B) e le perdite di trasferimento di massa (regione C). La tensione di cella è rappresentata da  $\Delta E$ , e la perdita ohmica da  $I \cdot \Sigma R_{\Omega}$ . I potenziali di equilibrio degli elettrodi sono indicati da  $E_e^{cathode}$  e  $E_e^{anode}$ . Si presume che l'elettrodo di riferimento è posto vicino l'anodo [47].



*Figura 10 - Grafico della sovratensione anodica e catodica, in funzione della densità di corrente ( $i$ , in ascisse) per una MFC, (con un elettrodo di riferimento nell'anodo:  $E_e^{anode}$ , il potenziale di semicella dell'anodo e  $E_e^{cathode} = E_e^{anode} + \Delta E + I \cdot \Sigma R_{\Omega}$  = il potenziale di semicella del catodo;  $OCV = E_e^{cathode} - E_e^{anode}$  = la tensione a circuito aperto) [47].*

Tutti i termini delle perdite vengono sommati fra loro, per un generico punto di funzionamento della MFC, in figura 10; per essi si vede che:

$$\Delta E = OCV - \Delta E_{\eta} - \Delta E_{\Omega} = (E_e^{cathode} - E_e^{anode}) - (\Sigma \eta^{anode} - \Sigma \eta^{cathode}) - I \cdot \Sigma R_{\Omega}$$

dove la  $\Delta E$  è il potenziale di cella; può venire anche scritta con l'espressione che rappresenta tutti i termini, così come sono riportati nella figura:

$$E_e^{cathode} - E_e^{anode} = \Delta E + \Sigma \eta^{anode} - \Sigma \eta^{cathode} + I \cdot \Sigma R_{\Omega}$$

L'andamento delle perdite ohmiche, in funzione della densità di corrente, per una MFC, è riportato in figura 11 [47]:

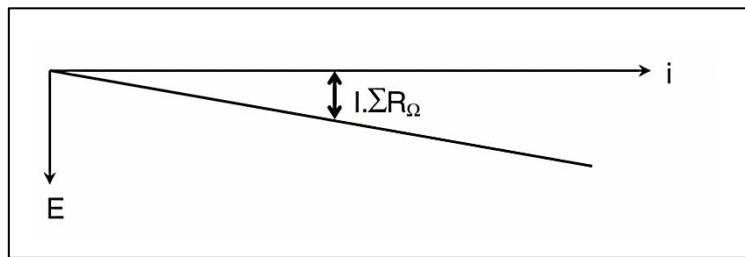


Figura 11 - Grafico delle perdite ohmiche ( $I \cdot \Sigma R_{\Omega}$ ), in funzione della densità di corrente, in una MFC [47].

La differenza di potenziale tra gli elettrodi è massima ( $E^0$ ) quando non si ha passaggio di corrente nel circuito esterno, e nel momento in cui questa comincia a circolare si ha un allontanamento dall'equilibrio per l'insorgere di fenomeni di polarizzazione (sovratensioni); si ha quindi una diminuzione dell'energia elettrica fornita, rispetto a quella teorica; quindi, ciò che viene misurato nella MFC sarà inferiore alla massima tensione raggiungibile. In pratica, i potenziali massimi a circuito aperto misurati (potenziale misurato quando non passa corrente nel circuito elettrico della MFC) sono stati dell'ordine di 750-800 mV.

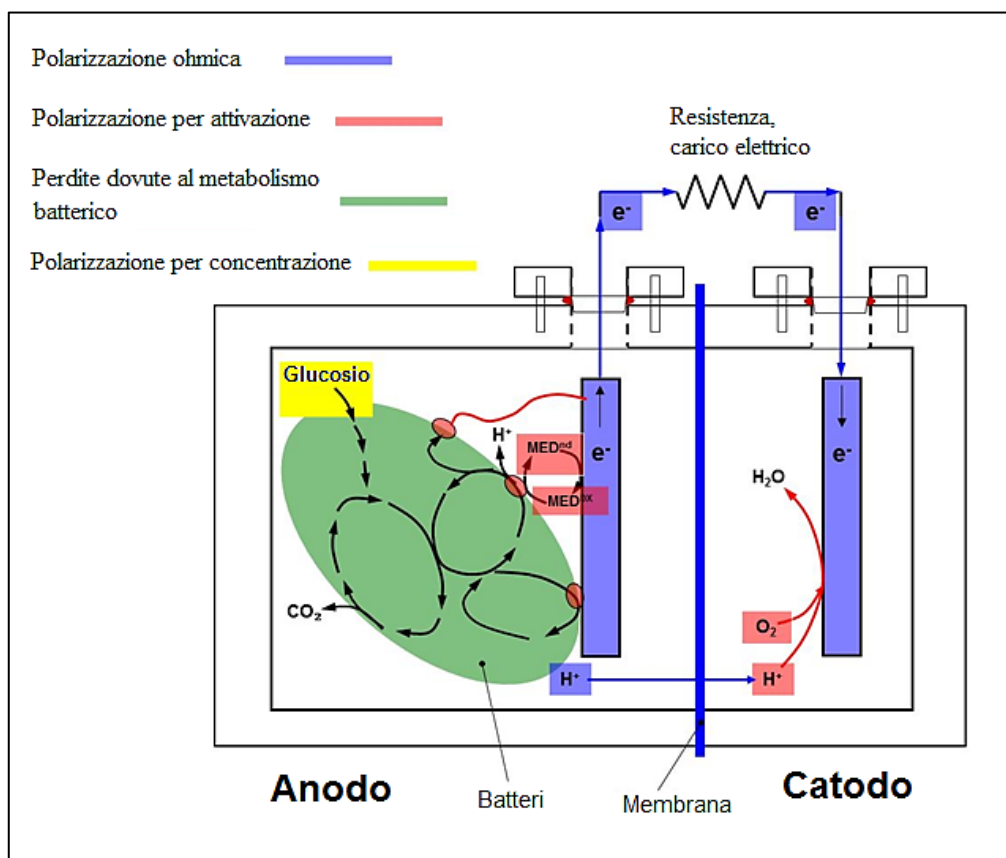


Figura 12 – Schema della MFC in cui sono localizzate, in diversi colori, le perdite ohmiche di polarizzazione [25], [31].

Quando si chiude il circuito elettrico, questa tensione diminuisce significativamente, soprattutto a causa delle cosiddette “sovratensioni”, che sono delle differenze di potenziale dovute alle resistenze di trasferimento degli elettroni e alle resistenze interne. Tre tipi di sovratensioni possono essere definite: sovratensioni di attivazione, perdite ohmiche e di polarizzazione per concentrazione e sono raffigurate con diversa colorazione nella figura 12; in colore blu ci sono evidenziate le zone dove sono localizzate le perdite ohmiche in quanto il flusso degli elettroni è ostacolato dalla resistenza del materiale dell'elettrodo, che introduce una caduta di tensione ohmica.

La maggiore conducibilità del materiale dell'elettrodo e una minore caduta di tensione di contatto e la distanza che percorreranno gli elettroni all'interno dell'elettrodo, garantiscono la più alta efficienza per la conduzione degli elettroni e la minore caduta di tensione ohmica. Inoltre, per ogni carica negativa trasferita verso l'anodo, una pari quantità di cariche positive (idealmente protoni, in alternativa cationi) ha bisogno di fluire verso l'elettrodo anodico. La resistenza che gli ioni incontrano mentre fluiscono attraverso l'elettrolita è parte delle perdite ohmiche del reattore. Per consentire un efficace trasporto degli ioni, sono della massima importanza la conduttività e l'efficienza del tampone dell'elettrolita e la distanza fra gli elettrodi.

Per una generica MFC, la sovratensione di attivazione sembra essere il principale fattore limitante; questa sovratensione dipende in larga misura dalla densità di corrente che fluisce attraverso l'anodo, le proprietà elettrochimiche dell'elettrodo, la presenza di composti mediatori e dalla temperatura di esercizio; infatti per l'inizio del trasferimento degli elettroni dai microrganismi elettrochimicamente attivi verso l'elettrodo, deve essere superata una barriera di energia, che comporta questa caduta di tensione. È stato ipotizzato che i microrganismi elettrochimicamente attivi possono far diminuire tale sovratensione e di conseguenza aumentare il loro guadagno di energia metabolica ottimizzando le loro strategie di trasferimento degli elettroni. Le interazioni tra i microrganismi elettrochimicamente attivi e l'elettrodo, che sono legati alla proprietà della superficie dell'elettrodo è un altro fattore determinante per le perdite di attivazione.

L'andamento dei potenziali che si può misurare all'interno di una MFC è quello riportato nella figura 13:

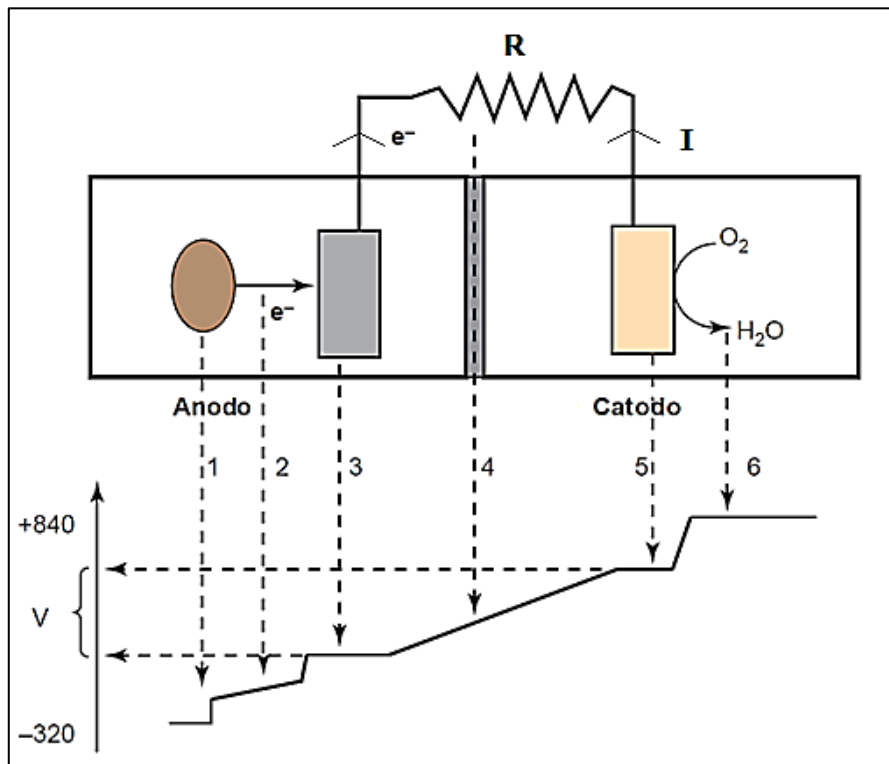


Figura 13 – Andamento dei potenziali e delle perdite durante il trasferimento degli elettroni in una MFC [59].

ed i tipi di perdite ohmiche sono indicate dai relativi valori numerici, e di seguito riportiamo la loro tipologia:

1. Perdita causata dal trasferimento batterico degli elettroni.
2. Le perdite a causa della resistenza elettrolitica.
3. Perdite sull'elettrodo anodico,  $\eta_a$ .
4. Perdite sulla resistenza esterna della MFC (differenza di potenziale utile, ai capi del carico) e le perdite dovute alla resistenza della membrana polimerica, PEM.
5. Perdite sull'elettrodo catodico,  $\eta_c$ .
6. Perdite dovute alla riduzione dell'accettore di elettroni.

Le sovratensioni agli elettrodi sono generalmente dovute a:

- perdite dovute all'attivazione;
- perdite legate al metabolismo batterico;
- perdite dovute al trasferimento di materia, o di concentrazione.

Le perdite di attivazione sono dovute all'energia di attivazione necessaria per le reazioni di ossidazione/riduzione e si manifestano durante il trasferimento di elettroni da/verso un composto reagente verso/da un elettrodo. Tali perdite crescono sensibilmente nel caso di bassi valori di corrente prodotta e decrescono molto lentamente quando la densità di corrente diminuisce. È possibile ridurle aumentando la superficie degli elettrodi e aumentando la temperatura operativa.

Nell'interfase fra elettrodo e soluzione vi è una barriera energetica che si frappone allo svolgimento dell'atto di reazione elettrodica vero e proprio (trasferimento di carica tra elettrodo e soluzione), esigendo quindi l'attivazione delle specie reagenti. In questo caso si parla anche di sovratensione di attivazione, sovratensione di barriera, o sovratensione di trasferimento di carica all'interfase. Per sovratensioni di questo tipo la legge di dipendenza dalla densità di corrente ( $i$ ), quando si sia sufficientemente dall'equilibrio, è logaritmica e risponde alla legge di Tafel.

Le perdite dovute al metabolismo batterico sono la conseguenza del fatto che, per produrre energia dal loro metabolismo, i batteri, trasportano gli elettroni da un substrato a basso potenziale (ad esempio acetato: -0,296 V) verso l'elettron-accettore terminale (ad esempio ossigeno) ad un potenziale più elevato. In una MFC, l'anodo è l'elettron-accettore finale ed il suo potenziale determina il guadagno di energia per i batteri. Tanto più elevata è la differenza tra il redox del substrato ed il potenziale anodico, tanto maggiore è l'energia guadagnata per i batteri, ma tanto più basso è il massimo potenziale ottenibile dalla cella. È anche vero che per massimizzare il potenziale prodotto dalla cella, è necessario mantenere il potenziale anodico più basso possibile; ciò, tuttavia, senza inibire il trasporto di elettroni e la fermentazione del substrato.

Le perdite di concentrazione, infine, si verificano quando la velocità del trasferimento di materia di una specie da o verso un elettrodo, limita la produzione di corrente [48]. Tali perdite si verificano di preferenza per elevati valori della densità di corrente.

In generale si scrive:

$$E_{\text{cell}} = \text{OCV} - I \cdot \Sigma R_{\text{int}}$$

$I \cdot R_{\text{int}}$  = somma delle perdite complessive all'interno di una MFC che risultano essere proporzionali alla corrente prodotta ( $I$ ) e alla resistenza ohmica interna ( $R_{\text{int}}$ ) del sistema; si osserva che in quest'ultima espressione le sovratensioni anodiche e catodiche che si registrano a circuito aperto sono incluse nel termine OCV, mentre le sovratensioni dipendenti dalla corrente (relativamente sia agli elettrodi che alle cadute ohmiche) sono incluse nel termine  $I \cdot \Sigma R_{\text{int}}$ . Le MFC il cui comportamento è ben descritto dall'equazione soprascritta, mostrano la massima produzione di energia quando la resistenza interna è identica alla resistenza esterna,  $R_{\text{est}}$ . Sebbene la resistenza interna includa molto di più della semplice resistenza ohmica,  $R_{\Omega}$ , spesso questi due termini sono utilizzati indistintamente.

Per incrementare le prestazioni elettriche di una MFC è indispensabile ridurre al minimo la resistenza interna del sistema [49]. Ciò può essere realizzato aumentando l'area superficiale dell'anodo [50], [51] e del catodo [52], la forza ionica dell'elettrolita [11], il pH [31] e, qualora essa venga utilizzata, la superficie della membrana [51].

Nella figura 14 viene riportata la scala dei potenziali di riduzione standard  $E_0'$  dei valori dei potenziali redox durante la reazione di ossido-riduzione dell'acido acetico impiegato all'anodo per alimentare una MFC, nella scala a sinistra:

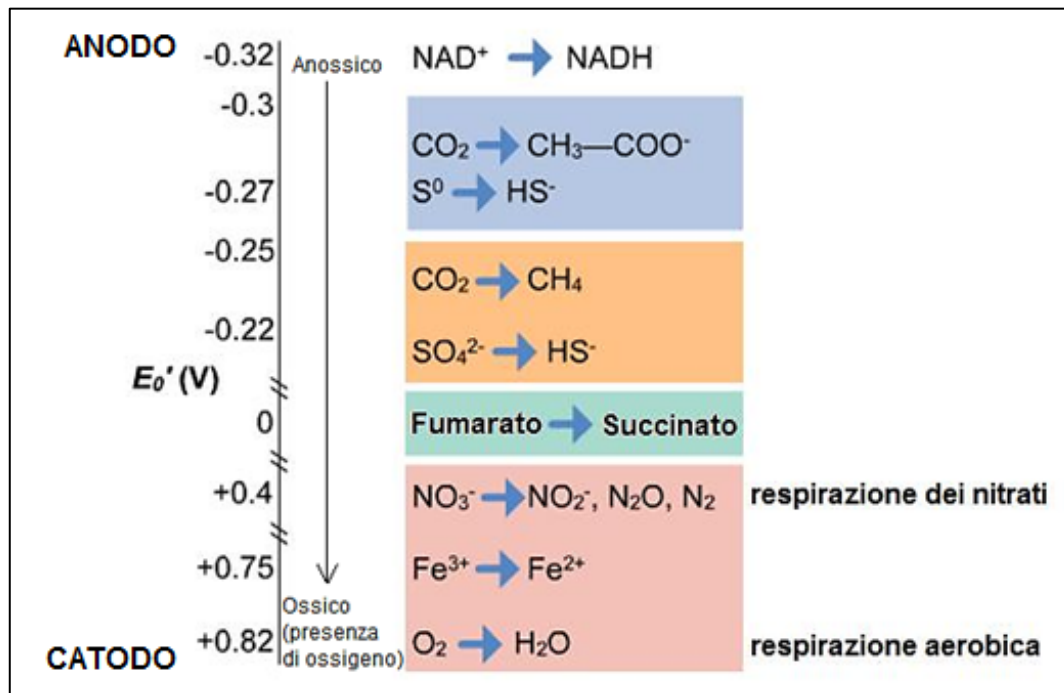


Figura 14 - Potenziali elettrici di riduzione e di ossidazione della serie delle reazioni che avvengono lungo la catena di trasporto degli elettroni [58].

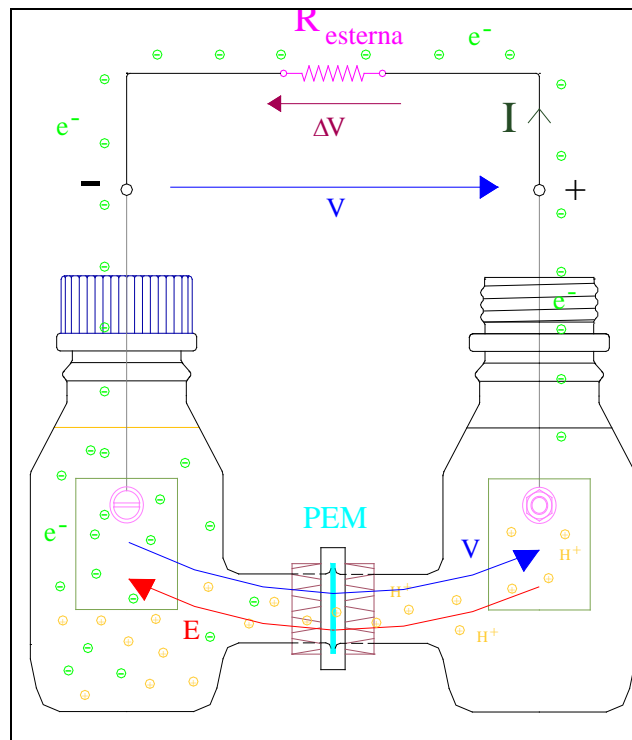
#### 1.4.1 Schema dei campi elettrici all'interno di una MFC

In una MFC con catodo all'aria, il funzionamento è assicurato dalla presenza della comunità microbica nella camera anodica; la comunità adesa sull'elettrodo, in forma di biofilm, essendo elettrogenica riesce a cedere cariche elettriche negative, gli elettroni di colore verde nella figura 15, prelevandoli dal substrato e cedendoli all'elettrodo catalizzatore; nel comparto anodico avviene l'ossidazione del substrato ed il rilascio della  $\text{CO}_2$ . Insieme alla formazione degli elettroni ci saranno presenti anche gli ioni,  $\text{H}^+$  che nella figura invece sono di colore giallo, i quali potranno attraversare la membrana di scambio protonico PEM e giungere così alla camera catodica. Gli elettroni troveranno un circuito di richiusura, verso la camera catodica, attraverso il conduttore di prima specie e raggiungeranno l'elettrodo catodico attraverso un circuito elettrico esterno, il quale sarà formato da una resistenza elettrica esterna in filo metallico, che dissiperà l'energia prodotta, direttamente sotto forma di energia elettrica.

Nella camera catodica, in presenza degli ioni, assisteremo alla costituzione del polo elettrico positivo della MFC, nel quale si troveranno le cariche positive  $\text{H}^+$  e saranno la sorgente del campo elettrico  $\vec{E}$  che continuerà a far circolare le cariche positive e negative attraverso i



conduttori di seconda specie, quali l'elettrolita, verso l'anodo che invece costituirà il pozzo delle linee di forza del campo elettrico e quindi costituirà il polo elettrico negativo.



*Figura 15 - Campo elettrico, differenza di potenziale e verso di circolazione della corrente in una MFC, con catodo all'aria.*

Questo campo  $\vec{E}$  renderà disponibile agli estremi accessibili degli elettrodi una differenza di potenziale, di valore più elevato se non accompagnato dalla circolazione di corrente (funzionamento a vuoto), o altrimenti la d.d.p. potrà essere applicata ad una resistenza esterna e vedrà il passaggio di una corrente  $I$  sul circuito esterno della MFC producendo una potenza elettrica  $P$  secondo le seguenti formule equivalenti:

$$P = I \cdot V = I^2 \cdot R = \frac{V^2}{R}$$

dove  $V$  è la tensione misurata ai capi della resistenza esterna  $R$  e  $I$  è la corrente stimata dalla legge di Ohm:

$$I = \frac{V}{R}$$

Nella camera catodica, che è all'aria, l'ossigeno subirà una riduzione e si avrà la formazione di acqua pura e le cariche elettriche di ioni ed elettroni si ricombineranno, consentendo di continuare il funzionamento di questo generatore in corrente continua, sino alla perdita di attività

della comunità microbica o al completo esaurimento del substrato di alimentazione; il massimo potenziale teorico raggiungibile al catodo all'aria  $E^0$  è pari a 0,805 V.

Altre reazioni di riduzione da parte della comunità microbica possono essere: la denitrificazione, riduzione di ossigeno in acqua  $H_2O$  o in perossido di idrogeno  $H_2O_2$ , dealogenazione, riduzione del metallo, la produzione di idrogeno, produzione di metano, riduzione del perclorato.

#### 1.4.2 I parametri biologici, chimici ed elettrici utilizzati per valutare le prestazioni di una MFC

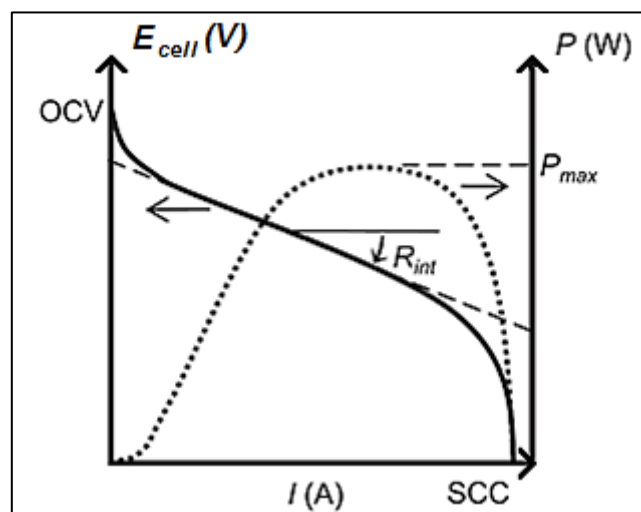
I parametri biologici, chimici ed elettrici utilizzati per valutare le prestazioni di una MFC sono riportati nella tabella 5 [65]:

Parametro	Unità di misura	Descrizione
Fattore di carico organico volumetrico (di COD)	$kg \cdot m^{-3} \cdot g^{-1}$	Un indice per descrivere le prestazioni del processo di trattamento dei rifiuti in una MFC. La quantità di sostanze organiche (espressa come domanda chimica di ossigeno, COD in [kg]) che alimenta una MFC è normalizzata al valore del volume netto della camera anodica [ $m^3$ ] e del tempo in giorni, [g].
Qualità dell'effluente	$kg \cdot m^{-3}$	Concentrazione di sostanze organiche (COD) nell'effluente scaricato dalla camera anodica.
Efficienza di trattamento	%	Questo è indicato anche come efficienza di rimozione-COD che è determinato dividendo la concentrazione di COD nell'effluente [mg/l] da quello nell'influente [mg/l].
Densità di potenza (per volume)	$W \cdot m^{-3}$	La potenza è normalizzata al volume dell'anodo o alla somma dei volumi dell'anodo e del catodo. In molti casi, la potenza massima ( $P_{max}$ ) viene calcolato dalla curva di potenza (andamento della potenza rispetto alla corrente in Fig. 16) e utilizzata come potenza prodotta (cioè, come densità di potenza massima).
Densità di potenza (per area)	$W \cdot m^{-2}$	La potenza è normalizzata alla superficie dell'anodo o del catodo. Questo valore della $P_{max}$ viene spesso utilizzato (Fig. 16). Quando un elettrodo possiede una struttura complessa (per esempio, feltro o panno), viene utilizzata l'area proiettata, piuttosto che la superficie reale dell'elettrodo.
Densità di corrente	$A \cdot m^{-2}$	La corrente generata è normalizzata all'area dell'anodo. Questo è considerato essere un indice relativo all'attività totale catabolica dei microbi nella camera anodica.

Tensione a circuito aperto (Open Circuit Voltage, OCV)	V	La tensione misurata tra l'anodo e il catodo in assenza di corrente. La differenza tra la forza elettromotrice totale (f.e.m., la differenza di potenziale tra il catodo e l'anodo) e l'OCV è considerata come la caduta di potenziale totale.
Resistenza interna ( $R_{int}$ )	$\Omega$	Questa è ottenuta dalla pendenza della curva di polarizzazione (Fig. 16) ed è utile per valutare le perdite totali, all'interno di un processo MFC.
Efficienza Coulombica (CE)	%	Questa viene definita come il rapporto della quantità di carica, espressa in coulomb misurati nella corrente totale circolante nel circuito elettrico, sui coulomb contenuti nel substrato di alimentazione (stimati sul valore del COD totale). Se ci sono accettori di elettroni alternativi presenti nella camera dell'anodo, tale valore diminuisce.
Efficienza energetica (EE)	%	Questa viene calcolata come rapporto fra la potenza prodotta dalla MFC sull'energia termica ottenuta dalla combustione del substrato di alimentazione, ed è considerato il parametro più importante per valutare un processo MFC come processo di recupero energetico.

*Tabella 5 – Parametri più frequentemente utilizzati per valutare le prestazioni di una MFC.*

I parametri elettrici di una MFC sono, principalmente, la corrente generata  $I$ , la tensione a circuito aperto OCV, quella ai capi di una resistenza esterna  $E_{cell}$  e la potenza prodotta  $P$  su un carico elettrico esterno  $R_{esterna}$ ; è importante definire anche la resistenza interna  $R_{int}$  della MFC. Il grafico che rappresenta tutte queste grandezze è riportato in figura 16, che è composto dalla curva di polarizzazione (continua) e di potenza (tratteggiata):



*Figura 16 - Curve di polarizzazione (continua) e di potenza (tratteggiata) utilizzate per valutare le prestazioni elettriche di una MFC [65].*

Una curva di polarizzazione rappresenta l'andamento della tensione ai capi di una MFC in funzione della corrente circolante nel circuito, pertanto l'effettuazione di curve di polarizzazione nell'intervallo di corrente-tensione in cui le celle sono operative rappresenta il metodo più immediato per valutare le prestazioni di una MFC; un metodo semplice di eseguire una curva di polarizzazione, consiste nell'inserire, una alla volta e per un tempo sufficiente a stabilizzare la tensione, una serie di resistenze elettriche diverse, di valore noto, nel ramo esterno di collegamento fra i due elettrodi della cella a combustibile microbica.

Inoltre dalla pendenza della curva di polarizzazione nella regione in cui la tensione ai capi di una MFC è funzione quasi lineare dei valori della corrente si può stimare un valore di resistenza interna,  $R_{int}$  della cella pari alla pendenza della retta, assimilando, in prima approssimazione, che tutti i contributi alla caduta di tensione siano resistenze ohmiche.

Un obiettivo comune a tutti i generatori di energia elettrica è quello di massimizzare la quantità di potenza disponibile per un lavoro esterno; nel caso delle celle a combustibile microbiche questo corrisponde al più alto valore di corrente circolante nel circuito con il più alto valore di tensione misurata ai capi della resistenza esterna fissa; dai dati forniti dalla curva di polarizzazione (normalizzati rispetto alla superficie degli elettrodi, al volume anodico o alla superficie della membrana elettrolitica), si può calcolare l'andamento della potenza utile disponibile per alimentare il carico esterno, e quindi la curva della densità di potenza di una MFC; la curva di potenza per una MFC ha il tipico andamento parabolico, rappresentato in figura; il massimo della curva di potenza di una data MFC,  $P_{max}$  rappresenta la potenza massima che il sistema è in grado di generare per alimentare i carichi esterni.

Generalmente viene misurato il potenziale ai capi della resistenza esterna fissa ( $E_{cell}$ ), mentre la corrente è calcolata utilizzando la Legge di Ohm ( $E_{cell}=I \cdot R_{est}$ ); quindi la potenza prodotta da una MFC è calcolata come:

$$P = E_{cell} \cdot I = \frac{E_{cell}^2}{R_{est}}$$

Generalmente la potenza è però normalizzata alla superficie di progetto dell'anodo,  $A_n$  in quanto è proprio su questa superficie che hanno luogo le reazioni principali [30], [31]. Si scrive pertanto:

$$P_{an} = \frac{E_{cell}^2}{A_n \cdot R_{est}}$$

con :

$$P_{an} = \left[ \frac{W}{m^2} \right]$$

Utilizzando una serie di resistenze tali da coprire alcuni ordini di grandezza attorno al valore di resistenza ohmica interna della cella elettrochimica, è possibile tracciare l'andamento della tensione in funzione della corrente (curva di polarizzazione) che caratterizza una data MFC.

In molti casi, comunque, sono le reazioni al catodo quelle limitanti l'intero processo [36] oppure l'anodo è realizzato in materiali di cui è difficile stimare la superficie (ad esempio materiali granulari). Si può utilizzare la potenza normalizzata sulla superficie catodica.

Per ricondursi a valori più ingegneristici, specie nell'ottica della stima dei costi dei reattori, si normalizza la potenza rispetto al volume del reattore:

$$P_{\text{an}} = \frac{E_{\text{cell}}^2}{v \cdot R_{\text{est}}} \quad (22)$$

con:

$$P_{\text{an}} = \left[ \frac{\text{W}}{\text{m}^3} \right]$$

v: volume totale del reattore [m<sup>3</sup>].

Attualmente la maggior parte dei ricercatori impegnati in questo campo sono biologi anziché elettrochimici o ingegneri. Questo ha portato alcuni ricercatori [69] a effettuare alcune pratiche sbagliate, come registrare la massima corrente ottenuta dalla pila collegata a una resistenza come indicatore delle prestazioni elettriche, anziché della corrente stazionaria che è spesso di un ordine di grandezza più bassa. A volte i dati sul valore della resistenza elettrica esterna  $R_{\text{est}}$  usata sono scarsi, portando a valori non comparabili.

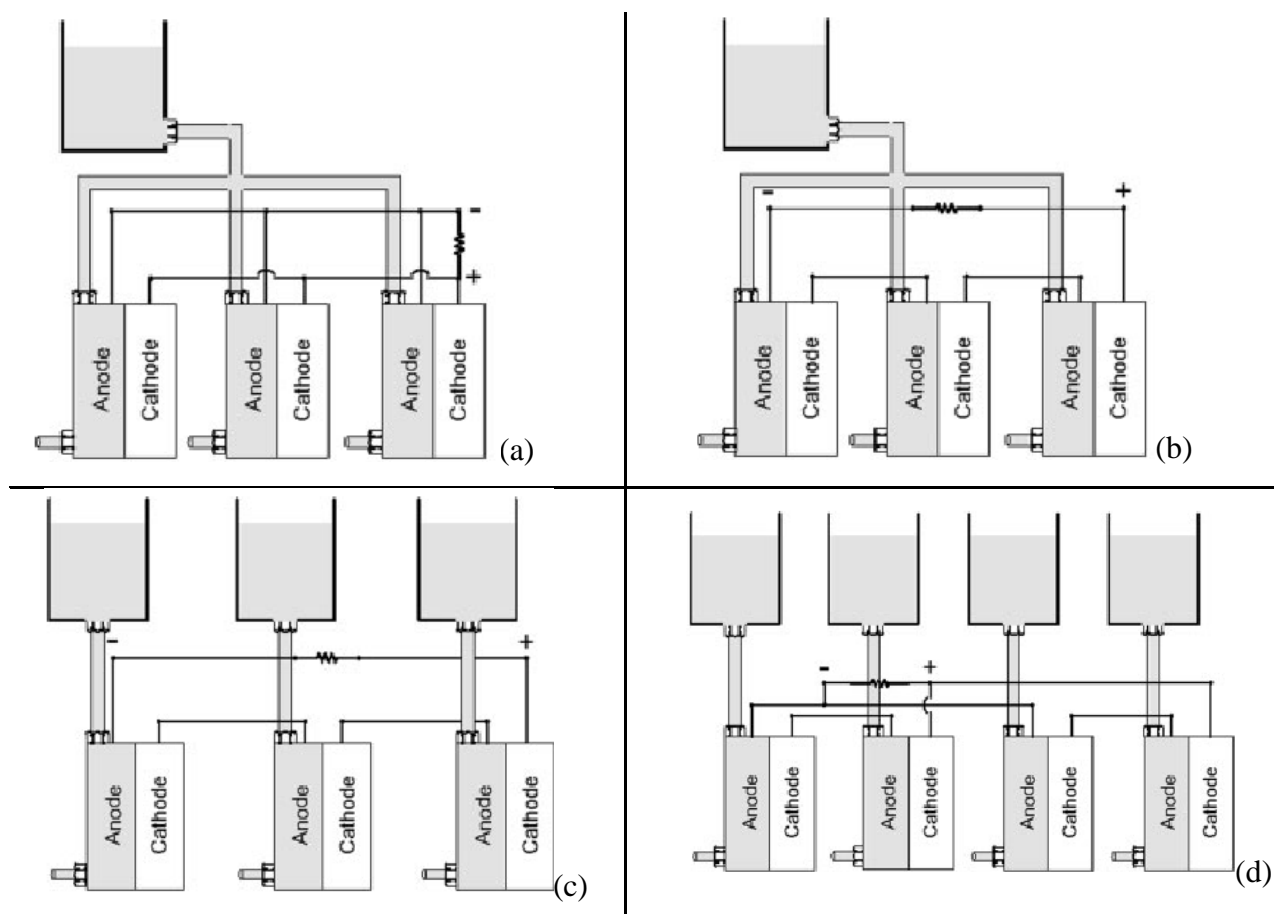
Una utilizzazione delle MFC è quella di realizzare delle batterie, cioè collegando insieme più MFC, si otterranno dei valori di potenza elettrica maggiori; una immagine dello "stack" è quella nella figura 17:



*Figura 17 – Un esempio di stack di MFC [71].*

Nella figura 18 viene riportata una rappresentazione schematica [60] delle diverse configurazioni dei circuiti dei fluidi e dei collegamenti elettrici per uno stack di MFC: (a) collegamento elettrico in parallelo delle MFC con una linea di alimentazione comune, (b) collegamento elettrico in serie

con una linea di alimentazione comune, (c) collegamento elettrico in serie ma con singole linee di alimentazione separate, e (d) con connessioni in serie e in parallelo con linee di alimentazione individuali e con un numero pari di MFC.



*Figura 18 – I 4 diversi tipi di collegamento dello stack delle MFC [60].*

Dal collegamento in serie di  $n$  celle, ciascuna con una determinata f.e.m. e corrente nominale, dalla batteria (o “stack”) potremo ottenere una f.e.m. totale pari alla somma delle  $n$ -esime f.e.m. e la stessa corrente nominale sul carico; mentre dal collegamento in parallelo delle stesse  $n$ -esime celle, dalla batteria potremo ottenere una corrente totale sul carico  $n$  volte più intensa della corrente nominale e la stessa tensione nominale della singola cella.

I dati sull’evoluzione della densità di potenza nel corso degli anni che vanno dal 1998 al 2008, per 4 differenti tipologie di MFC [61] sono riportati nella figura 19 [55]:

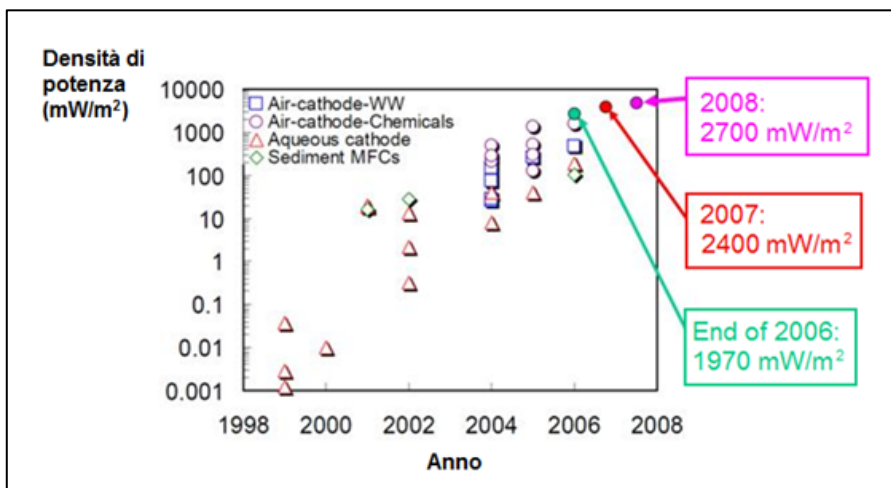


Figura 19 - Evoluzione della densità di potenza, negli anni dal 1998 al 2008, per 4 diversi tipi di MFC.

mentre nella figura 20 [14] vengono riportati i valori delle stesse tipologie di MFC della figura sovrastante, con dei pallini di colore viola ed in aggiunta la densità di potenza delle MFC con anodo di volume più piccolo del catodo, nel quale i valori della densità di potenza sulle ordinate vengono espresse ancora sulla scala logaritmica:

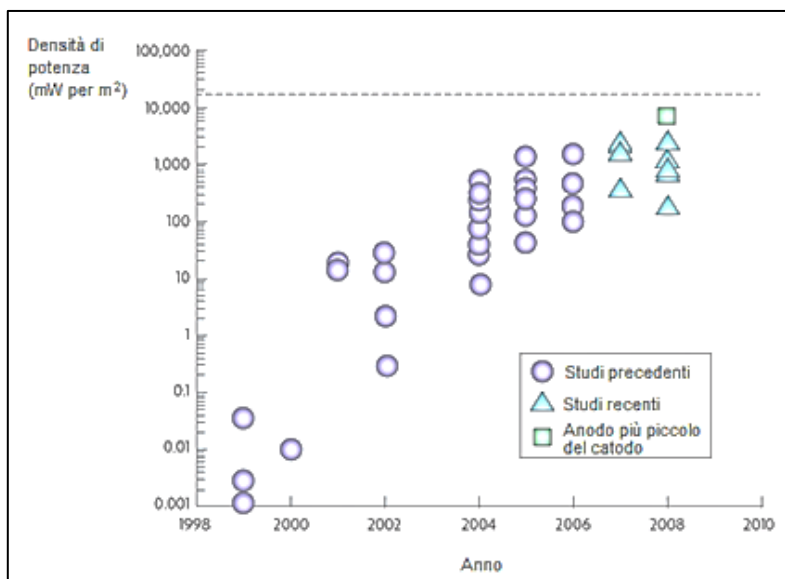


Figura 20 - Densità di potenza per le MFC, normalizzate all'area della superficie proiettata dall'elettrodo.

Questi dati provenienti da diversi ricercatori che hanno impiegato ossigeno al catodo, come riportato in figura 20, pubblicati fra il 1999 ed il 2006 sono rappresentati dai cerchi di colore viola. I dati riportati dagli studi recenti che sottolineano le maggiori densità di potenza, in cui la potenza viene sempre normalizzata all'area della superficie proiettata dall'elettrodo catodico perché la potenza è limitata dal catodo, sono rappresentati dai triangoli di colore celeste. Un

recente test che ha utilizzato un anodo con un catodo che è stato 14 volte più grande ha prodotto un valore apparentemente alto di densità di potenza di 6,860 mW per m<sup>2</sup> (rappresentata da un rettangolo di colore verde), e se la densità di potenza viene normalizzata all'area della superficie proiettata dall'elettrodo catodico, tuttavia, la densità di potenza è stata solo di 490 mW per m<sup>2</sup>. La potenza del reattore pertanto non è stata aumentata, ma questo non dimostra che l'anodo può avere delle densità di potenza maggiori se le prestazioni del catodo sono ottimizzate. La linea tratteggiata in alto indica il valore massimo previsto sulla base del limite rappresentato dal trasferimento di massa del substrato verso l'anodo.

L'efficienza energetica di una MFC si calcola mediante il rapporto tra l'integrale della potenza istantanea generata dalla MFC nell'intervallo di tempo  $t$  ed il potere calorifico superiore (potere calorifico specifico che considera anche il calore latente di evaporazione dell'acqua, HHV) del substrato moltiplicato per la massa di substrato utilizzata ( $m_{\text{utilizzata}}$ ), secondo la formula:

$$EE = \frac{\int_0^t e_{\text{MFC}}(t) \cdot i(t) dt}{\text{HHV} \cdot m_{\text{utilizzata}}}$$

dove la tensione  $e_{\text{MFC}}$  misurata “a vuoto” (circuito aperto) rappresenta la forza elettromotrice della pila. Il valore del potere calorifico superiore per le acque reflue è noto soltanto in prima approssimazione e potrebbe non essere costante nel tempo, ad eccezione di quello di particolari acque reflue industriali (come quelle di alcune industrie alimentari) o di quelle “artificiali”, utilizzate nella valutazione delle prestazioni delle MFC.

È comunque possibile affermare che, in generale, le efficienze energetiche (riferite al potere calorifico) delle MFC varino dal 2% a più del 60 %, a seconda della biodegradabilità del substrato impiegato.

### 1.4.3 I tipi di celle a combustibile microbiche

Attualmente i tipi più impiegati di Microbial Fuel Cells, MFC sono qui di seguito riportati con la loro denominazione seguita dall'acronimo e in parentesi i termini;

- Cella a desalinizzazione: MDC (Microbial Desalination Cells);
- Cella elettrolitica microbica: MEC (Microbial Electrolysis Cell).

I dispositivi sopra menzionati, qui riassunti come MXCs, dove X assume la sigla delle diverse tipologie, ma le applicazioni condividono tutte un anodo microbico comune. A seconda del volume totale, le potremo classificare in questi altri modi:

- a grande volume: LMFC (Larger MFC),



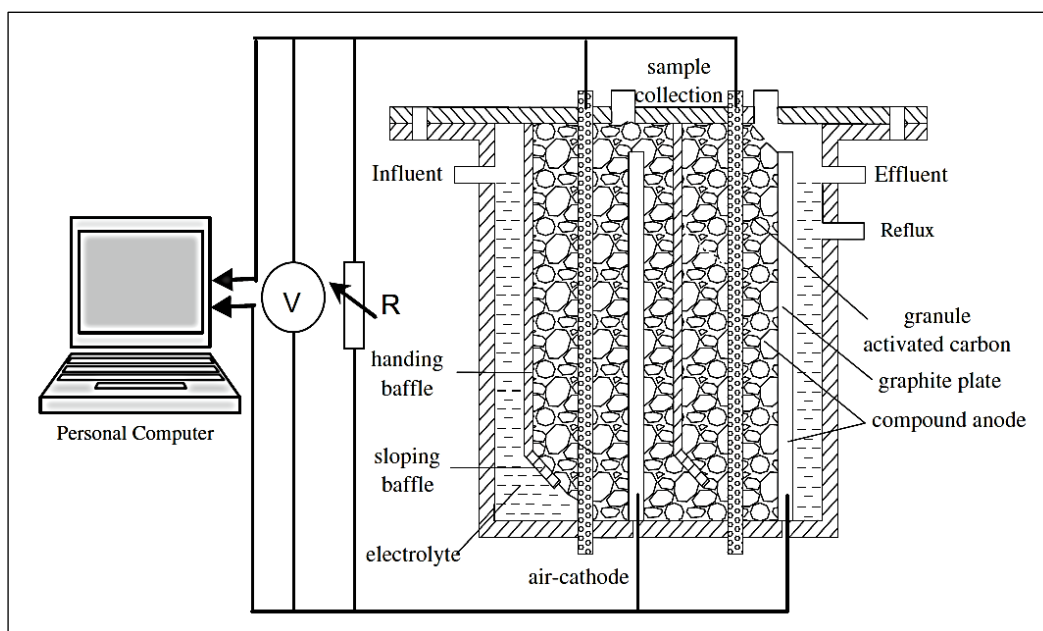
- a piccolo volume: SMFC (Smaller MFC);
- a singola camera: SCMEC (single-chamber MEC);

mentre per la forma delle camere anodica o catodica saranno:

- Camera catodica di forma parallelepipedica: C-MFC (cube),
- Camera catodica a forma di bottiglia, all'aria: bottle (B-MFC) air-cathode MFC,

o ancora per la forma della membrana:

- Membrana a pannello che avvolge il catodo, all'aria [19]: BAFMFC (baffled air-cathode microbial fuel cell), che viene riportata nella figura 21 con il circuito di misura delle grandezze elettriche:



*Figura 21 – BAFMFC, con il circuito di misura delle grandezze elettriche [56].*

- Membrana a fibre porose, in intercapedine: HFM-MFC (Hollow Fiber Membrane), ma questa tipologia è poco diffusa;

o anche per la forma degli elettrodi:

- Elettrodo a granuli di grafite in camera anodica tubolare, all'aria: GTMFC (graphite-granule anode, tubular air-cathode MFC);
- Elettrodo a spazzola di grafite: GFB (Graphite fibre brush);
- Elettrodo a granuli di grafite: GG (Graphite granule);
- Elettrodo a foglio di grafite: GP (Graphite plate).

### 1.5 Tabelle di confronto dei vari parametri delle MFC

Tabella 6 - Quadro riassuntivo dei vari tipi di sistemi bioelettrochimici (BES): la massima corrente prodotta ( $I_{max}$ ) e la potenza elettrica ( $P_{max}$ ) per ciascuna microbial fuel cell (MFC) o la massima corrente prodotta:

MFC	Tipo di cultura	Substrato	Tipo di elettrodo	Mediatore Redox
	<b>Coltura Axenica</b>			
1	<i>Proteus vulgaris</i>	Glucosio	Carbonio Vetroso Reticolato	X
2	<i>Erwinia dissolvens</i>	Glucosio	Tessuto di grafite	X
3	<i>Proteus vulgaris</i>	Glucosio	Carbonio Vetroso Reticolato	X
4	<i>Shewanella putrefaciens</i>	Lattato	Tessuto di grafite	
5	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	Acetato	Foglio di grafite piano	
6	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Glucosio	Foglio di grafite piano	
7			Tessuto di grafite	
8			Grafite espansa	
9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Glucosio	Foglio di grafite piano	
10	<i>Escherichia coli</i>	Lattato	Tessuto di grafite <sup>c</sup>	X
11			Foglio di grafite piano <sup>c</sup>	X
	<b>Colture miste</b>			
1	Mista, marina	Acetato	Foglio di grafite piano	
2		S <sub>2</sub> <sup>-</sup> /acetato	Foglio di grafite piano	
3	Consorzio misto, in batch	Glucosio	Foglio di grafite piano	
4	Fanghi attivi	Acque reflue	Tessuto di grafite	
5		Lattato	Tessuto di grafite <sup>b</sup>	X
6			Foglio di grafite piano <sup>b</sup>	X
7		Acque reflue	Tessuto di grafite	
8		Glucosio	Tessuto di grafite	
9	Consorzio misto, in continuo	Saccarosio	Grafite granulare	
10		Glucosio	Grafite granulare	
11		Acetato	Foglio di Carbonio	
12		Butirrato	Foglio di Carbonio	

continua alla tabella seguente

continua dalla tabella precedente	I (mA)	P (mW/m <sup>2</sup> )	P (W/m <sup>3</sup> )	Riferimento	MFC
	0,8	4,5	18	Rismani-Yazdi, H. et al. (2008)	1
	0,7	0,27 <sup>b</sup>	n.a. <sup>e</sup>	Dumas, C. et al. (2007)	2
	0,7	85	9,0	Schroder, U. (2007)	3
	0,04	0,00032	0,08	Tanisho, S. et al. (1989)	4
	0,4	13	0,35	Rabaey, K. et al. (2005)	5
	0,2	8	0,25	Kim, B.H. et al. (2003)	6
	0,57	17	1,7	Kim, B.H. et al. (2003)	7

	0,4514	33	0,96	Kim, B.H. et al. (2003)	8
	0,1	88	8,8	Bond, D.R. and Lovley, D.R. (2003)	9
	3,3	1,2	7,6	Habermann, W. and Pommer, E.H. (1991)	10
	2,6	91	3,6	Habermann, W. and Pommer, E.H. (1991)	11
	0,23	10	n.a. <sup>e</sup>	Busalmen, J.P. et al. (2008)	1
	60 <sup>d</sup>	32	n.a. <sup>e</sup>	Aelterman, P. et al. (2008)	2
	30	3600	216	Liu, H. et al. (2005)	3
	0,2	8	1,6	Clauwaert, P. et al. (2008)	4
	11	5,3	34	Habermann, W. and Pommer, E.H. (1991)	5
	2,6	788	32	Habermann, W. and Pommer, E.H. (1991)	6
	4,85	26	1,6	Logan, B.E. et al. (2006)	7
	0,9	494	13	Logan, B.E. et al. (2006)	8
	6,2	23	47	Tender, L.M. et al. (2002)	9
	5,4	18	37	Tender, L.M. et al. (2002)	10
	1,27	506	13	Rabaey, K. et al. (2005)	11
	0,46	305	7,6	Rabaey, K. et al. (2005)	12

<sup>a</sup> Dati sulla superficie non disponibili, valore assoluto in mW.

<sup>b</sup> Potenza di uscita calcolata come media delle potenze di uscita, dove possibile in quanto le potenze di picco sono meno rappresentative.

<sup>c</sup> Mediatore immobilizzato sulla / dentro la matrice degli elettrodi.

<sup>d</sup> Dato espresso come mA/m<sup>2</sup> riferito alla superficie dell'anodo.

<sup>e</sup> n.a., dati disponibile insufficienti, o non applicabili.

*Dati tratti da [13].*

*Tabella 7 - Quadro riassuntivo dei vari tipi di sistemi bioelettrochimici (BES): la massima corrente prodotta ( $I_{max}$ ) e la potenza elettrica ( $P_{max}$ ) per ciascuna microbial fuel cell (MFC) o la massima corrente prodotta e la tensione applicata ( $V_{applicata}$ ) per le celle elettrolitiche microbiche (MEC) in funzione del volume del reattore, al tipo degli elettrodi e al tipo di membrana, e alle condizioni operative.*

MFC	Anodo					Catodo		continua alla pagina seguente
	Substrato	Materiale	Tipo di alimentazione	Concentrazione del tampone fosfato (mM)	Concentrazione del tampone carbonato (mM)	Substrato	Materiale	
1	Glucosio (biocatalizzato)	carbonio, in foglio	in batch	53	–	O <sub>2</sub> /H <sup>+</sup>	foglio di carbonio platinizzato	

2	Glucosio (biocatalizzato)	Spazzola di grafite (con pretrattamento in ammoniaca)	in batch	200	–	O <sub>2</sub> /H <sup>+</sup>	2 tubi ultrafiltrazione con pasta di carbonio (Cobalto tetrametossifenil oporfirina)
3	Acetato (biocatalizzato)	rivestita di carbonio (con pretrattamento in ammoniaca)	in batch	213	–	O <sub>2</sub> /H <sup>+</sup>	foglio di carbonio platinizzato
4	Acetato (biocatalizzato)	Spazzola di grafite (con pretrattamento in ammoniaca)	in batch	200	–	O <sub>2</sub> /H <sup>+</sup>	carbonio Ketjen black (ftalocianina Fe(II))
5	Acetato (biocatalizzato)	Spazzola di grafite (con pretrattamento in ammoniaca)	in batch	201	–	O <sub>2</sub> /H <sup>+</sup>	foglio di carbonio platinizzato
6	Acetato (biocatalizzato)	carbonio, in foglio	in batch	2	30	O <sub>2</sub> /H <sup>+</sup>	foglio di carbonio platinizzato
7	Acetato (biocatalizzato)	grafite granulare	in batch	52	24	O <sub>2</sub> /H <sup>+</sup> (biocatalizzato)	feltro di grafite
8	Idrogeno (prodotto biologicamente)	Platino (ricoperto di polianilina fluorinata)	in batch	71	119	O <sub>2</sub> /H <sup>+</sup>	rivestito di carbonio (ftalocianina Fe(II))
9	Idrogeno (prodotto biologicamente)	Platino (ricoperto di polianilina fluorinata)	in batch	71	119	O <sub>2</sub> /H <sup>+</sup>	rivestito di carbonio (Cobalto tetrametossifenil oporfirina)
10	Acetato (biocatalizzato)	grafite granulare	in batch	52	24	O <sub>2</sub> /H <sup>+</sup> (biocatalizzato)	feltro di grafite

\* biocatalizzato, con trasportatori di elettroni Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup> per l'*Acidithiobacillus ferrooxidans*.

continua dalla pagina precedente	Membrana		Grandezze elettriche			Volume totale (litri)	Riferimento	MFC
	Tipo	m <sup>2</sup> ·m <sup>-3</sup>	I <sub>max</sub> A·m <sup>-3</sup> (MFC)	P <sub>max</sub> W·m <sup>-3</sup> (MFC)	V <sub>applicata</sub> (V)			
	assente	assente	36	13	–			

*Tesi di Dottorato di Ricerca dell'Ing. Gianluca Petroni*  
 Capitolo 1 - Principio di funzionamento delle celle a combustibile microbiche, *Microbial Fuel Cells (MFC)*

	assente	assente	100	18	–	0,029	Zuo et al. (2007)	2
	assente	assente	205	115	–	0,028	Cheng and Logan (2007a)	3
	assente	assente	237	56	–	0,026	Yu et al. (2007)	4
	assente	assente	310	73	–	0,027	Logan et al. (2007)	5
	cationica	44	100	30	–	0,036	Liang et al. (2007)	6
	cationica	69	251	83	–	0,184	Clauwaert et al. (2007b)	7
	cationica	1	29	7	–	0,5	Zhao et al. (2005)	8
	cationica	2	33	7	–	0,5	Zhao et al. (2005)	9
	cationica	69	96	30	–	0,531	Clauwaert et al. (2007b)	10

MFC	Anodo					Catodo		
	Substrato	Materiale	Tipo di alimentazione	Concentrazione del tampone fosfato (mM)	Concentrazione del tampone carbonato (mM)	Substrato	Materiale	
11	Acetato (biocatalizzato)	grafite granulare	in batch	52	24	O <sub>2</sub> /H <sup>+</sup> (biocatalizzato)	feltro di grafite	continua alla pagina seguente
12	Acetato (biocatalizzato)	grafite granulare	in continuo	52	24	O <sub>2</sub> /H <sup>+</sup> (biocatalizzato)	feltro di grafite	
13	Acetato (biocatalizzato)	grafite granulare	in continuo	64	–	Ferricianide	granuli di grafite	
14	Acetato (biocatalizzato)	grafite granulare	in continuo	65	–	Ferricianide	feltro di grafite	
15	Saccarosio (biocatalizzato)	carbonio attivo, in granuli	in continuo	45–178	–	Ferricianide	carbonio attivo, in granuli	
16	Acetato (biocatalizzato)	grafite granulare	in continuo	72	–	O <sub>2</sub> /H <sup>+</sup>	grafite granulare	
17	Acetato (biocatalizzato)	feltro di grafite	in continuo	20–30	–	O <sub>2</sub> /H <sup>+</sup> (biocatalizzato)*	feltro di grafite	
18	Acetato (biocatalizzato)	rivestita di carbonio	in batch	50	–	H <sup>+</sup>	carbonio, in foglio (Platino)	
19	Acetato (biocatalizzato)	carbonio attivo, in granuli	in batch	52	24	H <sup>+</sup>	rivestita di grafite (Pt)	
20	Acetato (biocatalizzato)	rivestita di carbonio	in batch	50	–	H <sup>+</sup>	carbonio, in foglio (Platino)	

*Tesi di Dottorato di Ricerca dell'Ing. Gianluca Petroni*  
 Capitolo 1 - Principio di funzionamento delle celle a combustibile microbiche, *Microbial Fuel Cells (MFC)*

21	Acetato (biocatalizzato)	feltro di grafite	in continuo	10	–	H <sup>+</sup>	membrana ed elettrodo + filo conduttore (Platino)
22	Ferrocianide	feltro di grafite	in batch	10	–	H <sup>+</sup> (biocatalizzato)	feltro di grafite

\* con trasportatori di elettroni Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup> per l'*Acidithiobacillus ferrooxidans*.

	Membrana		Grandezze elettriche			Volume totale (litri)	Riferimento	MFC
	Tipo	m <sup>2</sup> ·m <sup>-3</sup>	I <sub>max</sub> A·m <sup>-3</sup> (MFC)	P <sub>max</sub> W·m <sup>-3</sup> (MFC)	V <sub>applicata</sub> (V)			
continua dalla pagina precedente	cationica	43	90	32	–	0,699	Clauwaert et al. (2007b)	11
	cationica	69	188	65	–	0,184	Clauwaert et al. (2007b)	12
	cationica	33	110	50	–	0,312	Aelterman et al. (2006b)	13
	cationica	60	68	25	–	0,482	Rabaey et al. (2005b)	14
	cationica	30	56	10	–	0,62	He et al. (2006)	15
	cationica	assente	31	7	–	0,7	Freguia et al. (2007)	16
	bipolare	29	103	28	–	1.240	Ter Heijne et al. (2007)	17
	cationica	25	176	–	0,85	0,028	Liu et al. (2005b)	18
	cationica, a strati sottili **	22	145	–	0,8	0,225	Clauwaert et al. (2008)	19
	cationica	1	3	–	0,85	0,4	Liu et al. (2005b)	20
	cationica	8	29	–	1	3.300	Rozendal et al. (2007b)	21
	cationica	assente	36	–	– (fissando il potenziale del catodo a -0,700 V vs SHE)	0,825	Rozendal et al. (2008)	22

\*\* per ridurre i gradienti di pH per la produzione di H<sub>2</sub>/CH<sub>4</sub>.

Il volume totale del reattore è dato per convenzione dalla somma del volume dell'elettrodo, della membrana, e di tutto l'elettrolita nel reattore.

*dati tratti da [47].*

*Tabella 8 - Massima densità di corrente, densità di potenza ed efficienza coulombica dove i mediatori non sono stati aggiunti dai campioni in acqua pura fresca e da coltura mista:*

MFC	Configurazione del sistema	Materiale dell'anodo	Materiale del catodo	Membrana di scambio protonico	Densità di corrente (mA·m <sup>-2</sup> )
1	Doppia camera, in stack	carbonio vetroso reticolato (RVC)	RVC con 50 mM Ferricianide	Nafion 117	44
2	Doppia camera H-cell	grafite solida	Grafite	Nafion 117	50
3	Doppia camera H-cell	grafite solida	grafite solida con 50 mM Ferricianide	Nafion 117	65,4
4	Doppia camera, in stack	grafite solida	grafite solida con 100 mM Ferricianide	Ultrex	130
5	Upflow	carbonio vetroso reticolato (RVC)	carbonio vetroso reticolato (RVC)	Ultrex	516
6	Mono camera	tessuto di carbonio non resistente all'acqua	tessuto di carbonio non resistente all'acqua rivestito di carbonio e PTFE (Politetrafluoroetilene) ossigeno al catodo	assente	1050
7	Doppia camera convogliate, in stack	carbonio, in foglio	rivestito di carbonio (Platinizzato al 10% 0,5 mg·cm <sup>-2</sup> )	Nafion 117	1300
8	Doppia camera, in stack	fibre di carbonio	fibre di carbonio con 50 mM Ferricianide	Nafion 117	3200
9	Doppia camera, in stack	fibre di carbonio	fibre di carbonio con 50 mM Ferricianide	Nafion 117	4600
10	Doppia camera, in stack	grafite solida	Grafite con 100 mM Ferricianide	Ultrex	6000
11	Doppia camera, in stack	grafite solida	Grafite solida con 50 mM Ferricianide	Ultrex	Anodo granulare, non è data la superficie

continua alla pagina seguente

continua dalla pagina precedente	Densità di potenza sulla superficie dell'anodo ( $\text{mW}\cdot\text{m}^{-2}$ )	Densità di potenza sul volume totale dell'anodo ( $\text{W}\cdot\text{m}^{-3}$ )	Efficienza Coulombica (%)	Cultura/inoculo	Riferimento	MFC
	3000	500	8,3	Shewanella oneidensis ceppo DSP10	Ringeisen et al. (2006)	1
	9,3	0,25	56,2	Shewanella oneidensis	Lanthier et al. (2007)	2
	13,1	0,36	95	Geobacter sulfurreducens	Bond and Lovley (2003)	3
	1,67	0,077	dato non fornito	Pseudomonas aeruginosa	Rabaey et al. (2005b)	4
	170	8,7	0,7–8,1	fanghi da digestore anaerobico	He et al. (2005)	5
	766	19,1	32	acque reflue	Cheng et al. (2006)	6
	309	77	65	acque reflue	Min and Logan (2004)	7
	1600	1,4	40–45	fanghi da digestore anaerobico	Nevin, K. P. et al. (2008)	8
	1900	43,3 [2150 con anodo ottimizzato]	100	Geobacter sulfurreducens	Nevin, K. P. et al. (2008)	9
	3600	216	65–89	fanghi da digestore anaerobico arricchito	Rabaey et al. (2003)	10
	Anodo granulare, non è data la superficie	280	29	fanghi da digestore anaerobico e aerobico	Aelterman et al. (2006)	11

*dati tratti da [62].*

*Tabella 9 - Confronto delle prestazioni delle MFC in base alla configurazione MFC ed al metodo di funzionamento.*

<sup>a</sup> Le densità di potenza sono state calcolate sulla superficie apparente degli elettrodi.

<sup>b</sup> Le potenze volumiche sono state calcolate utilizzando il volume totale delle MFC.

<sup>c</sup> I dati sono stati segnalati in base alla superficie proiettata dell'elettrodo anodico.

<sup>d</sup> I dati sono stati calcolati in base al volume contenuto nel volume del compartimento anodico.

<sup>e</sup> n.a. significa "i dati disponibili sono insufficienti", o "non calcolabile".

<sup>f</sup> I dati sono stati calcolati in base al volume del liquido.



	Configurazione della MFC	Tipo di alimentazione	Substrato	Configurazione del sistema catodico	Densità di potenza <sup>a</sup> (mW/m <sup>2</sup> )	Potenza volumetrica <sup>a</sup> (W/m <sup>3</sup> )	Riferimenti		
<b>MFC con membrana</b>	Doppia camera e reattore a flusso a cultura mista	in batch	Acetato	Aria acquosa /ferricianide	16	0,4	Bond, D. R. and D. R. Lovley. (2003)		
			Glucosio	Aria acquosa /ferricianide	8.02	0,15	Chaudhuri, S. K. and D. R. Lovley. (2003)		
	Doppia camera e reattore a flusso a pistone	in continuo	Glucosio	Aria acquosa/ferricianide	3600 <sup>e</sup>	216 <sup>d</sup>	Rabaay, K. et al. (2003)		
			Glucosio	Aria diretta/platino	212 <sup>e</sup>	n.a. <sup>e</sup>	Min, B. and B. E. Logan. (2004)		
			Glucosio e glutammato	Aria diretta/platino	560	102	Moon, H., I. S. Chang, and B. H. Kim. (2006)		
			Glucosio	Ferricianide	4,310 <sup>e</sup>	85,5	Rabaay, K. et al. (2004)		
			Acque reflue domestiche	Aria diretta/platino	26	1,6 <sup>f</sup>	Liu, H., R. Ramnarayanan, and B. E. Logan. (2004)		
			Glucosio	Ferricianide	n.a. <sup>e</sup>	90 <sup>d</sup>	Rabaay, K. et al. (2005)		
			Acque reflue dalla trasformazione dei prodotti alimentari	in batch	Lactato	Aria diretta/grafite ferrico	788	16	Park, D. H. and J. G. Zeikus. (2003)
					Acque reflue domestiche	Aria diretta/platino	146	n.a. <sup>e</sup>	Liu, H. and B. E. Logan. (2004)
<b>MFC senza membrana</b>	Monocamera e reattore a flusso a pistone	in continuo	Glucosio e glutammato	Aria acquosa/platino	n.a. <sup>e</sup>	0,01	Jang, J. K. Et al. (2004)		
			Glucosio e glutammato	Aria acquosa/platino	n.a. <sup>e</sup>	7,6	Moon, H. et al. (2005)		
	Monocamera e reattore a flusso a pistone	in continuo	Glucosio	Perossido	22	0,43	Tartakovskiy, B. and S. R. Guiot. (2006)		
			Glucosio						

Dati tratti da [63].

Tabella 10 - riassunto dei parametri presentati da diverse celle a combustibile microbiche bicamera con l'ossigeno al catodo:

*Tesi di Dottorato di Ricerca dell'Ing. Gianluca Petroni*  
 Capitolo 1 - Principio di funzionamento delle celle a combustibile microbiche, *Microbial Fuel Cells (MFC)*

MFC	Materiale del catodo	Catalizzatore	Modalità di aerazione	Modalità di funzionamento del reattore	Superficie nominale del catodo (m <sup>2</sup> )	Volume totale del catodo (m <sup>3</sup> )	Volume totale del reattore (m <sup>3</sup> )	Corrente sulla superficie del catodo al MPP <sup>a</sup> (mA·m <sup>-2</sup> ) <sup>b</sup>	continua alla tabella seguente
1	Foglio di Carbonio	Nessuno	Aria insufflata	in batch	1,13·10 <sup>-3</sup>	2,5·10 <sup>-4</sup>	5,0·10 <sup>-4</sup>	133	
2	Foglio di Carbonio	Platino (0,5 mg/cm <sup>2</sup> )	Aria insufflata	in batch	1,13·10 <sup>-3</sup>	2,5·10 <sup>-4</sup>	5,0·10 <sup>-4</sup>	373	
3	Tessuto di Carbonio	Cobalto tetrametosifenilopirrina	Aria insufflata	in batch	3,0·10 <sup>-3</sup>	2,5·10 <sup>-4</sup>	5,0·10 <sup>-4</sup>	1900	
4	Feltro di grafite	Fe <sup>3+</sup> /Fe <sup>2+</sup>	Aria insufflata	in batch	2,9·10 <sup>-2</sup>	6,2·10 <sup>-4</sup>	1,2·10 <sup>-3</sup>	1300	
5	Tessuto di Carbonio	Platino (0,5 mg/cm <sup>2</sup> )	Aria passiva al catodo	in continuo	7,0·10 <sup>-4</sup>	1,3·10 <sup>-6</sup>	1,4·10 <sup>-5</sup>	6200	
6	Grafite granulare	Nessuno	Aria insufflata	in continuo	1,26	3,5·10 <sup>-4</sup>	7,0·10 <sup>-4</sup>	17	

Alcuni valori sono calcolati dagli altri dati riportati dai ricercatori;

<sup>a</sup> MPP, punto di massima potenza;

<sup>b</sup> Area nominale della superficie, o proiettata;

<sup>c</sup> Il volume catodico include il volume dell'elettrodo e quello del liquido;

n/a il valore non è riportato dall'autore e non può essere calcolato dagli altri dati.

continua dalla tabella precedente	Corrente sul volume del catodo al MPP <sup>a</sup> (A·m <sup>-3</sup> ) <sup>c</sup>	Potenza sul volume totale del catodo al MPP <sup>a</sup> (W·m <sup>-3</sup> ) <sup>c</sup>	Potenza sul volume totale del reattore al MPP <sup>a</sup> (W·m <sup>-3</sup> )	Rimozione del COD (%)	Efficienza Coulombica massima (%)	Efficienza energetica massima (%)	Riferimenti	MFC
	0,6	0,08	0,04	n/a	n/a	n/a	Oh, S. et al. (2004)	1
	1,7	0,8	0,4	80%	63–78%	<15%	Oh, S. et al. (2004)	2
	24	14	7	n/a	n/a	n/a	Zhao, F. et al. (2005)	3
	61	25	13	n/a	80–95%	18–29%	Ter Heijne, A. et al. (2006)	4
	3340	1240	115	n/a	30–60%	15%	Cheng, S. et al. (2007)	5
	63	21	11	91%	65%	13%	Freguia, S. et al. (2007)	6

*Dati tratti da [64].*

## Capitolo 2

### I batteri e le comunità microbiche elettrogeniche

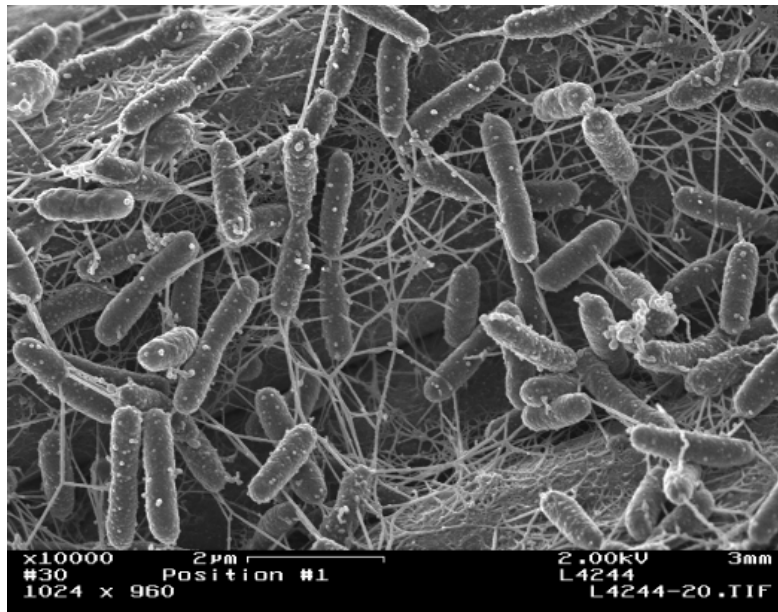
#### 2.1 Il biofilm

Un biofilm o biopellicola o microfouling, è una aggregazione complessa di microrganismi contraddistinta dalla secrezione di una matrice adesiva e protettiva, e spesso anche da:

- adesione ad una superficie, sia di tipo biologico che inerte (ad esempio rocce e protesi),
- eterogeneità strutturale,
- interazioni biologiche complesse,
- una matrice extracellulare di sostanze polimeriche, spesso di carattere polisaccaridico.

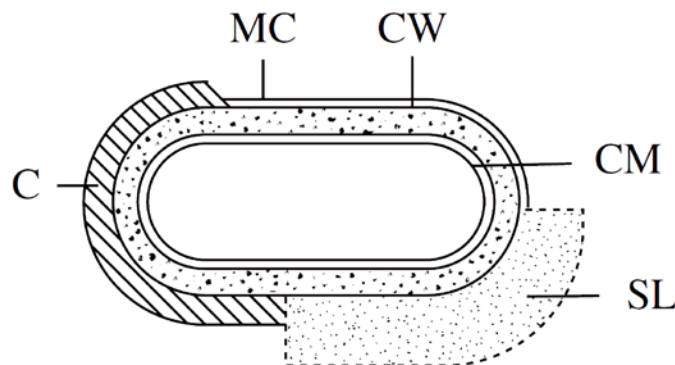
Gli organismi unicellulari solitamente mostrano due distinte modalità di comportamento. La prima è la familiare forma fluttuante, o planctonica, nella quale le cellule separate fluttuano o nuotano indipendentemente in un supporto liquido. La seconda è lo stato aggregato, o sessile, in cui le cellule sono strettamente vincolate e fermamente attaccate l'una all'altra ed anche, di solito, ad una superficie solida. La modifica del comportamento è attivata da un meccanismo di comunicazione chimica che differisce tra le specie. Alcune specie, ad esempio, possono produrre acil-omoseril-lattoni come segnale di "quiescenza", che induce le cellule planctoniche circostanti al cambiamento fenotipico verso lo stato sessile, attraverso una differente espressione dei geni della cellula. Il biofilm si può definire come uno strato irregolare di microrganismi concentrati nella melma o nella poltiglia in cui sono incorporati e secernono un liquido o su di una superficie solida. Sono delle grandi comunità batteriche complesse e organizzate. I biofilm che si sviluppano nelle condutture degli impianti industriali, possono rallentare il flusso dei fluidi che li percorrono, e compromettere la qualità delle acque potabili. Sono responsabili dell'aumento della velocità dei processi di corrosione non solo di tubature, ma anche di installazioni sommerse come ad esempio piattaforme petrolifere, imbarcazioni e installazioni costiere [66].

La figura 22 riporta una immagine SEM di un biofilm di *Geobacter sulfurreducens*:



*Figura 22 - Immagine al SEM di biofilm di Geobacter sulfurreducens.*

Molte cellule procariotiche sono ricoperte da polisaccaridi. In alcuni casi i polimeri sono strettamente integrati con la cella, mentre in altri sono collegati liberamente. Il primo strato si chiama capsula, ed il secondo strato di limo.



*Figura 23 - Schema della struttura della superficie di una cellula procariota che ci mostra la capsula e lo strato di melma: C, capsula; CM, membrana citoplasmatica; CW, parete cellulare; MC, micro-capsule; SL, strato di limo.*

Il materiale dello strato di limo può diffondere nel terreno e la sua struttura e composizione dipende dalle condizioni di crescita. Un ruolo importante per queste strutture è l'adesione alle cellule ospite per invasione o ad una superficie solida per iniziare e stabilizzare la formazione del biofilm. Queste strutture sono anche responsabili della resistenza alla fagocitosi, aumentandone così la virulenza. In alcuni batteri la funzione della capsula sarà quella di fare da recettore per i

fagi. Dal momento che i polisaccaridi sono idrofili, possono anche proteggere le cellule dall'essiccamento. Il termine glicocalice può essere usato per descrivere le strutture extracellulari inserite tra la capsula e lo strato di limo.

## 2.2 Molti batteri formano biofilm

Molti tipi di batteri che vivono in ambienti acquosi formano dense pellicole, dette biofilm, che aderiscono a superfici solide. I batteri presenti in un biofilm formano strati spessi fino a 200  $\mu\text{m}$ . I batteri secernono una sostanza melmosa simile alla colla, ricca di polisaccaridi, e restano immersi in questa matrice. La maggior parte dei biofilm è costituita da numerose specie di batteri e può includere altri tipi di organismi, come funghi e protozoi. Sono state trovate evidenze di antichi biofilm in sedimenti di ambienti costieri marini risalenti a 3,5 miliardi di anni fa.

La placca dentale è un esempio familiare di biofilm. Tali film si formano comunemente anche sulla superficie delle lenti a contatto e dei cateteri. Talvolta, si sviluppano su impianti chirurgici, come pacemaker e protesi articolari.

L'interazione dei microrganismi, che formano il biofilm, con un elettrodo darà luogo ad un bioanodo; sarà il materiale di cui è costituito l'elettrodo a svolgere una funzione catalizzatrice per i batteri stessi, il quale ne dovrà favorire la formazione e la crescita, sino alla saturazione. Se i bioanodi verranno inseriti e fatti sviluppare nelle microbial fuel cell, potranno anche effettuare uno scambio di elettroni e produrre così energia elettrica. In un bioanodo, i microrganismi elettrochimicamente attivi (EAM) ossidano (cioè prendono elettroni) dai donatori di elettroni (substrati) e trasferiscono questi elettroni all'elettrodo tramite vari meccanismi di trasferimento degli elettroni. In un sistema bioelettrochimico (BES) funzionante con un bioanodo, un ruolo importante nell'insieme delle prestazioni complessive lo svolgono le prestazioni dell'anodo. Gli aspetti fondamentali dei bioanodi debbono essere approfonditamente analizzati, per comprendere meglio la crescita, la cinetica di funzionamento e le interazioni dei microrganismi anodofili. I BES hanno molte applicazioni possibili: possono essere utilizzati per il trattamento delle acque reflue e il recupero di energia rinnovabile, per la produzione di vettori energetici, come l'idrogeno o il metano, per il biorisanamento di composti da riciclare o per la produzione di prodotti di possibile utilità. Vale la pena di ricordare anche l'uso di BES come biosensori per il monitoraggio della domanda biologica di ossigeno (BOD) o di sostanze tossiche, nei processi di trattamento delle acque reflue.

Nella tabella 11 sono riportati i valori delle densità di potenza per alcuni dispositivi produttori di energia elettrica:

Batterie chimiche	30-90 kW/m <sup>3</sup>
Celle a combustibile	140 kW/m <sup>3</sup>
Digestione anaerobica	4 kW/m <sup>3</sup>
Sistema bioelettrochimico (BES)	0,1 kW/m <sup>3</sup>

Tabella 11 - Dispositivi produttori di energia elettrica e valori delle densità di potenza.

### 2.3 I batteri e le comunità elettrogeniche

Il fenomeno della bioelettricità microbica è ancora poco conosciuto nei suoi dettagli molecolari, ma quello che è certo è che avviene grazie alle peculiari capacità di alcuni batteri che vivono nel suolo e nei sedimenti marini in grado di trasferire gli elettroni attraverso accettori extracellulari. I primi organismi dotati di tali capacità ad essere individuati e studiati appartenevano al genere *Geobacter*, batteri capaci di crescere nei sedimenti marini o lacustri. Pertanto tale batterio è stato utilizzato come modello per lo studio dei meccanismi genetici che stanno alla base del fenomeno elettrogenico.

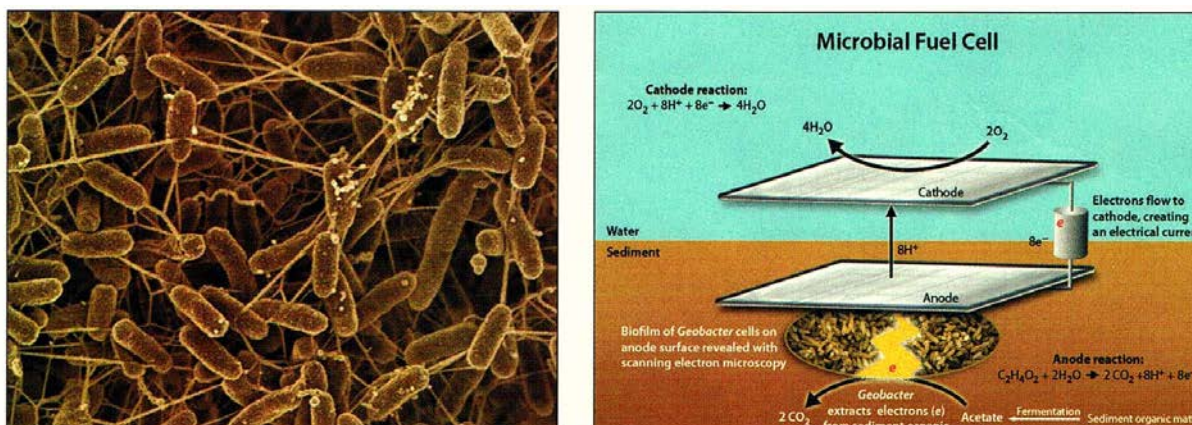


Figura 24 - Schema generale di una MFC con batteri *Geobacter sulfurreducens* che ossidano un substrato e si collegano attraverso microscopici filamenti detti nanopili, con i quali si trasferiscono gli elettroni.

Numerosi studi hanno dimostrato che il processo di trasferimento elettronico avviene prevalentemente in ambiente anaerobico con tre modalità: la prima è diretta, ovvero attraverso la formazione di biofilm di batteri elettrogenici sulla superficie dell'elettrodo e il trasferimento di elettroni tramite contatto diretto; la seconda prevede la formazione e l'utilizzo di micropili che

fungono da veri e propri cavi elettrici microscopici, detti nanowires, che collegano le cellule batteriche tra di loro e all'elettrodo, un aspetto di grande interesse per chi si occupa di nanotecnologie. La terza modalità è indiretta, ovvero non richiede il contatto fisico con l'elettrodo né la formazione dei micropili, ma prevede l'utilizzo di mediatori chimici, detti electron shuttle, come mezzo di trasporto per gli elettroni. È particolarmente interessante il fatto che nell'ambiente naturale i batteri non vivono isolati l'uno dall'altro, ma formano delle proprie comunità microbiche all'interno delle quali ognuno di essi svolge determinate funzioni. La comunità microbica diventa così capace di svolgere numerosi processi, tra i quali la produzione di energia elettrica e/o la rimozione biologica di materiali di scarto (biologici e non).

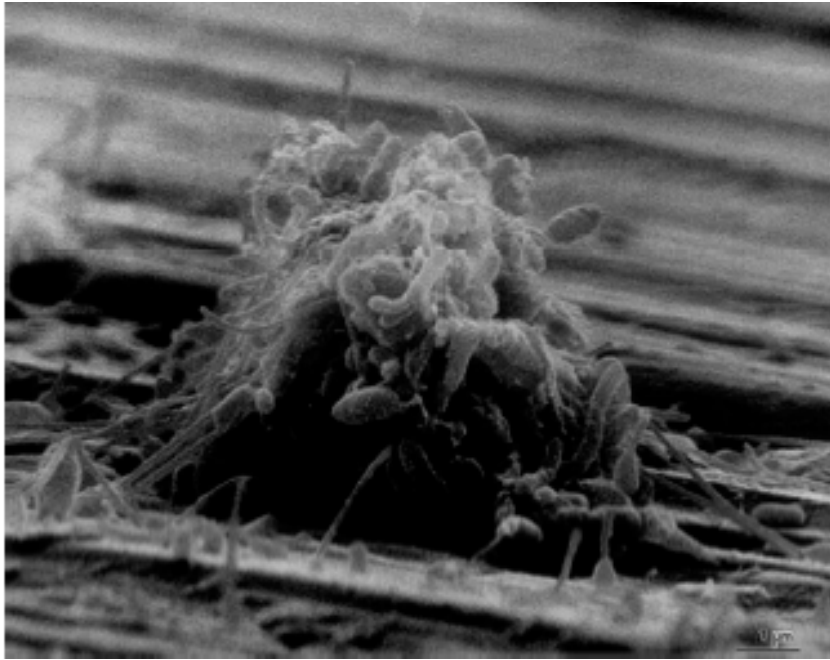
In seguito alla scoperta che le proprietà elettrogeniche non sono quindi esclusive di poche specie batteriche ma molto più diffuse e variabili di quanto si pensasse e che batteri diversi sono "specializzati" per l'utilizzo di substrati organici diversi, si è subito compresa l'enorme potenzialità che le comunità microbiche offrono in questo contesto. La causa del perché tali batteri abbiano sviluppato tali capacità non è ancora stata trovata. Tuttavia sono state avanzate tre possibili funzioni:

1. di respirazione microbica, consentendo alle cellule di utilizzare ossidi di metallo (es. ferro) quali accettori finali di elettroni, producendo Fe(II) a partire da Fe(III);
2. di trasferimento elettronico tra batteri diversi, consentendo loro di ottenere energia attraverso una sorta di meccanismo catalitico;
3. una terza funzione potrebbe essere quella di meccanismo di comunicazione tra batteri che, però, non è mai stato dimostrato.

Il motivo tuttavia rimane da indagare.

## 2.4 Metodi di studio dei biofilm

La nostra conoscenza dei biofilm si è sviluppata con l'evolversi dei metodi investigativi. Gran parte dei primi lavori si sono basati sulla microscopia elettronica a scansione (figura 25). Questa tecnica utilizza solventi che disidratano gradualmente il campione prima dell'esame e provocano artefatti. Le sostanze polimeriche extracellulari, che per il 95% sono formate da acqua [67], compaiono più come fibre che come spessa matrice gelatinosa che circonda le cellule. L'uso della microscopia elettronica e la colorazione specifica del polisaccaride con rutenio, invece, hanno consentito di chiarire la natura delle fibre extracellulari nei biofilm e la loro associazione con le cellule. La microscopia elettronica è stata usata per l'esame e la descrizione dei biofilm sui dispositivi medici [72], [73] e nelle infezioni umane [74], [75].



*Figura 25 - Micrografia elettronica a scansione di un biofilm sviluppatosi in un sistema di acque industriali [76].*

Tuttavia anche la preparazione dei campioni per la m.e. può provocare artefatti, cui si può ovviare con l'uso dell'ESEM (Environmental Scanning Electron Microscopy), che consente l'osservazione di campioni umidi in pressione variabile da 1 a 20 Torr e in condizioni di umidità e temperatura controllata [77].

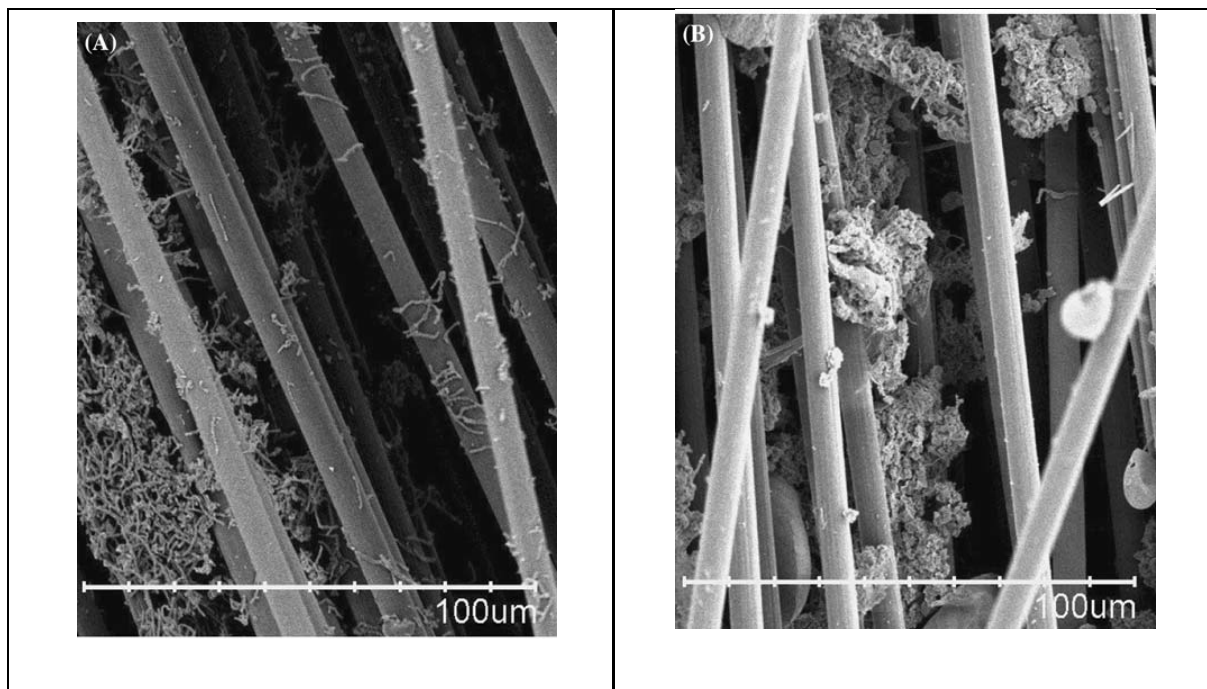
Lo sviluppo della microscopia laser confocale a scansione (CLSM) negli anni '80 ha fornito la capacità di esaminare i biofilm in situ senza le limitazioni incontrate con il microscopio elettronico a scansione, anche se a minore risoluzione. La diminuzione nella risoluzione è stata più che compensata dalla possibilità di esaminare la matrice del biofilm invariata ed intatta. L'uso sia della CLSM sia della microscopia ad epifluorescenza richiede che gli organismi nei biofilm siano resi fluorescenti. Una tecnica è quella della colorazione con emissione di fluorescenza con arancio di acridina [76].

## 2.5 Biofilm microbico

I microrganismi sul bioanodo generalmente crescono nel biofilm sulla superficie dell'elettrodo [78], [79]. La produzione di pili conduttivi e/o trasportatori di elettroni è importante per la formazione e il funzionamento del biofilm in quanto consentono ai microrganismi di trasferire gli elettroni all'elettrodo ad una distanza fino a 40-50  $\mu\text{m}$  [80], [81]. I pili potrebbero anche essere coinvolti nel supporto strutturale del biofilm anodico e sono ritenuti essenziali per aumentare lo



spessore del biofilm [81], [83], che è importante per le prestazioni dell'anodo perché si correla con la quantità di biomassa attiva che può potenzialmente utilizzare l'elettrodo come accettore di elettroni.



*Figura 26 - Immagine SEM sulla crescita del biofilm sulla superficie dell'anodo (A) e del catodo (B). Ogni barretta della scala è lunga 100  $\mu\text{m}$ .*

Tuttavia, sino ad oggi, i biofilm anodici sono stati trovati di spessore piuttosto sottile rispetto a quelli trovati in altri processi biologici, e in molti casi, è stata riscontrata una distribuzione non omogenea di biomassa microbica sugli elettrodi [83], [84]. La corrente che può essere generato da un biofilm anodico, in genere, aumenta con la quantità di biomassa attiva adesa o collegata con l'elettrodo [81], [85]. Rispetto alla densità di biomassa osservata nei reattori anaerobici, che sono dell'ordine di almeno 10-20 g di peso a secco della cella (CDW)  $\text{L}^{-1}$  [86], la densità di biomassa nei bioanodi è 20-40 volte inferiore. Aumentando la densità di biomassa nei bioanodi ai livelli presenti in altre applicazioni biotecnologiche si potrebbero migliorare sostanzialmente le prestazioni dei bioanodi. Tuttavia, una maggiore densità di biomassa sarà ottenuta da un più alto ritmo di rotazione del substrato e quindi una produzione di corrente, se le perdite dei reattori non sono elevate.

## 2.6 Meccanismi di trasferimento degli elettroni sugli elettrodi

Fondamentale per il funzionamento di una cella a combustibile microbiologico è la formazione dei biofilm batterici altamente specializzati sulla superficie dell'elettrodo. Mentre molte specie

batteriche si sono formate per collegarsi sugli elettrodi, ad oggi solo poche sono state isolate in una coltura pura con la possibilità di produrre una elevata densità di corrente. Una di tali specie, il *Geobacter sulfurreducens*, si ipotizza formi un biofilm conduttore di elettricità in grado di trasferire gli elettroni ad una considerevole distanza, superiore ai 50  $\mu\text{m}$ . I meccanismi di trasferimento degli elettroni attraverso tali distanze solo ora si sono iniziati a capire e possono comportare una matrice di nanofili prodotti batteriologicamente e/o i citocromi di tipo c, ma limitati però a causa dell'accumulo di protoni. L'evoluzione della ricerca e gli studi di ingegneria genetica si stanno adesso iniziando ad occupare sul come aumentare la potenza per una cella, con successi alterni.

### 2.6.1 I modelli per i meccanismi di trasferimento degli elettroni che si verificano in un bioanodo

Nella figura 27, il riquadro (a) mostra i “modelli consolidati” per i meccanismi di trasferimento degli elettroni nei bioanodi: (i) il trasferimento indiretto di elettroni da parte dei mediatori aggiunti esternamente; (ii) il trasferimento indiretto di elettroni da parte dei mediatori auto prodotti; (iii) il trasferimento diretto di elettroni da (un unico) citocromo della membrana esterna; e (iv) trasferimento di elettroni da ‘nanofilamenti’.

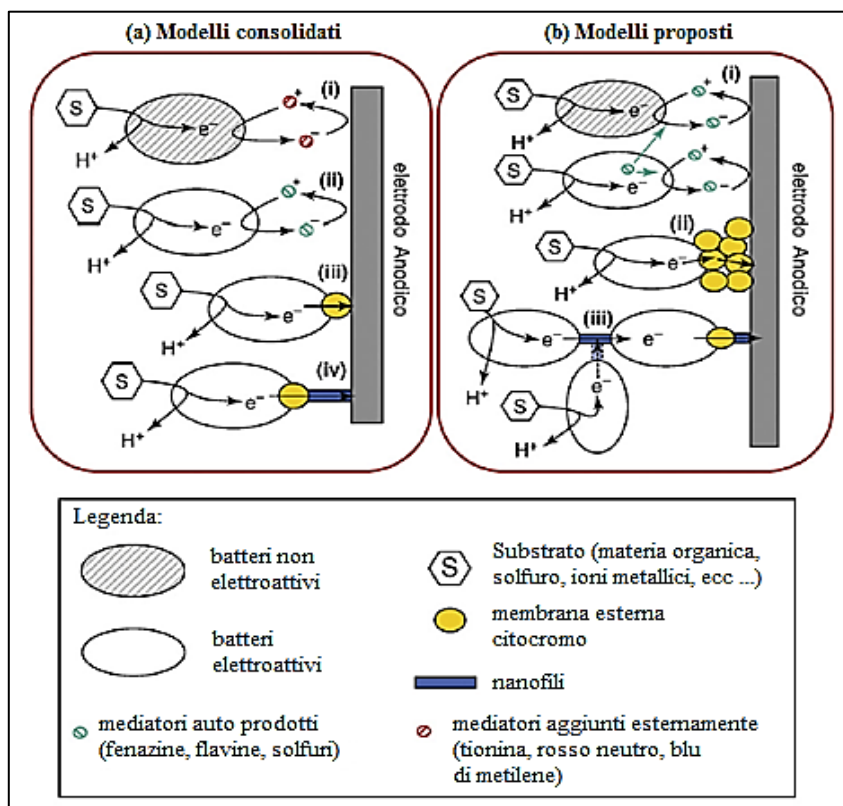


Figura 27 - Meccanismi di trasferimento degli elettroni nei bioanodi. Il riquadro (b) mostra gli ipotetici “modelli proposti” recentemente per i trasferimenti di elettroni che si basano su recenti osservazioni [87], [88], [89]: (i) il trasferimento indiretto di elettroni di specie non elettroattive

*ottenute utilizzando mediatori che sono prodotti da specie elettroattive; (ii) il trasferimento diretto di elettroni da uno strato di citocromi mescolati alla membrana esterna; e (iii) il trasferimento di elettroni da una cella all'altra attraverso "nanofilamenti".*

Numerosi studi hanno confermato che gli elettroni che sono prodotti dalla ossidazione dei substrati in un bioanodo sono trasferiti agli elettrodi per mezzo di diversi meccanismi, che sono simili a quelli presenti nella respirazione anaerobica extracellulare [13],[90], [91]. In breve, gli elettroni possono essere trasferiti da: (i) i *citocromi c* che si trovano sulla superficie esterna delle membrane cellulari batteriche, come è stato scoperto nel *Shewanella oneidensis* e *Geobacter sulfurreducens* [78], [92]; (ii) pili conduttivi, noto anche come "nanofilamenti" [93], [94]; e/o (iii) trasportatori di elettroni che si sono aggiunti esternamente [95] o prodotti dai microrganismi stessi [96], [97] (Figura 27a). I trasportatori di elettroni prodotti microbiologicamente possono essere i metaboliti primari, come i solfuri [12] o gli ioni di ferro [90], o i metaboliti secondari, come ad esempio fenazine, ma la loro produzione è energeticamente costosa [98], [80]. Resta da stabilire il contributo di ciascun meccanismo di trasporto degli elettroni nell'insieme del flusso di elettroni che passa dai microrganismi all'elettrodo anodico [99], [90].

## 2.7 Andamento dei gradienti all'interno di un biofilm di *Geobacter sulfurreducens* elettrogeneratore

In un biofilm di *G. sulfurreducens* elettrogeneratore alcuni gradienti possono influenzare la produzione di energia. Questi includono la concentrazione del substrato, il potenziale locale e l'accumulo dei protoni. Se la concentrazione del substrato scende sotto un livello di soglia, le sezioni del biofilm possono diventare dei limitati donatori di elettroni (concentrazione del substrato). Celle a combustibile microbiologiche con *G. sulfurreducens* con 10 mM acetato in configurazione a flusso non si pensa saranno limitate dal substrato [100]. Se il biofilm è definito come una matrice conduttiva, può essere considerato funzionare come una parte della conduzione dell'anodo e di elettroni può creare un gradiente di potenziale elettrico in tutto lo spessore del biofilm (potenziale locale) [101]. La conduzione degli elettroni attraverso il biofilm dell'anodo dipende dal gradiente di potenziale mentre il potenziale è controllato dal tasso di respirazione dei microbi [102]. L'accumulo dei protoni nel biofilm provoca la formazione di un gradiente di pH, attualmente ritenuto uno dei principali fattori che limitano la produzione di energia elettrica in un biofilm di *G. sulfurreducens* elettrogeneratore [103], [104].

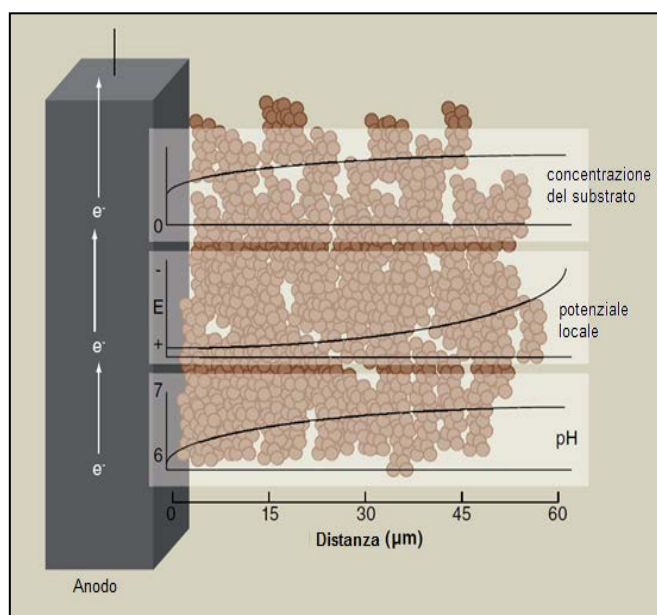
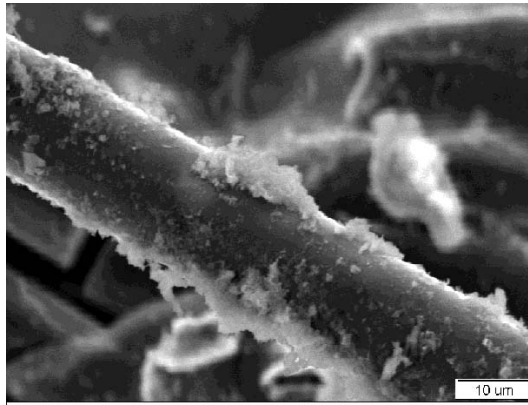


Figura 28 - Andamento dei gradienti all'interno di un biofilm di *Geobacter sulfurreducens* elettrogenatore.

L'aggiunta su larga scala di un tampone è inverosimile in una applicazione reale. Simile all'aggiunta dei mediatori, l'aggiunta di un tampone dovrebbe avvenire continuamente in un sistema a flusso continuo, aumentando i costi e richiederebbe un trattamento per rimuovere il tampone dopo la generazione di energia.

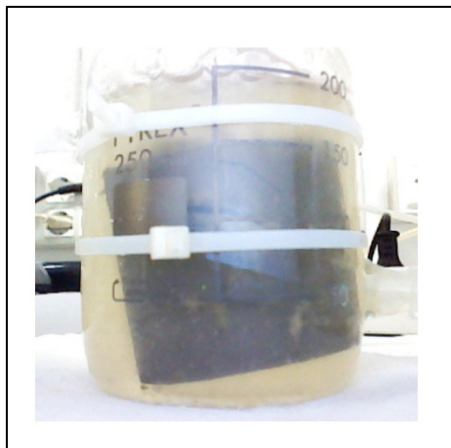
Quando la C-SNARF-4, una sonda fluorimetrica (FluoroProbe) sensibile al pH, è stato utilizzata per le immagini in tempo reale di una MFC per analizzare l'eterogeneità spaziale all'interno degli attuali biofilm elettrogenici, una differenza di dieci volte, pari ad una differenza di 1 pH, è stata osservata tra il dentro e il fuori di un biofilm di spessore di 50 micron (Figura 28) [105]. L'esterno del biofilm, il più lontano dall'anodo, si trovava a un simile pH alla parte fluida del volume a pH 7, mentre le cellule all'interno del biofilm, più vicine all'anodo, sono stati a pH 6. La disconnessione dell'anodo, causando una perturbazione nei trasportatori di elettroni e nei protoni prodotti, ha portato il biofilm a ritornare ad un pH neutro. Allo stesso modo, la crescita con un elettrone solubile non produce un gradiente di protoni che si formano all'interno del biofilm. Il trasferimento di protoni attraverso il biofilm è pensato di essere uno dei limiti maggiori alla produzione di corrente [25], [104][105][107]. Il gradiente dei protoni all'interno del biofilm porta all'ipotesi di quale parte del biofilm elettrogenico era metabolicamente attivo. Gli studi di modellizzazione hanno suggerito che una gran parte di biofilm elettrogenico sarebbe metabolicamente inattivo a causa all'inibizione dei protoni [100].



*Figura 29 - Immagine al SEM della crescita di una popolazione batterica su una fibra di carbonio.*

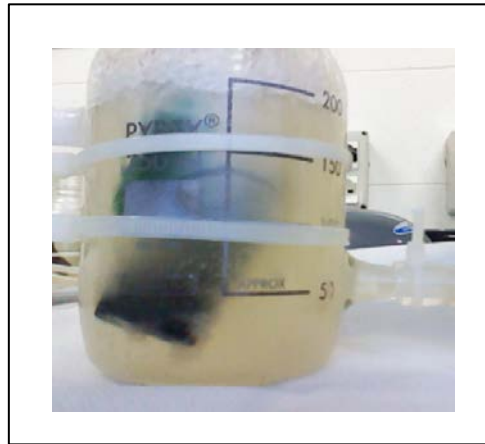
## 2.8 Biofilm sulle MFC in laboratorio

La crescita del biofilm che si è manifestata sugli elettrodi di grafite delle nostre MFC, è qui riportata in 2 immagini; si possono vedere le masse più dense di coltura batterica adese agli elettrodi catodici; in questa prima immagine il biofilm è cresciuto nella parte centrale dell'elettrodo:



*Figura 30 - Biofilm su un elettrodo di grafite piana.*

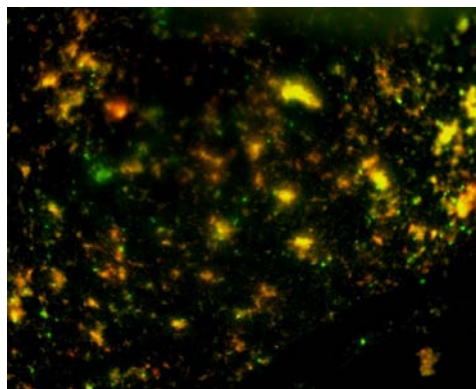
mentre in questa seconda immagine il biofilm è cresciuto a chiazze ed in forma più melmosa e con uno spessore maggiore maggiormente sui bordi dell'elettrodo di grafite:



*Figura 31 - Biofilm su un elettrodo di grafite piana.*

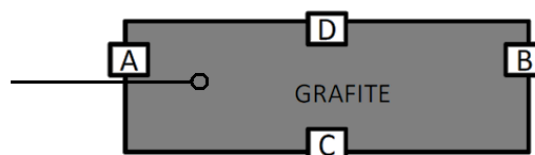
### 2.8.1 Analisi effettuate sul biofilm

Per studiare la formazione di biofilm sull'elettrodo, il frammento di grafite è stato prelevato dall'anodo della bicamera 1:2 e successivamente colorato tramite il LIVE/DEAD bacterial viability kit per evidenziare la presenza di batteri. Tramite l'utilizzo di due coloranti fluorescenti è possibile evidenziare in verde i batteri vivi mentre con il rosso quelli morti. Il giallo indica i punti di sovrapposizione.



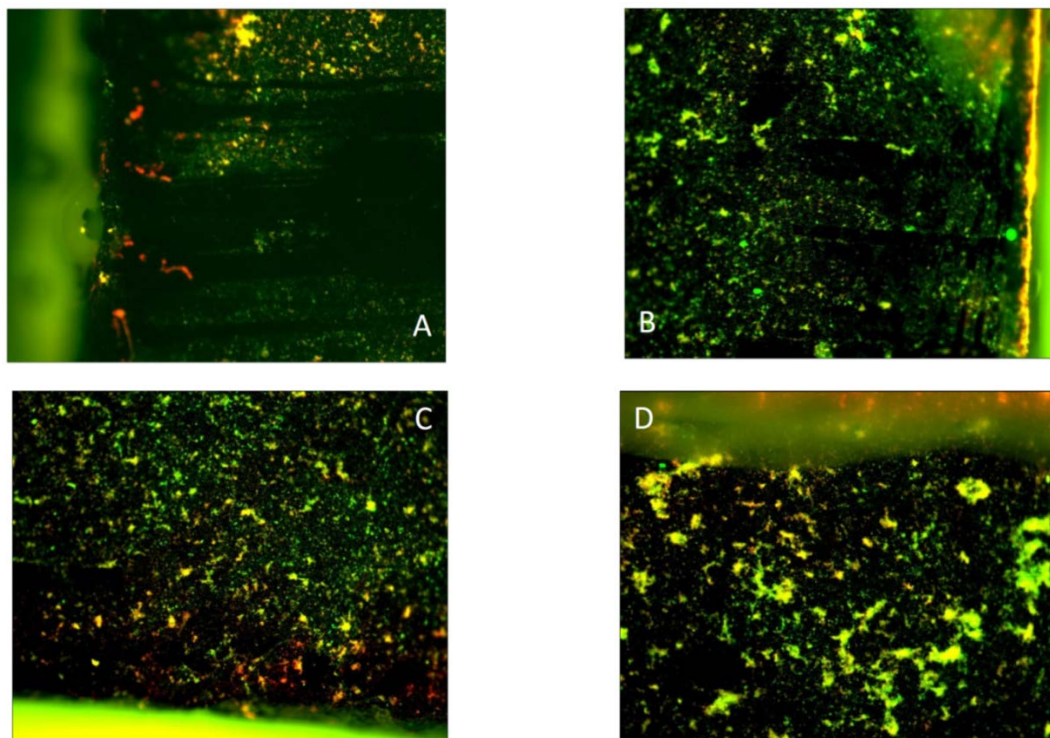
*Figura 32 - Studio della formazione di biofilm sull'elettrodo.*

I punti dell'elettrodo dai quali sono stati eseguite le immagini della coltura batterica sono qui di seguito riportate, ed il cerchio avente un segmento rappresenta il collegamento elettrico posto nella parte superiore dell'elettrodo:



*Figura 33 - Indicazione dei punti dell'elettrodo di grafite piana dei quali sono state effettuate le analisi.*

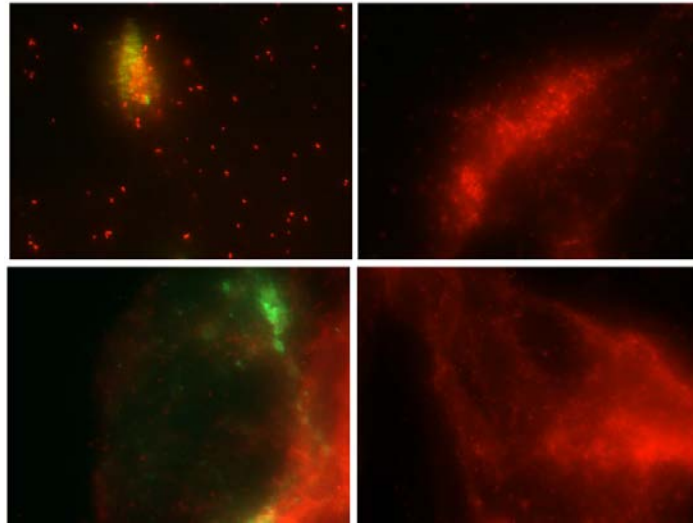
Le relative foto del biofilm dall'analisi con la tecnica che si chiama "crystal violet assay" sono state eseguite al Dipartimento di Biologia e Biotecnologia "C. Darwin" alla Università degli Studi di Roma "SAPIENZA"; sono riportate nell'ordine con i 4 punti scelti sull'elettrodo e indicati con le lettere maiuscole corrispondenti:



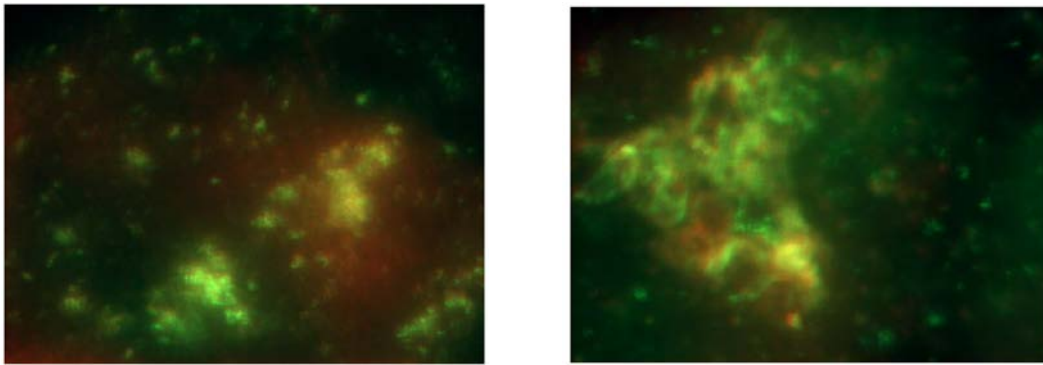
*Figura 34 - Immagini dei punti corrispondenti sull'elettrodo di grafite piana.*

In breve, questo saggio utilizzato colora le cellule vive in verde e quelle morte in rosso. Nel grafene le cellule sono quasi tutte rosse (morte) mentre per la grafite e la grafite siliconata prevalgono le cellule verdi (vive). La cosa è molto interessante per la grafene, perché un elettrodo si fatto anche se non può essere utilizzato come anodo, potrebbe avere applicazioni diverse.

Per colorare le cellule, è stato utilizzato il crystal violetto che è un colorante che si assorbe alla parete cellulare batterica (come per la colorazione di gram). Le cellule debbono poi essere lavate con acqua per eliminare le cellule che non formano biofilm e successivamente il crystal violet viene rilasciato tramite lavaggio in etanolo. L'etanolo viene poi recuperato insieme al crystal violetto e la quantità di colorante viene stimata tramite spettrofotometro.



*Figura 35 - Analisi del grafene.*



*Figura 36 - Analisi della grafite siliconata.*

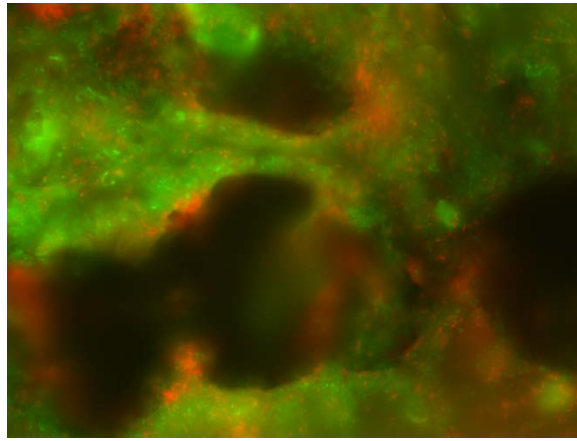
Lo stesso tipo di analisi ottenute con un microscopio a fluorescenza confocale per live imaging della Zeiss del modello Z1 del Centro di ricerca di Nanotecnologie applicate all'Ingegneria di Sapienza – CNIS, di cui è riportata una immagine nella figura 37:



*Figura 37 - Immagine del Microscopio a fluorescenza confocale per live imaging, al CNIS - Centro di Ricerca per le nanotecnologie Applicate all'Ingegneria a SAPIENZA.*

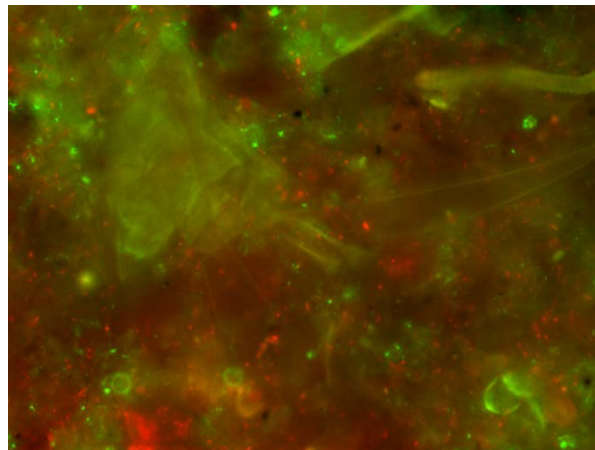
e le immagini sono state effettuate per la MFC-C e la MFC-U:





*Figura 38 - Immagine con microscopio a fluorescenza confocale della MFC-U non condizionata, con digestato ma senza terreno di coltura.*

Nella immagine precedente si riscontra una struttura del biofilm complessa e ben delimitata;



*Figura 39 - Immagine con microscopio a fluorescenza confocale della MFC-C condizionata, con digestato ma senza terreno di coltura.*

nella immagine precedente si riscontra invece una struttura del biofilm più frammentata e molto meno ben delimitata della precedente.

## 2.9 Problematiche legate alla formazione di biofilm negli impianti industriali

La contaminazione da biofilm nell'industria alimentare comporta seri problemi per la salute umana e può compromettere l'intero ciclo di produzione; è anche possibile una contaminazione da patogeni per le ideali condizioni di colonizzazione che si verificano durante il ciclo produttivo [70].

### 2.9.1 Come i microrganismi formano biofilm, quorum-sensing

In natura i microrganismi sono attirati da superfici solide su cui si depositano, aderiscono e si moltiplicano attivamente formando colonie. Questo accumulo di cellule può ingrandirsi a tal punto da includere detriti organici ed inorganici, nutrienti ed anche altri microrganismi formando così un biofilm [108].

I batteri planctonici possono aderire alle superfici ed iniziare la formazione del biofilm anche in presenza di flussi continui.

Si è portati a pensare che il flusso turbolento ostacoli la adesività batterica e la formazione del biofilm ma, qualunque sia il meccanismo, i biofilm si formano anche in presenza di elevati flussi nei sistemi naturali ed industriali; ne è la riprova il funzionamento delle MFC con il tipo di alimentazione “in continuo”.

Una volta che un biofilm si è formato e la matrice esopolisaccaridica è stata secreta dalle cellule sessili, la struttura risultante è altamente viscoelastica con caratteristiche di materiale gommoso [110].

Quando i biofilm si accrescono su piccole superfici, hanno una bassa resistenza alla trazione e si rompono facilmente, ma sono notevolmente forti e resistenti a rottura meccanica se si sviluppano su superfici più estese [76].

La formazione di un biofilm, comunque, è un processo dinamico e complesso che si articola in diverse fasi:

- 1) adesione alla superficie;
- 2) formazione di microcolonie;
- 3) maturazione del biofilm.

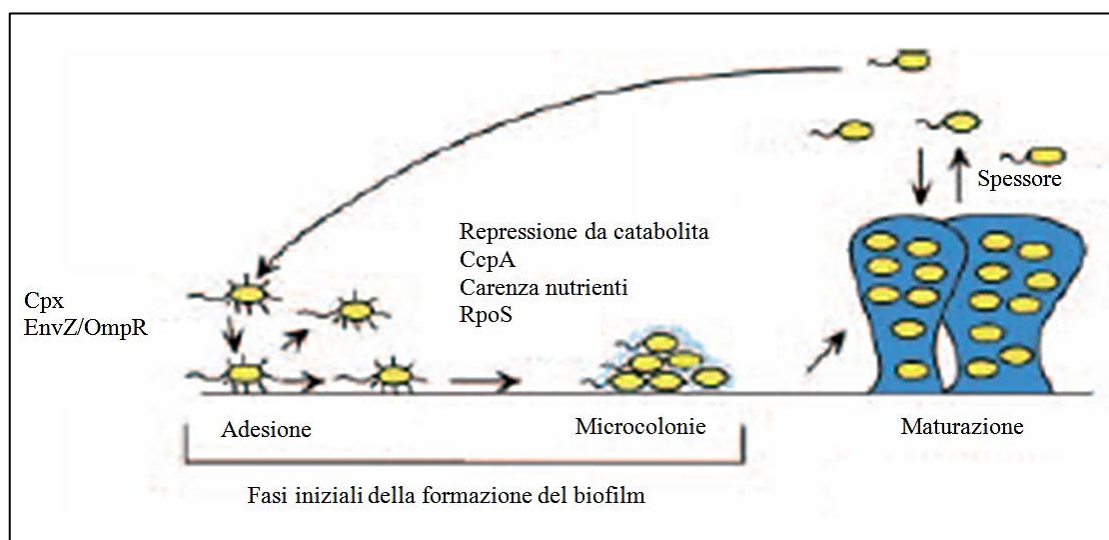


Figura 40 - Rappresentazione schematica del ciclo di formazione del biofilm [111].

L'adesione al substrato e la formazione di microcolonie sono eventi influenzati da segnali ambientali quali osmolarità, pH, disponibilità di ferro, ossigeno, temperatura e disponibilità di nutrienti [110], mentre la maturazione del biofilm, responsabile dell'architettura e dello spessore, è regolata dal quorum-sensing: quest'ultimo è un sistema di comunicazione conservato tra diverse specie batteriche in grado di rispondere all'aumento della densità di popolazione modificando l'espressione genica.

### 2.9.2 Adesione alla superficie

Il primo punto nella formazione del biofilm implica l'adesione delle cellule batteriche ad una superficie o ad un'interfaccia solido-liquido (figura 40). È un processo che dipende sia dalla probabilità che il batterio entri in contatto diretto con la superficie, sia dall'instaurarsi di interazioni cellula-superficie in grado di superare le forze repulsive che si generano fra le superfici. Anche se il contatto iniziale di una cellula batterica con una superficie non è regolato geneticamente, ci sono prove che dimostrano l'esistenza di meccanismi che regolano la formazione di interazioni stabili tra cellula e superficie. Alcune di queste derivano dagli studi sul sistema Cpx di *Escherichia coli* ed indicano che i batteri possono percepire il contatto con una superficie e rispondere regolando l'espressione genica per promuovere interazioni stabili cellula-superficie. Infatti, quando le cellule di *E. coli* si trovano a contatto con una superficie attivano il sistema di controllo a due componenti Cpx. Questo è formato da due geni che codificano rispettivamente la proteina CpxA, una chinasi sensore, e la proteina CpxR, un regolatore del segnale [115]. L'attivazione di questo sistema dipende dalla proteina di membrana NlpE che potrebbe essere un sensore diretto del contatto. Il mutante *cpxR* interagisce meno stabilmente con la superficie rispetto al ceppo selvatico, mentre il mutante *cpxA* quando forma biofilm produce meno biomassa rispetto al ceppo selvatico. Inoltre il sistema Cpx è coinvolto nella regolazione della biogenesi dei pili di tipo IV [116], che hanno un ruolo nell'adesione di superficie, e di altre appendici cellulari coinvolte nell'interazione cellula-superficie e cellula-cellula [117].

Le interazioni cellula-superficie, oltre ad essere regolate dal semplice contatto della cellula con la superficie, possono anche essere regolate dalle condizioni ambientali come l'osmolarità. In cellule di *E. coli* che colonizzano superfici ad alta osmolarità, viene attivato il sistema EnvZ/OmpR, un sistema costituito da due proteine coinvolte nella stabilizzazione delle interazioni cellula-superficie in condizioni di alta osmolarità. In presenza di alte pressioni osmotiche la proteina EnvZ fosforila e attiva la proteina OmpR che regola la formazione del biofilm attivando a sua volta la trascrizione del gene *csgD*. La proteina CsgD codifica per un regolatore positivo della trascrizione dei geni *csgAB* e *adrA*, coinvolti rispettivamente nella

sintesi dei pili curli e della cellulosa, precursore dei componenti della matrice [112]. I pili curli sono presenti in *E. coli* ed in alcune specie del genere *Salmonella*, dove sono conosciuti come fibre aggregative [118]. Di numero variabile da cellula a cellula, queste appendici si formano a livello della membrana cellulare, sono più piccole dei flagelli e non sono coinvolte nel movimento cellulare.

### 2.9.3 Formazione di microcolonie

Le microcolonie sono comunità batteriche con uno spessore di circa tre-cinque cellule che si sviluppano in seguito all'adesione di alcune cellule alle superfici (figura 40) [110]. Tuttavia, non è necessaria la sola interazione stabile con la superficie per formare una microcolonia, ma sono necessari anche uno sviluppo clonale e interazioni stabili cellula-cellula. Alcuni batteri possono esibire un programma più complicato in cui la motilità di superficie riunisce le cellule per formare una microcolonia [116]. Lo sviluppo clonale è controllato semplicemente dai nutrienti presenti. Tuttavia sono necessarie distinte vie di trasduzione del segnale per la produzione delle strutture di superficie responsabili della motilità, quali i pili, e per la produzione della matrice esopolisaccaridica, struttura predominante che media le interazioni stabili cellula-cellula [118], [119], [120], [121].

Durante la fase iniziale della formazione di biofilm, dopo l'adesione alla superficie e la formazione della microcolonia, è attivata la trascrizione di specifici geni, quali *algC*, *algD*, *algU* la cui trascrizione è necessaria per la sintesi del polisaccaride extracellulare, che nel caso di *P. aeruginosa* è costituito da arginato [111].

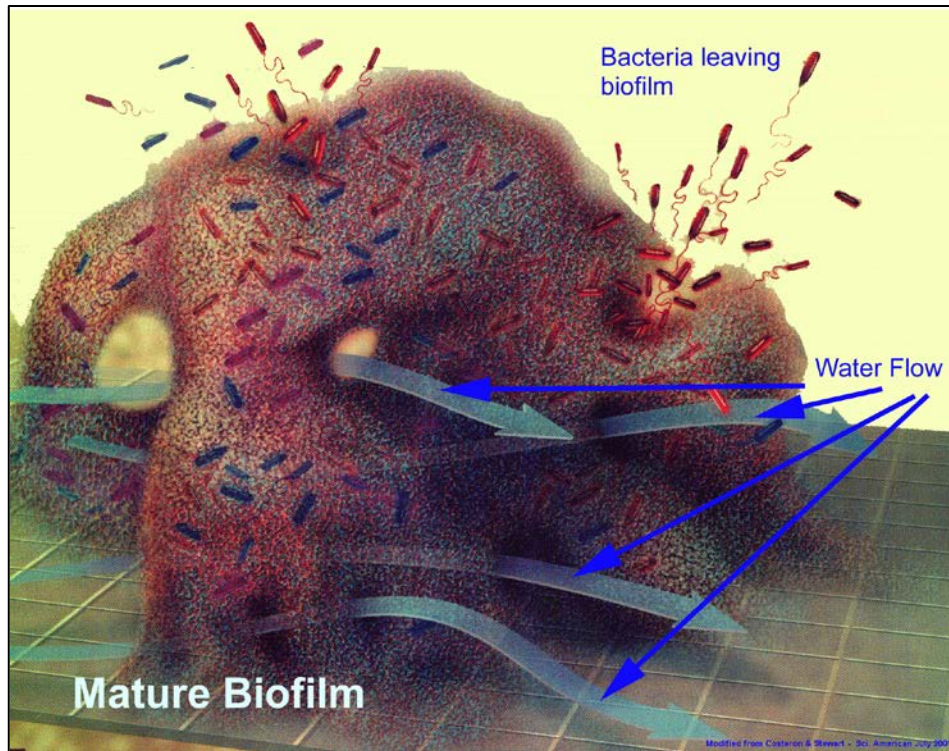
La proteina Crc regolatore globale Crc del metabolismo del carbonio, attiva la trascrizione del gene *pilA*, che è richiesto per la produzione di pili di tipo IV in *P. aeruginosa* [122]. Ceppi di *P. aeruginosa* con mutazione nulla nel gene Crc sono in grado di aderire a superfici ma non di formare microcolonie [122].

In *Staphylococcus aureus* e in *Staphylococcus epidermidis*, la formazione della microcolonia è mediata dalla produzione di un polisaccaride intercellulare adesivo (PIA). Parecchi fattori ambientali influenzano la produzione del PIA, compresi il glucosio, l'anaerobiosi, l'osmolarità, la temperatura elevata, la concentrazione di etanolo e ferro [123]. Molti dei fattori ambientali che aumentano la produzione del PIA inducono l'over-espressione dei geni che codificano gli enzimi per la sintesi del PIA, organizzati nell'operone *icaADBC*.

#### 2.9.4 Maturazione del biofilm

Dopo le fasi iniziali dell'adesione, le microcolonie si sviluppano in un biofilm maturo; questo step è associato alla produzione di EPS.

Il biofilm maturo può essere costituito da uno strato omogeneo di cellule, o da una struttura complessa di cellule formanti canali dell'acqua la cui funzione è quella di permettere la diffusione dei nutrienti (figura 41) [110].



*Figura 41 - Biofilm maturo; con le frecce sono evidenziati i canali dell'acqua ed il rilascio cellulare.*

La struttura di un biofilm maturo, sia mono che multi-specie, può variare non solo in funzione delle diverse specie batteriche che lo compongono, ma anche in funzione dei differenti parametri che caratterizzano l'ambiente. Sono stati identificati ceppi mutanti con alterata profondità o alterata architettura del biofilm rispetto al ceppo selvatico. Questi mutanti suggeriscono che la maturazione del biofilm è controllata dalla disponibilità di nutrienti e dal quorum-sensing, cioè la capacità delle cellule di percepire un'alta densità cellulare [111].

## Capitolo 3

### Impiego delle comunità batterica elettrogenica del *Geobacter sulfurreducens* e *Pseudomonas aeruginosa* nelle MFC

#### 3.1 Al via una banca batterica per conservare le specie più efficienti nella produzione di energia elettrica, dal *Pseudomonas aeruginosa* ed oltre

Uno degli obiettivi del gruppo di ricerca di Renato Fani, docente di Ingegneria genetica dell'Università di Firenze, che sta cercando nuove strategie di recupero dei rifiuti e di produzione di energia da fonti alternative, è quello di creare una 'batterioteca' dove catalogare i migliori ceppi di batteri in grado di produrre energia elettrica da diversi tipi di materiale organico (elettrogenici) per usarli in futuro nelle celle MFC (Microbial fuel cell), ovvero delle batterie biologiche in fase di sperimentazione avanzata.

I primi in Italia ad aver sviluppato un progetto di ricerca in questo settore sono l'ateneo toscano ed il Centro di Ricerca per lo Studio delle Relazioni tra Pianta e Suolo (CRA-RPS) di Roma. Per esplorare tutti gli aspetti legati alla produzione di energia elettrica con le MFC si è utilizzato un approccio multidisciplinare e altamente tecnologico, tramite la caratterizzazione delle biomasse, la messa a punto dei sistemi a celle e dei materiali che accumulano ioni, lo studio della diversità funzionale della comunità batterica coinvolta nel processo, la selezione dei ceppi più efficienti e la loro applicazione. L'intento sarà trasformare un rifiuto in una risorsa.

I batteri possono produrre direttamente elettricità, mediante un processo che impiega la tecnologia delle Microbial Fuel Cell (MFC).

Delle prospettive di questo metodo per produrre energia si è parlato nel corso di un convegno organizzato dall'ENEA (Ente per le Nuove Tecnologie, l'Energia e l'Ambiente) a Bruxelles, nella sede del Parlamento Europeo, il 17 Settembre 2008.

La nuova tecnica porterebbe alla generazione di energia verde, annullando i processi generativi intermedi che sono propri delle energie prodotte da biomasse e passando direttamente da energia chimica, contenuta in celle combustibili alimentate da batteri, a energia elettrica. Le stime degli esperti riuniti al convegno parlano di tempi di realizzazione abbastanza brevi, entro dieci anni produrre elettricità tramite MFC potrebbe diventare una realtà su scala industriale.

Per questo all'Università di Firenze sono state messe a punto due MFC, in cui l'anodo contiene 50 grammi di matrice (suolo in un caso, biomassa industriale nell'altro) sospesa in acqua distillata. L'anodo è stato collegato al catodo attraverso una membrana che consente il passaggio degli ioni. Per chiudere il circuito sono stati utilizzati elettrodi di grafite collegati tra loro da una resistenza esterna.

Il passaggio di corrente tra i due poli è stato misurato per tre settimane ed al termine dell'esperimento le matrici sono state rimosse e analizzate per trovare eventuali correlazioni tra produzione di corrente elettrica e cambiamenti nella composizione della frazione organica o della diversità delle colonie di batteri.

I risultati hanno evidenziato una significativa tensione ai capi dei due elettrodi di oltre i 400 mV (milliVolt) per i rifiuti organici industriali e oltre i 200 mV per il suolo, che ha portato sia alla produzione di elettricità sia alla selezione delle specie batteriche più efficienti, come *Pseudomonas aeruginosa*. È stata anche osservata una stretta connessione tra tipo di sostanza organica e produzione di energia elettrica.

Il Prof. Fani spiega 'In seguito alla scoperta che le proprietà elettrogeniche non sono esclusive di poche specie batteriche ma molto più diffuse di quanto si pensasse, si è voluto applicare la tecnologia delle MFC direttamente al suolo, principale fonte di biodiversità del pianeta. Lo scopo era di esplorarne le proprietà elettrogeniche e compararle a quelle delle biomasse industriali, per individuare poi i principali organismi responsabili del fenomeno nel substrato e continua. L'energia ottenuta è in grado di accendere piccoli led e lampadine ma, per quanto riguarda l'efficienza di queste celle, le ricerche non hanno ancora fornito dati certi. Da un punto di vista scientifico questo progetto si propone come una novità a livello nazionale e tra i pochi a livello europeo. Sebbene esistano alcuni gruppi di ricerca che hanno messo a punto con successo delle celle a microbatteri, il loro utilizzo come reale fonte di energia elettrica non è mai stato esplorato. Il progetto si propone invece di fornire le basi per una futura applicazione delle MFC come possibile fonte di energia alternativa.

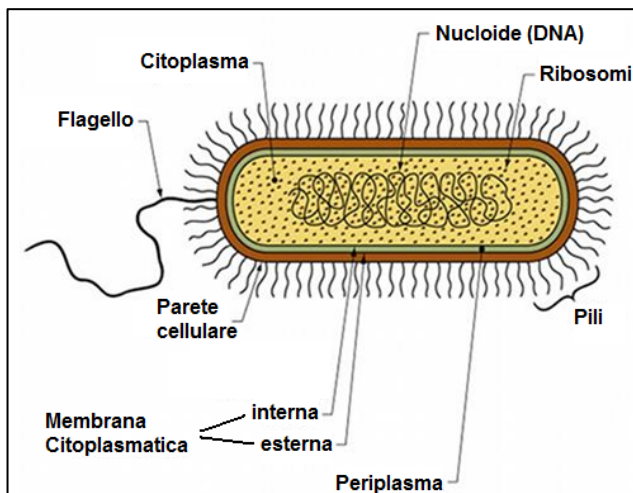
### 3.2 Le cellule procariote

Le cellule procariote (*pro*: prima e *kàryon*: nucleo) sono cellule prive di un nucleo ben definito e delimitate dalla membrana cellulare, le cellule procariote rispetto a quelle eucariote non possiedono organuli e hanno una struttura interna molto semplice. Non avendo il nucleo il loro DNA è sparso nel citoplasma.

Le loro dimensioni sono dell'ordine di pochi micron, ma possono variare dai circa 0,2  $\mu\text{m}$  dei micoplasmi ai 30  $\mu\text{m}$  di alcune spirochete e oltre. L'interno non è suddiviso in organuli da membrane, anche se alcune funzioni metaboliche, come la respirazione e la fotosintesi, sono associate ad invaginazioni e ripiegamenti della membrana cellulare, chiamati mesosomi.

Le cellule procariote hanno un'appendice mobile chiamata flagello (plurale, flagelli) che conferirà loro la motilità, e una struttura simile ma più piccola, la fimbria (plurale, fimbrie). Le fimbrie non sono coinvolte nella motilità e sono composti da proteine. Il flagellum dei batteri è composto da tre parti, esse sono un corpo basale, un gancio e un filamento. Il corpo basale è incorporato nella membrana citoplasmatica e la struttura della superficie cellulare è collegato al filamento attraverso il gancio. Nei batteri Gram-negativi il corpo basale è costituito da un anello della membrana citoplasmatica, un anello periplasmatico e un anello esterno alla membrana attraverso la quale passa l'asta centrale. Il diametro degli anelli può essere di 20-50 nm a seconda della specie. Il genoma cellulare è più semplice di quello delle cellule eucariote ed è costituito da una sola molecola circolare di DNA, a cui si aggiungono eventuali repliconi autonomi. È assente la membrana nucleare. Il citoplasma delle cellule procariote contiene il DNA, i ribosomi 70 S, che sintetizzano le proteine.

La parete cellulare, se presente, può essere composta da una sostanza caratteristica denominata peptidoglicano. Esternamente alla parete cellulare ci può essere uno strato più spesso e meno rigido, detto capsula.

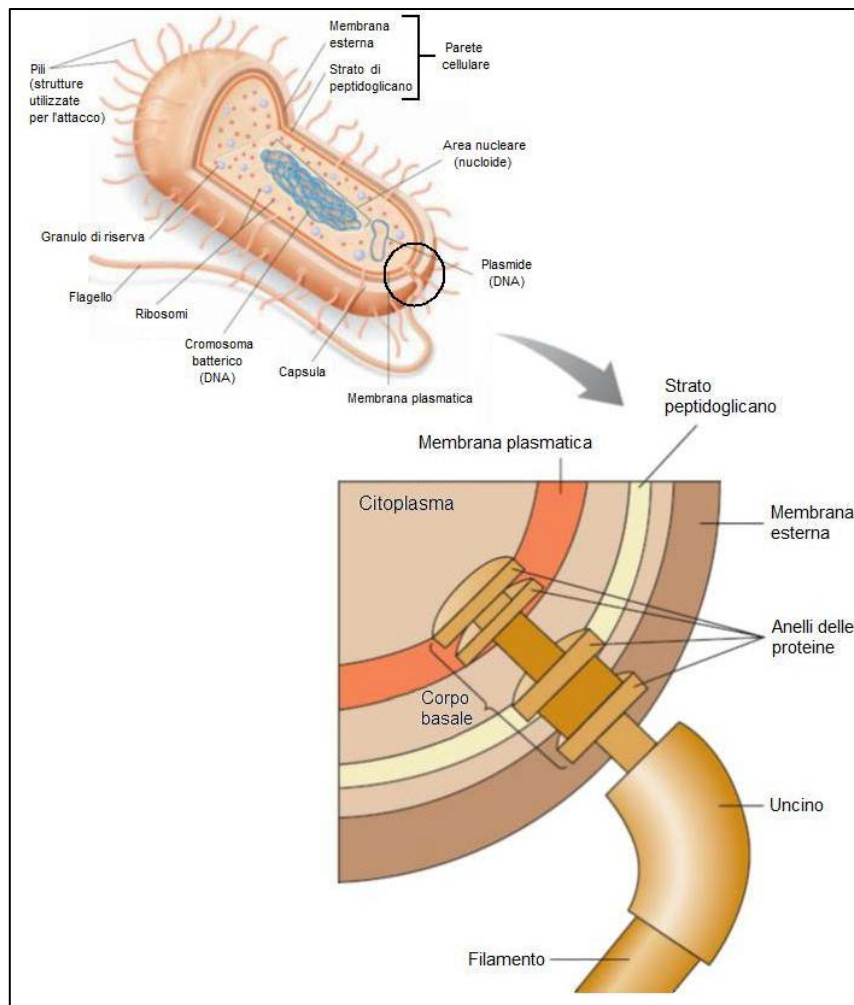


*Figura 42 - I batteri sono esempi di organismi formati da cellule procariote (tutti unicellulari).*

Molti procarioti mostrano chemiotassi, il movimento in risposta a composti chimici presenti nell'ambiente. Ad esempio, i batteri si muovono verso il nutrimento, mentre si allontanano da certe sostanze chimiche dannose. Alcuni batteri si muovono anche l'uno verso l'altro.



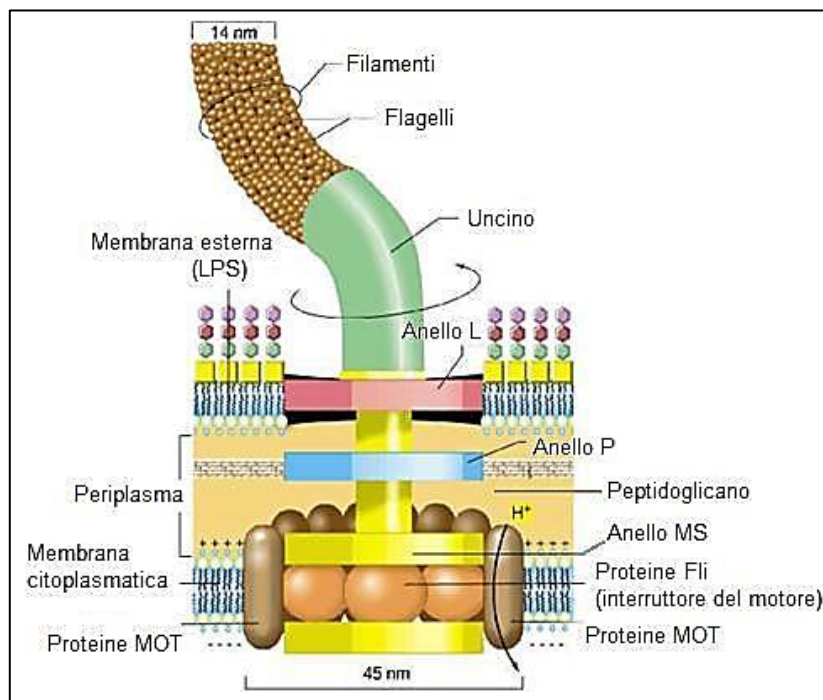
I flagelli sono appendici filiformi di natura proteica che conferiscono motilità al batterio, le dimensioni sono pari al diametro di 10-20 nm e una lunghezza di 5-20 mm; il numero e la zona di inserzione sulla superficie cellulare molto variabili ed usati come criteri di classificazione, inoltre non sono visibili al microscopio ottico a meno che non si incrementi il diametro con speciali coloranti (acido tannico); indirettamente, mediante motilità (vetrino a fresco, terreni semisolidi).



*Figura 43 - Struttura di un flagello batterico di una cellula procariota. Il motore è il corpo basale, che è formato da una serie di piastre discoidali che ancorano il flagello alla parete cellulare e alla membrana plasmatica e fanno girare l'uncino ed il filamento del flagello.*

L'anello citoplasmatico del corpo basale in aggiunta è associato con proteine, note come il complesso MOT. Il complesso MOT fa ruotare il corpo basale con tutto il flagello consumando una forza proto- (o sodio-) motrice. L'anello della membrana citoplasmatica è quindi fatto funzionare come un motore con il complesso MOT. Oltre al complesso MOT, il corpo basale è associato con un apparato trapassante attraverso il quale vengono trasportati i blocchi di costruzione del filamento. Il gancio si collega all'asta centrale del corpo basale al filamento ed è

composto da una singola proteina chiamata proteina gancio. I filamenti, con un diametro di 10-20 nm, possono essere sciolti a pH 3-4 con tensioattivi ad una soluzione con la proteina flagellina. Il peso molecolare della flagellina varia fra 20-65 kDa a seconda della specie batterica. Il gancio e il filamento sono a forma di tubo e fanno muovere la flagellina attraverso il tubo sulla punta sporgente del filamento. La punta del filamento è ricoperta da filamenti di proteine come un cappello. Il numero e la posizione dei flagelli variano a seconda della specie batterica. In alcuni procarioti si trovano in uno o entrambi i poli, mentre in altri l'intera superficie della cella può essere coperto con i flagelli.



*Figura 44 – Struttura di un'appendice, il flagello, di una cellula procariota.*

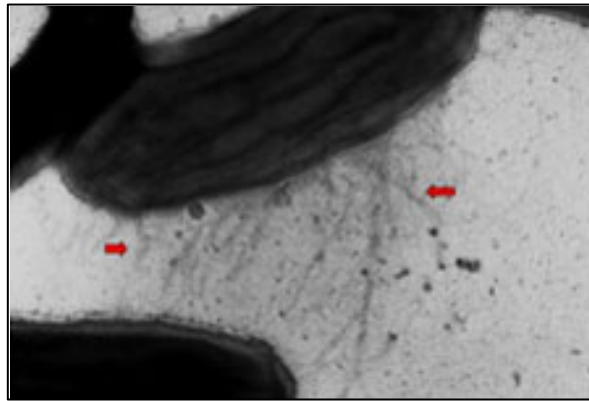
La struttura dei flagelli è complessa, ma abbastanza costante; sono costituiti da tre parti principali:

- 1) filamento: subunità tutte uguali di flagellina, una proteina molto conservata;
- 2) uncino;
- 3) corpo basale;

le loro funzioni sono quelle di conferire motilità al batterio. Non sono assolutamente necessari per la sopravvivenza, ma conferiscono il vantaggio dei movimenti chemiotattici ed inoltre sono importanti antigeni (h) alla base della classificazione sierologica di molti microrganismi.

### 3.3 Molti tipi di procarioti sono mobili

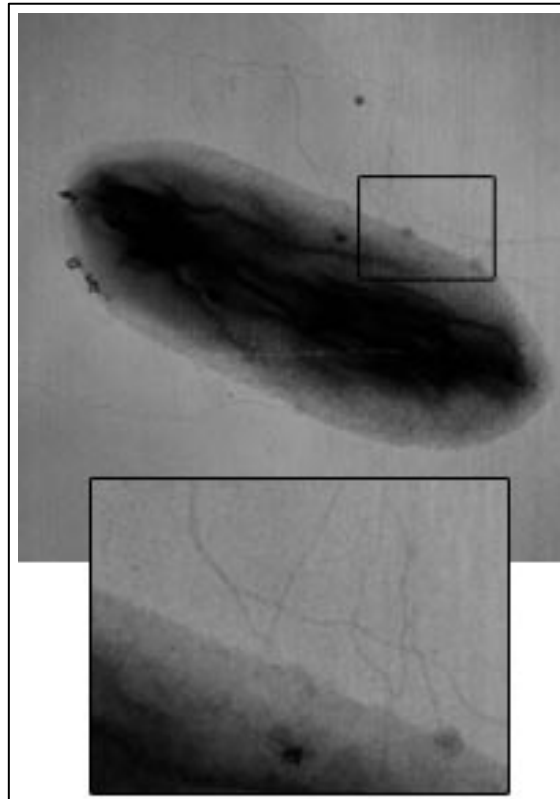
La maggior parte dei batteri si muove grazie alla presenza di flagelli. Il numero e la posizione di questi rappresentano un dato importante per la classificazione di alcune specie batteriche.



*Figura 45 - Immagine SEM di un batterio, con indicati con le frecce rosse i flagelli.*

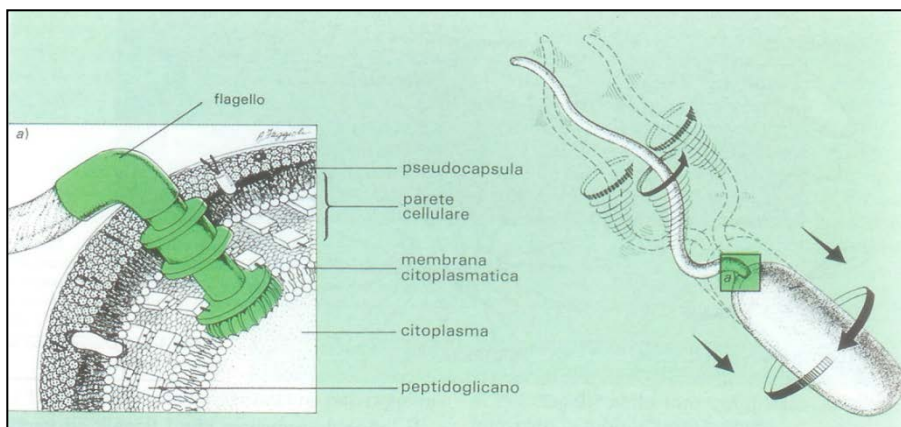
Il movimento flagellare è un movimento rotatorio che si origina dal corpo basale che funzionerebbe come un motore (proteine MOT); altre proteine (Fli) fungono da invertitori, ribaltando la rotazione del flagello in risposta a segnali intracellulari. Di conseguenza si avrà un avanzamento in linea retta combinata con dei capovolgimenti. L'energia richiesta per la rotazione dei flagelli proviene dalla forza proton-motrice e la velocità di rotazione varia a seconda della specie e dell'energia proton-motrice ed è compresa tra 200 e 1000 giri al sec, la velocità di avanzamento è pari a 0,00017 km/h, 60 lunghezze cellulari/sec e come raffronto vogliamo citare i valori per le stesse grandezze per un ghepardo pari a 110 km/h, 25 lunghezze/sec, considerato uno dei più veloci animali della terra. Il movimento dei microrganismi con flagelli polari o lofotrichi è diverso da quello dei microrganismi con flagelli peritrichi.

La struttura del flagello dei procarioti è abbastanza diversa da quella dei flagelli degli eucarioti. Il flagello batterico non è costituito da microtubuli. Esso è formato da tre parti: il corpo basale, l'uncino ed un filamento singolo. Il corpo basale è una struttura complessa che àncora il flagello alla parete cellulare tramite dei dischi appiattiti. L'uncino unisce il corpo basale al lungo filamento cavo che si estende nell'ambiente circostante. Il corpo basale è il motore. Il batterio utilizza ATP per pompare protoni fuori dalla cellula.



*Figura 46 - Particolare dei pili in un batterio Geobacter.*

La diffusione di questi protoni nella cellula dà energia al motore, sostenendo il movimento rotatorio propulsivo del flagello. Così, il flagello produce un movimento rotatorio che spinge la cellula, come un'elica spinge una barca sull'acqua. Il flagello ruota in senso antiorario, spingendo la cellula in avanti. Il motore è il corpo basale, che consiste in una serie di piastre a forma di disco che ancorano il flagello per la parete cellulare e la membrana plasmatica e girare l'uncino ed il filamento del flagello.



*Figura 47 - Rappresentazione schematica del movimento di un batterio per azione di un flagello polare (il flagello e la cellula ruotano in direzioni opposte). Nel particolare di sinistra è rappresentata l'inserzione, nel corpo batterico, del flagello con la sua struttura a 'rotore'. Il flagello ruota a una velocità fino a 1000 rotazioni al secondo.*

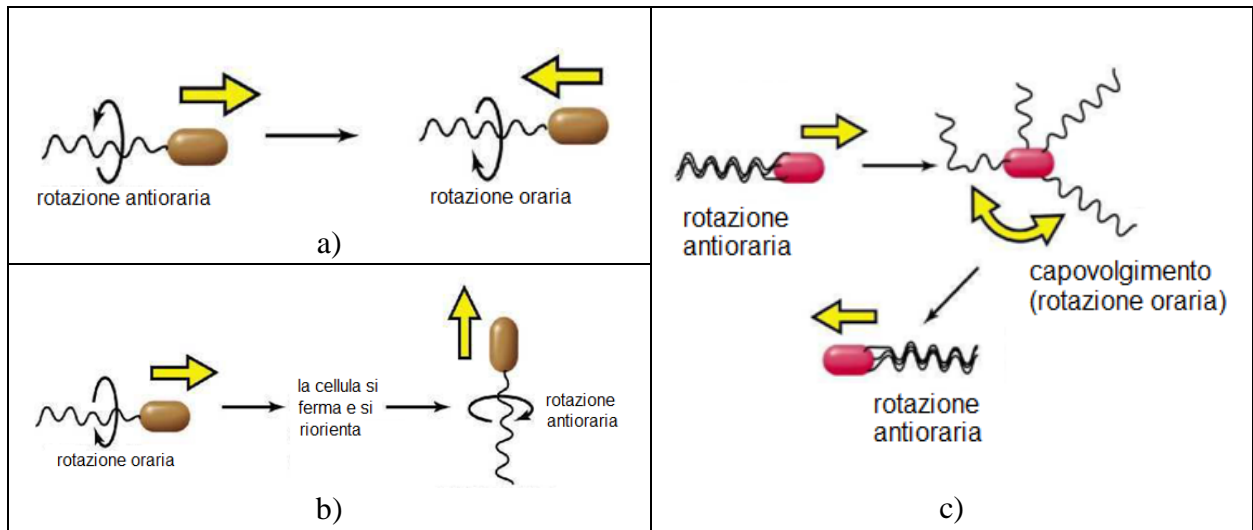


Figura 48 - Movimenti di un batterio tramite il flagello: a) cambiamento di direzione del moto; b) inversione di direzione del moto; c) inversione di direzione del moto, previo capovolgimento.

### 3.4 Dalla respirazione dei batteri si può trarre energia con il trasferimento di elettroni agli accettori esterni.

I microrganismi sopravvivono e crescono in virtù dell'energia che loro generano per mezzo del trasferimento di elettroni. Durante la respirazione, i microrganismi liberano elettroni da un substrato ricco di elettroni ad un potenziale redox basso, e trasferiscono questi elettroni per mezzo di un numero di sistemi di trasporto di elettrone attraverso la membrana della cellula dove un accettore finale di elettroni viene ridotto [112]. I microrganismi non usano l'energia prodotta dal flusso di elettroni in un unico modo, invece il flusso di elettroni è usato per creare un gradiente di protoni attraverso la membrana della cellula. L'energia rilasciata dal flusso interno dei protoni attraverso un complesso membranoso (sintesi dell'ATP) è usata per rigenerare molecole portatrici di energia, come adenosina trifosfato (ATP). Creando questo gradiente di protoni, la differenza di potenziale tra il donatore di elettroni (i.e. il substrato a basso potenziale) e l'accettore di elettroni è trasformato in un processo per la generazione di energia. La maggiore differenza di potenziale tra il donatore di elettroni e l'accettore di elettroni, ed anche la maggiore differenza di potenziale che spinge il protone ed il più alto valore di potenziale dell'ATP possono fare alimentare i batteri. Nella respirazione i microrganismi possono usare una grande varietà di accettori di elettroni diversi, che variano da ossigeno, nitrato, ed ossidi di solfato di ferro e manganese, ma la loro abilità di usare l'accettore col più alto potenziale redox aumenterà la loro energia per la crescita [113] e c'è la volontà di esplorare accettori di elettroni alternativi.

Nella figura 49, la figura di sinistra mostra l'orientamento dei portatori di elettroni (catena di trasporto degli elettroni) e l'elettone trasportato nella membrana di una cellula procariota. Mentre FMN (flavoproteina), FAD (flavina adenina dinucleotide), Q (quinone), Fe/S (proteina ferro-zolfo), citocromo a, b, c, le cariche + e - rappresentano rispettivamente  $H^+$  ed  $OH^-$ ;

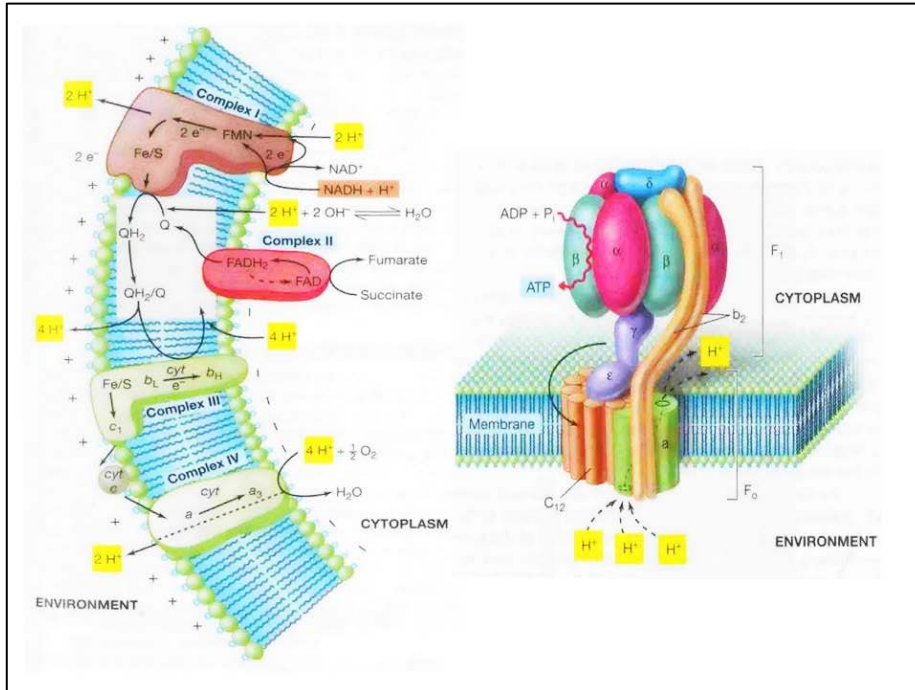


Figura 49 - Catena di trasporto degli elettroni attraverso la membrana di una cellula procariota; la figura di destra mostra la struttura e la funzione della ATP sintasi (ATPasi, Complesso quinto). Come entrano i protoni, la dissipazione della forza motrice protonica guida la sintesi di ATP che è catalizzata dal complesso F.

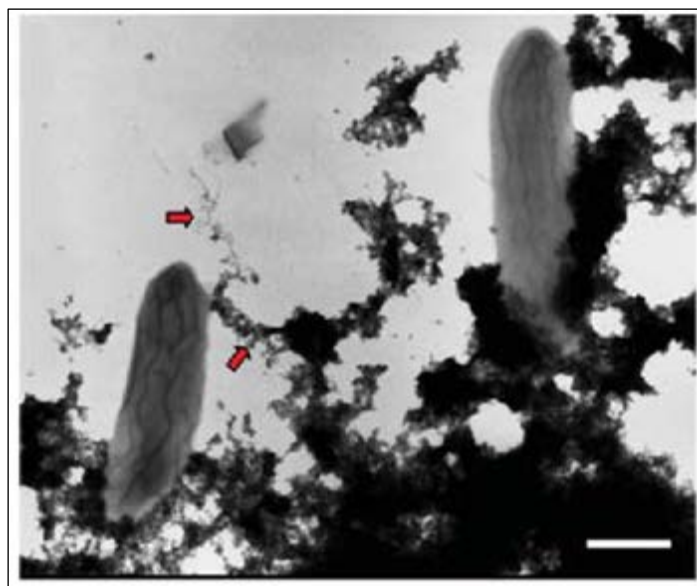
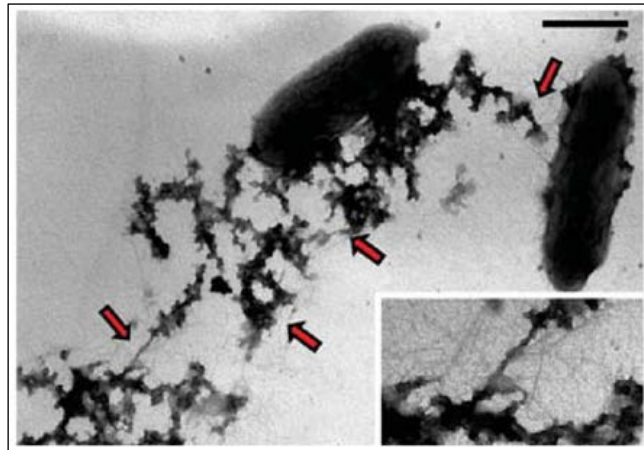
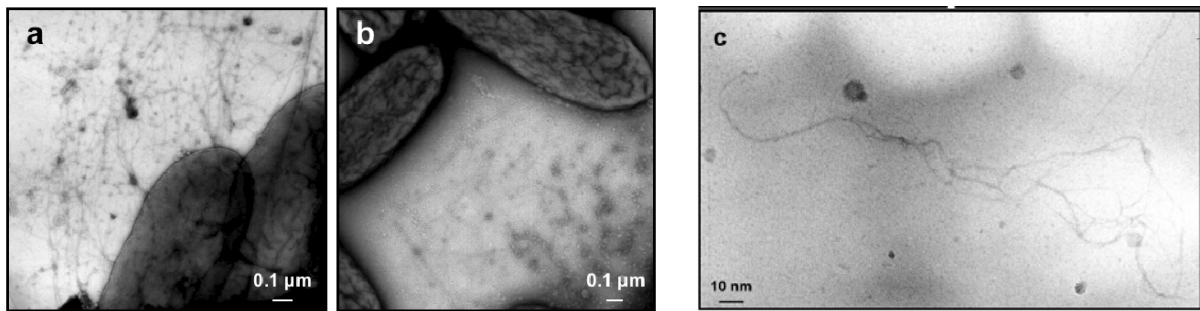


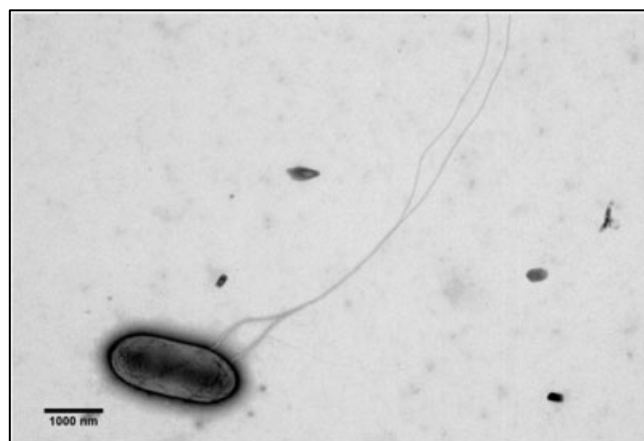
Figura 50 - Immagine SEM delle cellule di Geobacter sulfurreducens in fase di trasmissione attraverso i pili. Le frecce rosse indicano i pili; barra 0,5  $\mu m$ .



*Figura 51 – Immagine TEM della trasmissione degli elettroni dal ceppo batterico al fumarato; barra, 20 μm.*



*Figura 52 - Immagine con un microscopio elettronico a trasmissione TEM, dei pili di un ceppo puro di *G. sulfurreducens*. (a-b) Cellule di *G. sulfurreducens* che sviluppano i pili dopo 48 ore di incubazione a 25 °C in terreno con fumarato. (c) Filamenti di pili che sono stati meccanicamente tosti dalla superficie esterna del ceppo puro di *G. sulfurreducens*.*



*Figura 53 - Immagine con un microscopio elettronico a trasmissione (TEM) che illustra i flagelli del *G. sulfurreducens* ceppo KN400, cresciuto su un biofilm anodico.*

### 3.5 Fabbisogno di energia e risorse energetiche dei batteri

I batteri, al pari di tutti gli esseri viventi, richiedono continuamente energia per il compimento dei vari lavori a carattere osmotico, elettrico, meccanico e per la sintesi di nuovo materiale cellulare e la ricavano in diversi modi. Alcune specie batteriche (batteri fotosintetici) assumono l'energia solare trasformandola in energia chimica di legame mediante un processo di fotosintesi. Tutte le altre specie batteriche producono invece energia libera trasformabile ossidando in alcuni casi substrati inorganici (batteri chemolitotrofi) o, assai più di frequente substrati organici alla presenza di ossigeno molecolare atmosferico o di composti ossidati. Queste ossidazioni si svolgono per azione di particolari enzimi (le ossido-reduttasi) e consistono in definitiva in sottrazione e trasporto di elettroni dal substrato donatore all'accettore. Tutti questi enzimi operano secondo un certo ordine dovuto al loro potenziale di ossidoriduzione (da quello più basso a quello più alto) e costituiscono nel loro insieme le catene respiratorie lungo le quali avviene la liberazione dell'energia immagazzinata nel substrato donatore. Come accettori nei processi di ossidazione possono funzionare sia l'ossigeno atmosferico, sia altre sostanze capaci di ridursi e di conseguenza le ossido-riduttasi saranno distinte in ossitrope nel primo caso e anossitrope nel secondo. La possibilità che oltre all'ossigeno atmosferico anche altre sostanze possano agire da accettori d'idrogeno spiega come per molte specie batteriche possa aversi la vita (e quindi anche la respirazione) in assenza di aria. Si parla allora di batteri che vivono in anaerobiosi (batteri anaerobi), per distinguerli dai batteri aerobi che respirano alla presenza di aria il cui ossigeno funziona da accettore d'idrogeno. Per alcune specie batteriche il vivere in assenza di aria diventa addirittura una necessità. Per esse la presenza dell'ossigeno atmosferico può essere addirittura incompatibile con la vita (anaerobi obbligati).

Il microorganismo *Geobacter sulfurreducens*, che vive nel suolo, potrebbe svolgere un ruolo molto importante nelle strategie di 'bioremediation', il trattamento biologico di siti inquinati. Il genoma di questo batterio può aiutare a rispondere ad alcune delle sfide più complesse in materia di inquinamento ambientale nonché a produrre energia dallo sfruttamento di fonti rinnovabili. È stato scoperto che *Geobacter* ha la capacità di produrre energia elettrica e di far precipitare, bloccandoli, una serie di radionuclidi (come l'uranio e il tecnezio), evitando così che questi elementi finiscano nelle acque dei pozzi e dei fiumi.

Il microorganismo *P. aeruginosa*, così come molti altri *Pseudomonas*, può degradare gli idrocarburi aromatici come metilbenzene, che sono i sottoprodotti delle industrie petrolifere e sono comunemente utilizzati come solventi per smalti e vernici, nonché nella produzione di farmaci e sostanze chimiche. Metilbenzene sono considerati contaminanti ambientali che sono



presenti in atmosfera, suolo e sottosuolo e nelle acque superficiali. *P. aeruginosa* può abbattere toluene, la forma più semplice di metilbenzene. *P. aeruginosa* degrada toluene attraverso l'ossidazione del gruppo metilico di aldeidi, alcool e un acido, che viene poi convertito in catecolo. Quindi, *P. aeruginosa* può essere utilizzato nel controllo dell'inquinamento.

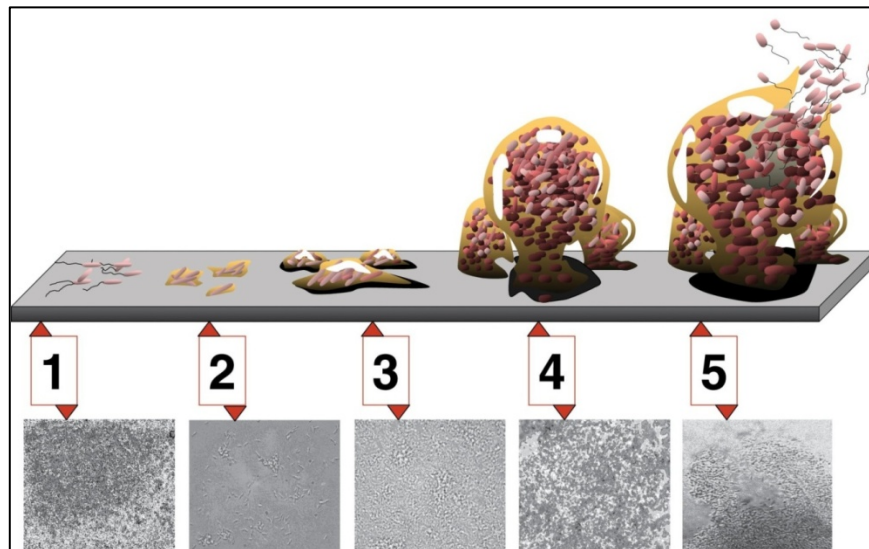
Per l'allestimento delle prime MFC è stato utilizzato un ceppo batterico altamente elettrogenico quale il *Geobacter sulfurreducens*. L'efficienza nella trasmissione di elettroni tra i batteri e l'anodo è il risultato di un delicato equilibrio che consente a questo microorganismo di svilupparsi all'interno del reattore e di colonizzare l'anodo attraverso la formazione del biofilm. Durante la prima fase del progetto le colture di *Geobacter sulfurreducens* sono riuscite a crescere all'interno del reattore, mantenendosi sostanzialmente come l'unica specie presente nella regione anodica. Nella fase successiva, la grafite utilizzata come anodo è stata sostituita con un tipo differente. Durante questa seconda parte del progetto i reattori sono stati riempiti con nuovo terreno di crescita batterico ed è stata inoculata una nuova coltura di *Geobacter sulfurreducens*. Questa modifica ha sicuramente influito in maniera determinante nell'efficienza del reattore sia perché *Geobacter sulfurreducens* necessita di tempi lunghi per poter ristabilire le condizioni di massima efficienza osservate durante la prima fase della ricerca e sia perché il batterio potrebbe avere una minore capacità di colonizzare la nuova grafite. Per comprendere se esiste un'affinità differente per la nuova grafite sono stati fatti esperimenti di biologia per quantificare la capacità di formazione di biofilm da parte di *Geobacter sulfurreducens*. Un altro fattore che ancora non può essere escluso poiché in fase di indagine, è rappresentato dalla presenza di possibili contaminanti nella fase anodica. In questo caso *Geobacter sulfurreducens* non sarebbe più presente come specie pura ma come un componente all'interno di un consorzio microbico più vasto. In presenza di competitori quindi, l'attività di *Geobacter sulfurreducens* sarebbe ridotta influenzando negativamente sull'efficienza del reattore MFC.

### 3.6 Sviluppo del biofilm di *Pseudomonas aeruginosa*

Si distinguono cinque fasi nello sviluppo di un biofilm:

- 1) attecchimento iniziale;
- 2) attecchimento irreversibile (irreversible attachment);
- 3) maturazione I;
- 4) maturazione II;
- 5) dispersione.

La figura 54 riporta ognuna delle 5 fasi dello sviluppo, ed il diagramma è accoppiato con una microfotografia, posta nella parte sottostante, dello sviluppo del biofilm del *P. aeruginosa*; tutte le microfotografie sono mostrate nella stessa scala:



*Figura 54 - Cinque fasi di sviluppo del biofilm *Pseudomonas aeruginosa*. Per gentile concessione di Peg Dirchx e David Davies [144].*

*Pseudomonas aeruginosa* è un batterio ambientale che ha un'alta resistenza alla pulitura meccanica e alla pressione così come ai disinfettanti e antibiotici. La sua persistenza negli ambienti acquatici e la sua resistenza sono anche da mettere in relazione al fatto che è uno dei microrganismi coinvolti nella formazione del biofilm. Infatti, è in grado di aderire a superfici umide o in contatto con liquidi grazie alla produzione, da parte di ceppi mucoidi o non mucoidi, di lipopolisaccaridi e glicoproteine extracellulari (slime). È stato ampiamente dimostrato che i batteri che crescono nel biofilm, subiscono cambiamenti a livello fenotipico che li rendono più resistenti delle forme planctoniche, agli antibiotici, ai biocidi e alle difese immunitarie dell'ospite. Tale resistenza è dovuta a strategie multicellulari e/o alla capacità delle singole cellule interne al biofilm di differenziarsi in uno stato fenotipico protetto e tollerante l'azione antimicrobica.

## Capitolo 4

### Utilizzo delle biomasse per la produzione di energia elettrica

#### 4.1 Usare le biomasse come fonte di energia

Le biomasse [148] sono una fonte di energia rinnovabile, costituita da materiale biologico dalle sostanze di origine animale e vegetale, non fossili, che possono essere usate come combustibile per riscaldamento o per la produzione di energia elettrica. Alcune fonti, come la legna, non necessitano di subire trattamenti, mentre altre - come gli scarti vegetali e i rifiuti urbani - devono essere processate in un digestore. Quando la biomassa viene chiusa in un digestore, al suo interno si sviluppano dei microrganismi che con la fermentazione anaerobica (cioè in assenza di ossigeno) del materiale organico formano il cosiddetto biogas. Dopo un trattamento depurativo, quest'ultimo può essere usato come biocarburante, combustibile per il riscaldamento o per la produzione di energia elettrica. Inoltre, tramite un opportuno procedimento, è possibile trasformare le biomasse di qualsiasi natura (quindi materiali di scarto oppure determinati vegetali coltivati ad hoc) in biocarburanti liquidi, come ad esempio il biodiesel.



*Figura 55 - Impianto di trattamento delle biomasse, dove sono in evidenza i digestori.*

Ad oggi, le biomasse soddisfano il 15% circa degli usi energetici primari nel mondo, con 55 milioni di TJ/anno (1.230 MTep/anno). L'utilizzo di tale fonte mostra, però, un forte grado di disomogeneità fra i vari Paesi. I Paesi in Via di Sviluppo, nel complesso, ricavano mediamente il 38% della propria energia dalle biomasse, con 48 milioni di TJ/anno (1.074 MTep/anno), ma in molti di essi tale risorsa soddisfa fino al 90% del fabbisogno energetico totale, mediante la combustione di legno, paglia e rifiuti animali.

Nei Paesi Industrializzati, invece, le biomasse contribuiscono appena per il 3% agli usi energetici primari con 7 milioni di TJ/anno (156 MTep/anno). In particolare, gli USA ricavano il 3,2% della propria energia dalle biomasse, equivalente a 3,2 milioni di TJ/anno (70 MTep/anno); l'Europa, complessivamente, il 3,5%, corrispondenti a circa 40 Mtep/anno, con punte del 18% in Finlandia, 17% in Svezia, 13% in Austria, l'Italia, con il 2% del proprio fabbisogno coperto dalle biomasse, è al di sotto della media europea.

L'impiego delle biomasse in Europa soddisfa, dunque, una quota piuttosto marginale dei consumi di energia primaria, ma il reale potenziale energetico di tale fonte non è ancora pienamente sfruttato. All'avanguardia, nello sfruttamento delle biomasse come fonte energetica, sono i Paesi del centro-nord Europa, che hanno installato grossi impianti di cogenerazione e teleriscaldamento alimentati a biomasse. La Francia, che ha la più vasta superficie agricola in Europa, punta molto anche sulla produzione di biodiesel ed etanolo, per il cui impiego come combustibile ha adottato una politica di completa defiscalizzazione. La Gran Bretagna invece, ha sviluppato una produzione trascurabile di biocombustibili, ritenuti allo stato attuale antieconomici, e si è dedicata in particolare allo sviluppo di un vasto ed efficiente sistema di recupero del biogas dalle discariche, sia per usi termici che elettrici. La Svezia e l'Austria, che contano su una lunga tradizione di utilizzo della legna da ardere, hanno continuato ad incrementare tale impiego sia per riscaldamento che per teleriscaldamento, dando grande impulso alle piantagioni di bosco ceduo (salice, pioppo) che hanno rese 3÷4 volte superiori alla media come fornitura di materia prima. Nel quadro europeo dell'utilizzo energetico delle biomasse, l'Italia si pone in una condizione di scarso sviluppo, nonostante l'elevato potenziale di cui dispone, che come esposto nel prosieguo risulta non inferiore ai 27 MTep.

L'Italia ha recepito la Direttiva Europea 2001/77 sulla promozione dell'energia elettrica prodotta da fonti rinnovabili, in linea con quanto stabilito dal protocollo di Kyoto.

La Normativa Nazionale, recependo quella Europea, definisce la biomassa come: "la parte biodegradabile dei prodotti, rifiuti e residui provenienti dall'agricoltura (comprendente sostanze vegetali e animali) e dalla silvicoltura e dalle industrie connesse, compresa la pesca e

l'acquacoltura, gli sfalci e le potature provenienti dal verde urbano nonché la parte biodegradabile dei rifiuti industriali e urbani”.

Le biomasse possono essere utilizzate per alimentare impianti che generano solo calore, solo energia elettrica, o entrambe le forme di energia contemporaneamente. Quest'ultimo uso, detto cogenerazione, qualora possibile, è quello più efficiente.

A seconda della tecnologia e degli usi finali dell'energia prodotta (termici e/o elettrici), è possibile scegliere tra una pluralità di soluzioni impiantistiche. Esse comprendono impianti alimentati da biomasse solide (come legna da ardere, pellet o cippato), liquide (come il biodiesel) o gassose (come il biogas prodotto ad esempio dai reflui zootecnici).

Le biomasse, se utilizzate all'interno di un ciclo locale di produzione-utilizzazione nel rispetto del patrimonio forestale e della biodiversità, rappresentano una preziosa risorsa energetica rinnovabile.

Le biomasse possono presentarsi in una vastissima gamma di tipologie, vergini o residuali di lavorazioni agricole e industriali, in diversi stati fisici, con un ampio spettro di poteri calorifici. A volte, anziché utilizzare direttamente il termine biomassa, si usa il termine “biocombustibili” per indicare i combustibili ricavati dalla biomassa.

#### 4.2 Il trattamento delle deiezioni zootecniche in Italia

Oggi la zootecnia ha subito una radicale trasformazione passando da un elevato numero di allevamenti con pochi capi di bestiame, a un numero molto più ristretto di allevamenti intensivi (molti animali per stalla o stabilimento). Inoltre, queste aziende sono sempre meno basate sulle risorse agricole interne, facendo ricorso principalmente a prodotti mangimistici o a integratori alimentari esterni, ottenuti da industrie specializzate che sviluppano formule alimentari specifiche per tipologia di allevamento e per stadio di sviluppo dell'animale. Si è giunti allo sviluppo di grandi allevamenti zootecnici senza terra (biofabbriche), cioè senza un'azienda agricola di adeguate dimensioni di supporto sia per la produzione delle materie prime tradizionali (foraggio fresco, insilati, fieno) che per il conseguente smaltimento dei reflui nel suolo. La mancanza di un reimpiego dello stallatico nell'azienda agricola ha modificato nel corso degli anni la natura del terreno, soggetto a un continuo depauperamento della sostanza organica, dell'humus e, conseguentemente, della fertilità e dell'equilibrio idrogeologico del territorio. Oggi i materiali organici di rifiuto finiscono prevalentemente in discarica. È anche cambiata la tipologia dell'allevamento; le bovine non hanno più la classica lettiera di paglia, ma vivono in condizioni che impediscono la formazione dello stallatico. Queste trasformazioni hanno inasprito profondamente i problemi ambientali. La riduzione del fertilizzante biologico (stallatico) ha

inoltre spinto gli agricoltori a incrementare l'impiego di concimi chimici, che hanno cambiato la struttura fisica e chimica del terreno, trasformandolo in un substrato con caratteristiche chimico-fisiche poco adatte all'assorbimento dell'acqua e allo sviluppo della flora microbica.

L'impiego indiscriminato ed eccessivo dei concimi prodotti dall'industria chimica ha comportato l'inquinamento delle falde acquifere di superficie in cui vengono rilasciati composti azotati (nitriti, nitrati, ammoniaca) e, in minor misura, fosfati, che contribuiscono al fenomeno di eutrofizzazione dei corsi d'acqua, dei laghi e dei mari. Infatti solo una frazione modesta (15-25%) dei fertilizzanti e concimi chimici è assorbita dalla pianta, il resto viene dilavato dalle piogge. Alle attività agricole è attribuibile il 36% delle emissioni di metano che derivano sia dai processi digestivi (emissioni enteriche), che dalla degradazione anaerobica delle deiezioni. Proprio per queste ragioni, le recenti normative regionali tendono a ridurre il carico massimo di bestiame allevabile per superficie, anche in funzione della fragilità ambientale delle aree considerate. Questo nuovo assetto produttivo della zootecnia richiede quindi nuovi strumenti tecnologici per affrontare l'impatto ambientale in modo radicale e definitivo, evitando soluzioni provvisorie e costose come la discarica, ma che siano in grado di rispettare i nuovi vincoli ambientali imposti a livello nazionale ed europeo.

È necessario definire e ottimizzare i processi di trasformazione delle deiezioni per produrre fertilizzanti organici, sani, profumati e con elevata attività fertilizzante. Più in particolare è necessario elaborare un progetto integrato per consentire di:

- ridurre le emissioni gassose maleodoranti e a effetto serra ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ );
- igienizzare il materiale organico di partenza e l'ambiente, eliminando flore nocive;
- ottenere un prodotto organico standardizzato e certificato a elevato valore fertilizzante/ammendante dei terreni, a effetto ambientale positivo;
- realizzare una perfetta compatibilità del nuovo prodotto biologico con la natura chimico-fisica e biochimica del suolo di spargimento e, conseguentemente, con le relative e specifiche colture vegetali.

Le deiezioni avicole hanno il più alto in nutrienti per il terreno, in particolare per le colture vegetali. Al contrario le deiezioni suinicole sono le più scarse in termini di contenuti di azoto e fosforo e presentano il massimo contenuto di sostanze indesiderate (metalli pesanti) per ottenere un fertilizzante di qualità.

L'azoto è presente nella sostanza organica di origine zootecnica in tre diverse forme: una forma minerale, immediatamente disponibile per le colture, ma più suscettibile al dilavamento, una forma organica facilmente mineralizzabile e una forma organica residuale. Quest'ultima, poiché

di più difficile degradabilità, rimane nel terreno rendendo disponibile i nutrienti per tempi prolungati.

### 4.3 Il ciclo produttivo zootecnico

Rendere più agevoli le condizioni di vita degli animali negli allevamenti intensivi giova alla loro salute, a quella degli operatori e all'economia dell'azienda. Il ricambio d'aria, lo spazio vitale di movimento, la gestione delle deiezioni e dei liquami, le condizioni di luce, la pavimentazione delle stalle, l'isolamento termico, la presenza o meno della lettiera sono tutti elementi importanti. Più l'animale vive in condizioni accettabili, meno si deve far ricorso a sostanze farmacologiche, vaccini, ecc., che, tra l'altro, hanno un costo di approvvigionamento non trascurabile. Tende a scomparire l'uso di materiali per lettiera, soprattutto nei bovini. L'uso e la scelta di questi materiali costituiscono una vera e propria fase di pretrattamento delle deiezioni ai fini del successivo ciclo di lavorazione. Le deiezioni devono quindi essere trattate all'origine, sia per ridurre una perdita di azoto in forma volatile, sia per favorire la trasformazione del substrato in prodotto digerito (letame), riducendo in tal modo anche gli odori sgradevoli, responsabili delle principali patologie respiratorie negli avicoli. L'impiego di materiali da lettiera costituisce un'interessante opportunità sia per l'igiene degli animali, che per l'utilizzo in campo delle deiezioni compostate. Il kenapulo, ad esempio, è un materiale cellulosico derivante dal kenaf, una pianta per fibre tessili, ad alto potere adsorbente, già sperimentato come materiale per lettiera nei polli. Microrganismi patogeni possono contaminare gli allevamenti attraverso il mangime, l'aria, animali infetti, il contatto con l'uomo, con le deiezioni, ecc.. Purtroppo le deiezioni giocano un ruolo importante nella trasmissione di malattie infettive, poiché nella loro matrice alcune specie patogene e virali possono rimanere attive per periodi molto lunghi (2-5 mesi). La gestione corretta dell'allevamento (aerazione, umidità, temperatura, fotoperiodo, giacenza su lettiera contaminate, ecc.) può ridurre la somministrazione di sostanze farmacologiche a beneficio della qualità dei prodotti e della salute degli animali e dell'uomo.

#### 4.3.1 Impiego agricolo del compost

Per un impiego agronomico delle deiezioni zootecniche compostate, il rapporto di applicazione sul terreno di coltura deve essere basato sul principio di gestione dei nutrienti. Questo implica il bilancio degli elementi che vengono addizionati al suolo con quelli assorbiti dalle colture per il proprio fabbisogno nutrizionale. In questo bilancio vanno inclusi i nutrienti forniti dai residui

organici delle specie coltivate, la fertilità del suolo, così come la perdita di nutrienti per dilavamento, volatilizzazione e attività microbica del suolo. Solo con un corretto bilancio dei nutrienti in ingresso e in uscita è possibile un'applicazione ottimale del fertilizzante per tipo di coltura. Un eccessivo impiego di nutrienti ha un effetto dannoso sulle piante e sull'ambiente. L'eccesso di azoto, soprattutto nella pollina, può essere volatilizzato in forma ammoniacale, mentre sotto forma di nitrato è molto mobile e può essere lisciviato nelle acque sotterranee.

Il fosforo è meno mobile dell'azoto e tende a legarsi con le particelle, specialmente argillose, presenti nel suolo dopo la sua incorporazione. Comunque, costituisce un serio problema nelle acque superficiali (eutrofizzazione) dove può essere trasportato per erosione e/o dilavamento. I livelli di potassio possono essere elevati nei suoli con forti carichi di deiezioni, ma questo nutriente non è generalmente fonte di problemi ambientali. Il prodotto compostato dovrebbe avere una composizione chimica indicativa, che può variare a seconda delle integrazioni proteiche e cellulose delle deiezioni, come riportato nella tabella 12:

Indici	%
Umidità	2
Carbonio	7-20
Azoto organico	3-5
Fosforo	3-5
Potassio	2-4
Calcio	0,3-1
Manganese	0,5-1
Metalli pesanti	limiti consentiti

*Tabella 12 - Composizione media di un fertilizzante organico da compostaggio.*

La qualità del fertilizzante dipende anche dal contenuto di sostanze tossiche, in particolare di metalli pesanti, che spesso superano i valori previsti dalla normativa, che ne disciplina l'impiego agricolo, legge 748/1984 e successive modificazioni e integrazioni, in particolare *Gazzetta Ufficiale* n. 149 del 28-6-2000, da cui è stata estratta la tabella 13, relativa ai limiti superiori di metalli pesanti.

Metalli	Concentrazione (ppm)
Piombo totale	100
Cadmio totale	2
Nichel totale	50
Zinco totale	500
Rame totale	500
Mercurio totale	1,5
Cromo esavalente totale	0,5

*Tabella 13 - Concentrazione limite dei metalli pesanti in fertilizzanti e ammendanti.*



È noto che nell'uso in campo dei prodotti è necessario rispettare le norme di spandimento dei fertilizzanti, generalmente indicate dal produttore, per non creare eccessive concentrazioni di nutrienti (dannosi per le colture) e di metalli tossici.

#### 4.4 La biodigestione e la produzione di energia

I processi di conversione biochimica permettono di ricavare energia per reazione chimica dovuta al contributo di enzimi, funghi e micro-organismi, che si formano nella biomassa sotto particolari condizioni, e vengono impiegati per quelle biomasse in cui il rapporto C/N sia inferiore a 30 e l'umidità alla raccolta superiore al 30%. Risultano idonei alla conversione biochimica le colture acquatiche, alcuni sottoprodotti colturali (foglie e steli di barbabietola, ortive, patata, ecc.), i reflui zootecnici e alcuni scarti di lavorazione (borlande, acqua di vegetazione, ecc.), nonché la biomassa eterogenea immagazzinata nelle discariche controllate.

La digestione anaerobica, processo di conversione di tipo biochimico, avviene in assenza di ossigeno e consiste nella demolizione, ad opera di micro-organismi, di sostanze organiche complesse (lipidi, protidi, glucidi) contenute nei vegetali e nei sottoprodotti di origine animale, che produce un gas (biogas) costituito per il 50÷70% da metano e per la restante parte soprattutto da CO<sub>2</sub> ed avente un potere calorifico medio dell'ordine di 23.000 kJ/Nm<sup>3</sup>. Il biogas così prodotto viene raccolto, essiccato, compresso ed immagazzinato e può essere utilizzato come combustibile per alimentare caldaie a gas per produrre calore o motori a combustione interna (adattati allo scopo a partire da motori navali a basso numero di giri) per produrre energia elettrica. Al termine del processo di fermentazione nell'effluente si conservano integri i principali elementi nutritivi (azoto, fosforo, potassio), già presenti nella materia prima, favorendo così la mineralizzazione dell'azoto organico; l'effluente risulta in tal modo un ottimo fertilizzante. Gli impianti a digestione anaerobica possono essere alimentati mediante residui ad alto contenuto di umidità, quali le deiezioni animali, i reflui civili, i rifiuti alimentari e la frazione organica dei rifiuti solidi urbani. Tuttavia, anche in discariche opportunamente attrezzate per la raccolta del biogas sviluppato, solo il 40% circa del gas generato può essere raccolto, mentre la rimanente parte viene dispersa in atmosfera: poiché il metano, di cui è in gran parte costituito il biogas, è un gas serra con un effetto circa venti volte superiore a quello della CO<sub>2</sub>, le emissioni in atmosfera di biogas non sono desiderabili; quando invece la decomposizione dei rifiuti organici è ottenuta mediante digestione anaerobica nei digestori (chiusi) degli appositi impianti, quasi tutto il gas prodotto viene raccolto ed usato come combustibile.

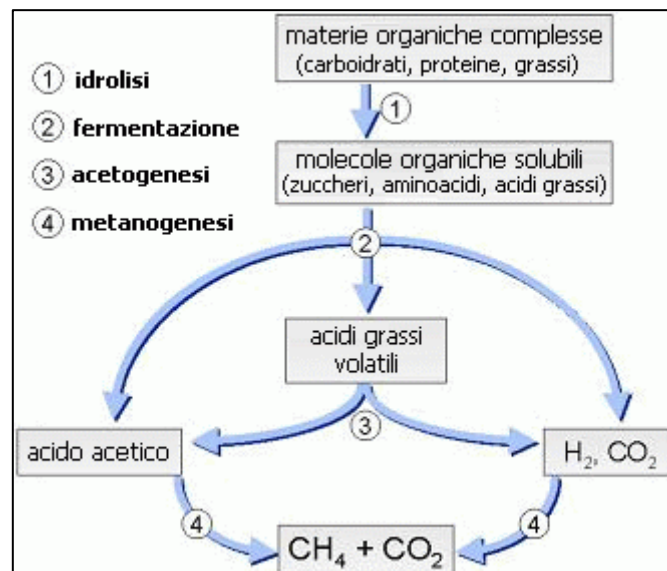
#### 4.5 Il processo di digestione anaerobica

La digestione anaerobica è un processo biologico molto diffuso in natura. Consiste essenzialmente nella degradazione, in assenza di ossigeno, della sostanza organica, ad opera di popolazioni batteriche di tipo anaerobico e facoltativo. Da tale processo si genera il cosiddetto “biogas”, composto principalmente da metano ed anidride carbonica, con percentuali rispettivamente intorno al 55-60% e al 40-45%, e da altri componenti quali acido solfidrico, solfuri, acidi volatili e vapore acqueo, in piccole percentuali. Il processo di digestione anaerobica può suddividersi in tre successivi stadi temporali:

- la idrolisi e fermentazione acidogenica;
- la deidrogenazione e idrogenazione acetogenica;
- la decarbossilazione dell'acetato e riduzione dell'anidride carbonica.

Ogni stadio comprende diverse tappe operate mediante differenti popolazioni batteriche:

- i batteri idrolitico-fermentativi;
- i batteri acidogenici;
- i batteri acetogenici;
- i batteri solfato-riduttori;
- i batteri nitrato-riduttori;
- i batteri metanigeni.

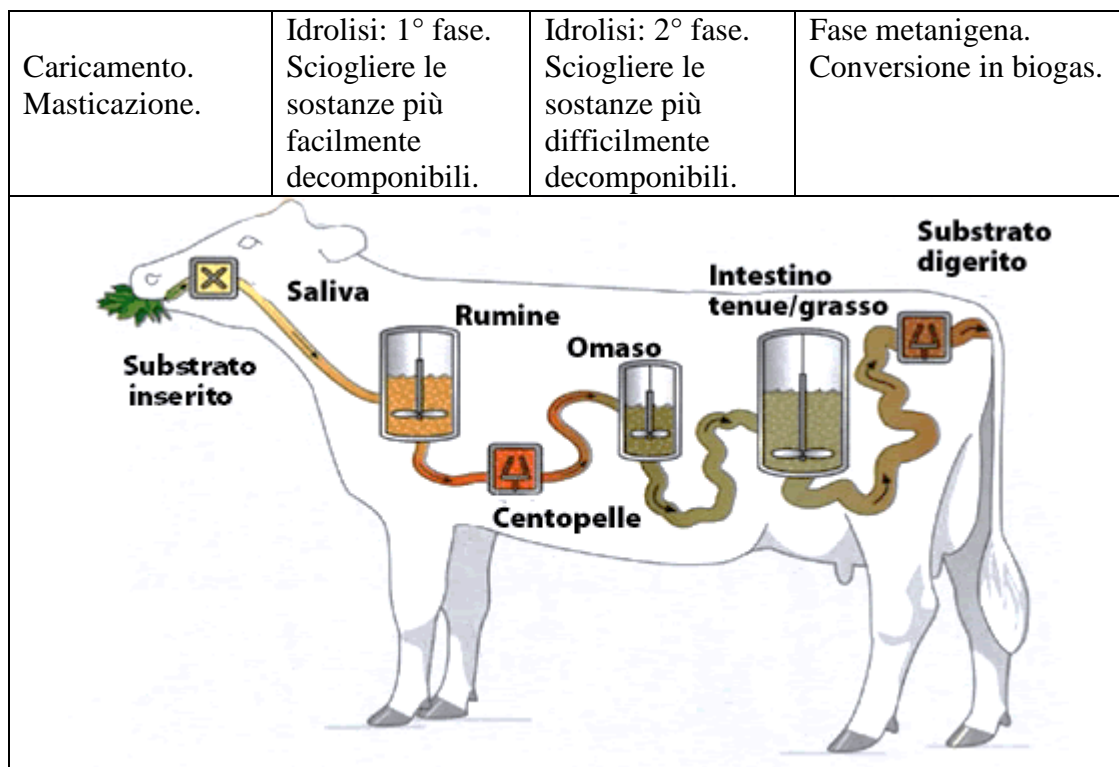


*Figura 56 - Schema dei diversi stadi, con i prodotti ottenuti, che si ottengono dalla digestione anaerobica.*

Nel primo stadio avviene l'idrolisi delle molecole organiche complesse contenute nella struttura

organica del substrato in digestione, quali carboidrati, grassi e proteine che vengono scissi in monosaccaridi, acidi grassi e aminoacidi rispettivamente. Nel secondo stadio i prodotti di idrolisi, metabolizzati dalle diverse specie batteriche di tipo idrolitico-fermentativo, vengono convertiti principalmente in acidi grassi volatili, idrogeno, anidride carbonica ed in minor misura in acido lattico, alcoli ed altri composti organici intermedi. Nel corso del terzo stadio del processo, detto di acetogenesi, avviene la formazione di acetato attraverso il metabolismo ossidativo dei prodotti organici del primo stadio. Il quarto stadio della fermentazione anaerobica è quello della ossidazione, decarbossilazione dell'acetato e riduzione dell'anidride carbonica, nel quale avviene l'ossidazione dell'acido acetico con produzione di idrogeno solforato o ammoniacale, nel caso rispettivamente di reazioni mediate da batteri solfato-riduttori e batteri nitrato-riduttori, oppure con produzione di metano ed anidride carbonica nel caso di reazioni mediate da metanobatteri.

Questa fase della digestione anaerobica rappresenta la chiave che definisce lo sviluppo del processo verso la metanogenesi o la solfato-nitrato riduzione. La presenza di alte concentrazioni di solfati o nitrati favorisce la tendenza verso la solfato-nitrato riduzione, mentre la scarsità di questi ultimi dà luogo allo sviluppo prevalentemente dei batteri metanigeni che operano la decarbossilazione dello ione acetato con formazione di metano.



*Figura 57 – Processo di gestione anaerobica, che avviene in modo naturale nei bovini.*

In aggiunta agli stati precedentemente elencati dovrà essere aggiunto uno stadio di repowering, di cui che siamo in fase di progetto, che sarà quello delle microbial fuel cell, che porterà ad avere

una rimozione dell'azoto dall'effluente ed in aggiunta la produzione di energia elettrica; per effettuare la produzione di energia elettrica vedremo attivi i batteri elettrogenici di tipo endogeno già presenti nell'effluente e l'energia prodotta potrà essere considerata a tutti gli effetti, prodotta da FER, fonte energetica rinnovabile e perciò soggetta a tutte le forme di incentivazione previste dalla normativa vigente.

L'installazione di impianti MFC come unità bottom repowering di biodigestori anaerobici presenta, a nostro avviso, due indiscutibili vantaggi:

- valorizzazione energetica della frazione organica ancora presente nel digestato (>20%);
- rimozione quantitativa dei nitrati.

Un moderno impianto di digestione anaerobica, per biogas è costituito da diverse componenti tecnologiche:

- sistema di alimentazione substrati (pompe, tramogge, coclee, ecc.);
- digestore anaerobico (vasca, copertura, sistema di riscaldamento, miscelatori, valvole di sicurezza, ecc.);
- trattamento biogas (deumidificazione, desolforazione, filtrazione, ecc.);
- unità di cogenerazione (motore, alternatore, scambiatore, circuito raffreddamento, scarico fumi, ecc.);
- installazioni elettriche ed allacciamento alla rete (quadri, cabina di trasformazione, contatori, ecc.);
- strumenti per l'automazione e il controllo;
- vasca di stoccaggio del digestato;

nella figura 58 è riportato lo schema di un moderno impianto a biodigestore per la produzione del biogas:

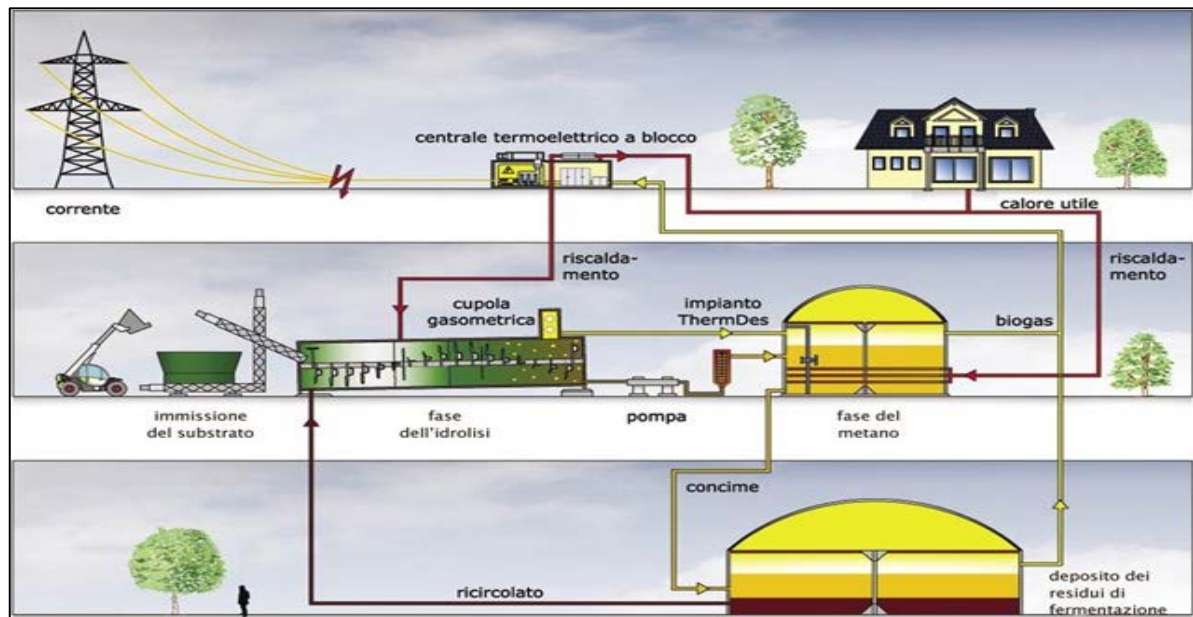


Figura 58 - Schema di un impianto a biodigestore, per la produzione di biogas.

#### 4.5.1 Tipologie di digestori

La tipologia più diffusa in ambito agricolo sono i digestori a umido (che lavorano con un contenuto in sostanza secca inferiore al 10-12%), verticali e completamente miscelati; in alternativa i digestori a umido possono essere anche a flusso orizzontale.

I digestori “a secco” sono adatti alla digestione di materiali con contenuto in sostanza secca superiore al 20% (es. letame, biomasse vegetali, ecc.). Sono per lo più diffusi nel settore del trattamento dei rifiuti solidi urbani.

A seconda degli stadi in cui avviene la digestione, gli impianti possono essere monostadio o bistadio.

Una proposta per la realizzazione dello stadio di repowering dell'impianto a biodigestore con lo stadio MFC, microbial fuel cell prevede la realizzazione della camera anodica nel digestore, a condizione che siano garantite le necessarie condizioni anaerobiche e l'installazione dell'elettrodo risulti agevole, anche dal punto di vista della manutenzione; la camera catodica è costituita dalla vasca di accumulo del digestato, nel quale occorrerà impiantare l'elettrodo catodico, a cui si dovrà assicurare la necessaria manutenzione.

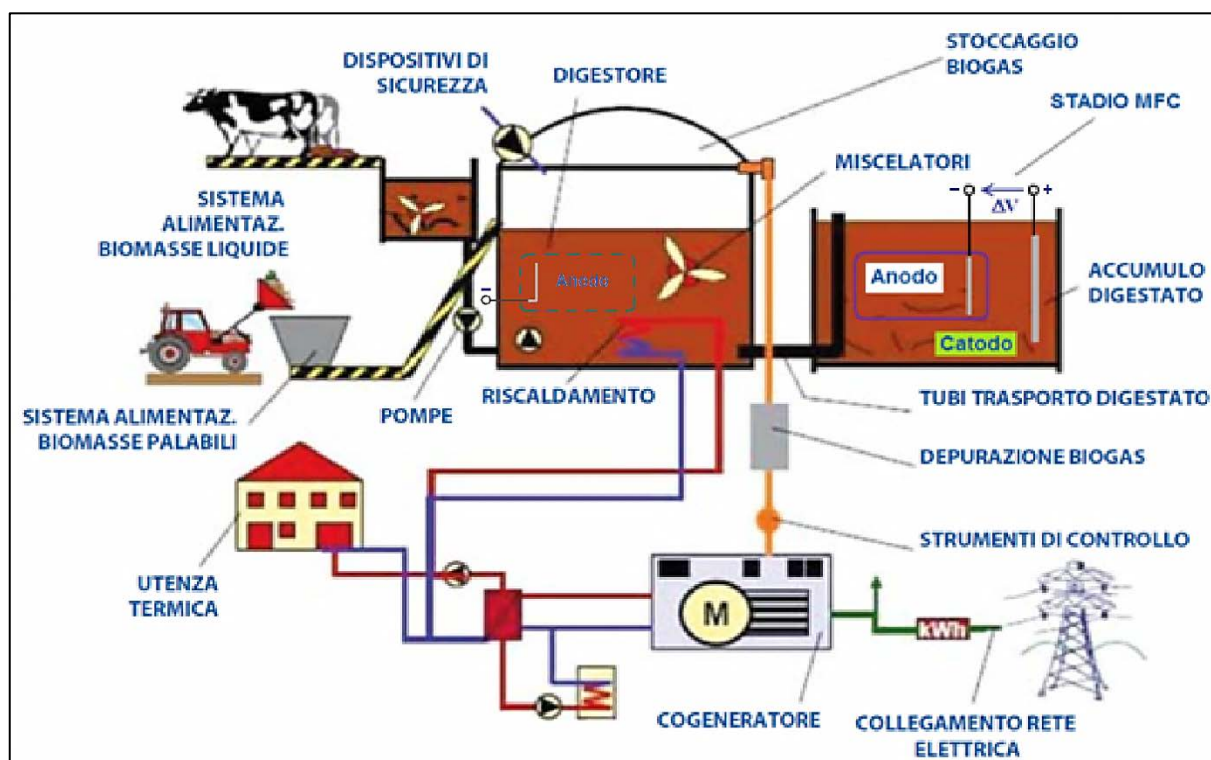


Figura 59 - Impianto di digestione anaerobica, nel quale è già presente lo stadio MFC, nelle due versioni ipotizzate.

I collegamenti elettrici saranno collegati agli elettrodi, sui quali è prevista una tensione  $\Delta V$  di poche decine di Volt, e poi verranno collegati ad un sistema di accumulo, di tipo a batterie chimiche; con un successivo sistema di conversione cc/ca verrà poi previsto il collegamento all'utenza. In condizioni favorevoli si potrà installare la camera anodica anche nella vasca di accumulo del digestato, insieme alla camera catodica, e le due soluzioni vengono riportate in figura 59.

#### 4.5.2 Caratterizzazione ed utilizzo agronomico del digestato

Alla fine del processo di digestione anaerobica si ottiene il digestato, un prodotto di composizione e consistenza variabili, in funzione dei substrati in entrata e delle modalità di conduzione dell'impianto. Il quantitativo di azoto nel digestato è funzione di quello presente nei substrati di partenza; l'azoto totale rimane invariato lungo il processo di digestione; esso subisce solo una trasformazione chimica (mineralizzazione) e da azoto prevalentemente organico nelle biomasse di origine, diventa in larga parte azoto ammoniacale, forma prontamente assimilabile dalle colture.

Altri substrati che sono idonei e che si stanno già impiegando per l'alimentazione sono i reflui di distilleria e di industrie alimentari, liquami di industria cartaria e di caseificio, tutti caratterizzati da composti organici meno facilmente biodegradabili e dalla presenza di composti inibenti.

#### 4.5.3 Benefici agronomici nell'uso del digestato

Per valorizzare appieno il potenziale nutritivo e minimizzare le perdite, specie quelle per volatilizzazione dell'ammoniaca, è necessario che la distribuzione avvenga a ridosso dell'epoca di utilizzo da parte delle colture e che sia tempestivamente seguita da interrimento.

Sostanza secca - ss	[g/kg]	30-90
Solidi volatili	[% ss]	50-70
pH		7,5-8,2
Azoto Totale Kjeldahl, TKN	[g/kg]	3-6
Azoto ammoniacale N-NH <sub>4</sub>	[TKN%]	50-80
C/N		3-8
Fosforo (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	[g/kg]	0,8-1,6
Potassio (K <sub>2</sub> O)	[g/kg]	4,7

*Tabella 14 - Composizione del digestato. Fonte: Barbanti et al., L'Informatore Agrario 13/2010, pp. 44 e ss.*

#### 4.5.4 Tecnologie per il trattamento del digestato

La gestione degli effluenti organici degli allevamenti zootecnici richiede la soluzione di problemi ambientali che riguardano l'aria, l'acqua, il suolo e la salute. Le tecniche di trattamento delle deiezioni sono diverse e ognuna è specializzata per risolvere specifici problemi di abbattimento o trasformazione della matrice organica.

Le tecnologie per il trattamento del digestato, qualora sia necessaria la riduzione dei composti azotati presenti, sono molteplici e presentano diverso grado di efficienza, di complessità e di maturità tecnologica e analizziamo le tre seguenti:

- a) Trattamenti meccanici;
- b) Trattamenti fisico-chimici;
- c) Trattamenti biologici;

a) Trattamenti meccanici

La separazione meccanica tra solido e liquido è il trattamento più diffuso. Essa genera un solido palabile (con circa il 20-30% di sostanza secca) e un liquido con basso tenore di solidi (circa il 2-8% di sostanza secca), consentendo una gestione agronomica più flessibile, nonché una riduzione dei volumi di stoccaggio. Il trattamento non porta ad una effettiva rimozione dell'azoto presente, bensì determina una redistribuzione dello stesso. Il liquido, dove si concentrano l'azoto ammoniacale e i sali solubili, presenta caratteristiche simili a quelle di un concime e può essere distribuito in fertirrigazione. Il solido, ad elevato contenuto in sostanza organica ed azoto organico a lento rilascio, presenta proprietà ammendanti e può essere ceduto ad altre aziende terze, consentendo la riduzione del carico azotato aziendale.

Efficienza di separazione			Frazione solida		Consumo energetico	
Tipo di separatore	%SS	%N	%SS	% di volume rispetto al liquame in ingresso	kWh/m <sup>3</sup> liquame trattato	kWh/kgN separato
Separatore rotante	40-55	25-35	18-20	16-32	0,4-1,8	0,5-2,4
Separatore a compressione elicoidale	30-40	15-25	20-25	8-20	0,4-0,8	0,5-1,7
Centrifuga	50-75	20-35	20-28	10-20	4,3-6,7	6,2-9,1

*Tabella 15 - Prestazioni di diverse tecnologie per la separazione meccanica dei solidi. Fonte C.E.T.A.*

b) Trattamenti fisico-chimici

Gran parte dell'azoto viene estratto e trasferito in un "concentrato" solido, eventualmente utilizzabile come fertilizzante. Sono solitamente processi molto efficienti, ma costosi, che comunque necessitano di pretrattamenti a monte (separazione solido liquido, depurazione). Pur essendo tecnologie collaudate e diffuse in altri settori economici (industriale, depurazione civile), trovano ancora scarsa applicazione in campo zootecnico.

Tecnologia di trattamento	DISTRIBUZIONE DOPO TRATTAMENTO			
	Frazione liquida (nota **)		Frazione solida/ densa	
Strippaggio	Azoto 20-40% (*)	Fosforo: 10-70% (*)	Azoto: 60-80% (*)	Fosforo: 30-90% (*)
Precipitazione della struvite	Azoto: 20% (*)	Fosforo: 10% (*)	Azoto: 80% (*)	Fosforo: 90% (*)
Microfiltrazione e ultrafiltrazione	Azoto: 50% (*)	Fosforo: 15% (*)	Azoto: 50% (*)	Fosforo: 85% (*)
Osmosi inversa	Azoto: 5% (*)	Fosforo: 1% (*)	Azoto: 95% (*)	Fosforo: 99% (*)

*Tabella 16 - Efficienza di separazione dell'azoto (N) e del fosforo (P) mediante diversi trattamenti fisico-chimici.*



(\*) Regione Lombardia – ERSAF – I.I.A. Gestione e riduzione dell'azoto di origine zootecnica Soluzioni tecnologiche e impiantistiche - Quaderni della ricerca.

(\*\*) Nei quantitativi di N presenti nelle frazioni liquide non sono considerate eventuali perdite per volatilizzazione che possono avvenire durante la fase di stoccaggio. Ad esempio la Regione Veneto (All. A al Decreto 104 del 31 marzo 2008), considera che uno stoccaggio di 90 giorni può comportare una perdita di azoto ammoniacale pari al 28% dell'azoto.

c) Trattamenti biologici

Consentono una vera e propria riduzione della concentrazione di composti azotati, mediante la loro trasformazione biochimica in azoto molecolare allo stato gassoso (N<sub>2</sub>).

I trattamenti biologici, specie quelli nitro-denitro tradizionali, sono noti in ambito zootecnico, in particolare negli allevamenti intensivi di suini. Sono processi molto “energivori” e quindi costosi. In un contesto simile, la digestione anaerobica, attraverso la produzione di energia, rappresenta un'opportunità interessante per la riduzione dei costi di gestione del reflui per le aziende nelle aree a maggior criticità.

Tipologia di trattamento	Rimozione dell'Azoto (N)
Fanghi attivi tradizionali con nitro-denitro	70-95%
Trattamento SHARON- ANAMOX (sistemi di denitrificazione via nitrito)	95%
Impianti SBR (Sequencing Batch Reactor)	70-90%
Impianti MBR (Membrane Bio Reactors)	> 90%
Fitodepurazione	> 50%

*Tabella 17 - Efficienza di separazione dell'azoto attraverso diversi trattamenti biologici. Fonte C.E.T.A. da fonti varie.*

La notevole affidabilità del processo di rimozione biologica dell'azoto e la conoscenza pressoché completa degli aspetti microbiologici e biochimici ne ha favorito la diffusione, rendendolo oggi il processo più adottato; ad essa si affianca ora la rimozione microbiologica, che richiede la conoscenza di molti parametri microbiologici e biochimici.

#### 4.6 Caso studio: cogenerazione da BRUNI Enrico e Aldo SOC.AGR.S.S. Sutri (VT)

L'impianto di digestione anaerobica presso l'Azienda Bruni è in funzione dall'Agosto 2009. Tale impianto e il suo gemello della vicina Azienda Palombini (Nepi), costituiscono le prime realizzazioni di filiera biogas attivate nel Lazio in ambito prettamente agricolo. Gli amministratori, Aldo ed Enrico Bruni, ospitano volentieri delle viste tecniche al fine di trasferire l'esperienza maturata favorendo la replicabilità dell'iniziativa nel Centro-Sud del Paese.

I due digestori anaerobici sono alimentati con un mix di matrici organiche di provenienza aziendale, per la maggior parte, e da filiera corta per la restante.

L'Azienda Bruni si estende su una superficie di 200 ettari impiegati per la produzione di mais, sorgo e loietto destinati all'alimentazione dei bovini ed in parte di insilati a destinazione energetica; il core business aziendale è l'allevamento di vacche da latte, circa 700 capi della razza Frisona, per la fornitura della centrale del latte di Nepi; l'Azienda Bruni gestisce autonomamente tutte le sezioni dell'impianto. Il digestato solido prodotto viene stoccato in una platea di cemento, mentre quello liquido in vasche del volume di 4.000 m<sup>3</sup> ed entrambi vengono impiegati in azienda per il ripristino della sostanza organica nel suolo da coltivare e distribuito come ammendante agricolo sui terreni limitrofi. La gestione dell'impianto è a carico degli agricoltori.

*Tabella 18 - Caratteristiche dell'Impianto di digestione anaerobica*

Caratteristiche dell'impianto di digestione anaerobica		
Tipologia di impianto		Impianto di cogenerazione alimentato a biogas per la produzione di energia elettrica e termica. Anno di realizzazione: 2009 Qualificato IAFR: 2009
La filiera	Materia prima utilizzata	effluenti zootecnici, colture dedicate, scarti agroalimentari e agroindustriali
	Provenienza della materia prima	70% produzione interna, 30% da filiera corta (inferiore a 70 km di raggio)
	Consumo medio di materia prima	circa 23.000 t/anno (16.200 t/anno di liquami + 3.600 t/anno di letame + 1.500 t/anno insilati + 1.000 t/anno residui agroindustriali ed acque di vegetazione + 700 t/anno di glicerina)

La percentuale di energia autoconsumata per l'esercizio dell'impianto e per gli usi aziendali è circa il 3% dell'energia elettrica prodotta per la movimentazione delle matrici organiche ed il caricamento idraulico; circa il 50% dell'energia termica prodotta in inverno viene destinata alla termoregolazione del digestore.

*Tabella 19 - Caratteristiche dell'impianto di cogenerazione.*

Caratteristiche dell'impianto di cogenerazione	
Potenza elettrica nominale	500 kWe
Potenza termica utilizzata	250 kWt
Ore di funzionamento annue	8.000 h elettrica; 2.000 h termica
Produttività elettrica media annua	4.000 MWh

Recupero termico medio annuo	500 MWh (usi termici dell'azienda e termoregolazione del digestore)
Destinazione dell'energia elettrica	vendita al gestore della rete nazionale
Destinazione dell'energia termica	autoconsumo

La digestione anaerobica avviene in due reattori da 1100 m<sup>3</sup> ciascuno, e la figura 60 ne riporta una fotografia, ed in essi la miscelazione del substrato avviene tramite agitatori ad elica con asse verticale.



*Figura 60 - Fotografia dei 2 biodigestori dell'azienda Bruni, Sutri (VT).*

L'alimentazione dei reattori muta a seconda delle matrici: meccanica (pala caricatrice) per quelle solide, idraulica con sistemi di pompaggio per quelle liquide (acque di vegetazione) e semiliquide (liquami e glicerina). L'alimentazione è gestita da un sistema computerizzato che regola giornalmente il flusso di materia ai digestori.

Il biogas è prodotto in regime mesofilo (circa 40 °C), il riscaldamento dei digestori è ottenuto grazie al recupero del calore di raffreddamento dei generatori di elettricità e mantenuto da un efficiente sistema di coibentazione dei reattori.

Il tempo di permanenza della biomassa nei reattori (ritenzione idraulica) è in media 50 giorni.

Il biogas prodotto viene raccolto in due gasometri da 400 m<sup>3</sup> ciascuno, quindi sottoposto ad un processo di "pulizia" chimica (deumidificazione), fisica (raffreddamento e filtrazione) e biologica (desolfurazione batterica).

Il biogas, con un contenuto di metano del 55-60%, va ad alimentare due motori Scania a punto fisso da 250 kWe ciascuno per la produzione di energia elettrica e termica. L'energia elettrica viene ceduta alla rete di trasmissione nazionale tramite il collegamento alla centralina di media tensione limitrofa all'azienda. Nel primo anno di vita l'impianto ha operato per 8.000 ore circa, con una produzione di 4.000 MWh.

L'energia termica, sotto forma di acqua calda a 85 °C, è prodotta recuperando il calore di raffreddamento dei generatori e dei fumi di scarico.

#### 4.6.1 Caratteristiche di gestione e tipologia di finanziamenti

Il costo di investimento iniziale per la realizzazione dell'impianto è stato sostenuto per una quota da finanziamenti regionali (PSR – Regione LAZIO – ASSE 3, MISUR 311 “Diversificazione in attività non agricole”). Per l'acquisto del secondo gruppo di cogenerazione l'Azienda ha partecipato al bando ENAMA PAAF. Enama - Ente Nazionale per la Meccanizzazione Agricola, è una associazione a cui aderiscono le principali organizzazioni agricole (Cia, Coldiretti e Confagricoltura), del contoterzismo (Unima), del commercio (Assocap e Unacma), dell'industria (Unacoma) e, in qualità di membri di diritto, il Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali, le Regioni e l'Ente C.R.A.

L'Azienda usufruisce della Tariffa Omnicomprensiva (0,28 €/kWh) riservata agli impianti alimentati a biogas con potenza inferiore ad 1 MW.

La tipologia di produzione dell'energia elettrica è la cogenerazione; l'energia elettrica prodotta è immessa in rete e venduta al GSE e solo una piccola parte è consumata dall'azienda agricola per l'impianto e per gli usi aziendali; l'energia termica è totalmente utilizzata all'interno dell'Azienda.

L'Azienda ha stipulato dei contratti di filiera di cui un Accordo Quadro con il Consorzio dei Frantoi Laziali, e contratti privati con i singoli frantoi per la fornitura delle acque di vegetazione e delle sanse risultanti dal processo di spremitura delle olive. Per la fornitura dei residui dell'agroindustria (vegetali di scarto dei mercati ortofrutticoli locali) ha stipulato un contratto con la Cooperativa Ortofrutticola Ortosole di Maccarese.

COSTI	Progetto Biomasse ENAMA
Costi impianto	2.000.000 €
Costi di esercizio	60.000 €/anno
Costi materia prima	200.000 €/anno (glicerina, trasporto e gasolio)
Costi di smaltimento del digestato	nessuno
Costo medio energia elettrica aziendale	0,17-0,18 €/kWh
Costo polizza assicurativa	2.500 €/anno
Costi gestione servizio vendita energia e costi gestione servizio CV	5.000 €/anno
Tempo previsto di rientro dell'investimento	5-6 anni

*Tabella 20 - Analisi costi / benefici per l'impianto.*

<b>QUADRO NORMATIVO</b>
Autorizzazioni ottenute per la costruzione ed avvio dell'impianto
Dichiarazione di Inizio Attività (Comune di Sutri)
Autorizzazione Unica (Provincia di Viterbo)

Dichiarazione di conformità impianto antincendio (VVFF)
Denuncia di officina elettrica (UTIF)
Qualifica IAFR 2009 (GSE)

*Tabella 21 - Quadro normativo e autorizzativo dell'impianto.*

#### 4.7 Inquadramento normativo del digestato

Non esiste attualmente un inquadramento normativo univoco a livello nazionale per il trattamento e/o impiego del digestato a scopi agronomici o commerciali. In generale la qualificazione del digestato può, in funzione delle matrici di alimentazione del digestore, delle caratteristiche del ciclo produttivo e delle modalità di impiego del digestato, essere inquadrata nell'ambito della disciplina che regola l'utilizzo:

- dei rifiuti;
- dell'esclusione dal regime dei rifiuti in caso di sostanze naturali non pericolose utilizzate nell'attività agricola;
- dei sottoprodotti;
- ai sensi del DM 7/4/2006 sull'utilizzo agronomico (attualmente riservato ai soli effluenti di allevamento).

Nell'ambito dei lavori di revisione in materia di rifiuti e della disciplina che regola l'utilizzazione agronomica degli effluenti zootecnici, le modifiche proposte al D.M. 7 aprile 2006 e al D.Lgs 152/2006, introducono finalmente la definizione di "digestato". Le modifiche in corso sono dettate dall'esigenza di adeguare ad una realtà agricola in evoluzione la "utilizzazione agronomica degli effluenti di allevamento". Questi sono sempre più utilizzati in miscela con biomasse agricole sottoposte a digestione anaerobica o ad altri trattamenti e sempre più agricola in evoluzione la "utilizzazione agronomica degli effluenti di allevamento". Questi sono sempre più utilizzati in miscela con biomasse agricole sottoposte a digestione anaerobica o ad altri trattamenti e sempre più diffusa è la loro utilizzazione per scopi di valorizzazione energetica. Riferimenti in tal senso erano già presenti nel vecchio decreto, adesso si intende ampliare e dare maggiore certezza agli operatori in tal senso. Una volta stabilita la possibilità di impiego agronomico del digestato, il dosaggio deve essere definito in base al contenuto di azoto, nel rispetto dei vincoli stabiliti dalla

Direttiva Nitrati (91/676/CEE) e relativi provvedimenti di attuazione: 170 kg di N/ha in Zone Vulnerabili da Nitrati (ZVN); 340 kg di N/ha in Zone Ordinarie (ZO).

Come noto, il vincolo imposto dalla Direttiva Nitrati riguarda l'azoto di origine zootecnica. In assenza di un inquadramento relativo alle differenti tipologie di digestato a livello nazionale, diverse sono state le interpretazioni da parte delle singole Regioni relativamente all'azoto

presente nel digestato, e possono essere ricondotte ai seguenti casi:

- il digestato è assimilato ad un refluo zootecnico, quindi tutto l'azoto presente rientra nei massimali previsti dalla Direttiva Nitrati, a prescindere dalla natura del digestato;
- nei digestati “misti” da co-digestione, solo alla frazione di azoto che deriva dai reflui zootecnici viene applicato il limite per le ZO o ZVN; il resto dell'azoto va a contribuire alla quota del fabbisogno colturale specifico.

SUBSTRATO	AZOTO	AZOTO
	[% sostanza secca]	[kg/ t di fresco]
Liquame bovino	2,6-6,7	4,42
Liquame suino	6-18	8,40
Pollina	5,4	17,28
Silomais	1,1-2	4,26
Colletto e foglie barbabietola	0,2-0,4	0,48
Marcomela	1,1	3,85
Sfalci d'erba	2-3	3,00

*Tabella 22 - Contenuto di azoto (N) per tipologie di substrato. Fonte: autori vari.*

#### 4.8 Incentivi economici per i produttori di energia

Le tipologie di incentivi che vengono applicati agli impianti a biodigestori, sono quelli delle due seguenti tipologie:

- Tariffa onnicomprensiva ;
- Certificati verdi;

e li andiamo ad analizzare qui nel seguito:

##### 4.8.1 Tariffa onnicomprensiva

Per impianti di potenza inferiore ad 1 MWh il produttore può accedere alla tariffa onnicomprensiva, che prevede il pagamento di €0,28 per ogni kW prodotto. Ad esempio, un impianto da 500 kWh è in grado di produrre 12.000 kW al giorno, equivalenti a €3.360 (oltre € 1.000.000 all'anno). La tariffa onnicomprensiva ha una durata di 15 anni, terminati i quali l'impianto mantiene comunque un rendimento legato alla vendita dell'energia in rete. È importante considerare inoltre che ogni intervento sull'impianto che ne determini un aumento di potenza permette l'applicazione della tariffa onnicomprensiva sulla parte eccedente per ulteriori 15 anni. Ad esempio, se dopo alcuni anni il produttore apporta una miglioria che aumenta la

potenza da 500 a 750 kWh, da quel momento e per i successivi 15 anni potrà accedere alla tariffa onnicomprensiva per la parte eccedente (in questo caso 250 kWh).

#### 4.8.2 Certificati verdi

I produttori di energia da fonti rinnovabili hanno accesso ai certificati verdi rilasciati dal Gestore per i Servizi Elettrici (GSE). La normativa italiana prevede che ogni produttore di energia da fonti non rinnovabili (carbone, nafta etc.) produca una quota di energia da fonti rinnovabili. Se non è in grado può comprare tale quota dai possessori di certificati verdi. La quota richiesta aumenta ogni anno; per il 2010 è fissata sul 6,05% della produzione. Ciò significa che un produttore di biogas può richiedere al GSE certificati verdi e vendere la propria energia ai soggetti che necessitano comprare una quota di produzione energetica da fonti rinnovabili. Le tariffe non sono fisse, sottostanno ad un regime di libero mercato. Anche i certificati verdi hanno una durata di 15 anni.

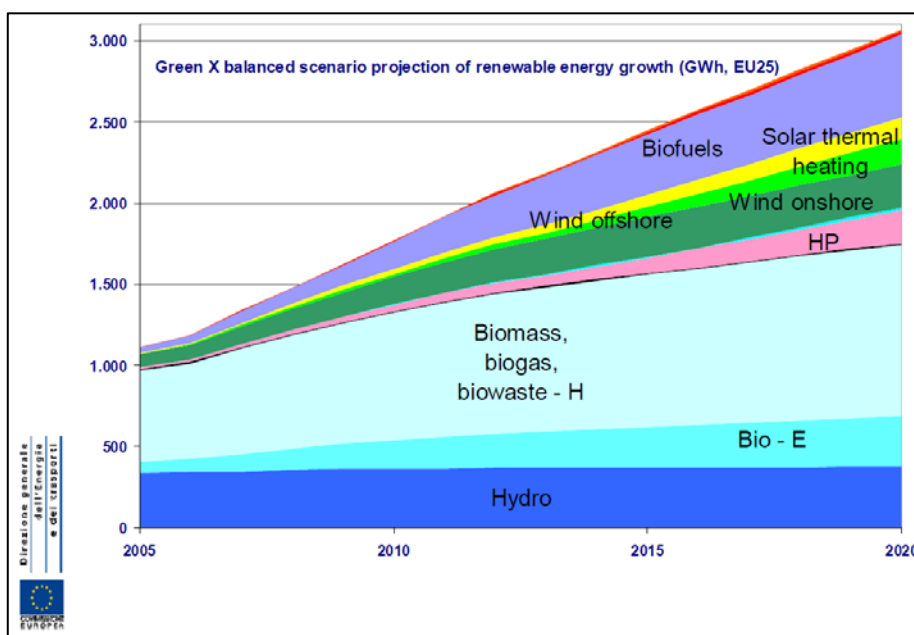
#### 4.8.3 Potenzialità per lo sfruttamento a fini energetici delle biomasse

Lo sfruttamento a fini energetici delle biomasse può assumere un ruolo strategico, contribuendo ad uno sviluppo sostenibile ed equilibrato del pianeta.

Un impiego diffuso delle biomasse può comportare notevoli ricadute a livello economico, ambientale ed occupazionale, in quanto esse possono garantire:

- la valorizzazione di residui agroindustriali;
- nuove opportunità di sviluppo per zone marginali e/o riduzione di surplus agricoli con sostituzione di colture tradizionali con colture energetiche;
- la possibilità di sviluppo di nuove iniziative industriali;
- contributo nullo all'incremento del tasso di CO<sub>2</sub> in atmosfera;
- l'autonomia energetica locale di Aziende agricole o di lavorazioni del legno.

In tale ottica, la Campagna della Commissione europea per il decollo delle fonti energetiche rinnovabili (Take off Campaign) individua l'energia da biomasse come uno dei settori-chiave per il raggiungimento degli obiettivi previsti dal Libro Bianco europeo.



*Figura 61 - Trend di crescita delle fonti rinnovabili di energia. [Libro Bianco, EU, 2010].*

#### 4.9 Il mercato del biogas In Italia

La difficoltà di sviluppo del settore dello sfruttamento energetico delle biomasse è legata principalmente al superamento delle barriere non-tecniche (finanziamenti dei costi di investimento alquanto elevati, Politica Agricola Comunitaria, diffusione delle informazioni). Il costo dell'energia da biomassa è, attualmente, ancora generalmente maggiore di quello derivante dalle fonti fossili, ma vi è una tendenza verso la competitività, in tempi ragionevolmente brevi, da sostenere e valorizzare.

In tutti i casi, tuttavia, il gap di costo tra le fonti rinnovabili e quelle fossili, sarebbe invertito se venissero considerati nell'analisi costi-benefici gli aspetti ambientali ed i costi sociali connessi alla combustione dei materiali fossili.

Nell'ottica della diversificazione delle fonti rinnovabili, inoltre, lo sfruttamento a fini energetici delle biomasse rappresenta, in particolare per l'Italia, un importante giacimento energetico potenziale, che potrebbe permettere di ridurre la vulnerabilità nell'approvvigionamento delle risorse energetiche e limitare l'importazione di energia elettrica. Si valuta, infatti, che la disponibilità di biomasse residuali (legno, residui agricoli e dell'industria agroalimentare, rifiuti urbani e dell'industria zootecnica), in Italia, corrisponde ad un ammontare di circa 66 milioni di t di sostanza secca l'anno equivalente a 27 Mtep. L'Italia dispone di una notevole quantità di "petrolio verde" costituito dalle biomasse, sotto forma non solo di alberi, piante coltivate e



residui vegetali, ma anche della parte biodegradabile dei rifiuti solidi urbani, di biogas e di bioliquidi. Ecco il quadro della situazione e come si può sfruttare questa preziosa risorsa.

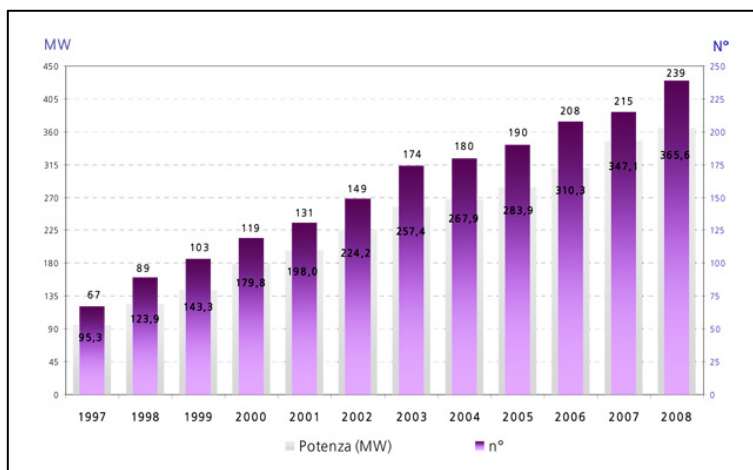


Figura 62 - Potenza installata e numero degli impianti di biogas in Italia, dal 1997 al 2008.  
Fonte: GSE Gestore Sistema Elettrico S.p.A. .

In Italia, tra il 1997 e il 2008 gli impianti alimentati da biogas sono aumentati secondo un tasso medio annuo pari al 12,3% (fonte: GSE). Dai 67 impianti del 1997 si arriva ai 239 del 2008. La potenza installata aumenta secondo un tasso medio annuo pari al 13%.

Nello stesso periodo, la produzione annua di biogas è passata da 372,8 a 1599,5 GWh, con un tasso medio annuo di crescita del 14,2%.

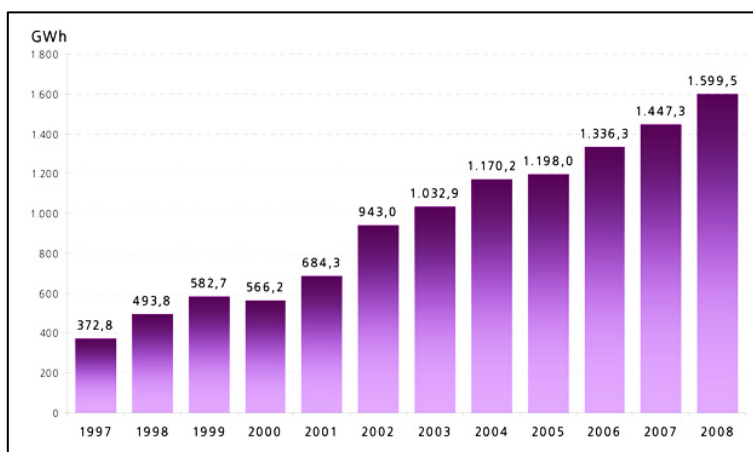


Figura 63 - Energia elettrica prodotta dagli impianti di biogas in Italia, dal 1997 al 2008.  
Fonte: GSE Gestore Sistema Elettrico S.p.A. .

I produttori di biogas hanno accesso agli incentivi spettanti ai produttori di energia elettrica da fonti rinnovabili. Il produttore può scegliere tra la tariffa onnicomprensiva e i certificati verdi, CV.

## Capitolo 5

### Azione di denitrificazione da parte delle MFC

#### 5.1 Il ciclo dell'azoto

In natura esiste un ciclo dell'azoto: l'azoto dell'atmosfera viene fissato dai batteri nitrificanti del terreno, e viene portato nel suolo dalle precipitazioni atmosferiche che raccolgono i composti azotati che si formano nell'atmosfera per reazione dell' $N_2$  con l' $O_2$  sotto l'azione delle scariche elettriche; la quantità di tali composti azotati è stata valutata ad oltre 250.000 tonnellate per giorno. Questi composti vengono poi trasformati dalle piante in proteine vegetali, e da queste usate come alimenti dalla fauna, prendono così origine le proteine animali; infine batteri denitrificanti e fermentazioni biologiche riportano l'azoto nell'atmosfera.

L'azoto rappresenta il 78% dei gas che costituiscono l'atmosfera terrestre; tuttavia, dal momento che la maggior parte degli organismi viventi non può utilizzare l'azoto atmosferico per fabbricare gli aminoacidi e gli altri composti azotati, le comunità dipendono dall'azoto contenuto nei minerali del terreno. Pertanto, nonostante l'abbondante contenuto nella biosfera, la scarsità di azoto nel suolo rappresenta spesso il principale fattore limitante per la crescita delle piante. Il processo attraverso il quale questa limitata quantità di azoto viene riciclata attraverso il mondo vivente è denominato *ciclo dell'azoto*. I tre stadi principali del ciclo dell'azoto sono: (1) la ammonificazione, (2) la nitrificazione, (3) l'assimilazione.

Gran parte dell'azoto contenuto nel terreno proviene dalla decomposizione dei materiali organici e si trova sotto forma di composti organici complessi, come proteine, aminoacidi, acidi nucleici e nucleotidi. Tuttavia, questi composti azotati vengono in genere decomposti rapidamente in composti più semplici dagli organismi che vivono nel terreno. Determinati batteri e funghi del suolo sono i principali responsabili della degradazione dei materiali organici provenienti dagli organismi morti. Questi microrganismi utilizzano le proteine e gli aminoacidi come sorgente per la sintesi delle loro proteine specifiche e sono in forma di ammoniaca ( $NH_3$ ), o ione ammonio ( $NH_4^+$ ). Questo processo viene chiamato *ammonificazione*.

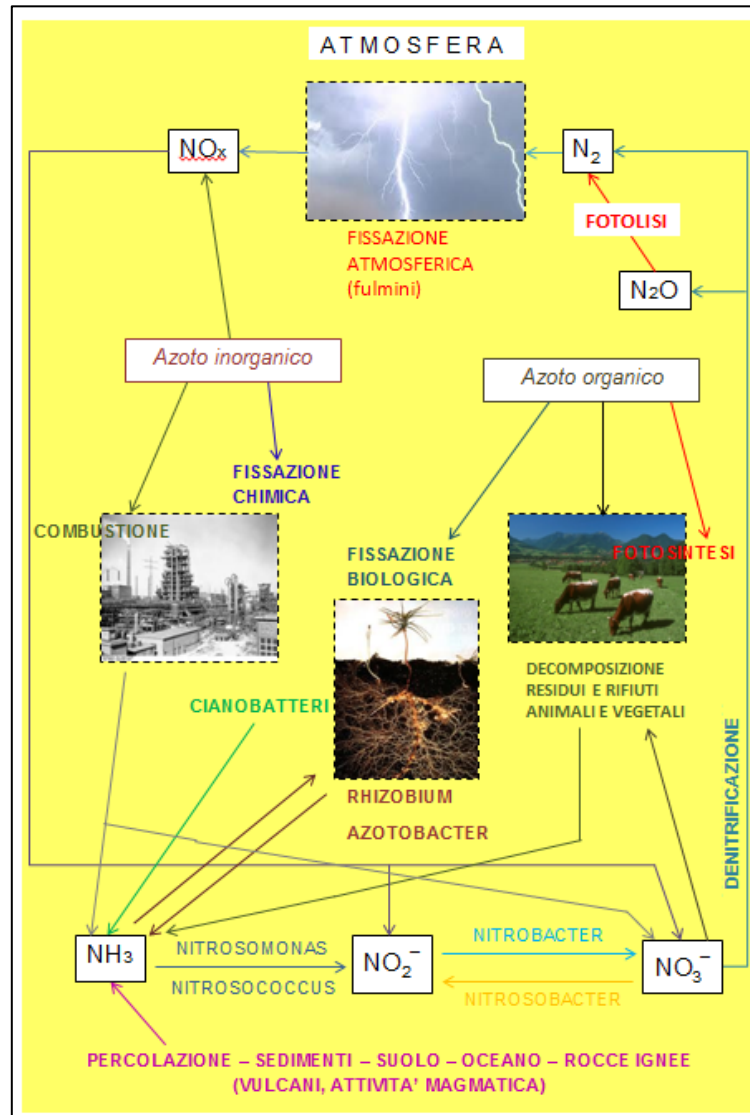
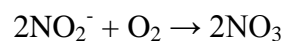


Figura 64 - Ciclo dell'azoto, in forma schematica, comprensivo di tutti i suoi componenti.

Diverse specie di batteri che si trovano comunemente nel suolo sono in grado di ossidare l'ammoniaca o lo ione ammonio. Questa ossidazione, chiamata *nitrificazione*, è un processo in cui viene prodotta energia che rappresenta la fonte principale utilizzata da questi batteri. Un gruppo di batteri ossida l'ammoniaca  $NH_3$  (o lo ione ammonio  $NH_4^+$ ) a nitriti  $NO_2^-$ :



I nitriti sono tossici per le piante superiori, ma raramente si accumulano nel terreno. Un altro gruppo di batteri ossida i nitriti a nitrati liberando di nuovo energia:



I nitrati, una volta entrati nella cellula, vengono trasformati in ioni ammonio. Contrariamente alla nitrificazione questo processo di assimilazione richiede energia. Gli ioni ammonio così formati

vengono trasferiti su composti del carbonio per la produzione di aminoacidi e di altri composti organici azotati.

## 5.2 I procarioti svolgono un ruolo importante nel suolo e nelle raccolte d'acqua

Gli animali per il cibo dipendono, direttamente o indirettamente, dalle piante fotosintetiche, ma le piante dipendono per il loro da altri organismi: i procarioti. Senza i batteri che fissano l'azoto non esisterebbe alcuna forma di vita perché nessun altro organismo può fissare l'azoto gassoso che ci circonda. I nitrificanti svolgono inoltre un ruolo fondamentale per la biosfera perché le piante utilizzano preferibilmente per il proprio metabolismo gli ioni nitrato (il prodotto finale della nitrificazione) rispetto ai prodotti della fissazione dell'azoto. I nitrificanti producono la forma di azoto più utilizzata dalle piante che, a loro volta, rappresentano la fonte di composti azotati per gli animali e i funghi.

Se i fissatori di azoto convertono l'azoto gassoso in composti che possono essere usati dall'intero mondo vivente, perché l' $N_2$  atmosferico non si esaurisce? I denitrificanti svolgono un ruolo chiave nel mantenimento del ciclo dell'azoto. Senza i denitrificanti, che convertono gli ioni nitrato in azoto gassoso, tutte le forme di azoto percolerebbero dal suolo e finirebbero nei laghi e negli oceani, rendendo impossibile la vita sulla Terra. Altri procarioti innescano un ciclo simile per lo zolfo.

In passato i cianobatteri ebbero lo stesso drammatico impatto: la loro fotosintesi trasformò l'ambiente globale da anaerobio ad aerobio. Il risultato fu la perdita totale delle specie che non potevano tollerare l'ossigeno gassoso ( $O_2$ ) generato dai cianobatteri, ma questa trasformazione rese possibile l'evoluzione della respirazione cellulare e di conseguenza l'esplosione della vita eucariotica.

I batteri compiono le tappe fondamentali di questo ciclo. Le piante riducono i nitrati, quindi i batteri catturano l'azoto gassoso (fissazione dell'azoto), lo trasformano in ione nitrato (nitrificazione) ed infine rilasciano l'azoto gassoso nell'atmosfera (denitrificazione).

## 5.3 Trasformazioni organiche dell'azoto

Di tutti i nutrienti che influiscono sulla crescita delle piante terrestri, l'azoto ( $N_2$ ) è spesso quello meno disponibile. Fin dall'inizio della vita sulla Terra era abbondante sia nell'atmosfera sia negli oceani, ma non nella crosta terrestre, dove si è andato accumulando solo per opera degli organismi capaci di fissare l'azoto atmosferico.

La sua molecola, costituita da due atomi di azoto uniti da un triplo legame covalente, è chimicamente molto stabile e solo pochi organismi sono in grado di scinderla, trasformando l'azoto gassoso in composti azotati utilizzabili dagli organismi. Il ciclo dell'azoto è uno dei cicli più complessi e avviene attraverso differenti processi: *fissazione*, *assimilazione*, *biosintesi*, *decomposizione* (quest'ultima distinta in *ammonificazione*, *nitrificazione* e *denitrificazione*).

I primi tre processi provocano il passaggio dell'azoto dalla forma gassosa a quella organica: la fissazione avviene per l'intervento di batteri specializzati (batteri azotofissatori), presenti sia nell'acqua (p.e. *Anabaena*, *Nostoc*) sia nel suolo (*Rhizobium*, *Azotobacter*), che trasformano l'azoto in ammoniaca (NH<sub>3</sub>), una sostanza facilmente solubile in acqua nella quale si trasforma in ione ammonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>).

*Tabella 23 - Batteri nitrificanti, genere e loro morfologia cellulare*

Reazione	Genere	Morfologia cellulare	Flagelli	Membrane intracito-plasmatiche
da NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> a NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	<i>Nitrosomonas</i>	Bastoncino	Subpolari	Lamellari
	<i>Nitrosospora</i>	Spirale stretta	Peritrichi	-
	<i>Nitrosococcus</i>	Cocco	Peritrichi	Lamellari
da NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> a NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	<i>Nitrobacter</i>	Bastoncino, a forma di pera*	Polari	Lamellari
	<i>Nitrospira</i>	Bastoncino sottile	-	-
	<i>Nitrococcus</i>	Cocco	Polari	Tubolari

Autotrofia obbligata per tutti, e mono per il *Nitrobacter*;

\* Riproduzione per gemmazione; tutti gli altri si riproducono per scissione binaria.

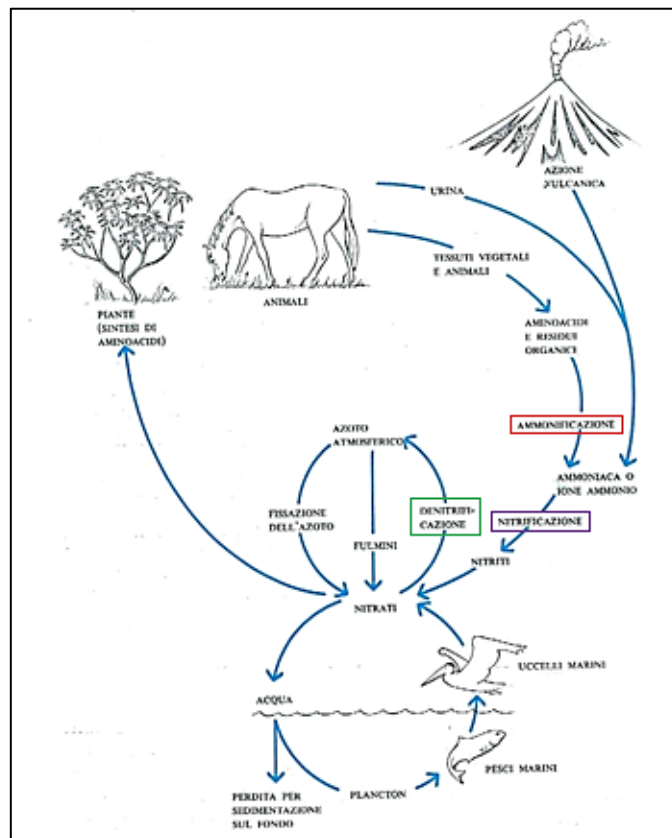
L'azoto così modificato può essere utilizzato nella sintesi degli amminoacidi, delle proteine e degli acidi nucleici (assimilazione e biosintesi).

Nonostante siano di dimensioni ridotte (pochi micron di lunghezza), i batteri responsabili della fissazione sono estremamente diffusi, tanto da fissare annualmente circa 200 milioni di tonnellate di azoto. Una volta fissato, l'azoto diventa disponibile per gli altri organismi, soprattutto attraverso quelle piante (p.e. le leguminose, quali sono fagioli, piselli) che hanno evoluto un rapporto di simbiosi con i batteri azotofissatori. I composti dell'azoto rimangono disponibili anche quando gli organismi azotofissatori muoiono e si decompongono; infatti tali sostanze si sciolgono nell'acqua presente nel suolo e possono essere assorbite dalle piante, l'unica fonte di azoto per gli animali.

I processi successivi (*decomposizione*) portano alla chiusura del ciclo dell'azoto e al ritorno di quest'ultimo nell'atmosfera sotto forma di gas. Durante l'ammonificazione alcuni batteri e

funghi decompongono i prodotti di rifiuto e i resti contenenti azoto di piante e animali. Tali decompositori usano gli amminoacidi e le proteine così liberati per crescere, rilasciando l'eccesso di azoto sotto forma di ammoniaca e di ioni ammonio che vengono in parte assimilati nuovamente dalle piante. Una parte viene invece attaccata da batteri nitrificanti che sottraggono elettroni all'ammoniaca o allo ione ammonio, formando con l'ossigeno ioni nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) che altri batteri nitrificanti possono metabolizzare e trasformare in ioni nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). Tali reazioni prendono il nome di nitrificazione.

Gli ioni azotati così prodotti diventano il substrato ideale per altri batteri (batteri denitrificanti) che, in condizioni di scarsità di ossigeno, usano vie metaboliche anaerobiche durante le quali i nitrati sono usati come accettori finali di idrogeno, al posto dell'ossigeno, e trasformati in ossido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) e azoto gassoso ( $\text{N}_2$ ), che ritornano all'atmosfera.



*Figura 65 - Ciclo dell'azoto.*

#### 5.4 L'azoto atmosferico può essere utilizzato direttamente da pochissimi organismi

L'azoto è una componente essenziale di molte molecole organiche, come acidi nucleici e proteine. Sebbene l'azoto ( $\text{N}_2$ ) costituisca il 78% dell'atmosfera, la maggior parte degli organismi non è in grado di utilizzare tale elemento nella sua forma gassosa. L'azoto atmosferico può essere convertito in una forma biologicamente utilizzabile soltanto da poche specie di batteri

e cianobatteri. Nonostante la sua abbondanza, l'azoto biologicamente utilizzabile costituisce quindi un elemento limitante nella maggior parte degli ecosistemi. È per questo motivo che praticamente tutti i fertilizzanti di uso commerciale contengono composti di azoto biologicamente utilizzabile.

Oltre a non essere in grado di fissare l'azoto atmosferico, gli organismi non possono restituire quest'elemento all'atmosfera attraverso la respirazione. La conversione delle molecole organiche contenenti azoto avviene infatti attraverso numerosi passaggi chimici e ad opera di più organismi. Gran parte dei composti contenenti azoto, come i nitrati e l'ammoniaca, viene in seguito riutilizzata dalle piante. Il movimento dell'azoto attraverso gli organismi ammonta a circa il 95% del flusso complessivo di questo elemento sulla Terra, come riportato in figura 66:

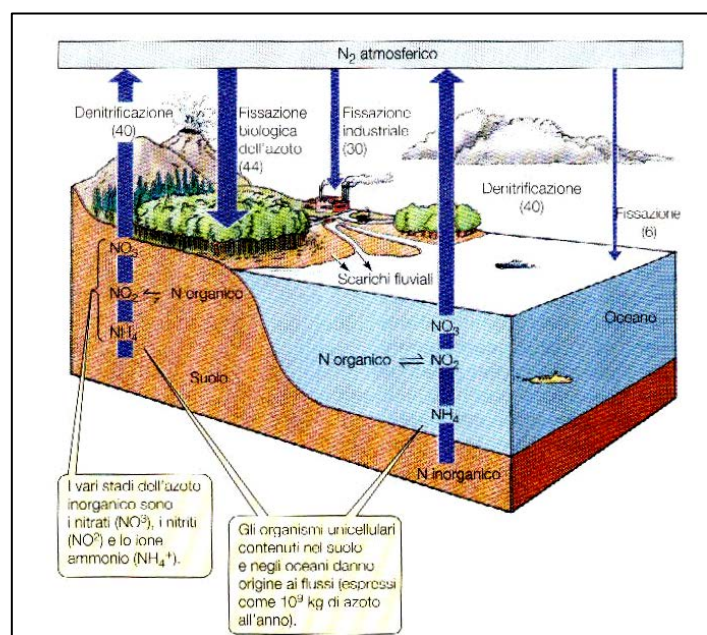


Figura 66 - Il ciclo dell'azoto. I numeri indicano le quantità di azoto (esprese in unità di  $10^9$  kg) contenute negli organismi e nelle varie riserve e la quantità di tale elemento che viene scambiata annualmente fra i vari compartimenti dell'ecosistema. La larghezza delle frecce è proporzionale all'entità del flusso.

La carenza di azoto limita la produzione di sostanze alimentari, pertanto, numerose ricerche sono tese a potenziare la capacità dei microorganismi di fornire composti azotati assimilabili dalle piante. L'eccesso di azoto nelle acque dolci rappresenta una fonte di inquinamento ambientale (eutrofizzazione dei laghi). La produzione da parte dei microorganismi di ossidi di azoto volatili inquinano l'atmosfera.

#### 5.4.1 Fissazione dell'azoto da parte dei microrganismi

I composti azotati delle piante verdi ritornano nel terreno alla morte delle piante (o degli animali che si sono cibati delle piante) e vengono riciclati dagli organismi e microrganismi del suolo, assorbiti dalle radici delle piante in forma di nitrati sciolti nell'acqua e di nuovo convertiti in composti organici. Nel corso di questo ciclo, una certa quantità d'azoto viene "perduta", nel senso che diventa non più utilizzabile da parte delle piante. La principale causa delle perdite di azoto è dovuta alla rimozione delle piante dal suolo. I terreni coltivati spesso subiscono una costante diminuzione del contenuto d'azoto. L'azoto viene perduto anche quando gli strati superficiali del terreno vengono asportati per erosione o quando gli incendi distruggono la vegetazione. L'azoto viene portato via dall'acqua che percola attraverso il suolo e raggiunge le acque sotterranee. Inoltre sono presenti nel suolo numerosi tipi di batteri che in mancanza di ossigeno possono degradare i nitrati liberando azoto nell'aria e utilizzando l'ossigeno per l'ossidazione dei composti del carbonio (respirazione). Questo processo, chiamato denitrificazione, ha luogo nei terreni in cui il drenaggio è scarso e quindi sono poco areati. Come si può facilmente intuire, se l'azoto perduto dal suolo non venisse prontamente sostituito, tutta la vita sulla Terra, alla fine sparirebbe. Nel suolo la perdita di azoto viene controbilanciata mediante il processo di fissazione dell'azoto. La fissazione dell'azoto è il processo mediante il quale l'azoto atmosferico viene incorporato nei composti organici azotati e, quindi, immesso nel ciclo dell'azoto. L'azoto viene tratto in piccola parte dai processi abiotici, come la produzione di ossidi di azoto per interazione tra azoto e altri gas atmosferici; il fulmine è una possibile sorgente di energia. La maggior parte dei processi di fissazione dell'azoto, tuttavia, è attuata da pochi tipi di microrganismi a vita libera (tra i quali in primo luogo alcune cianofitiche e alcuni batteri) e da combinazioni simbiotiche di batteri e piante superiori. Come tutti gli organismi dipendono in definitiva dalla fotosintesi come sorgente d'energia così tutti dipendono dal processo di fissazione dell'azoto.

Ogni anno la superficie terrestre riceve un centinaio di milioni di tonnellate di azoto; di queste, 90 milioni sono di origine biologica, il rimanente 10% è in gran parte rappresentato dai fertilizzanti chimici. Tra i diversi tipi di organismi capaci di fissare l'azoto, i batteri simbiotici sono di gran lunga i più importanti almeno dal punto di vista della quantità di azoto fissato. Il più comune tra i batteri simbiotici fissatori di azoto è il *Rhizobium* che invade le radici delle piante leguminose quali il trifoglio, il pisello, il fagiolo, la veccia e l'alfa-alfa.



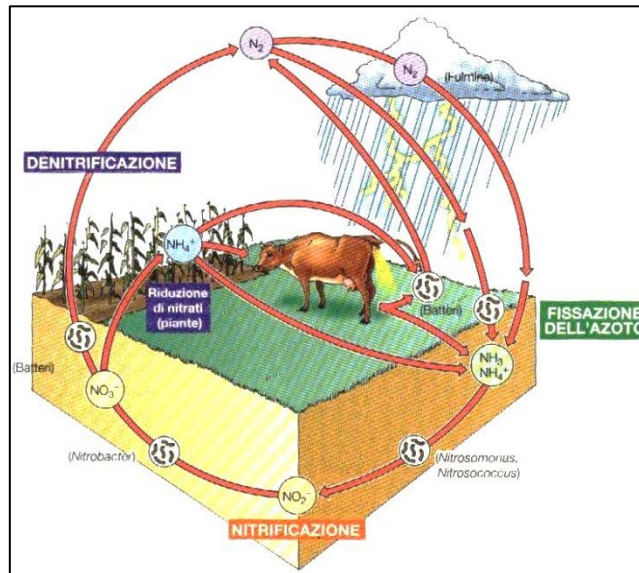


Figura 67 - Ciclo dell'azoto, con i diversi processi ed i tipi di microrganismi.

L'azoto viene reso disponibile in seguito a: rilascio da parte delle popolazioni microbiche azoto-fissanti; distruzione degli azoto-fissatori da parte di altri microorganismi; cattura e digestione degli azoto-fissatori da parte di predatori. In questo modo l'azoto diventa disponibile per gli altri organismi che vivono in quello stesso ecosistema; la fissazione dell'azoto assicura al terreno gli stessi vantaggi dei fertilizzanti agricoli. Sono numerosi i tentativi tesi a potenziare l'attività microbica dei batteri che colonizzano le radici delle leguminose e dei cianobatteri che vivono nelle risaie. Le piante, possono assimilare l'azoto tramite l'assorbimento di alcuni composti azotati (nitriti, nitrati e sali d'ammonio) che, disciolti nell'acqua, giungono fino alle loro radici. Una volta organicato nella fitomassa, l'azoto viene quindi trasferito agli organismi eterotrofi, come gli animali, mediante la catena alimentare.

Nella catena alimentare, l'azoto giunge alle piante per poi essere mangiato dagli erbivori, successivamente prede dei carnivori di dimensioni modeste che vengono poi a nutrire degli altri carnivori di dimensioni generalmente più grosse. In questo modo l'azoto rimane dentro il corpo di alcuni esseri viventi, fino a quando essi rilasciano sostanze organiche, che tramite l'azione dei batteri decompositori viene restituito al terreno e riassorbito dalle piante.

## 5.5 Chimica del ciclo dell'azoto in natura

L'azoto in natura è presente sotto varie forme sia in molecole organiche complesse (proteine) che in forma inorganica: ammoniaca ( $NH_4^+/NH_3$ ), azoto biatomico gassoso presente nell'atmosfera ( $N_2$ ), nitrati ( $NO_3^-$ ) prevalenti nel suolo.

L'azoto atmosferico  $N_2$  è una molecola molto stabile, poco reattiva chimicamente, nonostante ciò in natura può essere convertito in azoto ammoniacale ( $NH_3$ ) in due modi:

- Fissazione chimica: reazione di riduzione attraverso raggi cosmici e fulmini che forniscono l'energia necessaria per far reagire la molecola di  $N_2$  con l'idrogeno dell'acqua e con l'ossigeno dell'aria per formare rispettivamente ossidi di azoto ( $NO_x$ ) e ammoniaca ( $NH_3$ ).
- Fissazione biologica: un particolare enzima presente in alcuni ceppi batterici, la nitrogenasi scinde i legami della molecola  $N_2$  per formare azoto ammoniacale; si diffondono così nell'ambiente piccole quantità di azoto fondamentali per lo svolgersi del ciclo.

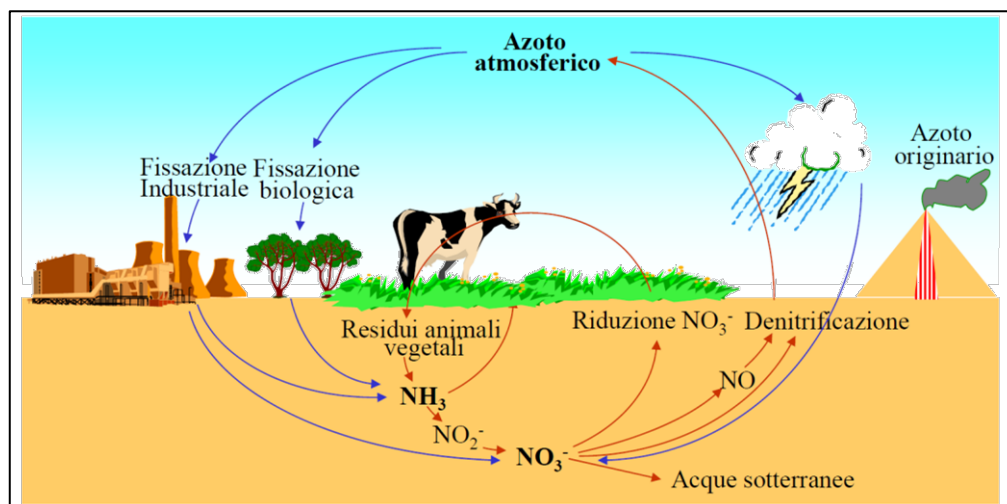
Un'altra fonte di ammoniaca in natura sono gli organismi morti e gli scarti del metabolismo animale (urea).

Batteri ammonizzanti (nel suolo anche funghi) "spezzettano" (idrolizzano) le proteine e gli aminoacidi presenti nella biomassa in via di decomposizione e nelle deiezioni animali.

Questo processo porta all'eliminazione di ammoniaca, acido urico e urea e vengono prodotte anche anidride carbonica ( $CO_2$ ) e acqua.

I batteri ammonizzanti sono deputati solo all'idrolisi delle proteine e non sono da confondere con i batteri nitrificanti che si occupano di trasformare l'ammoniaca.

Nei pesci ossei l'ammoniaca viene eliminata come tale (animali amminotelici), nei vertebrati terrestri come urea (animali urotelici) in uccelli, insetti e rettili come acido urico (animali uricotelici).



*Figura 68 - Ciclo dell'azoto, con le diverse fasi di nitrificazione e denitrificazione.*

L'ammoniaca è tossica per tutti gli organismi viventi, specialmente se presente totalmente nella forma neutra  $NH_3$ , questo succede a valori di pH alcalini (10-12); a valori di pH= 7,5 quasi tutto l'azoto ammoniacale è presente sotto la forma carica  $NH_4^+$  assai meno pericolosa, mentre al pH

caratteristico dell'acquario marino (8,1-8,4) avremo circa il 12% dell'azoto ammoniacale sotto la forma più tossica di  $\text{NH}_3$ .

La trasformazione con cui l'azoto molecolare ( $\text{N}_2$ ) presente nell'atmosfera viene trasformato in ammoniaca ( $\text{NH}_3$ ) può avvenire con un processo industriale, detto di Haber-Bosch.

### 5.5.1 La catena alimentare

Gran parte dell'azoto, presente nel terreno come ioni ammonio o nitrato, entra nella biosfera, dove viene organicato (cioè inserito in molecole organiche) e si muove in un piccolo ciclo formato da piante, animali e batteri. Una parte dell'azoto nitrico viene trasformato, ad opera di batteri denitrificanti specializzati, in azoto molecolare che ritorna all'atmosfera (capacità dei comparti dell'azoto).

Una certa quantità di nitrati viene perduta per migrazione dalle zone terrestri verso i sedimenti oceanici profondi (azoto nei sedimenti), entrando così in cicli geochimici di lunga durata: dai sedimenti l'azoto può ritornare disponibile attraverso le eruzioni vulcaniche (azoto "juvenile").

D'altra parte vi è un minimo, ma continuo rifornimento di azoto al ciclo della biosfera per alterazione delle rocce ignee della litosfera.

### 5.5.2 Geochimica isotopica e ciclo dell'azoto

L'elevato valore della energia di legame fra i due atomi di azoto della molecola  $\text{N}_2$  (226,8 Kcal/mole), che significa grande stabilità di tale molecola, fa sì che l'azoto entri in reazione con difficoltà (alto valore dell'energia di attivazione). Nei suoi composti l'azoto, legato sempre covalentemente, presenta tutti i possibili numeri di ossidazione: da -3 a +5. L'azoto in natura è presente in due isotopi stabili:  $^{14}\text{N}$ , il più abbondante, e  $^{15}\text{N}$ . I due isotopi, avendo proprietà chimiche leggermente differenti, non si distribuiscono nello stesso modo lungo il ciclo dell'azoto.

L'azoto elementare atmosferico, che è considerato lo standard di riferimento per la misura dell'abbondanza isotopica dell'azoto, ha per definizione un valore di  $\delta^{15}\text{N} = 0\text{‰ AIR}$ .

La fissazione dell'azoto è un processo che causa un leggero arricchimento in  $^{15}\text{N}$  dell'azoto organico prodotto: l'azoto che si ritrova negli organismi azotofissatori, e nelle piante leguminose con cui sono in simbiosi, è di circa  $\delta^{15}\text{N} = +1\text{‰ AIR}$  (ovvero il rapporto tra  $^{15}\text{N}$  e  $^{14}\text{N}$  nelle piante è superiore del 1‰ rispetto allo stesso rapporto nell'azoto elementare atmosferico).

Lungo la catena alimentare, ad ogni passaggio l'azoto organico si arricchisce in  $^{15}\text{N}$  di circa il +4‰, così che l'azoto contenuto nei tessuti di un carnivoro potrebbe avere un valore  $\delta^{15}\text{N} = +13\text{‰ AIR}$ . Viceversa la deaminazione degli aminoacidi produce ammonio impoverito in  $^{15}\text{N}$ . Ulteriori impoverimenti si hanno con la nitrificazione ( $\text{NO}_3^-$  risulta impoverito anche del 10‰ rispetto a  $\text{NH}_4^+$ ), e con la denitrificazione ( $\text{N}_2$  impoverito del 16‰ - 20‰ rispetto a  $\text{NO}_3^-$ ).

## 5.6 Mineralizzazione

Una delle tappe fondamentali del ciclo dell'azoto è la mineralizzazione, cioè la conversione dell'azoto organico in composti inorganici assimilabili dagli organismi fotosintetici presenti nel terreno e nelle acque.

### 5.6.1 Nitrificazione

L'ammoniaca, vista la tossicità, deve essere velocemente trasformata, di questo si occupano i batteri nitrificanti diffusi nel suolo e nelle acque.

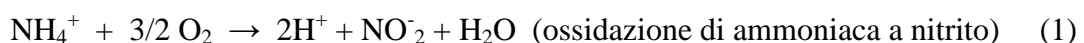
La nitrificazione consiste in una ossidazione dell' $\text{NH}_3$  a nitrito  $\text{NO}_2^-$ , attraverso gli intermedi idrossilammina ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ), protossido di azoto ( $\text{N}_2\text{O}$ ), monossido di azoto ( $\text{NO}$ ), in seguito un altro gruppo di batteri ossida il nitrito a nitrato  $\text{NO}_3^-$ .

Si tratta di un processo strettamente aerobico, avviene solo in presenza di  $\text{O}_2$ , i batteri preposti a tale compito ottengono da queste ossidazioni l'energia necessaria per la sintesi di composti organici sia fissando  $\text{CO}_2$  come sorgente di carbonio (autotrofi obbligati) sia espellendola (eterotrofi).

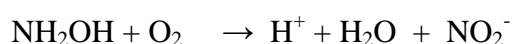
L'energia associata al singolo processo di nitrificazione è molto piccola quindi per le loro necessità metaboliche i batteri devono trasformare grandi quantità di materia.

I batteri nitrificanti più diffusi sono *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*, abitano suolo, acque dolci e marine a pH non inferiori a 5,5 e in un intervallo di temperature tra 5 e 35 °C (temperature ideali 25-30 °C).

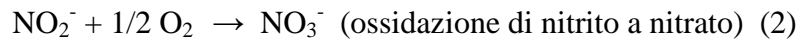
Reazioni di nitrificazione:



Questa reazione avviene in due stadi:



La trasformazione del nitrito a nitrato avviene in un unico stadio:



L'azoto, sotto forma di ione ammonio, può essere ossidato a nitrato nei terreni areati e nelle acque ossigenate. Questa nitrificazione è attuata dai batteri nitrificanti e si svolge in due tappe. La prima reazione è espletata dai *Nitrosomonas* che ossidano l'ammonio a nitrito. Nella seconda tappa, il nitrito è ossidato a nitrato dai *Nitrobacter*. In molti ambienti la quasi totalità dei nitrati è di origine microbica. I nitrati fungono da nutrimento per le piante e per gli altri microorganismi. Una parte può infiltrarsi nelle acque sotterranee che alimentano sorgenti idriche, risultando nociva per i lattanti.

La nitrificazione è sensibile alle variazioni ambientali e quindi viene utilizzata come indice di tale variazione. Se un composto inquinante non inibisce la nitrificazione, è probabile che non modifichi altri processi geochimici espletati da microorganismi.

### 5.6.2 Denitrificazione

La denitrificazione consiste nella riduzione di nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ad azoto molecolare gassoso  $\text{N}_2$ , attraverso gli intermedi nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e protossido di azoto ( $\text{N}_2\text{O}$ ).

I batteri denitrificanti in condizioni anaerobiche (eseguono il processo solo in assenza di  $\text{O}_2$ ) usano il nitrato come accettore di elettroni e ossidano molecole organiche  $(\text{CHO})_n$  a anidride carbonica ( $\text{CO}_2$ ) e acqua. I prodotti gassosi che si formano  $\text{N}_2$  e  $\text{CO}_2$  vengono dispersi nell'atmosfera e così la denitrificazione permette all'azoto di tornare nel ciclo.

Sono denitrificanti alcune specie di batteri dei generi *Pseudomonas*, *Thiobacillus*, *Paracoccus* che possiedono enzimi come la nitratoriduttasi e la nitritoriduttasi la cui sintesi è bloccata in presenza di ossigeno.

Reazione globale, a partire dal glucosio come reagente:



Materia organica di partenza nell'esempio il glucosio, è anche frequentemente impiegata nelle MFC.

I nitrati possono essere ridotti con formazione di composti gassosi. Questa reazione, detta denitrificazione, converte i nitrati in azoto e composti ossigenati; si ha dapprima la riduzione da nitrato a nitrito e poi la riduzione del nitrito con formazione di  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{NO}$  e azoto. La denitrificazione si verifica negli habitat dove prevalgono condizioni anaerobiche e dove la decomposizione dei materiali organici avviene con rapidità (acque profonde e sedimenti). I

microorganismi coinvolti sono batteri anaerobi facoltativi: *Thiobacillus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus* e *Achromobacter*.

Gli ossidi generati dalla denitrificazione sono inquinanti.  $N_2O$  diffonde dal terreno verso l'atmosfera, reagisce con l'ozono riducendo lo strato di ozono. Quindi aumenta l'irradiazione terrestre; le radiazioni UV sono lesive per gli organismi vegetali e animali e sono ritenute cause di neoplasie cutanee.  $NO$  e  $NO_2$  sono tossici per gli animali e sono generati principalmente dall'attività metabolica dei microorganismi. La denitrificazione è una forma di respirazione anaerobica che usa il nitrato come accettore di elettroni in assenza di ossigeno.

### 5.6.3 Nitrogenasi

La reazione chimica complessiva di fissazione dell'azoto è la formazione di  $NH_3$ . Il primo stadio è rappresentato dalla rottura del triplo legame dell'azoto e il secondo dalla sua reazione con l'H. Nei batteri azotofissatori l'H viene fornito dal glucosio, che è il principale prodotto della fotosintesi.

La nitrogenasi è costituita da 2 proteine: componente I (P.M.= 220.000, 4 subunità, contenenti 24 atomi di Fe e 2 atomi di Mo) e componente II (P.M.= 55.000, 2 subunità con 2 atomi di Fe).

Una proteina trasportatrice trasferisce gli elettroni alla nitrogenasi, che li fa reagire con  $N_2$  attraverso il componente II e poi I, dove avviene la riduzione.

Entrambi i componenti proteici si alterano irreversibilmente per contatto con l' $O_2$  atmosferico. Pertanto i microorganismi azotofissatori hanno sviluppato diversi accorgimenti per proteggere dall' $O_2$  i propri enzimi.

## 5.7 I microorganismi azotofissatori anaerobi

I microorganismi azotofissatori anaerobi vivono solo in strati profondi del terreno dove l' $O_2$  è assente; *Klebsiella pneumoniae* facoltativo si svolge con o senza  $O_2$  finché si trova in presenza di  $NH_3$  o nitrato, mentre in presenza di  $O_2$  perde la capacità di svilupparsi su  $N_2$  atmosferico.

Molti cianobatteri possiedono cellule specializzate (eterocisti) a pareti ispessite, che contengono la nitrogenasi e la isolano dal contatto con l' $O_2$  atmosferico. I batteri aerobi hanno sviluppato un sistema enzimatico che riduce l' $O_2$  ad  $H_2O$  appena esso entra nella cellula.

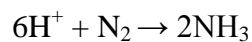
Il sistema più perfezionato di protezione contro l' $O_2$  atmosferico è presente nella simbiosi tra *Rhizobium* e leguminose. L' $O_2$  non può raggiungere i batteri in quanto viene legato da una proteina (leg-Hb) sintetizzata dalla pianta nei noduli radicali e che lo cedono solo quando è

necessario. Questo è il maggiore vantaggio che il *Rhizobium* ricava dalla simbiosi con le leguminose (può realizzare un metabolismo aerobico e proteggere la nitrogenasi dall'O<sub>2</sub>).

Un aspetto rilevante della fissazione dell'azoto è il suo elevato dispendio di energia. La trasformazione di 1 molecola di N<sub>2</sub> in 2 molecole di NH<sub>3</sub> richiede 12-24 molecole di ATP. Molti elettroni si ricombinano con i protoni liberando H<sub>2</sub>.

Una soluzione di questo problema è suggerita dal fatto che alcuni ceppi di *Rhizobium* e il *Frankia alni* contengono un gene hup, che codifica la sintesi dell'idrogenasi, che converte l'H<sub>2</sub> in elettroni e protoni che vengono riciclati alla nitrogenasi. L'idrogenasi potrebbe migliorare l'efficacia energetica dei batteri azotofissatori.

L'azoto è uno dei componenti fondamentali degli organismi viventi. Esso è presente nell'atmosfera terrestre, sotto forma di gas (N<sub>2</sub>), e non può essere utilizzato dalla maggior parte degli organismi. Per venire utilizzato l'azoto deve essere "fissato", cioè legato in un composto chimico, come ad esempio nell'ammoniaca e nei nitrati. Una parte dell'azoto atmosferico viene fissato in composti azotati in modo non biologico da scariche elettriche e da reazioni fotochimiche. Però la fonte più importante di azoto fissato per gli organismi viventi è la fissazione biologica operata da diversi microrganismi. L'azoto viene fissato secondo la reazione:



La reazione viene catalizzata da un enzima, la nitrogenasi. La reazione richiede energia, che viene fornita dall'ATP.

I microrganismi che fissano l'azoto sono sia simbionti di piante superiori, soprattutto leguminose, sia microrganismi liberi. Tra i simbionti ricordiamo i batteri appartenenti al genere *Rhizobium*. Gli azotofissatori liberi possono essere aerobi eterotrofi come *Azotobacter*, aerobi fotoautotrofi come le alghe verdi-azzurre, anaerobi eterotrofi (batteri del genere *Clostridium*) o anaerobi fotoautotrofi, come i batteri dei generi *Chromatium* e *Rhodospirillum*, o infine anaerobi facoltativi come *Klebsiella pneumoniae*.

## Capitolo 6

### Impianti industriali con MFC

Un impianto industriale di MFC è un sistema bioelettrochimico che genera energia elettrica sfruttando le fermentazioni anaerobiche, alcolica o metanigena. Una delle prime applicazioni a livello industriale delle MFC potrebbe essere lo sviluppo di reattori in scala pilota nelle ubicazioni industriali dove una elevata qualità e sicurezza dal punto di vista della disponibilità ed affidabilità dell'alimentazione è messa a disposizione. L'alimentazione del reattore con le acque reflue che sono state trattate ed emesse dai digestori sono buoni candidati. Dall'esame del potenziale per la generazione dell'elettricità in quel dato sito, consideri un industria alimentare che produce 7500 kg/giorno di reflui organici sotto forma di acque di scarico [42]. Questo rappresenta una capacità di 950 kW di potenza, o 330 kW se viene assunta una efficienza del 30%. Per raggiungere una potenza di  $1 \text{ kW/m}^3$ , c'è bisogno di un reattore di  $350 \text{ m}^3$ , il quale costerebbero approssimativamente 2,6 Milioni di Euro [57], a moneta corrente.

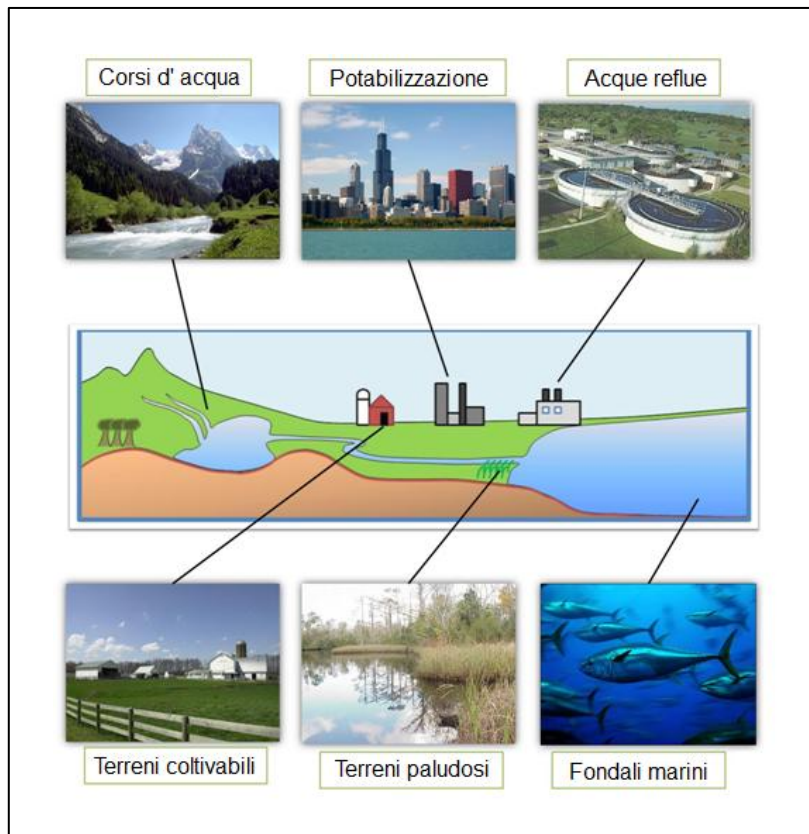


Figura 69 - Tutte le alimentazioni sperimentate per le MFC.



L'energia elettrica prodotta, calcolata alla tariffa base di 0,1 Euro per kWh, ammonta approssimativamente a 0,3 milioni di Euro all'anno, con un tempo di ritorno di 10 anni senza considerare le perdite di energia o i profitti comparati alle altre tecnologie di tipo aerobico.

Negli ultimi cinque anni, i progetti sperimentali di MFC negli impianti di trattamento dell'acqua reflua si stanno moltiplicando, tuttavia, allo stato dell'arte, le potenzialità delle altri sistemi, fra cui le celle a combustibile chimiche, e gli altri sistemi da FER fra cui i sistemi di accumulatori e gli impianti fotovoltaici, continuano ad essere di un ordine di grandezza superiore, nonostante fosse già stata avanzata l'ipotesi di superare il divario nel 2008. Il trattamento delle acque reflue può essere effettuato in maniera più economica se si accompagna con la produzione di idrogeno, metano e di elettricità.

### 6.1 Impianto pilota di celle a combustibile microbiche alla Foster's Brewery, in Australia.

Nel maggio 2007 l'Università di Queensland in Australia, ha completato il suo prototipo di pila a combustibile microbiologica, come risultato della cooperazione con la Fosters Brewing Company. Il prototipo, un modello da 10 litri, converte l'acqua di scarto della birreria in anidride carbonica, acqua pulita ed elettricità.



*Figura 70 - Impianto pilota di celle a combustibile microbiche alla Foster's Brewery, Australia. Il reattore MFC è costituito da 12 moduli tubulari, e nella figura se ne distinguono 6 tubi su 2 file, dell'altezza di 3 metri, con il catodo all'aria; ha un volume complessivo di circa 1 m<sup>3</sup> ed è già in grado di erogare 1 kW trattando 20 kg di COD da refluo al giorno [146].*

Con il prototipo dimostrato funzionante, si progetta di costruire una versione da 660 galloni per la birreria, che si stima in grado di produrre 2 kW di potenza elettrica. Anche se è una piccola quantità di energia, la produzione di acqua pulita è il punto più importante per l'Australia, che sta vivendo il suo peggior periodo di siccità in 100 anni.

Il Advanced Water Management Centre ha costruito una celle a combustibile microbica in scala pilota. L'impianto pilota in scala è stata costruito sul sito della fabbrica di birra Foster in Yatala, Queensland (Australia). Le acque reflue delle birrerie vengono utilizzate come alimentazione e poi depurate. Nella configurazione attuale, il reattore ha un volume di circa 1 m<sup>3</sup> e si compone di 12 moduli. Vengono utilizzati degli elettrodi in fibra di carbonio per gli anodi ed i catodi, a forma di spazzola. In una seconda fase, saranno costruito 12 moduli aggiuntivi di diverse tipologie.

I ricercatori hanno effettuato diversi mesi di prove prima di fare una corretta valutazione dei benefici di questa tecnologia.

La MFC tubolare di 12 moduli, disposti su 2 file di 6 moduli ciascuna, attualmente installata presso la fabbrica di birra Foster in Yatala (Queensland, Australia). L'altezza di un modulo è di circa 3 m. Due ricercatori, direttori del progetto di ricerca sono in piedi di fronte alla MFC pilota ed a sinistra c'è Jurg Keller e a destra Korneel Rabaey [130].



*Figura 71 - Il reattore con i due ricercatori Jurg Keller e Korneel Rabaey, dell'Università di Queensland in Australia.*



*Figura 72 - Una immagine del reattore, prima di essere alimentato.*

Il reattore impiega come elettrodi anodici delle spazzole in fibra di carbonio dentro ciascun tubo del reattore, con il flusso dell'alimentazione che sale attraverso la parte interna del tubo e viene mandato nel lato esterno del reattore che è ricoperto con elettrodi catodici di spazzole di fibre di carbonio. Il progetto è simile ad un modello testato in laboratorio, che aveva la ferricianide come catolita.

### 6.1.1 Il circuito idraulico

La figura 66 riporta uno schema completo del circuito idraulico dell'impianto che comprende anche le pompe di alimentazione e di ricircolo dell'alimentazione:

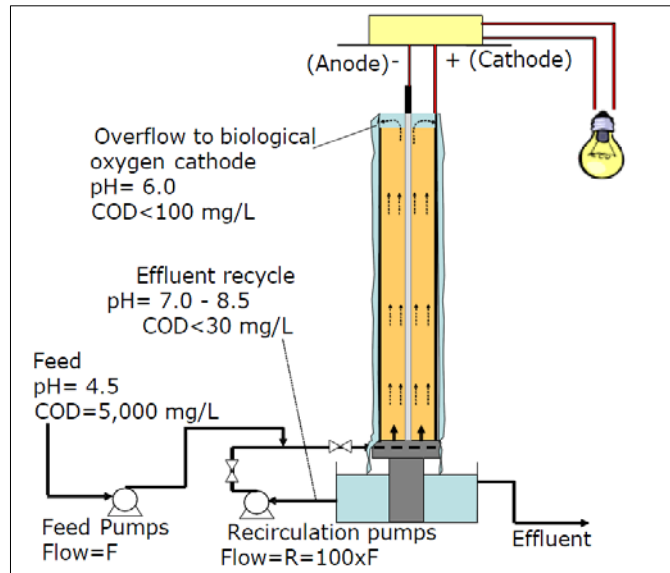


Figura 73 - Schema di tutte le parti idrauliche ed elettriche costituenti un singolo tubo dell'impianto, con i dati principali.

Questa immagine offre una panoramica completa dell'impianto pilota in scala con la sala di controllo (anteriore) installata presso il birrificio e l'altra due ricercatori, fra cui il ricercatore italiano Stefano Freguia mentre eseguono i prelievi delle analisi delle acque depurate.



Figura 74 - Immagine con la visione d'insieme dell'impianto con il manufatto della sala di controllo con le pareti di colore bianco, posta nelle immediate vicinanze del reattore.



Figura 75 - Fasi di prelievo dell'effluente, per le analisi chimiche e microbiologiche.

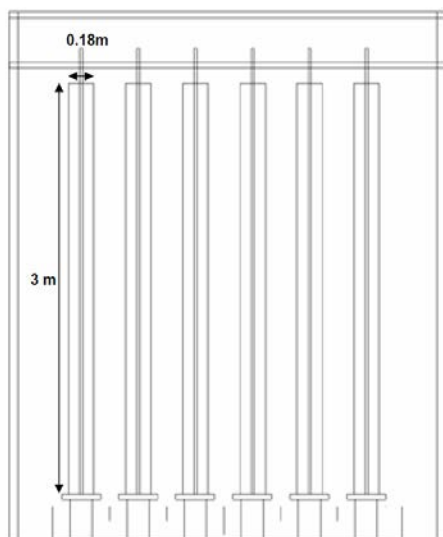
I risultati ottenuti, in funzionamento continuo sono:

- Corrente massima: 2 A, con un potenziale di cella di 400 mV;
- COD rimosso in continuo: circa  $0,2 \text{ kg COD m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ ;
- Densità di Potenza:  $0,5 \text{ W m}^{-2}$ , riferita all'area della membrana e  $8,5 \text{ W m}^{-3}$  riferita al volume del reattore;
- Il funzionamento del ricircolo è essenziale per stabilizzare il pH.

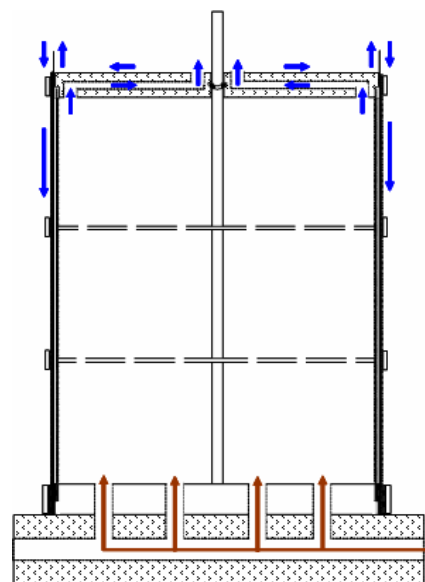
ed i dati specifici per la parte elettrica del reattore sono:

- Conducibilità dell'elettrodo e corrente al collettore: resistenza di  $0,1 \Omega$  a 2 A con un potenziale di 0,2 V, con il flusso in caduta;
- Potenza elettrica del convertitore per generare la potenza utile alla rete: conversione da 0,2 - 0,5 V a 12 V in single step.

Per il progetto sono determinanti le dimensioni del reattore e il percorso del flusso dell'alimentazione, sospinta dalle pompe; nella figura seguente viene riportato il diametro esterno di ciascun tubo con le quote dell'altezza dell'elettrodo ed a fianco invece il percorso del fluido all'interno della camera anodica, il quale dopo aver percorso in salita la parte interna del tubo deve lambire l'elettrodo catodico posto esternamente alla camera anodica, separati da una membrana.



*Figura 76 - Schema dell'impianto con le quote d'ingombro del singolo tubo.*



*Figura 77 - Schema del flusso dell'effluente all'interno di un tubo e le vie di alimentazione poste nella parte inferiore.*

Un altro aspetto che vogliamo documentare è la realizzazione degli elettrodi per la camera anodica e quella catodica;



Figura 78 - Un elettrodo anodico completo di tutte le sue spazzole, in totale sono 6 per ciascun tubo.



Figura 79 - Una visione d'insieme degli anodi di tutti i tubi, privi dei catodi non ancora installati.



Figura 80 - Costruzione degli elettrodi anodici, con l'uso delle fibre di carbonio, ancora avvolte nei supporti di cartone e che costituiranno le spazzole.



Figura 81 - Una singola spazzola che serve a realizzare l'elettrodo anodico di un singolo tubo.



Figura 82 - Una spazzola montata sul suo sostegno in acciaio e che viene collegata al collettore dell'elettrodo anodico a forma di disco, di un singolo tubo.



Figura 83 - Immagine dei 2 elettrodi di un singolo tubo, dove la rete esterna costituisce il catodo mentre le spazzole interne costituiscono l'elettrodo anodico.



Figura 84 - Immagine con tutti i tubi già montati sui supporti comprensivi di elettrodi anodici ma mancanti di quelli catodici.



Figura 85 - Una fotografia della vista laterale dell'impianto, dalla quale si distinguono le 2 pompe, quella di ricircolo e quella di alimentazione poste alla base.

La crescita del biofilm si è osservata all'interno dei tubi nei quali passa il fluido di alimentazione, che porta ad una ostruzione del tubo stesso e di conseguenza ad una riduzione della portata dell'alimentazione ma anche sulla superficie esterna del tubo e si deve indagare meglio nelle superfici interne, che costituiscono gli elettrodi anodici.

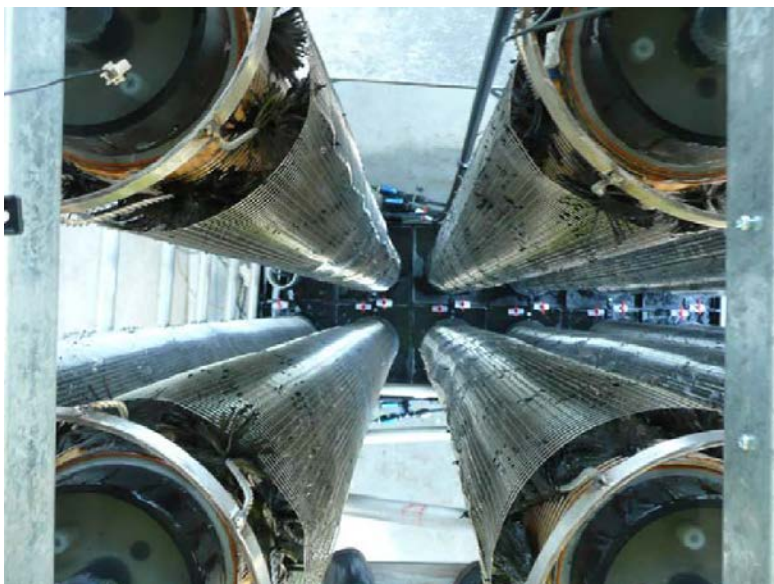


Figura 86 - Una fotografia dei tubi, presa dal basso da cui si possono distinguere i dischi degli elettrodi anodici ed in altro a sinistra un collegamento elettrico al collettore realizzato con un morsetto di colore bianco; nella parte in basso ci sono le valvole che permettono o meno l'alimentazione di ciascun tubo.



Figura 87 - Una vista totale dell'impianto che ci fornisce una visione del reale ingombro.



Figura 88 - Immagine che mette in luce gli elettrodi catodici, per 11 tubi mentre un solo tubo ha già il rivestimento esterno plastico di colore bianco.

Il progetto di ricerca è stato finanziato dal Governo del Queensland con un Fondo per l'innovazione, per l'energia sostenibile Grant (circa 115.000 USD) e una borsa di studio dell'Australian Research Council (per poco più di 1 milione di USD); il prototipo di MFC realizzato dall'Università di Queensland è stato di 10 litri, o 2,6425 galloni US, ma il reattore finale, che è stato installato nella fabbrica di birra Foster's, tiene 660 galloni. La MFC produrrà 2 kW di potenza, sufficiente per alimentare una casa media, ed è operativo presso la fabbrica di birra dal Settembre 2007.

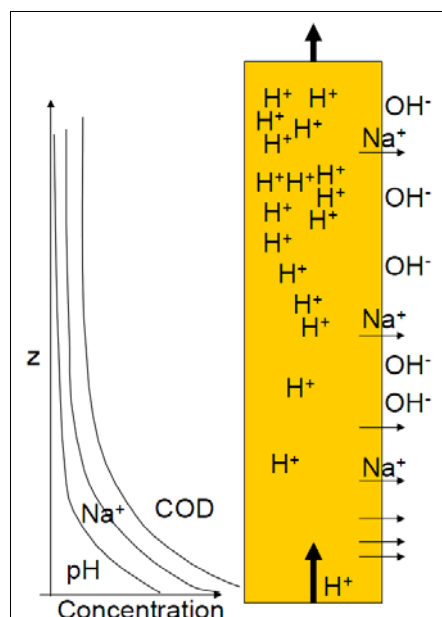
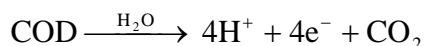


Figura 89 - Schema della salinità, del pH e del COD lungo l'altezza di ogni singolo tubo.

L'impianto impone il controllo dei gradienti di pH, dell'alcalinità ed inoltre dei limiti alla salinità; nello schema che segue vengono riportati gli andamenti del pH, del COD e dell' $\text{Na}^+$  in funzione della quota del tubo, mentre i valori misurati sono i seguenti:

- COD delle acque reflue della birreria = 50-500 m-eq  $\text{L}^{-1}$
- Forza del tampone (alcalinità)= 5-10 m-eq  $\text{L}^{-1}$
- Salinità = 5-10 m-eq  $\text{L}^{-1}$



## 6.2 La MFC Mud Watt

Una MFC realizzata e attualmente in commercio si chiama "MudWatt" ed è prodotta dall'azienda canadese KeegoTech Technologies, LLC [149]; una immagine del sistema d'insieme è quello in figura 90, mentre nella modalità di funzionamento da alimentatore nella figura 91:



Figura 90 - Immagine della MFC MudWatt.



Figura 91 - MFC MudWatt mentre alimenta una stazione per il monitoraggio della temperatura e della pressione.

ed in figura 92 sono riportate tutte le parti che lo compongono, con i relativi costi, in USD:




				
MudWatt™ HACKER BOARD	MudWatt™ ANODE	MudWatt™ CATHODE	MudWatt™ VESSEL	MudWatt™ POWERBOOST GRANULES
\$9.95	\$14.95	\$14.95	\$4.95	\$6.95

Figura 92 - Parti di ricambio, con i relativi prezzi, della MudWatt.



Il costo complessivo della MudWatt è di 44,95 USD.

La MFC MudWatt può essere alimentata dai fanghi naturali del terreno ed ha la struttura di una MFC monocamera, con l'elettrodo anodico a forma granulare di grafite e quello catodico a forma di disco. Lo scambio degli elettroni avviene ad opera dei batteri contenuti nel fango e una volta che l'elettrone è stato trasferito all'anodo, esso scorre poi al catodo, dove reagisce con una molecola di ossigeno ed un protone, che è un sottoprodotto del metabolismo elettrogenico, per formare acqua (come è raffigurato nel disegno in figura 93):

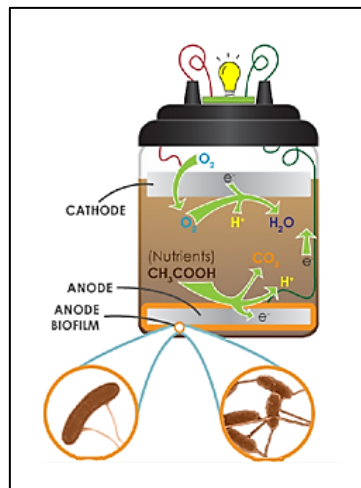


Figura 93 - Comunità microbica nella MFC MudWatt.

La differenza della concentrazione di ossigeno è quella che crea la forza elettromotrice di una MFC, e i due elettrodi sono circondato da ambienti con potenziali redox molto diversi; viene così generata una corrente elettrica, dalla quale può essere estratta la potenza elettrica applicando semplicemente un carico (per esempio una luce a LED) collegato tra i due elettrodi.

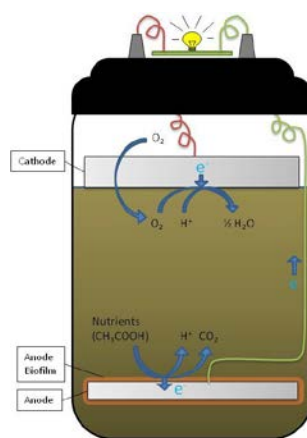


Figura 94 - Trasformazioni nella MFC MudWatt.

Il trasferimento degli elettroni, dalle comunità endogene può avvenire nei modi qui sotto elencati e raffigurati in figura 95:

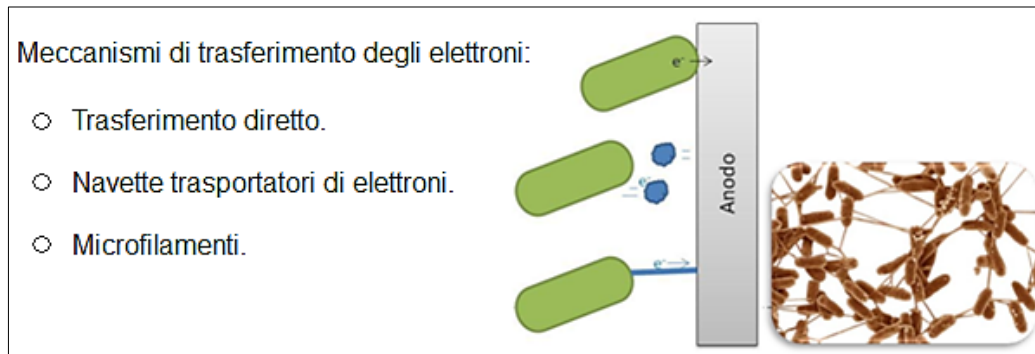


Figura 95 - Elenco dei tre meccanismi di trasferimento degli elettroni all'elettrodo anodico, con a fianco delle raffigurazioni schematiche.

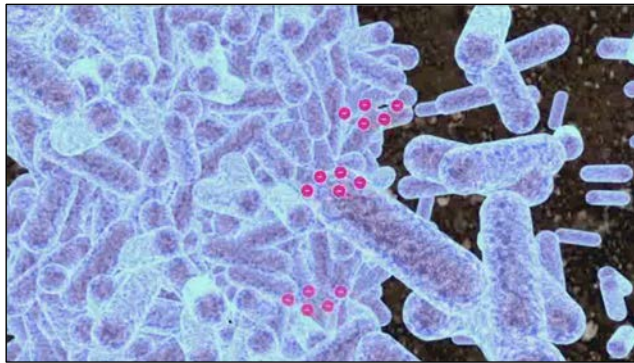
Come viene raffigurato il primo modo di trasferire gli elettroni è quello “diretto” nel quale dei batteri elettrogenici estraggono gli elettroni dal substrato, costituito da una biomassa o da altra matrice organica, che fermentando in ambiente anaerobio li cederanno agli accettori extracellulari come può essere la superficie dell'elettrodo anodico; il secondo modo avviene impiegando delle altre biomolecole, dette navette trasportatori di elettroni che trasferiscono gli elettroni all'anodo ed infine il terzo avviene utilizzando delle appendici conduttive, denominate “microfilamenti” che sono sviluppate dai microbi e tendono a formare il biofilm, come è raffigurato nel riquadro a fianco nella figura, e mostrato qui più nel dettaglio.



Figura 96 - Una comunità microbica elettrogenica connessa da una fitta rete di microfilamenti.

La MFC MudWatt risponde in fondo agli stessi principi di funzionamento delle MFC, e prevede un terreno di coltura anodico come il suolo ricco di nutrienti, l'inoculo di microrganismi, e una membrana di scambio protonico (PEM). L'anodo è posizionato ad una certa profondità all'interno del suolo, mentre il catodico resta sulla superficie del suolo e così è esposto all'ossigeno nell'aria. In tutti i tipi di suolo sono presenti al loro interno, dei diversi consorzi di microbi naturali con inclusi i microbi elettrogenici di cui hanno bisogno le MFC, e sono pieni di zuccheri complessi e di altri nutrienti che si sono accumulati in milioni di anni di decadimento di materiale vegetale ed animale. Inoltre, i microbi aerobici (che consumano ossigeno)

costituiscono nel suolo come un filtro per l'ossigeno, proprio come i materiali costosi delle PEM usate nei sistemi MFC di laboratorio che sono la causa del potenziale redox del suolo, che decresce con l'aumento della profondità.



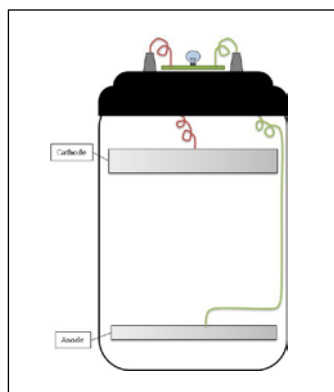
*Figura 97 - Animazione della generazione e del trasferimento degli elettroni, da parte dei batteri, nella MFC MudWatt.*

Questa è la causa della tensione resa disponibile dalla MFC MudWatt, per alimentare un carico esterno. L'anodo è posizionato ad una profondità al quale si avrà il potenziale redox più negativo che esiste e che varia dipendendo dalla composizione del suolo ma tipicamente nell'intervallo fra 5 cm a 15 cm. L'elettrodo catodico, che si trova in cima al suolo, è fatto di materiale poroso di carbone che lascia permeare l'ossigeno che è necessario per far avvenire la reazione chimica.

Noi possiamo sfruttare queste caratteristiche inserendo un elettrodo in queste colture di batteri e vedendo che invece di passare gli elettroni fra di loro, i batteri li passano all'elettrodo.

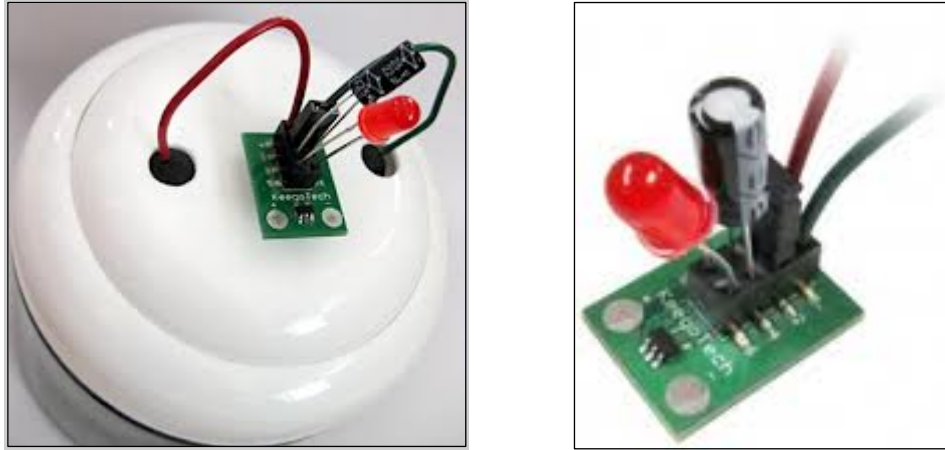
### 6.2.1 I componenti che formano il circuito elettrico

I componenti che formano il circuito elettrico della MFC MudWatt sono evidenziati qui di seguito; abbiamo l'elettrodo anodico, posto nel fondo del contenitore e l'elettrodo catodico posto sotto il coperchio:



*Figura 98 - Circuito elettrico della MudWatt.*

Ci soffermiamo ora sul circuito elettronico posto all'esterno della camera che serve ad attuare l'adattamento con il circuito interno della MFC MudWatt; in pratica si varierà il valore del carico esterno e di conseguenza avremo una variazione della potenza prodotta, in maniera non lineare ma parabolica.



*Figura 99 - Il circuito elettronico già montato su una MudWatt, a sinistra e un dettaglio del solo circuito elettronico, a destra.*

Le MFC generano il valore massimo della potenza quando sono collegate ad una resistenza esterna che è uguale alla sua resistenza interna. Questa resistenza interna è una funzione della capacità degli ioni di diffondere attraverso il terreno di coltura delle MFC dall'anodo al catodo. Più è basso il valore di questa resistenza interna, e maggiore potenza le MFC produrranno. Ci sono molti modi di ridurre questa resistenza, come aggiunge elettroliti (sali) al terreno di coltura, e riducendo la distanza tra l'elettrodo dell'anodo e quello del catodo, comunque assicurandosi che ci sia abbastanza distanza per avere un gradiente di ossigeno sufficiente. Per avere più i suggerimenti su come minimizzare la resistenza interna e massimizzare la potenza con una MFC MudWatt, si può visitare il forum dell'azienda. Per trovare la resistenza interna di una MFC MudWatt, e quindi il suo valore massimo della potenza erogata, si deve attuare la tecnica "potenziometrica" (anche chiamata "spazzolata"). Questa consiste nella lettura della tensione prodotta dalla MFC MudWatt su delle resistenze variabili. Per una maggior convenienza, la MFC MudWatt ha un circuito elettronico che include una serie di 5 resistenze che possono essere inserite e disinserite facilmente. Le istruzioni per compiere una "spazzolata" sono contenute nell'opuscolo delle istruzioni incluso. Una volta che è stata compiuta una singola "spazzolata" sulla MFC MudWatt, si sarà in grado di generare la curva di potenza, come quella mostrata alla destra, applicando semplicemente la legge di Ohm:

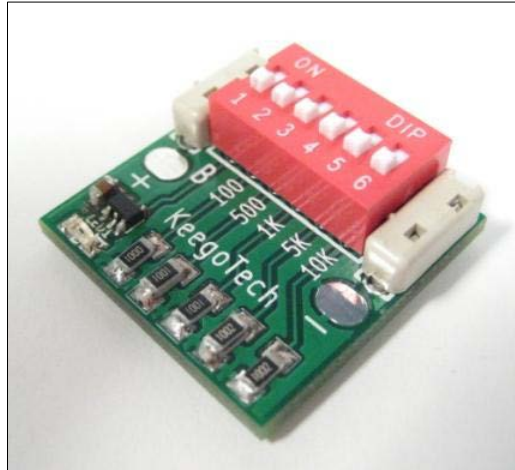
$$P = \frac{V^2}{R}$$

P=potenza (W)

V=tensione (V)

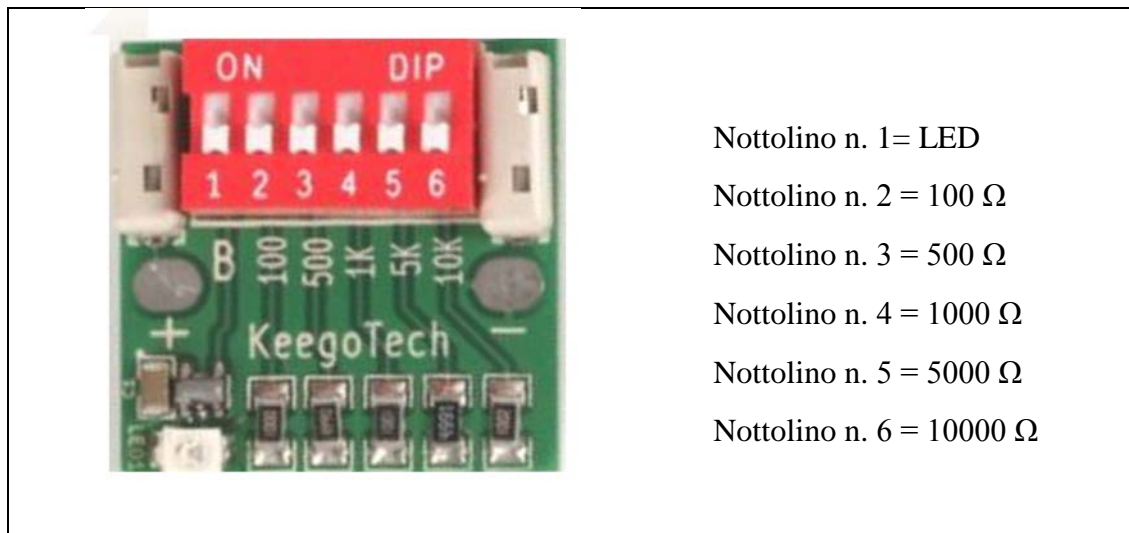
R=resistenza (Ohm)

La “spazzolata” con i valori di resistenza presenti nel circuito elettronico fornito in dotazione, raffigurato qui di seguito:



*Figura 100 - Circuito elettronico esterno fornito in dotazione con la MFC MudWatt.*

E nell'immagine frontale, qui di seguito riportata si distinguono le resistenze esterne da inserire e disinserire con i nottolini di colore bianco, in totale 6, i cui valori sono riportati nella tabella a fianco.



*Figura 101 - Immagine frontale del circuito elettronico esterno fornito in dotazione con la MFC MudWatt, ed a fianco la tabella con i valori delle resistenze esterne collegate ai 5 nottolini, mentre il numero 1 la collegherà ad un LED.*

Un esempio della curva di potenza ottenuta con un terreno comune, è quella riportata nel grafico seguente:

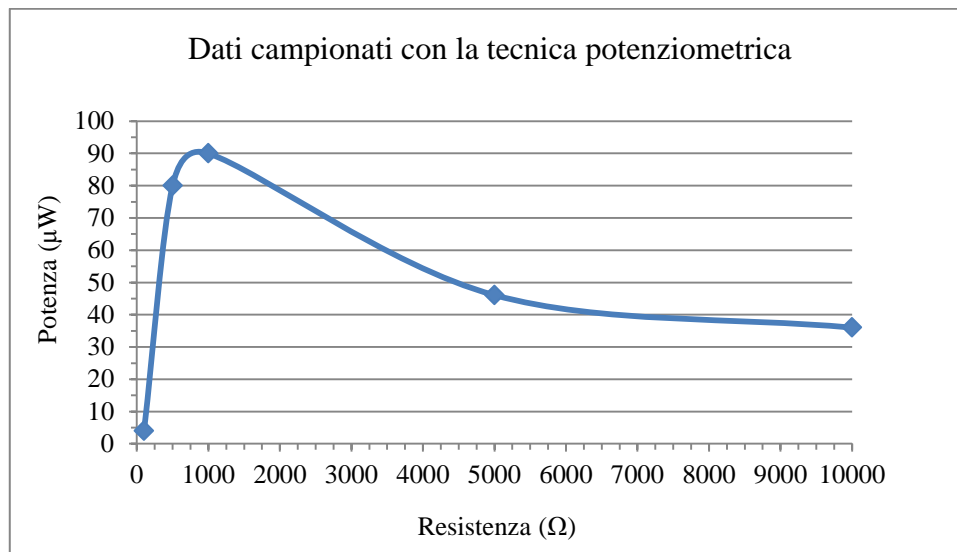


Figura 102 - Grafico della curva di potenza di una MFC MudWatt, ottenuta con i valori delle resistenze esterne presenti nel circuito elettronico esterno, fornito in dotazione.

La tensione delle MFC, in generale è determinata dalla differenza dei potenziali redox tra le due distinte camere elettrodeiche. Quando una comunità microbica si forma e comincia la respirazione sulla superficie dell'elettrodo anodico, le biomolecole si cominciano ad accumulare attorno all'anodo. Questo accumulo di microrganismi e altri sottoprodotti metabolici sono la causa del potenziale elettrico dell'anodo, che si stabilizza tipicamente tra -0,1 V e -0,4 V vs SHE (l'elettrodo standard di idrogeno). Il secondo elettrodo, il catodo è posizionato in un ambiente più ossidante, come può essere quello dell'acqua areata. La presenza di ossigeno disciolto dà al catodo un più alto potenziale elettrico, tipicamente da 0,4 V a 0,8 V vs SHE. La tensione di lavoro della MFC è semplicemente il potenziale redox dell'anodo sottratto al potenziale del catodo. Si dovrebbe notare che la MFC ha una tensione teorica massima che può essere realizzata tra i due elettrodi, approssimativamente 1,2 V dato che il potenziale redox di riduzione delle biomolecole ha un minimo di -0,4 V vs. SHE ed il potenziale redox dell'ossigeno è di 0,8 V vs. SHE. Il potenziale redox del suolo si porta tipicamente a -0,2 V vs. SHE. La tensione tipica realizzata in una MFC MudWatt con il terreno varia da 0,2 V a 0,6 V vs. SHE per il catodo e -0,2 V a 0,0 V vs. SHE per l'anodo. La massima tensione a vuoto registrata da una MFC MudWatt è stata di 0,92 V alimentata soltanto dal suolo. Questi parametri, per la MFC MudWatt sono raffigurati di seguito, in figura 103 nella quale viene riportata la curva dell'andamento della f.e.m. in funzione del numero dei giorni dopo il suo completo assemblaggio; si distingue una fase iniziale detta "fase di latenza" della popolazione batterica che sarà più o meno breve a

seconda delle condizioni, seguita poi dall'altra fase della "crescita esponenziale", molto rapida nella quale le cellule batteriche aumentano di numero in poco tempo; il valore a cui si porta la f.e.m. della MFC MudWatt, dopo aver raggiunto le condizioni stazionarie, è di 0,6 V dopo 7 giorni di funzionamento.

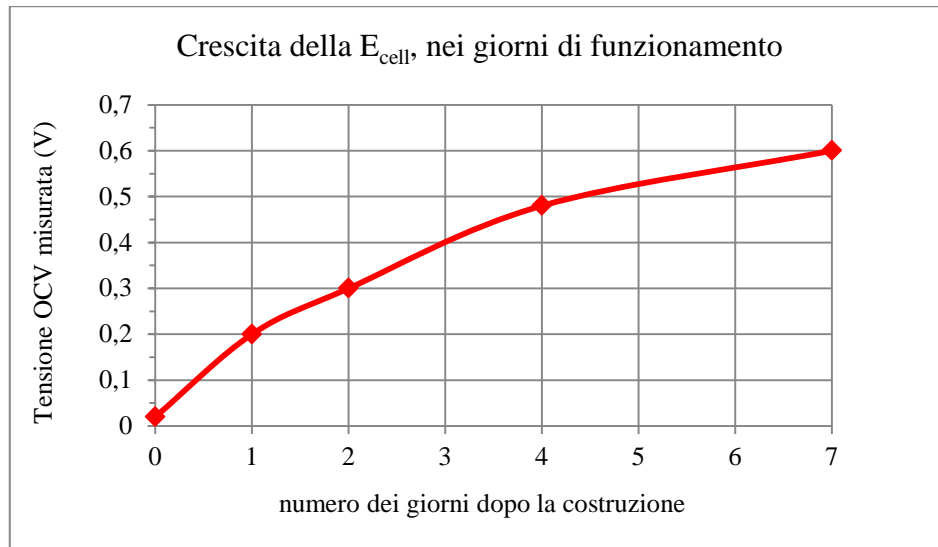


Figura 103 - Curva che raffigura la crescita della tensione a circuito aperto OCV, dai primi giorni dopo la costruzione della MFC MudWatt.

L'andamento della potenza prodotta nel tempo, nei diversi giorni di funzionamento della MFC MudWatt è riportato in figura 104, nella quale si distingue una fase iniziale di latenza della coltura microbica che è durata 7-8 giorni e poi una fase più stazionaria, al valore massimo della potenza, dall'ottavo giorno in avanti, ad un valore di potenza massima di 100  $\mu$ W. Questo valore di potenza è stato ottenuto su un valore della resistenza esterna di 1000  $\Omega$ , cioè posizionando il nottolino del circuito elettronico esterno sulla posizione No. 4, che è anche il valore ricavato dalla curva in figura 102 alla quale si è assistito al massimo valore di potenza trasmessa, il MPP (Maximum Power Point) in base alla teoria dell'adattamento del massimo trasferimento di potenza al carico esterno. Il limite massimo di monitoraggio della MFC MudWatt è stato di 28 giorni, alla quale dovrebbe essere seguita la fase di morte della coltura batterica dovuta ad una minore disponibilità di nutrienti o anche all'aumento della concentrazione delle sostanze di rifiuto nel terreno, ma sono terminate le misurazioni oppure si è provveduto ad inserire nuovo terreno.

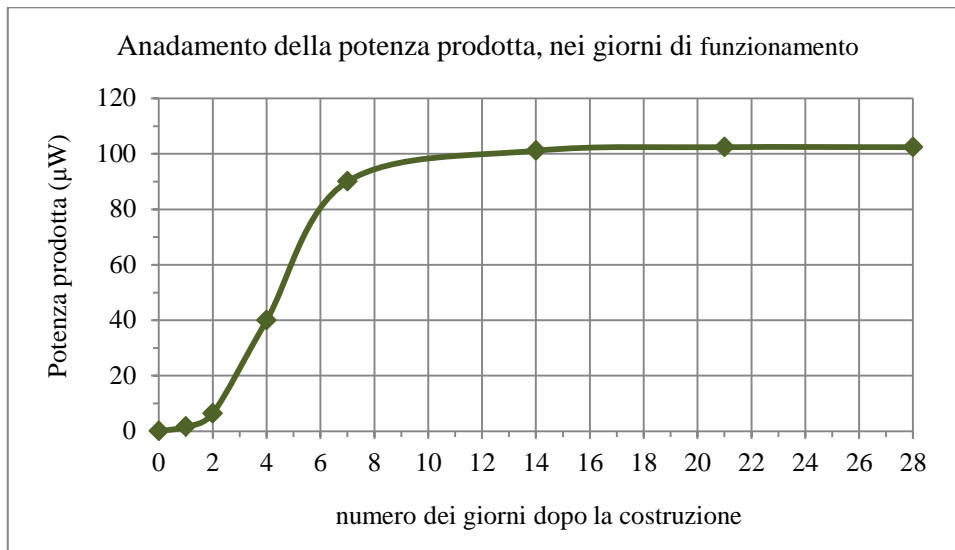


Figura 104 - Andamento della potenza prodotta, in funzione del numero dei giorni di funzionamento.

Un'altra curva che viene considerata è quella che fornisce l'andamento della CCV, la tensione ai capi di un carico esterno sulla quale sarà chiusa la MFC MudWatt costituito da tutte resistenze elettriche che si trovano sul circuito elettronico esterno, in pratica inserendo tutti i n. 2, di valore minore, pari a 100  $\Omega$ , poi il n. 3 pari a 500  $\Omega$ , e poi tutti gli altri ed i 5 valori ottenuti sono quelli riportati in fig. 105:

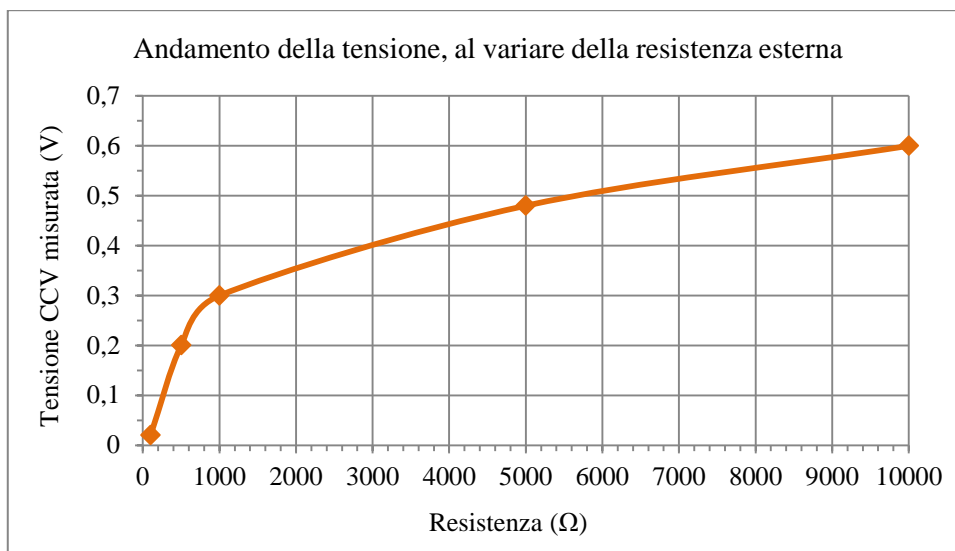


Figura 105 - Curva dell'andamento della CCV al variare della Resistenza esterna.

Il grafico seguente, della curva di polarizzazione, rappresenta l'andamento della tensione a circuito chiuso CCV della MFC MudWatt, e si può identificare anche con lo sviluppo del biofilm



sulla superficie dell'elettrodo, nei giorni successivi a quello di inizio dell'alimentazione con il terreno, che è fissato come giorno zero nel grafico seguente, ma influirà anche il tempo di crescita della comunità batterica sugli elettrodi di grafite. Facendo variare tutti i valori delle resistenze elettriche esterne se ne registrano i valori della tensione CCV e della corrente I, come vengono riportati in figura 106:

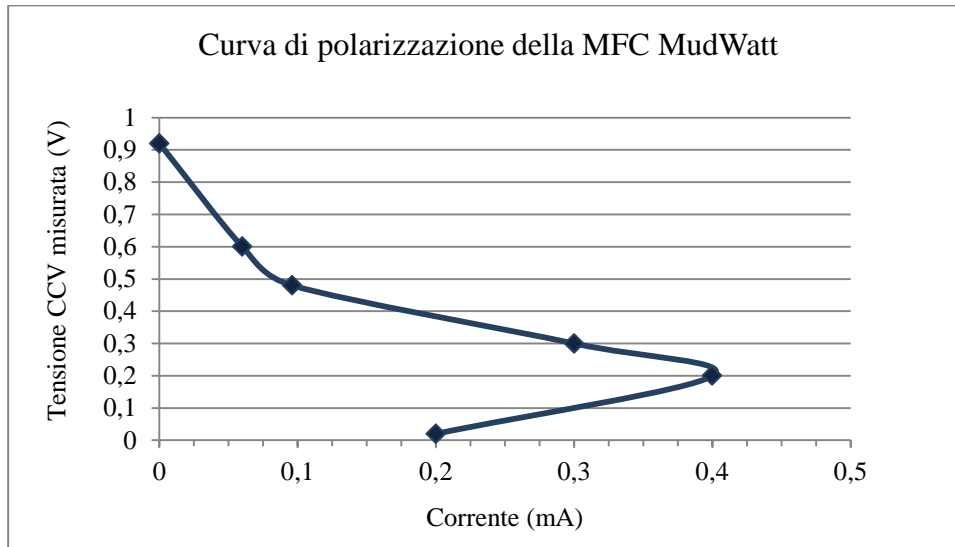


Figura 106 - Curva di polarizzazione della MFC MudWatt.

si evidenzia un valore della OCV pari a 0,92 V, che è il punto corrispondente ad un valore di corrente nulla, e che si legge direttamente sull'asse delle ordinate; si nota anche una regressione nel valore della tensione per il valore più grande della corrente, dovuto probabilmente ad un esaurimento dei nutrienti del terreno della MFC MudWatt. Nel grafico manca il valore della corrente quando la resistenza esterna è nulla, perché questa misura non è stata effettuata.

La curva di potenza è quella che rappresenta i valori della potenza generata dalla MFC MudWatt, al variare della resistenza esterna; è stata determinata andando a misurare i valori della CCV ai capi di ciascuna Resistenza esterna, passando per tutti i valori messi a disposizione dal circuito elettronico esterno ottenuti selezionando i 6 nottolini, dal valore minore al più grande; si è potuta calcolare la potenza prodotta dalla formula sopra riportata e la curva ottenuta è quella riportata in figura 107:

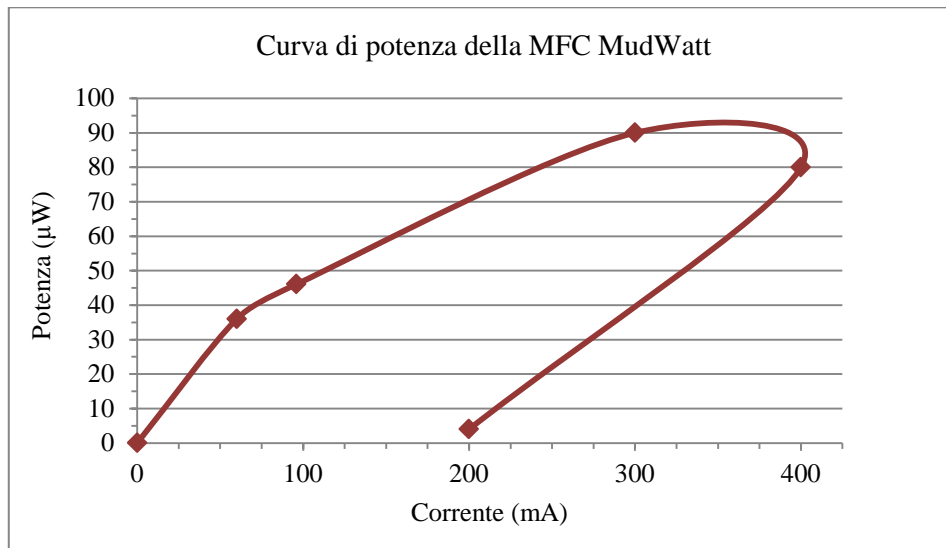


Figura 107 - Curva di potenza della MFC MudWatt.

Anche in questo caso il valore massimo della potenza si è avuto per un valore della resistenza esterna pari a 1000 , quello ottenuto con il nottolino n. 4.

Nella figura 108 è riportato un modello differente dal precedente per la MFC MudWatt, e tutti i suoi componenti sono rappresentati ed indicati in figura 108, a sinistra, mentre a destra c'è il modello già tutto assemblato:

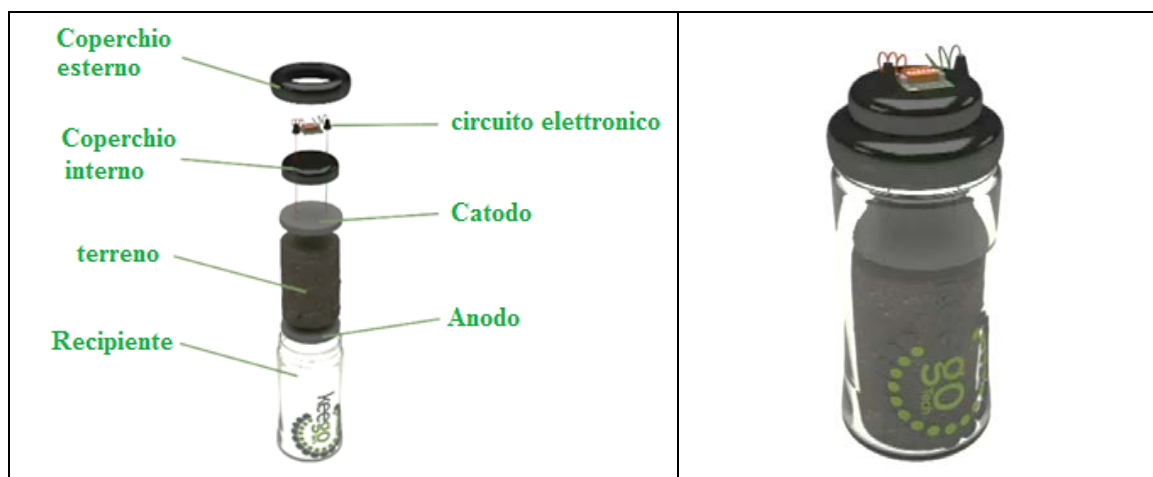


Figura 108 - La MFC MudWatt, con tutti i suoi componenti ed assemblata.

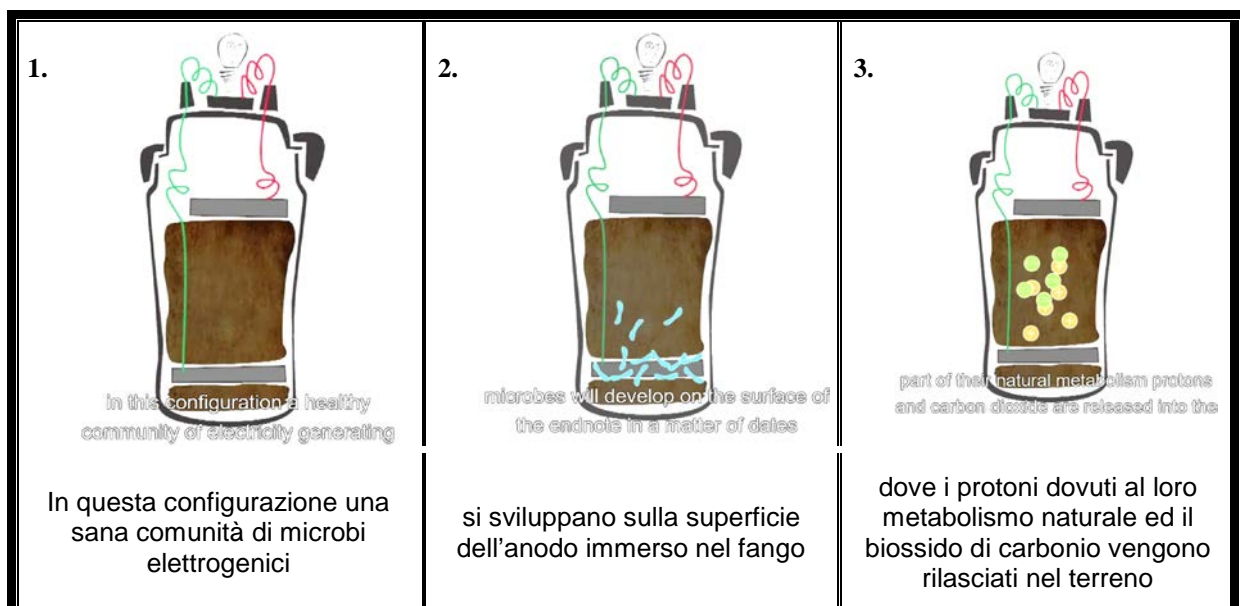
### 6.2.2 Percorso e fasi di generazione della corrente in una MFC MudWatt

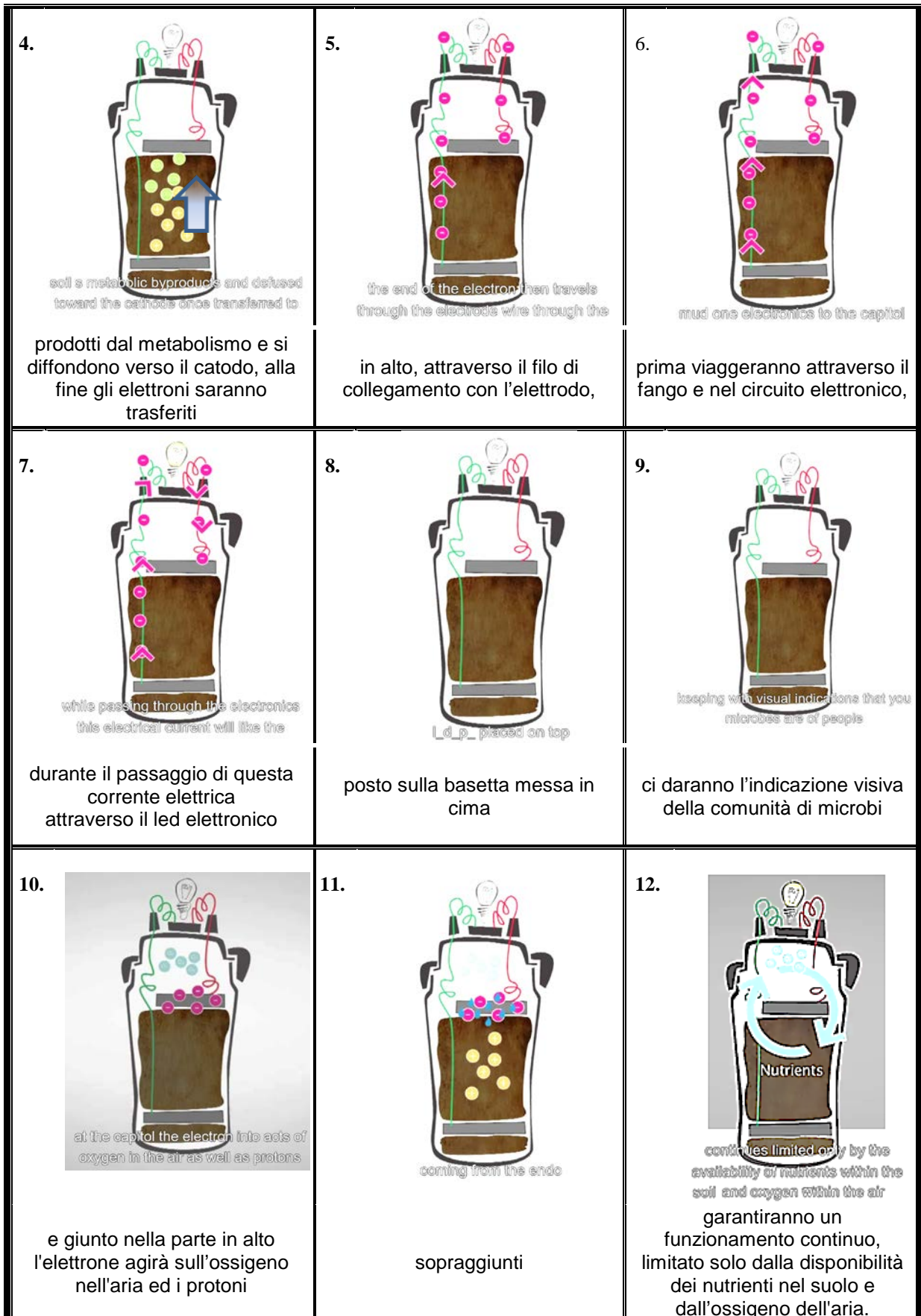
Il funzionamento della MFC MudWatt [149] è riassunto nella successione dei 12 passaggi raffigurati in tabella 24; partendo dalla configurazione classica della MFC MudWatt, già riempita di fango e riportata nel riquadro 1., si deve attendere il tempo di latenza per la comunità

microbica al fine di farla sviluppare nelle nuove condizioni ambientali presentate dalla MudWatt in modo che liberino dal terreno tutte le sostanze ad esse utili, come gli zuccheri e né estraggano gli elettroni ed inoltre che giungano sull'elettrodo anodico (nel riquadro 2.); nel terreno si assisterà alla separazione delle cariche positive, i protoni e alla produzione di anidride carbonica (nel riquadro 3.), che si libererà all'interno della MudWatt (nel riquadro 4.) e tenderà a raggiungere la cima del contenitore. Gli elettroni liberati dal terreno e facenti parte dei nutrienti per i batteri elettrogenici, saranno catturati dall'elettrodo, in grafite (nel riquadro 5.) e cercheranno di raggiungere zone a potenziale redox più basso, cioè il catodo; per far questo, dopo essere stati catturati dall'elettrodo circoleranno nel filo di collegamento (nel riquadro 6.) che dall'elettrodo li porterà nel circuito elettronico esterno e poi all'elettrodo catodico (nel riquadro 7.). Nel circuito elettronico saranno in grado di accendere il led in esso montato (nel riquadro 8.), che renderà in maniera visibile l'attività batterica all'interno della MFC MudWatt (nel riquadro 9.). Sull'elettrodo catodico, posto in ambiente aerobico sarà presente anche l'ossigeno (nel riquadro 10.) che si combinerà con i protoni e formerà acqua (nel riquadro 11.) che di nuovo precipiterà all'interno del terreno, stimolando così della nuova attività batterica e darà inizio ad un nuovo ciclo per la produzione di corrente elettrica, a condizione che non si siano esauriti i nutrienti del terreno e l'ossigeno, e sino a quando la comunità microbica non avrà cessato la sua attività (nel riquadro 12).

Nella tabella 24 sono inoltre riportati il testo originale della descrizione del produttore KeegoTech di tutte le fasi di funzionamento della MFC MudWatt in lingua inglese, che sono posti come sotto titoli nei riquadri, ed un breve sunto che chiarisce il significato della descrizione in lingua inglese.

Tabella 24 - Passaggi nel funzionamento della MFC MudWatt





## Capitolo 7

### Analisi e commento dei dati sperimentali

#### 7.1 Funzionamento del potenziostato

Le tecniche voltammetriche si basano sulla misurazione della corrente che attraversa un elettrodo, immerso in una soluzione contenente specie elettroattive, quando ad esso viene applicato un potenziale variabile in maniera opportuna, per fare tutto questo occorre uno strumento chiamato potenziostato [147].

Consente di rilevare le curve caratteristiche potenziale/densità di corrente; consideriamo dunque la cella di elettrolisi riportata in figura 109 dove: E è elettrodo su cui vogliamo rilevare le dissipazioni, ER è un elettrodo di riferimento; CE è il controelettrodo con cui E scambia corrente.

Questi elettrodi vengono collegati al potenziostato cioè ad un generatore di corrente a 3 morsetti atto a fornire un valore di corrente fra E e CE, tale che la tensione fra E ed ER abbia un valore prefissato.

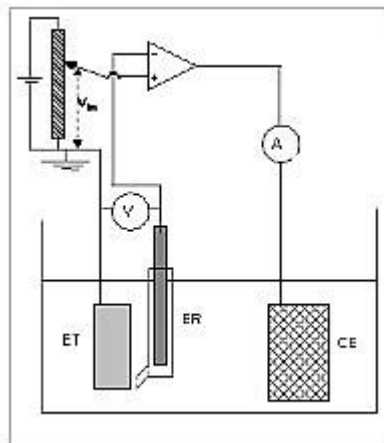


Figura 109 - Tecnica potenziostatica per una cella a singola camera.

Ciò è ottenuto mediante un servomeccanismo di cui è indicato nella figura 110 successiva lo schema a blocchi e nella figura 111 lo schema di funzionamento:

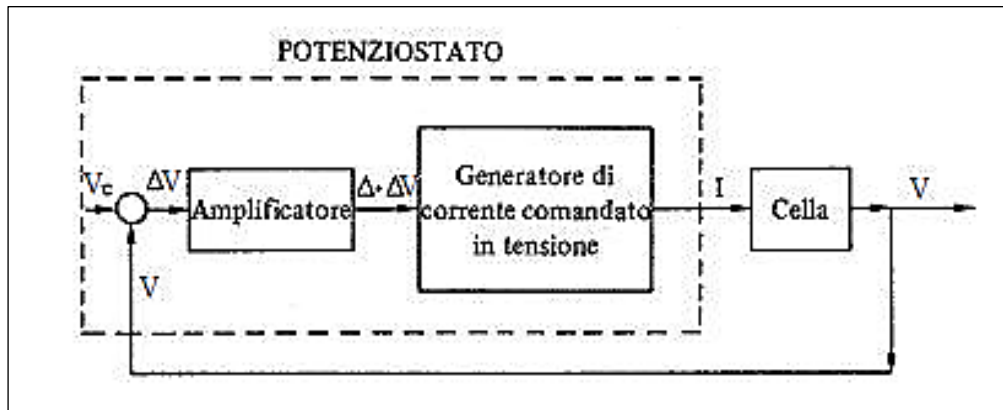


Figura 110 - Principio del rilevamento delle curve di polarizzazione col metodo potenziostatico.

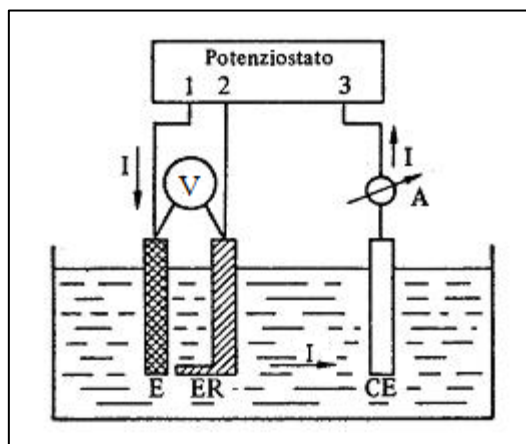


Figura 111 - Schema a blocchi di un potenziostato.

Il potenziale  $V$  dell'elettrodo  $E$  (rispetto al riferimento utilizzato  $ER$ ) è confrontato con una tensione campione  $V_c$  mediante un apparato atto a fornire un segnale proporzionale alla differenza  $(V - V_c) = \Delta V$ . Questo segnale, amplificato, è trasmesso ad un generatore di corrente comandato in tensione, il quale agisce sulla corrente  $I$  in maniera tale da far variare  $V$  (che di  $I$  è funzione) fino ad annullare la differenza  $(V - V_c)$ , come è rappresentato in figura 112:

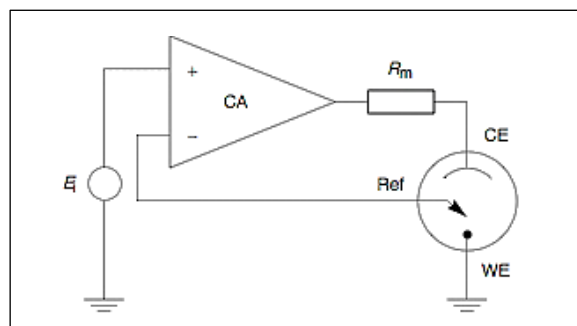


Figura 112 - Schema di funzionamento del potenziostato, con la tecnica a tre elettrodi.

Un amperometro in serie alla cella consente di leggere il valore di  $I$  per ogni valore imposto  $V = V_c$  del potenziale dell'elettrodo  $E$ . Utilizzando il potenziostato si possono costruire le caratteristiche  $i = i(V)$  con valori della densità di corrente misurate in corrispondenza ad ogni valore imposto del potenziale  $V$ .

Il circuito potenziostatico permette di imporre la scansione di potenziale programmata tra l'elettrodo di lavoro  $WE$  e quello di riferimento  $RE$  mentre viene misurata la corrente circolante nella cella, tra elettrodo di lavoro  $RE$  e contro elettrodo  $CE$ . Il sistema di gestione è costituito da un software residente in un PC, denominato EC-Lab interfacciato tramite una linea seriale al sistema di misura. Questo software ha il compito di inviare al sistema di misura i parametri di una scansione, di controllarne l'esecuzione e gestire i dati di corrente e potenziale ricevuti; nella figura 113 è riportato lo schema del circuito potenziostatico da realizzare sulle indicazioni del produttore Bio-Logic del potenziostato VSP in uso:

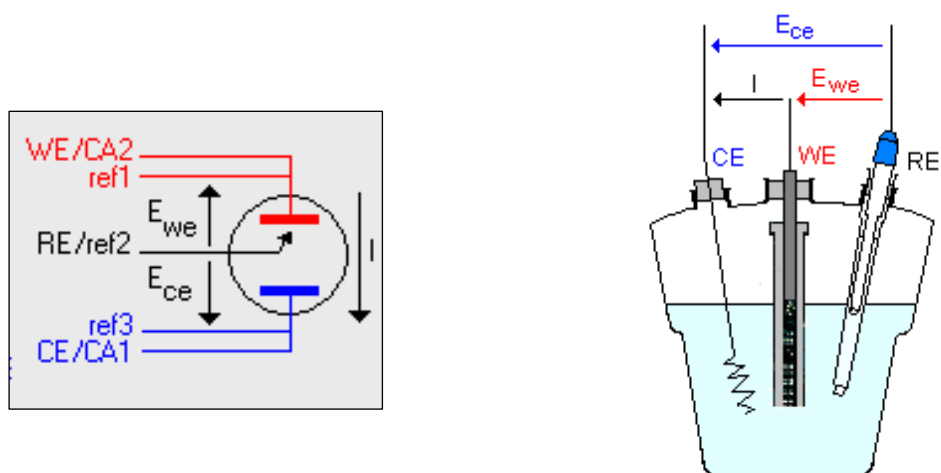


Figura 113 - Il circuito potenziostatico da realizzare con il potenziostato VSP della Bio-Logic.

Il potenziostato è lo strumento principe anche per lo studio della cinetica dei processi corrosivi.

### 7.1.1 Elettrodo di riferimento

Nella letteratura scientifica internazionale i valori di potenziale riferiti all'elettrodo standard di idrogeno vengono spesso fatti seguire dalla sigla SHE (Standard Hydrogen Electrode). In pratica, oggi, l'elettrodo di idrogeno viene impiegato solo in misure particolari, perché di uso scomodo (il Pt spesso si avvelena, l'idrogeno non è mai purissimo, etc.); operativamente si preferiscono altri elettrodi di riferimento, anche se in elettrochimica si continua a riferire i valori dei potenziali dei vari semielementi al potenziale dell'elettrodo di idrogeno posto uguale a 0 Volt.

Gli elettrodi di riferimento generano un potenziale costante con il quale si controlla quello ottenuto

dall'elettrodo indicatore. L'elettrolita di riferimento non deve alterare la concentrazione degli ioni che si analizzano. È necessario che questo elettrolita non reagisca neppure con alcun componente del campione al fine di evitare l'ostruzione del diaframma.

L'elettrodo ad argento-cloruro d'argento è largamente usato in pratica, ed è costituito da un filo di platino su cui viene prima depositato, elettroliticamente, un velo d'argento, sul quale poi, sempre elettroliticamente, si fa sviluppare cloro; parte dell'Ag viene trasformato in AgCl, insolubile, che resta aderente all'elettrodo stesso, creando così il corpo di fondo. Se questo elettrodo viene immerso in una soluzione contenente ioni Cl<sup>-</sup>, assume un potenziale che è funzione dell'attività degli ioni Cl<sup>-</sup>.

Temperatura di lavoro	0... 100 °C
Elemento di riferimento	crystalli di Ag/AgCl incapsulati
Diaframma	ceramico
Elettrolita	CRISOLYT
Materiale corpo	vetro

Tabella 25 - Specifiche dell'elettrodo di riferimento impiegato CRISON 52 40, impiegato in tutte le sperimentazioni.

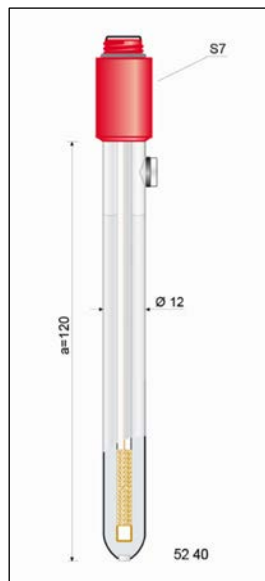


Figura 114 - Dimensioni geometriche dell'elettrodo di riferimento CRISON modello 52 40.

## 7.2 Analisi e commento dei dati sperimentali-fase I: elettrodo a spazzola

In questa fase I, denominata *elettrodo a spazzola*, sono stati sviluppati dei prototipi di celle a combustibile microbiologiche (MFC) per la produzione diretta di energia elettrica. Tali prototipi sono stati realizzati in scala di laboratorio secondo le configurazioni reattoristiche maggiormente utilizzate in letteratura: cella a combustibile microbica bicamera, “H-type”, e cella a combustibile microbica monocamera, con catodo all'aria. Per ciascuna delle due configurazioni è



stata realizzata una serie di tre MFC rispettivamente con le seguenti caratteristiche:

- ⇒ Elettrodo in forma di spazzola con inoculo di batteri conservato in atmosfera di azoto
- ⇒ Elettrodo in forma di spazzola con inoculo di batteri conservati sotto paraffina liquida
- ⇒ Elettrodo piano con inoculo di batteri conservato in atmosfera di azoto

Gli elettrodi anodici sono stati realizzati o in forma di spazzola di fibre di grafite avvolte su filo di titanio, oppure nella forma piana costituita da fogli di carbonio pressati.

Il ceppo batterico inoculato nei reattori MFC è il *Geobacter sulfurreducens* PCA, in grado di produrre energia elettrica formando un biofilm sulla superficie dell'anodo, che si comporta da elettrone-accettore senza dover ricorrere all'aggiunta di mediatori per il trasferimento degli elettroni all'elettrodo. Tali microrganismi anaerobici sono stati coltivati in laboratorio e successivamente conservati in ambiente anaerobico fino al momento dell'inoculo all'interno della cella. Le condizioni di anaerobiosi sono state garantite secondo due modalità diverse: nel primo caso i microrganismi sono stati coltivati in presenza di azoto secondo la tecnica Hungate (D.S.M.Z.); nel secondo caso è stato depositato un sottile strato superficiale di paraffina liquida sul terreno al fine di evitare che eventuale ossigeno presente si disciolga all'interno del terreno batterico.

### 7.2.1 Procedura sperimentale seguita nell'allestimento delle MFC

Sono stati inizialmente coltivati in laboratorio i microrganismi *G. sulfurreducens* nel loro terreno di crescita standard in provette da 10 ml l'una per un periodo di 10 giorni, e successivamente conservati in condizioni anaerobiche e a temperatura di -10 °C fino al momento dell'inoculo nei reattori MFC. Contemporaneamente si sono costruite sei celle a combustibile microbiche secondo il criterio citato nel paragrafo precedente. Per semplicità d'ora in avanti tali MFC verranno denominate come segue:

1. Reattore MFC bicamera con elettrodo a spazzola inoculato con batteri conservati in atmosfera di azoto, di cui riporto una immagine ed i dati salienti:
  - elettrodo dell'anodo in grafite a forma di spazzola con superficie di 0,144 m<sup>2</sup>, anaerobico;
  - elettrodo del catodo in grafite a forma di spazzola con superficie di 0,144 m<sup>2</sup>, aerobico;
  - volume inoculo camera anodica= 200 ml;

-  $R_{\text{est}} = 177,5 \pm 0,6 \Omega$ ;



Figura 115 – Immagine dell'elettrodo a spazzola di grafite.

e di seguito una fotografia:



Figura 116 - MFC numero 1.

Vogliamo qui elencare tutti i componenti delle MFC che hanno costituito questa fase della ricerca:

□ il ceppo *Geobacter sulfurreducens* coltura batterica pura, acquistati alla ATCC (American Type Culture Collection) bioproducts, del ceppo PCA, coltura No. 51573, banca del genoma AE017180, è stato inizialmente coltivato in provette batch precedentemente autoclavate e riempite anaerobicamente ciascuna con 10 ml di terreno di crescita, ad una temperatura di 30 °C per 10 giorni. Il terreno di crescita standard per *Geobacter sulfurreducens* è composto da:

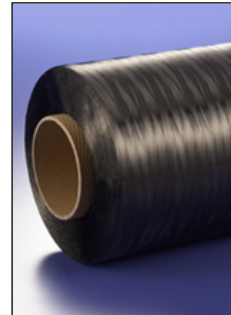
- $\text{NH}_4\text{Cl}$  1,5 g/l;
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,6 g/l;
- $\text{KCl}$  0,1 g/l;

- NaAc 0,82 g/l;
- Wolfe's mineral solution 10 ml/l;
- Vitamin solution 10 ml/l;
- NaHCO<sub>3</sub> 2,5 g/l;
- sodio fumarato 8,0 g/l (come accettore di elettroni).

Il pH del terreno di crescita batterica è stato aggiustato a 6,8 con HCl 1 M. Successivamente tale coltura batterica è stata utilizzata per inoculare le microbial fuel cells.

□ per realizzare la spazzola è stata impiegata la fibra di carbonio della ditta Teijin dalla Deltapreg, Italia ed il modello e le proprietà del filamento sono riportate in tabella, con a fianco una immagine del prodotto:

Codice	HTA40	3K
Numero Filamenti	1000	
Prodotto	tessuto	67
Carico di rottura	kgf/mm <sup>2</sup>	390
	MPa	3800
Modulo elastico	tonf/mm <sup>2</sup>	24
	GPa	238
Allungamento	%	1,6
Diametro filamento	micron	7
Densità	g/cm <sup>3</sup>	1,78
Resistività Elettrica	ohm-cm	1,6 x 10 <sup>-3</sup>



□ bottiglia PYREX, in vetro del volume di 250 ml, il cui adattamento per le parti in vetro, necessarie per l'impiego della membrana protonica, è stato eseguito dalla VetroScientifica Srl; le dimensioni del corpo-bottiglia sono di seguito riportate, con a fianco una immagine de prodotto:

volume	(ml)	250
Altezza del corpo-bottiglia	(mm)	138
Diametro del corpo-bottiglia	(mm)	70
Dimensione filettatura	(mm)	45



□ tappi per le bottiglie in polipropilene, autoclavabili sino a 140 °C, di cui è riportata una immagine;





Diametro	0,81 mm
Punto di ebollizione (boiling point, bp)	3287 °C (lit.)
Punto di fusione (melting point, mp)	1660 °C (lit.)
Densità	4,5 g/mL a 25 °C (lit.)

□ morsettiere a vite, in nylon, di cui riportiamo le caratteristiche ed una immagine:

Corrente nominale	10A
Materiale	Nylon
Numero di vie	12
Punti di fissaggio	8 mm
Sezione cavo	1,5 mm <sup>2</sup>
Temperatura nominale	125 °C
Tensione nominale	250V



□ morsetti a coccodrillo miniaturizzati, di acciaio con placcatura in nichel e senza isolamento, di cui viene riportata una immagine:



□ resistenza a film metallico, impiegata come carico esterno delle MFC, acquistate alla Rs Components (Mi), del valore nominale di 178 Ω ± 0,1% della quale riportiamo le specifiche:

Coefficiente di temperatura	±15 ppm/°C
Coefficiente di temperatura massimo	+15 ppm/°C
Coefficiente di temperatura minimo	-15 ppm/°C
Diametro corpo	2,3 mm
Dimensioni corpo	2,3 dia. x 5,6 mm
Lunghezza corpo	5,6 mm
Lunghezza filo	25 mm
Diametro filo	0,6 mm
Potenza	¼ W
Resistenza	178 Ω
Tecnologia	Film metallico
Temperatura operativa minima	-55 °C
Temperatura operativa massima	+125 °C
Tipo contenitore	Conforme
Tipo di terminazione	Assiale
Tolleranza	±0,1 %
Tensione massima	250 V nominale
Rigidità dielettrica	500 V

ed una immagine:



□ silicone universale acetico “Sigillante Sista Silicon 5” trasparente, acquistato alla Rs Components (Mi) ed impiegato per la sigillatura delle camere della cella e viene riportata una immagine del prodotto:



Ideale per sigillare materiali non porosi quali: vetro, ceramica, metalli e legno verniciato, alluminio e la maggior parte delle materie plastiche (ad esclusione di PE, PP e PTFE); ideale per lavori su vetro, serramenti e carpenteria metallica leggera. La resistenza alle muffe li rendono particolarmente indicati per sigillare bagni, cucine, box doccia, lavabi, servizi igienici, lavatoi e sanitari in genere. Buona resistenza ad agenti atmosferici, raggi U.V., acidi e basi diluite, detersivi.

- diffusore in pietra porosa per areatore (stonewater), a bolle fini; dimensioni totali: 1,5 diam. x 4,5 h cm, della quale viene riportata una immagine:



- aeratore ad una via, del quale riportiamo le caratteristiche ed una immagine:

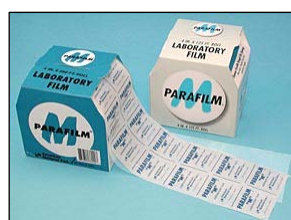
tipo di alimentazione	a c
tensione di alimentazione	220-240 V
frequenza di alimentazione	50 Hz
potenza assorbita dalla rete, dall'aeratore	5 Watt
pressione aria	0,012 MPa
portata aria	3,5 l/min



- tubicino di silicone trasparente per aeratore, diametro interno 4 mm, diametro esterno 6 mm, di cui riportiamo una immagine:



- parafilm M<sup>®</sup> film di laboratorio impiegato per la sigillatura di tutte le parti nelle quali erano possibili delle dispersioni di liquido, ma anche per evitare l'ingresso dell'aria all'interno della camera anodica che avrebbe causato la perdita dell'anaerobiosi; viene riportata una immagine del prodotto:



Flessibile, modellabile, autosigillante, semi-trasparente, praticamente incolore e inodore; può essere tagliato rapidamente con il distributore e utilizzata per provette, flaconi, e coprendo superfici irregolari. Nella ricerca orticole, Parafilm M viene utilizzato per sigillare gli innesti e gli steli recisi per prevenire la perdita di umidità.

□ Fascette in nylon per cavi standard serie T, di cui riportiamo le specifiche di una tipologia impiegata, ma ne sono state utilizzate altre dello stesso tipo ed una immagine campione:

Colore	Naturale
Diametro massimo fascio	22 mm
Larghezza	2,5 mm
Massima temperatura operativa	+85 °C
Materiale	PA (nylon) 6,6
Minima temperatura operativa	-40 °C
Resistente alla fiamma	Sì
Resistenza alla trazione	80 N
Tipo	Non riapribile



2. Reattore MFC bicamera con elettrodo a spazzola inoculato con batteri conservati sotto paraffina liquida, di cui riporto una immagine ed i dati salienti:

- MFC bicamera con inoculo di *Geobacter sulfurreducens* conservati sotto paraffina;
- elettrodo dell'anodo in grafite a forma di spazzola con superficie di 0,144 m<sup>2</sup>, anaerobico;
- elettrodo del catodo in grafite a forma di spazzola con superficie di 0,144 m<sup>2</sup>, aerobico;
- volume inoculo camera anodica= 200 ml;
- Rest= 177,5 ± 0,6 Ω;

e di seguito una fotografia:



Figura 117 – MFC numero 2.

3. Reattore MFC bicamera con elettrodo anodico piano inoculato con batteri conservati in atmosfera di azoto, di cui riporto una immagine ed i dati salienti:

- MFC bicamera con inoculo di *Geobacter sulfurreducens* inoculato con coltura planctonica;

- elettrodo dell'anodo in grafite di forma piana con superficie di  $16 \text{ cm}^2$ , aerobico;
- elettrodo del catodo in grafite a forma di spazzola con superficie di  $0,144 \text{ m}^2$ , anaerobico;
- volume inoculo camera anodica= 200 ml;
- Rest=  $177,5 \pm 0,6 \Omega$ ;

e di seguito una fotografia:



*Figura 118 – MFC numero 3.*

4. Reattore MFC monocamera con elettrodo a spazzola inoculato con batteri conservati in atmosfera di azoto, di cui riporto una immagine ed i dati salienti:

- elettrodo dell'anodo in grafite a forma di spazzola con superficie di  $0,144 \text{ m}^2$ , anaerobico;
- elettrodo del catodo in grafite di forma piana con superficie di  $25 \text{ cm}^2$ , all'aria;
- membrana protonica: NAFION 117;
- volume inoculo = 200 ml;
- Rest=  $177,5 \pm 0,6 \Omega$ ;

e di seguito una fotografia:



*Figura 119 – MFC numero 4.*

□ Nastro per schermatura

Lamina di rame da  $35 \mu\text{m}$  rivestita con adesivo acrilico elettricamente conduttivo su uno strato di silicone rimovibile, buona saldabilità, schermatura eccellente e buona conduttività attraverso



l'adesivo, di cui riportiamo i dettagli tecnici ed una immagine nella tabella seguente:

Spessore nastro:	0,035 mm
Spessore adesivo:	0,025 mm
Spessore totale	0,060 mm
Adesività sull'acciaio:	4,5 N/cm
Resistenza a trazione:	40 N/cm
Resistenza alla Temperatura:	da -20 °C a +155 °C
Resistenza elettrica attraverso l'adesivo:	3 mΩ
Temperatura di conservazione:	+12 °C to +25 °C
Larghezza	19 mm
Lunghezza	33 m



5. Reattore MFC monocamera con elettrodo a spazzola inoculato con batteri conservati sotto paraffina liquida, di cui riporto una immagine ed i dati salienti:

- elettrodo dell'anodo in grafite a forma di spazzola con superficie di  $0,144 \text{ m}^2$ , anaerobico;
- elettrodo del catodo di forma piana con superficie di  $25 \text{ cm}^2$ , all'aria;
- membrana protonica: NAFION 117;
- volume inoculo = 200 ml;
- Rest=  $177,5 \pm 0,6 \Omega$ ;

e di seguito una fotografia:



Figura 120 – MFC numero 5.

6. Reattore MFC monocamera con elettrodo piano inoculato con batteri conservati in atmosfera di azoto, di cui riporto una immagine ed i dati salienti:

- elettrodo dell'anodo in grafite a forma piana con superficie di  $16 \text{ cm}^2$ , anaerobico;
- elettrodo del catodo in grafite di forma piana con superficie di  $25 \text{ cm}^2$ , all'aria;
- membrana protonica: NAFION 117;
- volume inoculo = 200 ml;
- Rest=  $177,5 \pm 0,6 \Omega$ ;

e di seguito una fotografia:

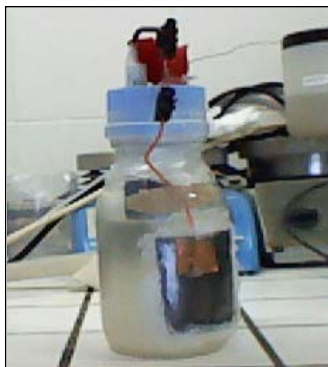


Figura 121 - MFC numero 6.

Tutti gli elettrodi sono stati pretrattati come già descritto, prima di essere utilizzati in ciascuna fuel cell. Dal foro praticato sulla sommità del compartimento anodico (anaerobico) di ciascuna delle sei MFC è stato introdotto sotto atmosfera di azoto il quantitativo opportuno di terreno per i *G. sulfurreducens* (400 ml per i reattori MFC bicamera 1 – 3, e 200 ml per i reattori MFC monocamera 4 - 6). Successivamente il terreno presente in ciascun comparto anodico è stato degasato con azoto puro per eliminare l'eventuale presenza di ossigeno disciolto, ed inoculato con 10 ml del terreno di crescita in cui erano stati precedentemente coltivati i *G. sulfurreducens*. I due elettrodi sono stati quindi collegati tra loro attraverso un circuito esterno chiuso su una resistenza di carico di 177,5  $\Omega$ .

Dopo un breve periodo di acclimatazione di circa 24 ore, si è iniziato a monitorare la produzione di tensione e corrente in ciascuna cella microbica. Il monitoraggio elettrico è durato per un periodo di circa 60-70 giorni; le misure elettriche ed il calcolo della resistenza interna sono stati effettuati secondo il metodo voltamperometrico descritto nel capitolo 7 (nel paragrafo 7.2.2), realizzando cinque letture al giorno di tensione CCV, corrente I e tensione equivalente OCV; dalla misura di tali valori si è ricavato poi il valore medio giornaliero delle suddette grandezze. Poiché tali dispositivi funzionano in modalità batch, si rende necessario periodicamente reintegrare il terreno di coltura batterica con i nutrienti necessari per far procedere il metabolismo anaerobico dei batteri e, quindi, la produzione di energia. A tal fine è stato effettuato uno spurgo di circa 200 ml per ciascun compartimento elettrodico, ed è stato inoculato nuovo terreno di crescita (“medium“ per i batteri) ogni 10-12 giorni circa per ripristinare la concentrazione iniziale del terreno; infatti, dopo tale periodo di tempo è stato riscontrato un abbassamento notevole della corrente e tensione erogate dalle MFC, a testimonianza dell'effettivo esaurimento della sostanza organica degradabile dai batteri. Inoltre è stata periodicamente misurata la concentrazione del carbonio organico totale (TOC) disciolto in soluzione al fine di valutare l'andamento dell'efficienza di rimozione del substrato organico ad opera dei microrganismi. Oltre alla concentrazione di carbonio organico sono state analizzate

anche le concentrazioni dei principali anioni presenti in un'acqua di scarico: nitrati, solfati, fosfati, etc.

Sulla base di tali grandezze misurate sono stati ricavati i valori dei principali parametri che consentono di valutare le performances di una MFC, ovvero:

- Densità di potenza [ $\text{W}/\text{m}^2$ ]: la potenza è valutata come prodotto della corrente erogata  $I$  e della tensione  $V$ , ed è normalizzata sulla base della superficie utile dell'elettrodo anodico.
- Densità di corrente [ $\text{A}/\text{m}^2$ ]: i valori misurati di corrente erogata vengono normalizzati con la superficie utile anodica. Tale parametro è considerato un indice dell'attività catabolica globale dei microrganismi presenti in camera anodica.
- Tensione a circuito aperto (OCV) [ $\text{V}$ ]: è il voltaggio presente tra anodo e catodo misurato in assenza di corrente, a circuito aperto. La differenza tra OCV e forza elettromotrice è considerata come la perdita totale di potenziale della cella.
- Resistenza interna ( $R_{\text{int}}$ ) [ $\Omega$ ]: essa viene valutata tramite il metodo voltamperometrico, applicando la legge di Ohm al circuito chiuso delle MFC.
- Efficienza di rimozione [%]: è riferita alla concentrazione del carbonio organico totale (TOC) ed è stimata dividendo la differenza tra TOC entrante ed uscente per il valore di TOC entrante:

$$\eta(\%) = \frac{\text{TOC}_{\text{in}} - \text{TOC}_{\text{out}}}{\text{TOC}_{\text{in}}}$$

- Qualità dell'effluente [ $\text{mg}/\text{l}$ ]: concentrazione della sostanza organica (TOC) in un effluente scaricato dalla camera anodica.

### 7.2.2 Misura delle grandezze elettriche: potenza elettrica prodotta e corrente erogata

Per la misura delle grandezze elettriche che caratterizzano una MFC, cioè tensione OCV, la CCV, la corrente  $I$  e la potenza elettrica  $P$  è stato necessario allestire un circuito di misura ed il metodo impiegato è stato quello "voltamperometrico" per il quale si sono utilizzati due multimetri: un Fluke 85 Series III Digital True-rms Multimeter per misurare la corrente elettrica erogata (amperometro), ed un Fluke 73 Series III 3-1/2 Digital Multimeter per misurare la tensione (voltmetro).



Figura 122 - Immagine dei multimetri utilizzati durante la sperimentazione.

Le misure di tensione e di corrente generate da ciascun sistema MFC con questo metodo sono state effettuate contemporaneamente poiché tali grandezze vengono poi utilizzate per il calcolo della potenza erogata e della resistenza interna offerta dalle MFC. Tali misure si sono realizzate sulla base della costruzione del circuito elettrico che prevede la voltmetrica a valle, in cui il voltmetro è inserito in parallelo alla resistenza di carico, e l'amperometro è inserito in serie, sia per le MFC bicamera che per quelle monocamera. Qui di seguito si mostrano schematicamente le modalità adottate per effettuare le misure per i dispositivi bicamera e monocamera:

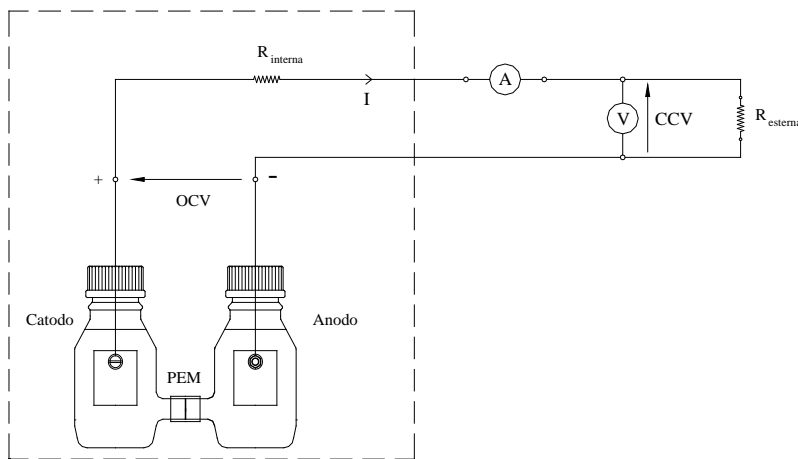


Figura 123 - Circuito di misura allestito per la misura delle grandezze elettriche di una MFC, secondo il metodo voltamperometrico con voltmetrica a valle.

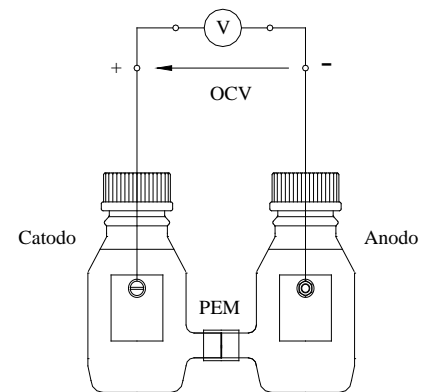


Figura 124 - Circuito di misura allestito per la misura della grandezza elettrica della tensione a circuito aperto OCV, di una MFC.

ed il circuito di misura è identico quando viene effettuata la misura su una MFC bicamera o monocamera, essendo sempre presenti due fili di collegamento con i due elettrodi della camera anodica e catodica ai quali verrà collegato il circuito di misura.

Di seguito si riporta l'andamento nel tempo della densità di potenza erogata da ciascun reattore MFC; le linee tratteggiate in verticale indicano l'inizio di un nuovo ciclo di alimentazione, ovvero i giorni in corrispondenza dei quali ogni reattore è stato spurgato ed inoculato con soluzione medium fresca, a partire dal numero del giorno sul quale si trova il semicerchio dello stesso colore. I grafici che vengono riportati sono 2 per ciascuna MFC, racchiusi in un riquadro; sul primo si possono leggere le tensioni e le correnti, ma anche i valori di resistenza interna

durante tutta la durata del ciclo di misura; mentre nel secondo grafico si riporta la potenza elettrica e la densità di corrente. In tutti i grafici vengono riportate le barre di errore, pari ai valori dell'incertezza per ciascuna grandezza in esame calcolata con la teoria della propagazione degli errori.

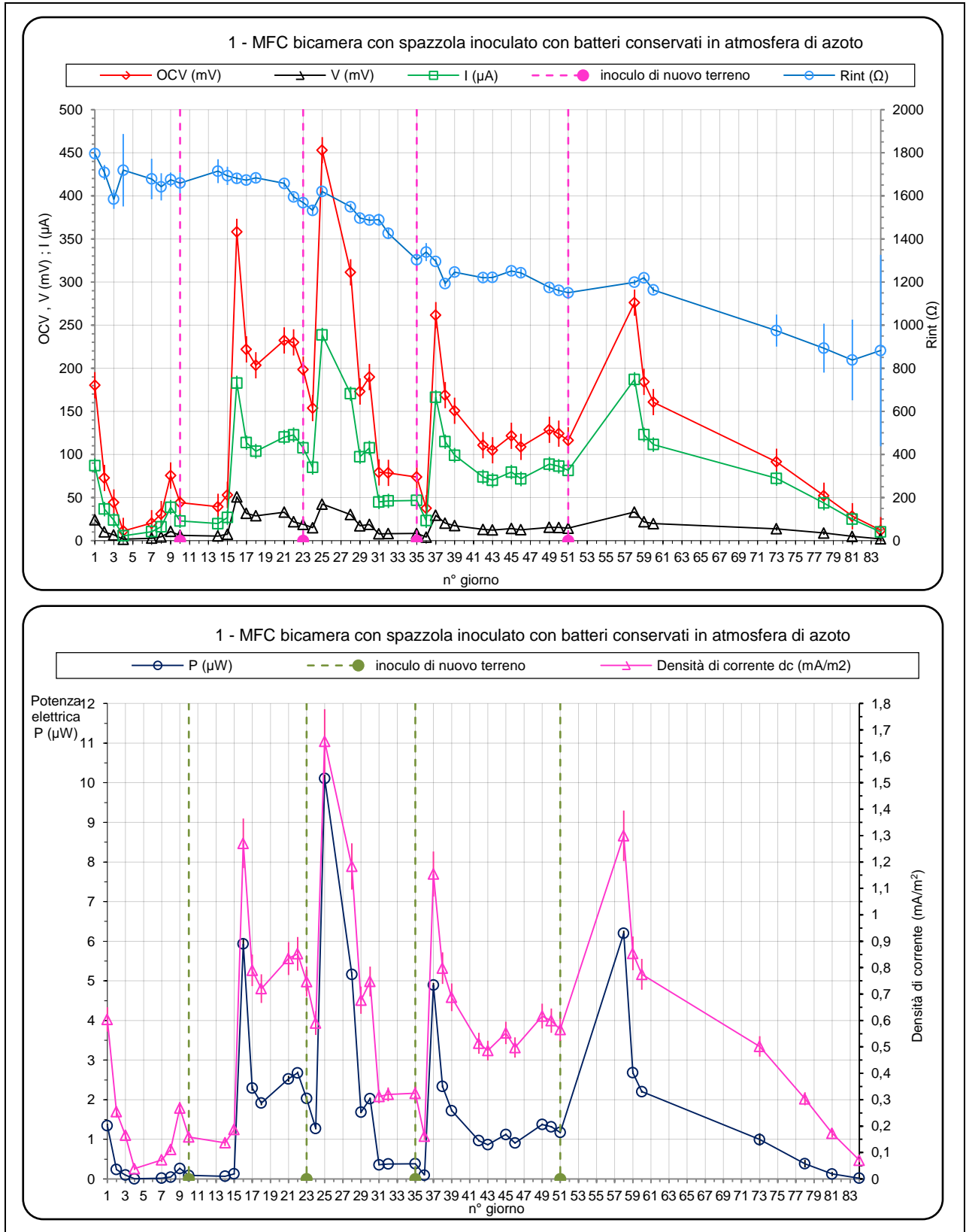


Figura 125 – Andamento delle grandezze elettriche per la MFC numero 1.

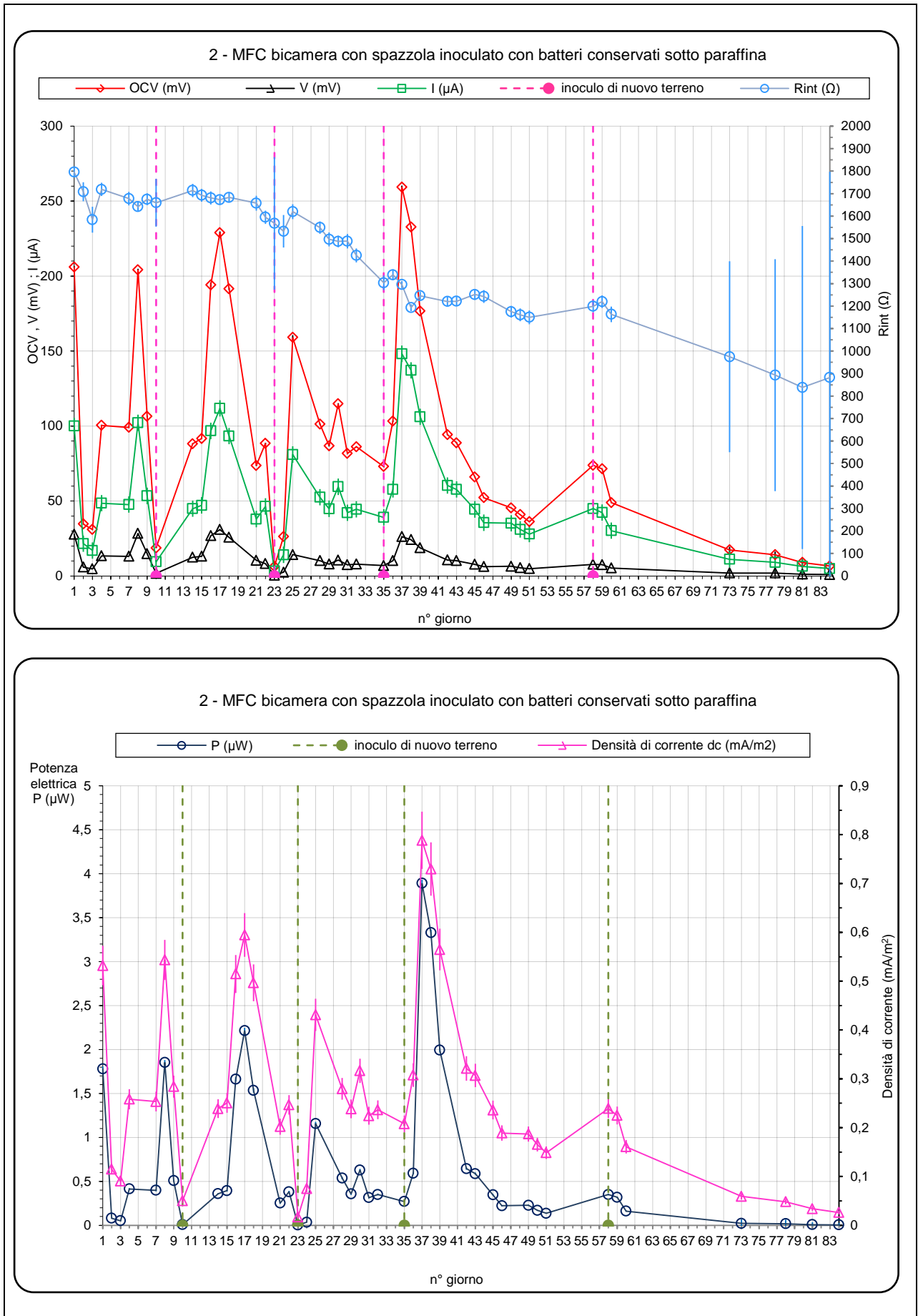


Figura 126 - Andamento delle grandezze elettriche per la MFC numero 2.

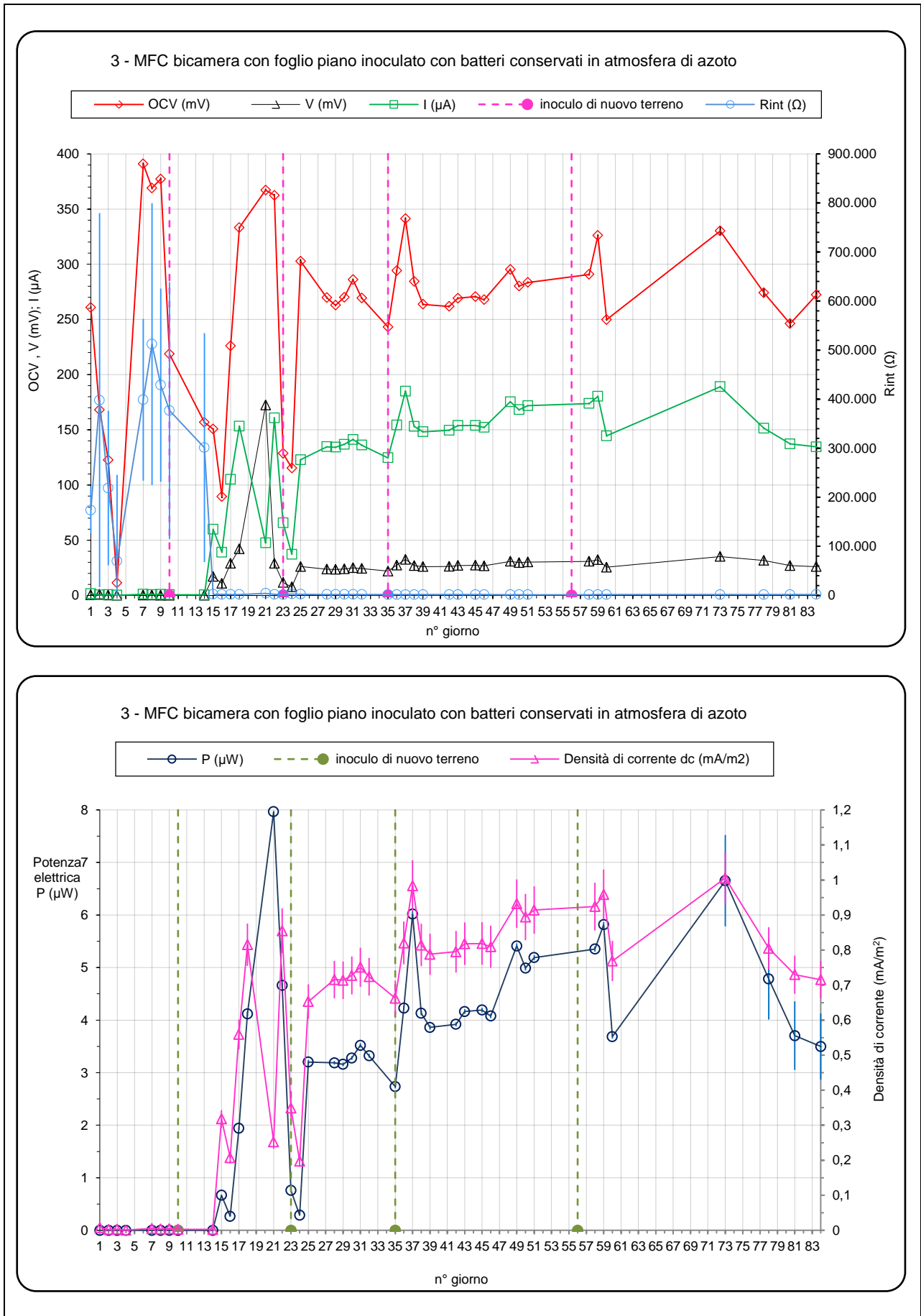


Figura 127 - Andamento delle grandezze elettriche per la MFC numero 3.

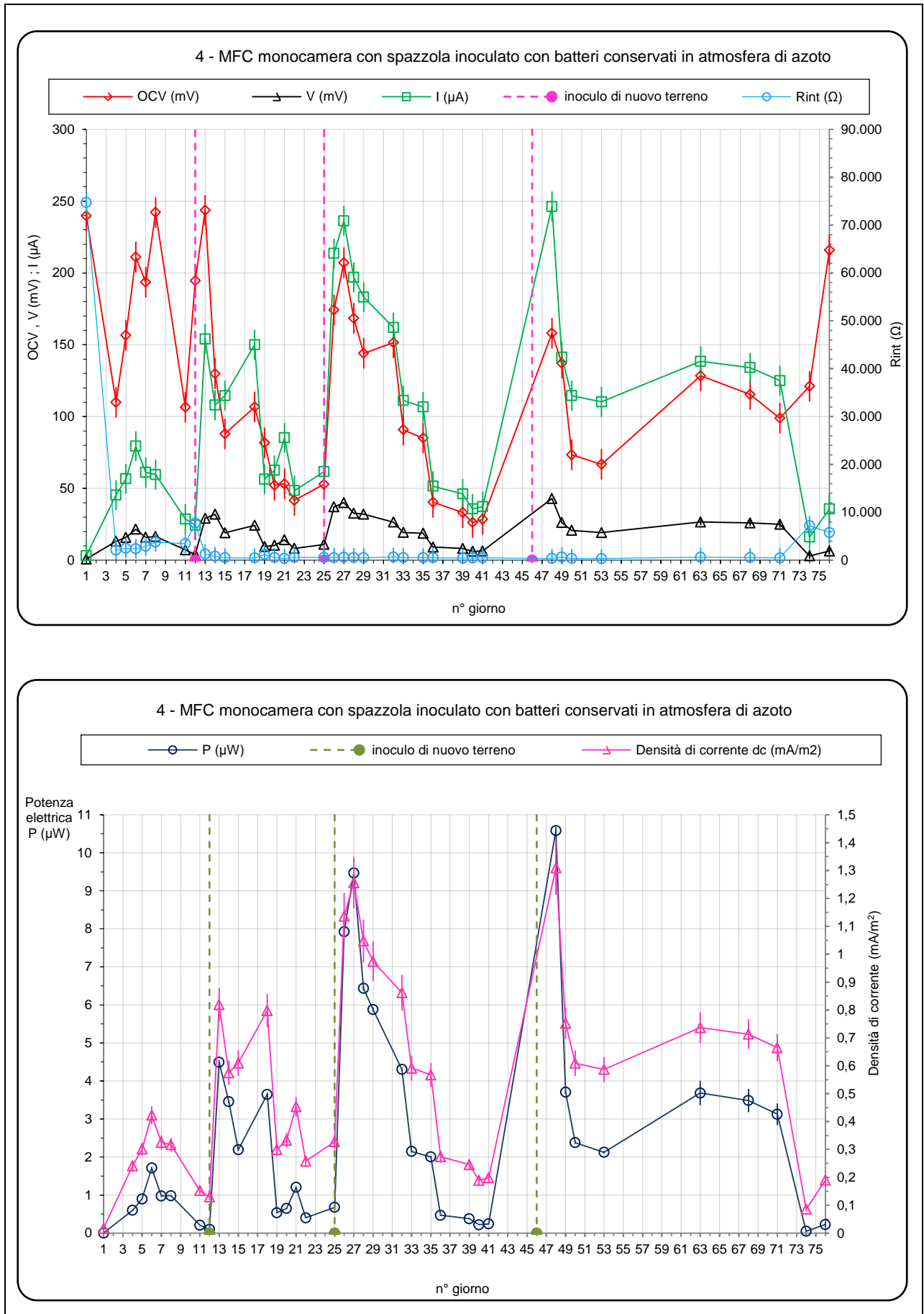


Figura 128 - Andamento delle grandezze elettriche per la MFC numero 4.



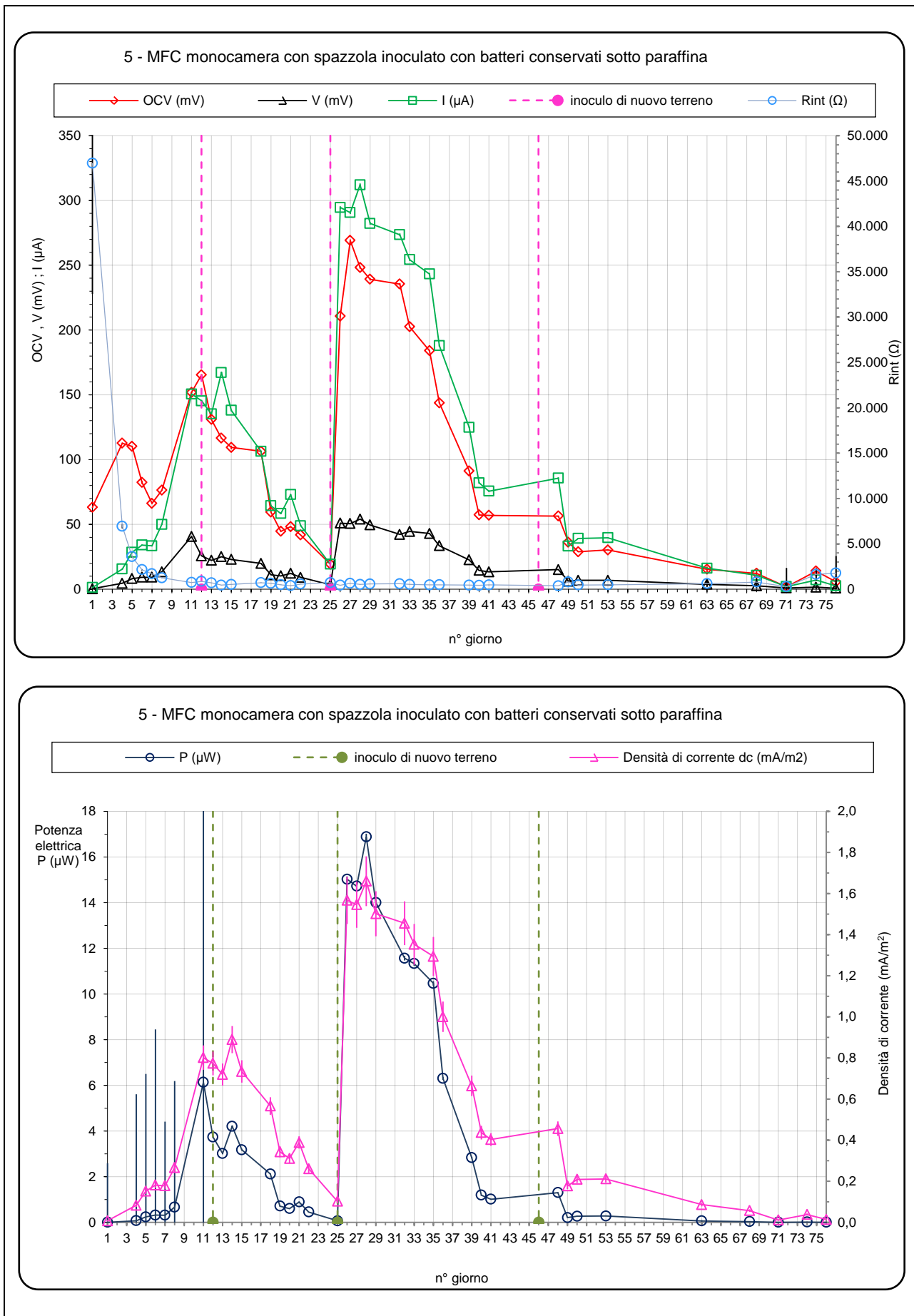


Figura 129 - Andamento delle grandezze elettriche per la MFC numero 5.

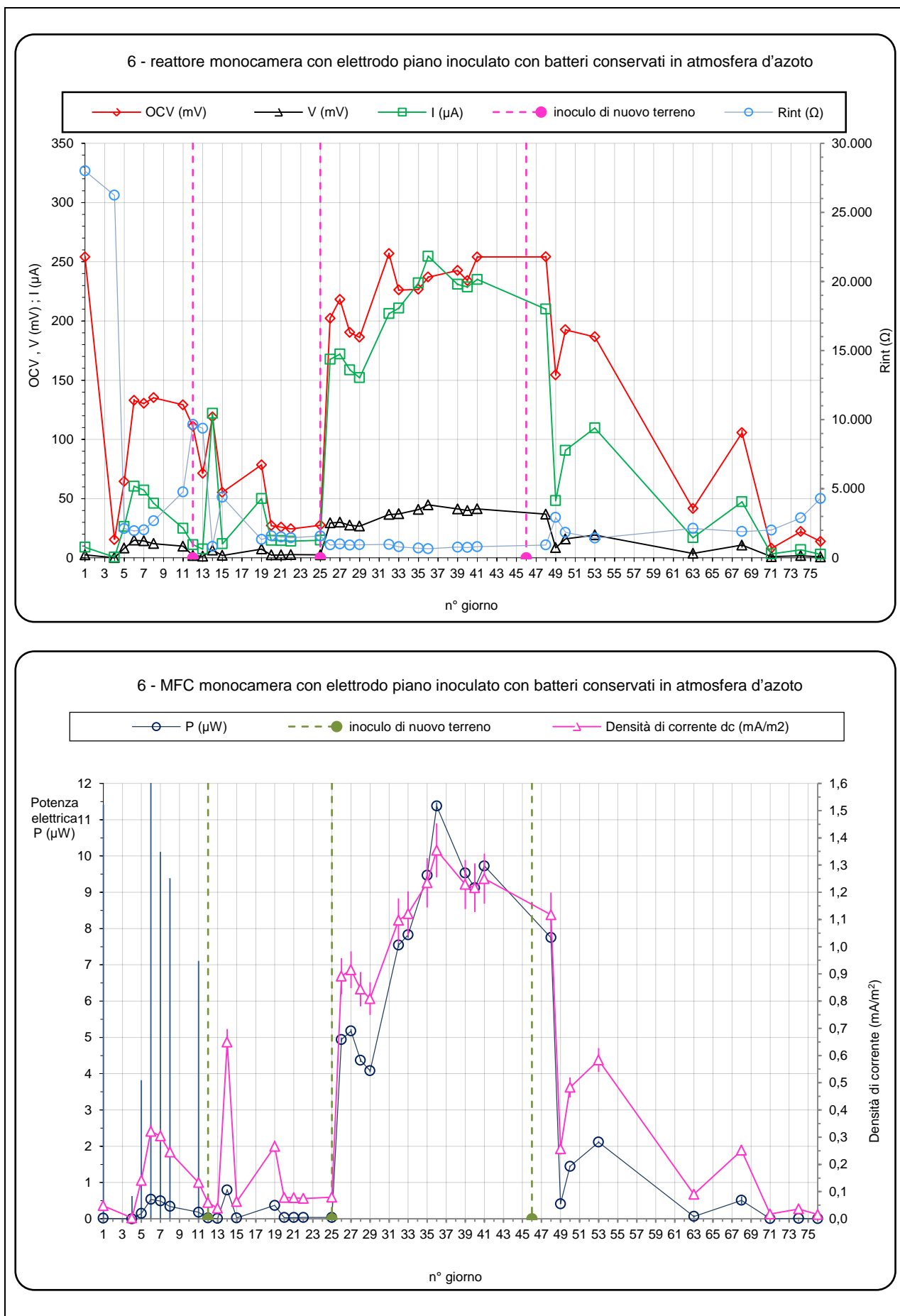


Figura 130 - Andamento delle grandezze elettriche per la MFC numero 6.

I valori di potenza, calcolati come prodotto  $P=CCV \cdot I$  del valore medio delle cinque misure giornaliere di tensione CCV per quello medio giornaliero di corrente I, sono stati normalizzati rispetto alla superficie utile dell'anodo.

È importante osservare che per l'ultimo ciclo rappresentato nei grafici, i reattori MFC n. 2, 3, 5, 6 sono stati inoculati con il terreno standard come nei cicli precedenti, ma in assenza di fumarato di sodio. Anche se il fumarato rappresenta uno dei principali nutrienti dei microrganismi, si è deciso di eliminarlo poiché esso funge anche da accettore di elettroni e quindi è stato ipotizzato che potesse entrare in competizione con l'anodo.

I risultati hanno mostrato un crollo dei valori di potenza erogata, particolarmente evidente nei reattori n. 2 e 5, ad indicare che l'assenza del fumarato rappresenta un fattore limitante nella proliferazione dei microrganismi e quindi nella generazione di elettricità. I restanti reattori MFC n. 1 e 4 sono stati inoculati con il medesimo terreno di coltura dei casi precedenti.

Si nota inoltre come l'elettrodo piano, in entrambe le configurazioni, sembrerebbe notevolmente più performante rispetto alla spazzola in grafite, essendo la densità di potenza maggiore di oltre due ordini di grandezza.

La tabella 26 riporta i valori massimi ed insieme l'incertezza di misura, per ciascuna grandezza elettrica, di ognuna delle 6 MFC:

Dati MFC	OCV (mV)	CCV (mV)	I ( $\mu$ A)	P ( $\mu$ W)	R <sub>int</sub> ( $\Omega$ )	dc (mA/m <sup>2</sup> )
MFC bicamera numero 1	452,8 $\pm$ 2,4	42,4 $\pm$ 0,2	238,6 $\pm$ 0,9	10,112 $\pm$ 0,091	1620 $\pm$ 16	1,657 $\pm$ 0,122
MFC bicamera numero 2	259,3 $\pm$ 0,9	26,3 $\pm$ 0,2	148,2 $\pm$ 0,7	3,892 $\pm$ 0,045	1473 $\pm$ 14	0,788 $\pm$ 0,059
MFC bicamera numero 3	367,2 $\pm$ 1,2	172,4 $\pm$ 0,6	47,5 $\pm$ 0,5	7,968 $\pm$ 0,121	4098 $\pm$ 81	0,253 $\pm$ 0,020
MFC monocamera numero 4	207,0 $\pm$ 0,7	40,1 $\pm$ 0,2	236,2 $\pm$ 0,9	9,468 $\pm$ 0,087	607 $\pm$ 6	1,257 $\pm$ 0,092
MFC monocamera numero 5	248,3 $\pm$ 0,8	54,1 $\pm$ 0,3	312,0 $\pm$ 1,0	16,881 $\pm$ 0,137	522 $\pm$ 5	1,660 $\pm$ 0,121
MFC monocamera numero 6	237,0 $\pm$ 0,8	44,7 $\pm$ 0,2	254,6 $\pm$ 0,9	11,374 $\pm$ 0,100	655 $\pm$ 6	1,354 $\pm$ 0,099

*Tabella 26 – Valori massimi di tutte le grandezze elettriche, per ciascuna delle 6 MFC.*

La tabella 26 mette a confronto i due tipi di elettrodo utilizzati: la superficie della spazzola è notevolmente più elevata di quella dell'elettrodo piano (più di un ordine di grandezza), ma i valori corrispondenti di potenza erogata non risultano proporzionali alla superficie anodica utile nei due tipi di elettrodo. Ciò potrebbe essere giustificato considerando che la forma e la densità del biofilm adeso è funzione delle condizioni operative della cella, in particolare della disponibilità di substrato: la superficie anodica totale a disposizione potrebbe quindi essere stata utilizzata solo parzialmente, per cui un ulteriore aumento di tale superficie risulterebbe superfluo ai fini di un aumento dell'attività elettrogenica del biofilm adeso. Per confermare tale ipotesi si renderebbe necessaria un'analisi microstrutturale del biofilm presente sulla superficie dell'anodo a spazzola e dell'anodo piano. Nella configurazione bicamera sembra esserci un lieve ritardo nella produzione di corrente (circa un paio di giorni o più), più evidente nel primo ciclo di alimentazione. Infatti, mentre nella configurazione monocamera i valori di corrente salgono notevolmente sin dal giorno successivo a quello in cui è stata effettuata la sostituzione con medium batterico fresco, nei reattori bicamera sono necessarie circa 48 ore affinché si abbia un apprezzabile aumento di produzione di corrente. Ciò è probabilmente dovuto proprio alla struttura delle celle a combustibile "H-type" (bicamera), poichè in esse deve avvenire il passaggio dei protoni dalla cella anodica a quella catodica attraverso un condotto di qualche centimetro, ponendo, tra l'altro, gli elettrodi a distanze maggiori rispetto a quelle in una cella a combustibile monocamera, in cui la configurazione stessa del catodo, costituito da fogli carbone pressato adiacente alla membrana, riduce notevolmente la resistenza alla diffusione dei protoni e la distanza dall'anodo. Inoltre il trasferimento dell'ossigeno al catodo è chiaramente favorito nel caso in cui esso sia direttamente esposto all'aria anzichè immerso in una soluzione acquosa.

Dall'andamento dei grafici sovrariportati si evince come, in linea con i valori riscontrabili in letteratura, l'andamento della produzione di corrente sia stato di natura ciclica: in ogni ciclo, a partire dall'alimentazione di terreno fresco ("medium") si è avuta una produzione di corrente (e di potenza) oscillatoria crescente, che raggiunge un valore massimo a partire dal quale l'attività elettrogenica batterica inizia una progressiva diminuzione, fino a tornare a valori comparabili con quelli misurabili prima dell'alimentazione. Inoltre, sebbene lo spurgo effettuato per sostituire la soluzione di medium batterico sia pressochè totale (eliminando quindi interamente la coltura planctonica in esso presente), si riscontra un rapido aumento della produzione di corrente nel periodo di 24÷48 ore; ciò conferma la intensa attività elettrogenica dei microrganismi *Geobacter* presenti nella forma adesa sulla superficie dell'anodo. Tali microrganismi si riproducono attraverso il metabolismo batterico del substrato nutriente, portando a "saturare" la soluzione e l'elettrodo nel giro di uno o due giorni circa; corrispondentemente, si ha il "picco" di produzione di energia. Dai risultati ottenuti si evince come solo nel primo caso si abbiano dei risultati

confrontabili per quanto riguarda sia la potenza che la corrente specifica prodotta. Negli altri due casi la configurazione monocamera ha mostrato risultati migliori sia utilizzando l'elettrodo a spazzola che quello piano; le migliori prestazioni del design monocamera si sono avute sia in termini di grandezze elettriche assolute che specifiche, con picchi di potenza e corrente specifica in alcuni casi superiori al doppio di quelli ottenuti con la configurazione bicamera. Nella configurazione monocamera, l'andamento della resistenza interna si è mostrato particolarmente instabile nella fase iniziale, con valori piuttosto elevati, per poi assestarsi dopo un periodo di circa 10-20 giorni su valori ben più bassi di quelli iniziali, con oscillazioni decisamente meno forti. Nella configurazione bicamera i valori di resistenza interna si sono assestati sin da subito intorno ai valori medi, con un andamento lievemente decrescente nel tempo, particolarmente evidente nel reattore MFC n.1, avente elettrodo a spazzola.

In generale, il design monocamera ha mostrato risultati migliori sia in termini di potenza che di corrente, particolarmente evidenti utilizzando un elettrodo piano; ciò probabilmente grazie ad una maggiore efficienza di trasferimento dei protoni e dell'ossigeno al catodo all'aria rispetto al catodo immerso in soluzione acquosa. La modalità di conservazione dei batteri non sembra aver influito in maniera rilevante sulla produzione di energia delle celle a combustibile microbiche.

### 7.2.3 Rimozione dei nutrienti

Al fine di porre le basi per uno sviluppo futuro delle MFC nell'ottica non solo di produrre potenza elettrica, ma anche di trattare effluenti contenenti elevate concentrazioni di inquinanti e di carico organico, è stata valutata l'efficienza di rimozione del carico organico, dei nitrati, dei solfati e dei fosfati.

La concentrazione di carbonio organico totale (T.O.C.) è considerato uno dei parametri chiave all'interno di un impianto di depurazione che consente di valutare chimicamente il carico inquinante di un refluo.

Nel presente lavoro sperimentale è stata valutata in particolare l'efficienza di rimozione del carico organico totale  $\eta$ , espressa come precedentemente citato (5.2), per ogni ciclo di alimentazione effettuato nelle diverse celle a combustibile microbiche.

In 23 sono riportati i risultati ottenuti, ed il relativo valore di  $\eta$  espressa in %, considerando che la periodica sostituzione dell'intera coltura planctonica è avvenuta con un medium batterico avente concentrazione costante di T.O.C. pari a 3420 mg/l.

Tabella 27 - Valori di rimozione percentuali per le 6 MFC sopra considerate

MFC	T.O.C. finale (mg/l)	Efficienza di rimozione (%)
MFC bicamera numero 1, con spazzola inoculato con batteri conservati in atmosfera di azoto	504,6	85,24
MFC bicamera numero 2, con spazzola inoculato con batteri conservati sotto paraffina	350,6	89,75
MFC bicamera numero 3, con elettrodo piano inoculato con coltura planctonica	651,6	80,95
MFC monocamera numero 4, con spazzola inoculato con batteri conservati in atmosfera di azoto	438,2	87,19
MFC monocamera numero 5, con spazzola inoculato con batteri conservati sotto paraffina	359,4	89,49
MFC monocamera numero 6, con elettrodo piano inoculato con batteri conservati in atmosfera d'azoto	465	86,40

L'andamento dell'efficienza di rimozione per le MFC è riportato in figura 131

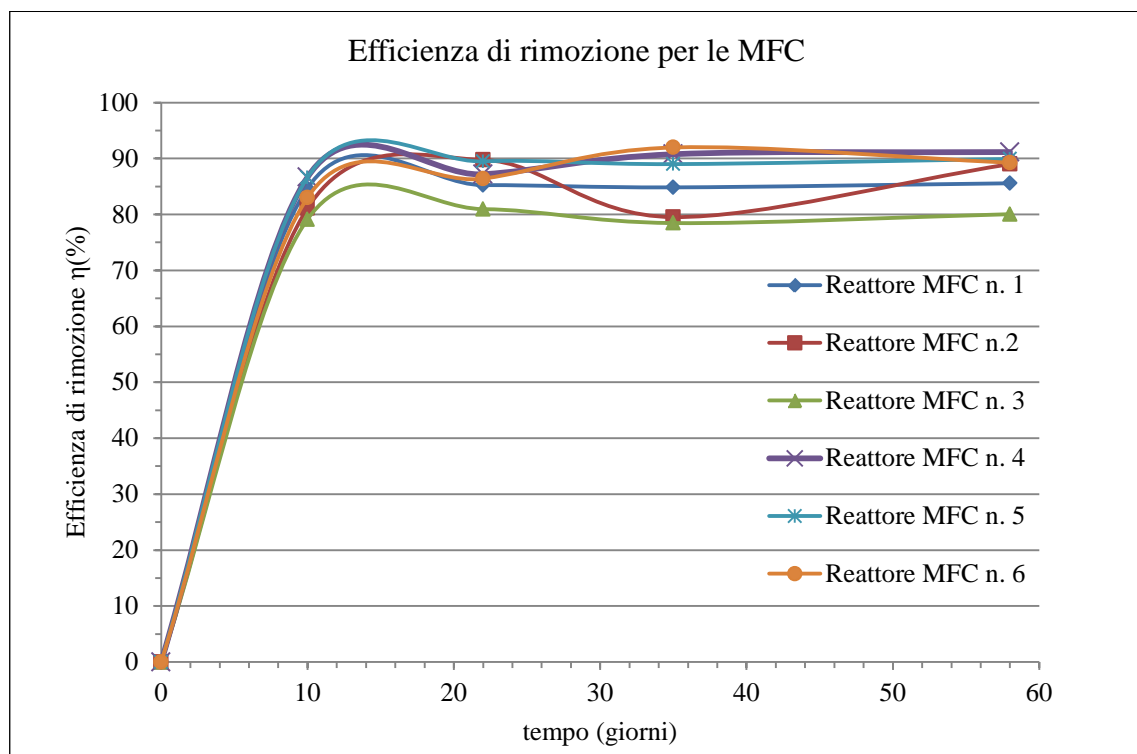


Figura 131 - Andamento dell'efficienza di rimozione nel corso di funzionamento delle 6 MFC.

Il grafico mostra delle ottime capacità di abbattimento del carico organico per tutti i sistemi MFC studiati; infatti i valori dell'efficienza di rimozione del carbonio organico sono quasi tutti compresi tra l'80 ed il 90% circa.

In particolare i sistemi MFC monocamera mostrano un'efficienza del carbonio organico leggermente superiore a quella dei sistemi bicamera (mediamente si riscontra un valore di  $\eta$  pari a 83,19% nei design bicamera, contro l'88,45% nei design monocamera).

Sono state inoltre analizzate le concentrazioni dei principali anioni inquinanti presenti in un liquame, in particolare i nitrati, i solfati ed i fosfati.

Per quanto riguarda i nitrati, le condizioni anaerobiche dell'anodo ne hanno permesso una rimozione pressochè totale; infatti, sin dalla fine del primo ciclo il cromatografo ionico non ha rilevato la presenza di tali anioni in nessuna delle fuel cells in opera.

Anche per i solfati la rimozione è avvenuta pressochè totalmente; è stata solamente riscontrata la presenza di circa 8,14 mg/l nel reattore MFC n. 2 e di 6,76 mg/l nel reattore MFC n. 3.

Per quel che riguarda i fosfati la percentuale di rimozione, come mostra la Tabella 28, si è attestata su valori più bassi, fatta eccezione per il sistema MFC monocamera dotato di elettrodo piano, la cui percentuale di rimozione media dei fosfati si è rilevata superiore all'87%. Ciò era del tutto prevedibile considerando che i fosfati, a differenza degli altri anioni citati, non hanno meccanismi di rimozione diversa se non l'assimilazione come nutrienti da parte della biomassa generata.

*Tabella 28 - Percentuale di rimozione dei fosfati media nelle varie MFC*

n. MFC	% di rimozione dei fosfati media
1	42,76
2	7,02
3	15,37
4	41,48
5	52,49
6	87,19

#### 7.2.4 Analisi dei frammenti di restrizione

Per confermare la presenza del ceppo elettrogenico *G. sulfurreducens* all'interno dei reattori è stata effettuata un'analisi dei frammenti di restrizione. A tal fine al termine del primo ciclo da ogni reattore è stato prelevato un volume di terreno di coltura pari a 10 ml; è stata effettuata l'estrazione di DNA totale e successivamente tramite PCR è stato amplificato il gene 16S rRNA.

In figura 132 vengono riportati a titolo esemplificativo i risultati ottenuti relativamente al reattore MFC n. 2; i risultati per gli altri reattori MFC sono del tutto analoghi.

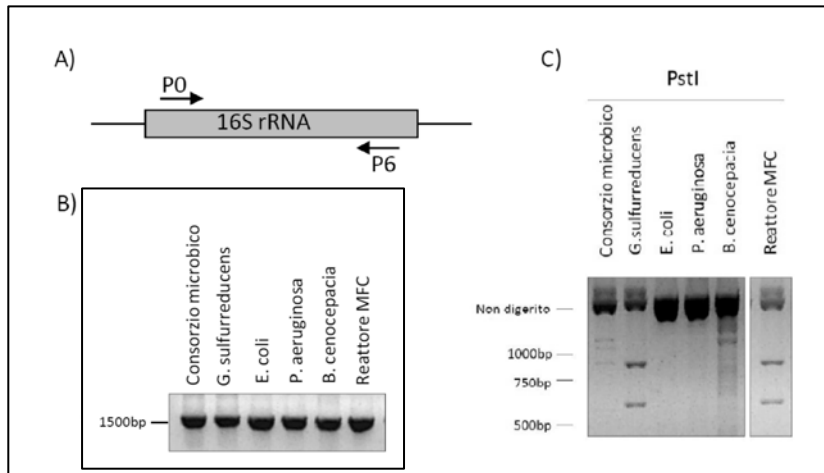


Figura 132 - Analisi dei frammenti di restrizione: A) schema esemplificativo del gene 16S rRNA e dei primers (P0 e P6) utilizzati nel processo di amplificazione per PCR; B) gel d'agarosio dei prodotti di PCR delle diverse colture esaminate; C) analisi dei frammenti di restrizione tramite l'enzima PstI.

prodotto di PCR, indipendentemente dalla specie batterica, produce un frammento di DNA di circa 1500 bp (base pairs); tuttavia, quello che realmente distingue un microrganismo è la sequenza specifica del gene. Questa si può analizzare direttamente mediante clonaggio e sequenziamento, oppure indirettamente tramite analisi dei polimorfismi di restrizione; si è scelto quest'ultimo metodo poichè senza dubbio più rapido e meno costoso del primo. Oltre al ceppo in esame *G. sulfurreducens*, sono stati analizzati in-silico i polimorfismi di restrizione di una serie di microrganismi che fanno notoriamente parte di comunità batteriche elettrogeniche quali: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cenocepacia*.

Per ottenere conferma della presenza di *G. sulfurreducens* nella coltura, dall'analisi delle sequenze è stato selezionato l'enzima di restrizione PstI che taglia in maniera specifica esclusivamente il DNA di *G. sulfurreducens* e non quello degli altri ceppi esaminati. Il taglio effettuato da tale enzima produce due frammenti di dimensioni pari a 664 bp e 857 bp che sono ben distinguibili tramite elettroforesi, come è possibile osservare dal gel d'agarosio in Figura 126 B per la coltura pura di *G. sulfurreducens*. Si osserva inoltre l'assenza di frammenti di digestione per *E. coli* e per *P. aeruginosa*, mentre in *B. cenocepacia* si osserva un bandeggio diffuso. Come ulteriore controllo è stato analizzato il DNA a partire da un consorzio microbico misto coltivato in ambiente anaerobico ed anche in questo caso è possibile escludere la presenza di *G. sulfurreducens*, in quanto non sono presenti i frammenti di restrizione attesi. Per quanto riguarda



l'analisi del campione di coltura prelevato dal reattore MFC, si osservano due frammenti delle dimensioni attese ad indicare la presenza nella coltura di *G. sulfurreducens*.

#### 7.2.5 Altri parametri operativi: concentrazione di ossigeno, pH

Al fine di assicurare sufficiente apporto di O<sub>2</sub> per far avvenire la reazione di formazione di acqua al catodo in maniera tale da chiudere il circuito elettrico della cella, è stata periodicamente misurata la concentrazione di ossigeno in camera catodica. L'inserimento nel compartimento catodico (delle celle bicamera) di un diffusore d'aria a bolle fini ha garantito che la soluzione si sia mantenuta prossima ai livelli di saturazione di ossigeno per tutta la durata del funzionamento delle celle a combustibile. I valori di concentrazione di ossigeno disciolto in soluzione in cella catodica sono infatti risultati tutti compresi tra l'85% ed il 100% del valore di saturazione a temperatura ambiente.

Non è stato previsto alcun tipo di sistema di riscaldamento delle celle a combustibile microbiche, poichè precedenti studi non hanno dimostrato un effettivo contributo positivo all'attività esolettrogenica dei microrganismi; questi ultimi infatti hanno dimostrato buone capacità di adattamento a diversi livelli di temperatura, a differenza dei batteri metanigeni, i quali sono molto sensibili alla temperatura e presentano le migliori condizioni di sviluppo a temperature superiori ai 30 °C, come in un comune digestore anaerobico (le cui temperature di lavoro si aggirano intorno ai 35 °C). Si rischierebbe quindi, a temperature superiori a quella ambiente, di favorire la produzione di metano anzichè di elettricità, con effetti negativi sulla produzione di corrente. Inoltre, un eventuale sistema riscaldante andrebbe ad aumentare i costi di esercizio per le celle a combustibile microbiche, rendendo ancor più difficoltosa la realizzazione di tali sistemi su una più vasta scala. È stato infine misurato il potenziale redox ed il pH all'interno delle celle catodiche, aerobiche, e delle soluzioni spurgate all'anodo. Tali valori sono risultati, rispettivamente, molto simili tra loro nelle varie MFC. Per quanto riguarda il pH, infatti, si è mantenuto su valori di  $6,23 \pm 0,5$  per quanto riguarda l'anodo, e di  $8,37 \pm 0,6$  al catodo, in tutti i tipi di reattore. Il potenziale redox è risultato pari a  $+83 \pm 50$  mV al catodo, e  $-213 \pm 35$  mV all'anodo.

#### 7.3 Analisi e commento dei dati sperimentali-fase II: elettrodi piani in grafite e in gomma siliconica

In questa fase II, denominata *elettrodi di grafite piana e in gomma siliconica* sono stati sviluppati

dei prototipi di celle a combustibile microbiche (MFC) per la produzione diretta di energia elettrica e l'abbattimento del carico organico in alimentazione. Tali prototipi sono stati realizzati in scala da laboratorio, secondo una delle configurazioni reattoristiche maggiormente utilizzate in letteratura: cella a combustibile microbica bicamera, ("H-type") [25].

Complessivamente sono state realizzate sei MFC del tipo bicamera, aventi le seguenti caratteristiche:

- Elettrodi in grafite siliconica, con area superficiale anodica pari all'area superficiale catodica;
- Elettrodi in grafite pressata su carta, con area superficiale anodica pari all'area superficiale catodica;
- Elettrodi in grafite pressata su carta, con area superficiale anodica pari alla metà dell'area superficiale catodica;
- Elettrodi in grafite pressata su carta, con area superficiale anodica pari al doppio dell'area superficiale catodica;
- Elettrodi in grafite pressata su carta, con area superficiale anodica pari all'area superficiale catodica, ma di dimensioni doppie rispetto al punto 1.

Per semplicità, per le sei celle, si introduce la seguente denominazione:

- 1) SG 1:1 → elettrodi in grafite siliconica con rapporto anodo/catodo 1:1 (2,5 cm x 2,5 cm);
- 2) G 1:1 → elettrodi in grafite pressata su carta con rapporto anodo/catodo 1:1 (2,5 cm x 2,5 cm);
- 3) G 1:2 → elettrodi in grafite pressata su carta con rapporto anodo/catodo 1:2 (2,5 cm x 5 cm);
- 4) G 2:1 → elettrodi in grafite pressata su carta con rapporto anodo/catodo 2:1 (5 cm x 2,5 cm);
- 5) G 2:2 → elettrodi in grafite pressata su carta con rapporto anodo/catodo 2:2 (5 cm x 5 cm);
- 6) SG 1:2 → elettrodi in grafite siliconica con rapporto anodo/catodo 1:2 (5 cm x 2,5 cm).

Si procede quindi a caratterizzare le sei MFC sulla base dei suddetti parametri:

1. SG 1:1) MFC bicamera con inoculo di *Geobacter sulfurreducens* conservati in atmosfera d'azoto (denominata "SG 1:1"):

- elettrodo dell'anodo in grafite su gomma siliconica a forma piana con superficie di 25 cm<sup>2</sup> (5 x 2,5 x 2<sup>2</sup> cm), anaerobico;

---

<sup>2</sup> il doppio della superficie piana serve per considerare entrambe le facce dell'elettrodo.

- elettrodo del catodo in grafite su gomma siliconica a forma piana con superficie di 25 cm<sup>2</sup> (5 x 2,5 x 2 cm), aerobico;
- volume inoculo = 200 ml;
- R<sub>est</sub> = 217,32 ± 0,03 Ω (misurata con il metodo a 4 fili);

e di seguito una fotografia, a sinistra delle parti assemblate ed a destra in funzione:

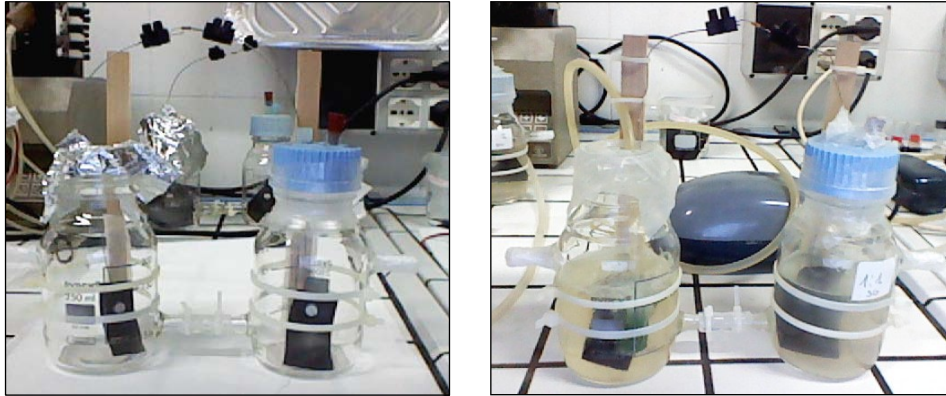


Figura 133 - MFC denominata SG 1:1.

Vogliamo elencare i componenti ed i materiali impiegati per l'allestimento di questa MFC, che sono stati modificati e sono differenti rispetto a quelli già impiegati nella fase I delle ricerche:

□ Foglio di silicone rinforzato con fibra di carbonio (Laird Technologies, USA) impiegato per realizzare gli elettrodi in grafite siliconata; è stata acquistata alla Rs Components ed è un elastomero in silicone elettricamente conduttivo riempito di carbone che fornisce una schermatura elettromagnetica di base su banda larga e la messa a terra di cariche elettrostatiche all'effetto corona, e le caratteristiche principali sono qui riportate, insieme ad una immagine:

Composto in silicone conforme a UL94HB
Resistività 5-10 ohm/cm
Tenuta ambientale fino a IP65
Temperature d'esercizio: -55 °C → +200 °C



□ Confezione di dadi ISO metrici in nylon 6,6 conformi a DIN 555 e rondelle piane conformi a DIN 125, di colore avorio, del quale riportiamo una immagine:



ed inoltre le viti ISO metriche ad intaglio in nylon, con testa cilindrica.

2. G 1:1) MFC bicamera con inoculo di *Geobacter sulfurreducens* conservati in atmosfera d'azoto (denominata "G 1:1"):

- elettrodo dell'anodo in grafite pressata su carta a forma piana con superficie di  $25 \text{ cm}^2$  ( $5 \times 2,5 \times 2 \text{ cm}$ ), anaerobico;
- elettrodo del catodo in grafite pressata su carta a forma piana con superficie di  $25 \text{ cm}^2$  ( $5 \times 2,5 \times 2 \text{ cm}$ ), aerobico;
- volume inoculo = 200 ml;
- membrana protonica: NAFION 117 (pretrattato);
- $R_{\text{est}} = 219,95 \pm 0,03 \Omega$  (misurata con il metodo a 4 fili);

e di seguito una fotografia:



*Figura 134 - MFC denominata G 1:1.*

3. G 1:2) MFC bicamera con inoculo di *Geobacter sulfurreducens* conservati in atmosfera d'azoto (denominata "G 1:2"):

- elettrodo dell'anodo in grafite pressata su carta a forma piana con superficie di  $25 \text{ cm}^2$  ( $5 \times 2,5 \times 2 \text{ cm}$ ), anaerobico;
- elettrodo del catodo in grafite pressata su carta a forma piana con superficie di  $50 \text{ cm}^2$  ( $5 \times 5 \times 2 \text{ cm}$ ), aerobico;
- volume inoculo = 200 ml;
- membrana protonica: NAFION 117 (pretrattato);
- $R_{\text{est}} = 217,32 \pm 0,03 \Omega$  (misurata con il metodo a 4 fili);

e di seguito una fotografia:



*Figura 135 - MFC denominata G 1:2.*

4. G 2:1) MFC bicamera con inoculo di *Geobacter sulfurreducens* conservati in atmosfera d'azoto (denominata "G 2:1"):

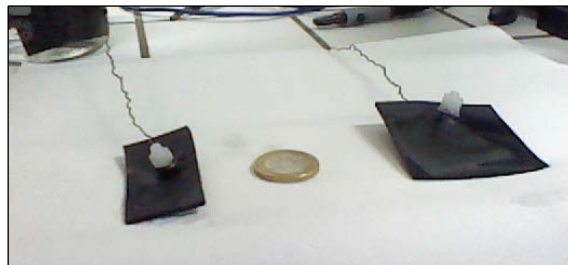
- elettrodo dell'anodo in grafite su gomma siliconica a forma piana con superficie di 50 cm<sup>2</sup> (5 x 5 x 2 cm), anaerobico;
- elettrodo del catodo in grafite su gomma siliconica a forma piana con superficie di 25 cm<sup>2</sup> (5 x 2,5 x 2 cm), aerobico;
- volume inoculo = 200 ml;
- membrana protonica: NAFION 117 (pretrattato);
- $R_{est} = 217,72 \pm 0,03 \Omega$  (misurata con il metodo a 4 fili);

e di seguito una fotografia:



*Figura 136 - MFC denominata G 2:1.*

e di seguito una immagine dei due elettrodi, ancora non immersi nelle camere della MFC G 2:1:



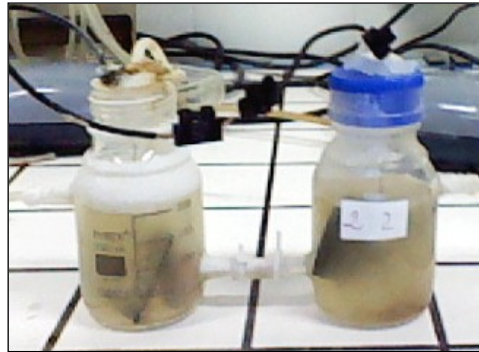
*Figura 137 - Immagine degli elettrodi della MFC denominata SG 2:1.*

5. G 2:2) MFC bicamera con inoculo di *Geobacter sulfurreducens* conservati in atmosfera d'azoto (denominata "G 2:2"):

- elettrodo dell'anodo in grafite su gomma siliconica a forma piana con superficie di 50 cm<sup>2</sup> (5 x 5 x 2 cm), anaerobico;
- elettrodo del catodo in grafite su gomma siliconica a forma piana con superficie di 50 cm<sup>2</sup> (5 x 5 x 2 cm), aerobico;
- volume inoculo = 200 ml;
- membrana protonica: NAFION 117 (pretrattato);

- $R_{est} = 217,32 \pm 0,03 \Omega$  (misurata con il metodo a 4 fili);

e di seguito una fotografia:



*Figura 138 - MFC denominata G 2:2.*

6. SG 2:1) MFC bicamera con inoculo di *Geobacter sulfurreducens* conservati in atmosfera d'azoto:

- elettrodo dell'anodo in grafite su gomma siliconica a forma piana con superficie di  $50 \text{ cm}^2$ , anaerobico;
- elettrodo del catodo in grafite su gomma siliconica a forma piana con superficie di  $25 \text{ cm}^2$ , aerobico;
- volume inoculo = 200 ml;
- membrana protonica: NAFION 117 (pretrattato);
- $R_{est} = 217,32 \pm 0,03 \Omega$  (misurata con il metodo a 4 fili);

e di seguito una fotografia:



*Figura 139 - MFC denominata SG 2:1.*

Di seguito sono riportati gli andamenti nel tempo della densità di potenza e della densità di corrente erogate da ciascuna cella a combustibile microbica; le linee tratteggiate in verticale indicano l'inizio di un nuovo ciclo di alimentazione, ovvero i giorni in corrispondenza dei quali ogni reattore è stato spurgato per essere poi reintegrato con medium batterico fresco, al fine di ripristinare le condizioni iniziali in termini di concentrazione di nutrienti, necessari al metabolismo batterico, a partire dal numero del giorno sul quale si trova il semicerchio dello stesso colore. I grafici che vengono riportati sono 2 per ciascuna MFC, racchiusi in un riquadro;

sul primo si possono leggere le tensioni e le correnti, ma anche i valori di resistenza interna durante tutta la durata del ciclo di misura; mentre nel secondo grafico si riporta la potenza elettrica e la densità di corrente. In tutti i grafici vengono riportate le barre di errore, pari ad i valori dell'incertezza per ciascuna grandezza in esame calcolata con la teoria della propagazione degli errori.

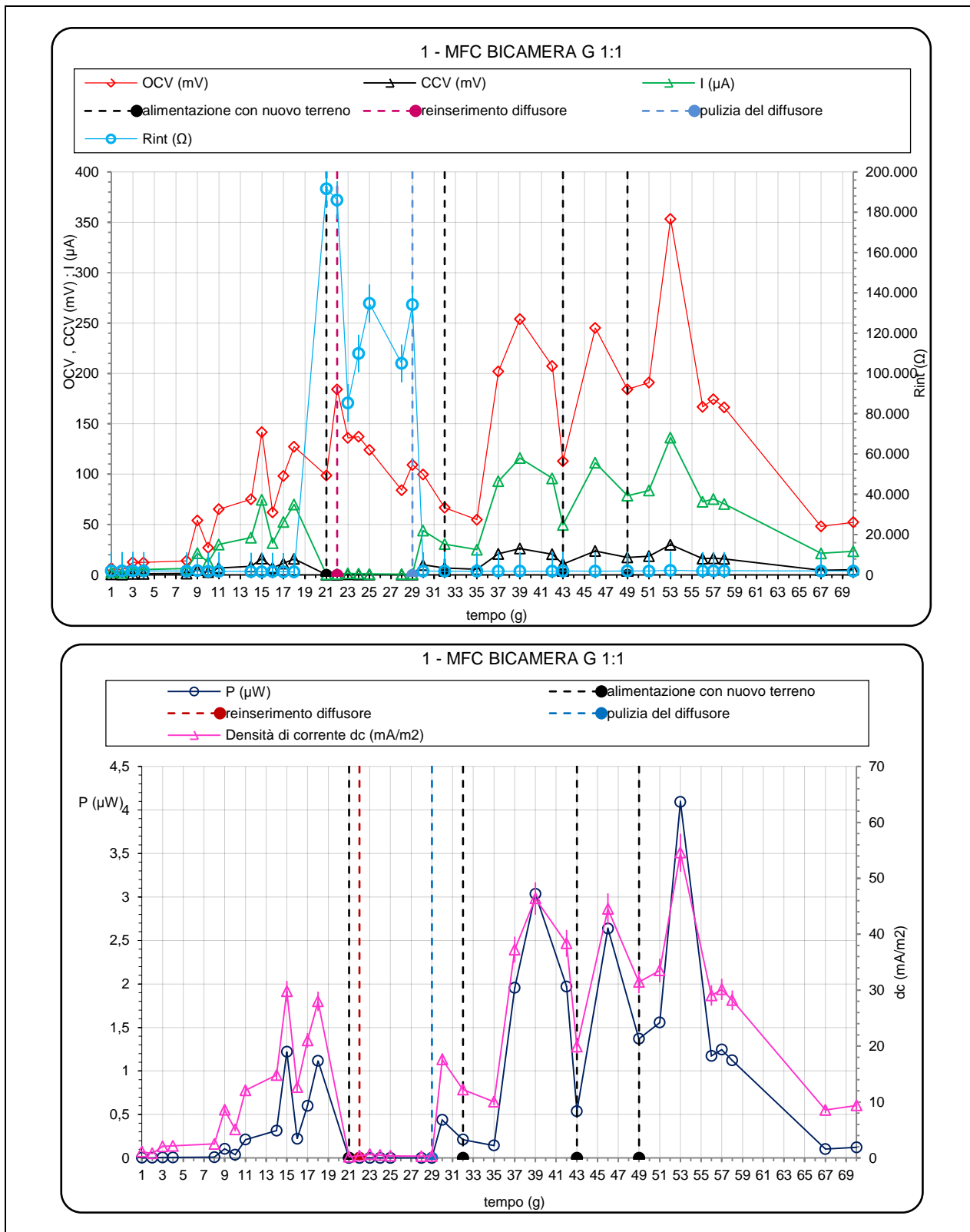


Figura 140 - Andamento delle grandezze elettriche per la MFC denominata G 1:1.

A seguito di un nuovo ciclo di alimentazione, in corrispondenza di un brusco calo della grandezza considerata, l'attività elettrogenica dei *Geobacter* è ripresa e la densità di corrente ha raggiunto un nuovo valore massimo. Ciò si è sempre verificato tra le 24 e le 48 ore successive alla nuova alimentazione.

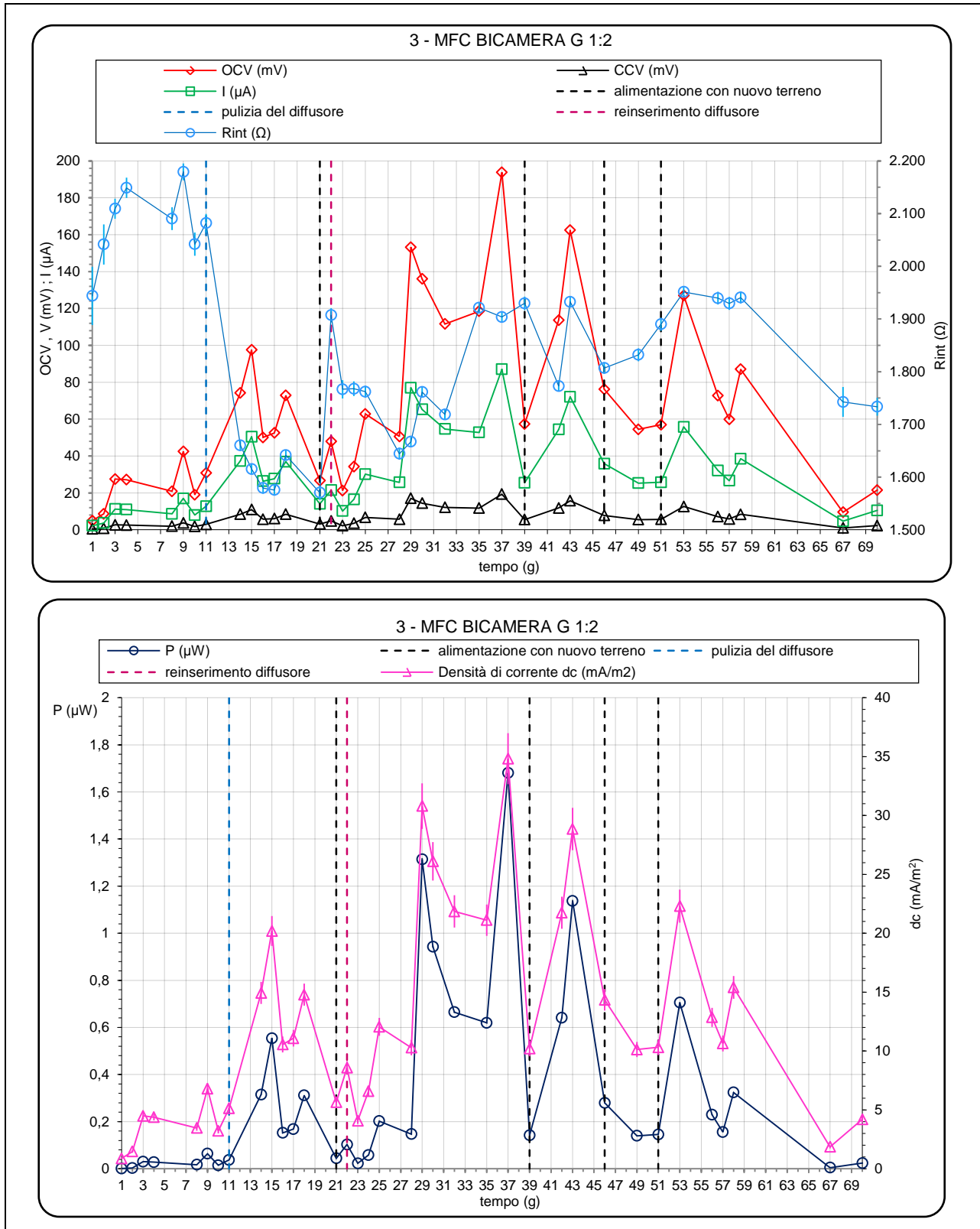


Figura 141 - Andamento delle grandezze elettriche per la MFC denominata G 1:2 .





Figura 142 - Andamento delle grandezze elettriche per la MFC denominata G 2:1.

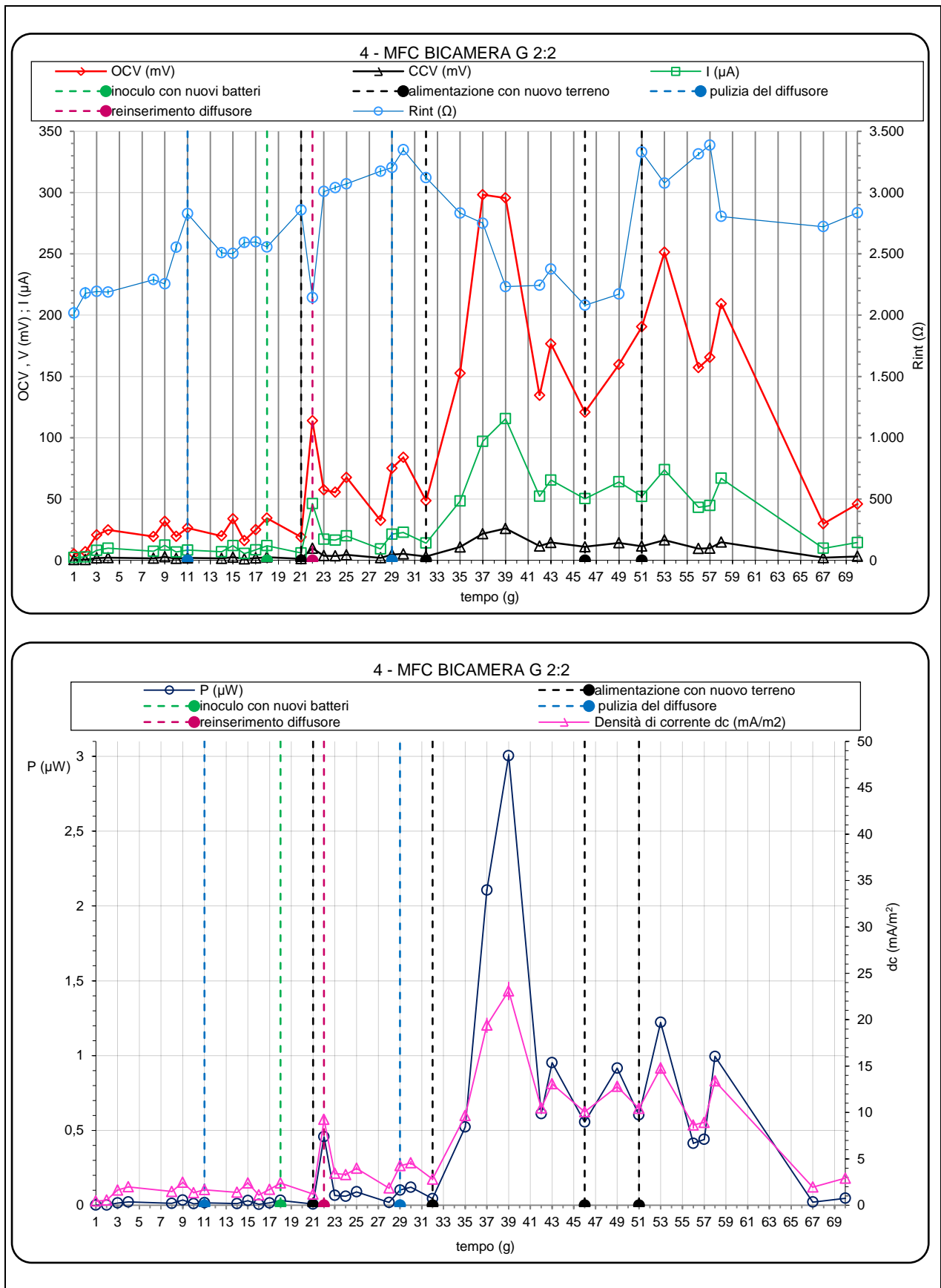


Figura 143 - Andamento delle grandezze elettriche per la MFC denominata G 2:2.

Dalla figura si può notare che la G 2:2 (anodo e catodo di stesse dimensioni) genera potenze più alte della G 2:1 (anodo doppio rispetto al catodo). Nella bicamera G 2:2 risulta, infatti, minima la

distanza tra gli elettrodi (a parità di volume della cella). I protoni che dal compartimento anodico migrano a quello catodico dovranno quindi percorrere una distanza minore.

Indipendentemente dalla dimensione dell'anodo, maggiore è la superficie del catodo e maggiore è il ritardo nella generazione di elettricità. Sia per la G 1:2 che per la G 2:2 bisogna aspettare almeno 20 giorni per avere produzione di corrente ma che, trascorsi circa 35 giorni e subito dopo il secondo ciclo di alimentazione, le sue prestazioni sono nettamente migliori.

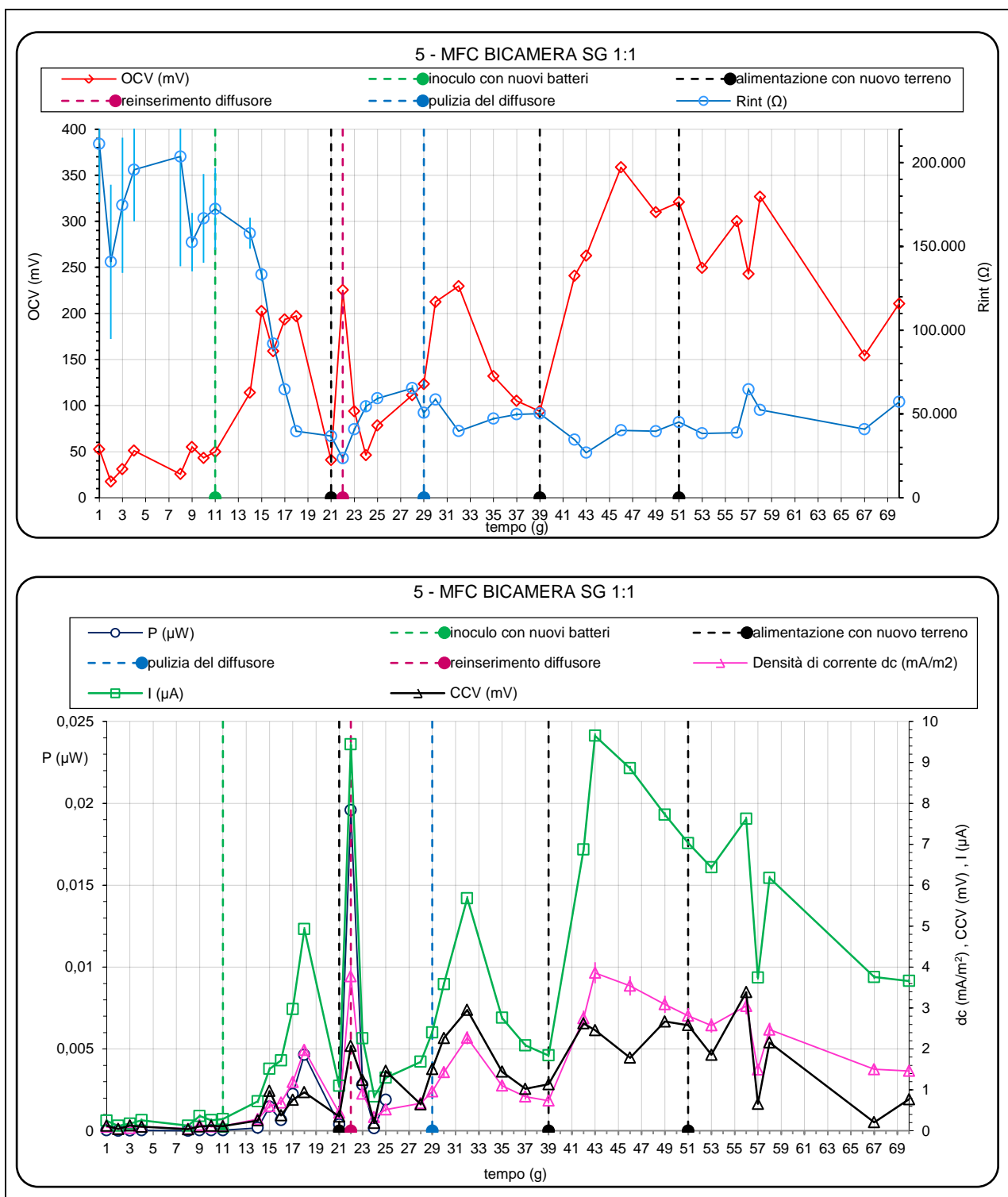


Figura 144 - Andamento delle grandezze elettriche per la MFC denominata SG 1:1.

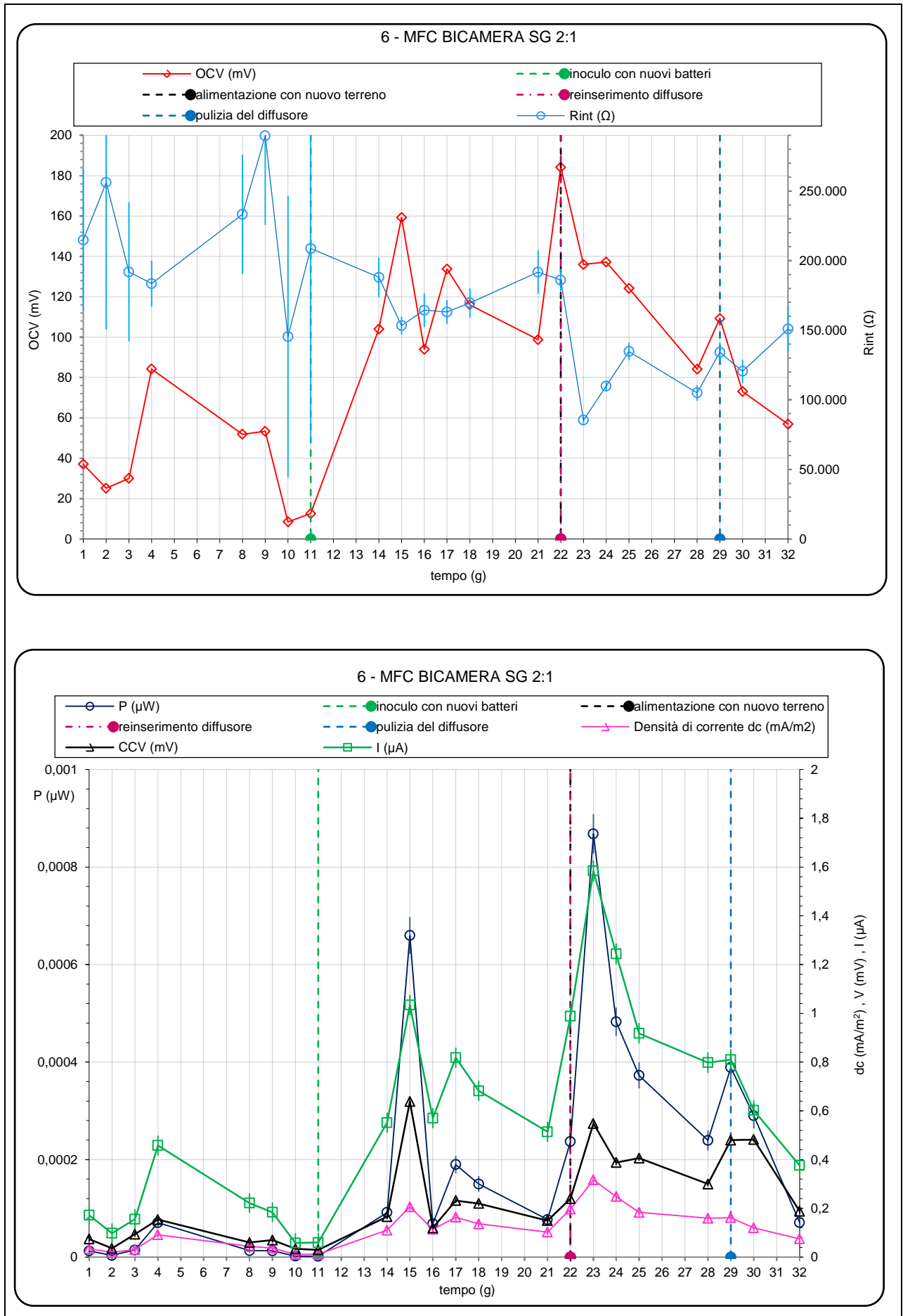


Figura 145 - Andamento delle grandezze elettriche per la MFC denominata SG 2:1.

I valori di potenza, calcolati come prodotto del valore medio giornaliero di tensione  $V$  per quello medio giornaliero di corrente  $I$ , sono stati normalizzati rispetto alla superficie anodica, come si legge in quasi tutti gli articoli scientifici in materia.

Dall'andamento dei grafici sopra riportati si evince come, in linea con i valori riscontrabili in letteratura, l'andamento della produzione di corrente sia stato di natura ciclica: in ogni ciclo, a partire dall'alimentazione di terreno fresco ("medium") si è avuta una produzione di corrente (e di potenza) oscillatoria crescente, che raggiunge un valore massimo a partire dal quale l'attività elettrogenica batterica inizia una progressiva diminuzione, fino a tornare a valori comparabili con quelli misurabili prima dell'alimentazione.

Un rapido aumento della produzione di corrente si riscontra nel giro di 24 - 48 ore; ciò conferma l'intensa attività elettrogenica dei *Geobacter* presenti nella forma adesa sulla superficie dell'anodo. Tali microrganismi si riproducono attraverso il metabolismo batterico del substrato nutriente, portando a "saturare" la soluzione e l'elettrodo nel giro di uno o due giorni circa; corrispondentemente, si ha il "picco" di produzione di energia.

Il penultimo ciclo di alimentazione è stato fatto dimezzando la dose di medium batterico fresco, da 200 ml a 100 ml totali. Solo le microbial fuel cells con rapporto tra gli elettrodi 1:1, indipendentemente dal materiale grafittico impiegato, sembrano non aver risentito affatto della riduzione della quota di reintegro del nuovo terreno. Ciò si evince da un picco massimo di densità di potenza maggiore di quello relativo alle precedenti alimentazioni. Mettendo a confronto i valori massimi registrati a seguito del secondo e terzo ciclo di alimentazione per la SG 1:1 e terzo e quarto ciclo di alimentazione per la G 1:1 si ha, infatti, un valore di densità di potenza massima pari a  $10,33 \mu\text{W}/\text{m}^2$  contro  $9,49 \mu\text{W}/\text{m}^2$  per l'una e  $1,64 \text{mW}/\text{m}^2$  contro  $1,05 \text{mW}/\text{m}^2$  per l'altra. Discorso diverso, invece, va fatto per gli altri reattori. In questo caso, la riduzione della dose del medium batterico fresco determina un abbassamento del picco massimo di densità di potenza rispetto a quello relativo alle precedenti alimentazioni, in maniera tanto più marcata quanto maggiori sono le dimensioni dell'anodo.

Infatti, i microrganismi produttori di elettricità colonizzano la superficie anodica ed è lecito pensare che maggiore è quest'ultima, maggiore è il numero di "colonizzatori" e, pertanto, maggiore dovrà essere l'apporto di nutrienti. Nella tabella seguente sono riportati i valori massimi di tutte le MFC, desunti dagli andamenti registrati durante il periodo di sperimentazione; ai valori viene associato il valore di incertezza:

tipo e denominazione MFC		OCV (mV)	CCV (mV)	I ( $\mu$ A)	P ( $\mu$ W)	R <sub>int</sub> ( $\Omega$ )	DC (mA/m <sup>2</sup> )	PD (mW/m <sup>3</sup> )	CD (A/m <sup>3</sup> )	dp (mW/m <sup>2</sup> )
<b>bicamera G</b>	<b>1:1</b>	332,1 ±0,4	0,7 ±0,1	3,44 ±0,21	0,00234 ±0,00049	96.310 ±6.007	1,375 ±0,166	0,012 ±0,0036	0,017 ±0,001	0,00094 ±0,00004
	<b>1:2</b>	434,7 ±0,5	0,5 ±0,1	2,4 ±0,21	0,00123 ±0,00035	180.950 ±15.820	0,959 ±0,14	0,0066 ±0,0025	0,012 ±0,001	0,00052 ±0,00002
	<b>2:1</b>	282,9 ±0,4	4,0 ±0,1	11,85 ±0,06	0,0479 ±0,00149	23.423 ±170	2,37 ±0,108	0,2394 ±0,01296	0,059 ±0,0005	0,00958 ±0,00028
	<b>2:2</b>	266,5 ±0,4	3,9 ±0,1	10,66 ±0,06	0,04201 ±0,00135	24.517 ±188	2,133 ±0,098	0,2101 ±0,01163	0,053 ±0,0004	0,0084 ±0,00024
<b>bicamera SG</b>	<b>1:1</b>	225,32 ±0,24	2,07 ±0,01	9,44 ±0,06	0,019578 ±0,000236	23.548 ±176	3,776 ±0,250	0,0979 ±0,0014	0,047 ±0,0004	0,00783 ±0,00056
	<b>2:1</b>	135,99 ±0,15	0,55 ±0,01	1,58 ±0,04	0,000868 ±0,000040	85.405 ±2.431	0,317 ±0,021	0,0043 ±0,0002	0,008 ±0,0002	0,00017 ±0,00002

I valori di corrente generati dalla MFC con elettrodi in grafite siliconica sono minori di circa un ordine di grandezza rispetto a quelli ottenuti con grafite pressata su carta.

L'SG è risultato, quindi, un materiale che mal si presta ad applicazioni di questo tipo. Ciò è molto probabilmente dovuto alla più bassa carica superficiale di carbonio rispetto all'altro tipo di elettrodo impiegato, da cui una minore conducibilità.

Maggiore è la carica superficiale di carbonio infatti, migliore è l'adesione dei batteri all'elettrodo e più facile è il trasferimento di elettroni, responsabili del flusso di corrente.

Un primo raffronto dei valori di corrente e potenza, in funzione della superficie dell'elettrodo anodico, sono quelli riportati nei grafici delle seguenti figure 146 e 147, che mostrano come le Densità di corrente dc e di potenza dp aumentino di fattori considerevoli già al solo raddoppio della superficie dell'elettrodo in grafite su gomma siliconica, che passa da 0,0025 m<sup>2</sup> per le MFC bicamera 1:1 e 1:2 a 0,005 m<sup>2</sup> per le MFC bicamera 2:1 e 2:2:

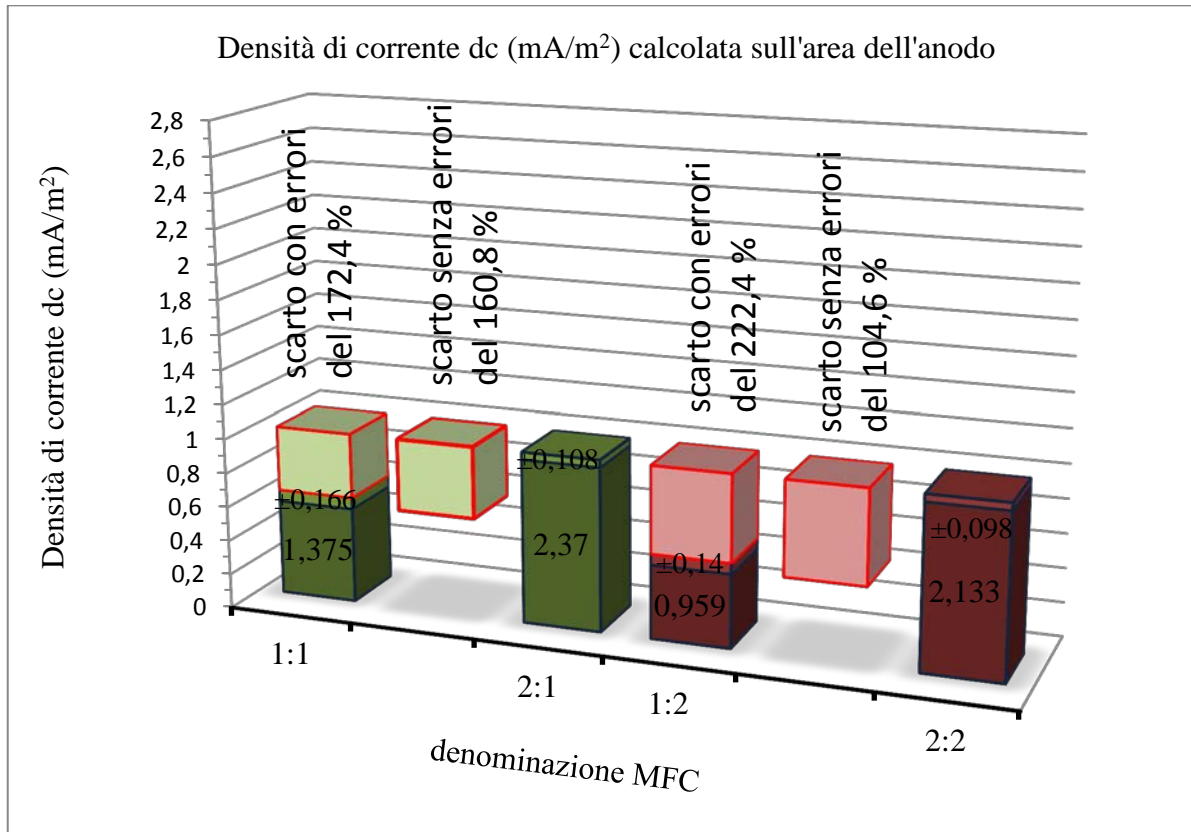


Figura 146 - Grafico della densità di corrente, per tutti e 4 i tipi di MFC.

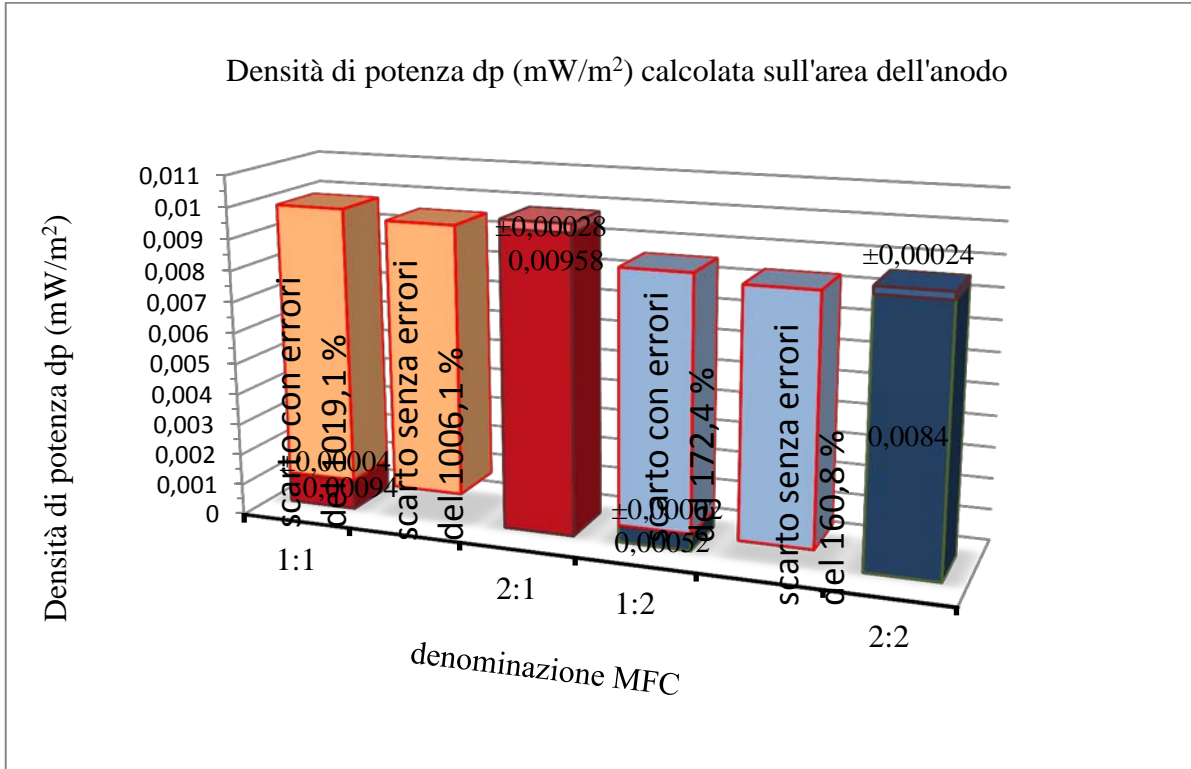


Figura 147 - Grafico della densità di potenza, per tutti e 4 i tipi di MFC.

Fissata la superficie anodica ( $25 \text{ cm}^2$ ), raddoppiando il catodo non si ha un aumento di potenza, contrariamente a quanto previsto in base alla letteratura. Ma i dati di letteratura sono difficilmente comparabili, in quanto ricavati in condizioni diverse e ottenuti in reattori con geometria, caratteristiche e alimentazioni diverse. Inoltre, bisogna considerare che nel presente studio non è stato seguito nessun approccio per migliorare la performance del catodo e abbassare la sovratensione per l'ossigeno (perdite d'attivazione), tra cui uso di mediatori, di catalizzatori, di ossidanti migliori. Per evitare che l'ossigeno possa costituire un fattore limitante nel comparto catodico, è necessario mantenerne elevata la concentrazione, ma ciò comporterebbe, inevitabilmente, un aumento della sua diffusione nel comparto anodico, causando un consumo improprio della sostanza organica.

L'andamento nel tempo della resistenza interna della cella a combustibile microbica con elettrodi in grafite siliconica si è mostrato particolarmente instabile nella fase iniziale, con valori piuttosto elevati, per poi assestarsi dopo un periodo di circa 20 giorni su valori ben più bassi di quelli iniziali, con oscillazioni decisamente meno forti.

Per quanto riguarda invece le MFC con elettrodi in grafite pressata su carta i valori di resistenza interna si sono assestati sin da subito intorno a valori medi, con un andamento lievemente decrescente nel tempo.

Per tutte e cinque le MFC considerate in questa fase, si può osservare un picco massimo del valore della resistenza interna in corrispondenza del 66 – esimo giorno di funzionamento.

A tale picco massimo corrisponde, naturalmente, un minimo e della potenza e della corrente generate; ciò a causa dell'esaurimento dei nutrienti in soluzione.

A seguito dell'ultimo ciclo di alimentazione, nonostante il raggiungimento di valori minimi delle grandezze elettriche prese in esame, l'attività elettrogenica dei batteri è ripresa e la resistenza interna si è riportata su valori più bassi.

I bassi valori di corrente, ottenuti con le MFC oggetto del presente lavoro di tesi, possono ricondursi all'elevata sovratensione della reazione di riduzione dell'ossigeno ad  $\text{H}_2\text{O}$ , che si verifica al catodo.

In primo luogo la bassa solubilità dell'  $\text{O}_2$  in acqua (9,1 mg/l alla temperatura di  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  e a pressione atmosferica) limita la disponibilità dell'elettron-accettore; secondariamente, l'elevata energia di attivazione (energia necessaria a rompere il legame O-O) della reazione di riduzione determina elevate perdite catodiche.



Sulla base dei principi dell'elettrochimica "l'overpotential" della riduzione dell'ossigeno al catodo dipende dalla densità di corrente, come mostra la seguente equazione, nota come equazione di Butler-Volmer:

$$i = i_0 \left[ \exp \frac{\beta F \eta_{\text{cat}}}{RT} - \exp \frac{-(1-\beta) F \eta_{\text{cat}}}{RT} \right]$$

Nell'equazione  $\eta_{\text{cat}}$  è la sovratensione catodica (OCV-CCV, V), R la costante dei gas ideali (8,31 J/mol K), T la temperatura assoluta (K),  $\beta$  un fattore di simmetria (una costante che determina la dipendenza dell'energia di attivazione sul potenziale d'elettrodo e che, per un processo catodico, ci dice che essa aumenta con il potenziale, F la costante di Faraday (96,485 C/mol), i la densità di corrente (mA/m<sup>2</sup>) e  $i_0$  è la densità di corrente di scambio, un parametro che dipende dall'energia di attivazione della reazione di riduzione in condizioni di equilibrio.

Se la sovratensione è compresa tra 80 e 100 mV alla temperatura di 25 °C, il secondo termine in parentesi diventa trascurabile e l'equazione di B-V può essere semplificata nella più nota equazione di Tafel:

$$\ln \frac{i}{i_0} = \frac{\beta F \eta_{\text{cat}}}{RT}$$

L'equazione mostra che la sovratensione di attivazione aumenta con la densità di corrente. Pertanto, invece di usare un catalizzatore per ridurre l'energia di attivazione della reazione di riduzione dell'ossigeno e quindi aumentare il parametro  $i_0$ , si può ridurre la densità di corrente impiegando un elettrodo non catalizzato con elevata area superficiale.

### 7.3.1 Parametri chimici operativi: potenziale redox catodico, pH

Quotidianamente, nel compartimento catodico di ciascuna cella a combustibile microbica, è stata introdotta la sonda di misura per misurare i valori di pH e di potenziale redox. I valori sono stati rilevati con un pH-meter della CRISON, modello GLP 22 di tipo portatile e la sonda impiegata è del tipo 52 02 che utilizza come sensore un elettrodo a vetro combinato con un opportuno elettrodo di riferimento in Ag/AgCl e del quale vengono riportate le caratteristiche in tabella 29:



*Figura 148 - Il pH-meter CRISON GLP 22 in fase di misura del pH in una MFC.*

*Tabella 29 - Dati caratteristici della sonda per pH Crison 52 02*

Scala di pH	0 ÷ 12
Temperatura di lavoro	0 ÷ 80 °C
Elemento di riferimento	Filo di Ag ricoperto di AgCl
Diaframma	Ceramico
Elettrolita	CRISOLYT A
Materiale corpo	Vetro
Immersione minima	20 mm



Prima di ogni misura l'apparecchiatura è stata tarata impiegando due soluzioni standard a pH = 4,02 ed a pH = 7,0.

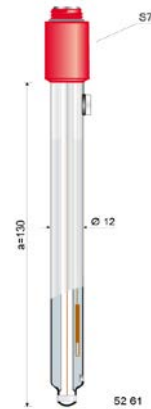
Ad analoghe misure sono stati sottoposti i campioni prelevati dal compartimento anodico in seguito al periodico spurgo previsto. Tali valori sono risultati abbastanza simili tra di loro, nelle varie MFC.

Nel compartimento catodico il pH si è mantenuto su valori di  $8,9 \pm 0,5$  in tutte le celle considerate; nel compartimento anodico si è invece registrato un valori di pH pari a  $6,6 \pm 0,3$ .

Il potenziale redox è stato misurato per via potenziometrica in maniera analoga alla misura del pH, inserendo un elettrodo redox di platino all'interno della soluzione stessa con un elettrodo CRISON tipo 52 61, le cui caratteristiche sono riportate in tabella 30, a fianco una sua immagine:

Tabella 30 - Dati caratteristici dell'elettrodo redox CRISON 52 61

Scala di misura	$\pm 2000$ mV
Metallo indicatore	Platino
Temperatura di lavoro	0 ÷ 80 °C
Riferimento	Cristalli di Ag / AgCl
Diaframma	Ceramico
Elettrolita	CRISOLYT A
Materiale corpo	Vetro
Punzonatura minima	12 mm
Tipo	52 61



Il potenziale redox è risultato pari a  $50 \pm 60$  mV al catodo e  $-121 \pm 30$  mV all'anodo. Qui di seguito vengono riportati gli andamenti del pH e del potenziale redox della semicella anodica, per ciascuna MFC, durante tutto il tempo di sperimentazione:

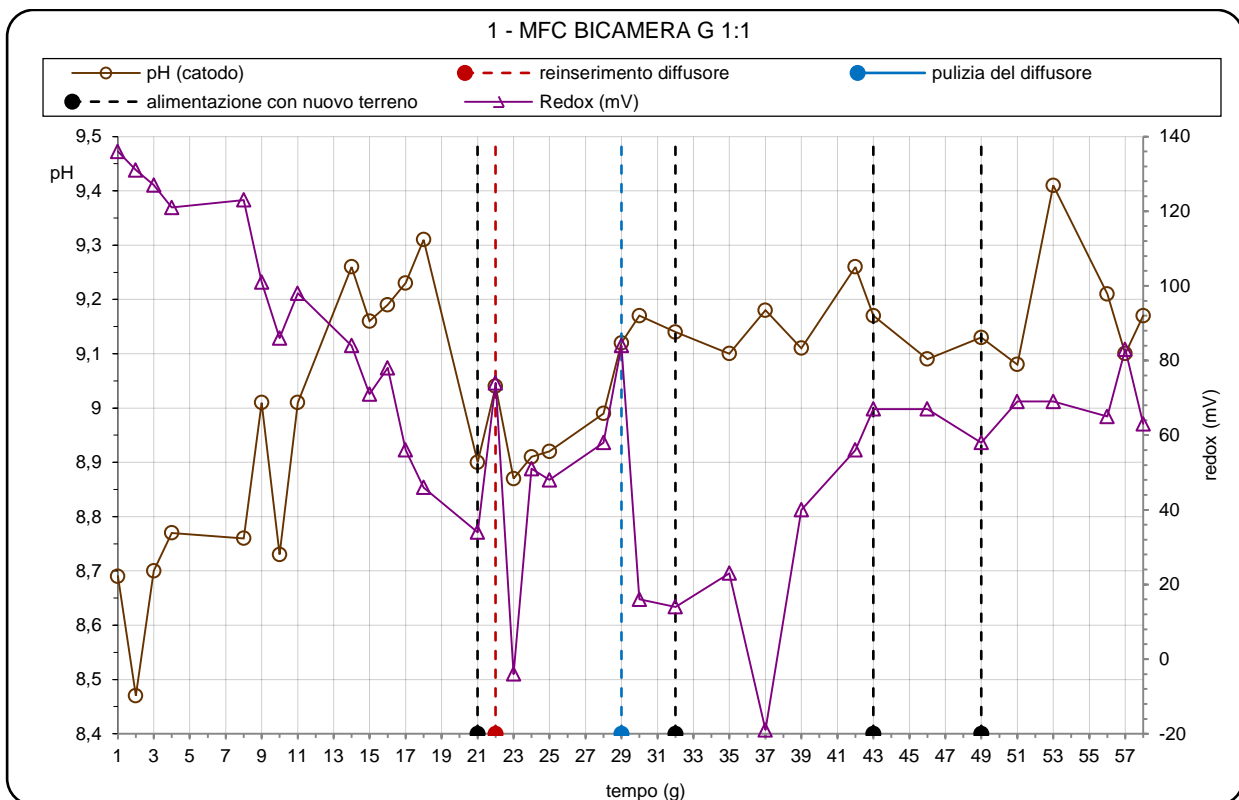


Figura 149 – Andamento del potenziale redox e del pH per la MFC bicamera G 1:1.

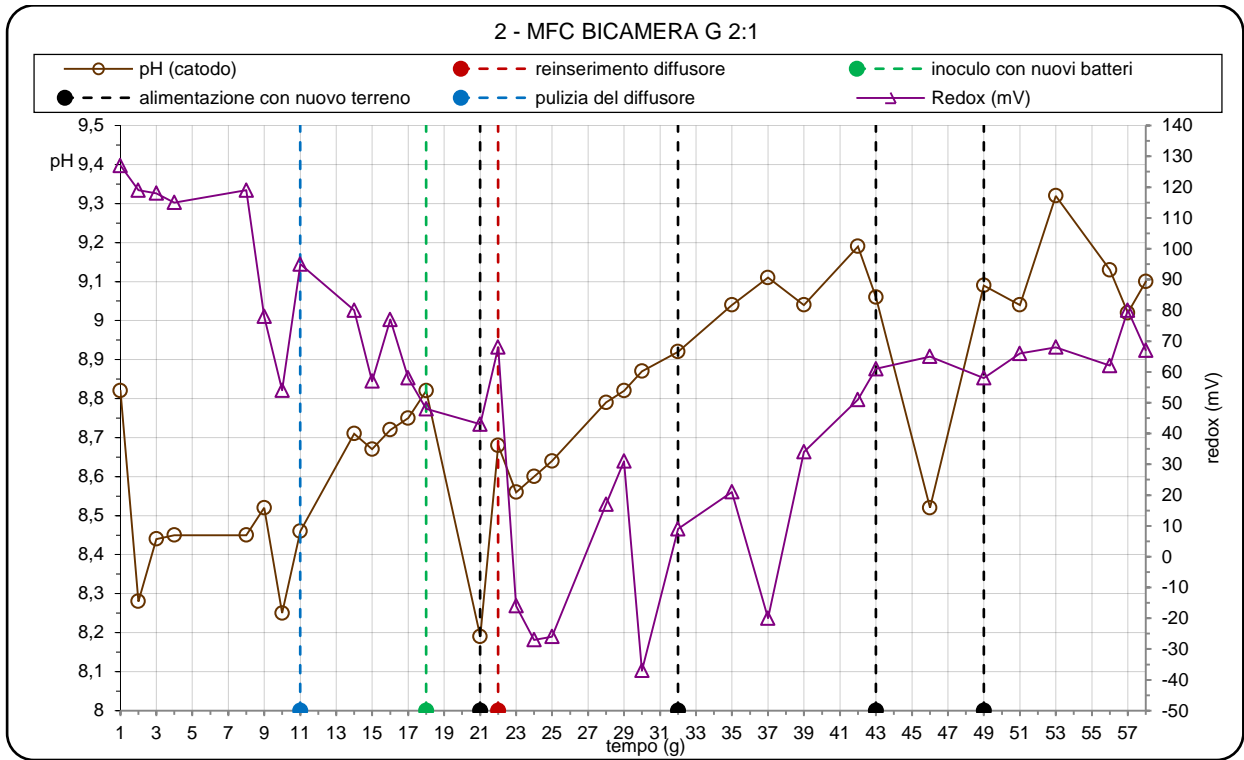


Figura 150 - Andamento del potenziale redox e del pH per la MFC bicamera G 2:1.

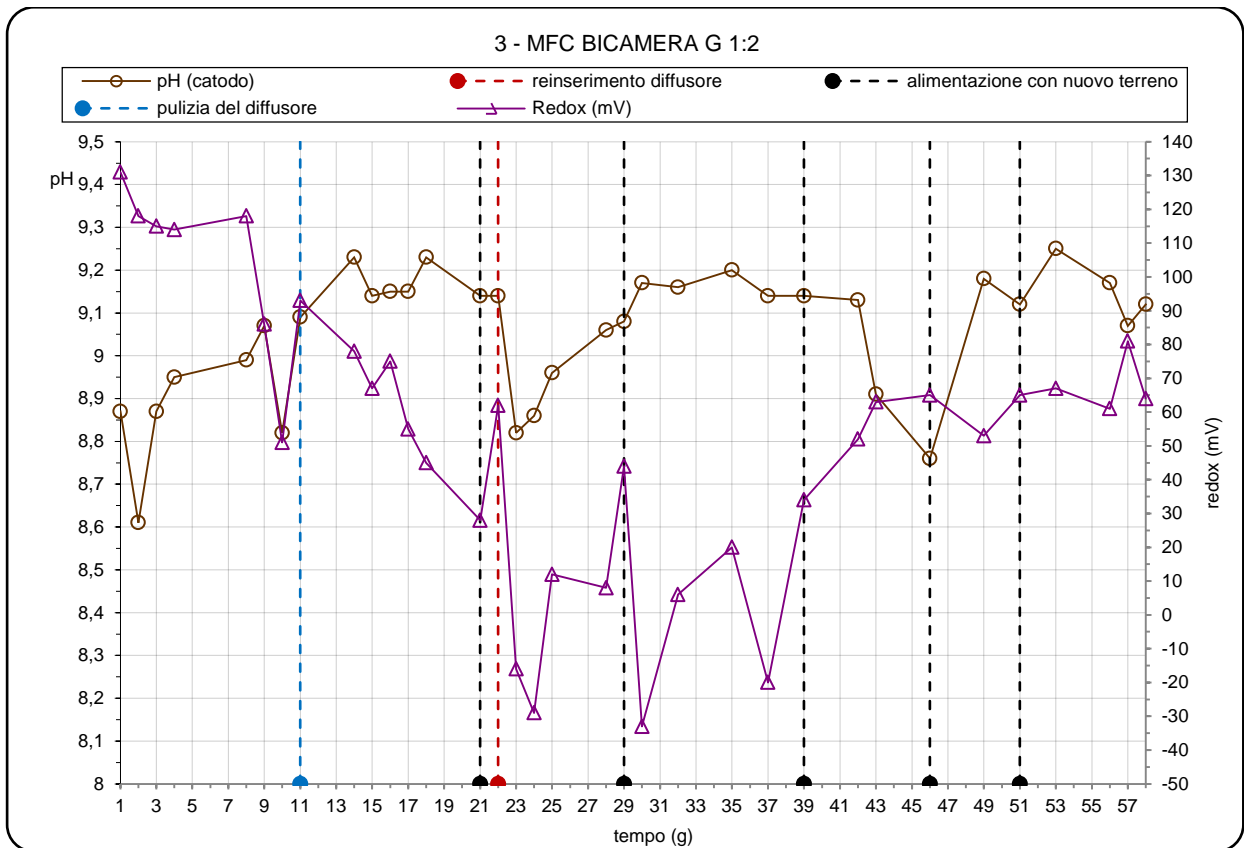


Figura 151 - Andamento del potenziale redox e del pH per la MFC bicamera G 1:2.

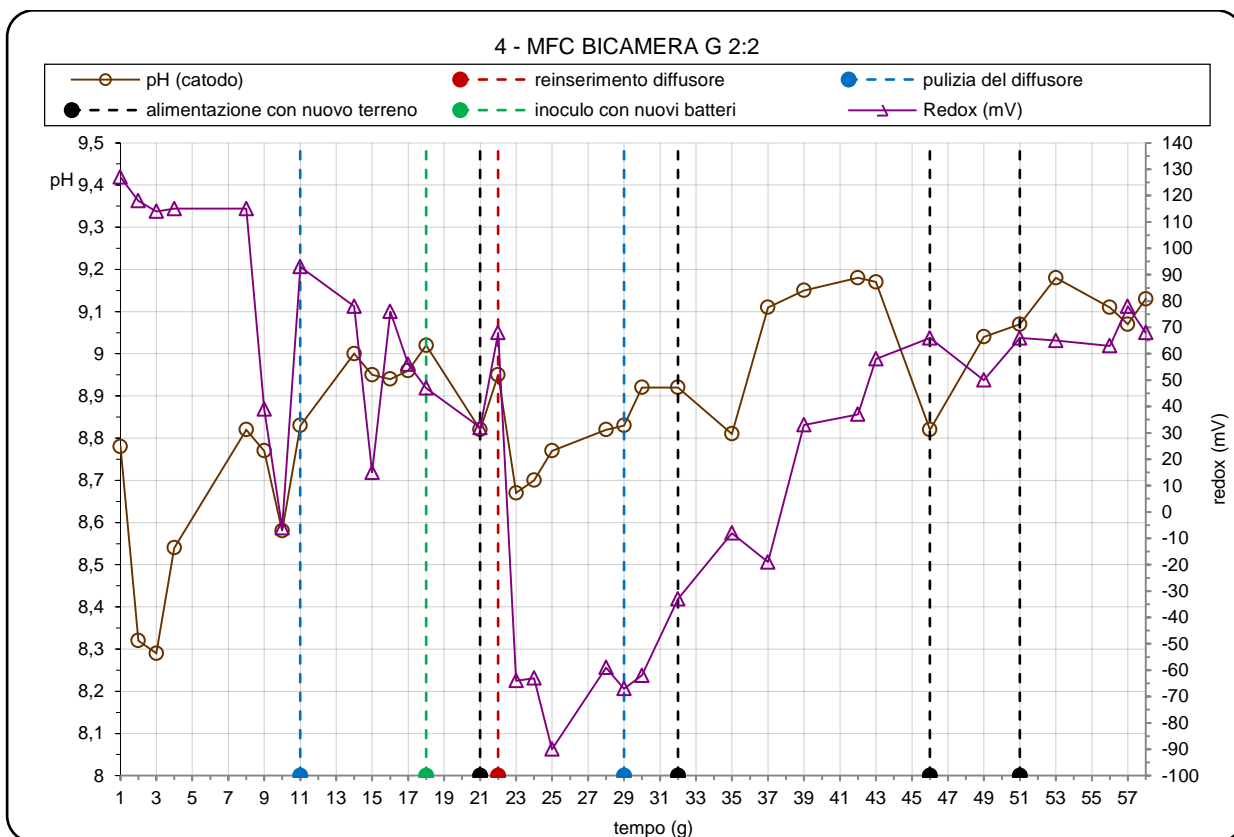


Figura 152 - Andamento del potenziale redox e del pH per la MFC bicamera G 1:2.

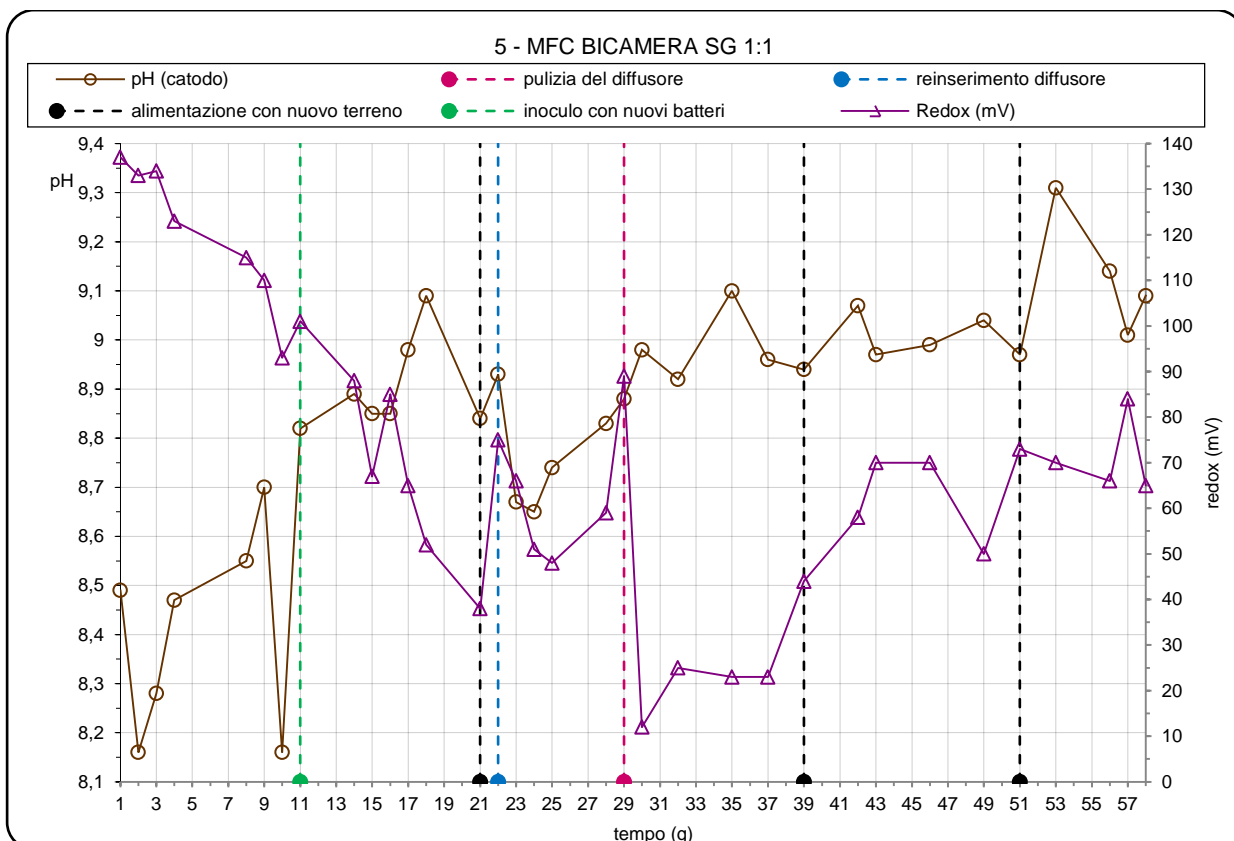


Figura 153 - Andamento del potenziale redox e del pH per la MFC bicamera SG 1:1.

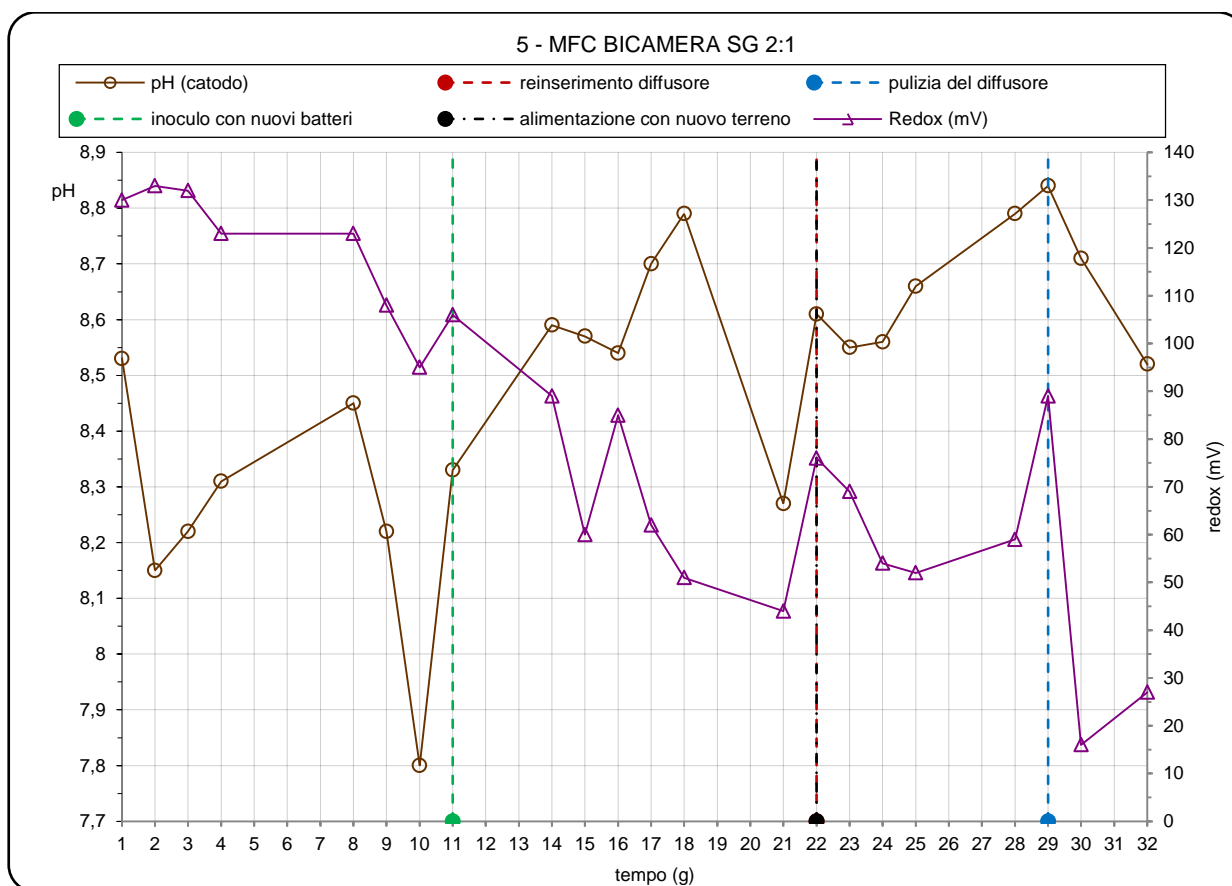


Figura 154 - Andamento del potenziale redox e del pH per la MFC bicamera SG 2:1.

Non è stato previsto nessun tipo di riscaldamento delle MFC in quanto studi precedenti non hanno dimostrato un effettivo contributo positivo della temperatura all'attività elettrogenica dei microrganismi. Questi ultimi, infatti, hanno dimostrato buone capacità di adattamento a diversi livelli di temperatura, a differenza dei batteri metanigeni, i quali sono molto sensibili alla temperatura e presentano le migliori condizioni di crescita a temperature superiori ai 30 °C. Si rischierebbe quindi, a temperature superiori a quella ambiente, di favorire la produzione di metano anziché di elettricità, con effetti negativi sulla produzione di corrente. Inoltre, un eventuale sistema riscaldante andrebbe ad aumentare i costi di esercizio per le celle a combustibile microbiche, rendendo ancor più difficoltosa la realizzazione di tali sistemi su una più vasta scala.

### 7.3.2 Rimozione della sostanza organica

Le "microbial fuel cells" risultano essere, oggi, una tecnologia promettente non solo per la produzione diretta di bioenergia ma anche per il trattamento di liquami di varia natura. Al fine di porre le basi per un loro sviluppo futuro per trattare effluenti ad elevato carico organico, è stato

valutato l'andamento nel tempo del TOC. La concentrazione di carbonio organico totale (TOC) è considerato, infatti, uno dei parametri chiave all'interno di un impianto di depurazione, che consente di valutare chimicamente il carico inquinante di un reflu. È stata inoltre valutata l'efficienza, in termini percentuali, con cui ogni singola cella ha rimosso le sostanze organiche presenti nel terreno di crescita batterica.

Di seguito in figura 155 è riportato l'andamento nel tempo del TOC mettendo a confronto, in termini di efficienza di rimozione, le diverse MFC al variare dei materiali e delle dimensioni degli elettrodi.

La periodica sostituzione della coltura planctonica è avvenuta con un medium batterico avente concentrazione costante di TOC pari a 1934 mg/l.

Siccome lo spurgo non è stato totale, ad ogni ciclo di alimentazione corrisponde un diverso valore del TOC iniziale, rappresentato con un puntino sui grafici.

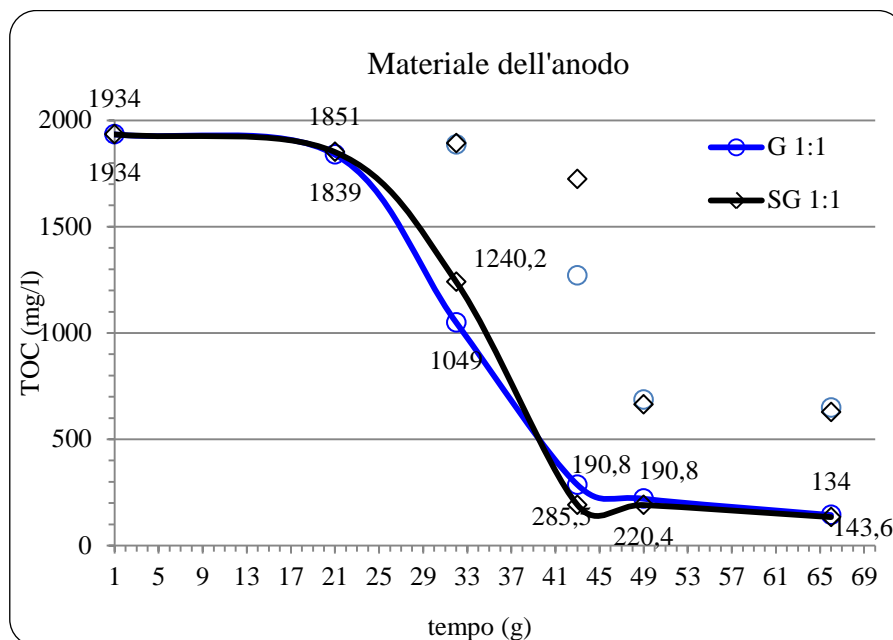


Figura 155 - Confronto tra SG e G nella rimozione del carico organico.

In figura 156 è riportato l'andamento nel tempo del TOC per le MFC G 1:1 e SG 1:1. Come si può osservare l'unica differenza tra i due materiali grafiteici impiegati è la velocità con cui il carico organico decresce, in quanto i valori di TOC finali sono praticamente gli stessi.

In termini di efficienza di rimozione, si ha:

η %	
SG	G
93,07%	92,42%

Da tale confronto possiamo affermare che la grafite siliconica non da risultati soddisfacenti in termini energetici ma che, per quanto riguarda l'abbattimento del carico organico, risulta essere competitiva con la grafite pressata su carta.

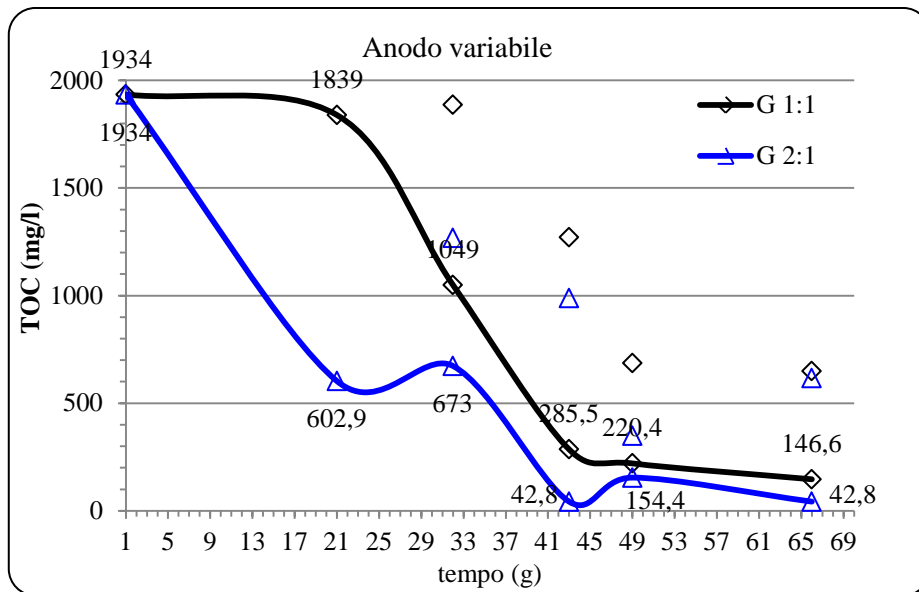


Figura 156 - Confronto tra G 1:1 e G 2:1 nella rimozione del carico organico.

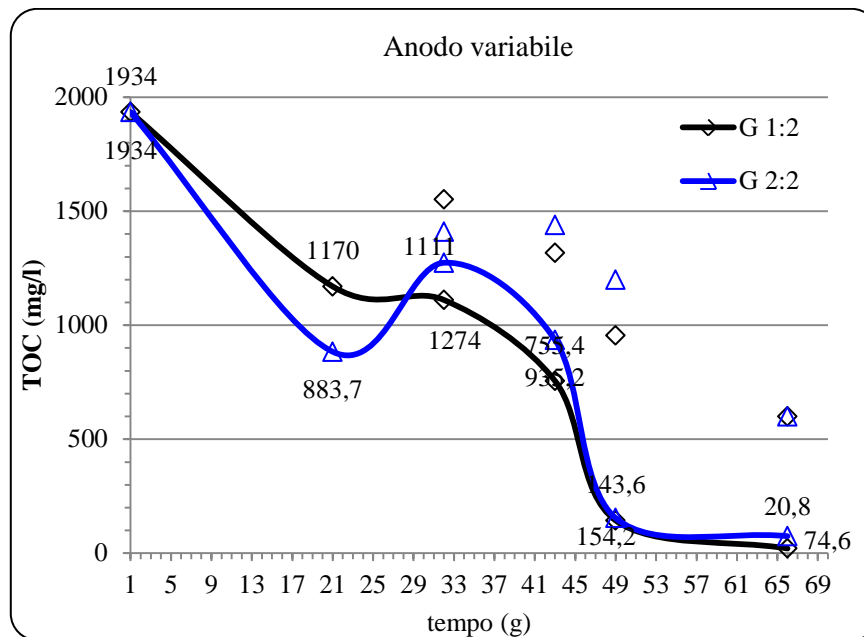


Figura 157 - Confronto tra G 1:2 e G 2:2 nella rimozione del carico organico.

In figura 156 e 157 è riportato l'andamento nel tempo del carbonio organico totale al variare della superficie anodica.

Con un'area superficiale catodica di 25 cm<sup>2</sup>, maggiore è la dimensione dell'anodo e maggiore è la velocità con cui il carico organico decresce e migliore è l'abbattimento.



Con un'area superficiale catodica doppia (da 25 a 50 cm<sup>2</sup>) la dimensione dell'anodo sembra non essere determinante. La velocità media di abbattimento del carico organico è la stessa così come per il valore del TOC in uscita.

In figura 157, dall'andamento mostrato dalla G 2:2 si potrebbe erroneamente pensare che il carico organico stia aumentando nel tempo anziché diminuire. In realtà questo aumento è solo apparente in quanto bisogna sempre prendere a riferimento il valore iniziale del TOC per quel determinato ciclo di alimentazione.

In termini di efficienza di rimozione si ha:

$\eta$ %			
1:1 G	1:2 G	2:1 G	2:2 G
92,57%	98,92%	97,79%	96,14%

Tutti i sistemi MFC studiati mostrano delle ottime capacità di abbattimento del carico organico. Infatti i valori dell'efficienza di rimozione del carbonio organico totale sono tutti compresi tra il 92 % ed il 98 % circa.

Dai risultati ottenuti si evince che, più piccola è la dimensione del catodo e maggiore è l'abbattimento che si ottiene all'aumentare della superficie anodica.

#### 7.4 Analisi e commento dei dati sperimentali-fase III: variazione della concentrazione e del tipo del terreno di coltura

La terza fase della ricerca ha riguardato lo studio della tipologia e della concentrazione del terreno di coltura per le microbial fuel cell ed in particolare ha visto l'allestimento di 6 MFC, di cui 3 del tipo monocamera e 3 del tipo bicamera; si è differenziato anche il materiale del quale sono costituiti gli elettrodi; le concentrazioni del terreno di coltura si sono fatte variare diluendolo con del residuo vegetale o mantenendolo puro ed i valori del rapporto residuo vegetale-terreno di coltura standard scelti sono stati pari a 1:9 oppure pari a 1:19.

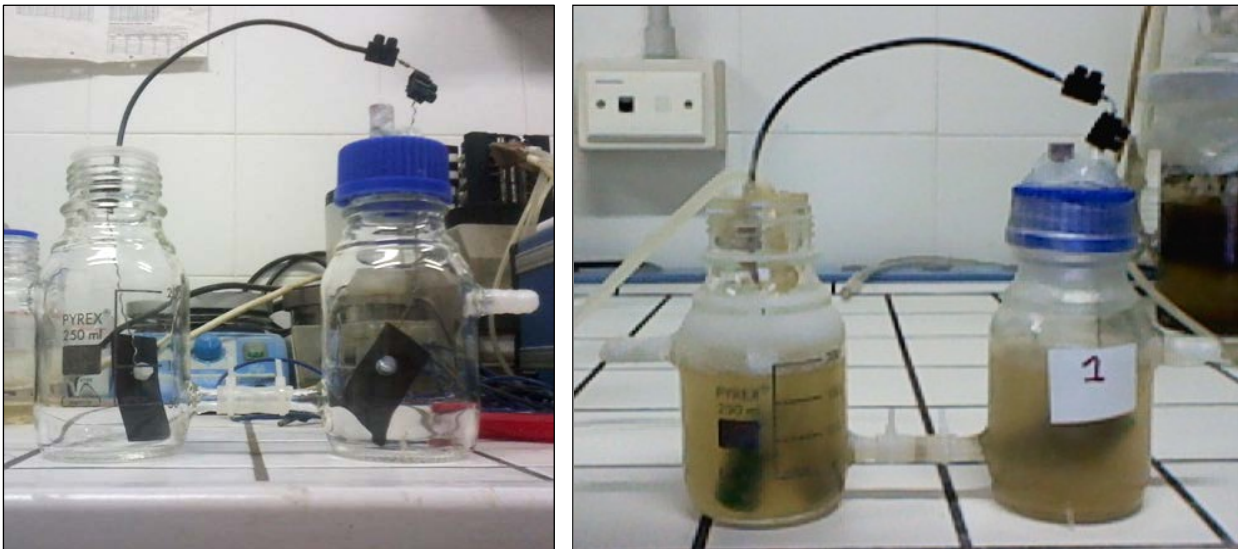
Le due MFC monocamera, ad esclusione della MFC con alghe marine, sono state alimentate con "medium" costituito da minestrone e terreno standard con rapporto 1:9, mentre le tre MFC bicamera sono state invece alimentate, rispettivamente, due con rapporto minestrone-terreno standard 1:9 ed una con rapporto 1:19.

Si procede quindi a caratterizzare le sei MFC sulla base dei suddetti parametri:

1) MFC bicamera con inoculo di *Geobacter sulfurreducens* conservati in atmosfera d'azoto (denominata "bicamera SG 1:1 (1:9)"):

- elettrodo dell'anodo in grafite su gomma siliconica a forma piana con superficie di 25 cm<sup>2</sup>, anaerobico;
- elettrodo del catodo in grafite su gomma siliconica a forma piana con superficie di 25 cm<sup>2</sup>, aerobico;
- membrana protonica: NAFION 117 (pretrattato);
- volume inoculo = 200 ml;
- $R_{est} = 177,123 \pm 0,029 \Omega$  (misurata con il metodo a 4 fili);

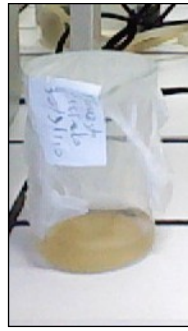
e di seguito ne riportiamo una fotografia in fase di montaggio a sinistra, dalla quale si evidenziano tutti i componenti ed a destra la stessa MFC in funzione:



*Figura 158 - MFC bicamera SG 1:1.*

ed i componenti, che in aggiunta a quelli elencati nella fase I, sono stati utilizzati per la costruzione di queste nuove MFC vengono di seguito elencati:

□ frullato di minestrone della Valle degli Orti-Buitoni che è stato filtrato, della quale riportiamo una immagine dopo la filtrazione ed inoltre la composizione; esso contiene una combinazione di quindici verdure: patate, fagioli borlotti reidratati, pomodori, carote, piselli, zucchine, sedano, bietole, zucca, fagiolini, verze, porri, prezzemolo, basilico, aglio:



INFORMAZIONI NUTRIZIONALI valori medi	Per 100 g	Per 150 g (1 porzione)
Valore Energetico	217 kJ 51 kcal	326 kJ 77 kcal
Proteine	3,2 g	4,8 g
Carboidrati	8,9 g	13,4 g
di cui zuccheri	2,3 g	3,5 g
Grassi	0,3 g	0,5 g
di cui saturi	0,1 g	0,1 g
Fibre Alimentari	2,8 g	4,2 g
Sodio	0,010 g	0,015 g

Ai fini del suo utilizzo, il minestrone è stato scongelato e diluito in 1,5 litri di acqua di rubinetto. Si è quindi proceduto alla filtrazione del preparato: l'operazione si è svolta in più steps, a causa della consistenza pastosa del composto ottenuto, fino ad ottenere un liquido di color verde caratterizzato da un valore di TOC pari a 9813 mg/l.

Il minestrone filtrato è stato travasato in appositi contenitori chiusi ermeticamente e conservati in frigo fino al momento del loro utilizzo.

2) MFC bicamera con inoculo di *Geobacter sulfurreducens* conservati in atmosfera d'azoto (denominata "bicamera G 1:1 (1:9)"):

- elettrodo dell'anodo in grafite su gomma siliconica a forma piana con superficie di 25 cm<sup>2</sup>, anaerobico;
- elettrodo del catodo in grafite su gomma siliconica a forma piana con superficie di 25 cm<sup>2</sup>, aerobico;
- volume inoculo = 200 ml;
- membrana protonica: NAFION 117 (pretrattato);
- $R_{est} = 218,13 \pm 0,03 \Omega$  (misurata con il metodo a 4 fili);

e di seguito una fotografia:



Figura 159 - MFC bicamera G 1:1.

3) MFC bicamera con inoculo di *Geobacter sulfurreducens* conservati in atmosfera d'azoto (denominata "bicamera G (1:19)"):

- elettrodo dell'anodo in grafite su cartone precompresso a forma piana con superficie di 25 cm<sup>2</sup>, anaerobico;
- elettrodo del catodo in grafite su cartone precompresso di forma piana con superficie di 25 cm<sup>2</sup>, all'aria;
- membrana protonica: NAFION 117 (pretrattato);
- volume inoculo = 200 ml;
- $R_{est} = 221,54 \pm 0,03 \Omega$  (misurata con il metodo a 4 fili);

e di seguito una fotografia:



Figura 160 - MFC bicamera G (1:19).

- Foglio di grafite su cartone precompresso, acquistato alla Goodfellow, UK di cui vengono elencate le proprietà:

Proprietà del foglio di carbonio	Unità di misura	Valore
Materiale		Grafite flessibile
Coefficiente di espansione termica	10 <sup>-6</sup> ·K <sup>-1</sup>	1-25
Densità	g·cm <sup>-3</sup>	0.9-1.3
Resistività	μOhm·cm	1000-50000
Conduttività termica	W·m <sup>-1</sup> ·K <sup>-1</sup>	4-160
Grado di purezza	% di C	99.8
Spessore	mm	0.5

viene riportata una immagine dell'elettrodo e del sistema di collegamento con il connettore a coccodrillo:



sono stati immersi in etanolo al 100% per 30 minuti e in 1 M HCl per 1 h; dopo ogni uso, gli elettrodi sono stati lavati in 1,0 M HCl seguito da 1,0 M NaOH, ciascuno per 1 h, per rimuovere eventuali metallo e la contaminazione biologica, e conservati in acqua distillata prima dell'impiego.

4) MFC monocamera con inoculo di *Geobacter sulfurreducens* conservati in atmosfera d'azoto (denominata "monocamera SG (1:9)"):

- elettrodo dell'anodo in grafite su gomma siliconica a forma piana con superficie di 25 cm<sup>2</sup>, anaerobico; il 30/09, giorno 64 è stato sostituito l'elettrodo dell'anodo con uno di uguale superficie (0,0008 m<sup>2</sup>), ma in grafite compressa su carta;
- elettrodo del catodo in grafite compressa su carta di forma piana con superficie di 25 cm<sup>2</sup>, all'aria;
- membrana protonica: NAFION 117 (pretrattato);
- volume inoculo = 200 ml; il 30/09, giorno 64 è stato inoculato il frullato di minestrone (10 ml, 10% V/V).
- $R_{est} = 177,314 \pm 0,029 \Omega$  (misurata con il metodo a 4 fili).

e di seguito una fotografia:



*Figura 161 - MFC denominata monocamera SG.*

5) MFC monocamera con inoculo di *Geobacter sulfurreducens* conservati in atmosfera d'azoto (denominata "monocamera G (1:9)"):

- elettrodo dell'anodo in grafite su cartone precompresso a forma piana con superficie di 25 cm<sup>2</sup>, anaerobico;

- elettrodo del catodo in grafite su cartone precompresso di forma piana con superficie di 25 cm<sup>2</sup>, all'aria;
- membrana protonica: NAFION 117 (pretrattato);
- volume inoculo = 200 ml;
- $R_{est} = 221,54 \pm 0,03 \Omega$  (misurata con il metodo a 4 fili);

e di seguito una fotografia, a sinistra la MFC in fase di assemblaggio, per evidenziare meglio tutti i suoi componenti ed a destra la MFC in funzione:

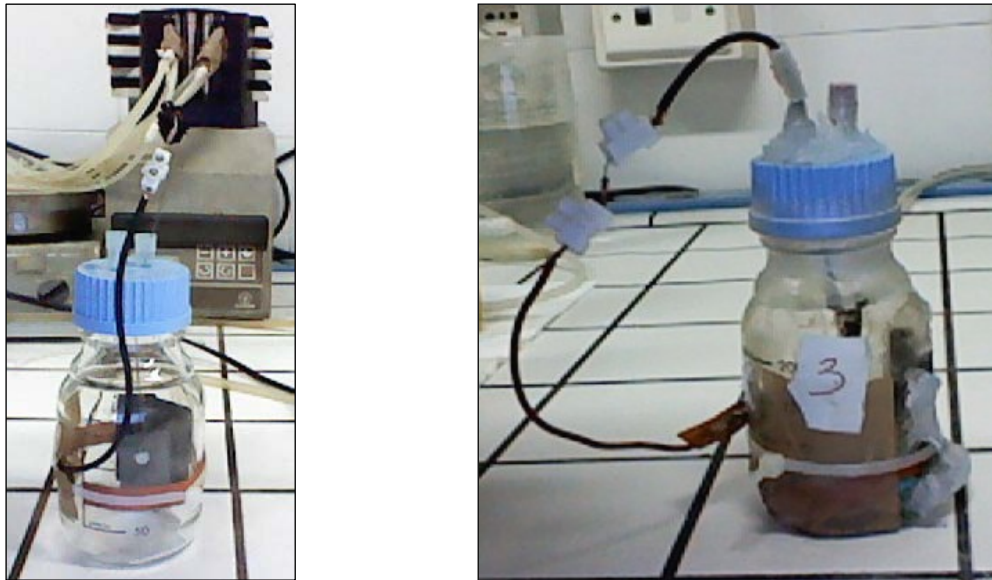


Figura 162 - MFC denominata monocamera G.

□ colla PATTEX RIPARA EXTREME, della Henkel, adesivo universale, flessibile ed extraforte; Ideale per incollaggi invisibili, flessibili, in verticale o con presa rapida. Adatto a tutti i materiali: metalli (acciaio, ferro, alluminio, rame) anche se verniciati, vetro, ceramica, plastica (escluso PE, PP, PTFE), piccoli specchi, tessuto, legno, cemento, gomma, cuoio, etc. Utilizzabile sia in interni (inodore), che in esterni (resistente all'acqua). Riposizionabile nei primi 5 minuti. Resistente a strappi, urti e vibrazioni; sovra verniciabile. Vengono riportate le principali caratteristiche di questo prodotto ed una immagine:

Materie prime	Polimeri speciali sintetici
Densità	1,1 g/ml circa
Colore	Traslucido
Temperatura di applicazione	da +5 °C a +40 °C
Tempo aperto	2 – 3 minuti circa a seconda di temperatura e umidità
Resistenza alla temperatura	da -50 °C a + 120 °C
Allungamento a rottura	150% circa
Resistenza a trazione	fino a 35 kg/cm <sup>2</sup> circa
Potere riempitivo	fino a 5 mm
Velocità indurimento	2 mm per 24 ore, a seconda di temperatura e umidità



□ nastro di rame impiegato per realizzare il collegamento elettrico fra il foglio di grafite, che costituisce l'elettrodo catodico ed il filo di collegamento in rame che è stato possibile saldare ad esso con una saldatura a freddo; riportiamo una immagine del prodotto e anche le proprietà e caratteristiche di questo materiale:

Materiale	Nylon non tessuto rivestito in rame
Rivestimento	Carta bianca polirivestita silicizzata
Temperatura di funzionamento	da -20 °C a +80 °C
Conduttività di superficie	0,04 Ω
Tipologia nastro	non adesivo



□ pittura d'argento, impiegata come collante per realizzare il collegamento elettrico del filo di rame sull'elettrodo di grafite precompressa su carta che costituisce l'elettrodo catodico:

Dispersed Solid	Grey Liquid
Carrier	Solvent Blend
Consistency	Creamy
Specific Gravity a@ 20°C	1,71
Surface Resistance @ 0.6 to 2 g/100cm <sup>2</sup>	da 0,01 a 0,03 Ohm/sq
Electrical Rating	0,1 to 1 W/cm <sup>2</sup>
Drying time @ 20°C	10 minutes
Temperature Range	da -80 °C a +125 °C
Flash Point	-18 °C



6) MFC monocamera con alghe marine (denominata “alghe marine G”):

- elettrodo dell'anodo in grafite su gomma silionica a forma piana con superficie di 25 cm<sup>2</sup>, anaerobico;
- elettrodo del catodo in grafite su cartone precompresso di forma piana con superficie di 25 cm<sup>2</sup>, all'aria;
- membrana protonica: NAFION 117 (pretrattato);
- volume del terreno di coltura pari a 200 ml;



Figura 163 - MFC denominata alghe marine G.

#### 7.4.1 Andamento nel tempo delle grandezze elettriche

Di seguito per ciascuna MFC si riporta l'andamento nel tempo della tensione a circuito aperto OCV, della resistenza interna  $R_{int}$  insieme nel primo grafico, mentre in un secondo grafico vengono riportate la potenza elettrica  $P$ , la densità di corrente  $d_c$  e la tensione a circuito chiuso CCV ed in tutti i grafici i valori vengono accompagnati dalle barre di errore, pari ai valori dell'incertezza per ciascuna grandezza in esame calcolata con la teoria della propagazione degli errori; in ciascun grafico le linee tratteggiate in verticale indicano l'inizio di un nuovo ciclo di alimentazione, ovvero i giorni in corrispondenza dei quali ogni reattore è stato spurgato ed inoculato con soluzione medium fresca ma cercando di mantenere sempre costante il rapporto residuo vegetale-terreno standard scelto in partenza, a partire dal numero del giorno sul quale si trova il semicerchio dello stesso colore.

La principale caratteristica che si è registrata per tutte e sei le MFC è stata la natura ciclica della OCV, che ha presentato sempre una prima fase crescente, seguita dal raggiungimento di un valore massimo a cui è seguita una fase decrescente che poteva essere arrestata soltanto con una nuova alimentazione di terreno fresco, con una intera durata del ciclo che termina dopo 7-10 giorni, per 5 delle MFC che hanno operato in condizione fed-batch, come è stato riscontrato in letteratura, mentre per la MFC denominata "alghie marine G" è stato operato un ciclo soltanto, mantenendola in rigorose condizioni batch; inoltre ad ogni ciclo si riscontravano valori della OCV sempre maggiori di quelli del ciclo precedente, con alcune anomalie per la bicamera SG 1:1 e la monocamera SG e nel secondo ciclo per la monocamera G.

Il valore di OCV ad ogni ciclo di alimentazione cresce più o meno rapidamente, raggiunge un valore massimo o picco, quindi inizia progressivamente a diminuire.

Si è riportata poi l'andamento dei valori della CCV ed i valori della corrente  $I$  generata, ottenuti dalle misure effettuate giornalmente ed è stata poi considerata la media algebrica delle cinque letture, e della densità di corrente erogata, espressi in  $\text{mA}/\text{m}^2$ , nel corso dei vari cicli di alimentazione e di spurgo, delle sei celle a combustibile microbiologiche.

Gli andamenti ottenuti per la MFC bicamera SG 1:1 [1:9] sono quelli riportati nei 2 grafici in figura 164:



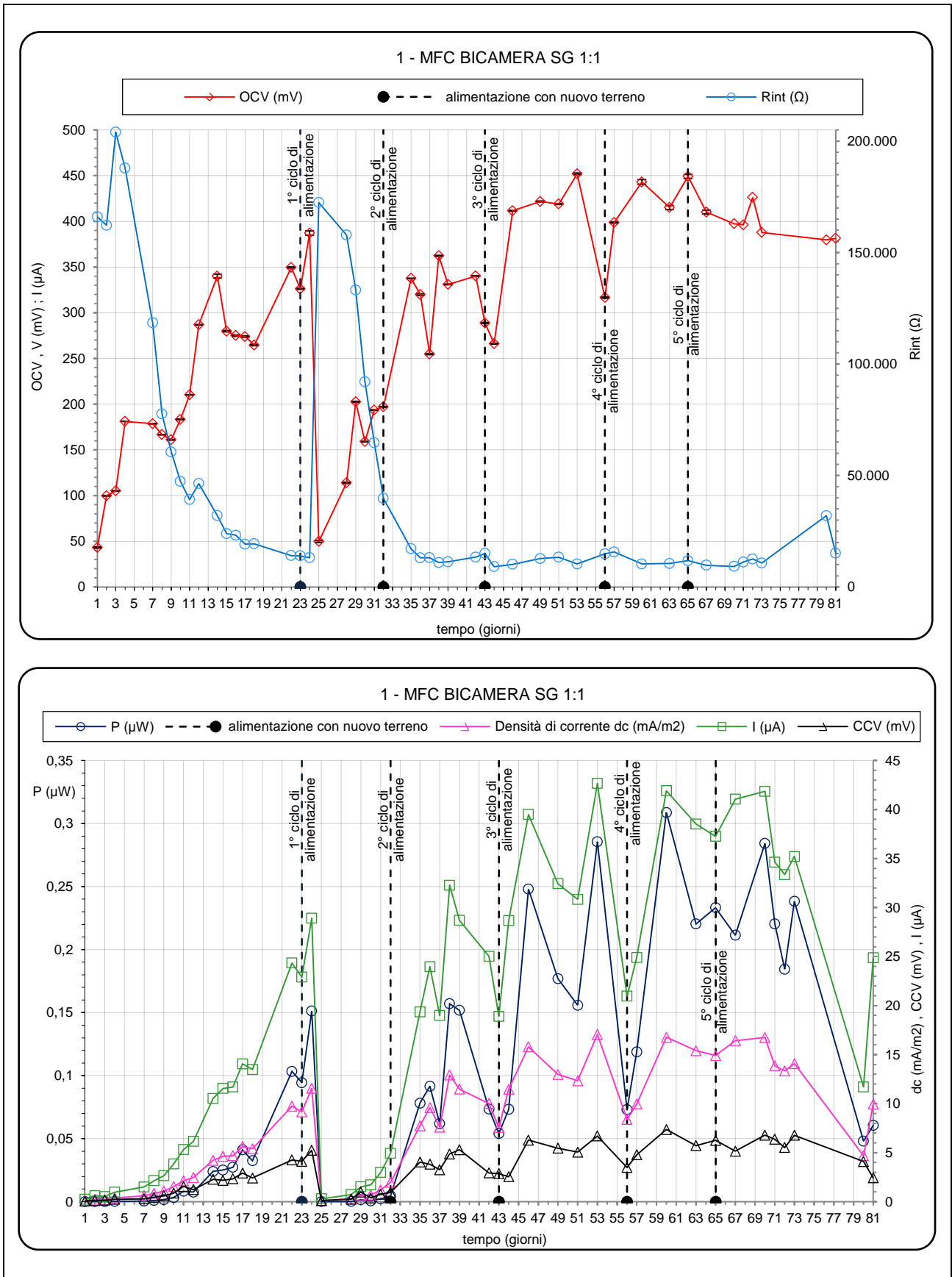


Figura 164 - Andamento delle grandezze elettriche per la MFC denominata bicamera SG 1:1 [1:9].

Dallo studio dell'andamento durante i primi 18 giorni si è osservata una crescita lenta, attribuibile alla fase di latenza della comunità microbica inoculata; il 23-esimo giorno si è effettuata invece la prima alimentazione: in seguito a ciò si è registrato un picco della potenza di  $0,1513 \mu\text{W}$  ed una corrispondente densità di potenza pari a  $0,7567 \text{ mW/m}^3$ , normalizzata rispetto al volume del compartimento anodico, pari a 200 ml e considerato a livello costante durante tutta la sperimentazione.

Durante i successivi altri 3 cicli di alimentazione si è avuta un nuovo aumento dei valori della corrente prodotta ed in corrispondenza al 4° ciclo di alimentazione si è osservato un aumento della densità di potenza che ha raggiunto un valore quasi doppio rispetto a quello del ciclo precedente, e pari a  $0,2856 \mu\text{W}$ ; anche in seguito, con il quinto ciclo di alimentazione, la densità di potenza si è mantenuta sui valori più alti.

L'incremento della potenza, tuttavia, è stato limitato dal fatto che si è eseguita l'alimentazione con 100 ml di terreno fresco, anziché con i 200 ml utilizzati nei cicli precedenti; tale riduzione del quantitativo di alimentazione si ritiene abbia limitato la generazione di potenza anche nel ciclo successivo, dove si è alimentato sempre con 100 ml di terreno.

Il picco di quest'ultimo ciclo non è infatti riuscito a superare il picco del ciclo precedente.

Nel secondo grafico della figura 164 si osserva un andamento della densità di corrente di natura ciclica, in linea con i valori riscontrabili in letteratura; in ogni ciclo, a partire dall'alimentazione di terreno fresco, si è evidenziata una produzione di corrente oscillatoria e crescente: essa raggiunge un valore massimo a partire dal quale l'attività elettrogenica batterica inizia una progressiva diminuzione, fino a tornare a valori comparabili con quelli misurati prima dell'alimentazione, segno questo dell'esaurirsi della sostanza organica.

I picchi di ogni nuovo ciclo di alimentazione-spurgo sono risultati superiori a quelli del ciclo precedente.

Per i primi quattro cicli di alimentazione si sono registrati i seguenti valori massimi di densità di corrente:  $9,738 \text{ mA/m}^2$  (22-esimo giorno),  $11,566 \text{ mA/m}^2$  (28-esimo giorno),  $12,914 \text{ mA/m}^2$  (38-esimo giorno) e  $17,062 \text{ mA/m}^2$  (53-esimo giorno).

In seguito alla riduzione del terreno di alimentazione da 200 ml a 100 ml si è evidenziato un assestamento del valore massimo della densità di corrente al valore di  $16,77 \text{ mA/m}^2$  e  $16,74 \text{ mA/m}^2$  rispettivamente per il quinto e sesto ciclo di alimentazione.

Gli andamenti ottenuti per la MFC bicamera G 1:1 [1:9] sono quelli riportati nei grafici in figura 165:

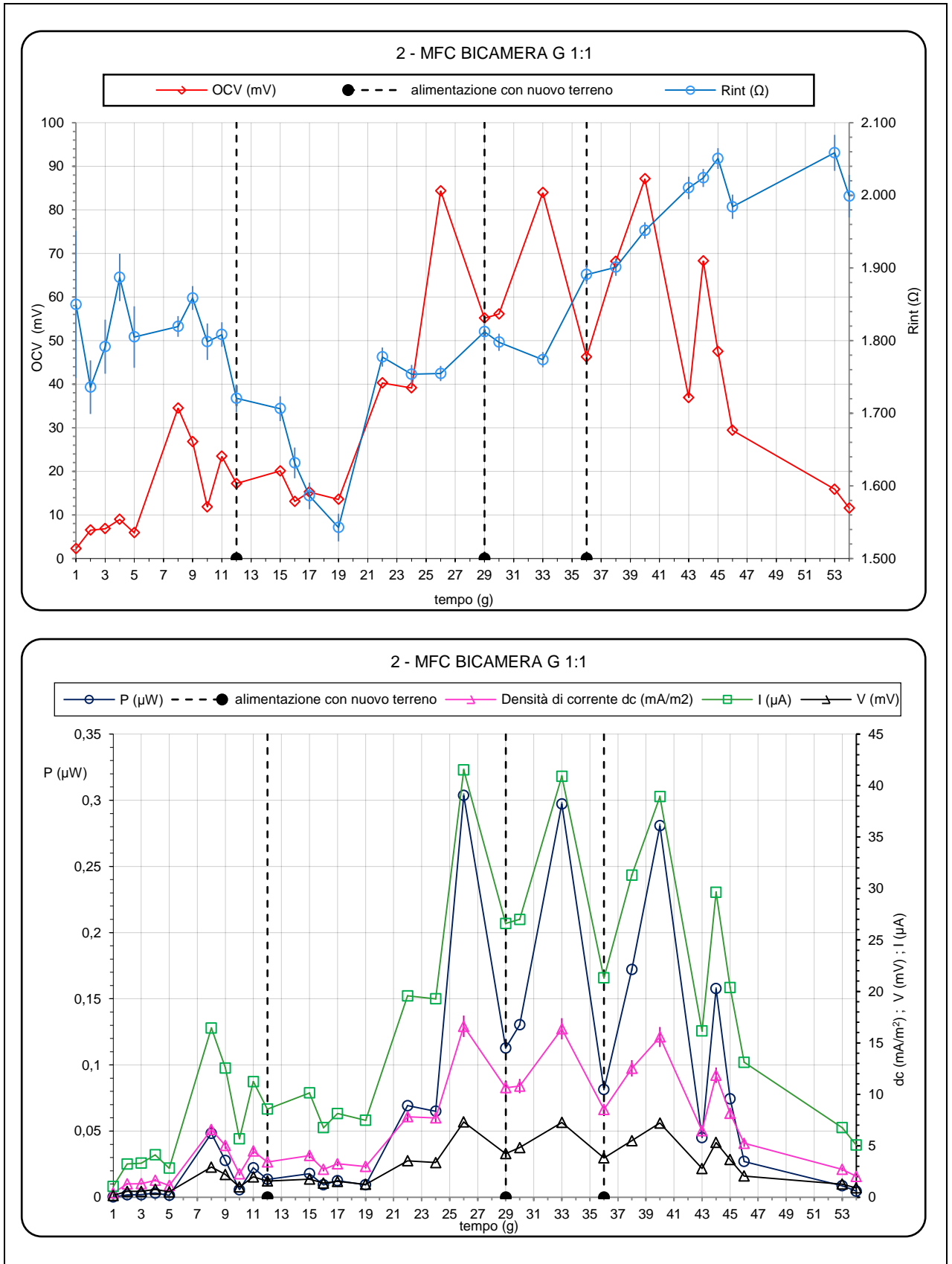


Figura 165 - Andamento delle grandezze elettriche per la MFC denominata bicamera G 1:1.

Per le prime due decadi si sono registrati bassi valori di densità di potenza, dovuti al periodo di latenza caratteristico del ceppo batterico ed il 19-esimo giorno si è proceduto ad effettuare un nuovo inoculo di 7 ml di *Geobacter sulfurreducens*; in seguito a ciò si è osservato un considerevole aumento nella erogazione della potenza: in particolare si è registrato un picco del valore di  $0,303657 \mu\text{W}$  cioè pari ad una densità di potenza di  $1,5183 \text{ mW/m}^3$  in corrispondenza del 26-esimo giorno.

A causa della carenza di terreno fresco a disposizione, la seconda alimentazione si è effettuata con 100 ml anziché con 200 ml: conseguentemente a ciò, il picco del ciclo successivo non ha superato quello precedente, ma si è mantenuto ad un valore pressoché costante; i valori di densità di potenza sono sensibilmente diminuiti nel giro di 5 giorni e si è resa necessaria una nuova alimentazione, ed il 26-esimo giorno si sono registrati valori massimi di tensione e di corrente rispettivamente pari a 7,31 mV e a 41,52  $\mu\text{A}$ .

Dal primo grafico in figura 165 si vede che per il reattore G 1:1 [alimentata con rapporto residuo vegetale-terreno pari 1:9 e mantenuto costante] (reattore numero (2)), il valore di resistenza interna è rimasto sempre intorno ai 2000  $\Omega$ , con un valore minimo di 1543  $\Omega$  nel 19-giorno.

Dopo una lenta crescita iniziale si è registrato in corrispondenza del 25-esimo giorno un aumento della densità di corrente che ha raggiunto di volta in volta valori pari a  $16,607 \text{ mA/m}^2$ ,  $16,363 \text{ mA/m}^2$  e  $15,57 \text{ mA/m}^2$ , rispettivamente per il secondo, terzo e quarto ciclo di alimentazione. Dopo il 40-esimo giorno i valori sono diminuiti nuovamente: anche in questo caso l'alimentazione effettuata con 100 ml di terreno anziché con 200 ml non ha consentito di raggiungere performance migliori durante la fase sperimentale.

È da evidenziare che la prima alimentazione per la suddetta MFC è stata effettuata con 100 ml di terreno anziché con 200 ml; è possibile dunque ritenere che, qualora si fosse alimentato con 100 ml in più, il valore della densità di potenza raggiunto da questo reattore sarebbe stato ancora più elevato.

Gli andamenti ottenuti per la MFC bicamera G (1:19) sono quelli riportati nei grafici in figura 166:

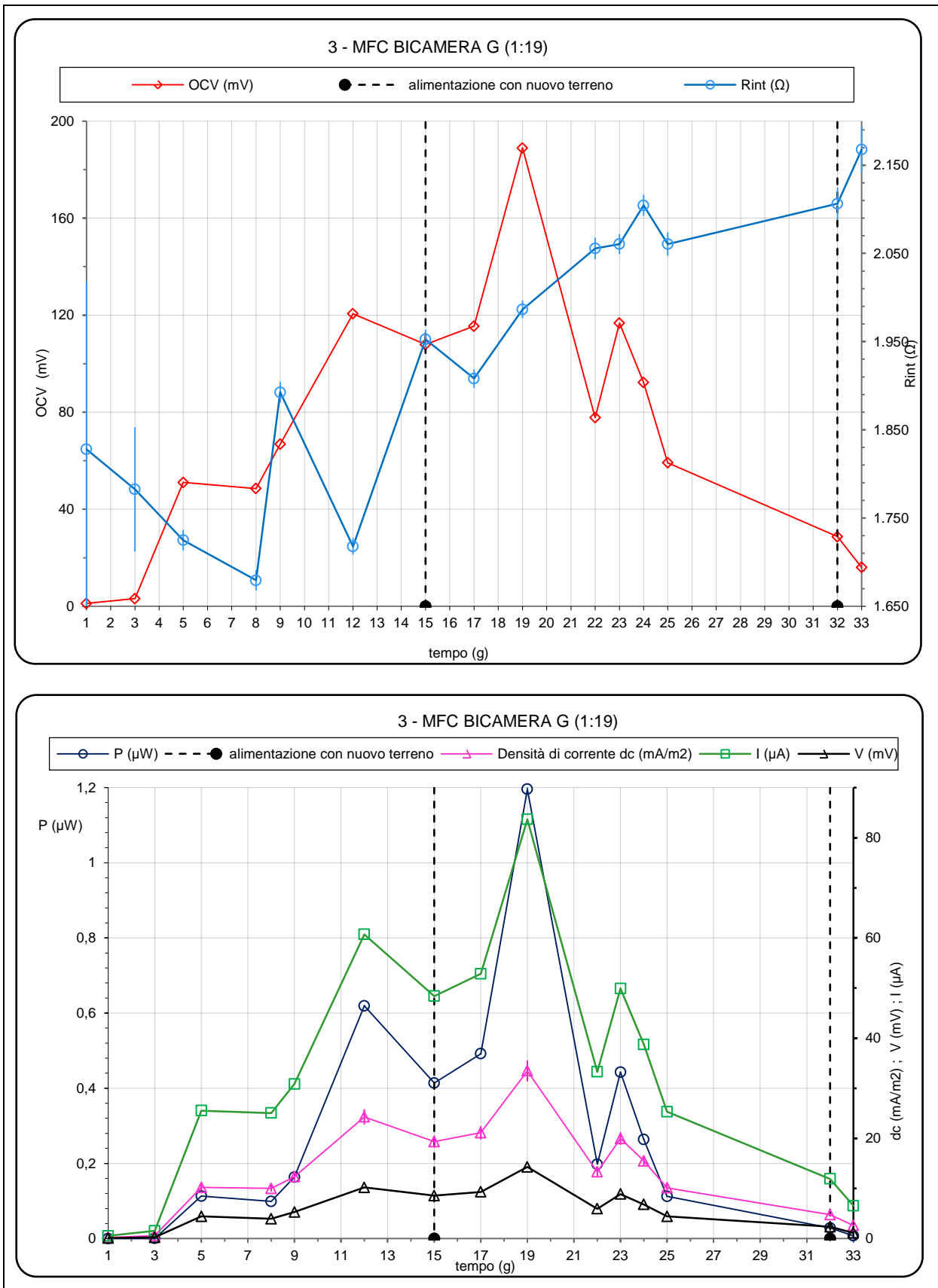


Figura 166 - Andamento delle grandezze elettriche per la MFC denominata bicamera G 1:1 (1:19).

Per la MFC bicamera G 1:1 [1:19] indicata con il numero (3) si è alimentato ciascun comparto con 10 ml di residuo vegetale e 190 ml di terreno standard, dei totali 200 ml. Il valore di picco massimo in questo caso si è raggiunto al 19-esimo giorno ed è risultato pari a  $5,9785 \text{ mW/m}^3$ . Si è potuto osservare un aumento della densità di potenza più rapido rispetto alle configurazioni numero (1) e (2), come era logico attendersi dato che questa MFC è stata alimentata con un residuo vegetale meno concentrato rispetto ai suddetti reattori numero (1) e numero (2); in particolare, già al decimo giorno la densità di potenza aveva superato  $1 \text{ mW/m}^3$ , valore che nelle precedenti due configurazioni si è osservato solo dopo 45 giorni per la bicamera SG [1:9] (reattore numero (1)) e dopo 25 giorni per la bicamera G [1:9] (reattore numero (2)). È da evidenziare che la prima alimentazione per la suddetta MFC è stata effettuata con 100 ml di terreno anziché con 200 ml; è possibile dunque ritenere che, qualora si fosse alimentato con 100 ml in più, il valore della densità di potenza raggiunto da questo reattore sarebbe stato ancora più elevato. Il reattore numero (3), inoltre, ha raggiunto in soli 10 giorni valori di tensione intorno ai 7 mV e valori di corrente intorno ai  $40 \mu\text{A}$ , là dove la MFC numero (2) invece ne ha impiegati 26 e la MFC numero (1) ben 53. Le prestazioni indubbiamente migliori della MFC numero (3) sono quindi da attribuirsi alla tipologia di elettrodo scelto, vale a dire elettrodo in grafite precompressa su carta, che ha favorito l'adesione del biofilm allo stesso e al tipo d'alimentazione utilizzata, residuo vegetale meno concentrato e quindi più facilmente degradabile dai batteri presenti nel compartimento anodico. Per il reattore numero (3) si è registrato una crescita della densità di corrente nettamente più rapida rispetto ai rispettivi andamenti della stessa grandezza per le due MFC, rispettivamente la numero (1) e numero (2), precedentemente analizzate. Già il quinto giorno il reattore numero (3) ha prodotto un valore di densità di corrente pari a  $10,21 \text{ mA/m}^2$ , e confrontati con i valori per il reattore numero (2) che raggiungeva valori pari a soli  $1,64 \text{ mA/m}^2$  e il reattore numero (1) valori addirittura pari a soli  $0,2 \text{ mA/m}^2$ . Il valore massimo di densità di corrente raggiunto con questo tipo di reattore è stato di  $33,461 \text{ mA/m}^2$ , mentre per i reattori numero (1) e numero (2) è stato rispettivamente di  $17,062 \text{ mA/m}^2$  e  $16,607 \text{ mA/m}^2$ . È evidente, dunque, che la presenza del residuo vegetale nel terreno d'alimentazione standard ha pregiudicato le prestazioni della MFC in termini di produzione di corrente elettrica. In questo reattore G [1:19] (reattore numero (3)) si è potuto osservare un aumento della densità di potenza più rapido rispetto alle configurazioni SG [1:9] (reattore numero (1)) e G [1:9] (reattore numero (2)), come era logico attendersi dato che questa MFC è stata alimentata con un residuo vegetale meno concentrato rispetto ai suddetti reattori numero (1) e numero (2); in particolare, già al decimo giorno la densità di potenza aveva superato  $1 \text{ mW/m}^3$ , valore che nelle precedenti due configurazioni si è osservato solo dopo 45 giorni per la bicamera SG [1:9] e dopo 25 giorni per la bicamera G [1:9].

Gli andamenti ottenuti per la MFC monocamera SG, indicata come il reattore numero (4) sono quelli riportati nei grafici in figura 167:

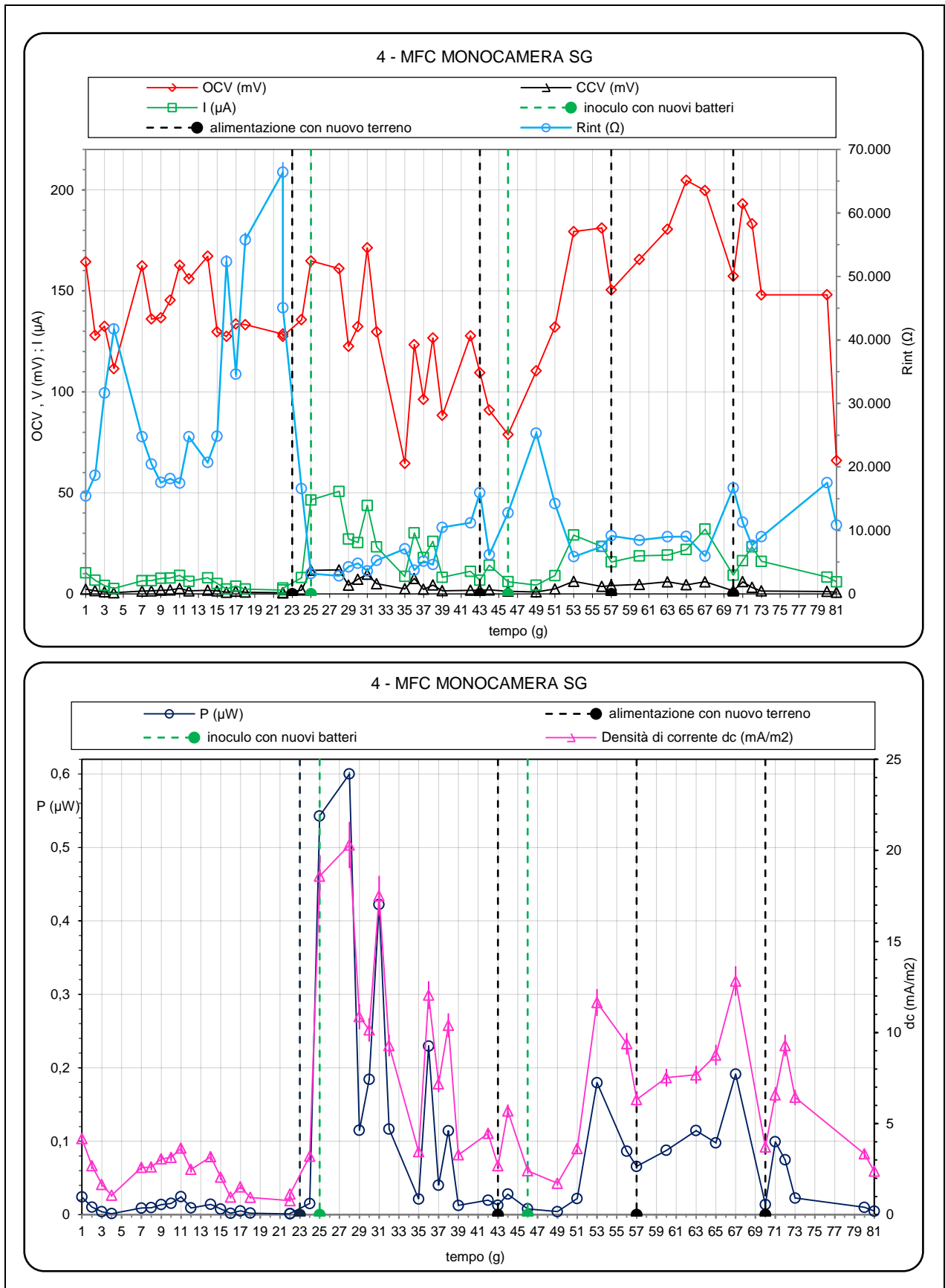


Figura 167 - Andamento delle grandezze elettriche per la MFC denominata monocamera SG.

Per la MFC monocamera SG dal secondo grafico di figura 167 si nota che per le prime due decadi il valore della densità di corrente si è mantenuta inferiore a  $5 \text{ mA/m}^2$ ; solo intorno al 25-esimo giorno si è avuto un rapido aumento della densità di corrente registrando un picco massimo di  $20,297 \text{ mA/m}^2$  in corrispondenza del 28-esimo giorno.

L'andamento della grandezza in esame si è ripetuto in maniera analoga nei successivi cicli di alimentazione-spurgo; tuttavia i valori massimi di densità di corrente, per i cicli d'alimentazione successivi al secondo, hanno mostrato risultati nettamente più bassi rispetto a quelli registrati nel secondo ciclo.

Per i primi 20 giorni la produzione di potenza è stata pressoché nulla, ed in seguito al primo ciclo di alimentazione e all'inoculo il giorno 25, riportato nel primo e secondo grafico di figura 167, con ulteriori 10 ml di *Geobacter sulfurreducens* rispetto a quanto già introdotto nella MFC in fase iniziale, si è osservato un rapido aumento della densità di potenza.

In corrispondenza al 28-esimo giorno si è registrato il picco massimo della densità di potenza pari a  $3,0 \text{ mW/m}^3$  e dopo circa 40 giorni si è assistito ad un brusco calo della densità di potenza erogata dalla monocamera SG.

Si è cercato allora di aumentare la produzione di energia elettrica il giorno 46 effettuando un terzo inoculo di *Geobacter sulfurreducens* con 7 ml; anche il valore della densità di potenza è così leggermente aumentato, mantenendosi tuttavia intorno a valori pari a  $1 \text{ mW/m}^3$ ; si è registrato un picco della densità di potenza il giorno 28 e pari a  $3,0003 \text{ mW/m}^3$ .

Il 28-esimo giorno, si sono registrati valori massimi di tensione e di corrente rispettivamente pari a 11,83 mV e a  $50,74 \mu\text{A}$  e la monocamera SG, ha raggiunto il picco massimo in un tempo nettamente più breve, ovvero in 28 giorni anziché nei 53 impiegati dalla MFC avente configurazioni di tipo bicamera.

Relativamente alla MFC numero (4), nei cicli d'alimentazione successivi al secondo, la produzione di corrente ha subito un calo, ed i valori di corrente associati ai picchi dei successivi cicli di alimentazione-spurgo sono stati intorno ai  $30 \mu\text{A}$ .

Nella configurazione monocamera SG, reattore numero (4), l'andamento della resistenza interna si è rivelato particolarmente instabile nella fase iniziale, registrando inizialmente valori piuttosto elevati, per poi assestarsi dopo un periodo di circa 20 giorni su valori ben più bassi di quelli iniziali (da 66.511 a  $10.000 \Omega$ ), con oscillazioni decisamente meno forti.

Gli andamenti ottenuti per la MFC monocamera G, indicata come il reattore numero (5) sono quelli riportati nei grafici in figura 168:



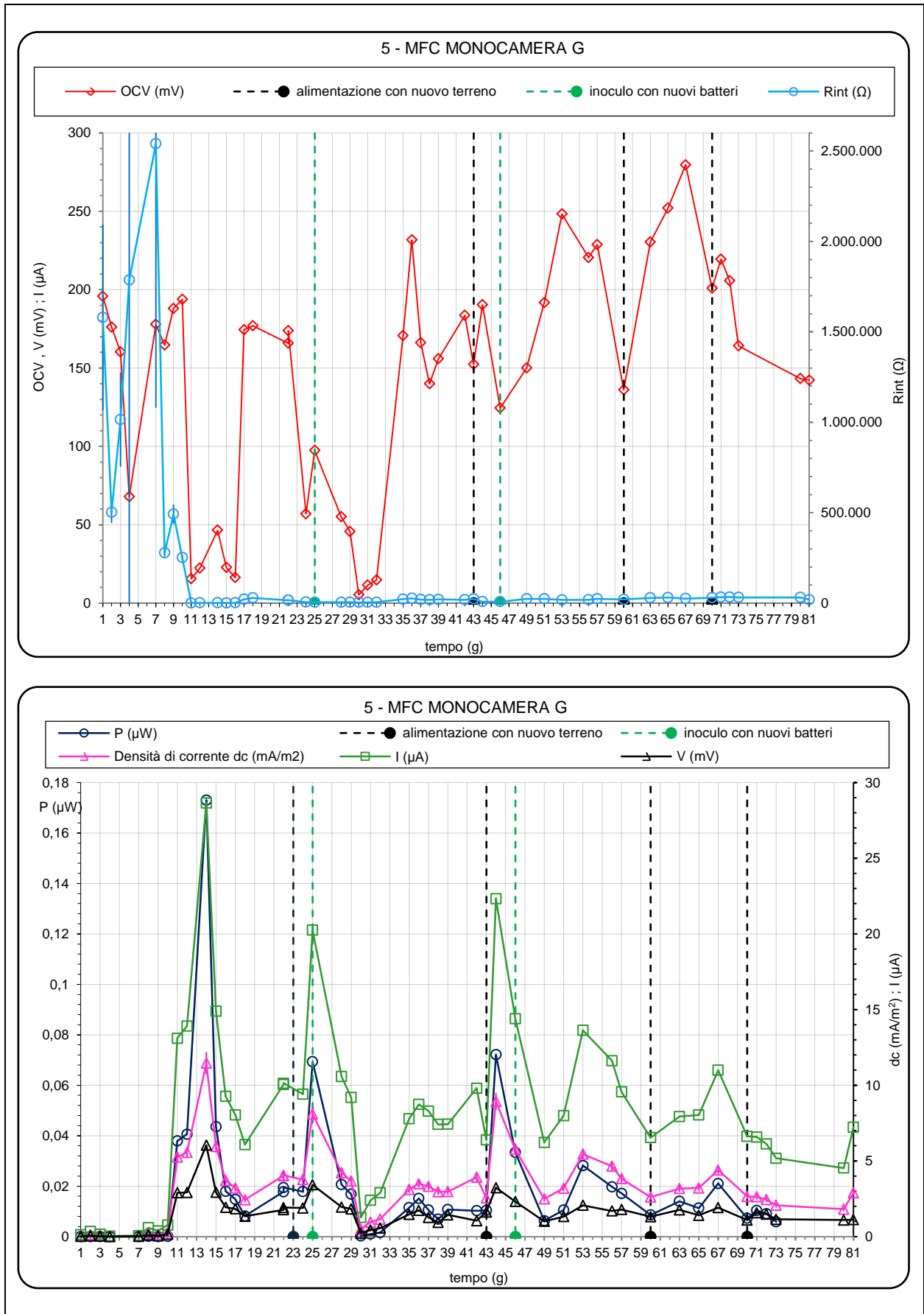


Figura 168 - Andamento delle grandezze elettriche per la MFC denominata monocamera G.

La MFC monocamera G [1:9] è stata alimentata con medium nel rapporto residuo vegetale-terreno standard e in ciascun comparto con 20 ml di residuo vegetale e 180 ml di terreno standard. Il valore più alto relativamente alla densità di corrente si è registrato nella fase iniziale e precisamente al 14-esimo giorno in cui si è rilevato un valore pari a  $11,461 \text{ mA/m}^2$ .

Nel ciclo successivo si è registrato un picco massimo di  $8,098 \text{ mA/m}^2$ .

In seguito al travaso del liquido contenuto nella MFC in una nuova monocamera, resosi necessario in seguito alle ripetute perdite verificatesi nella fase iniziale della sperimentazione, le performance della MFC hanno subito un drastico calo. Negli ultimi due cicli di alimentazioni il valore della densità di corrente per la MFC in questione non ha superato i  $6 \text{ mA/m}^2$ .

Nel reattore numero (5), monocamera la densità di potenza non ha mai superato il valore di  $1 \text{ mW/m}^3$ .

Nei primi due cicli di alimentazione si è osservata una costante perdita di liquido dal foro praticato lateralmente sulla bottiglietta della MFC monocamera, atto ad alloggiare la membrana PEM e l'elettrodo di grafite precompressa su carta; tale perdita era imputabile al parziale scollamento della membrana di Nafion 117 dalla bottiglietta.

È stato quindi effettuato il travaso del terreno in una nuova MFC monocamera.

Si è introdotto in essa lo stesso elettrodo utilizzato nel comparto anodico della precedente MFC, al fine di sfruttare l'eventuale biofilm creatosi sulla superficie dello stesso elettrodo.

A seguito del travaso, si è proceduto a degasare la monocamera per eliminare l'ossigeno presente. Tuttavia l'operazione di travaso dovrebbe aver danneggiato la coltura batterica e, nonostante siano state effettuate regolari alimentazioni ed un successivo inoculo di 7 ml di *Geobacter sulfurreducens*, al 46-esimo giorno, la MFC non ha mostrato le prestazioni attese.

Per confermare la suddetta ipotesi si renderebbe necessaria un'analisi biologica del biofilm presente sulla superficie dell'elettrodo anodico o un'analisi della coltura planctonica presente nell'anolita.

Si ipotizza, altresì, che all'interno del reattore numero (5) si siano instaurate determinate condizioni atte a favorire la produzione di metano piuttosto che di energia elettrica.

Tali condizioni sono state stimate mediante la misura del potenziale di ossidoriduzione e non tramite misura diretta del  $\text{CH}_4$  eventualmente prodotto. Considerando la composizione del terreno utilizzato come alimentazione, inoltre, è possibile dedurre che tale substrato sia maggiormente suscettibile a processi di fermentazione e manifesti quindi una scarsa potenzialità a stimolare una significativa attività elettrogenica.

Non deve dunque stupire la constatazione di una bassa produzione energetica soprattutto nella fase iniziale in quanto si deve attendere una speciazione della biomassa.

Per limitare l'eventuale produzione di  $\text{CH}_4$ , il 63-esimo giorno, si è operata l'aggiunta nel reattore numero (5) del sodio-2-bromoetanosulfonato ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{BrNaO}_3\text{S}$ ) al fine di ostacolare la metanogenesi.

Si sono pesati 0,0096 grammi di  $\text{C}_2\text{H}_4\text{BrNaO}_3\text{S}$  avente peso molecolare pari a 211,01 g/mol, quindi si sono sciolte  $4,5495 \cdot 10^{-5}$  moli di tale composto in 200 ml di acqua bidistillata per ottenere una soluzione avente concentrazione compresa tra 0,1 e 0,6 mmol/l.

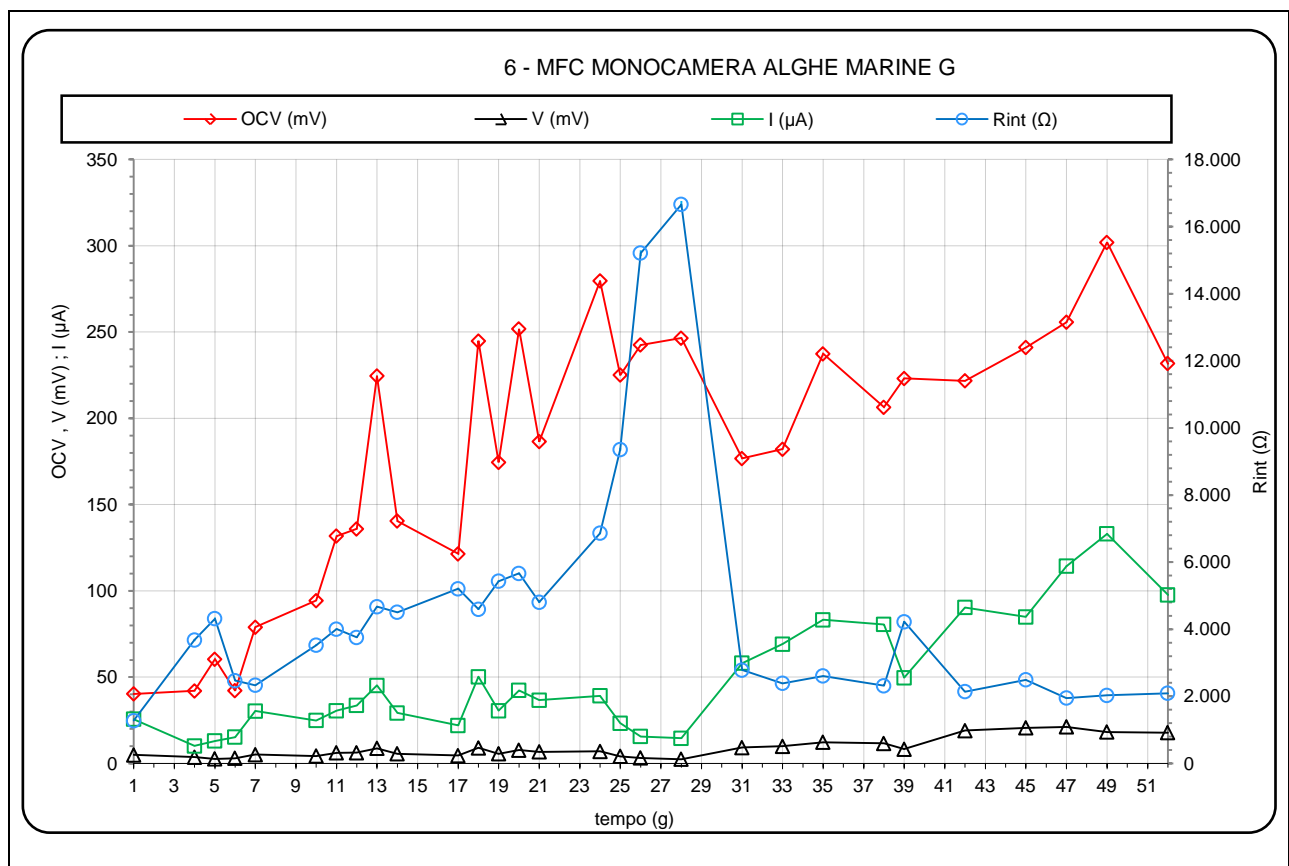
Alcune gocce della soluzione preparata avente concentrazione pari a 0,2275 mmol/l sono state aggiunte quindi nel reattore monocamera numero (5).

Il valore più alto relativamente alla densità di corrente si è registrato nella fase iniziale: precisamente al 14-esimo giorno in cui si è rilevato un valore pari a  $11,461 \text{ mA/m}^2$  e nel ciclo successivo si è registrato un picco massimo di  $8,928 \text{ mA/m}^2$ .

In seguito al travaso del liquido contenuto nella MFC in una nuova monocamera, resosi necessario in seguito alle ripetute perdite verificatesi nella fase iniziale della sperimentazione, le prestazioni della MFC hanno subito un drastico calo.

Negli ultimi due cicli di alimentazione il valore della densità di corrente per la MFC in questione non ha superato i  $6 \text{ mA/m}^2$ .

Gli andamenti ottenuti per la MFC monocamera alghe marine G, indicata come il reattore numero (6) sono quelli riportati nei grafici in figura 169:



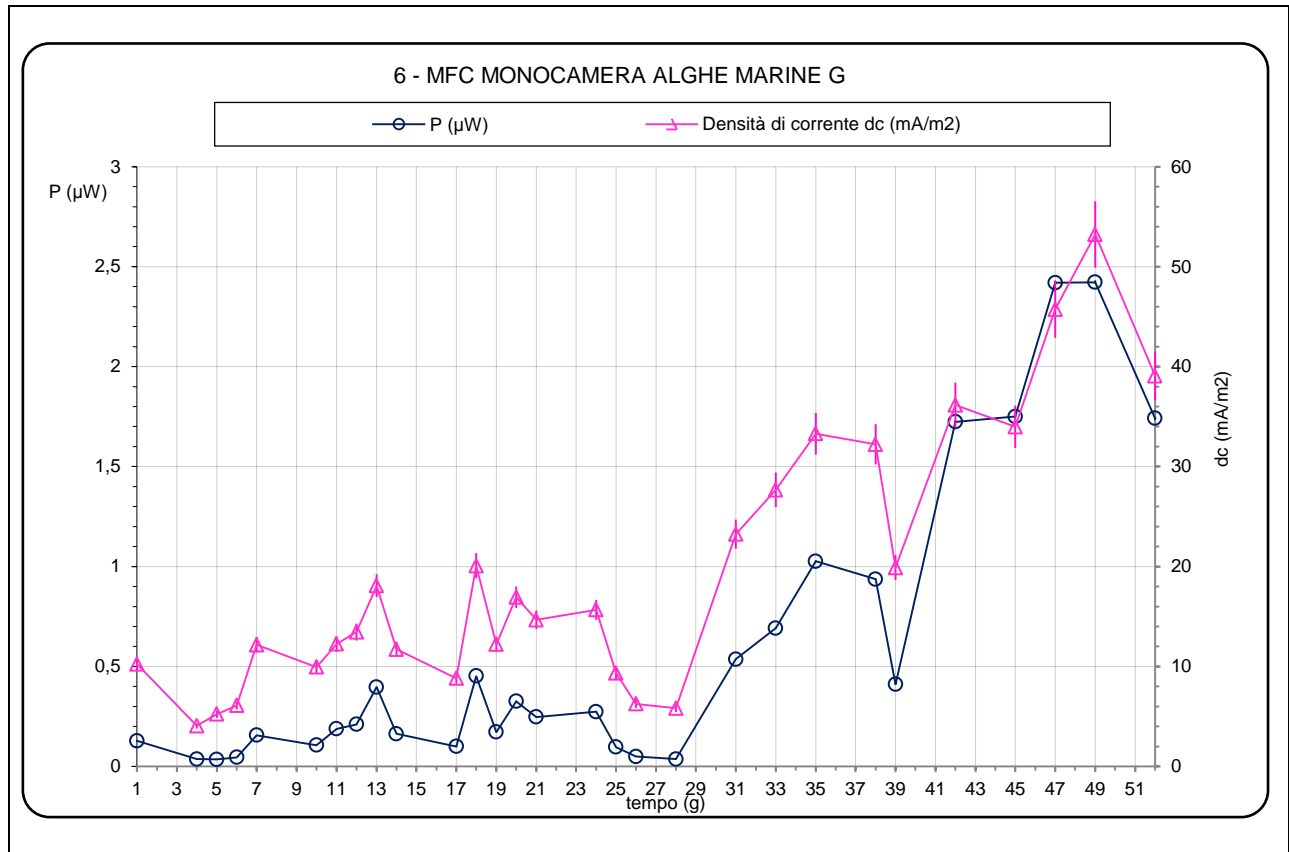


Figura 169 - Andamento delle grandezze elettriche per la MFC denominata monocamera alghe marine G.

Questa MFC monocamera aveva come substrato le alghe marine ed il terreno standard, gli andamenti dei valori della OCV, della CCV e della I sono stati sempre crescenti, indice dell'assenza di una fase di latenza; la resistenza interna ha registrato un aumento, dovuto ad involontarie modifiche della struttura costruttiva di questa MFC, ma dal 28-giorno i valori sono tornati sull'ordine di grandezza di 2.000 Ω.

Anche i valori della potenza sono risultati crescenti, con dei valori dell'incertezza non elevati e valori assoluti della densità di potenza elevati ed un valore massimo pari a 12,1099 mW/m<sup>3</sup> al 49-giorno. La sperimentazione ha avuto una durata più breve di quella delle altre 5 MFC perché questa configurazione della cella non comporta trattamento di coltura batterica pura, bensì solo quello di alghe marine, quindi è un ramo della ricerca che non poteva essere approfondito in questo lavoro ed inoltre è stata scelta la modalità di alimentazione in batch. Le alghe provenivano dalla Laguna di Orbetello (VT) nel Mar Tirreno e sono state conservate a temperatura frigorifera (4 °C) sino al loro utilizzo.

La tabella 31 riassume tutti i valori massimi assoluti, di tutte le grandezze elettriche, prodotte da ciascuna delle 6 MFC in questa fase III della ricerca che ha studiato l'influenza della variazione della concentrazione e del terreno di coltura:

tipo e denominazione MFC		OCV (mV)	CCV (mV)	I ( $\mu$ A)	P ( $\mu$ W)	$R_{int}$ ( $\Omega$ )	DC ( $\text{mA}/\text{m}^2$ )	PD ( $\text{mW}/\text{m}^3$ )	CD ( $\text{A}/\text{m}^3$ )	dp ( $\text{mW}/\text{m}^2$ )
monocamera	1	140,1 $\pm 0,2$	14,3 $\pm 0,1$	66,45 $\pm 0,53$	0,950 $\pm 0,015$	1.892 $\pm 21$	83,07 $\pm 1,81$	4,75 $\pm 0,09$	0,332 $\pm 0,003$	0,38 $\pm 0,16$
	2	125,7 $\pm 0,2$	0,9 $\pm 0,1$	3,43 $\pm 0,41$	0,0032 $\pm 0,0007$	36.324 $\pm 4.400$	1,37 $\pm 0,24$	0,016 $\pm 0,003$	0,017 $\pm 0,002$	0,0013 $\pm 0,00005$
	3	206,2 $\pm 0,3$	43,7 $\pm 0,1$	182,82 $\pm 0,66$	7,982 $\pm 0,055$	787,9 $\pm 7,9$	73,13 $\pm 4,65$	39,908 $\pm 0,367$	0,914 $\pm 0,006$	3,193 $\pm 0,213$
bicamera	1	209,6 $\pm 0,3$	3,9 $\pm 0,1$	9,72 $\pm 0,06$	0,03812 $\pm 0,002$	21.055 $\pm 172$	3,890 $\pm 0,257$	0,1906 $\pm 0,0135$	0,0486 $\pm 0,001$	0,0152 $\pm 0,0014$
	2	179,1 $\pm 0,3$	1,9 $\pm 0,1$	4,25 $\pm 0,41$	0,008 $\pm 0,0012$	41.578 $\pm 4.115$	1,701 $\pm 0,266$	0,04 $\pm 0,0054$	0,0213 $\pm 0,003$	0,0032 $\pm 0,00067$
	3	274,8 $\pm 0,4$	1,5 $\pm 0,1$	4,74 $\pm 0,21$	0,007 $\pm 0,0008$	57.606 $\pm 2.682$	1,894 $\pm 0,198$	0,035 $\pm 0,0054$	0,024 $\pm 0,001$	0,0028 $\pm 0,00012$

*Tabella 31 - Valori massimi ed incertezze di tutte le grandezze elettriche registrate per le 6 MFC nella fase di sperimentazione della variazione della concentrazione e del tipo del terreno di coltura.*

### 7.5 Analisi e commento dei dati sperimentali-fase IV: studio del catolita

Il catolita più comunemente utilizzato nelle celle a combustibile biologiche dopo l'ossigeno è il ferrocianuro o esacianoferrato,  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ . Esso ha un potenziale standard di 0,361 V, è altamente solubile in acqua e non richiede alcun tipo di metallo prezioso sul catodo. È stato dimostrato che il ferrocianuro porta alla produzione di maggiore energia rispetto all'ossigeno, in virtù della bassa polarizzazione dell'elettrodo a cui dà luogo, quindi il potenziale al catodo risulta più vicino a quello calcolato in condizioni standard [139], [141]. Pertanto, sebbene si preveda che l'ossigeno porti ad un potenziale catodico più elevato di quello del ferrocianuro, nella pratica i potenziali raggiunti utilizzando l'ossigeno raggiungono valori molto più bassi di quelli teorici.

Il comparto anodico delle due celle è stato riempito fino ad un volume di 250 ml utilizzando la componente liquida del digestato proveniente dall'allevamento Bruni, costituito da 700 capi di vacche da latte, e il mezzo di coltura con un rapporto 1:10. La camera catodica è stata riempita

fino a 250 ml con un tampone fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  100 mM e pH 7) e potassium ferricyanide [50 mM  $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (Sigma-Aldrich)] come catolita. La ferricyanide è un ottimo elettroaccettore, quindi viene spesso utilizzata come specie ossidante. Viene riportata una immagine della MFC-U in figura 170:



*Figura 170 - MFC-U, non condizionata, con ferricianide come catolita.*

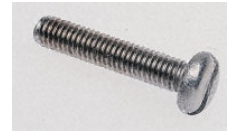
- MFC bicamera con digestato e terreno di coltura standard 1:10, e ferricianide come catolita (denominata “MFC-U”):
  - elettrodo dell’anodo in grafite pressata su carta, a forma piana con superficie di  $25 \text{ cm}^2$ , anaerobico;
  - elettrodo del catodo in grafite pressata su carta, a forma piana con superficie di  $25 \text{ cm}^2$ , aerobico;
  - membrana protonica: NAFION 117 (pretrattato);
  - volume inoculo = 200 ml;
  - $R_{\text{est}} = 180 \pm 0,5 \ \Omega$ ;

Vogliamo elencare tutti i materiali che sono stati impiegati per la realizzazione delle MFC studiate in questa fase della ricerca, a differenza di quelli già presentati nella fase I e fase II:

- Viti ISO metriche ad intaglio con testa tronco conica in acciaio inox A4 e anche Viti ISO metriche ad intaglio; sacchetti di viti a ferro ISO metriche a filettatura passo grosso, in acciaio inox A4. Il modello in acciaio A4, 316 S16 offre una maggiore resistenza a corrosioni e sostanze chimiche rispetto al modello A2 18/8, la testa conica a intaglio è realizzata a norma DIN 85 e la testa conica incassata è a norma DIN 7985. Acciaio inox al molibdeno studiato per applicazioni

in cui sussistono problemi di corrosione. Non è consigliato per applicazioni con temperature superiori a 300 °C; nella tabella vengono riportate le caratteristiche ed una immagine:

Dimensione filettatura	M3
Filettatura	Metrico
Materiale	Acciaio inox 18/8 A4



Dadi ISO metrici, rondelle piane e rondelle elastiche di cui riportiamo le caratteristiche e una immagine:

Dimensione filettatura	M3
Filettatura	Metrico
Materiale	Acciaio inox 18/8 A4
Modello	Completa



ed analogamente per le rondelle piane

Dimensioni	M3
Materiale	Acciaio Inossidabile A4
Modello	Liscio



□ membrana CMI-7000S Cation Exchange Membranes della ditta Ultrex Membranes International (USA):

Technical Specification	CMI-7000S
	Single Sheet
Functionality	Strong Acid Cation Exchange Membrane
Polymer Structure	Gel polystyrene cross linked with divinylbenzene
Functional Group	Sulphonic Acid
Ionic Form as Shipped	Sodium
Color	Brown
Standard Thickness (mils) (mm)	18±1 0.45±0.025
Electrical Resistance (Ohm·cm <sup>2</sup> ) 0,5 mol/L NaCl	<30
Permselectivity (%) 0,1 mol KCl/kg / 0,5 mol KCl/kg	94
Total Exchange Capacity (meq/g)	1.6±0.1
Water Permeability (ml/hr/ft <sup>2</sup> ) @5psi	<3
Mullen Burst Test strength (psi)	>80
Thermal Stability (°C)	90
Chemical Stability Range (pH)	1-10
Preconditioning Procedure	Membranes should be preconditioned by emersion in a 5% NaCl solution at 40°C for 24 hours to allow for membrane hydration and expansion.

analogamente in questa fase è stata allestita una seconda microbial fuel cell, del tipo non condizionata le cui caratteristiche vengono qui riportate:

- MFC bicamera con digestato e coltura microbica di *Geobacter sulfurreducens* preconditionato, in un terreno di coltura standard 1:10, e ferricianide come catolita (denominata “MFC-C”):
  - elettrodo dell’anodo in grafite pressata su carta, a forma piana con superficie di 25 cm<sup>2</sup>, anaerobico;
  - elettrodo del catodo in grafite pressata su carta, a forma piana con superficie di 25 cm<sup>2</sup>, aerobico;
  - membrana protonica: NAFION 117 (pretrattato);
  - volume inoculo = 200 ml;
  - $R_{est} = 180 \pm 0,5 \ \Omega$ ;

Per entrambe le MFC sono stati monitorati i parametri elettrici in termini soprattutto della CCV, per poterne poi calcolare i valori della corrente generata I e della potenza prodotta P; gli andamenti della CCV per entrambe le MFC, la condizionata MFC-C e la non condizionata MFC-U sono riportati in figura 171:

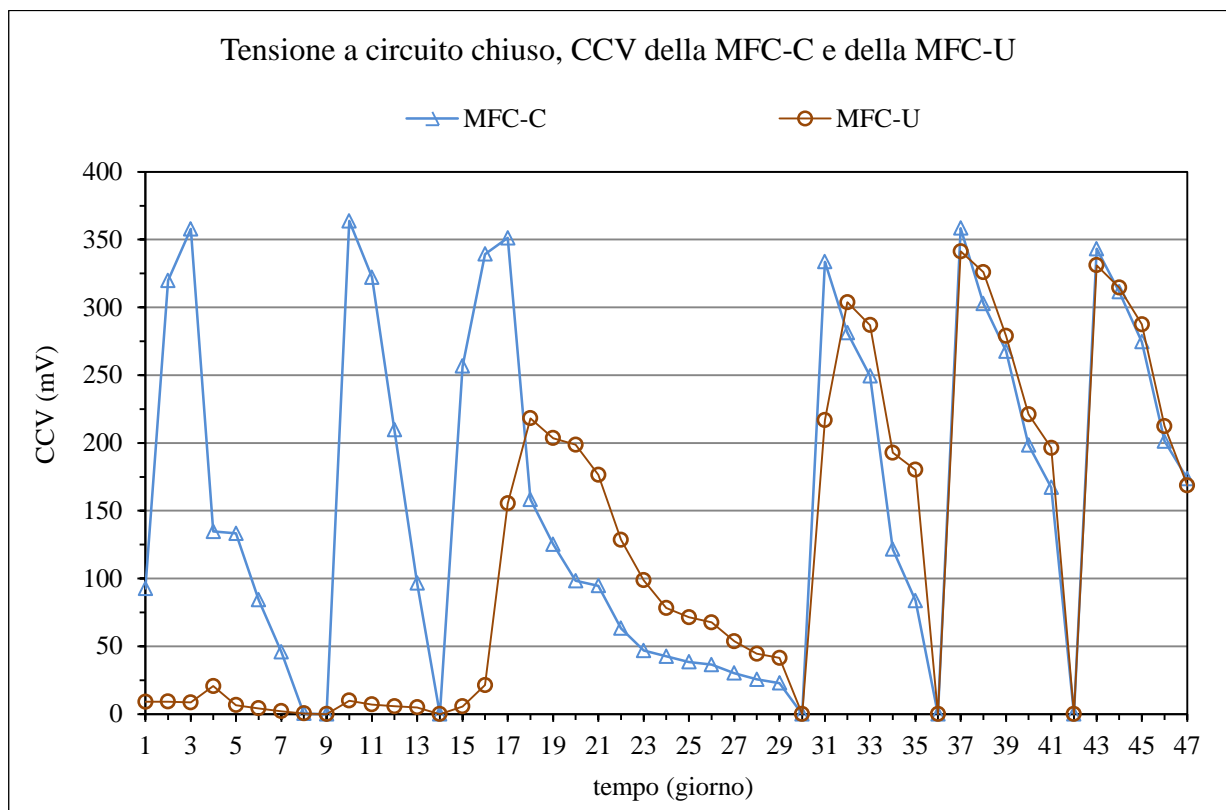


Figura 171 - Andamento della CCV per la MFC-C condizionata, e per la MFC-U non condizionata.



Nel primo mese di funzionamento i due reattori si sono comportati diversamente. La MFC-C ha mostrato un rapido aumento della CCV, seguito da rapide cadute, presumibilmente dovute all'attività elettrogenica decresciuta a causa dell'impoverimento del substrato. Effettivamente, a seguito dell'alimentazione della soluzione, la CCV risale al suo valore massimo (340-360 mV). In maniera differente si è comportata la MFC-U, che non ha mostrato attività apprezzabile in questo periodo. In seguito con la sostituzione dell'alimentazione anche la MFC-U ha mostrato un aumento della CCV che è arrivata alla metà del valore registrato dalla MFC-C. Da questo istante in poi, la MFC-U si è comportata come l'altra MFC-C che mostrano nel tempo un andamento simile della CCV.

In figura 172 vengono riportate le curve di polarizzazione della MFC inoculata con *Geobacter sulfurreducens*, con 2 differenti catoliti, in pratica con solo terreno di coltura o altrimenti con ferricianide; il grafico della MFC con ferricianide presenta dei valori massimi della corrente generata anche 5 volte maggiori della MFC senza ferricianide ed anche la OCV della MFC con la ferricianide risulta molto aumentata, rispetto a quella senza ferricianide:

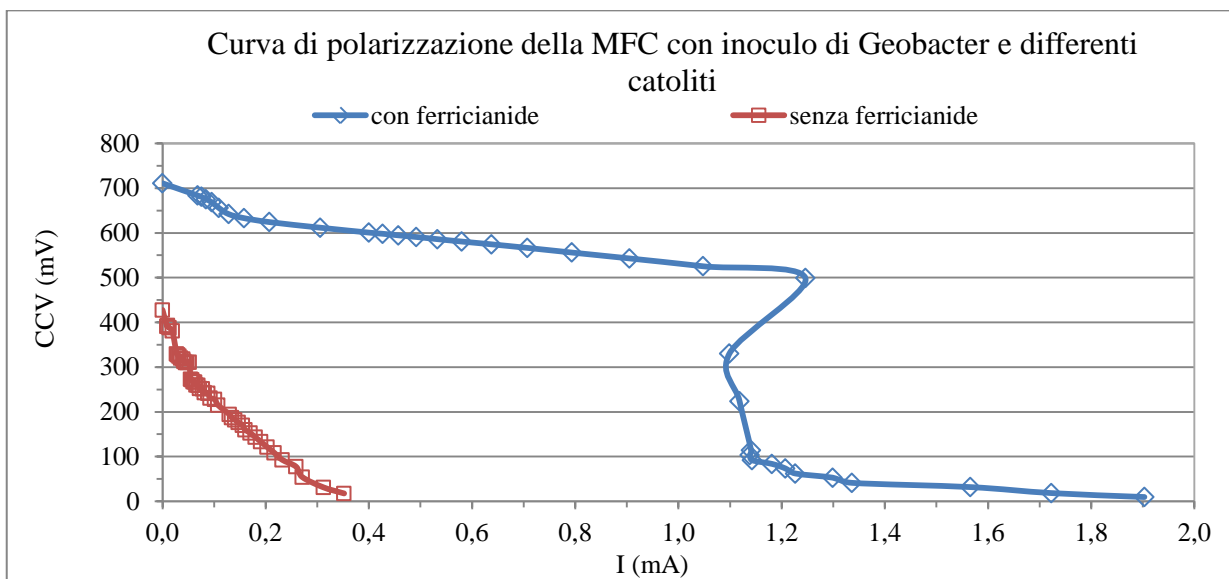


Figura 172 - Curve di polarizzazione della MFC-C inoculata con *Geobacter sulfurreducens*, con i due differenti catoliti.

Assai più illustrativa della funzione del catolita usato è la curva di potenza, riportata in figura 173, nella quale si evidenzia il grande aumento della potenza producibile dalla MFC con il catolita costituito dalla ferricianide, a scapito della potenza prodotta dalla MFC senza ferricianide:

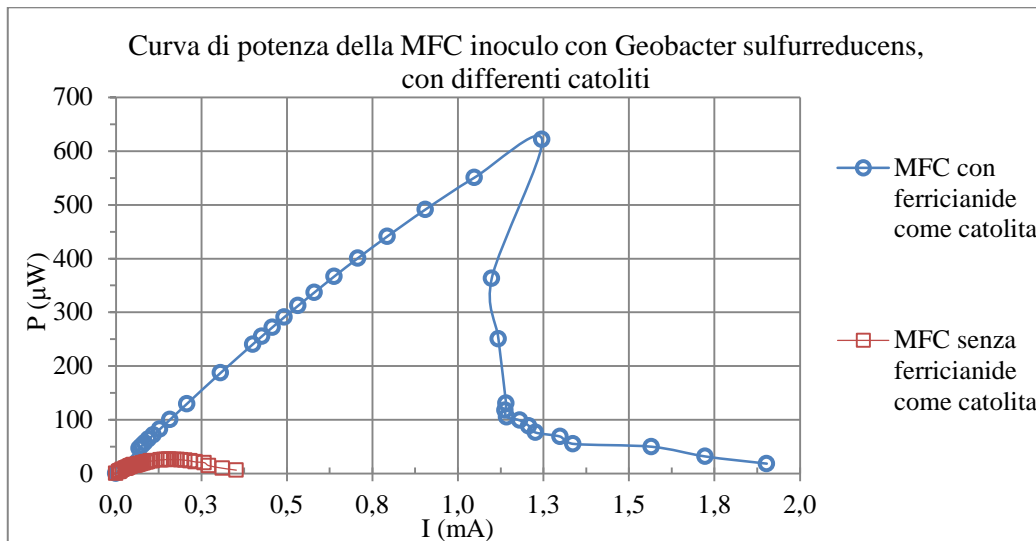


Figura 173 - Curve di potenza della MFC con inoculo di *Geobacter sulfurreducens* con differenti catoliti.

I valori della resistenza interna presentati da ciascuna di queste MFC sono ricavabili sull'asse delle ascisse, in corrispondenza del valore massimi dei valori della potenza prodotta da ciascuna MFC, ottenute applicando la teoria dell'adattamento della potenza prodotta dalla MFC, che afferma essere

di valore massimo quando la resistenza interna della MFC uguaglierà il valore della resistenza esterna ad essa applicata, avendola fatta variare da un valore minimo ad uno massimo ed i valori sulle curve riportate in figura 174 sono pari a 400,4 Ω per la MFC con ferricianide ed a 1100 Ω per la MFC senza ferricianide, quindi anche dal punto di vista elettrico il catolita favorisce delle prestazioni migliori per la MFC:

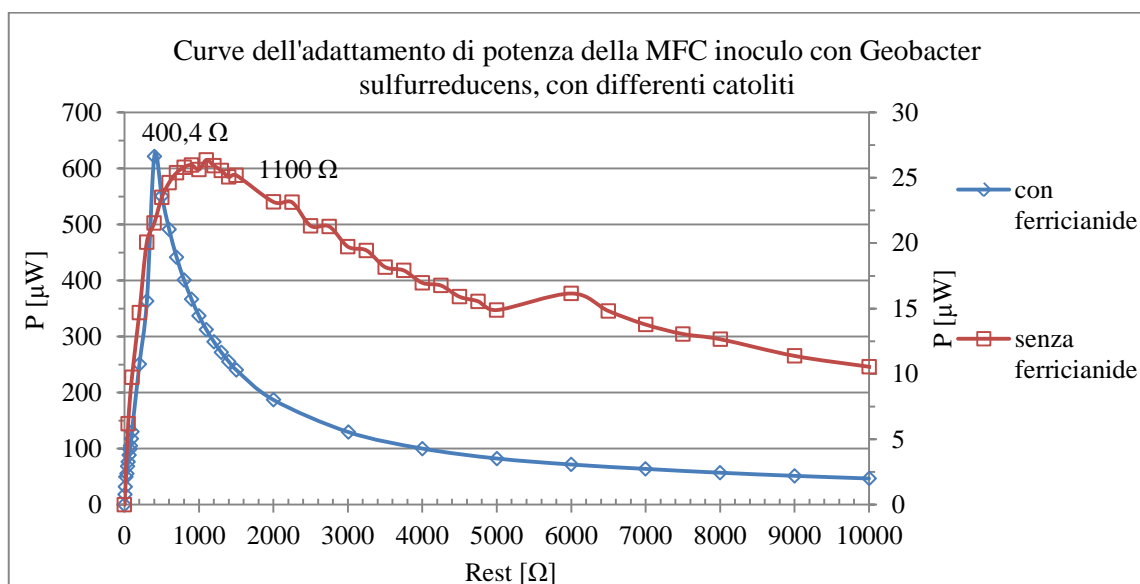


Figura 174 - Curva di polarizzazione della MFC inoculo con *Geobacter sulfurreducens*, con differenti catoliti.

Altri catoliti che vengono utilizzati sono il ferro [139], il manganese [140], ed il permanganato [141].

Pur essendo un catolita eccellente per quanto riguarda le prestazioni del sistema, la ferricianide deve essere rigenerata chimicamente e il suo utilizzo non è economicamente sostenibile, quindi il suo impiego è ristretto soltanto a studi di laboratorio.

### 7.5.1 Misura dei potenziali redox

Per la misura dei potenziali redox di ciascuna camera delle MFC condizionata e non condizionata è stato misurato per via potenziometrica in maniera analoga alla misura del pH, inserendo un elettrodo redox di platino all'interno della soluzione stessa. Il procedimento di misura è analogo a quello per la misura del pH, e lo strumento utilizzato è un elettrodo di platino 52 61 CRISON montato su uno strumento GLP 22, le cui specifiche sono riportate nella tabella 32:

*Tabella 32 - Caratteristiche tecniche dell'elettrodo redox CRISON 52 61*

Scala di misura	± 2000 mV
Metallo indicatore	Platino
Temperatura di lavoro	0 ÷ 80 °C
Riferimento	Cristalli di Ag / AgCl incapsulati
Diaframma	Ceramico
Elettrolita	CRISOLYT A
Materiale corpo	Vetro
Punzonatura minima	12 mm

La configurazione della cella per questa misura ha richiesto la presenza di un secondo elettrodo di riferimento nella camera catodica, per poter realizzare un circuito chiuso e composto da due potenziali noti, rappresentati dai due elettrodi di riferimento CRISON 52 61 e dai due potenziali incogniti, rappresentati dai due potenziali redox di semicella; i valori ottenuti per questi potenziali sono stati poi riportati ai valori dell'SHE, mentre durante la misura erano riferiti all'elettrodo di riferimento Ag/AgCl (KCl 3,5 M) che offre un potenziale di 205 mV; lo schema del circuito è qui sotto riportato, con tutti i valori determinati per la MFC non condizionata durante la misura n°. 1; in particolare si debbono considerare i valori della maglia che non include i due elettrodi di riferimento, mentre per questi ultimi è necessario prendere i valori riferiti all'ipotetico Ref NHE che fisserà i potenziali ai valori forniti dal costruttore e pari a 205 mV, mentre lo scarto  $\Delta Ref$  sarà l'errore massimo dal quale saranno affetti i valori dei potenziali redox di ciascuna semicella, che si aggira su circa il 10% per tutti i valori redox rilevati:

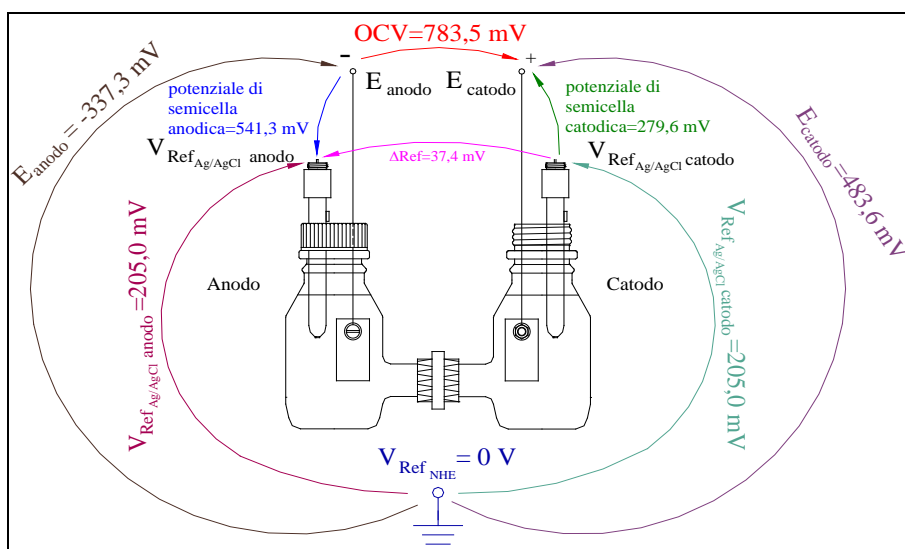


Figura 175 - Configurazione della maglia per la misura dei potenziali redox delle due semicelle che compongono la MFC.

I risultati sono stati ottenuti per la MFC-C condizionata, e la MFC-U non condizionata con due misure, a breve distanza temporale ed i risultati ottenuti sono riportati nelle due tabelle seguenti:

**MFC non condizionata**

misura n° 1	mV
potenziale di semicella anodica	541,3
potenziale di semicella catodica	279,6
$\Delta\text{Ref} (\text{Ref}_{\text{Ag}/\text{AgCl}} - \text{Ref}'_{\text{Ag}/\text{AgCl}})$	37,40
valore misurato dell'OCV	783,5
valore <u>calcolato</u> dell'OCV	783,5
$\Delta\text{OCV}$ (=valore misurato - valore calcolato)	+0,0

**potenziale redox semicella anodo (mV vs. SHE)** -337,3  
**potenziale redox semicella catodo** 483,6

misura n° 2	mV
potenziale di semicella anodica	546,4
potenziale di semicella catodica	293,4
$\Delta\text{Ref} (\text{Ref}_{\text{Ag}/\text{AgCl}} - \text{Ref}'_{\text{Ag}/\text{AgCl}})$	44,60
valore misurato dell'OCV	796,2
valore <u>calcolato</u> dell'OCV	795,2
$\Delta\text{OCV}$ (=valore misurato - valore calcolato)	+1,0

**potenziale redox semicella anodo (mV vs. SHE)** -342,4  
**potenziale redox semicella catodo** 497,4

**MFC condizionata**

misura n° 1	mV
potenziale di semicella anodica	537,5
potenziale di semicella catodica	290,3
$\Delta\text{Ref} (\text{Ref}_{\text{Ag}/\text{AgCl}} - \text{Ref}'_{\text{Ag}/\text{AgCl}})$	45,02
valore misurato dell'OCV	783,7
valore <u>calcolato</u> dell'OCV	782,8
$\Delta\text{OCV}$ (=valore misurato - valore calcolato)	+0,9

**potenziale redox semicella anodo (mV vs. SHE)** -333,5  
**potenziale redox semicella catodo** 494,3

misura n° 2	mV
potenziale di semicella anodica	538,4
potenziale di semicella catodica	295,1
$\Delta\text{Ref} (\text{Ref}_{\text{Ag}/\text{AgCl}} - \text{Ref}'_{\text{Ag}/\text{AgCl}})$	48,01
valore misurato dell'OCV	787,2
valore <u>calcolato</u> dell'OCV	785,5
$\Delta\text{OCV}$ (=valore misurato - valore calcolato)	+1,7

**potenziale redox semicella anodo (mV vs. SHE)** -334,4  
**potenziale redox semicella catodo** 499,1

i valori ottenuti sono nel range di funzionamento delle condizioni MFC, per entrambe le celle.

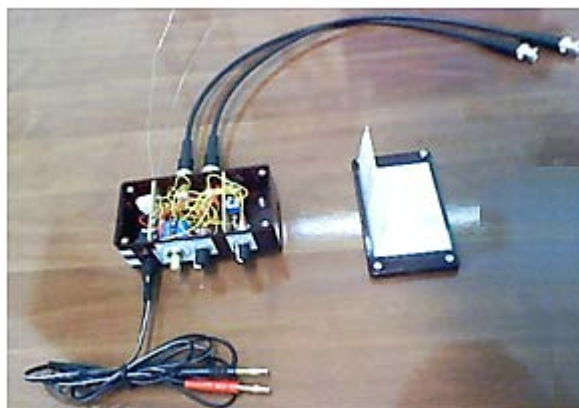
### 7.5.2 Stazione di misura che consente di effettuare la misura delle grandezze elettriche su una microbial fuel cell

Analogamente al metodo della variable resistor box, nel quale si esegue la variazione del valore della resistenza esterna cambiando la posizione delle spine in una cassetta di resistenza per valori opportuni della Rest, abbiamo progettato e realizzato dei sistemi che consentissero di scegliere dei valori voluti per la resistenza di carico esterno, necessari per la rilevazione delle curve di potenza e di polarizzazione di una MFC; in figura 176 è riportata la stazione di misura che consente un valore massimo della resistenza esterna da applicare, pari a 5 k $\Omega$  e anche la misura di altri parametri caratteristici di una MFC, come viene spiegato in seguito:



*Figura 176 - Prima stazione di misura (0÷5 k $\Omega$ ).*

L'altra stazione di misura, non è completamente identica alla precedente ma consente la scelta di un valore massimo per la Rest di 45 k $\Omega$ , e ne è riportata una immagine in figura 177:



*Figura 177 - Seconda stazione di misura (0÷45 k $\Omega$ ).*

il cartiglio del suo progetto è raffigurato nel seguito:

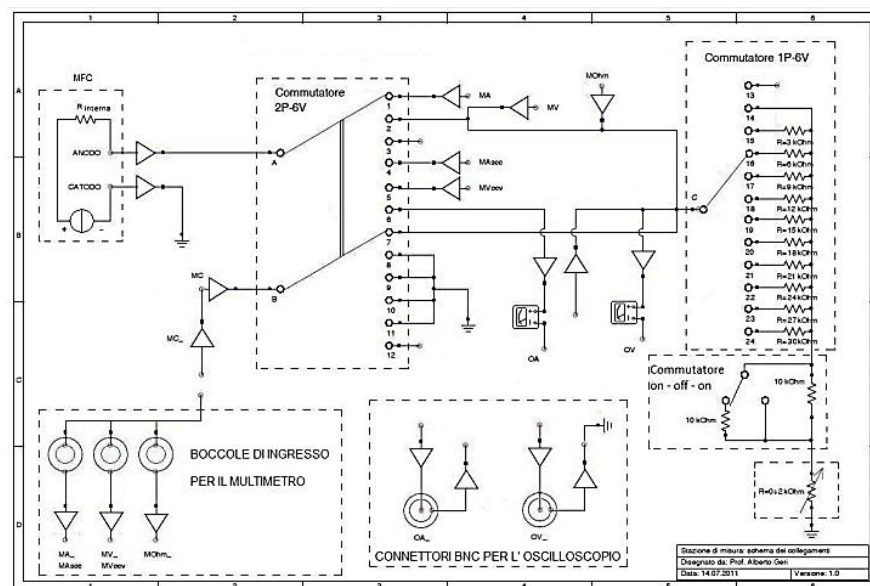


Figura 178 - Progetto dello schema elettrico della stazione di misura.

Questo circuito consente di realizzare una misura voltamperometrica sulla MFC collegando i due morsetti di ingresso agli elettrodi del catodo e dell'anodo della cella e variare poi la resistenza esterna; la misura delle grandezze elettriche può essere effettuato sia con un multimetro digitale DMM che con un oscilloscopio digitale. È stato progettato con due commutatori in cascata che della loro combinazione realizzano tutte le vie che consentono la misura delle grandezze elettriche di interesse:

- corrente sotto carico,  $I$ ;
- tensione ai capi della resistenza esterna;
- resistenza esterna,  $R_{est}$  ;
- corrente con anodo-catodo in c.to-c.to,  $I_{SCC}$  ;
- tensione a circuito aperto, OCV.

La resistenza esterna  $R_{est}$  può essere fatta variare, con in più la posizione di circuito aperto che è necessario per la misura della OCV che offre un valore della resistenza esterna infinita; la seconda stazione di misura è stata realizzata con gli stessi componenti della prima.

Si possono utilizzare sia un multimetro digitale che un oscilloscopio digitale a 2 canali e a seconda della grandezza elettrica da misurare bisogna collegare i terminali a banana nelle boccole ROSSA e NERA del multimetro, e lo spinotto nero nella porta corrispondente alla misura che si vuole effettuare ma bisogna posizionare il Commutatore 1 ed il Commutatore 2 nelle dovute posizioni. Nelle misure con l'oscilloscopio digitale bisogna inserire i due cavi coassiali ai connettori BNC dell'oscilloscopio; avremo così già attribuito al Canale 1 il segnale da rilevare (V od I) e per esclusione l'altro segnale sarà sul Canale 2.

Nello schema, in particolare si può osservare la funzione del Commutatore on-off-on che consente di sommare dei valori, rispettivamente 0 Ω, 5 kΩ e 10 kΩ semplicemente ponendo in parallelo alla resistenza di 10 kΩ che è sempre inserita, altri 2 valori di resistenze di cui la prima ha il valore di 10 kΩ, attraverso la quale si può ottenere una resistenza di 5 kΩ dal parallelo con la prima oppure corto circuitando la prima e ottenere 0 Ω ed infine escludendo il commutatore avremo il terzo valore di 10 kΩ. Il potenziometro consente invece di variare con continuità i valori della resistenza essendo esso posto in serie con le resistenze selezionabili con il Commutatore ad 1 polo e 6 vie. I valori di resistenza sono ottenibili dalla combinazione del commutatore con le selezioni del Commutatore 2:

selezione del commutatore		0 Ω (posizione in alto)		5 kΩ (posizione in basso)		10 kΩ (posizione centrale)	
valori di resistenza ottenibili		da (Ω)	a (Ω)	da (Ω)	a (Ω)	da (Ω)	a (Ω)
valore della resistenza nella posizione del Selettore 2	1	∞					
	2	potenziometro 0 ÷ 2 kΩ , 200 Ω x giro					
	3	3008	5030	7950	9980	12910	14930
	4	5550	7570	10490	12520	15450	17480
	5	8090	10120	13030	15060	17990	20020
	6	11800	13820	16740	18770	21700	23720
	7	14930	16960	19880	21900	24840	26860
	8	19930	21960	24880	26900	29830	31860
	9	21710	23740	26660	28680	31610	33640
	10	25030	27060	29980	32000	34930	36900
	11	26450	28480	31390	33420	36300	38300
	12	33040	35070	37900	40000	42900	44900

*Figura 179 – Valori di resistenza esterna impostati dalla combinazione del Commutatore 2.*

### 7.5.3 Misura della resistenza interna di una microbial fuel cells

Ci sono molti metodi differenti per determinare il valore della resistenza interna di una MFC e sono: la tangente alla curva di polarizzazione, il picco massimo della densità di potenza, la spettroscopia di impedenza elettrochimica (EIS) usando la curva di Nyquist ed il metodo della corrente interrotta. I primi due di questi metodi sono facili da eseguire ed immediatamente ci forniscono il valore della resistenza interna. Gli altri due metodi sono da preferire ma richiedono l'uso di un potenziostato.

Il metodo del picco massimo della densità di potenza applica la teoria dell'adattamento per cui la potenza prodotta da una MFC è massima quando il carico esterno applicato uguaglia la resistenza interna dell'intero sistema della MFC in esame [142]. Per la MFC-U e la MFC-C è

stata eseguita la misura della potenza prodotta da ciascuna MFC su un carico esterno variabile costituito dalle resistenze presenti nelle stazioni di misura; le curve di potenza e di polarizzazione così ottenute sono riportate in figura 180 per la MFC-U e sono state rappresentate nello stesso grafico perché così è possibile ricavare anche il valore della resistenza interna, seguendo il metodo del picco massimo della densità di potenza, seguendo il procedimento qui sotto riportato:

- si rileva il picco massimo della densità di potenza, sulla curva di potenza, il valore  $P_{max}$ ;
- in corrispondenza di questo punto, si scende sull'asse delle ascisse e si rileva il valore di corrente erogata in queste condizioni di funzionamento, la  $i_{opt}$ ;
- per lo stesso valore delle ascisse, sulla curva di polarizzazione si rileva il valore della tensione della MFC, la  $\Delta E_{opt}$ ;

per ricavare i valori numerici bisogna considerata la superficie dell'elettrodo anodico, assunta pari a  $0,0025 \text{ m}^2$ , da cui avremo:

$P_{max}=172,2 \text{ W/m}^2$ , con una  $i_{opt}=479 \text{ mA/m}^2$  e quindi  $I_{opt}= 479*0,0025=1,198 \text{ mA}$ ; in corrispondenza la  $\Delta E_{opt}=359,4 \text{ mV}$  e infine  $R_{int}= \Delta E_{opt}/I_{opt}=359,4/1,198=300,1 \Omega$ ;

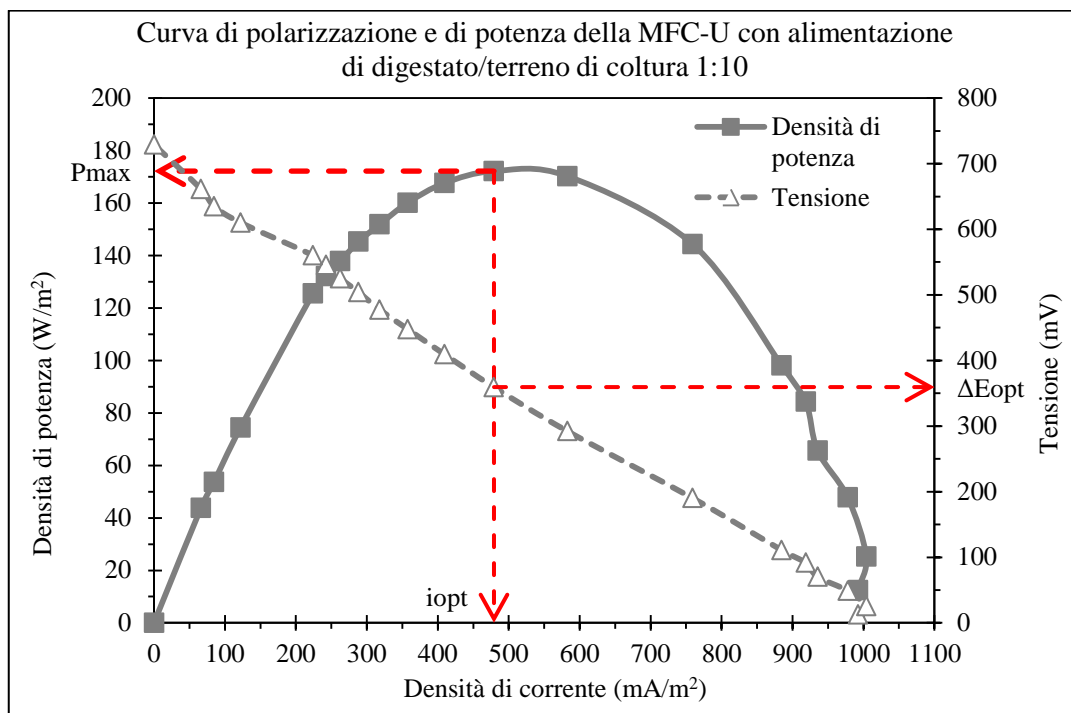


Figura 180 - Curva di polarizzazione e di potenza della MFC-U, con il procedimento grafico per determinare il valore della resistenza interna  $R_{int}$ .

Sulla curva che è stata ottenuta con la teoria dell'adattamento del trasferimento di potenza, cioè variando la Rest si rileva invece direttamente il valore della  $R_{int}$  offerta dalla MFC, leggendo il



valore sull'asse delle ascisse, in corrispondenza del picco della curva parabolica che è coinciso esattamente con il valore sopra determinato e cioè di  $300,1 \Omega$ , come è riportato in figura 181:

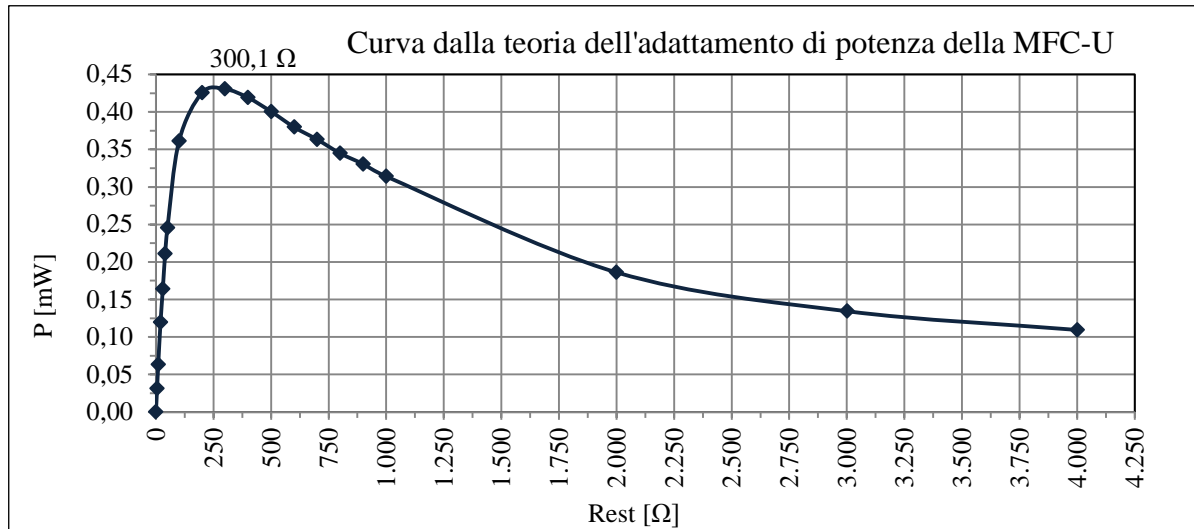


Figura 181 - Curva dalla teoria dell'adattamento di potenza della MFC-U, con riportato il suo valore della resistenza interna  $R_{int}$ .

Analogamente per la MFC-C, sono state eseguite le stesse misure di quelle per la MFC-U e sono state rilevate le curve di polarizzazione e di potenza, riportate in figura 182:

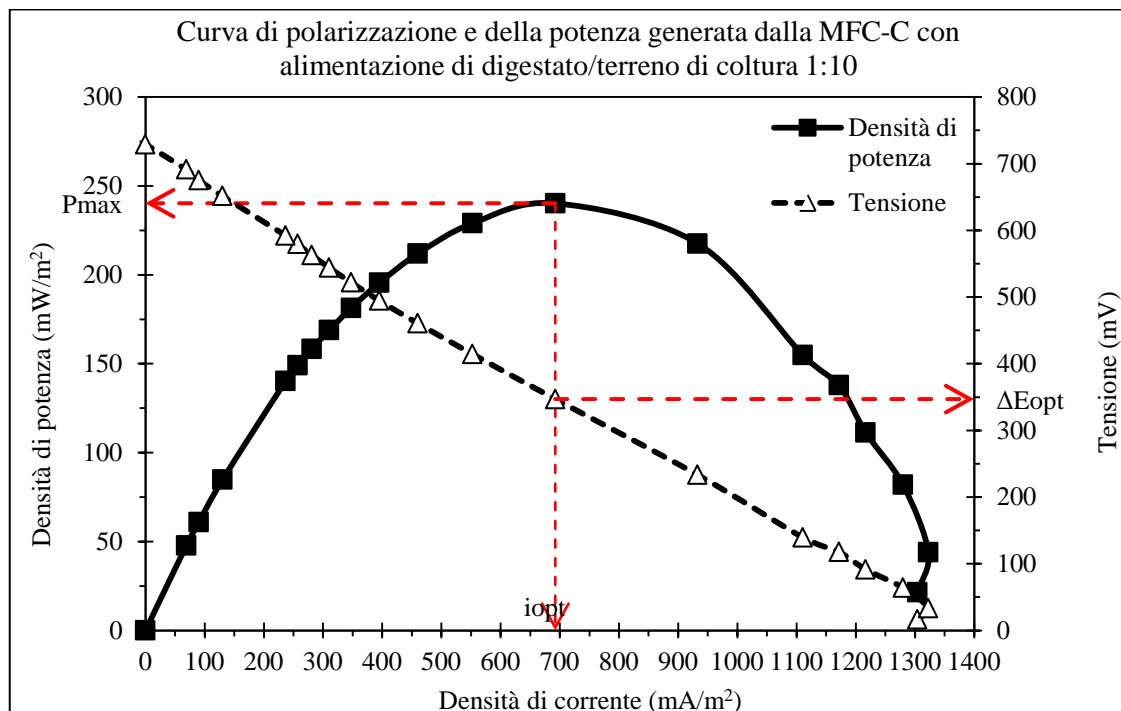


Figura 182 - Curva di polarizzazione e di potenza della MFC-C, con il procedimento grafico per determinare il valore della resistenza interna  $R_{int}$ .

La raffigurazione delle frecce, nel grafico ci aiuta ad applicare il metodo del picco massimo della densità di potenza per ricavare il valore della resistenza interna della MFC-C e eseguendo lo

stesso procedimento, avremo dei valori, ricavati dal grafico in figura 182; assunta la superficie dell'elettrodo anodico pari a  $0,0025 \text{ m}^2$ , avremo:

$P_{\max}=240,2 \text{ W/m}^2$ , con una  $i_{\text{opt}}=692,56 \text{ mA/m}^2$  e quindi  $I_{\text{opt}}= 692,56*0,0025=1,731 \text{ mA}$ ; in corrispondenza la  $\Delta E_{\text{opt}}=346,8 \text{ mV}$  e infine  $R_{\text{int}}= \Delta E_{\text{opt}}/I_{\text{opt}}=346,8/1,731=200,3 \Omega$ .

Questo risultato lo si deve confrontare con il valore della resistenza interna determinato sulla curva dell'adattamento di potenza riportata in figura 183 e si vede che sono fra loro coincidenti:

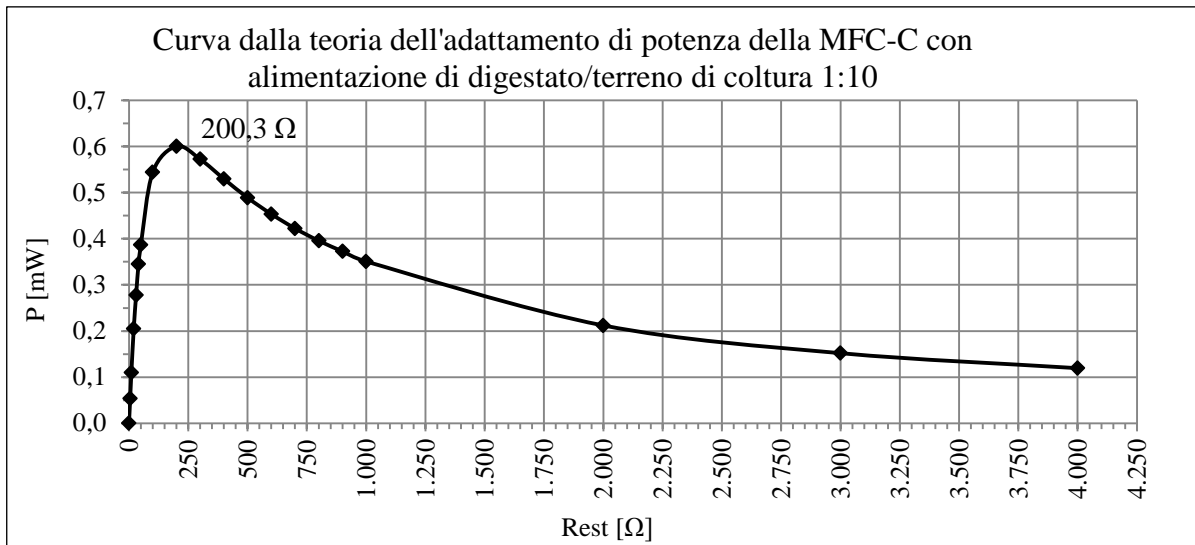


Figura 183 - Curva dalla teoria dell'adattamento di potenza della MFC-C, con riportato il suo valore della resistenza interna  $R_{\text{int}}$ .

#### 7.5.4 Fenomeno del power overshoot

La potenza elettrica resa disponibile da una MFC è massima quando il biofilm è maturo, e la regione del power overshoot può essere vista sulle curve di potenza e di polarizzazione, come quella nella quale la corrente e la potenza diminuiscono entrambe come viene indicato nella figura seguente:

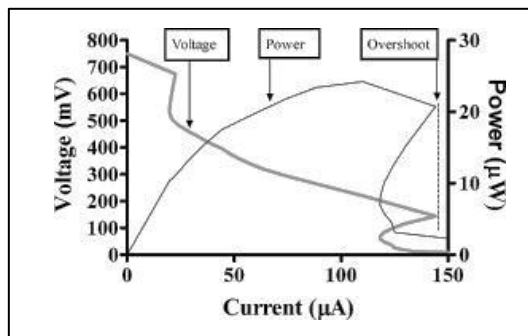
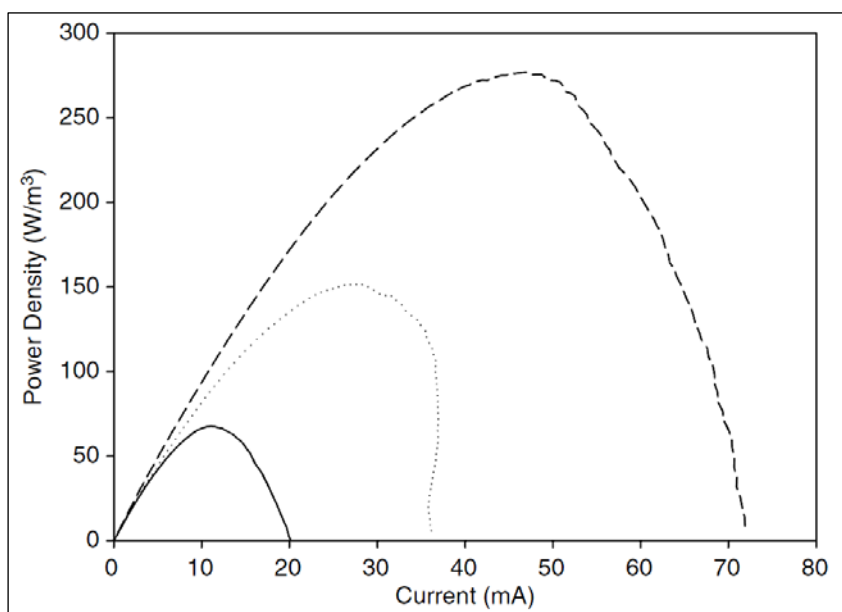


Figura 184 - Esempio di curva di polarizzazione e di potenza di una MFC, con evidenziata la regione del power overshoot.

Come viene mostrato in figura 184, l'overshoot appare essere solo un sovraccarico temporaneo del sistema, che i microbi mostrano riuscire a superare lo stesso lungo il tratto lineare della curva di polarizzazione. Durante la ripresa del rifornimento di elettroni e ioni è ristabilito l'equilibrio con la richiesta e sulla curva di potenza esiste il modo 'overload' con un nuovo aumento della corrente. Nel maggior punto di recupero la robustezza della coltura microbica e la sua capacità di adattamento alla dinamica degli eventi di condizioni ostili, che può essere attribuito al continuo rifornimento del substrato esaurito. Questo però è ancora qualcosa di raramente mostrato nella letteratura, dalla maggioranza delle curve di potenza riportate che rivelano l'overshoot, non mostrano recupero o se esso avviene non c'è una spiegazione per esso.

In una curva di polarizzazione per una MFC unitaria o in sistema di MFC in batteria (stack), viene riportata il rapporto tra produzione di potenza elettrica generata dalla MFC e la corrente, direttamente collegata al trasferimento extracellulare di elettroni. C'è un punto ottimale corrente - potenza che viene posizionato dal massimo valore nella curva [21]. L'uso che si fa della curva di polarizzazione è quello di indagare lo sviluppo della comunità batterica nella MFC; un esempio può essere quello riportato di seguito [128] in figura 185:



*Figura 185 - Grafico della presenza del fenomeno del power overshoot.*

dove si nota che nel periodo dopo lo start-up (linea piena), quando la densità batterica è ancora bassa, la potenza massima è limitata. In fase 2 (linea punteggiata), la potenza raggiunta è superiore, che indica una maturazione del sistema, ma esistono effetti negativi alle alte correnti dovute alla polarizzazione di concentrazione (evidenziato dalla parte non-parabolica della curva di polarizzazione rispetto a quella al tempo 1 e denominato "power overshoot"). In fase 3 (linea tratteggiata), anche se la potenza ottenuta e la corrente sono notevolmente più elevate, questa polarizzazione di concentrazione non viene più osservata. Ciò dimostra che i batteri possono

creare biofilm elettrochimicamente attivo nel tempo, in grado di superare le limitazioni di diffusione ed elettrochimiche. Ulteriori ricerche sono necessarie per capire come le comunità faccia avvenire questo.

La MFC inoculata con *Geobacter sulfurreducens* conservati in atmosfera d'azoto ha manifestato il funzionamento in power overshoot, evidenziato da due differenti misurazioni, eseguite il 10-11-2011 ed il 16-11-2011; in particolare in questa seconda sessione di misura si è ripetuta la prova dopo 30 minuti dalla prima rilevazione delle curve di potenza e di polarizzazione, al fine di definire la variazione nel tempo degli andamenti delle curve. Le curve di polarizzazione sono riportate nella figura 186:

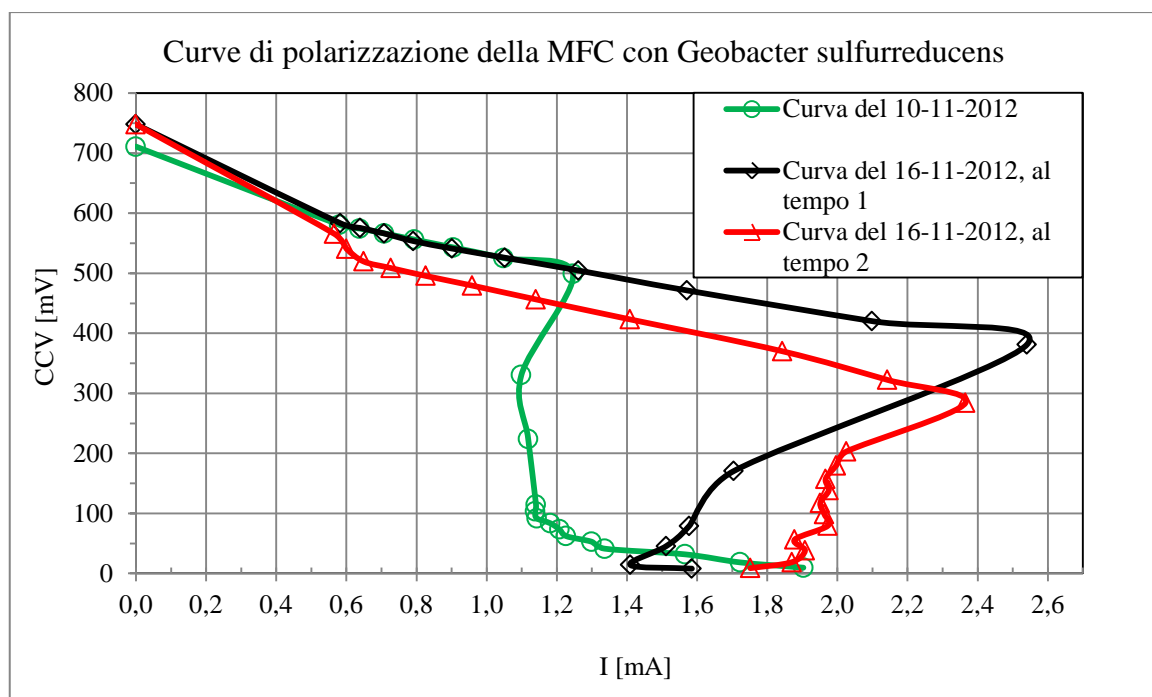


Figura 186 - Curve di polarizzazione della MFC con *Geobacter sulfurreducens* conservati in atmosfera d'azoto.

In letteratura [119] viene ipotizzato che l'overshoot potrebbe essere il risultato delle limitazioni del trasporto di massa nell'anodo. L'ipotesi formulata [126] è che il fenomeno dell'overshoot è il risultato dell'esaurimento degli elettroni e degli ioni che si verifica principalmente a causa del minore valore (o innalzamento) dell'intervallo di resistenze. Nello studio è stato ripetutamente notificato che la ritrazione ('piegatura verso l'interno') della parte della curva di potenza accade nel punto dove il punto di cambiamento sulla scala del carico diminuisce; per esempio quando l'intervallo cambia dalle migliaia alle centinaia. A questi valori bassi di resistenze, la richiesta di elettroni (causata dalla maggiore conduttività del circuito esterno) supera il tasso microbico che essi possono fornire, e come conseguenza, l'anodo diviene svuotato di elettroni e ioni. Questa

potrebbe essere una causa per la quale la corrente diminuisce dove ci si aspetterebbe di avere un aumento.

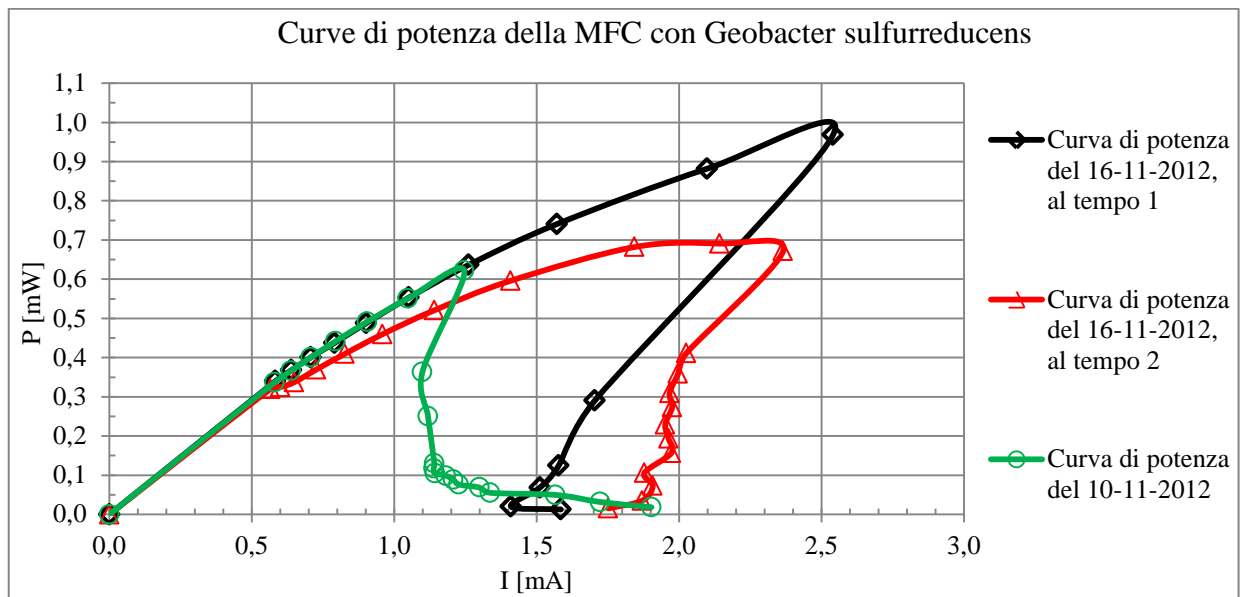


Figura 187 - Curve di potenza della MFC con *Geobacter sulfurreducens* conservati in atmosfera d'azoto.

Vogliamo riportare tutti gli andamenti ottenuti nel corso di queste 3 misurazioni, utilizzando inoltre le grandezze delle densità di potenza e di corrente, cioè esprimendole in funzione della superficie dell'elettrodo anodico, come rappresentato in figura 188:

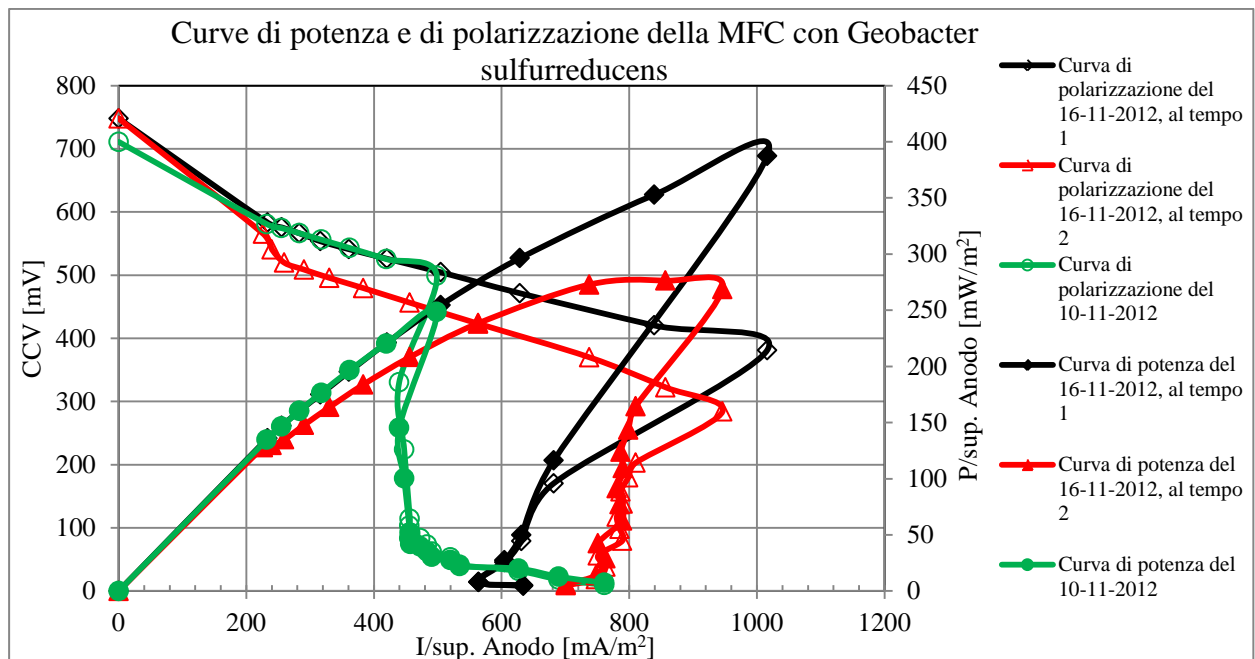


Figura 188 - Le curve di potenza e di polarizzazione della MFC con *Geobacter sulfurreducens* conservati in atmosfera d'azoto, ottenute da tutte le misurazioni.

Le curve di potenza che si ottengono spesso mostrano un “overshoot” in cui si ha una diminuzione della potenza e della corrente prodotta, in concomitanza e durante il quale ad una diminuzione della  $E_{cell}$ , corrisponde una diminuzione (e non un aumento) della corrente prodotta; in sostanza la MFC non funziona più da generatore elettrico, bensì da utilizzatore come se fosse un carico resistivo;

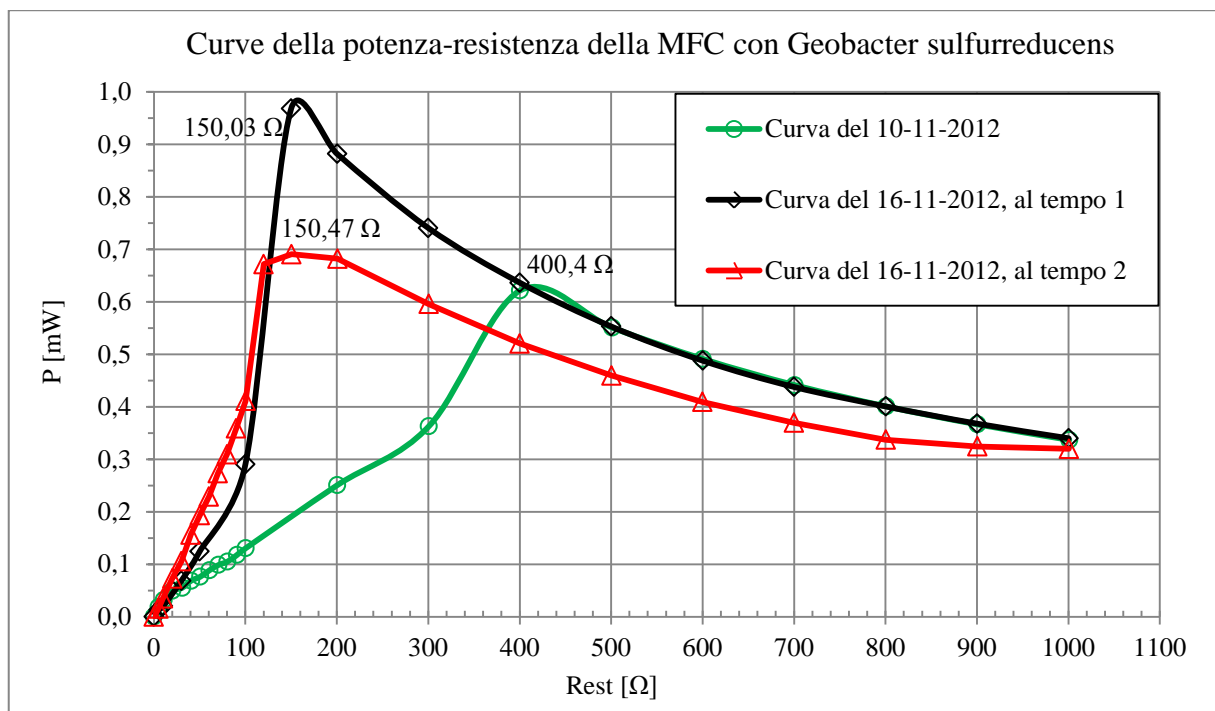


Figura 189 - Curva della variazione della potenza prodotta al variare della resistenza esterna dalla MFC con *Geobacter sulfurreducens* conservati in atmosfera d'azoto.

La figura 189 mostra che per alte portate è associata una diminuzione della  $R_{int}$  con un aumento della densità di potenza, oltretutto; questo non è il caso a basse portate dove entrambe aumentano insieme. La maggiore potenza massima è il risultato contingente del biofilm maturo che potrebbe inoltre spiegare l'aumento della  $R_{int}$  a consuntivo. Durante la prima fase dello sviluppo anodico, la superficie dell'elettrodo anodico è stata abbastanza completamente sprovvisto di crescita microbica. Oltretutto, la successiva colonizzazione dell'anodo (dall'esterno) contemporaneamente alla crescita ulteriore (dall'interno) può portare un aumento della resistenza di diffusione [129]. L'aumento della biomassa porta con esso un aumento nelle componenti cellulari non conduttive [129] che formerà un rivestimento non così apparente durante le fasi iniziali dell'inoculazione. Le portate maggiori potrebbero portare al taglio del biofilm rimosso dai rivestimenti resistivi e da ciò l'aumento della  $R_{int}$  non è testimoniato.

Inoltre al rivestimento resistivo, le mutazioni della comunità microbica potrebbero anche avere effetti sulle limitazioni al trasferimento di massa. Durante la fase iniziale dell'inoculazione la maggioranza della potenza potrebbe essere stata prodotta principalmente dai microrganismi planctonici. Così un cambiamento nella comunità microbica è sembrato possedere diverse condizioni di ambientamento ottimali come un flusso all'interno della cella. Questo potrebbe inoltre costituire una spiegazione all'aumento della  $R_{int}$  a più basse portate nonostante le maggiori potenze prodotte. Quando le curve delle resistenze sono inizialmente formate alle basse portate, la produzione di potenza è contribuita da una larga parte della comunità planctonica e così il trasferimento di massa dei metabolici attraverso il substrato potrebbe non porre gli stessi problemi di un biofilm statico.

### 7.6 MFC con altri ceppi elettrogenici: *Pseudomonas aeruginosa*

Sono state realizzate tre MFC, nella configurazione H-type per lo studio dell'attività elettrogenica del ceppo batterico *Pseudomonas aeruginosa*, il quale dalla letteratura scientifica risultava avere una considerevole capacità di produrre energia elettrica [129]; le caratteristiche costruttive, con le diverse peculiarità per ciascuna MFC sono presentate nel seguito:.

#### [1] MFC bicamera inoculata con *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* ceppo mutante, superproduttore di piocianina, conservati in atmosfera d'azoto; gli elementi che costituiscono questa MFC, con i dati sono riportati di seguito:

- elettrodo dell'anodo in grafite a forma piana con superficie di  $0,0025 \text{ m}^2$ , anaerobico;
- elettrodo del catodo in grafite a forma piana con superficie di  $0,0025 \text{ m}^2$ , aerobico;
- volume inoculo = 200 ml;
- membrana: CMI-7000 della Ultrex Membranes International;
- Temperatura di conservazione: costante a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , in cella;
- $R_{est} = 180 \pm 0,6 \Omega$ .



Figura 190 - MFC bicamera inoculata con *Pseudomonas aeruginosa*.

Il grafico con i valori rilevati durante i 18 giorni della misura, sono riportati in figura 191:

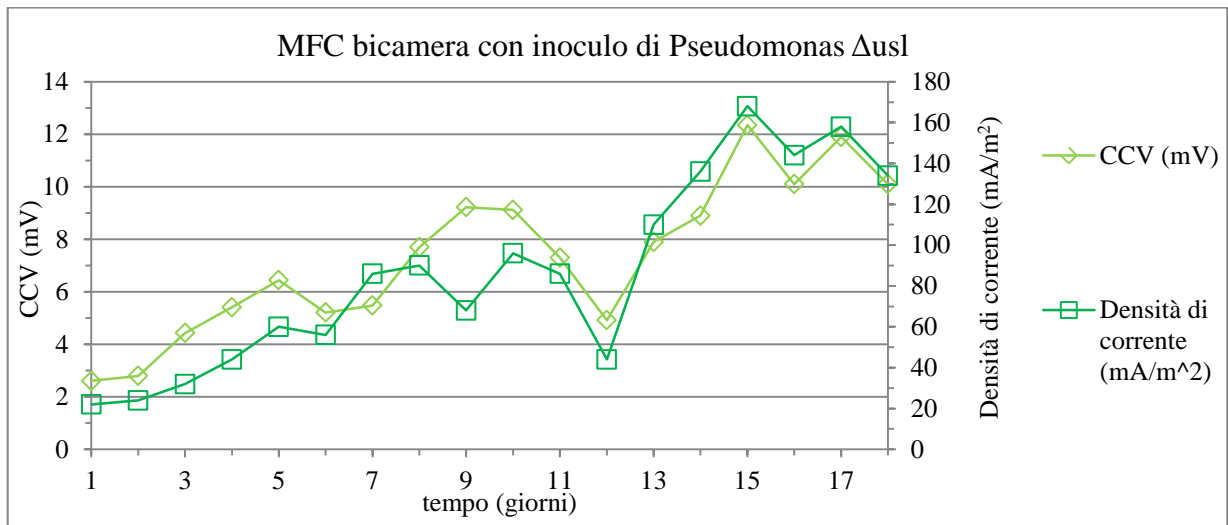


Figura 191 - Valori della CCV e della densità di corrente della MFC bicamera con inoculo del ceppo *Pseudomonas aeruginosa*.

[2] MFC bicamera inoculata con *Pseudomonas aeruginosa* ceppo Pa01 conservati in atmosfera d'azoto;

Gli elementi che costituiscono questa MFC, con i dati sono riportati di seguito:

- elettrodo dell'anodo in grafite a forma piana con superficie di  $0,0025 \text{ m}^2$ , anaerobico;
- elettrodo del catodo in grafite a forma piana con superficie di  $0,0025 \text{ m}^2$ , aerobico;
- volume inoculo = 200 ml;
- membrana: CMI-7000 della Ultrex Membranes International;
- Temperatura di conservazione: costante a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , in cella;
- $R_{\text{est}} = 180 \pm 0,6 \ \Omega$ .



Figura 192 - Immagine della MFC bicamera con inoculo di *Pseudomonas aeruginosa* ceppo Pa01.

Il grafico con i valori rilevati durante i 48 giorni della misura, sono riportati in figura 193:



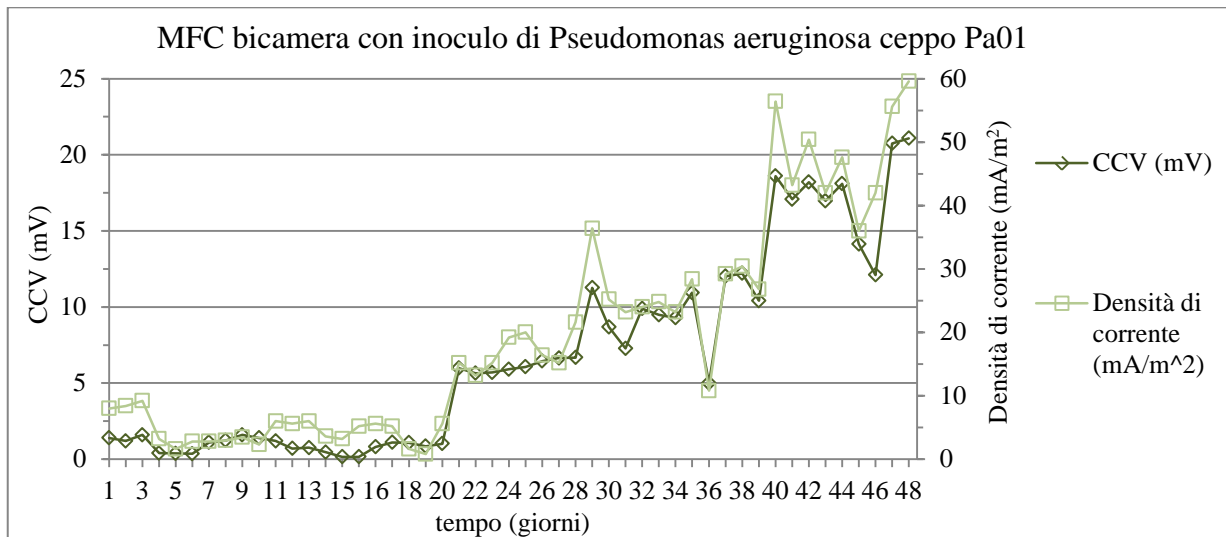


Figura 193 - Valori della CCV e della densità di corrente della MFC bicamera con inoculo del ceppo Pa01 *Pseudomonas aeruginosa*.

### [3] MFC monocamera inoculata con *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* conservati in atmosfera d'azoto

Gli elementi che costituiscono questa MFC, con i dati sono riportati di seguito:

- elettrodo dell'anodo in grafite a forma a forma piana con superficie di  $0,144 \text{ m}^2$ , anaerobico;
- elettrodo del catodo in grafite a forma piana con superficie di  $0,144 \text{ m}^2$ , all'aria, aerobico;
- volume inoculo = 200 ml;
- Temperatura di conservazione: costante a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , in cella;
- $R_{\text{est}} = 180 \pm 0,6 \ \Omega$ .



Figura 194 - Immagine della MFC *Pseudomonas aeruginosa* conservati in atmosfera d'azoto.

del quale riportiamo il valore massimo della potenza prodotta, pari a  $0,00125 \ \mu\text{W}$ .

In tabella vengono riassunti tutti i dati di questa sperimentazione:

n. MFC e tipo	n° giorni misurazioni	Valore massimo CCV (mV)	Valore massimo corrente I (mA)	Valore massimo della densità di corrente (mA/m <sup>2</sup> )	Valore massimo della potenza
1 - bicamera	48	21,08	0,149	59,6	3,1409
2 - bicamera	18	12,35	0,084	168	1,0374
3 - monocamera	5	--	--	--	0,00125

dalla quale si evince che si è avuta la maggior produzione di potenza dalla MFC numero 1, a causa di una migliore acclimatazione della coltura batterica, con una fase di latenza molto breve e subito una fase esponenziale, come si deduce dalla curva della CCV nel grafico in figura 193.

### 7.7 Analisi e commento dei dati sperimentali-fase IV: analisi dei picchi

Della MFC-C, condizionata e MFC-U, non condizionata celle è stata investigata l'attività elettrogenica della specie *Geobacter sulfurreducens* con delle prove potenziostatiche, come indicato nella letteratura scientifica [135], [136], mediante CV voltammetrie cicliche realizzate con un range di +0,5 V, -0,5 V vs. SCE ed un scan rate di 10 mV/s ed è stata operata questa scelta perché è stato ritenuto che restringere il range in quell'intervallo potesse limitare interferenze da specie redox presenti nel digestato stesso, mentre lo scan rate è stato scelto poiché è noto che i picchi risultano più evidenti al diminuire della velocità di scansione, ma si poteva ripetere la prova a 5 mV/s; i voltammogrammi ottenuti sono riportati in figura 195 per la MFC-C:

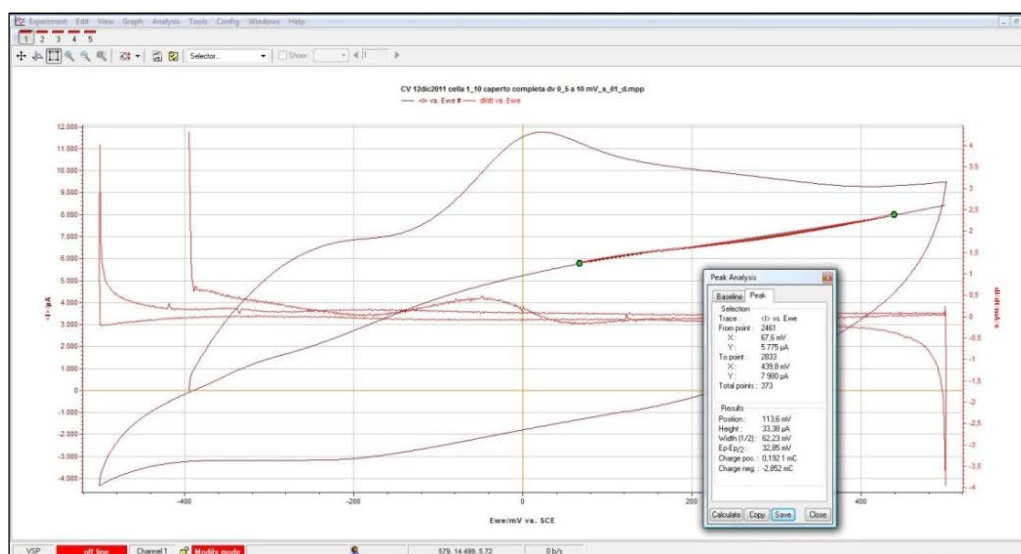


Figura 195 - Voltammogramma per la MFC-C, con in evidenza il picco di ossidazione e nel riquadro, alla voce Position, è riportato il suo valore.

dove si è ottenuto un picco per la ossidazione di 113,6 mV vs. SCE; questo valore si è dedotto applicando la funzione preposta del software EC-Lab e denominata *peak analysis* ed inoltre si è rappresentata anche la curva della *derivata prima DCV*, indicata come “dI/dt/mA/s” (the time derivative of the current) che presenta la proprietà di avere i valori maggiore o uguale a zero in corrispondenza dei picchi del voltammogramma e anche questa funzione ci conferma il valore trovato. Dallo stesso voltammogramma, e per la stessa MFC-C è stato cercato il picco della riduzione, con lo stesso procedimento adottato per il picco dell'ossidazione, ed i risultati ottenuti sono riportati in figura 196:

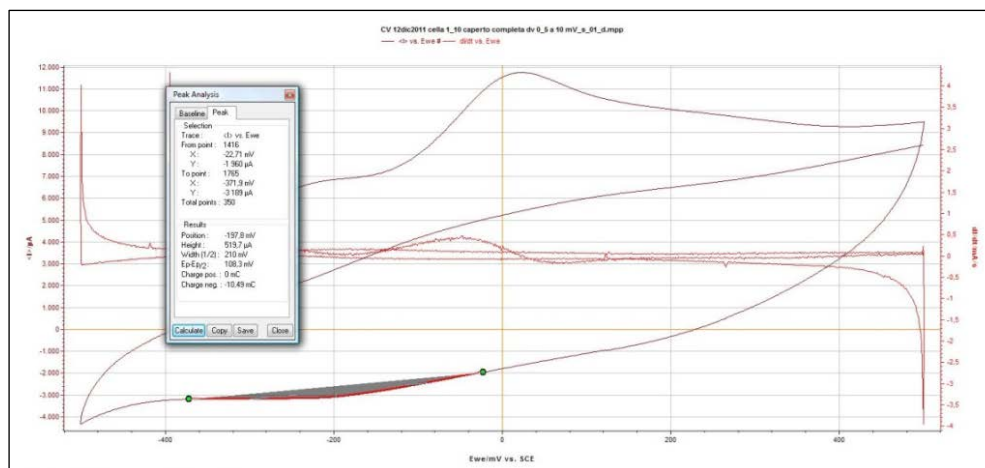


Figura 196 - Voltammogramma per la MFC-C, con in evidenza il picco di riduzione e nel riquadro, alla voce *Position*, è riportato il suo valore.

Il valore ottenuto per il picco della riduzione è di -197,8 mV vs. SCE; è adesso necessario eseguire il calcolo della differenza fra i due valori ottenuti, in pratica al valore del picco della ossidazione occorre sottrarre il valore ricavato per il picco della riduzione, ed avremo:

calcolo della differenza fra i picchi, nello stesso voltammogramma =  $136,8 - (-197,8) = 334,6$  mV

La disposizione dei picchi nel voltammogramma indica la presenza inequivocabile di un meccanismo di trasferimento intracellulare da specie elettroattive:

- la differenza tra il potenziale del picco di riduzione e quello di ossidazione nell'unica coppia di picchi rilevate è pari a 334,6 mV, prossimo al valore indicato in letteratura come quello relativo al ciclo dell'NADH (circa 320 mV): e l'interessante è che questo accade in presenza di digestato 1:10, che, quindi, non perturba l'equilibrio raggiunto e il lavoro dei *Geobacter sulfurreducens*, nè introduce fenomeni redox ulteriori (non ci sono altri picchi oltre la suddetta coppia)

- il picco di riduzione è a circa -197,8 mV: è proprio quello tipico dei *Geobacter sulfurreducens*.

Si può concludere quindi che:

- pur in presenza di digestato, c'è produzione di corrente per meccanismo elettroattivo;
- il meccanismo è di trasferimento intracellulare (senza mediatori esterni o generati);
- la specie elettroattiva è il *Geobacter sulfurreducens*;
- il digestato non introduce altri fenomeni redox (non contiene specie redox).

Analogamente per la MFC-U, non condizionata si sono eseguite le stesse rilevazioni e la definizione dei picchi, di ossidazione e di riduzione; in figura 197 viene riportato il voltammogramma ottenuto:

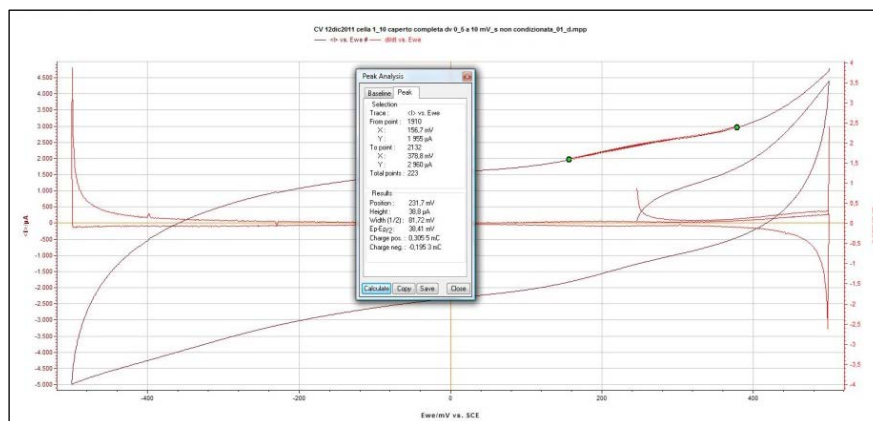


Figura 197 - Voltammogramma per la MFC-U, con in evidenza il picco di ossidazione e nel riquadro, alla voce Position, è riportato il suo valore.

Il valore del picco della ossidazione è stato di 231,7 mV vs. SCE; in figura 190 viene eseguita l'analisi del picco della riduzione:

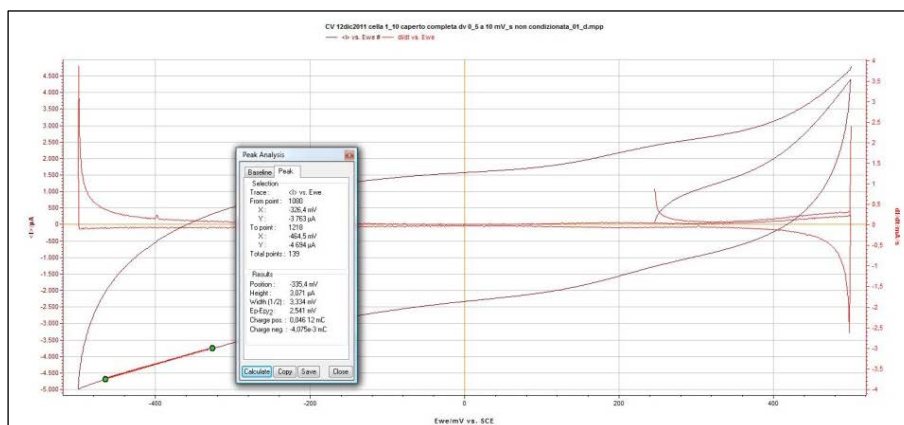


Figura 198 - Voltammogramma per la MFC-U, con in evidenza il picco di riduzione e nel riquadro, alla voce Position, è riportato il suo valore.

ed il valore picco della riduzione è stato di -335,4 mV vs. SCE. Anche per la MFC-U è necessario eseguire il calcolo della differenza, ed avremo in questo caso:

calcolo della differenza fra i picchi, nello stesso voltammogramma =  $231,7 - (-335,4) = 567,1$  mV

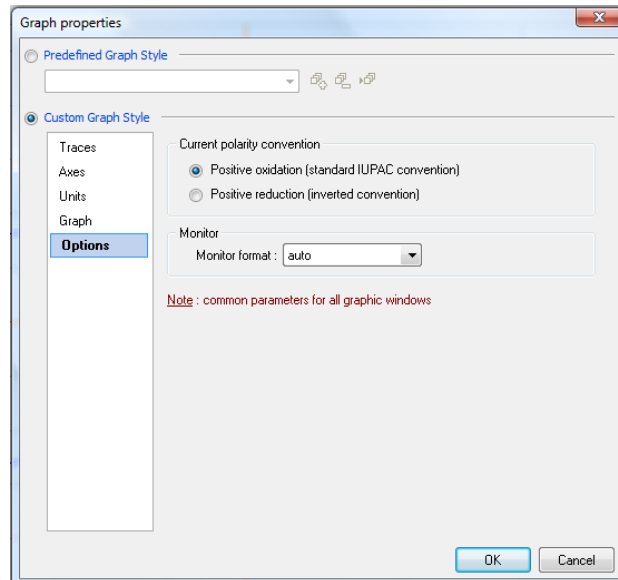
Sulla cella condizionata, invece i picchi sono di più, e disposti in maniera diversa, il che vuol dire che ci sono diversi fenomeni redox in atto. Inoltre:

- la differenza tra i due picchi principali è 567,1 mV (non è il ciclo dell'NADH);
- il picco di riduzione principale è a -335,4 mV, fuori quindi dal range *Geobacter sulfurreducens*: ipotizziamo pertanto che l'attività elettrica sia dovuta a specie diverse, e che la specie *Geobacter* non si è ancora selezionata.

### 7.7.1 Voltammetrie cicliche e analisi dei picchi

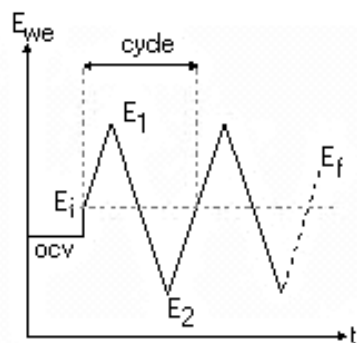
Durante una voltammetria ciclica, all'elettrodo anodico (Working Electrode) viene applicata una variazione di potenziale di forma triangolare, per produrre una risposta in corrente. Il potenziale varia a velocità (scan rate) costante da un valore iniziale ad uno finale, per poi tornare, sempre con lo stesso scan rate, al valore iniziale. Per eseguire la voltammetria ciclica occorre specificare i potenziali di inversione e la velocità di scansione del range di potenziale fissato; per entrambe le celle sono stati fissati gli stessi valori in modo da confrontare i dati ottenuti: è stato fissato un range di scansione per il potenziale (-0,5 ÷ 0,5 V) con uno scan rate pari a 10 mV/s.

Per la voltammetria ciclica, nel seguito indicata come CV, i setting impostati sono stati 3 ed il loro settaggio è stato studiato da [21], [49], mentre la parte teorica da [129]. In particolare le prove utilizzate prevedevano la scelta di diversi scan rate e degli estremi dell'intervallo di scansione della rampa, mentre il numero di cicli da far compiere in fase di scansione dei potenziali è sempre stato impostato pari ad 1, e solo in un caso a 0 cioè il valore minimo; la scansione triangolare è stata impostata in modo da indurre prima la riduzione e poi l'ossidazione con dei potenziali che decrescono da destra verso sinistra sull'asse delle ascisse del grafico i/E. Si adotta la convenzione in modo che la polarità della corrente in ossidazione sia positiva, in accordo con la convenzione IUPAC, e qui di seguito è riportata la schermata che riporta il settaggio della scelta della convenzione della polarità della corrente, con la selezione effettuata:



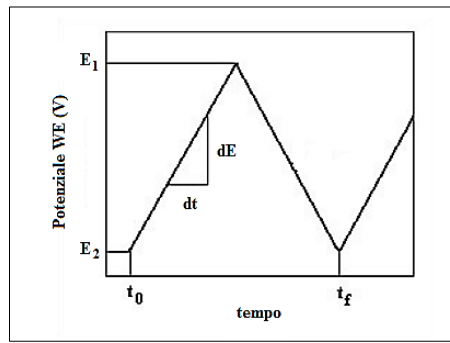
Le CV sono state effettuate su ciascuna cella, con un intervallo della misura di 24 ore, per 3 giorni; le caratteristiche della CV per la MFC non condizionata, sono state:

- valore del potenziale di partenza, riferendolo al valore di OCV già determinato;
- valore del potenziale iniziale della rampa, e in aggiunta rispetto a cosa andrebbe riferito se alla OCV cioè  $E_{oc}$ , al Ref o al potenziale misurato  $E_{mis}$ ;
- valore del potenziale finale della rampa, e in aggiunta rispetto a cosa andrebbe riferito se alla OCV cioè  $E_{oc}$ , al Ref o al potenziale misurato  $E_{mis}$ ;
- scan rate, cioè la velocità di scansione  $dE/dt$  di variazione della rampa;
- la possibilità di ripetere  $n_c$  volte la scansione della rampa triangolare;
- il fondo scala della tensione e della corrente;



- il valore del potenziale di termine della scansione ciclica,  $E_f$ ;

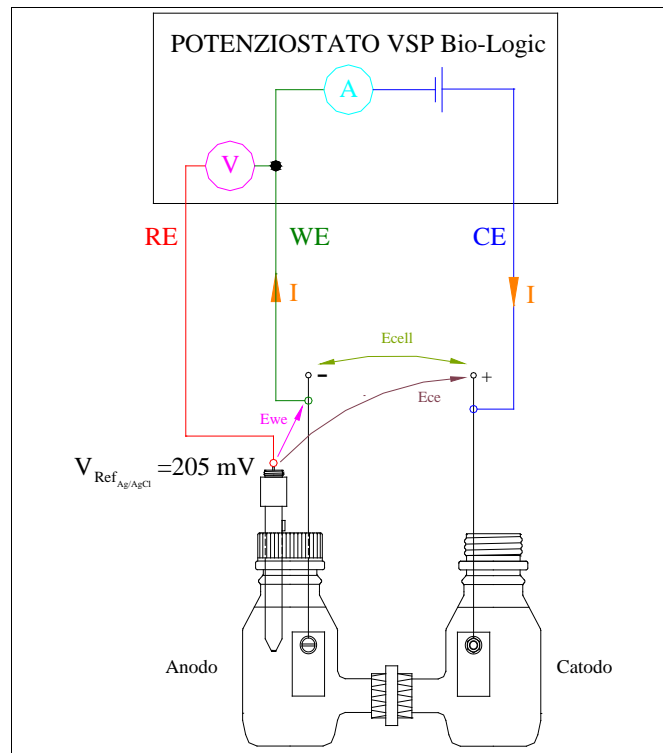
rappresentate in figura ci sono le grandezze che definiscono i parametri della rampa di scansione:



e tutte le grandezze sono presenti nella schermata di impostazione per questa tecnica, che viene riportata qui di seguito:

Inoltre le misure sono state effettuate selezionando nella terza schermata della tecnica CV, la Cell Description, il tipo dell'elettrodo di riferimento, Ref del tipo Ag/AgCl KCl (3,5 M), che è proprio quello impiegato in camera anodica e prodotto dalla Crison, del modello 52 02 e la configurazione della misura realizzata è stata quella a 3 elettrodi riportata schematicamente nella stessa schermata

e raffigurata nel seguente schema circuitale:



Il voltammogramma che è stato ottenuto presenta le 3 tracce sovrapposte, ottenute a 0 ore, dopo 24 ore e a 48 ore; la scelta di questo tipo di misura è stata effettuata per mettere in evidenza la presenza e la variazione dell'ampiezza delle correnti di picco della specie elettroattiva, ed il valore massimo della corrente prodotta; la MFC non condizionata ha degli evidenti picchi di ossidazione ma nulli in riduzione, e la loro ampiezza va aumentando nel corso della misura, come riportato in figura 199:

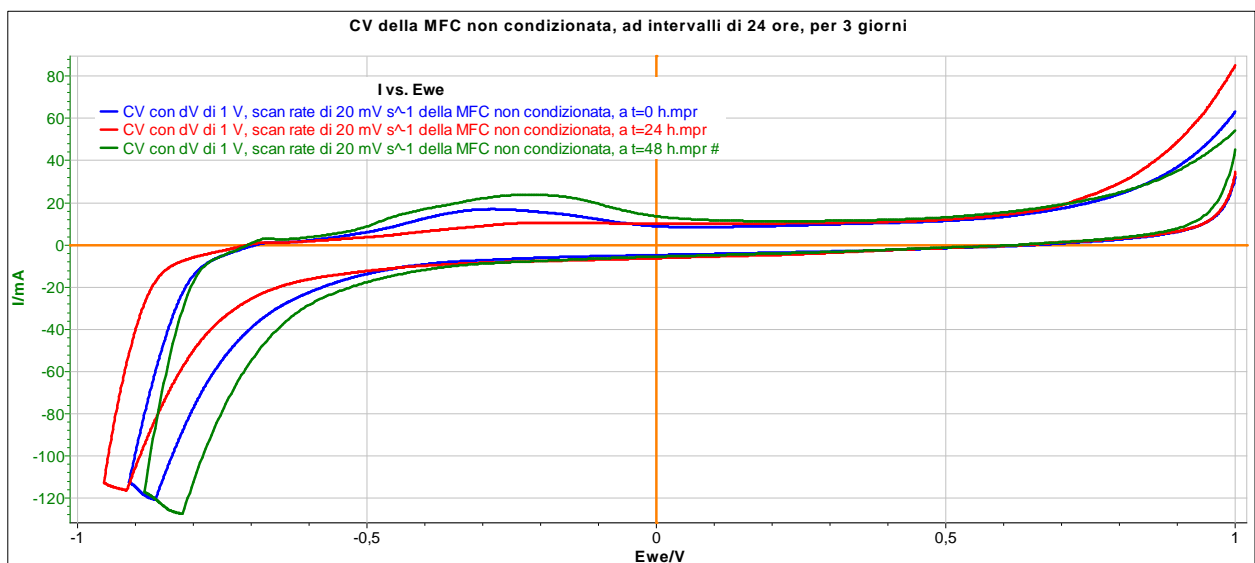
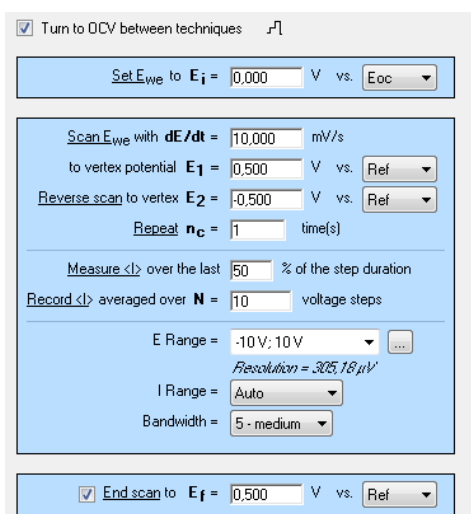


Figura 199 - Voltammogrammi per la MFC-U.

Anche per la MFC condizionata è stata effettuato lo stesso tipo di misura, la tecnica CV ad intervalli di 24 ore, per 3 giorni consecutivi ma la scelta dei parametri del settaggio della CV,



effettuata con il software EC-Lab V10.10 è stato opportunamente adattato ed i valori impostati sono tutti riportati nella schermata sotto riportata:



dove si può mettere in evidenza uno scan rate di 10 mV/s e degli estremi per l'intervallo della rampa di triangolazione di +0,5 e -0,5 V entrambe riferiti al Ref impiegato, e cioè il Crison 52 02 del tipo Ag/AgCl KCl (3,5 M); i 3 voltammogrammi registrati, con il potenziostato VSP della Bio-Logic, sono raffigurati qui si seguito in figura 200:

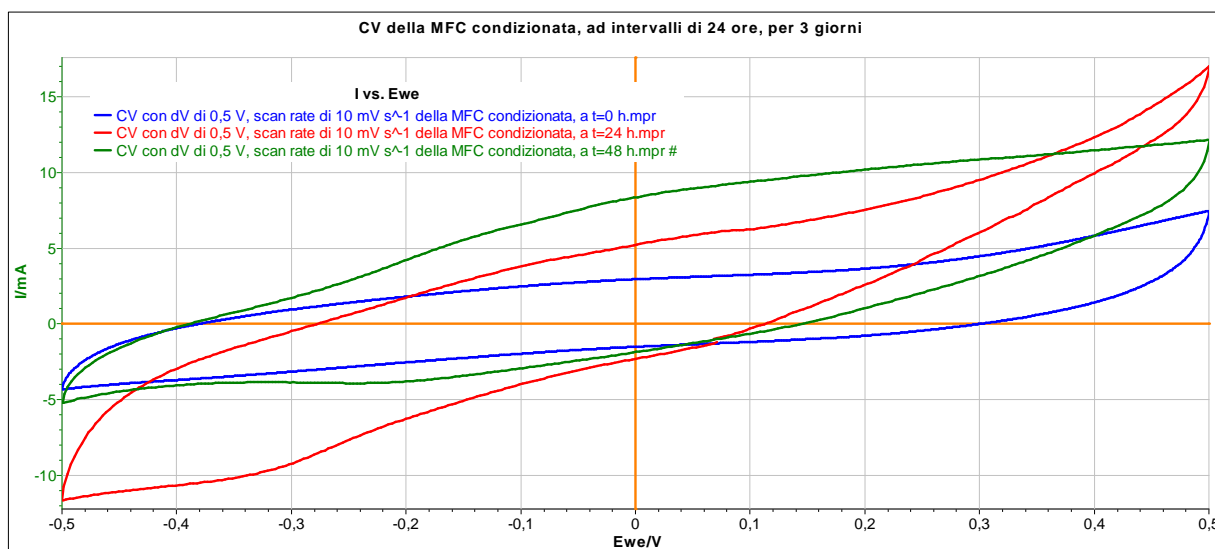


Figura 200 - Voltammogrammi per la MFC-C.

Si sono messi bene in evidenza dei picchi di riduzione, nel corso della misura hanno subito un aumento dei valori delle correnti di picco e lo stesso si hanno dei picchi di ossidazione della specie elettroattiva.

La scansione del potenziale nel range (-0,5 ÷ 0,5 V) è stata stabilita sulla base dei dati presenti in letteratura, secondo i quali i picchi di ossidazione e di riduzione del ceppo *Geobacter sulfurreducens* ricadono proprio all'interno di questo intervallo.

### 7.7.2 Efficienza coulombica con la tecnica potenziometrica cronoamperometrica

L'efficienza coulombica  $E_C$  è definita [25] come il rapporto fra le cariche totali che vengono trasferite all'elettrodo dell'anodo dal substrato, con la massima quantità di carica prodotta da tutto il substrato rimosso. L'efficienza coulombica che si ottiene è determinata dall'integrale della corrente alla fine del ciclo di rimozione e per le MFC alimentate in batch la  $E_{C,b}$  per un periodo di tempo  $t_b$  è calcolata come:

$$E_{C,b} = \frac{M \int_0^{t_b} I dt}{F b v_{an} \Delta COD}$$

dove  $M=32$  è il peso molecolare dell'ossigeno,  $F$  è la costante di Faraday,  $b=4$  è il numero di elettroni scambiati per ciascuna mole di ossigeno,  $v_{an}$  è il volume di liquido nel compartimento anodico, e  $\Delta COD$  è la variazione di COD (domanda chimica di ossigeno) nell'intervallo di tempo  $t_b$ . Per calcolare la  $E_C$  occorre rilevare l'andamento della corrente prodotta durante il tempo  $t_b$  dalla MFC ed allora è stato necessario utilizzare il potenziostato VSP con la tecnica cronoamperometrica, che nel seguito viene indicata con CA; il circuito di misura che è stato realizzato è quello riportato in figura 201:

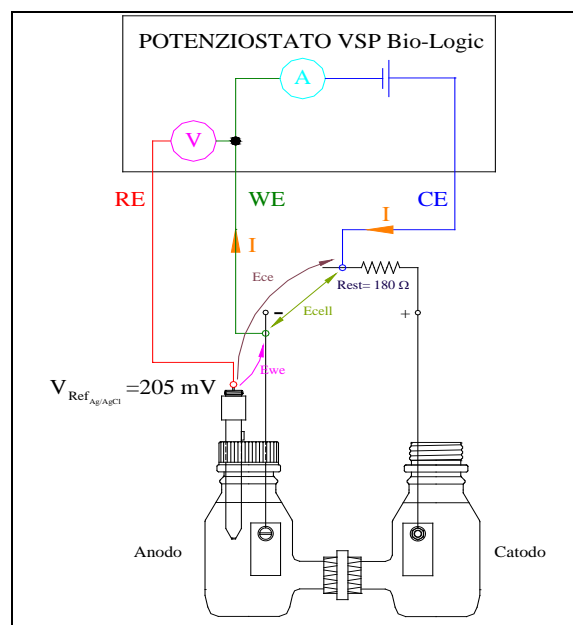


Figura 201 - Circuito di misura della corrente erogata da una MFC, con la tecnica della CA.

La tecnica cronoamperometrica CA, è stata applicata per misurare la corrente prodotta dalle MFC, nel tempo e le fonti di studio sono state [17] e [19]; la misura è stata effettuata in 2 cicli differenti, il I ciclo della durata di 6 giorni ed il II ciclo della durata di 7 giorni, sulle stesse MFC-C, condizionata e la MFC-U, non condizionata, alle quali veniva effettuato un prelievo di

20 ml per le analisi chimiche e biologiche del digestato, in ognuno dei giorni della misura; i valori iniziali della corrente molto elevati, sono da attribuire al valore della Ewe prodotta dal generatore di tensione, e non dalla MFC, che parte di default da un valore della Ewe elevato e con un breve intervallo di tempo, di pochi minuti si deve portare al valore per la  $E_i$  impostato nel setting che è stato scelto pari a 0 V rispetto al Ref impiegato; le altre grandezze da impostare sono raffigurate nel seguente diagramma:

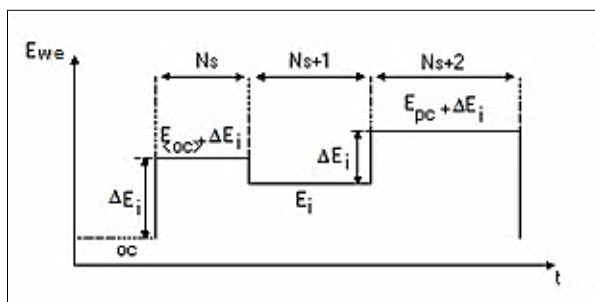
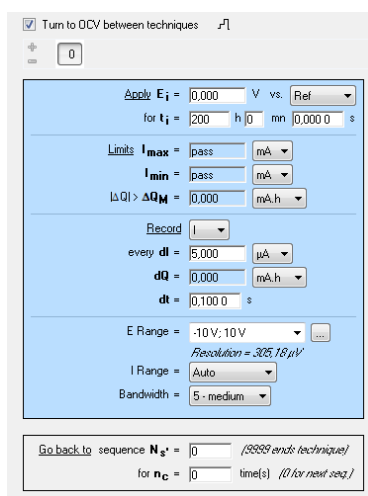


Figura 202 - Diagramma del funzionamento della tecnica cronoamperometrica CA con il potenziostato VSP.

e la schermata della CA da impostare con il software EC-Lab V10.18 è riportata nel seguito:



dove si possono distinguere:

- $E_i$ = il valore del potenziale da definire in valore assoluto o verso il Ref cioè l'elettrodo di riferimento o impostandolo rispetto alla precedente OCV cioè la  $E_{oc}$ , o rispetto al potenziale di controllo ( $E_{ctrl}$ ) o al potenziale misurato ( $E_{meas}$ ), cioè il precedente potenziale misurato;
- $t_i$ = il tempo di durata della prova, fino ad un massimo di 10'000'000 di ore;
- Limits  $I_{max}$ ,  $I_{min}$ ,  $\Delta Q_M$ = sono i limiti della corrente o della carica che si possono raggiungere;

- Record <current> = deve essere impostato sul valore istantaneo della corrente contrassegnato dalla lettera I e non sul valore medio contrassegnato dalla lettera <I>;
- $dI=$  è il valore della corrente per ogni step di campionamento e se si imposta il valore 0 vuol dire che il campionamento va effettuato in base alle altre 2 grandezze successive;
- $dQ=$  si può impostare il valore dello step della carica al quale far avvenire la registrazione dei valori della  $I(t)$ ;
- $dt=$  è l'intervallo temporale al quale far avvenire la registrazione dei valori della  $i(t)$ .

Le celle sono state mantenute ad una temperatura controllata, in un incubatore a circa 28 °C per tutta la durata delle misure, e l'organizzazione che è stata data al laboratorio è quello riportato in figura 203, dove si distinguono le due MFC poste all'interno dell'incubatore di colore azzurro ed il potenziostato di colore azzurro che lo sormonta ed alla loro destra la postazione del personal computer con funzione di data logger per la registrazione dei dati inviati dal potenziostato con la tecnica CA sulle MFC-C e MFC-U:



*Figura 203 - Una foto della postazione di misura, durante la misura.*

I dati salienti dell'incubatore della ditta Stuart, modello Shaker Incubator S150 sono riportati in tabella:

Gamma di temperature	+ 5 °C a 60 °C
Risoluzione display temperatura	0,1 °C
Accuratezza della temperatura	±0,5 °C
Dimensioni totali (lpxh)	450 x 436 x 606 mm

Altezza interna	321 mm
Alimentazione elettrica	230 V, 50 Hz, 350 W

mentre in figura 204 è riportato un dettaglio dei collegamenti realizzati per la registrazione dei dati con la tecnica CA, in cui si evidenzia l'elettrodo di riferimento ed i connettori a coccodrillo che si collegano ai fili di collegamento in titanio dell'elettrodo anodico e catodico, di ciascuna MFC; è meno visibile la resistenza a film metallico, collegata al filo di collegamento dell'elettrodo catodico del valore di  $180 \Omega$  che costituisce il carico elettrico esterno sulla quale viene fatta circolare la corrente prodotta da ciascuna MFC e connessa con una morsettiera al filo di titanio:



*Figura 204 - La MFC-C e la MFC-U nell'incubatore, a temperatura costante.*

Vengono riportati qui in figura 205 e 206 i tracciati ottenuti con il potenziostato VSP della Bio-Logic per il I ciclo della cronoamperometrica, formato dalla CA della MFC-C condizionata e della MFC-U non condizionata; i cicli di misura effettuati sono stati due, avendo soltanto eseguito una nuova alimentazione delle celle e posti ad un intervallo di 38 giorni, per far sì che le condizioni del biofilm non si alterassero eccessivamente; la misura del primo ciclo ha avuto la durata di 6 giorni mentre quella del secondo la durata è stata di 7 giorni;

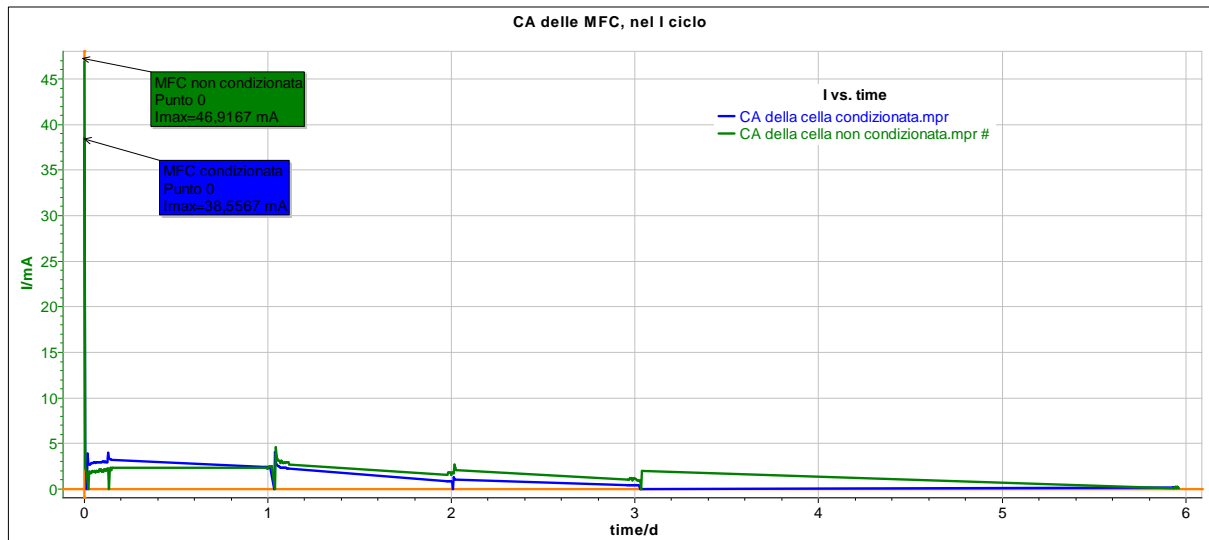


Figura 205 - Valori della corrente erogata dalle MFC, nel I ciclo di misura.

la variazione della curva  $I(t)$  è stata ottenuta con un intervallo di campionamento di 100 ms, cioè molto basso e anche per questo è stato possibile rilevare gli impulsi (spike), cioè dei piccoli picchi che si sono presentati in corrispondenza proprio di ciascun prelievo del digestato dalla camera anodica, che è stato effettuato con cadenza giornaliera e durante quel breve intervallo di tempo veniva portata in modalità pausa la registrazione dei dati con il potenziostato VSP e alla ripresa della registrazione il valore della  $E_{we}$  si doveva riportare al valore imposto per la  $E_i$ , causando questi picchi di ampiezza non elevata, ma comunque non generati dalla MFC:

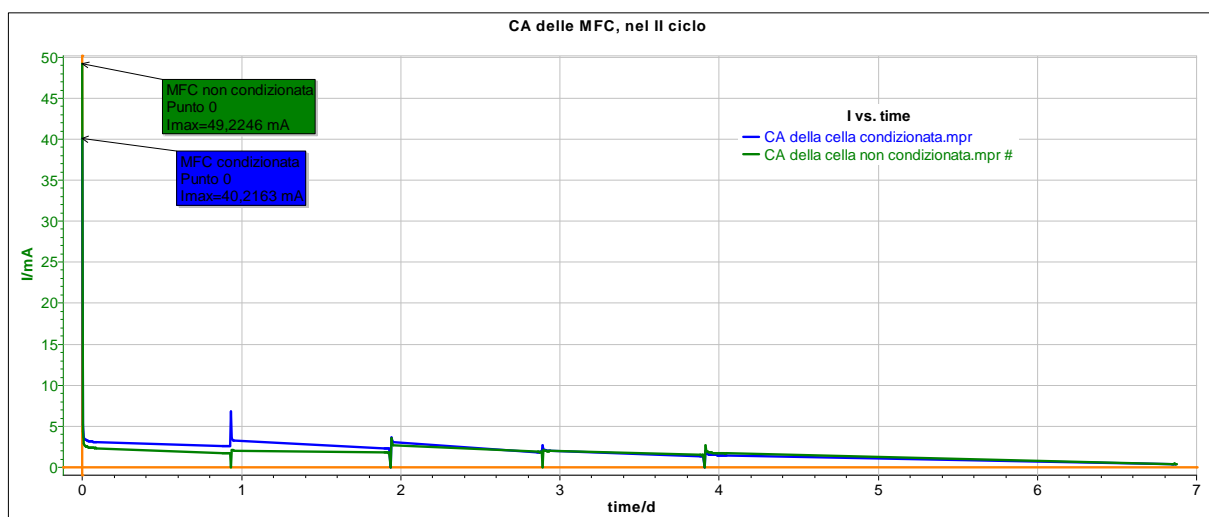


Figura 206 - Valori della corrente erogata dalle MFC, nel II ciclo di misura.

Nel calcolo della CE non è stato considerato il valore iniziale della corrente a  $t=0$  perché non prodotto dalla MFC, ma in questa fase è causata dal generatore di tensione interno al potenziostato VSP, della durata di pochi minuti, e questo è l'istante preso come estremo inferiore

nell'integrale; anche l'estremo superiore non coincide con l'istante finale della misura, in quanto nella fase finale la MFC non era più in grado di produrre un apprezzabile quantità di corrente, dopo esattamente 5 giorni, ma la misura si è protratta sino al 7 giorno allo scopo di verificare la continuazione della rimozione dell'azoto.

La quantità di carica  $Q$ , indispensabile per la determinazione della CE, è stata determinata integrando la curva della  $i(t)$  fra questi due estremi, cioè pochi minuti per l'istante iniziale e 5 giorni per l'estremo superiore,  $t_b$ . In figura 207 è riportata la curva della corrente erogata dalla MFC-C, nella quale sono stati eliminati gli spike di corrente con una operazione di post elaborazione dei dati che ha comportato dapprima una interpolazione lineare e poi una operazione di smooth, eseguite entrambe con le funzioni del software EC-Lab V10.18 e di questa curva si è andata ad effettuare l'integrazione che ha portato alla determinazione dei valori della quantità di carica prodotta dalla MFC-C, fra gli istanti  $t=1986,284$  sec. e  $t_b=5$  giorni del II ciclo:

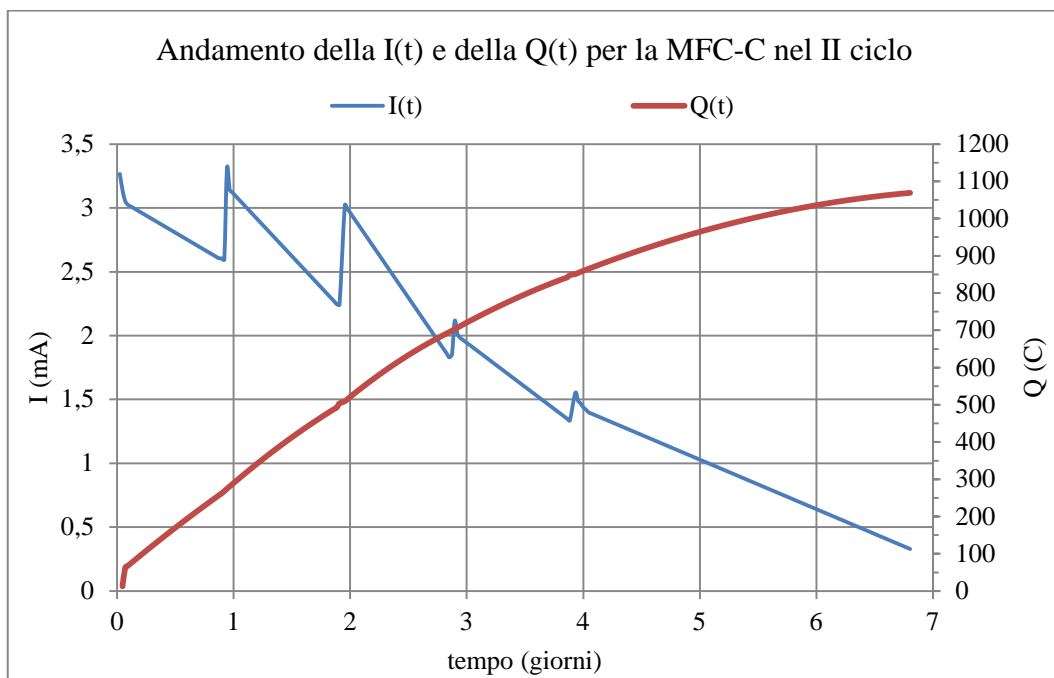


Figura 207 - Curve della corrente erogata dalla MFC-C nel II ciclo di misura e del suo integrale, cioè la quantità di carica  $Q$ .

In figura 208 sono riportate le curve della corrente erogata dalla MFC-U nel II ciclo, avendo eseguito le stesse operazioni di post elaborazioni per l'eliminazione degli impulsi, e da questi si è provveduto alla determinazione dei valori della quantità di carica prodotta dalla MFC-U, fra gli istanti  $t=1987,667$  sec. e  $t_b=5$  giorni del II ciclo:

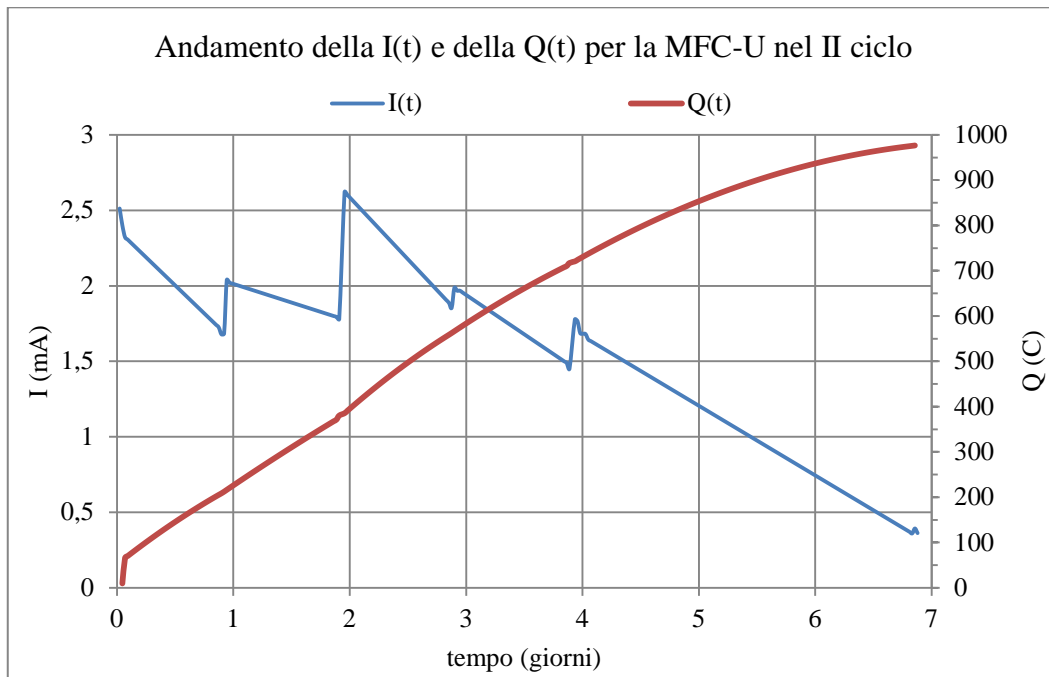


Figura 208 - Curve della corrente erogata dalla MFC-C nel I ciclo di misura e del suo integrale, cioè la quantità di carica Q.

È possibile eseguire un confronto delle quantità di carica prodotte da ciascuna MFC, in ciascuno dei 2 cicli di misura, con i valori delle Q(t) rappresentati nel grafico di figura 209, dove si evidenzia la durata massima  $t_b$  delle misure, per i due cicli ed inoltre l'andamento lineare per tutte le curve Q(t) nel tratto iniziale e poi una flessione nei valori della crescita, provocata dall'esaurimento del nutriente a disposizione della comunità microbica:

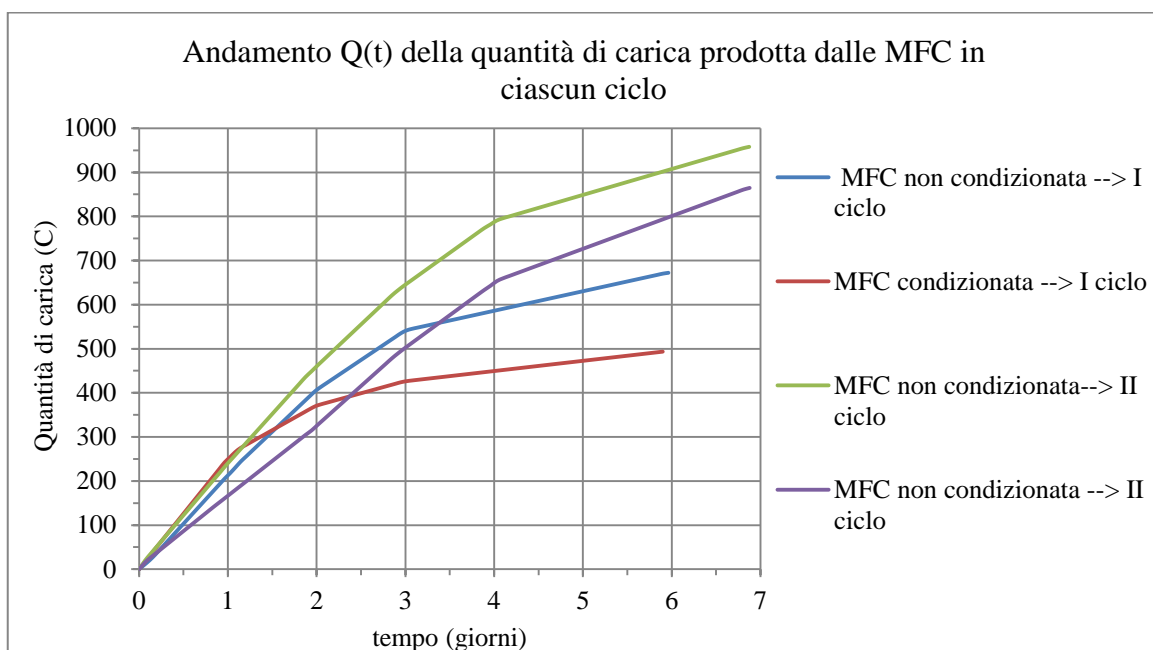


Figura 209 - Valori della quantità di carica Q delle MFC, nel I e II ciclo di misura.

In tabella 33 sono riportati i valori ottenuti dalle analisi dei campioni di substrato prelevati dalla



MFC-C e la rimozione percentuale  $\Delta\text{COD}$  dell'azoto, nei 5 giorni della misura ed inoltre ci sono anche i valori della  $Q(t)$  ed infine i valori ottenuti dal calcolo della CE:

*Tabella 33 - Valori della quantità di carica e del COD, misurati nel I ciclo di misura, per la MFC-C:*

Numero giorno della misura	COD (mg/l O <sub>2</sub> )	ml liq	COD effettivo	$\Delta\text{COD}$ (mg/l O <sub>2</sub> )	$\Delta\text{COD}$ (%)	Q (C)	$\Delta Q$ (C)	$\Delta\text{CE}$ (%)	<b>CE (%)</b>
0		0,813	3134,07	--	0,00%	0	--	--	--
1	2885	0,848	1964,62	1169,45	37,31%	229,927	229,927	7,58%	7,58%
2	1592	0,886	1659,14	305,48	47,06%	446,582	216,655	5,66%	11,68%
3	1000	0,828	1775,36	-116,22	43,35%	628,857	182,275	5,17%	17,85%
4	990	0,861	1593,50	181,87	49,16%	774,914	146,057	3,66%	19,40%
5	970	0,866	1244,80	348,69	60,28%	957,859	182,945	3,73%	<b>19,55%</b>

in base ai valori riportati in letteratura la CE, pari a 19,55% risulta essere un discreto valore.

Nella tabella 34 ci sono riportati la stessa tipologia di valori per la MFC-U, nei 5 giorni della misura:

*Tabella 34 - Valori della quantità di carica e del COD, misurati nel I ciclo di misura, per la MFC-U*

Numero giorno della misura	COD (mg/l O <sub>2</sub> )	ml liq	COD effettivo	$\Delta\text{COD}$ (mg/l O <sub>2</sub> )	$\Delta\text{COD}$ (%)	Q (C)	$\Delta Q$ (C)	$\Delta\text{CE}$ (%)	<b>CE (%)</b>
0	--	0,79	3134,07	--	0,00%	0	--	--	--
1	2288	0,827	2108,20	1025,87	32,73%	157,765	157,765	5,93%	5,93%
2	1791	0,824	2021,84	86,36	35,49%	311,404	153,639	5,33%	10,80%
3	1592	0,839	1635,28	386,56	47,82%	493,933	182,529	4,70%	12,71%
4	1293	0,879	1450,34	184,94	53,72%	636,45	142,517	3,26%	14,58%
5	980	0,887	994,36	455,98	68,27%	864,674	228,224	4,11%	<b>15,58%</b>

ed il valore ottenuto per la CE pari al 15,58% risulta essere necessariamente inferiore a quello della MFC-C, non essendo presente in questa MFC un inoculo preconditionato che favorisce lo sviluppo del biofilm sull'elettrodo anodico, che quindi incrementa sia la produzione di corrente che la rimozione della sostanza organica in esame cioè l'azoto, come avviene per la MFC-C; il valore della CE% per la MFC-U è comunque considerevole ed al pari con quelli riportati in letteratura e ci indica che è la configurazione stessa della cella, del tipo H-type ad agevolare questi valori elevati.

In figura 210 sono rappresentati gli andamenti della efficienza coulombica CE% e della rimozione dell'azoto  $\Delta$ COD%, in valori percentuali per le due MFC, nel II ciclo di misura con la tecnica CA:

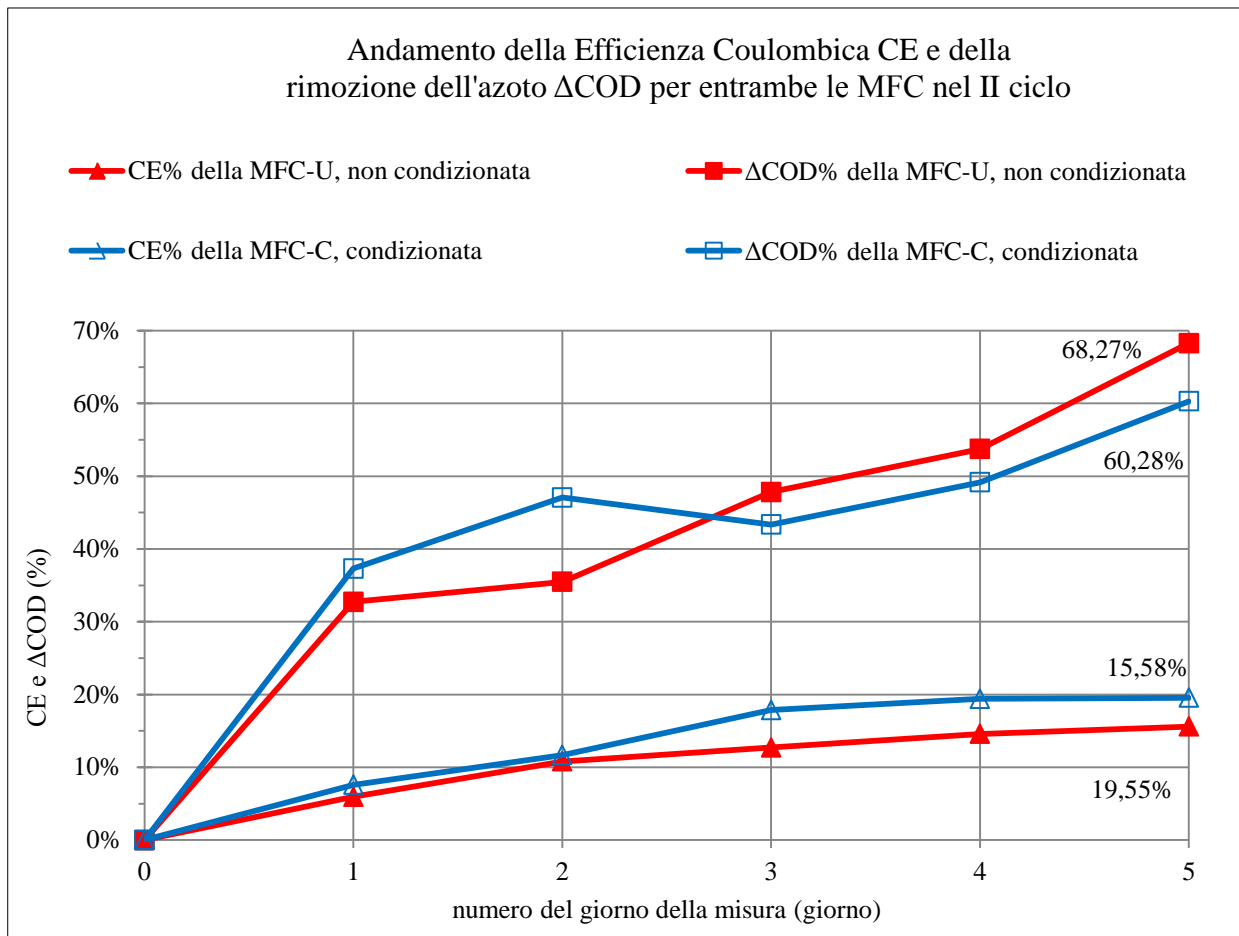


Figura 210 - Grafico con i valori della rimozione  $\Delta$ COD% e della CE% per le MFC durante il II ciclo di misura.

### 7.7.3 Voltammetria a scansione lineare

La tecnica della voltammetria a scansione lineare, nel seguito indicata con Linear Sweep Voltammetry LSV, è stata impiegata per la determinazione della curva di polarizzazione e la registrazione dei dati della curva di potenza, di entrambe le MFC, la condizionata e la non condizionata; la tecnica è stata studiata dai riferimenti [8],[18],[20],[21],[22],[23],[24],[25], le misure sono state effettuate sulle MFC inserite nell'incubatore della ditta Stuart, modello Shaker Incubator S150, che le manteneva ad una temperatura costante di 30 °C e nella immagine seguente viene riportata la postazione di misura appositamente allestita al Dipartimento di Biologia e Biotecnologia "C. Darwin" di SAPIENZA:



Figura 211 - Una foto della postazione di misura, durante la misura con la tecnica LSV sulle MFC-C e MFC-U.

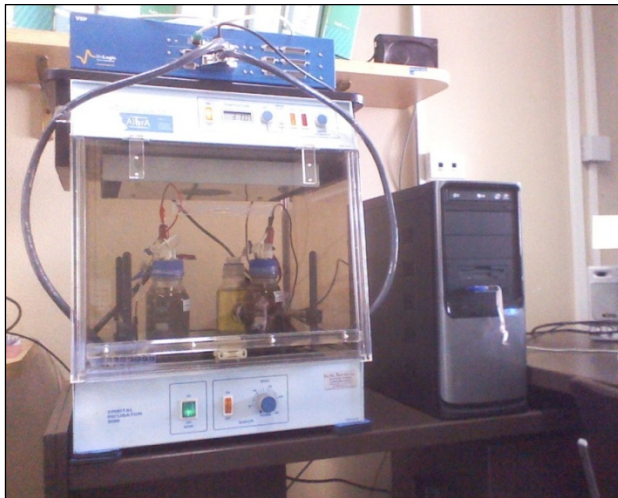


Figura 212 - Dettaglio del posizionamento delle MFC all'interno dell'incubatore, per la rilevazione delle LSV.

Le grandezze da definire, per eseguire questa tecnica potenziostatica, come riportato in figura 213:

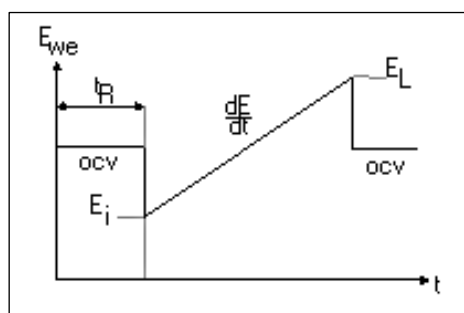


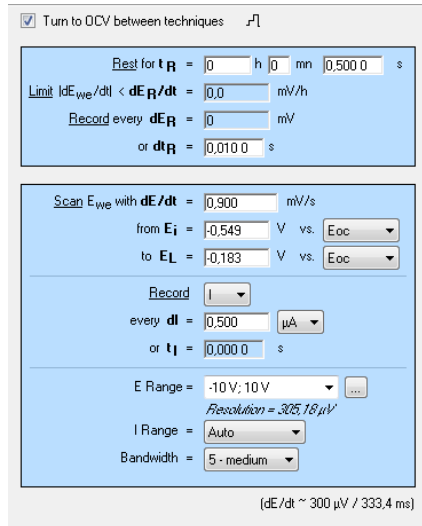
Figura 213 - Diagramma della tecnica potenziometrica LSV, con il potenziostato VSP.

e le elenchiamo qui:

$E_i$  = Potenziale iniziale (Start potential);  $E_L$  = Potenziale finale (End potential);  $t_0$  e  $t_f$  = tempo iniziale e finale della scansione;  $i_0$  = corrente all'inizio della scansione;  $i_p$  = corrente di picco;  $E_p$  = Potenziale di picco;  $\Delta d$  (Delta E between data) = incremento di potenziale all'interno del quale misurare l'incremento di corrente, durante la scansione;  $\Delta T$  = tempo di campionamento; I Range

= fondo scala della corrente (Current range); Scan  $E_{we}$  with  $dE/dt$ =velocità di scansione (scan rate) =  $dE/dt$ .

Il setting da impostare con il software EC-Lab V10.10 al potenziostato VSP utilizzato per la misura, è riportato nella figura seguente



ed il diagramma della curva di polarizzazione che si è ottenuto, per la MFC-C è riportato nella figura successiva:

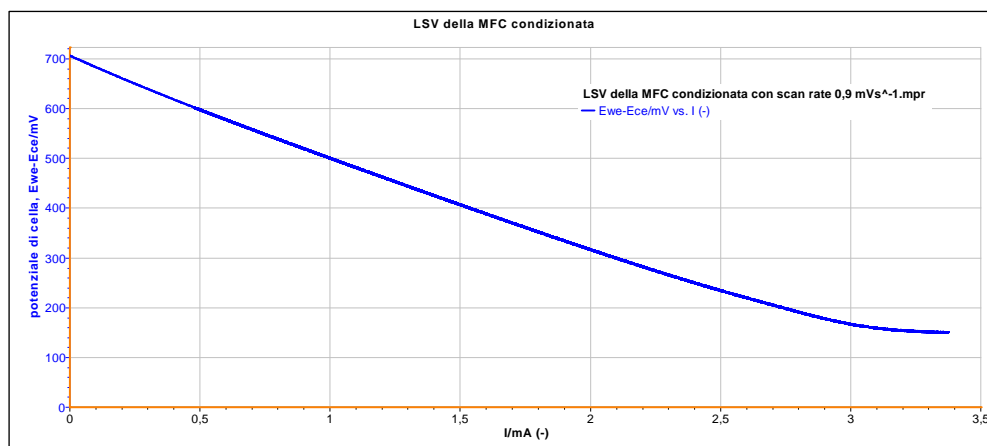


Figura 214 - Curva di polarizzazione della MFC-C, ottenuta con il potenziostato VSP, applicando la tecnica LSV.

Il punto a corrente massima, quello alla corrente di corto circuito  $I_{sc}$  è comunque possibile rilevarlo se la LSV viene eseguita dal valore della open circuit voltage (OCV) sino a 0 V riferiti al potenziale del catodo (short circuit) [134].

La curva di potenza non si può ottenere con il potenziostato perché la potenza da esso misurata è ottenuta facendo il prodotto del potenziale di semicella anodico e non del potenziale

di cella, in pratica  $P=E_{we} \cdot I$  e la curva di potenza che produce la si può poi vedere nella figura seguente, in colore rosso:

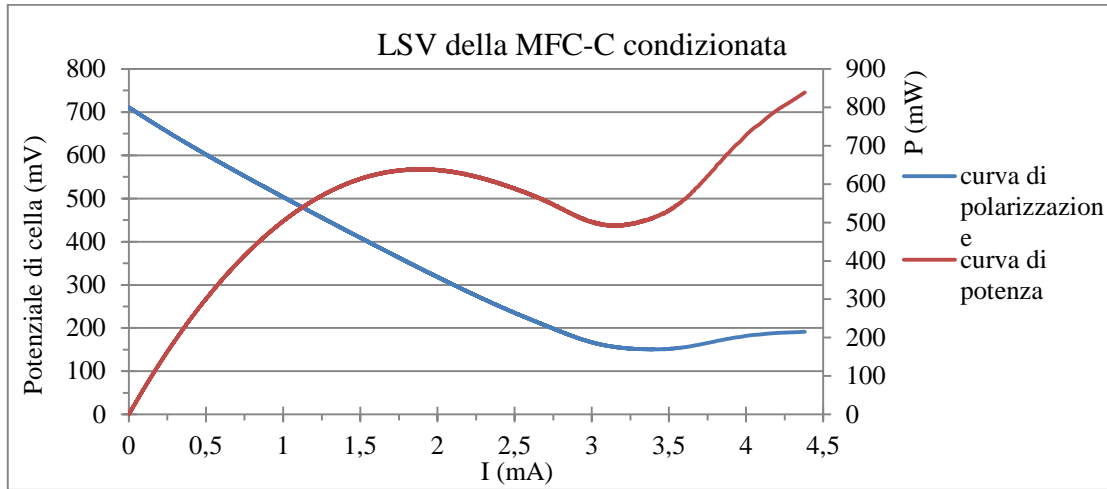


Figura 215 - Curve complete ottenute con il potenziostato VSP, applicando la tecnica LSV, voltammetria a scansione lineare.

cioè limitando i dati al valore massimo di 3 mA, perché con il potenziostato non ho i valori per il funzionamento in corto-circuito, in pratica  $E_{cell}=0$  e  $I=I_{sc}$  (corrente di corto-circuito); graficamente significa che la parabola della curva di potenza NON si completa nel tratto discendente a destra ma cresce da  $E_{cell}=OCV$  e  $I=0$ , cioè nel funzionamento a vuoto cioè nel tratto crescente a sinistra, fino al punto massimo della potenza, che viene indicato in figura 216 con il simbolo  $P_{max}$ .

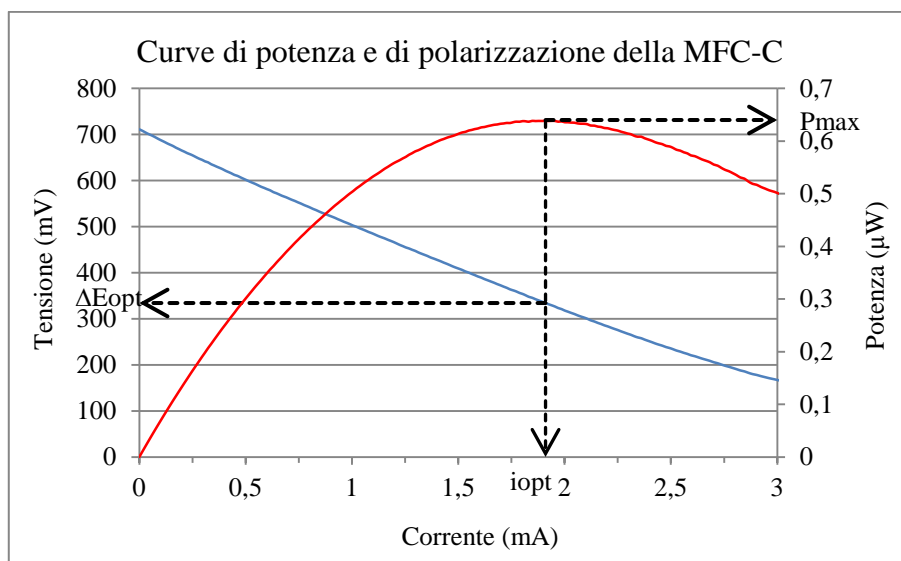


Figura 216 - Curve di potenza e di polarizzazione ottenute per la MFC-C con il potenziostato VSP.

#### 7.7.4 Spettroscopia di impedenza elettrochimica

Una tecnica potenziostatica è la spettroscopia di impedenza elettrochimica (Electrochemical Impedance Spectroscopy, EIS) che viene indicata anche con l'acronimo PEIS, per aggiungere il termine Potentiostatic all'inizio della definizione; questa tecnica permette di determinare direttamente il valore della resistenza interna offerta da una MFC sul digramma di Nyquist (piano complesso), nel quale sono di facile individuazione il valore dei tre contributi alla resistenza interna  $R_{int}$  di una MFC, la quale è data dalla somma di  $R_{\Omega}$  (resistenza dell'elettrolita o resistenza ohmica), della  $R_{ct}$  (resistenza al trasferimento di carica) e  $R_d$  (resistenza alla diffusione), come è qui di seguito raffigurato per la traccia ottenuta per la MFC-U:

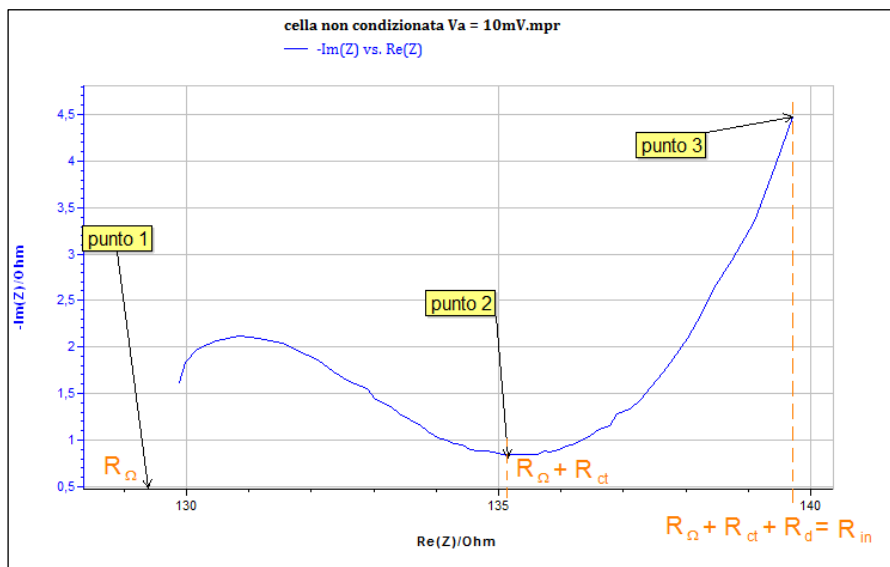


Figura 217 - Curva ottenuta con la tecnica EIS con il potenziostato VSP, per la MFC-U.

come viene indicato in [133] che presenta le grandezze sopra menzionate nel grafico sotto riportato:

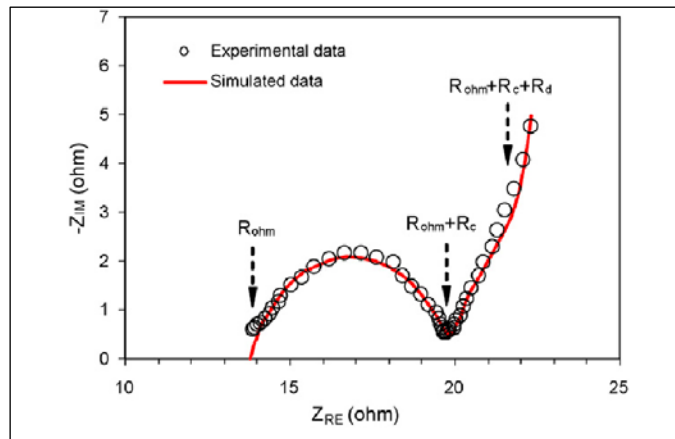


Figura 218 - Studio della traccia rilevata dalla tecnica potenziostatica EIS [131].

ed analogamente è stata eseguita la stessa misura della  $R_{int}$  alla MFC-C applicando la stessa tecnica EIS, ed il tracciato ottenuto è quello riportato in figura 219:

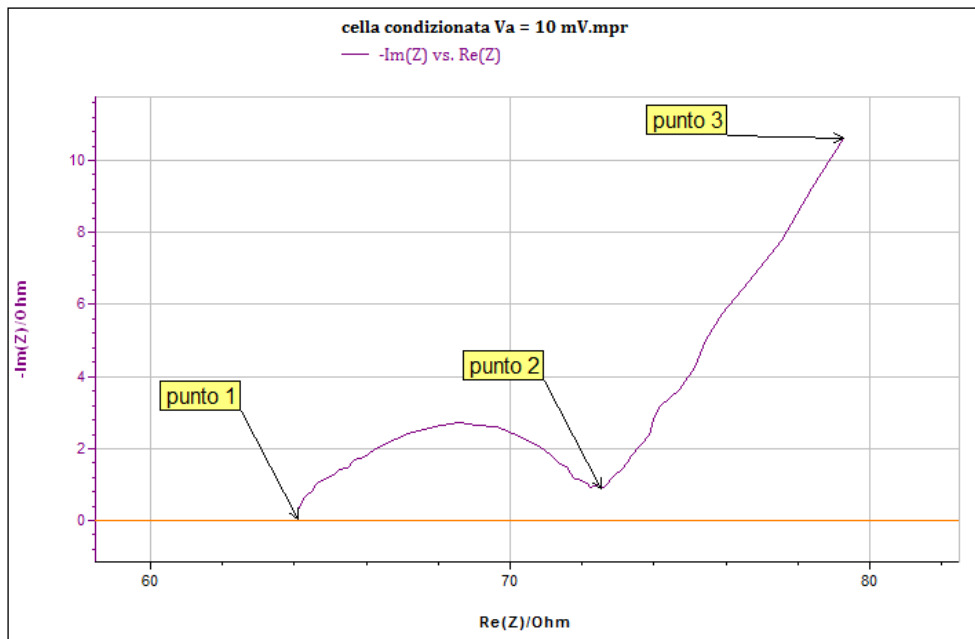


Figura 219 - Curva ottenuta con la tecnica EIS con il potenziostato VSP, per la MFC-C.

Il software dedicato EC-Lab per applicare questa tecnica con il potenziostato VSP richiede di fissare un intervallo di frequenze, in quanto va a sollecitare la cella con una variazione sinusoidale di potenziale: alle alte frequenze viene rilevata la resistenza ohmica ( $R_{\Omega}$ ) il cui valore si legge sull'asse delle ascisse al punto 1. Il diametro del semicerchio della parte circolare della curva rappresenta la resistenza al trasferimento di carica, calcolata come la differenza tra il valore letto al punto 2 e  $R_{\Omega}$ . Infine, al terzo punto leggiamo il valore della resistenza alla diffusione, ricavata sempre per differenza. Il tratto lineare, che segue quello circolare, sta a rappresentare un particolare elemento, detto *elemento di Warburg* dovuto all'impedenza di trasferimento di massa  $R_{ct}$  o impedenza di Warburg  $W$  che si deve introdurre nel circuito elettrico in quanto è cinematicamente determinante il trasferimento di materia dalla soluzione alla superficie dell'elettrodo che ha una componente reale e una immaginaria avente stesso modulo: dai grafici si può, infatti, vedere che questo tratto possiede una pendenza di circa  $45^{\circ}$ .

Cella	$R_{\Omega}$ ( $\Omega$ )	$R_{ct}$ ( $\Omega$ )	$R_d$ ( $\Omega$ )	$R_{int}$ ( $\Omega$ )
MFC-C, condizionata	64,1	8,4	6,8	79,3
MFC-U, non condizionata	129	6,1	4,6	139,7

Tabella 35 - Valori delle resistenze misurate per le due celle.

Come si legge dalla tabella 35, il contributo maggiore alla  $R_{int}$  è stato dato dalla resistenza ohmica  $R_{\Omega}$ , che è l'80% della totale nel caso della cella condizionata e il 92,3% nel caso della non condizionata. Quest'ultima, inoltre, ha una resistenza interna pari a circa due volte la resistenza interna dell'altra cella.

Il secondo passo è quello di selezionare il circuito elettrico equivalente della cella per ricavare i parametri elettrici che costituiscono la cella in esame ed in base allo studio della letteratura scientifica ci siamo orientati su questo modello, chiamato dalla letteratura scientifica "Randles cell":

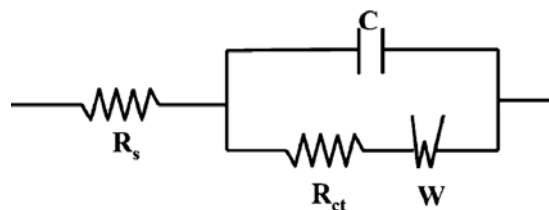


Figura 220 - Modello teorico scelto per la simulazione delle MFC bicamera e con membrana.

e possiamo così ricavare i valori delle grandezze che sono presenti nel modello con il software dedicato EC-Lab V10.18 che già aveva nelle librerie questo modello di cella; il circuito della Randles cell viene riportato come  $R1+C2/(R2+W2)$  dove viene usata la convenzione che fra gli elementi in serie si usa il segno "+" e per quelli in parallelo il simbolo "/"; il software determinerà i valori numerici di tutti gli elementi elettrici che costituiscono la cella, e con questi simulerà una curva teorica, per paragonarla alla cella reale, come viene riportato in figura 221:

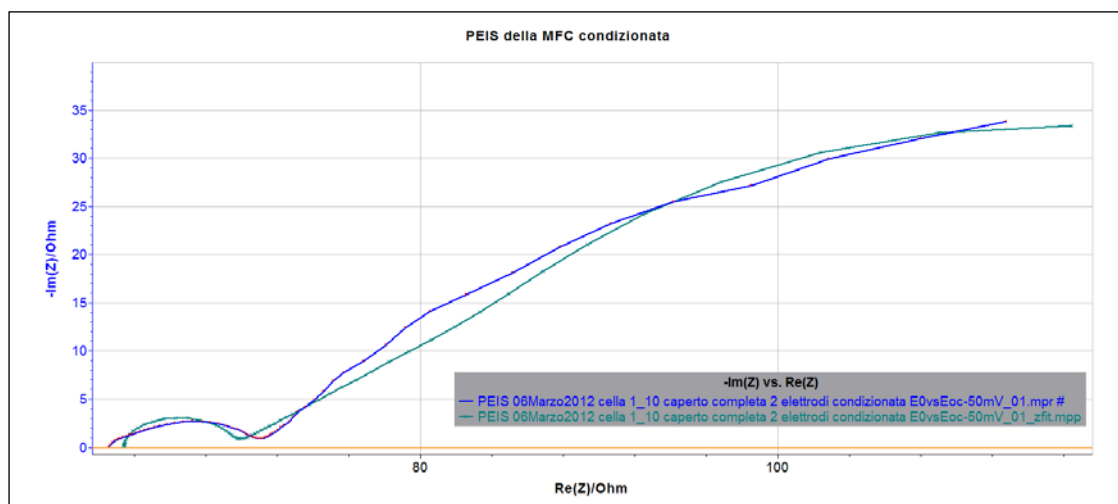


Figura 221 - Traccia della EIS della cella MFC-C reale (in colore verde), messa a confronto con la traccia teorica (in colore rosso) generata dal modello scelto della Randles Cell.

Il modello teorico della Randles cell con i valori numerici ricavati per la MFC non condizionata è riportato in figura 222:



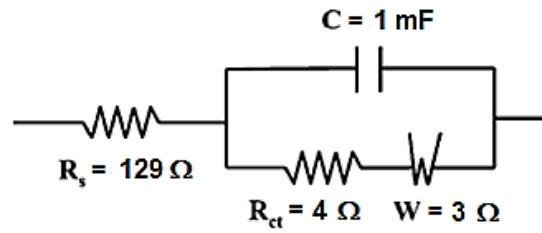


Figura 222 - Modello circuitale della Randles Cell per la MFC-U non condizionata, con i parametri ottenuti dalla simulazione con il software EC-Lab.

ottenuto con una costante di tempo della diffusione  $t_d$  pari a 25 s; analogamente è stata ottenuta per la MFC condizionata:

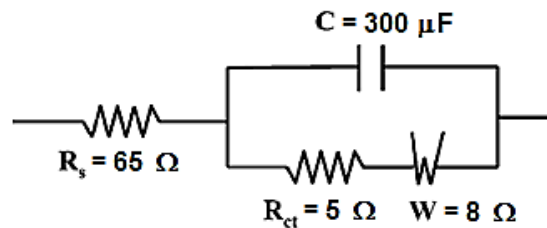


Figura 223 - Modello circuitale della Randles Cell per la MFC-C condizionata, con i parametri ottenuti dalla simulazione con il software EC-Lab.

ed il parametro della costante di tempo della diffusione  $t_d$  pari a 2 s ed è ottenuta dal software EC-Lab con un procedimento iterativo che si arresta dopo 5000 passi; in figura 224 sono confrontate le due tracce, e con la curva rossa c'è la curva determinata dalla misura con il potenziostato e con la curva blu quella ottenuta dalla simulazione inerente al circuito scelto e ai parametri assegnati:

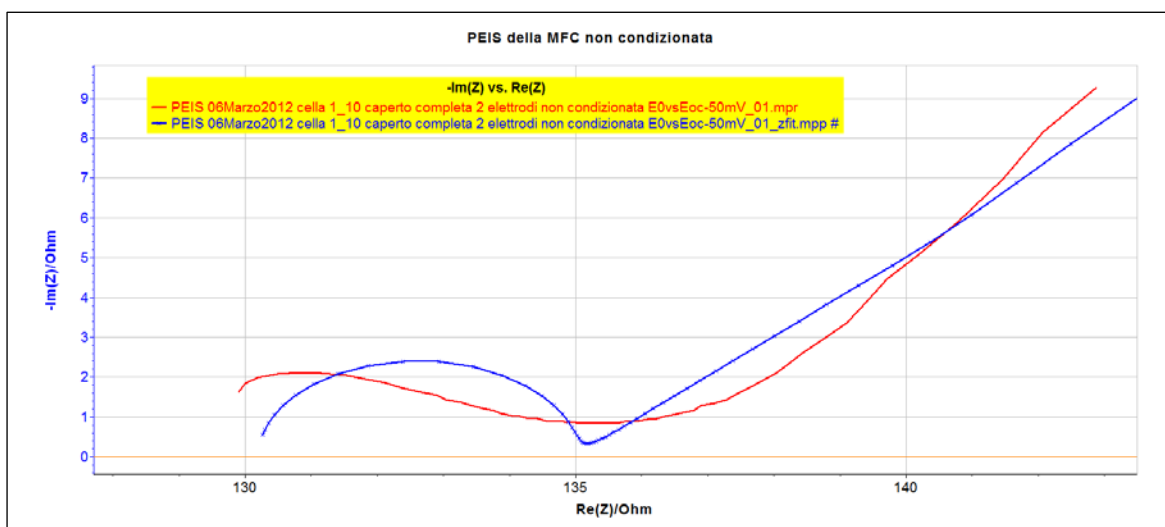


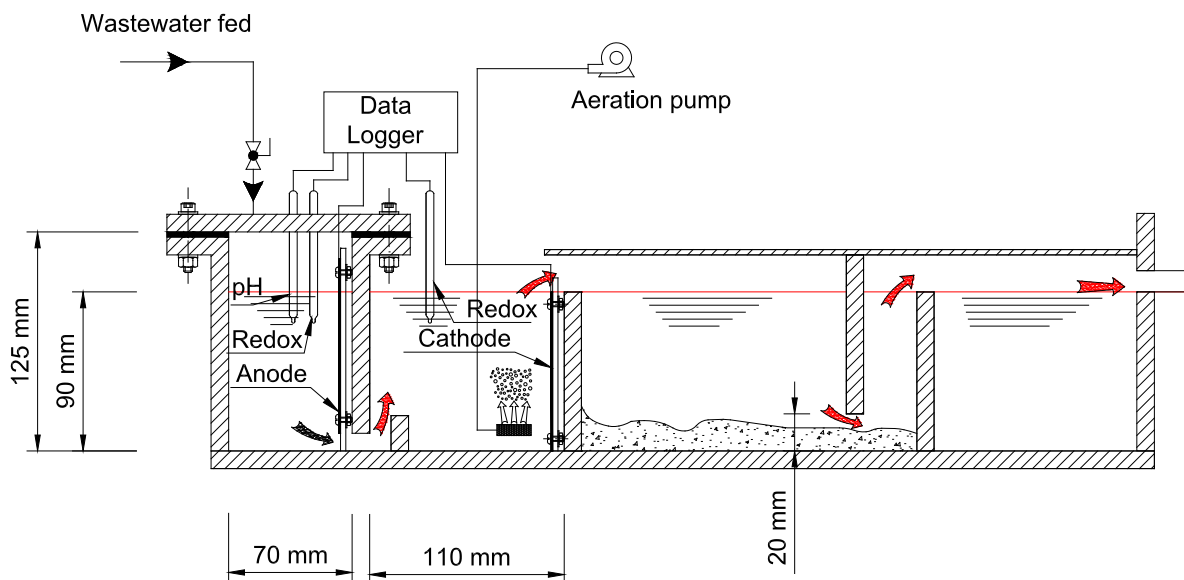
Figura 224 - Traccia della EIS della cella MFC-U reale (in colore rosso), messa a confronto con la traccia teorica (in colore blu) generata dal modello scelto della Randles Cell.

con questo modello è possibile prevedere il funzionamento di ciascuna MFC, a diversi regimi di funzionamento del carico elettrico esterno, in pratica della corrente erogata.

È possibile anche una modellizzazione di ciascuna tipologia di MFC, che permetta poi di simulare il suo comportamento, con delle simulazioni dinamiche [137].

### 7.8 Sperimentazione su un bio-reattore

Per 7 mesi è stata condotta la sperimentazione su di un bio-reattore, che è stato progettato dallo stesso gruppo di ricerca nel Laboratorio di Tecnologia e Chimica Applicate alla tutela dell'ambiente del Dipartimento di Ingegneria Chimica, e dove sono state eseguite le misure, le analisi e la manutenzione e ne è stata costantemente curata la gestione; è stato messo in funzione il bio-reattore ed il disegno in scala 1:1 è riportato nella figura 225:



*Figura 225 - Schema del bio-reattore, con alcune quote per la camera anodica A e la camera catodica C1; il disegno è in scala 1:1.*



*Figura 226 - Immagine del bio-reattore, in laboratorio.*

La struttura del bio-reattore è composta da plexiglass trasparente dello spessore di 10 mm ed è formato da 2 camera, l'anodica e la catodica; la camera anodica è in condizione anaerobiche per mezzo di un coperchio che costituisce la chiusura, anche per mezzo di una guarnizione di gomma in neoprene, con un solo lato adesivo e nella immagine sovrastante è quella indicata con l'etichetta con il simbolo A. Le camere catodiche sono 3 e hanno le denominazioni C1, C2 e C3, contrassegnate in figura dalle relative etichette e sono tutte aerobiche; la suddivisione è dovuta all'esigenza di avere la camera C1 per effettuare l'aerobiosi, la camera C2 per effettuare la sedimentazione e la camera C3 per il semplice scarico dell'effluente, che poi viene indirizzato per mezzo di un tubo in silicone, in un recipiente esterno, come raffigurato nell'immagine seguente:



*Figura 227 - Immagine del bio-reattore e dello scarico dell'effluente.*

La suddivisione delle diverse camere del bio-reattore avviene per mezzo di alcuni setti, anche essi costituiti da plexiglass trasparente, dello spessore di 10 mm; tutte le parti costituenti si possono vedere rappresentate in un disegno in 3D, sotto riportato, nella quale è stata riportata anche una sovracamera in materiale plastico, di C1, che si è rivelata necessaria a scongiurare le fuoriuscite di substrato che si avevano in seguito ad un aumento di alimentazione e la linea rappresenta il livello massimo del substrato:

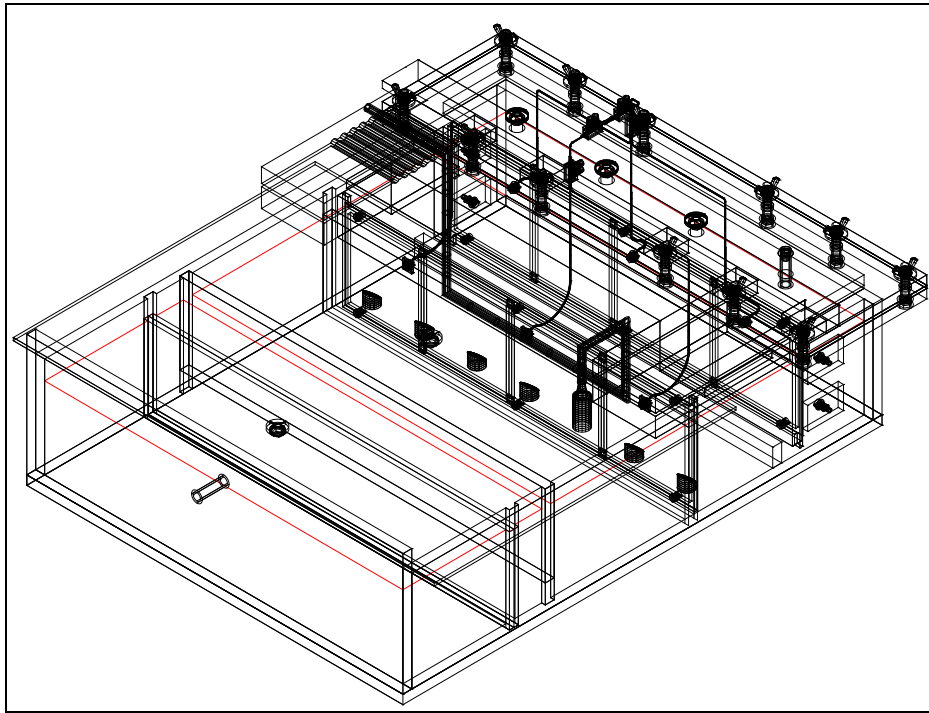
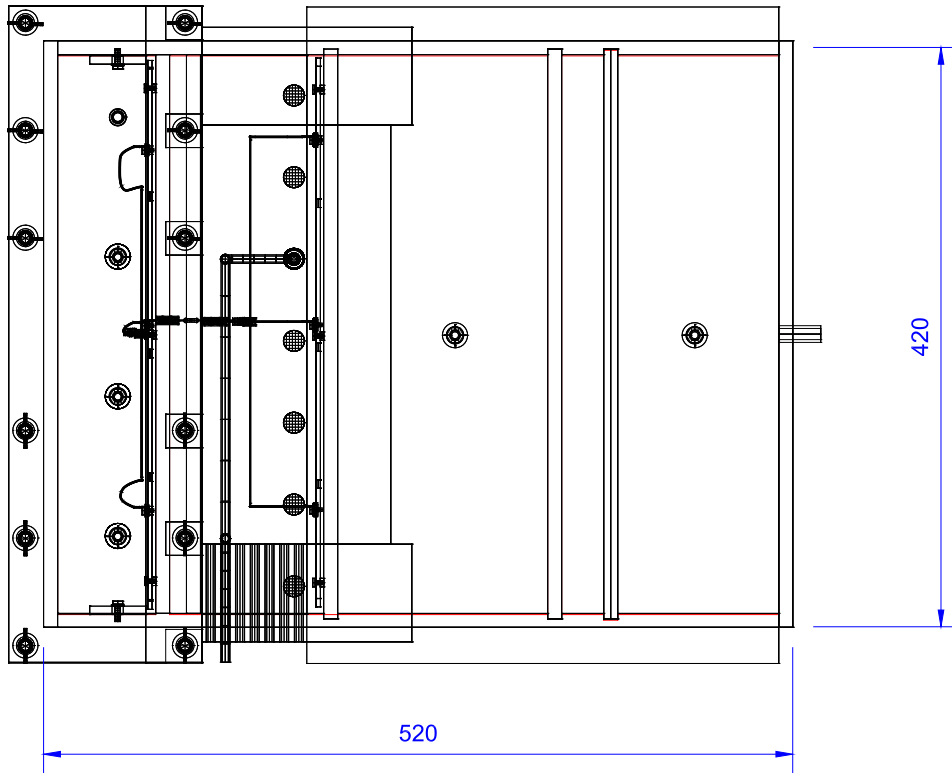


Figura 228 - Struttura del bio-reattore, che evidenzia tutte le parti che lo costituiscono.

L'aerazione della camera C1 è avvenuta per mezzo di diffusori, a forma di “stonewater”, che insufflavano ossigeno nascente dal fondo della camera e portavano l'aria prodotta dagli aeratori a cui erano collegati per mezzo di tubi in silicone, del diametro interno di 4 mm; il numero dei diffusori è stato fatto variare, nel corso della sperimentazione, da un numero iniziale di 3 diffusori, poi 7 e fino ad un massimo di 13 aeratori. Al variare del loro numero si assisteva ad un aumento della OCV, nel caso fossero stati aumentati e diversamente una diminuzione della stessa grandezza, nel caso venissero diminuiti di numero, ma questa linearità non sempre è stata rispettata perché concorrevano altri fattori, quali il valore del pH o la maggiore quantità di materiale sedimentato presente nelle camere A e C1, che è stato periodicamente rimosso; in particolare l'ostruzione della comunicazione fra la camera A e la C1 si è rilevata essere particolarmente dannosa anche sulla CCV, perché costituisce una barriera al passaggio delle cariche fra le due camere. I valori di pH sono stati periodicamente misurati in tutte le camere con un pH-meter CRISON GLP 22 ed un elettrodo CRISON modello 52 02, ed i valori più frequentemente rilevati sono riportati nella tabella seguente:

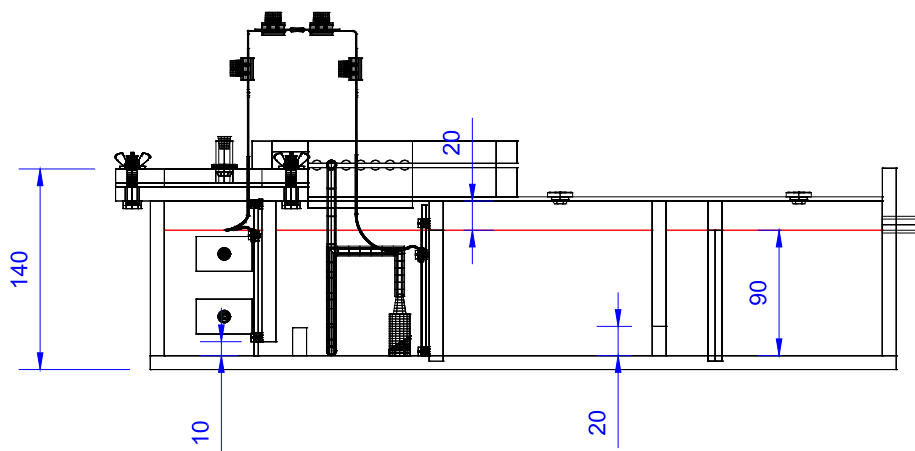
Camera del bio-reattore	pH
A	7,32
C1	8,65
C2	7,84
C3	8,95

Le dimensioni principali del bio-reattore sono riportate nelle tre viste seguenti, dove tutte le misure sono espresse in millimetri e tutti i disegni sono in scala 1:1; si evidenziano bene la posizione di tutte le parti costituenti il bio-reattore, in particolare gli elettrodi, i diffusori ed i tubi:



*Figura 229 - Vista dall'alto del bio-reattore.*

Nella vista laterale sono riportate le quote dei setti di separazione di tutte le camere ed il livello massimo del substrato, che viene determinato dal tubo in plexiglass, posto ad una quota fissa di 90 mm, in fondo alla camera C3:



*Figura 230 - Vista laterale del bio-reattore.*

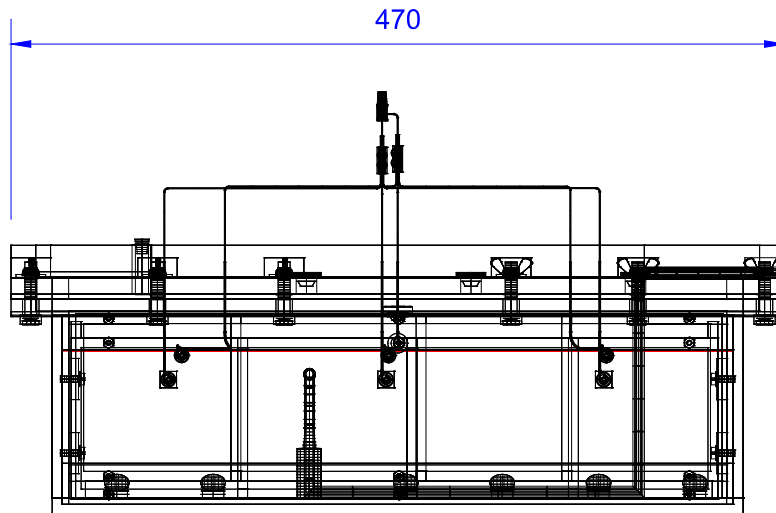


Figura 231 - Vista frontale del bio-reattore.

I volumi delle camere, considerato il livello del substrato massimo, sono quelli riportati nella tabella seguente:

CAMERA	VOLUME (litri)
A	2,52
C1	3,96
C2	6,48
C3	4,32
totale	17,28

L'alimentazione quotidiana del bio-reattore è avvenuta con un substrato che è stato reperito presso l'Azienda BRUNI Enrico e Aldo SOC. AGR. S.S. di Sutri (VT), una azienda agro-zootecnica dove è già in funzione una filiera agro-energetica legata alla gestione anaerobica di deiezioni animali e scarti agroindustriali; il digestato è stato prelevato periodicamente, con cadenza trimestrale direttamente dall'uscita del biodigestore in una forma definita "tal quale" e successivamente in Laboratorio è stato sottoposto alle operazioni di preparazione, in condizione adatte all'alimentazione del bio-reattore. La prima operazione di preparazione del digestato, ha comportato la frullatura, eseguita con un frullatore Bleck&Decker modello Blender da 350 Watt, con vaso in plastica da 1,4 litri, di tutto il digestato prelevato; la velocità di frullatura è stata scelta bassa, la minima offerta dall'elettrodomestico ed il tempo di durata dell'operazione è stato breve, tutto questo per evitare di diminuire la comunità microbica endogena, per l'effetto della sonificazione. La successiva fase di preparazione è consistita nella omogeneizzazione di tutto il digestato frullato, per uniformare tutti i parametri organici e chimici del digestato e non avere ed

in fine il confezionamento idoneo al congelamento per la conservazione nel tempo, che è stata eseguita in un freezer a 4 °C.

Le serie della sperimentazione sul bio-reattore e la loro relativa durata sono state:

t=0: dopo un tempo di 30 giorni di acclimatazione si sono avuti i valori significativi;

Serie 1: biofilm giovane, misura delle OCV (durata totale 15 giorni);

Serie 2 (durata totale 15 giorni);

Serie 3: biofilm maturo, misura della resistenza interna, EIS, CE, calcolo della rimozione del carbonio e dell'azoto (durata totale 15 giorni);

Serie 4: curva di potenza con il potenziostato;

Serie 5: biofilm in decadimento e rilevazione del regime di power overshoot; analisi biologiche con la determinazione dell'albero filogenetico, ed ognuna delle Serie prevedeva un intervallo di 15÷25 giorni.

Le analisi chimiche, dopo l'omogeneizzazione e cioè del substrato che è stato usato per alimentare il bio-reattore, hanno fornito i valori seguenti:

pH	7,98	VS/TS (%)	67,447	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (g/kg)	1,85
TS (%)	4,7	Ash (%)	32,553	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /TKN (%)	0,6955
TS (g/kg)	47	TKN (g/kg)	2,66	ORP <sub>tal quale</sub> (mV)	-366
VS (%)	3,17	N <sub>org</sub> +N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (g/kg)	2	ORP <sub>frullato</sub> (mV)	-346
VS (g/kg)	31,7				

*Tabella 36 - Valori che caratterizzano il digestato.*

dove: TS, solidi totali; VS, solidi volatili; TKN (Total Kjeldahl Nitrogen), azoto totale Kjeldahl = azoto organico + azoto ammoniacale → N<sub>2</sub> + NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, anche dette “forma ridotte”; Ash=ceneri.

Nelle acque di scarico l'azoto è presente essenzialmente in forma organica (urea, proteine) ed in forma ammoniacale (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). La sua rimozione per via biologica avviene attraverso i processi di: ammonificazione e idrolisi dell'azoto organico in azoto ammoniacale; successiva nitrificazione, con trasformazione dell'ammoniaca prima a nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) e poi a nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>); denitrificazione, con la riduzione del nitrato in azoto molecolare (N<sub>2</sub>), che si libera dal sistema; in un'acqua di scarico, quindi l'azoto si trova generalmente in due forme: ammoniacale e organico (azoto legato alla sostanza organica).

L'azoto ammoniacale è, in genere, quasi tutto presente sotto forma di ione ammonio, mentre l'azoto organico è trasformato nel tempo dai batteri nella forma ammoniacale, pertanto, il rapporto azoto ammoniacale/azoto organico tende ad aumentare. La somma dell'azoto organico e dell'azoto ammoniacale fornisce l'azoto totale.

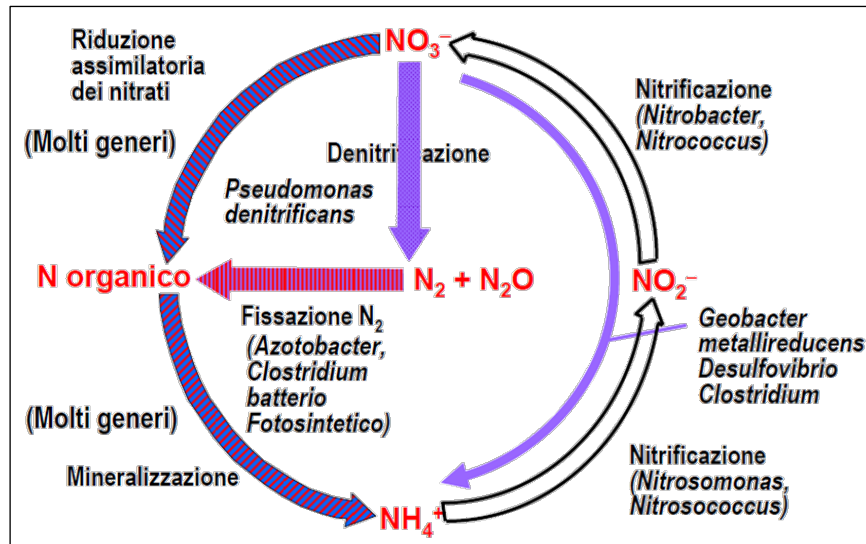
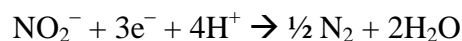


Figura 232 - Ciclo dell'azoto

In genere nella camera anodica le numerose specie batteriche sono in grado di operare la riduzione biologica dall'azoto nitrico a nitroso e successivamente ad azoto elementare gassoso, con formazione intermedia di ossidi di azoto, utilizzando la sostanza organica come donatore di elettroni. Tra le più comuni *Achromobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Micrococcus spp.* Nel caso di presenza contemporanea di ossigeno disciolto e di nitrati, si ha utilizzo preferenziale di ossigeno in quanto l'energia sviluppata, per unità di peso di sostanza organica metabolizzata, è maggiore nella riduzione dell'ossigeno molecolare rispetto alla denitrificazione. Il processo di denitrificazione si deve pertanto svolgere in condizioni rigorosamente anossiche, almeno nel microambiente circostante i batteri. Le reazioni alla base del processo di denitrificazione possono essere semplificate nel modo seguente:



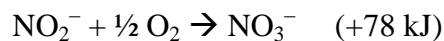
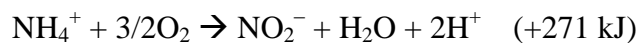
La riduzione dell'azoto nitroso avviene tramite la formazione di ossidi di azoto che sono successivamente ridotti ad azoto elementare. Accanto al processo di riduzione dei nitrati, che viene definito "dissimilativo", conseguente cioè alla respirazione batterica, si svolge anche un processo "assimilativo" di rimozione dell'azoto dovuto alla sintesi di nuova biomassa, e quindi di azoto organico. L'attività dei batteri denitrificanti è fortemente influenzata dalla natura della sostanza che funge da donatore di elettroni nella reazione di riduzione di nitrati. In base a considerazioni stechiometriche, il consumo di substrato organico presente in un liquame (carbonio "interno") necessario per la denitrificazione (assimilazione compresa) è circa pari a 4,4 mg BOD<sub>5</sub> per mg N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Nel caso di liquami ricchi di sostanza organica biodegradabile



(esprimibile in termini di BOD<sub>5</sub> o COD), questa rappresenta la sostanza ossidabile: il risultato complessivo è quello di realizzare, contestualmente alla denitrificazione, la rimozione di una parte del carico organico del liquame, senza consumo di ossigeno. Il substrato donatore di elettroni è la sostanza organica (C) e il substrato accettore sono i nitrati. La cinetica di denitrificazione, come quella di nitrificazione, dipende fortemente dalla temperatura, ma con intensità diversa in funzione della fonte di carbonio utilizzata.

Al catodo ci saranno le specie di batteri autotrofi che in natura sono in grado di ossidare l'azoto ammonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) a nitroso (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) in ambiente aerobico e l'azoto nitroso a nitrico (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). La loro azione può essere schematicamente rappresentata da reazioni di ossidoriduzione in cui l'azoto ammonico e nitroso fungono da donatori di elettroni e l'ossigeno libero (O<sub>2</sub>) costituisce l'accettore.

La stechiometria è essenzialmente riconducibile alle seguenti equazioni semplificate:



La reazione di ossidazione per via biologica dell'azoto ammonico è in realtà più complessa di quanto sopra indicato con formazione di intermedi azotati più instabili, mentre la reazione di ossidazione del nitrito avviene direttamente senza stadi intermedi.

Il pH ottimale è compreso fra 7,5 e 9,1. Nel caso di impianti di nitrificazione/ denitrificazione che trattano liquami urbani, la produzione di alcalinità (come ione OH<sup>-</sup>) conseguente alla reazione di denitrificazione non comporta di norma significative alterazioni del pH del sistema, sia per la capacità tampone della miscela a fanghi attivi, sia per l'effetto neutralizzante dell'acidità prodotta nel processo di nitrificazione; quando l'alcalinità iniziale dell'acqua da trattare non sia sufficiente, si determina un abbassamento del pH con il rischio di un inibizione totale del processo biologico; per il dimensionamento del trattamento di nitrificazione occorre verificare che l'alcalinità del liquame sia sufficiente. Il pH controlla anche la concentrazione di ammoniaca libera e di acido nitroso indissociato, entrambi forti inibitori dell'attività batterica e l'aumento della concentrazione dell'azoto nitroso è un indice di inibizione dei batteri che ossidano i nitriti.

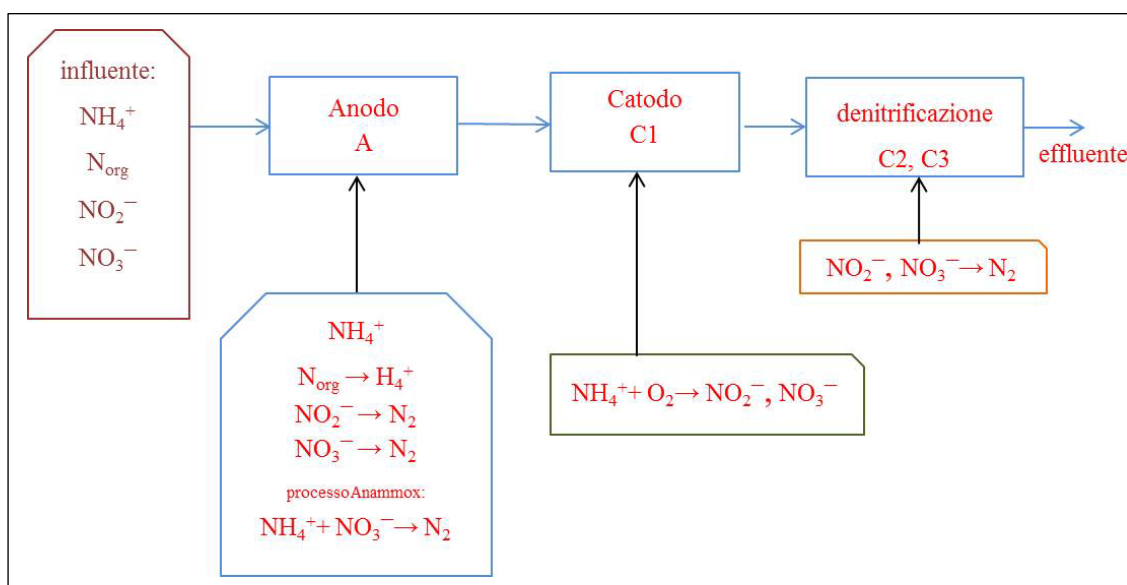


Figura 233 - Processi successivi per l'azoto, nel bio-reattore.

Nello stadio anossico i nitrati vengono ridotti ad azoto elementare gassoso utilizzando la sostanza organica del liquame grezzo come fonte di carbonio; nel successivo stadio areato si svolge l'ossidazione della sostanza organica e l'ossidazione dell'ammoniaca a nitrati, i quali sono necessari alla denitrificazione, essendo l'azoto presente nel liquame grezzo sotto forma ammoniacale ed organica; la corrente è prodotta dalla riduzione dell'ossigeno al catodo [122].

Facendo riferimento unicamente ai dati di due settimane, in quanto completi su tutto il reattore, questo appare come un perfetto sistema per far sparire l'azoto, e analizzando con attenzione i risultati dell'azoto nel reattore possiamo dire:

- per quanto riguarda l'alimentazione, non ci sono nitrati, il contenuto di azoto totale è superiore a quello del primo campionamento;
- per quanto riguarda la camera anodica (A) l'ammoniaca diminuisce poco e si forma qualche nitrato, l'azoto totale (TKN) sembra che addirittura aumenti un po', ma ciò lo si può attribuire all'incertezza della misura sperimentale;
- per la camera catodica (C1) risulta che l'azoto totale crolli, a seguito della diminuzione dell'ammoniaca, solo in parte compensata dalla formazione di nitrati sotto aerazione, si deve considerare infatti che l'azoto venga consumato come nutriente della rimozione del carbonio, ma non si può escludere la volatilizzazione dell'ammoniaca (il pH nella camera C1 è circa 8).

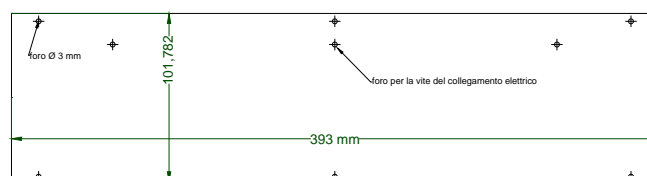
Per valutare la prima delle due ipotesi, abbiamo a disposizione i dati delle misure di solidi totali e volatili. Il consumo di questi ultimi ci fornisce indicazioni in merito all'attività degradativa nei confronti della materia organica; purtroppo, però estrapolare risultati significativi dai dati è

difficile, si è notato infatti un accumulo notevole di solidi in camera anodica (si passa dal valore iniziale di solidi totali nell'alimentazione di circa 23 g/kg ad un valore in camera anodica pari 60 g/kg dopo 130 giorni). Poiché noi periodicamente spurghiamo dalla camera C2, nelle altre camere l'andamento è regolare, ed usciamo in C3 con valori tra 12 e 17 g/kg, con un consumo di solidi volatili già in camera C1 di 25-30 g/kg, il che ci lascia supporre un consumo di ammoniaca come nutriente nella C1 di circa 0,3 g/kg.

Assumiamo poi che una buona parte di azoto organico resti nella camera anodica in accumulo, intrappolato nei solidi totali, resta però circa il 50-60% di ammoniaca che manca all'appello. A questo punto, per risolvere gli ultimi dubbi dobbiamo pensare a valutare l'eventuale volatilizzazione dell'ammoniaca sotto le intense condizioni di aerazione nella camera C1: - le camere C2 e C3 denitrificano i nitrati prodotti in C1, sono viceversa inefficaci rispetto all'ammoniaca, che addirittura in C2 e C3 sembra aumentare di nuovo, a seguito della contemporanea idrolisi di altro azoto organico, per cui l'azoto totale varia sensibilmente passando da C1 a C2, non varia passando da C2 a C3.

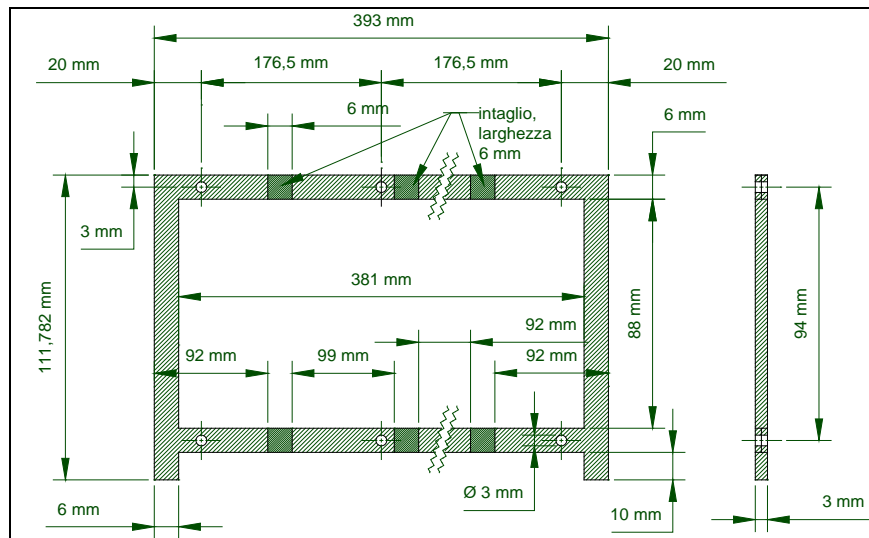
Per ovviare all'accumulo sul fondo della camera anodica bisogna spurgarla, ma potrebbe essere conveniente diluire il digestato a 1:5 e vedere se in tal modo si regolarizza il flusso.

Gli elettrodi sono di grafite, acquistata dalla GoodFellow, UK ed è stata impiegata sia per l'elettrodo anodico che per quello catodico; gli elettrodi sono montati su dei telai in plexiglass trasparente, dello spessore di 3 mm ed i collegamenti elettrici sono realizzati con i fili di titanio, acquistato dalla Sigma Aldrich; ogni elettrodo presenta 3 collegamenti elettrici, realizzati con dei sistemi di serraggio in acciaio inossidabile A4, acquistati alla RS Components, Milano, e composti da una vite M3x6, una rondella M3, un'altra M4 ed un dado M3 che svolgono la funzione di tenere il filo di titanio, precedentemente avvolto a spirale e con un occhiello centrale del diametro di 3 mm, sulla grafite dell'elettrodo; i collegamenti elettrici sono stati scelti in numero di 3 per ridurre le perdite per diffusione. Le dimensioni dell'elettrodo anodico sono di: 393 x 101,782 mm quindi una superficie di 40 cm<sup>2</sup> e viene fissato su di un telaio:



*Figura 234 - Maschera dell'elettrodo anodico.*

Sull'elettrodo di grafite per la camera anodica sono stati praticati 3 fori del diametro di 3 mm, per i collegamenti elettrici e sui bordi anche degli altri fori, del diametro di 3 mm, per fissare il foglio di grafite al telaio in plexiglass; questi fori sono necessari per fissare a grafite al telaio, con delle viti in nylon ed il sistema di serraggio è composto da 1 vite cilindrica intaglio M3x6 ISO metrica, in nylon 6.6, da 1 rondella piana M3 ISO metrica DIN 125, in nylon 6.6 e da 1 dado piano M3 ISO metrico DIN 555, in nylon 6.6. Il telaio è di plexiglass trasparente, dello spessore di 3 mm e nella figura 235 seguente sono riportate tutte le altre quote:



*Figura 235 - Telaio per l'elettrodo della camera anodica.*

Una fotografia, effettuata in corso d'opera dell'elettrodo anodico, montato sul telaio, con i 3 collegamenti elettrici, è riportata nelle figure seguenti; la vista frontale, in figura 236:



*Figura 236 - Elettrodo anodico, vista fronte.*

e nella vista posteriore, in figura 237:



*Figura 237 - Elettrodo anodico, vista retro.*

Il coperchio della camera anodica è serrato con 12 viti M5x45 mm, bloccate con dei galletti in Acciaio Inox A4 M5, che si serrano su delle rondelle Mudg'd Washer St M5x25 che premono il coperchio in plexiglass ed impediscono che entri l'ossigeno, rendendo possibile l'anaerobiosi.

Per la camera catodica è stato realizzato l'elettrodo con lo stesso materiale, ed in figura 238 vengono riportate tutte le altre quote:

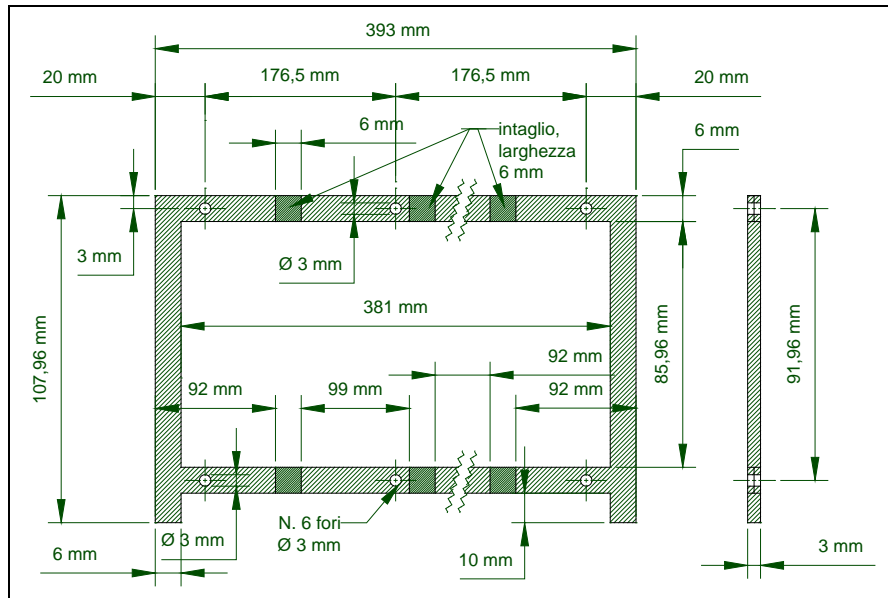


Figura 238 - Telaio dell'elettrodo catodico.

I setti della camera catodica sono stati fissati e sigillati, al fine di tenere completamente separate le diverse camere, rispettivamente C1, C2 e C3 ed il sigillante utilizzato è stato acquistato alla RS Components, del tipo Sista Silicon 5, trasparente.

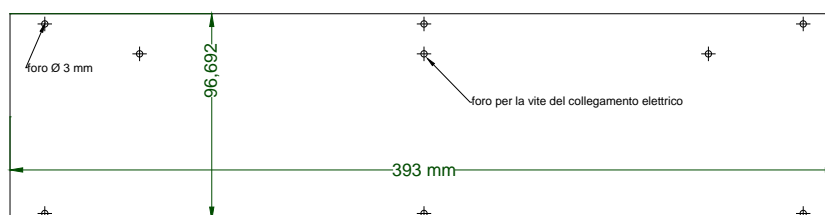


Figura 239 - Maschera per l'elettrodo catodico.

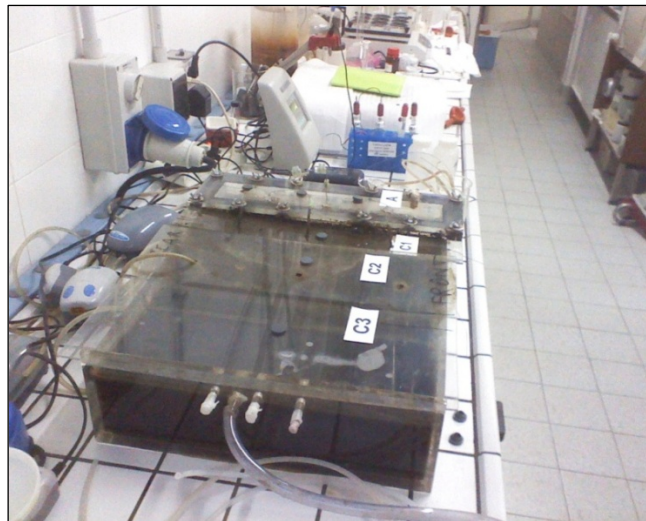
Il filo impiegato per i collegamenti elettrici degli elettrodi è stato acquistato dalla Sigma-Aldrich, ed ha un diametro di 0,81 mm; il materiale con il quale è realizzato è titanio puro al 99,7% con tracce di metalli di base, ed ha una resistività di 42,0  $\mu\Omega$ -cm, a 20 °C. I fili sono stati rivestiti con una guaina per evitare che gli elettroni che circolavano nel filo, venissero neutralizzati elettricamente dagli ioni presenti in soluzione nel digestato e per far sì che il liquido della camera non venga visto come una terra di dispersione per le cariche che si trovano sull'elettrodo; la

guaina è composta da tubi in polietilene, che abbiamo acquistato alla CLAY ADAMS, Parsippany (NJ 07054), è del tipo medicale ed ha un diametro interno di 0,083 mm e un diametro esterno di 1,524 mm.



*Figura 240 - Il bio-reattore, in cui si possono distinguere tutte le camere dalle quali è composto.*

Nella immagine seguente si rileva la presenza di un coperchio sulle camere anodiche, realizzato con il PETG trasparente, dello spessore di 3 mm, al quale sono stati praticati dei fori al fine di consentire i prelievi periodici di substrato per effettuare le analisi chimiche e biologiche.



*Figura 241 - Vista frontale del bio-reattore.*

I dettagli per il sistema di serraggio del coperchio della camera anodica A sono evidenziati nella figura 242, dove si distinguono le viti, i tappi in gomma grigia per i fori che consentivano l'alimentazione e lo spurgo delle diverse camere del bio-reattore; si notano anche i fili di collegamento di titanio per la camera anodica, che presenta anche del silicone trasparente per

assicurare l'anaerobiosi alla camera A; per la camera C1 i fili sono rivestiti dalla guaina, di colore nero; entrambe i fili di collegamento delle camere convergono in un punto (nodo) e terminano con un unico collegamento, che è quello che andrà a realizzare il circuito elettrico tramite la resistenza esterna, ad essi collegata con i rispettivi connettori, di colore trasparente:



*Figura 242 - Immagini dei dettagli delle camere del bio-reattore.*

La resistenza elettrica  $R_{est}$  utilizzata come carico elettrico è composta da una resistenza a film metallico, acquistata alla RS Components Resistenza del valore di  $178 \pm 0.1\% \Omega$  e tutti i collegamenti sono stati realizzati utilizzando dei morsetti da  $1,5 \text{ mm}^2$ , 250-380 V.

Le misure delle grandezze elettriche hanno portato alla rilevazione di 121 punti di misura, nei 207 giorni della durata della sperimentazione sul bio-reattore; nelle figure seguenti 251 - 258 sono riportati i grafici di tutte le grandezze rilevate, in dettaglio:

- Figura 243 - Potenziale a circuito aperto OCV, del bio-reattore misurati con il multimetro FLUKE 87V e con il potenziostato VSP.
- Figura 244 - Potenziale di semicella anodica A del bio-reattore,  $E_{we}$  misurato con il potenziostato VSP
- Figura 245 - Potenziale di semicella catodica C1 del bio-reattore,  $E_{ce}$  misurato con il potenziostato VSP.
- Figura 246 - Tensione ai capi della  $R_{est}$  del bio-reattore, CCV misurata con il multimetro FLUKE 87V.
- Figura 247 - Corrente erogata dal bio-reattore, calcolata con la misura indiretta eseguite con il multimetro FLUKE 87V.
- Figura 248 - Potenza prodotta dal bio-reattore, calcolata dalle misure eseguite con il multimetro FLUKE 87V.

–Figura 249 - Potenziale redox della semicella anodica A del bio-reattore, misurato con il GLP 22.

–Figura 250 - Potenziale redox della semicella catodica C1 del bio-reattore, misurato con il GLP 22.

Nel grafico 243 sono riportati i valori della tensione a circuito aperto del bio-reattore, OCV misurati con il multimetro FLUKE 87V ed il potenziostato VSP, ed in quest'ultimo caso il valore è stato ottenuto dalla differenza dei potenziali di semicella catodica ed anodica, ed i valori sono riportati in figura 244 per il potenziale della semicella anodica A, Ewe, ed in figura 245 per il potenziale della semicella catodica C1, Ece, rilevati entrambi con l'elettrodo di riferimento Ag/AgCl (3,5 M) e poi riportati verso l'elettrodo di riferimento NHE-Normal Hydrogen Electrode; i valori dei limiti dei potenziali redox caratteristici del funzionamento MFC del bio-reattore sono riportati in ciascuno delle due figure, con delle linee tratteggiate. Nella figura 246 è rilevata la tensione a circuito chiuso, CCV con il multimetro FLUKE 87V ai capi della Rest, del valore sempre costante e già sopra riportato; nella figura 247 ci sono i valori della corrente erogata dal bio-reattore, su un circuito esterno costituito dalla Rest. Nella figura 248 sono riportati i valori della potenza prodotta P, calcolata conoscendo i valori della CCV e della Rest, dalla formula:

$$P = \frac{CCV^2}{R_{est}}$$

con tutti i valori misurati con il multimetro. In tutti i grafici i valori rilevati sono relativi all'intero periodo della durata di 207 giorni.

Nelle figure 249 e 250 sono riportati i valori del potenziale redox della semicella anodica A e della semicella catodica C1, misurati con l'elettrodo redox Crison 52 61 collegato all'apparecchio GLP 22, riferiti all'elettrodo di riferimento Ag/AgCl (KCl 3,5 M) e poi riportati al valore dell'elettrodo di riferimento NHE; queste due serie di valori saranno riferiti al potenziale redox dell'elettrolita, mentre le stesse grandezze Ece e Ewe riportate negli altri grafici di figura 244 e 245 sono i potenziali redox degli elettrodi; questi valori sono risultati avere degli andamenti stabili, o con poche oscillazioni, e di conseguenza la loro rilevazione è stata arrestata al 120-giorno della misura.

I grafici presentano tutte le modifiche apportate al bio-reattore, nel corso di tutto il suo periodo di funzionamento ed in seguito le grandezze vengono rappresentate in funzione di queste modifiche.



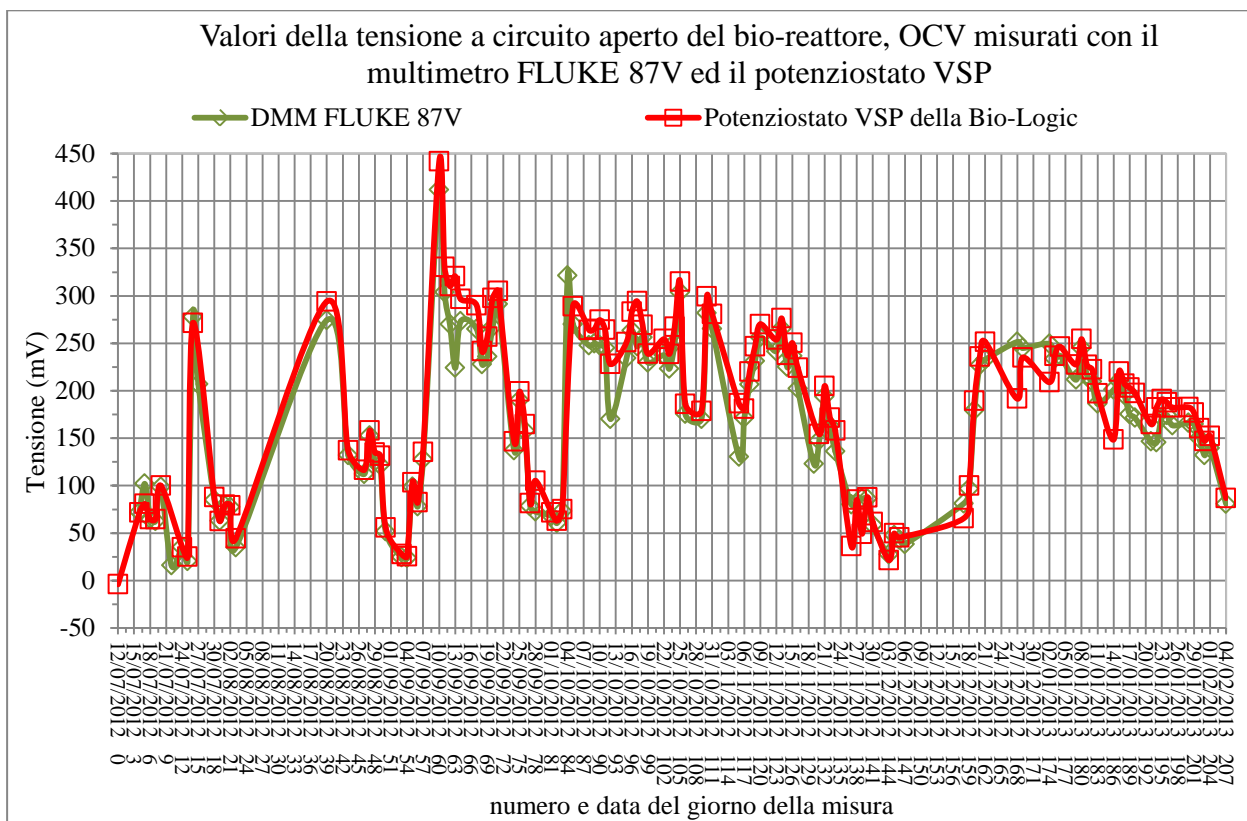


Figura 243 - Potenziale a circuito aperto OCV, del bio-reattore misurati con il multimetro FLUKE 87V e con il potenziostato VSP.

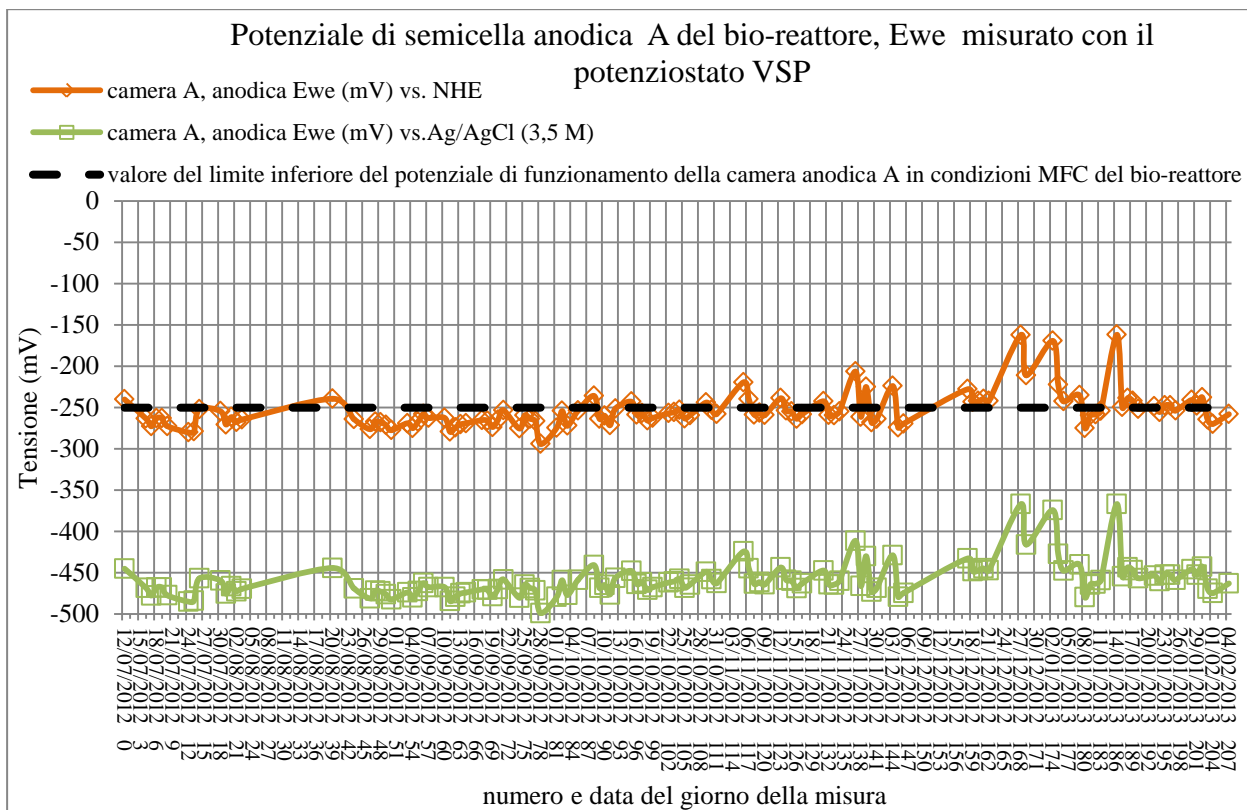


Figura 244 - Potenziale di semicella anodica A del bio-reattore, Ewe misurato con il potenziostato VSP.

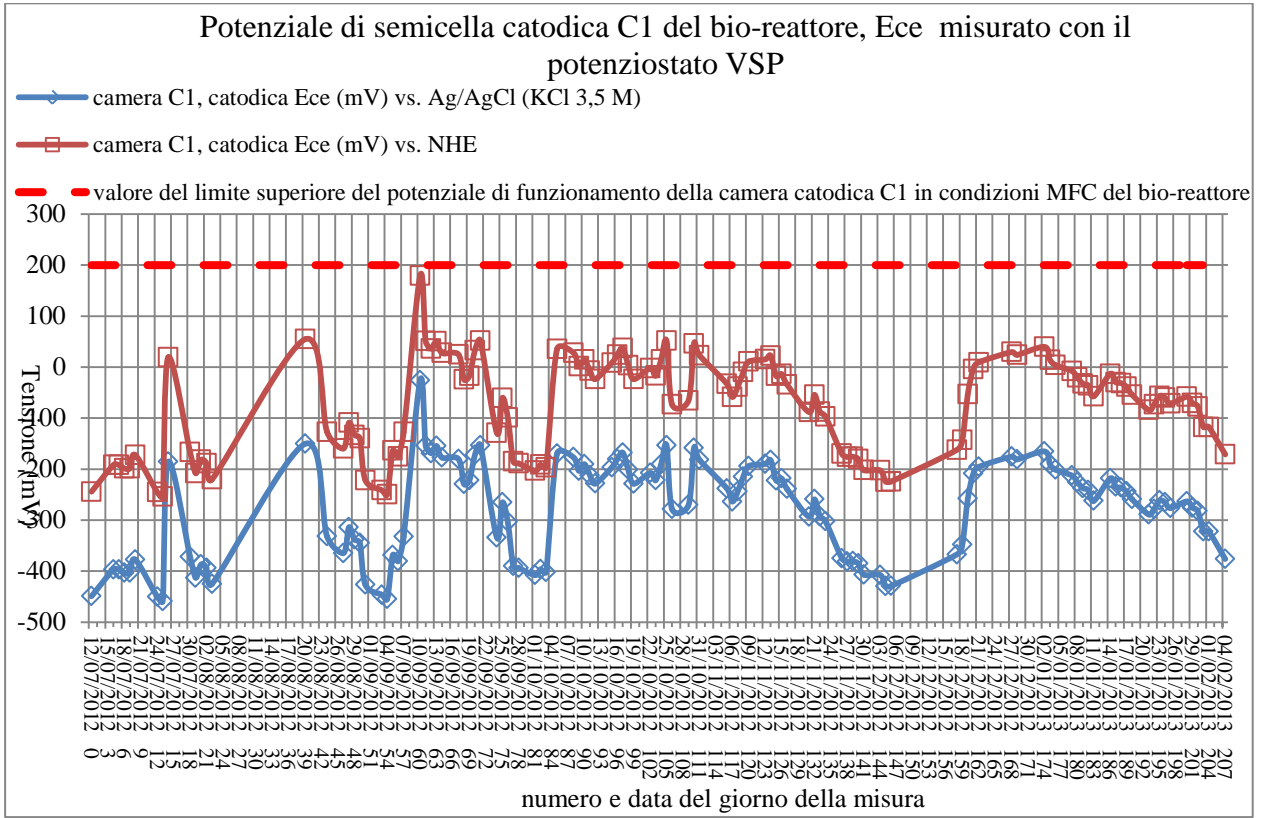


Figura 245 - Potenziale di semicella catodica C1 del bio-reattore, Ece misurato con il potenziostato VSP.

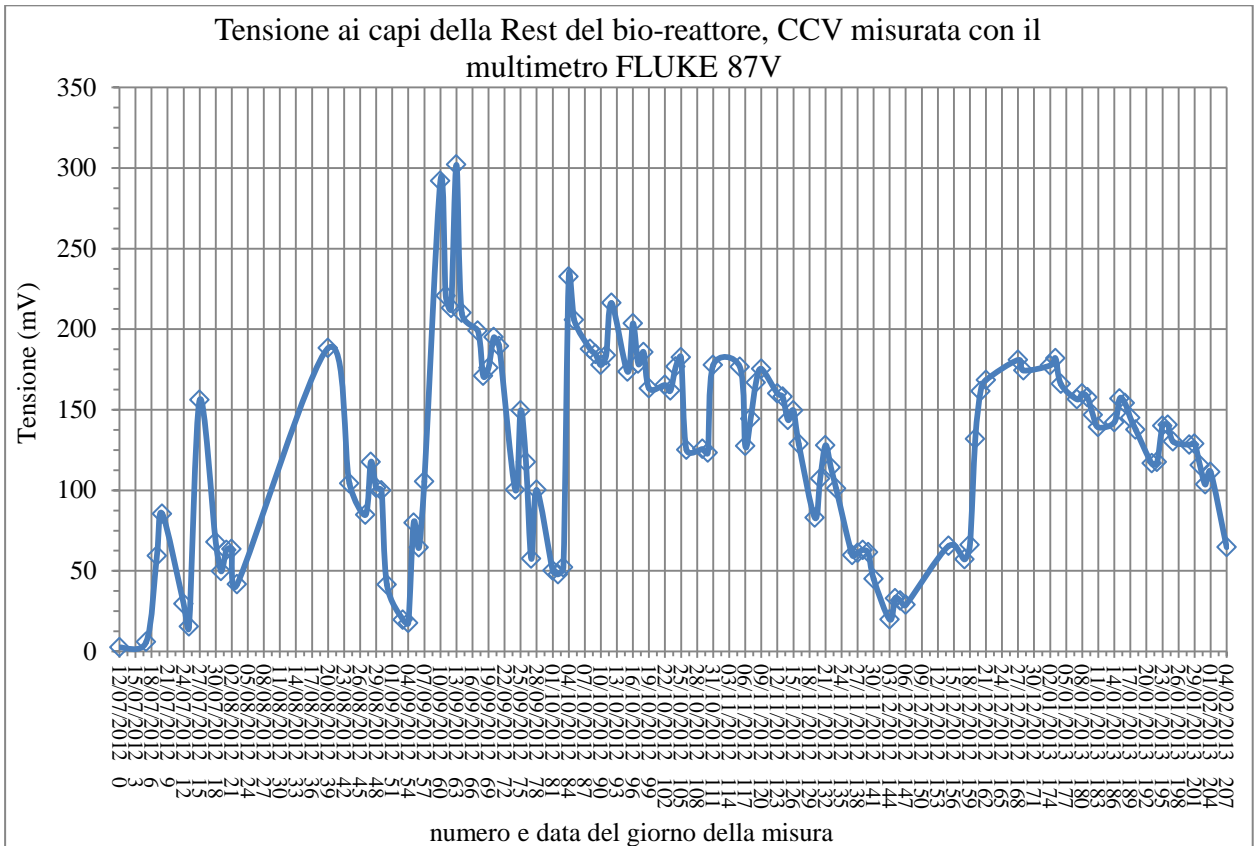


Figura 246 - Tensione ai capi della Rest del bio-reattore, CCV misurata con il multimetro FLUKE 87V.



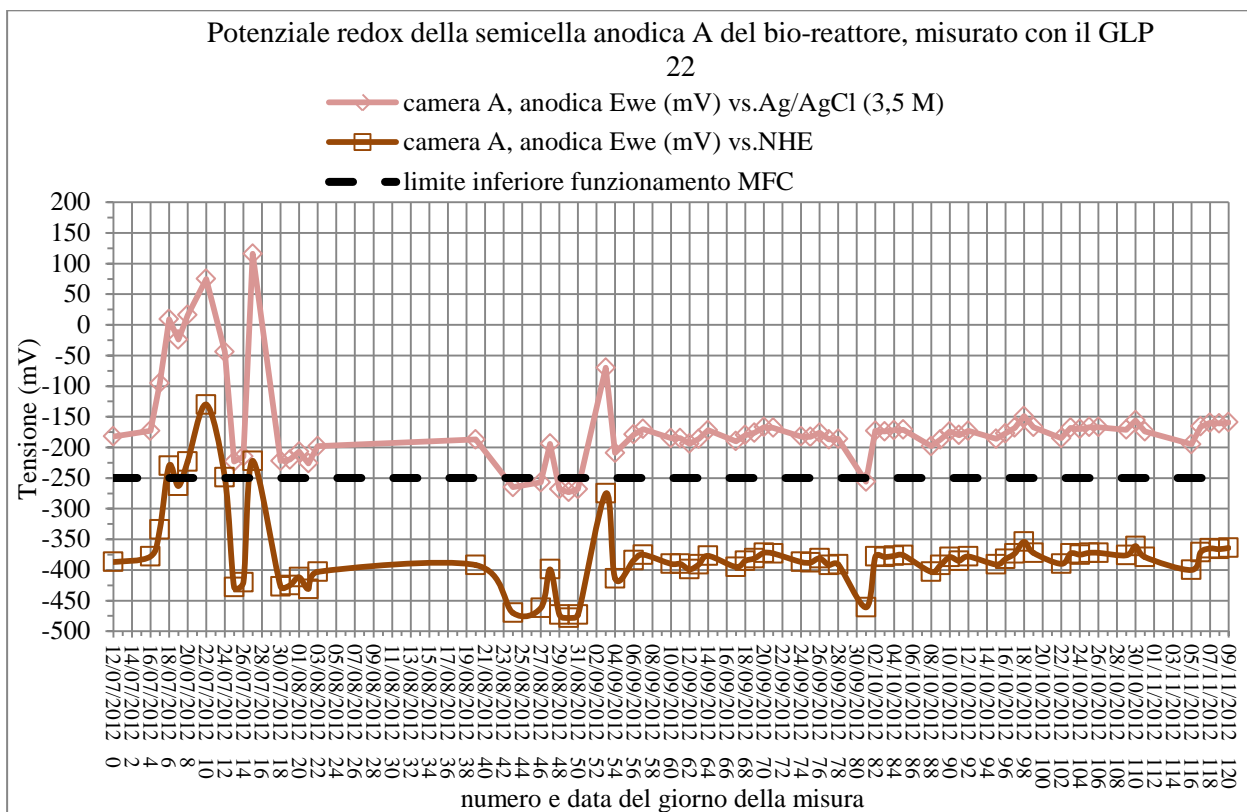


Figura 249 - Potenziale redox della semicella anodica A del bio-reattore, misurato con il GLP  
 22.

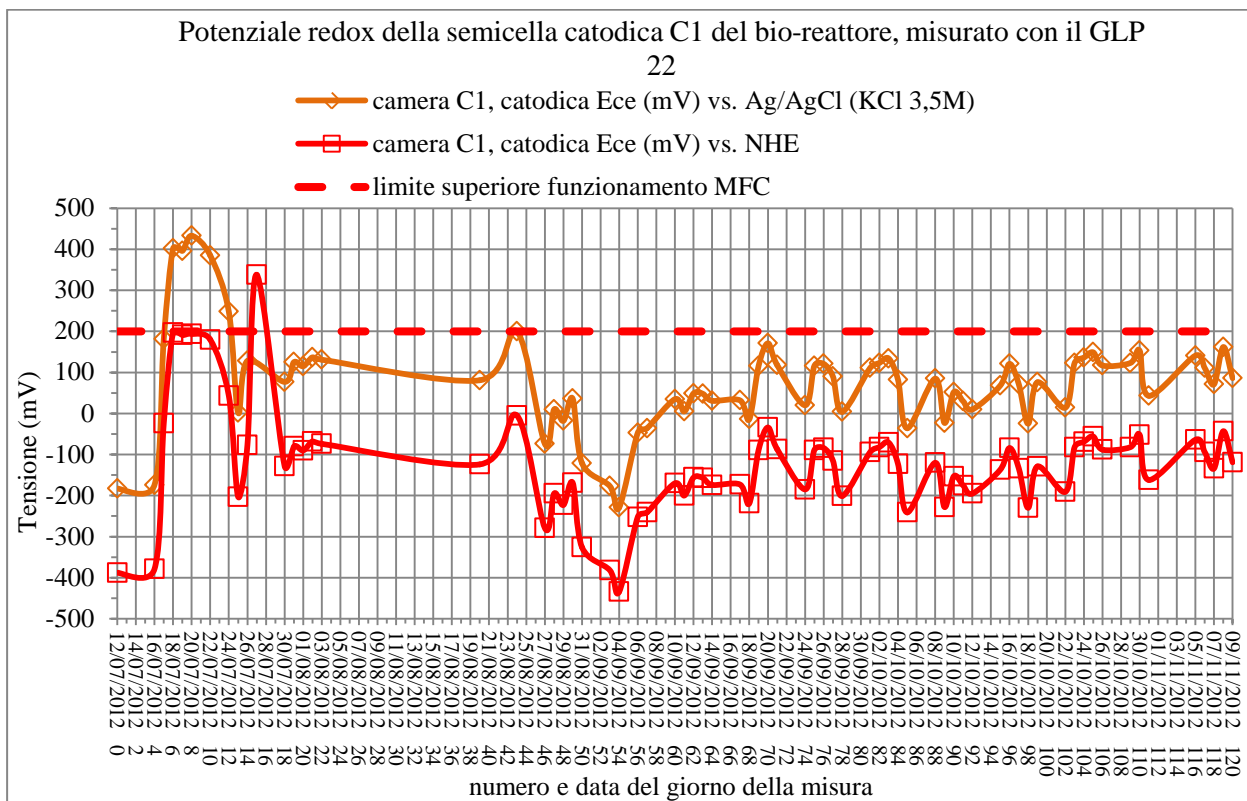


Figura 250 - Potenziale redox della semicella catodica C1 del bio-reattore, misurato con il GLP  
 22.

### 7.8.1 Rimozione di azoto da digestato nel bio-reattore

Nel bio-reattore sono state eseguite le analisi dei parametri che concorrono a definire il suo funzionamento dal punto di vista delle rimozione di azoto dal digestato, che ne ha costituito la sua alimentazione per tutta la durata della sperimentazione; è stato necessario rinnovare il quantitativo di refluo zootecnico con un nuovo prelievo dall'Azienda zootecnica ma con lo stesso trattamento, dal giorno 71 in cui il bio-reattore ha visto l'impiego di questo altro quantitativo di digestato per la sua alimentazione quotidiana, che è consistita nell'introduzione nella camera anodica di 250 ml di digestato e di 250 ml di acqua distillata, inizialmente separati fra loro ma in successione e poi dal giorno 188 la procedura è variata eseguendo una pre-miscelazione delle due quantità sopra indicate.

Gli andamenti delle quantità di solidi totali TS, solidi volatili VS fino al giorno 131 della sperimentazione sono riportati in figura 251:

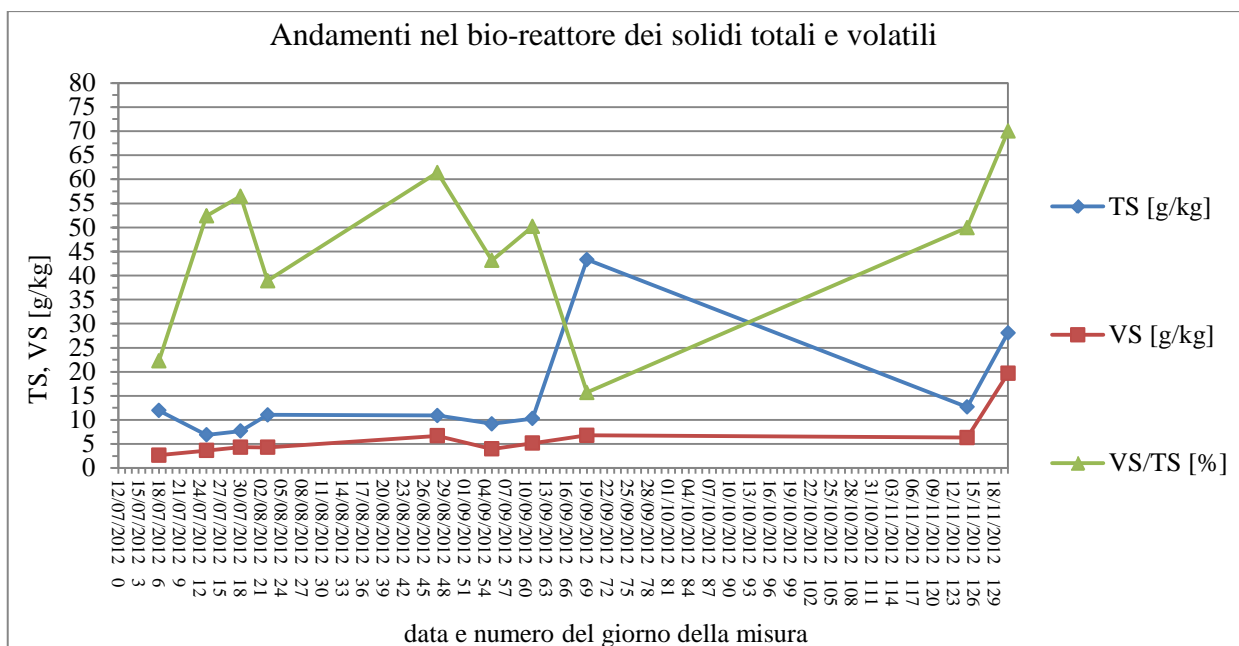


Figura 251 - Quantità dei solidi totali e dei solidi volatili presenti nel bio-reattore, dall'inizio della sperimentazione fino al giorno 131.

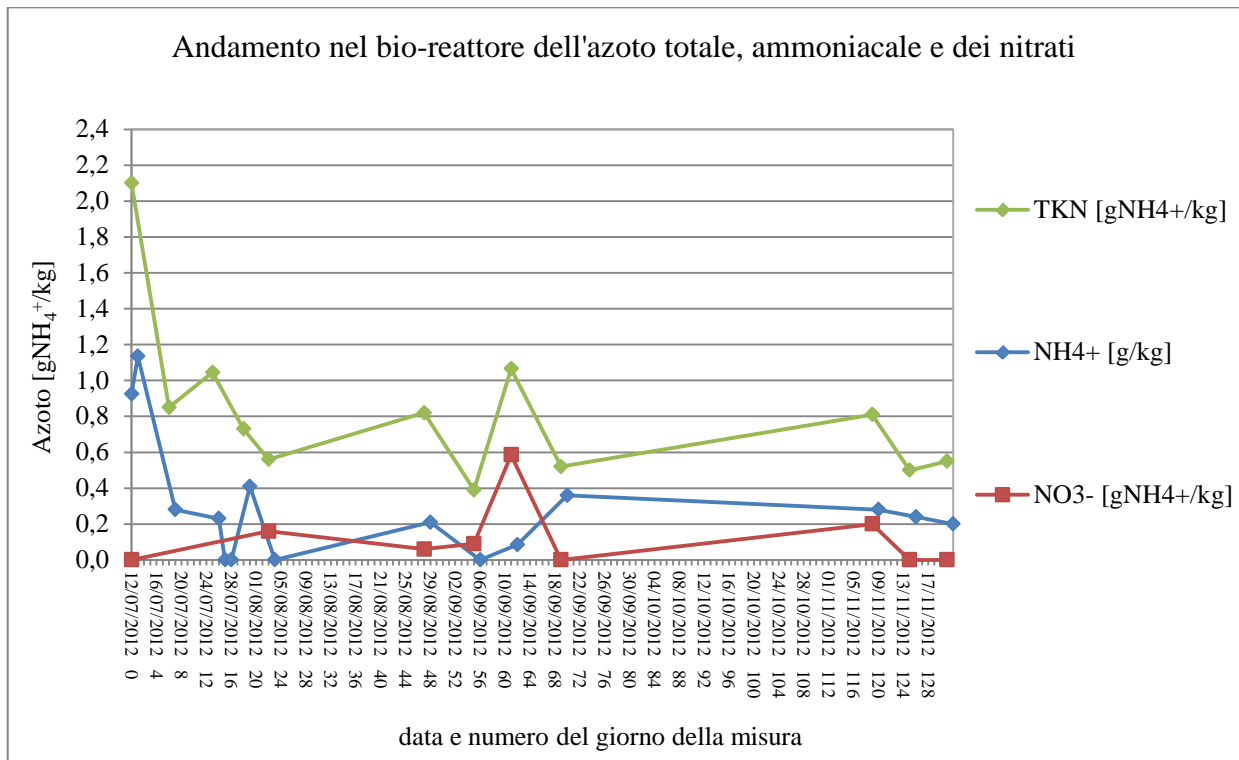


Figura 252 - Quantità dei solidi totali e dei solidi volatili presenti nel bio-reattore, dall'inizio della sperimentazione fino al giorno 131.

Il dettaglio dei solidi totali e dei solidi volatili ed anche delle ceneri per tutte le camere del bio-reattore, ma partendo dai valori presenti nell'alimentazione (nel grafico indicata con F) per il giorno 125 di funzionamento, sono riportati nel grafico in figura 253:

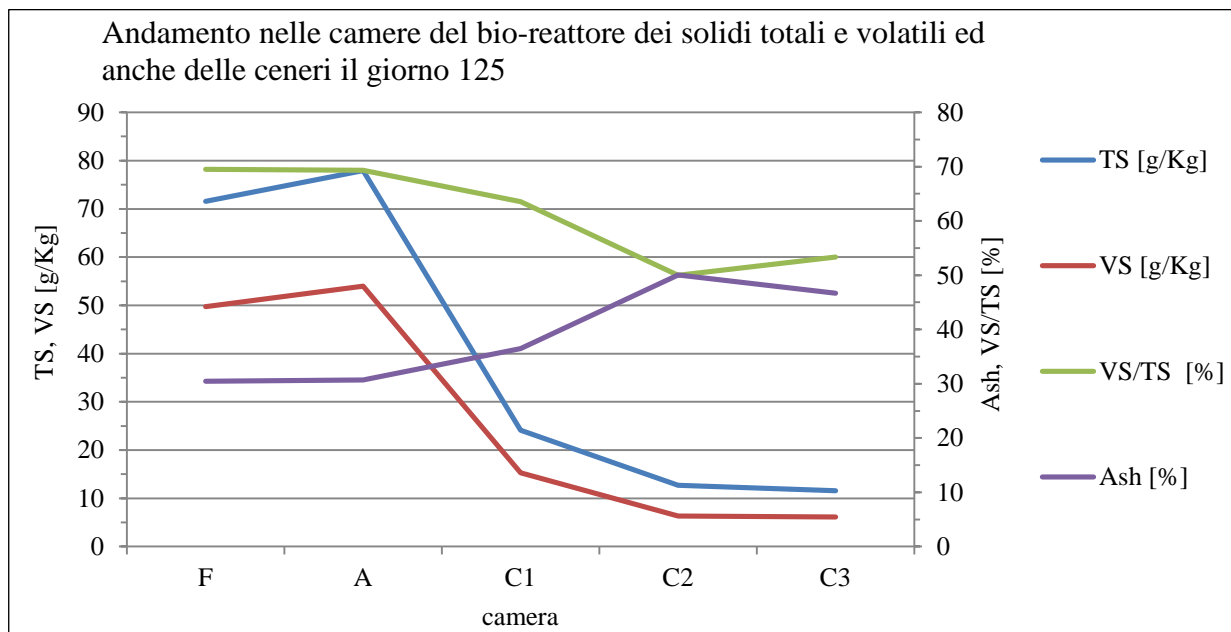


Figura 253 - Quantità dei solidi totali e volatili presenti nelle camere del bio-reattore ed anche delle ceneri, per il giorno 125.

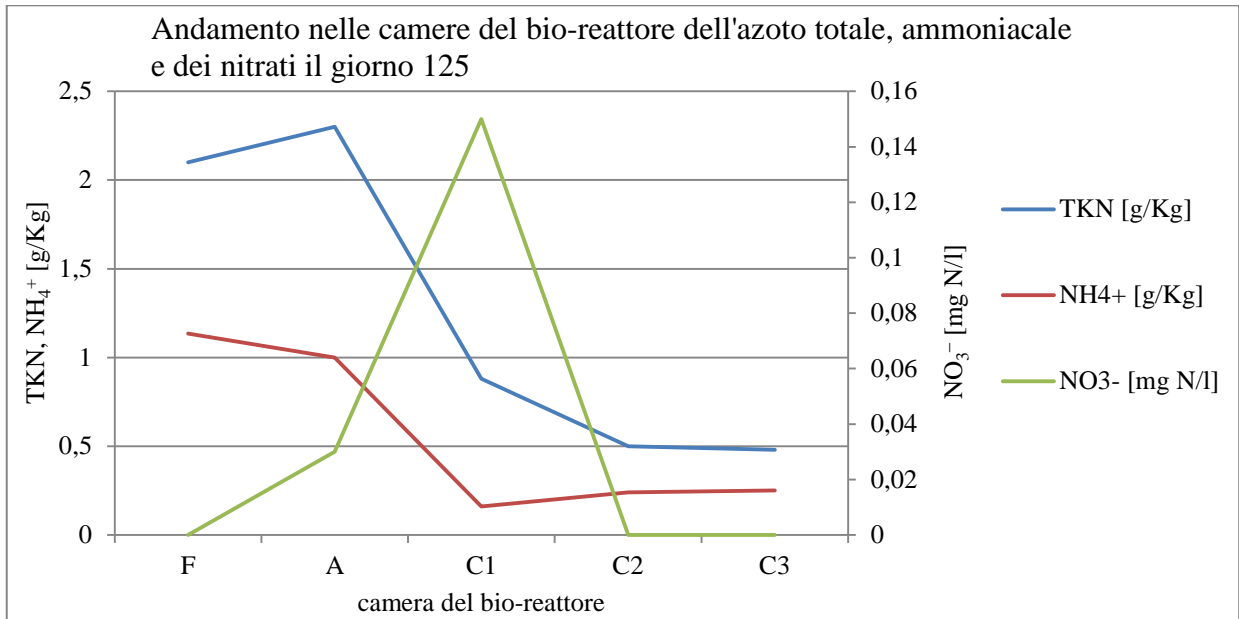


Figura 254 - Quantità nelle camere del bio-reattore dell'azoto totale, ammoniacale e dei nitrati, il giorno 125 di funzionamento.

Lo stesso tipo di analisi chimiche è stato eseguito anche il giorno 131 di funzionamento del bio-reattore:

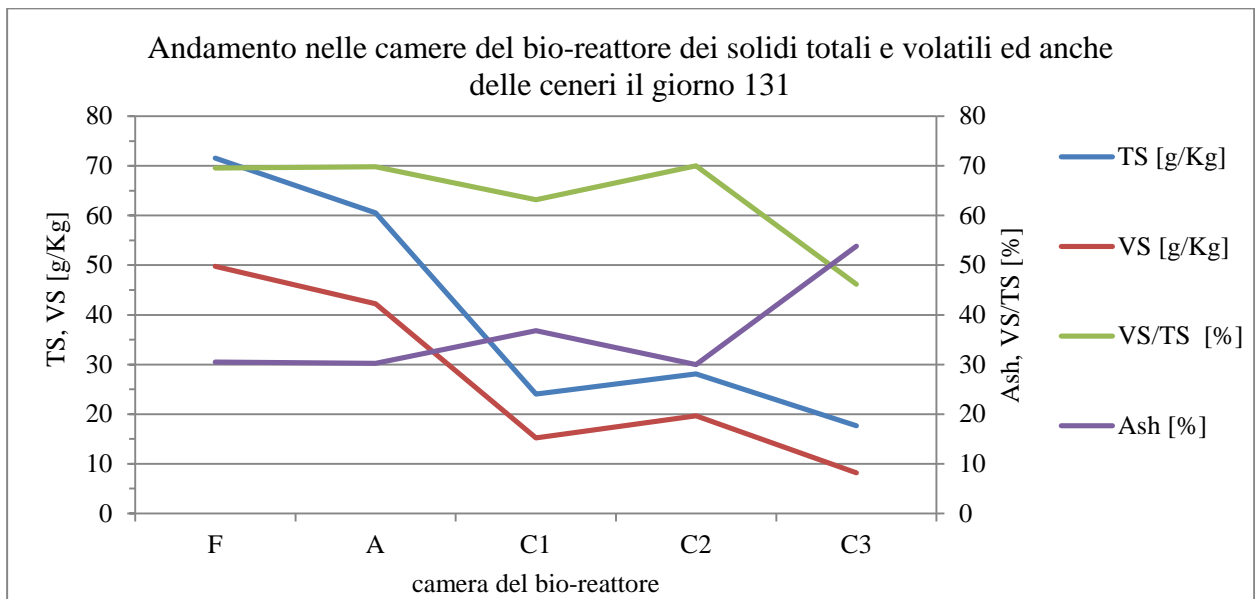


Figura 255 - Quantità dei solidi totali e volatili presenti nelle camere del bio-reattore ed anche delle ceneri, per il giorno 131.

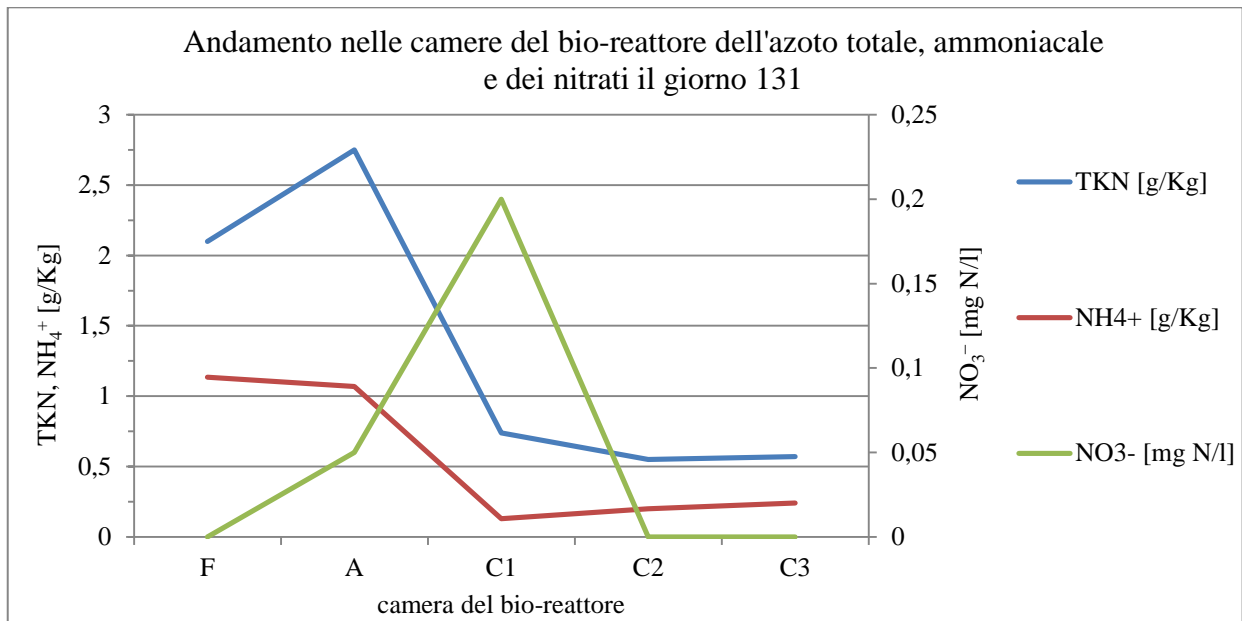


Figura 256 - Quantità nelle camere del bio-reattore dell'azoto totale, ammoniacale e dei nitrati, il giorno 131 di funzionamento.

### 7.8.2 Le curve di potenza e di polarizzazione del bio-reattore

Un obiettivo comune a tutti i generatori di energia elettrica è quello di determinarne le prestazioni in termini di potenza elettrica prodotta quando vengono collegati ad un carico elettrico esterno; una MFC ed anche il bio-reattore in fase operativa si possono schematizzare come un circuito dotato di due resistenze elettriche collegate in serie, di cui una rappresenta il carico esterno da alimentare ( $R_{est}$ ) e l'altro la resistenza interna della cella ( $R_{int}$ ), come rappresentato schematicamente in figura 257:

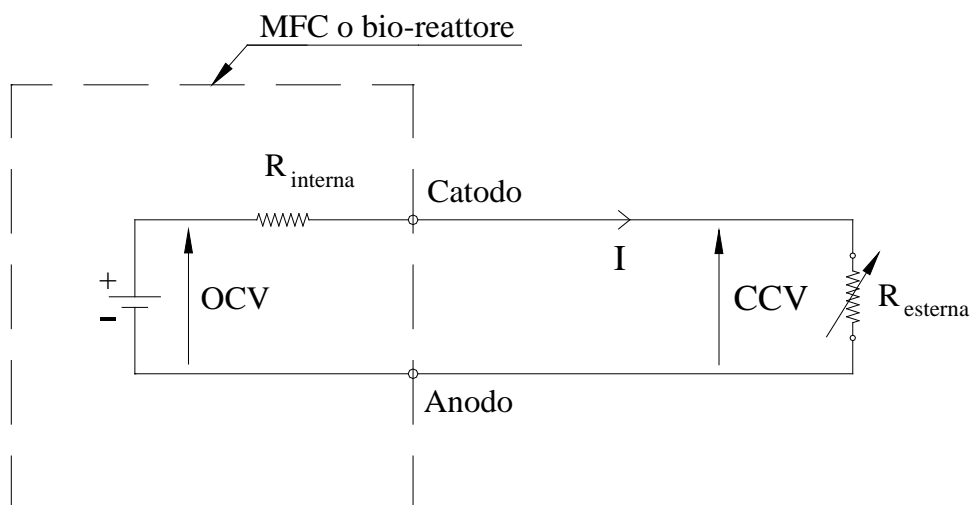


Figura 257 - Schema circuitale di una MFC e del bio-reattore.



la massima potenza prodotta da una MFC e trasferita al carico, si ricava dall'espressione:

$$P_{\max} = R_{\text{est}} \cdot I^2 = R_{\text{est}} \cdot \left( \frac{\text{OCV}}{R_{\text{int}} + R_{\text{est}}} \right)^2$$

e la tensione CCV ai capi della  $R_{\text{est}}$  può essere espressa in funzione delle altre grandezze:

$$\begin{cases} \text{CCV} = \text{OCV} - R_{\text{int}} \cdot I \\ \text{CCV} = R_{\text{est}} \cdot I \end{cases}$$

La potenza (P) trasferita al carico esterno  $R_{\text{est}}$  vale:

$$P = R_{\text{est}} \cdot I^2 = \text{CCV} \cdot I = (\text{OCV} - R_{\text{int}} \cdot I) \cdot I = \text{OCV} \cdot I - R_{\text{int}} \cdot I^2$$

la corrente  $\hat{I}$  per la quale la potenza trasferita è massima si ottiene derivando la formula della P, sopra scritta, per la variabile I e cioè:

$$\frac{dP}{dI} = 0$$

ed eseguendo la derivata della P, rispetto alla I della relazione precedente si ottiene:

$$\frac{dP}{dI} = \text{OCV} - 2 \cdot R_{\text{int}} \cdot \hat{I} = 0$$

e dalla espressione seguente si ricava la  $\hat{I}$ :

$$\hat{I} = \frac{\text{OCV}}{2 \cdot R_{\text{int}}}$$

e dunque si ha il massimo trasferimento di potenza quando la resistenza del carico uguaglia la resistenza interna della MFC:

$$R_{\text{est}} = R_{\text{int}}$$

e da quest'ultima equazione si può ricavare che la potenza massima del sistema generatore si ha quando la resistenza esterna  $R_{\text{est}}$ , assume lo stesso valore della resistenza interna  $R_{\text{int}}$ ; la potenza massima allora risulta:

$$P_{\max} = R_{\text{est}} \cdot \left( \frac{\text{OCV}}{2 \cdot R_{\text{est}}} \right)^2 = \frac{\text{OCV}^2}{4 \cdot R_{\text{est}}}$$

Diminuendo la resistenza interna della cella aumenta la potenza utile generata da una MFC per compiere un lavoro, quella che andrà ad alimentare il carico esterno  $R_{\text{est}}$ .

La potenza prodotta da una MFC può essere calcolata, nel nostro caso, utilizzando il valore della CCV come:

$$P = \frac{\text{CCV}^2}{R_{\text{est}}}$$

In una MFC e anche nel caso del bio-reattore, la curva di polarizzazione rappresenta l'andamento della tensione CCV in funzione della corrente circolante  $I$  nel circuito, con il valore della OCV coincidente con quello per  $I=0$ ; la curva di potenza rappresenta l'andamento della potenza prodotta  $P$ , al variare della corrente erogata  $I$  verso il carico esterno, in pratica una  $R_{est}$ . Per la misura di queste grandezze elettriche si è impiegato il metodo voltamperometrico, cioè la potenza erogata dalla MFC o dal bio-reattore, in corrente continua, è stata ottenuta misurando separatamente la tensione esistente ai capi della  $R_{est}$ , cioè la CCV e la corrente  $I$  che la percorre; la determinazione della tensione CCV e della corrente  $I$  viene eseguita rispettivamente con un voltmetro  $V$  collegato in derivazione sul tratto di circuito ai capi della  $R_{est}$ , e con un amperometro  $A$  in serie; all'atto pratico il voltmetro è stato derivato a valle dell'amperometro, seguendo lo schema dei collegamenti riportato in figura 258:

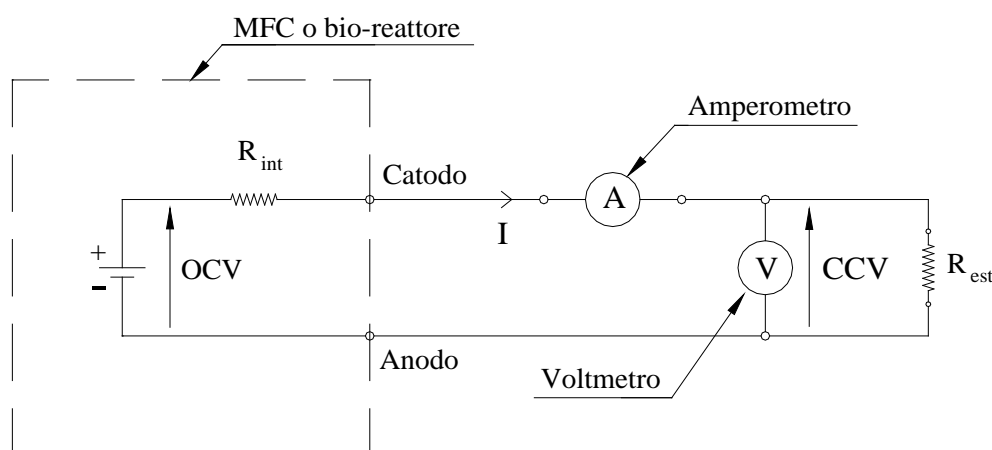


Figura 258 - Schema impiegato per la misura delle grandezze elettriche del bio-reattore. Questo è lo schema maggiormente adatto per la misura di tensione bassa e corrente elevata.

È stato provveduto ad eseguire le curve di potenza e di polarizzazione del bio-reattore, utilizzando il metodo della resistenza esterna variabile che ha visto l'impiego delle stazioni di misura, di nostra realizzazione, che ci consentono di variare la resistenza esterna, cioè il carico su cui viene erogata la potenza elettrica dal bio-reattore; il giorno 174 della misura sul bio-reattore sono state effettuate le misure delle grandezze elettriche necessarie per rilevare le curve di potenza e di polarizzazione e con l'uso del multimetro digitale FLUKE 87V, con la cassetta di resistenze variabili è stato applicato il metodo del picco delle densità di potenza; sulla base delle sole componenti resistive, la massima potenza generata dal bio-reattore disponibile per alimentare un carico esterno è generata quando la resistenza esterna del carico uguaglia la resistenza ohmica interna del bio-reattore.

Lo schema dei collegamenti per realizzare la curva di polarizzazione e di potenza del bio-reattore è quello schematizzato in figura 259:

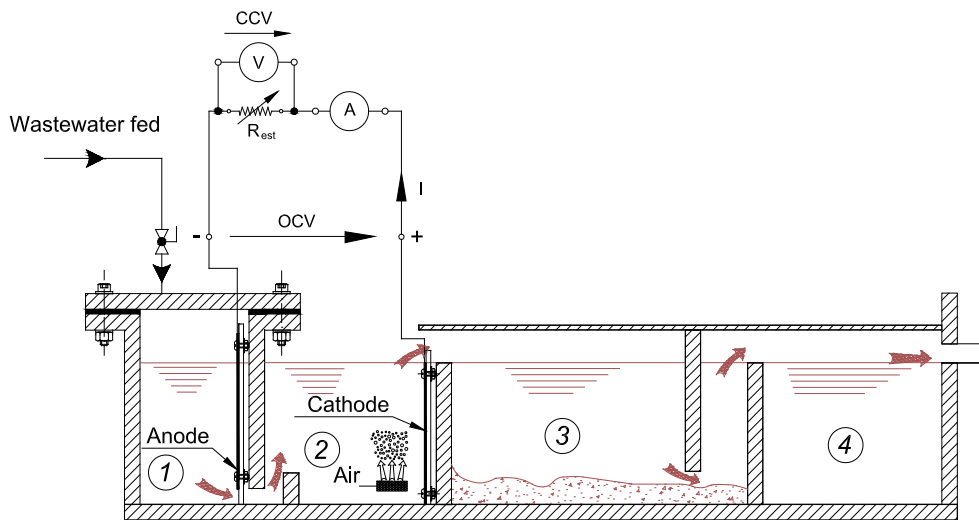


Figura 259 - Schema dei collegamenti del bio-reattore per la rilevazione della curva di potenza e di polarizzazione.

L'intervallo di valori nei quali si è fatta variare la  $R_{est}$  è stato da 0 a 4000  $\Omega$ , mentre per la determinazione della OCV si è lasciato il circuito elettrico esterno aperto per 24 ore; il giorno scelto della misura è caduto in un periodo nel quale il bio-reattore stava funzionando in condizioni di regime e l'alimentazione, per tutta la durata della misura, è stata interrotta per far sì che tutti i valori facessero parte di un singolo ciclo di alimentazione e comunque quando la concentrazione di substrato non era diminuita in maniera tale da influenzare significativamente la generazione di potenza; sono stati determinati 24 punti e l'intervallo di tempo fra loro non è stato preso costante, bensì ogni volta si è atteso che il sistema raggiungesse le condizioni di equilibrio, e questo è stato ottenuto andando a rilevare solo i valori dopo che diventavano stabili, per ogni valore di carico esterno applicato.

Al variare della resistenza esterna, si è determinato il picco di potenza, che è quello per il quale si ha una  $R_{int}=R_{est}$ , e con gli stessi valori della CCV e della I è stata calcolata la potenza P e la curva che si è ottenuta è quella riportata in figura 260; in figura 261 è riportata la curva ricavata dalla teoria dell'adattamento di potenza del bio-reattore, che in ascissa presenta i diversi valori della Rest applicati come carico esterno, variabile:

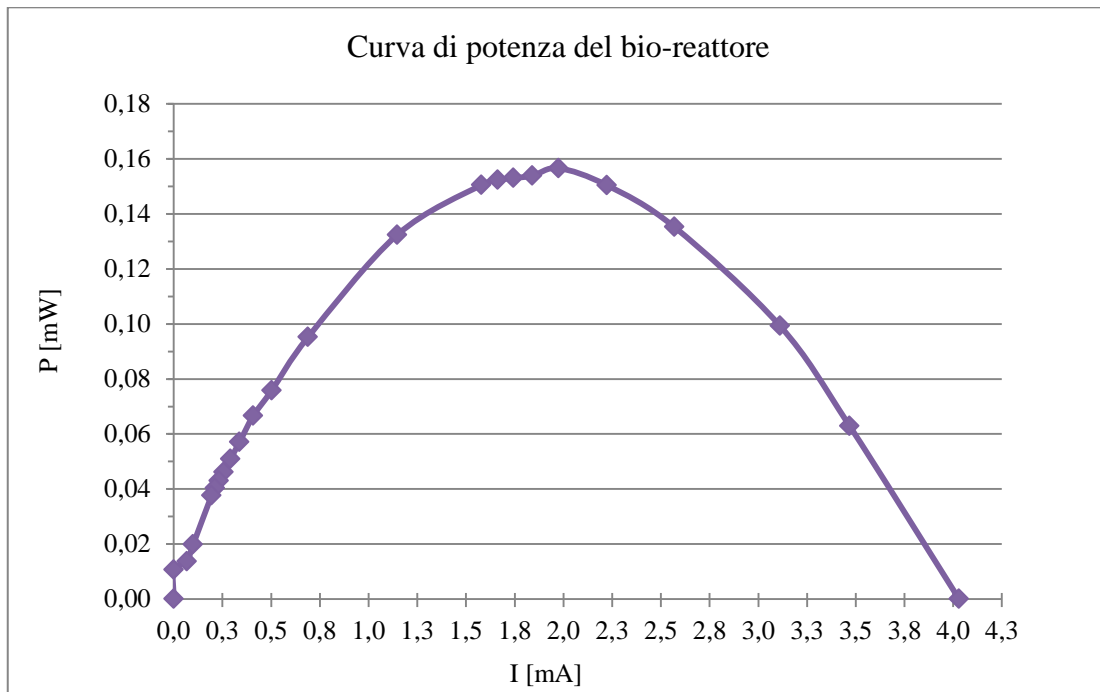


Figura 260 - Curva di potenza del bio-reattore.

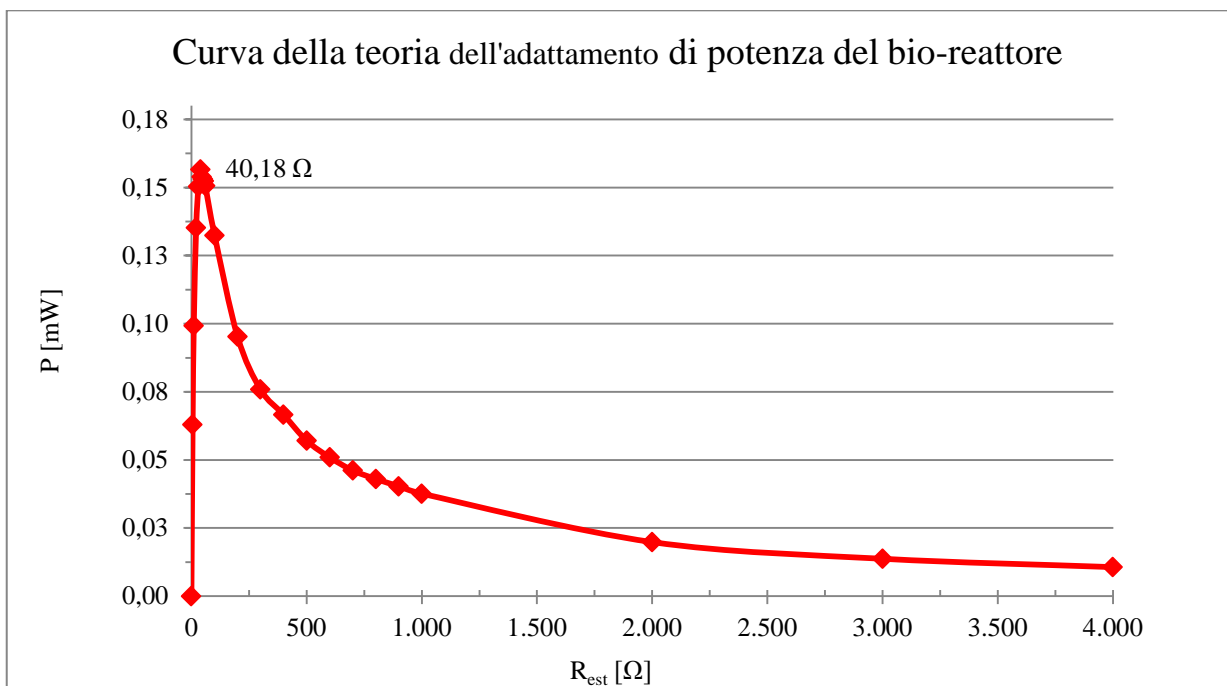


Figura 261 - Curva della potenza erogata dal bio-reattore in funzione del valore della resistenza ohmica  $R_{est}$  applicata sul circuito esterno, rilevata il giorno 174 della misura.

La curva di polarizzazione rappresenta l'andamento della tensione CCV in funzione della corrente circolante  $I$  nel circuito, con il valore della OCV coincidente con quello per  $I=0$ ; dalla pendenza della curva di polarizzazione nella regione in cui la tensione ai capi della  $R_{est}$  è funzione quasi lineare dei valori della corrente si può stimare un valore di resistenza interna del

bio-reattore pari alla pendenza della retta assimilando, in prima approssimazione, che tutti i contributi alla caduta di tensione siano resistenze ohmiche. In figura 262 è riportata la curva di polarizzazione del bio-reattore, rilevata il giorno 174 delle misure dalla quale si evince che le perdite per attivazione e per concentrazione sono contenute; dall'interpolazione del tratto lineare della curva di polarizzazione possiamo calcolare il valore della  $R_{int}$  e risulta di  $42,773 \Omega$  e questo valore è non molto differente da quello calcolato, precedentemente, con il metodo del picco delle densità di potenza.

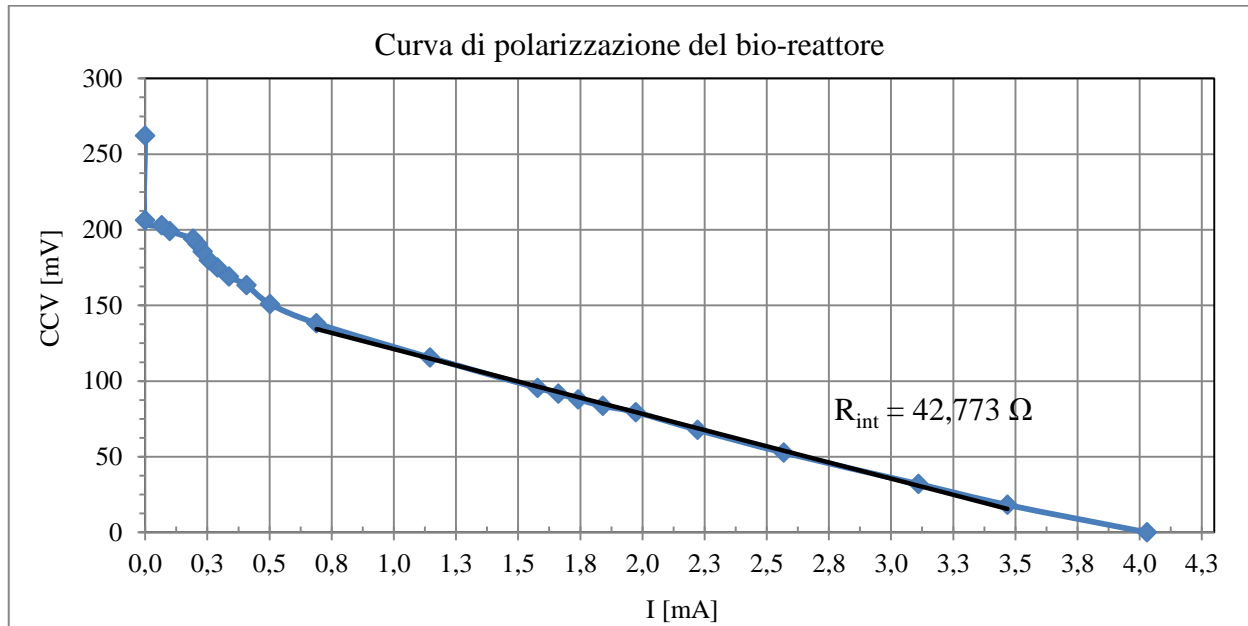


Figura 262 - Curva di polarizzazione del bio-reattore.

I dati rilevati il giorno 174 delle misure sono stati messi a confronto con gli stessi dati rilevati in precedenza, esattamente il giorno 161 delle misure; il bio-reattore necessitava in quei giorni dello spurgo dalla camera C1, in particolare nel canale di separazione con la camera A e nonostante sia stato effettuato uno spurgo di 30 ml si sono manifestate delle condizioni simili a quelle del “power overshoot”, che sono ben evidenziate dalle curve di potenza e di polarizzazione eseguite quel giorno; ancor più interessante è il dato rilevato nella curva ottenuta con la teoria dell'adattamento di potenza che ci fornisce un valore della resistenza interna elevato, dovuto proprio all'ostruzione della circolazione delle cariche elettriche causata dal fango che si è depositato ed il valore è circa 10 volte maggiore di quello a cui si è riusciti a giungere dopo poco tempo; una spiegazione di questo fenomeno non è disponibile in letteratura, ed è stato studiato [121] che il power overshoot si manifesta quando il biofilm è inabilitato a produrre correnti elevate; con l'attenzione all'anodo si avrà il power overshoot per la mancanza di ETC, cioè i trasportatori di elettroni dei batteri; i trasportatori di elettroni sono, per definizione, i

composti chimici organici ed inorganici usati per trasportare gli elettroni all'accettore finale degli elettroni, e così gli ETC includono le componenti interne ed esterne della cella e possono essere collegati alla cellula o liberi in soluzione; essi convogliano all'anodo gli elettroni che si ottengono dall'ossidazione del substrato. Si può intendere il power overshoot come una diminuzione dell'elettro-attività del biofilm anodico, per valori bassi della resistenza esterna, cioè per valori elevati della corrente prodotta; come si vede dal grafico la resistenza interna aumenta, in presenza di power overshoot:

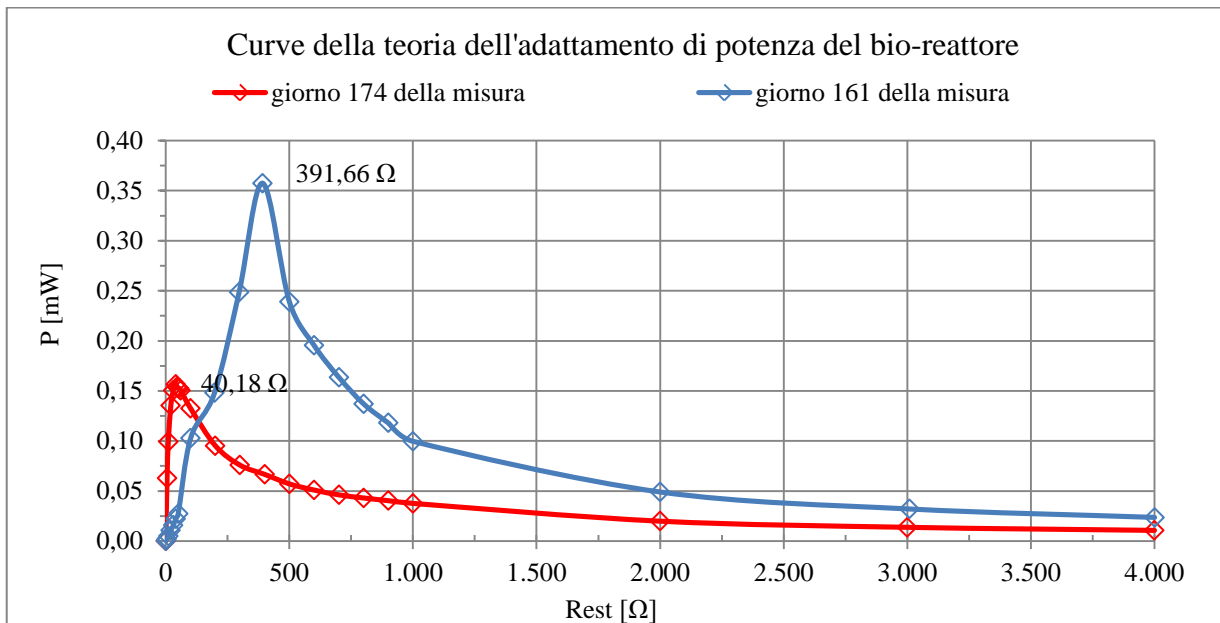


Figura 263 - Curve della potenza elettrica prodotta del bio-reattore, al variare della resistenza esterna.

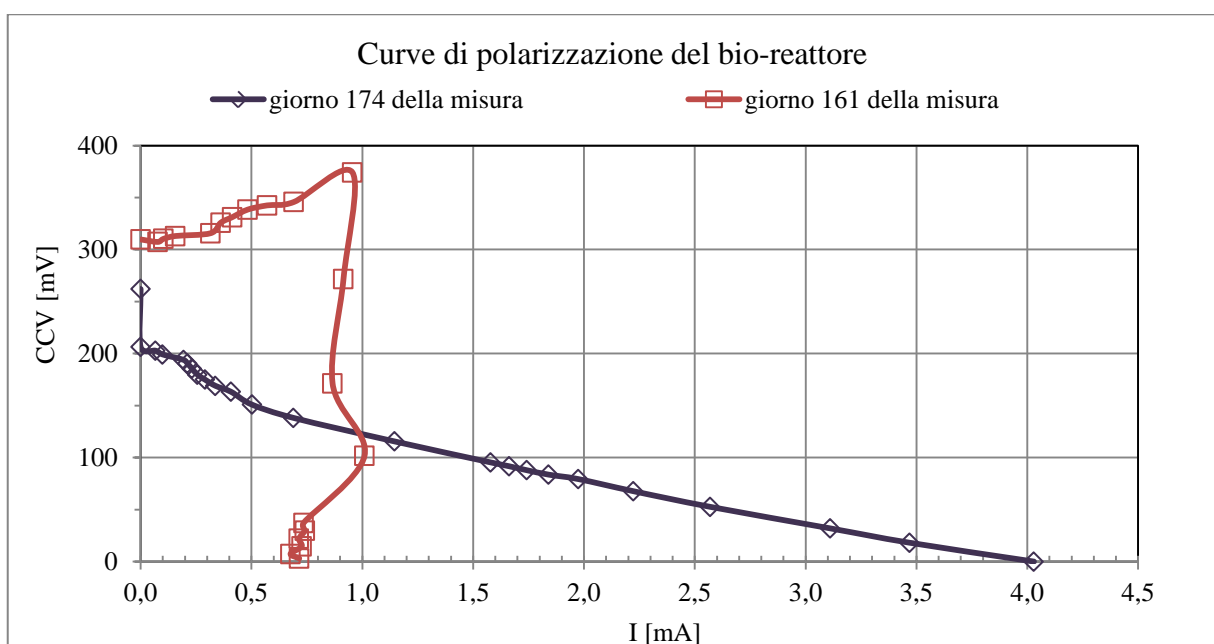


Figura 264 - Curve di polarizzazione del bio-reattore.

Se si fossero eseguite anche delle CV lo stesso giorno della misura, avremmo trovato, probabilmente, dei valori elevati delle derivate della corrente prodotta rispetto al potenziale applicato, cioè la  $I' = dI/dE = f(E)$ , per quei valori di  $I'$  ed  $E$  in cui l'attività degli ETC andava diminuendo. La diminuzione dell'attività batterica del biofilm e la diminuzione della corrente massima prodotta si potrebbe generare dal suo substrato o dai limiti causati dai trasportatori di elettroni; la mancanza di ETC potrebbe essere causata dalla scarsa biomassa, dalle diversità nella comunità microbica o dall'uso di percorsi di trasferimento degli elettroni differenti.

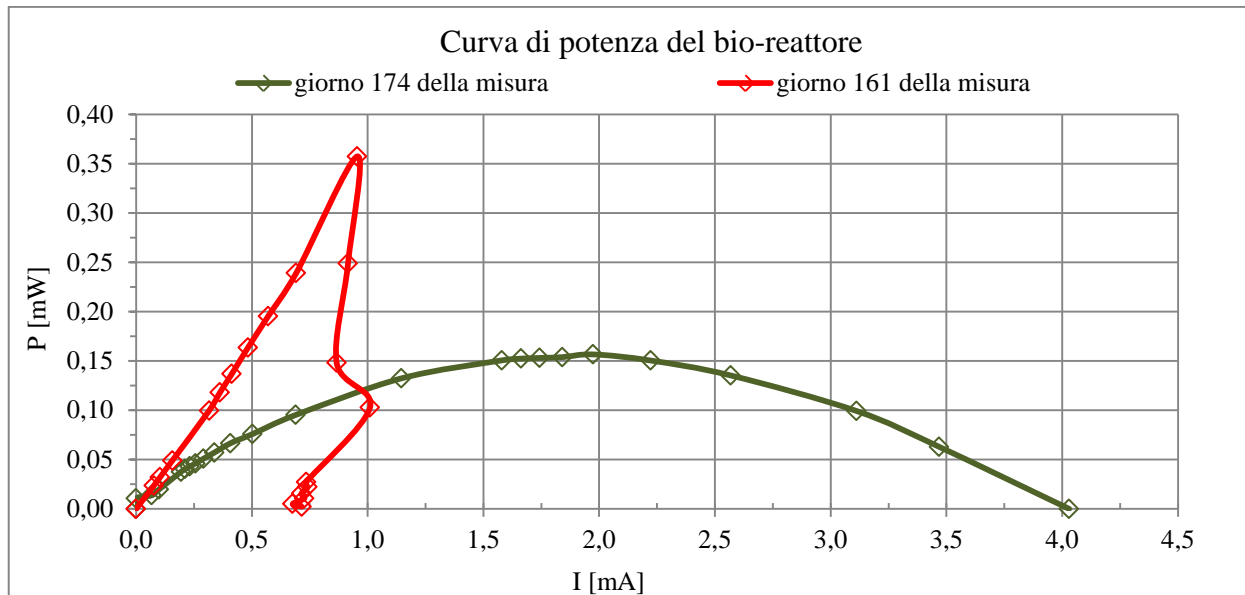


Figura 265 - Curve di potenza del bi-reattore, al giorno 161 e al 174 di funzionamento.

Le prestazioni delle MFC nel trattamento delle acque reflue richiederà un energico consorzio di colture microbiche miste. Quando vengono considerate come applicazioni pratiche, la regione dell'overshoot è una che deve indubbiamente essere evitata, dal momento che induce una minore prestazione. Tuttavia, esso è un fenomeno che dovrebbe essere perseguito nell'approccio dell'analisi dei sistemi, allo scopo di svelare future conoscenze su come molti modi di funzionamento dannosi potrebbero essere evitati. Il comportamento della dinamica della OCV e l'effetto seguente sulla resistenza interna è un'altra area che richiede future investigazioni.

I fattori responsabili della bassa efficienza coulombica, osservabili specialmente durante il trattamento delle acque reflue reali, sono principalmente i seguenti:

- intrappolamento e accumulo nel biofilm anodico di particelle organiche presenti nelle acque di scarico;
- produzione di metano;
- perdite in termini di efficienza a causa del fabbisogno energetico per sostenere le comunità fermentative e acetogene nella catena alimentare anodica;

- diffusione verso l'anodo dell'ossigeno, accettore terminale di elettroni.

Altri fattori potrebbero contribuire ad abbassare l'efficienza coulombica:

- presenza nelle acque di scarico di altri accettori terminali quali nitrati, Fe (III) solubile e solfato;
- fabbisogno energetico dei batteri elettrogeni per sostenere il loro metabolismo e la biosintesi;
- fuga di prodotti gassosi come l'idrogeno.

L'efficienza coulombica per il trattamento delle acque reflue reali realizzata con le MFC può essere migliorata antepoendo alle MFC, serbatoi di pre-acidificazione.

La pre-acidificazione delle acque di scarico potrebbe ridurre lo spessore del biofilm che si forma sull'elettrodo anodico, subordinando l'attività di agenti fermentativi a crescita rapida ad una maggiore attività da parte di batteri elettrogeni a crescita lenta, analogamente a quanto avviene nei digestori anaerobici.

La formazione di un biofilm sottile ridurrebbe la possibilità di proteggere i batteri metanigeni limitando la generazione di metano.

### 7.8.3 Gli spurghi nelle camere del bio-reattore

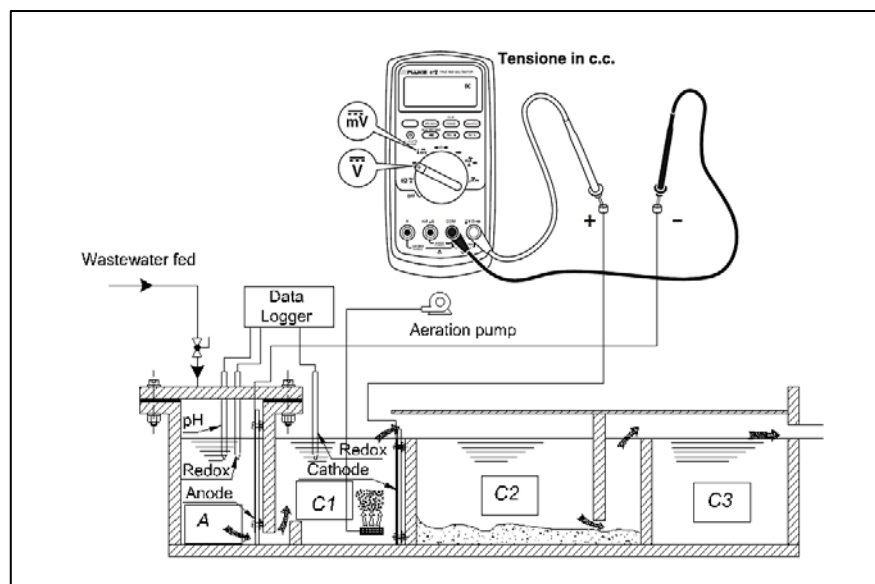
La manutenzione sul bio-reattore è stata quotidiana ed ha comportato il controllo del quantitativo di aria nella camera catodica C1 e l'esecuzione di spurgo di digestato da tutte le camere del bio-reattore, a cui seguiva anche la verifica della anaerobiosi nella camera anodica A; tutte queste operazioni hanno sempre avuto una certa influenza sulla corrente prodotta ed in generale su tutte le grandezze elettriche del bio-reattore. Le operazioni suddette erano già state programmate in fase di progettazione del bio-reattore e la loro esecuzione è avvenuta dopo aver valutato il reale funzionamento e l'andamento delle grandezze elettriche. La principale grandezza che è stata monitorata è la tensione a circuito aperto, denominata OCV che è stata rilevata misurando la differenza di potenziale fra i due elettrodi della camera anodica, A e quella catodica C1 e fornisce indicazioni sull'attività batterica presente in quel momento nel bio-reattore; gli strumenti che sono stati impiegati per questa misura sono due e cioè un multimetro digitale FLUKE modello 87V, a vero valore efficace che è di tipo industriale, con modalità normale a 3 ½ cifre e offre pregevoli funzioni; l'impiego ha comportato l'uso della funzione di indicazione relativa (REL  $\Delta$ ) per compensare uno scarto accidentale, nel quale il multimetro azzerava il display e memorizza la lettura corrente come valore di riferimento per le letture successive ed inoltre è stato impostato nella modalità di alta risoluzione (HiRes) che consiste ad una modalità a 4 ½ cifre, cioè in alta risoluzione di 10 volte superiore a quella normale e quindi con una precisione maggiore; nella figura 266 è riportata una immagine dello strumento:





*Figura 266 - Immagine del multimetro FLUKE 87V True-rms Digital Multimeters.*

Questa misura prevede il circuito elettrico esterno aperto, in pratica occorre scollegare la resistenza elettrica esterna, che costituisce il carico, a film metallico e andare a collegare i terminali del multimetro ai fili di collegamento dei due elettrodi del bio-reattore, con il vincolo di rispettare le polarità cioè considerando l'elettrodo catodico a potenziale maggiore di quello anodico e quindi collegandolo al terminale del cavetto contrassegnato dal segno “+” alla porta” generalmente di colore rosso, mentre il terminale dell'altro cavetto contrassegnato dal segno “-” andrà collegato all'altra porta, generalmente di colore nero; una raffigurazione di come è stato allestito il circuito di misura è quello riportato nella figura 267 seguente:



*Figura 267 - Schema dei collegamenti per la misura della OCV sul bio-reattore.*

La misurazione è stata effettuata nei frangenti nei quali il regime di funzionamento era in condizioni stazionarie, e cioè prima di alimentare con il substrato e prima di eseguire qualsiasi operazione di manutenzione ma l'unico vincolo era quello di accertarsi dell'efficienza dei

collegamenti elettrici dei fili di titanio sui rispettivi elettrodi immersi nelle camere del bio-reattore; così facendo i dati rilevati in ciascuna misurazione presentavano una discreta stabilità e si è assistito al raggiungimento di valori costanti in pochi minuti; il tempo della misura risultava così non molto elevato e non tale da perturbare le condizioni di funzionamento del bio-reattore, rendendolo idoneo anche alle analisi chimiche susseguenti.

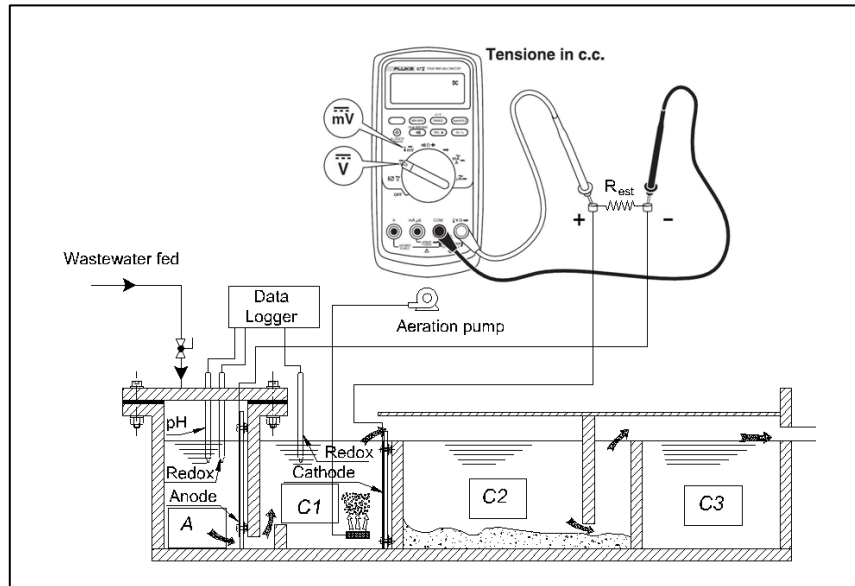


Figura 268 - Schema dei collegamenti per la misura della CCV sul bio-reattore.

Il giorno 77 è stato eseguito lo spurgo della camera anodica A del bio-reattore, a causa degli andamenti fortemente decrescenti dei valori della OCV, della CCV e della corrente I generata; è stata eseguita anche l'asportazione della sostanza adesa non elettroattiva dall'elettrodo anodico e questo ha portato a notevoli aumenti della quantità di corrente generata, ed i valori assoluti sono riportati in figura 269:

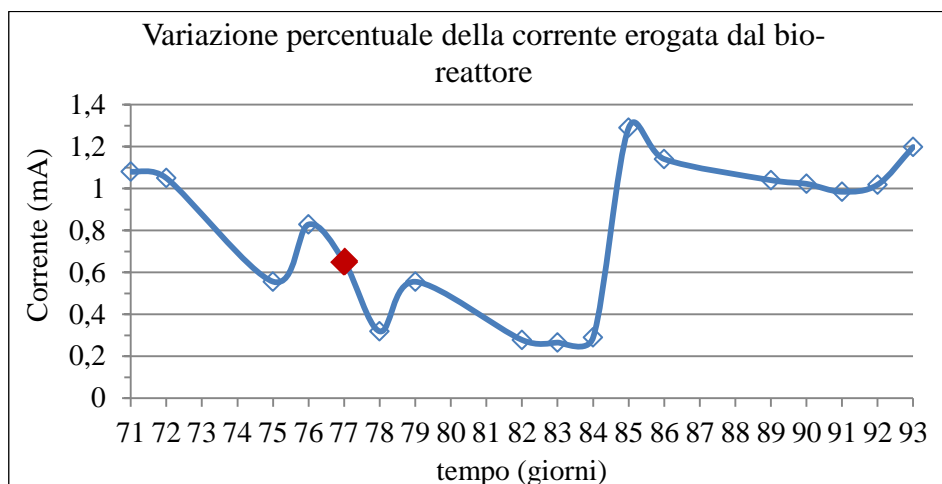


Figura 269 - Andamento della corrente generata dal bio-reattore, i seguito all'asportazione dall'elettrodo anodico della sostanza adesa non elettroattiva.

il giorno 77 è stata eseguita l'operazione di spurgo e pulizia e già dopo 7 giorni si è assistito ad un aumento del 97,76% del valore della corrente generata, rispetto al valore della I misurato il giorno stesso della pulizia.

Nelle figure da 270 a 273 vengono riportati i grafici che vogliono esplicitare il funzionamento del bio-reattore:

- Figura 270 - Potenziale a circuito aperto OCV, del bio-reattore misurati con il multimetro FLUKE 87V e con il potenziostato VSP ed insieme con le operazioni di pulizia e sostituzione dei diffusori nel bio-reattore.
- Figura 271 - Potenziale di semicella catodica C1 del reattore, Ece con il potenziostato VSP, insieme con le operazioni di pulizia e sostituzione dei diffusori nel reattore ed inoltre lo spurgo del digestato.
- Figura 272 - Corrente erogata dal bio-reattore insieme con le operazioni di pulizia e sostituzione dei diffusorie e l'insufflaggio di azoto nella camera anodica del bio-reattore.
- Figura 273 - Potenziale redox della semicella anodica A del reattore, Ewe insieme con le quantità degli spurghi di digestato e l'insufflaggio di azoto nel reattore.

Nella figura 270 si evidenzia come il continuo aumento del numero dei diffusori nella camera C1, sino ad un valore massimo di 13, ha comportato un consistente aumento della quantità di ossigeno, grazie alle operazioni di sostituzione o di pulizia degli stessi, che però solo in parte sono riusciti ad accrescere il valore della OCV. Dalla figura 271 si vede come le operazioni di manutenzione dei diffusori hanno molto contribuito a mantenere stabilizzare i valori del potenziale di semicella catodica Ece, che è stato necessario accompagnare anche con le operazioni di spurgo dalla camera C1. Nella figura 272 si evidenzia come l'insufflaggio dell'azoto nella camera anodica abbia portato ad un aumento della corrente elettrica prodotta, ognuna delle 3 volte nella quale è stata effettuata, nel giorno 5, 78 e 180 dei giorni della misura.

Nella figura 273 si vede come la potenza prodotta possa venire incrementata con gli spurghi di materiale sedimentato, in particolar modo dalla camera catodica C2, ed in minor misura anche dalla camera catodica C1 mentre il dato riferito al quantitativo dello spurgo di digestato dalla camera anodica A (riportato nel quadrato di colore rosso) non ha prodotto un consistente aumento della potenza, anche perché modesto e mirato all'asportazione di sostanza non elettroattiva sulla superficie dell'elettrodo.

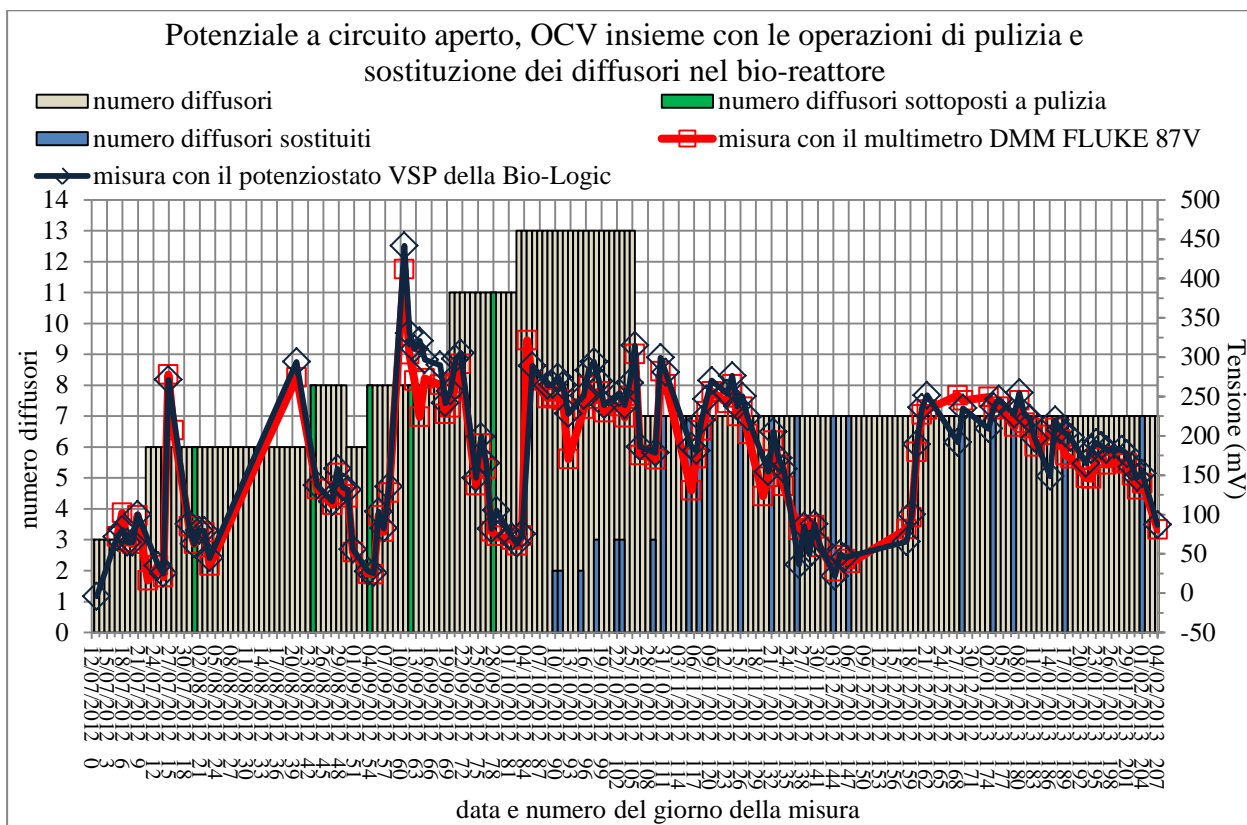


Figura 270 - Potenziale a circuito aperto OCV, del bio-reattore misurati con il multimetro FLUKE 87V e con il potenziostato VSP ed insieme con le operazioni di pulizia e sostituzione dei diffusori nel bio-reattore.

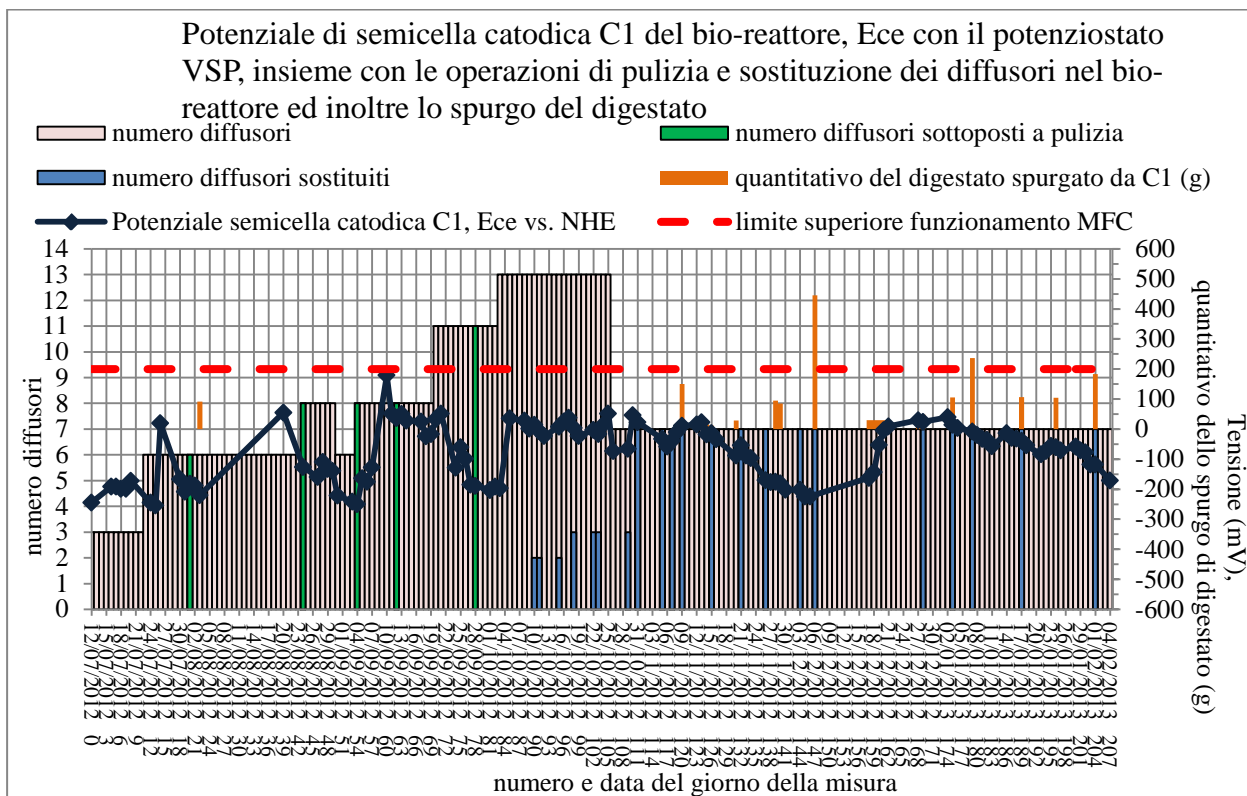


Figura 271 - Potenziale di semicella catodica C1 del reattore, Ece con il potenziostato VSP, insieme con le operazioni di pulizia e sostituzione dei diffusori nel reattore ed inoltre lo spurgo del digestato.

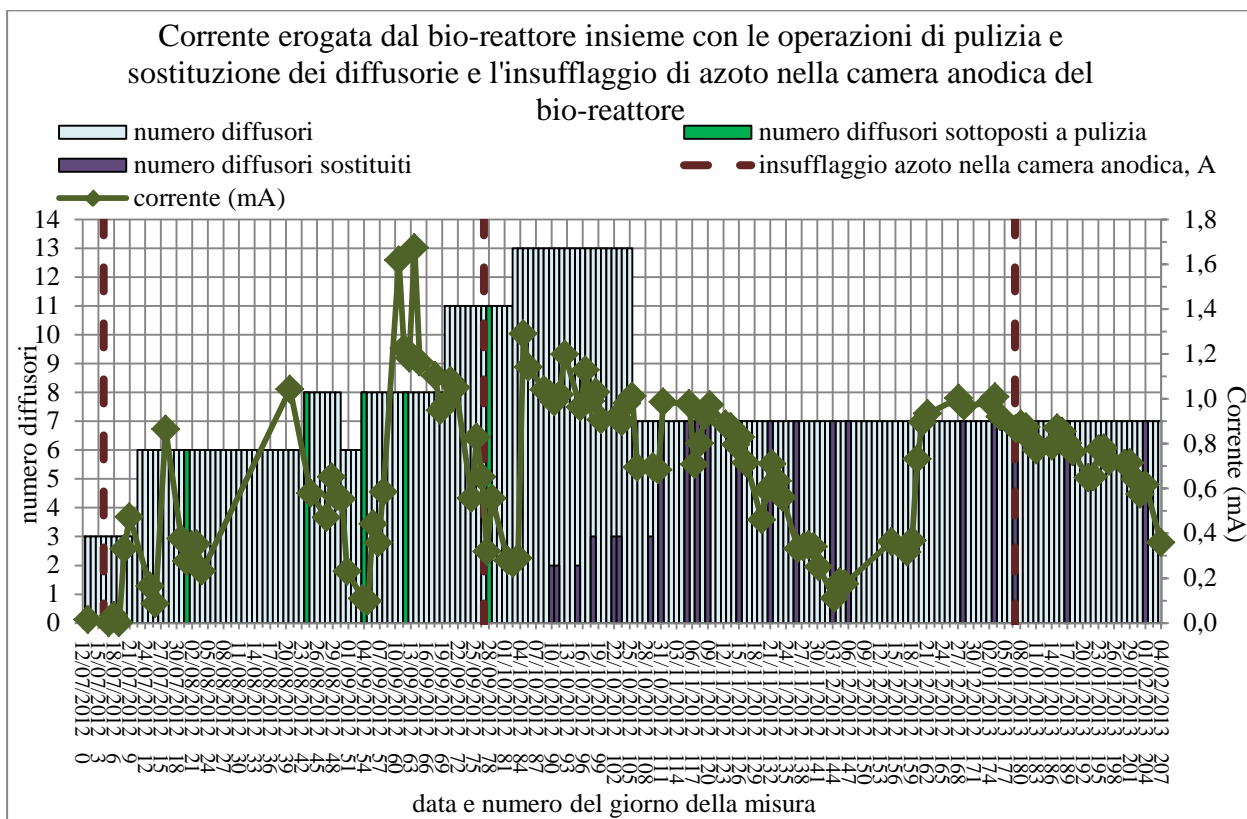


Figura 272 - Corrente erogata dal bio-reattore insieme con le operazioni di pulizia e sostituzione dei diffusorie e l'insufflaggio di azoto nella camera anodica del bio-reattore.

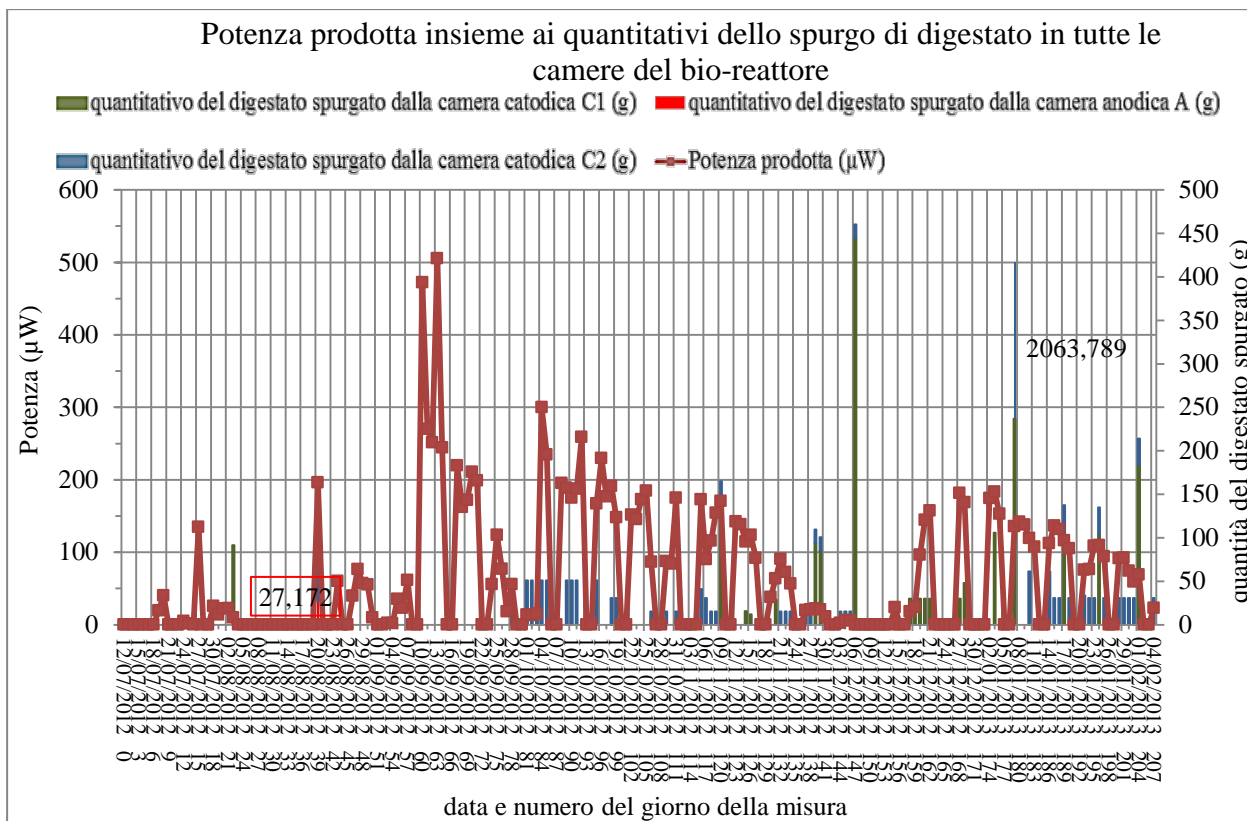


Figura 273 - Potenziale redox della semicella anodica A del reattore, Ewe insieme con le quantità degli spurghi di digestato e l'insufflaggio di azoto nel reattore.

Viene riportata una sintesi delle cause e degli effetti del funzionamento del bio-reattore, che è stato potuto possibile dedurre dalla pratica di funzionamento e come è possibile dedurre dai dati riportati nei grafici:

- 1) per aumentare la OCV, bisogna aumentare la quantità di ossigeno in C1, con la pulizia dei diffusori o aumentandone il numero; nonché avere una buona anaerobiosi in A;
- 2) per aumentare la corrente erogata I, la potenza prodotta P bisogna avere libera la camera C1, in particolare evitare l'accumulo di solidi e fanghi nella fessura di comunicazione fra la camera A e la C1; nonché avere una buona anaerobiosi in A;
- 3) per avere lo scarico del bio-reattore ed agevolare la rimozione dell'azoto, occorre spurgare la camera C2, al punto di avere minor fango possibile.

Per consentire un funzionamento continuo del bio-reattore occorre avere minor quantità di solido possibile con un fango liquido, poco pastoso;

Quando il tempo di ritenzione della parte solida dei fanghi nella camera anodica è troppo lungo, sono i batteri metanigeni, a lenta crescita, che riescono a svilupparsi adeguatamente e questo riduce l'attività del processo di rimozione e della produzione di potenza elettrica.

Bisogna evitare e rimuovere meccanicamente, il più possibile che può essere consentito, la crosta che si forma sulla superficie della camera anodica A ed avere anche depositi ed incrostazioni di fango nelle camere C2 e C3 minimi.

La miscelazione dei fanghi permette il più efficiente svolgimento delle reazioni biologiche, in tutto lo spazio occupato dal fango, migliorando inoltre la stabilità del processo di rimozione; la miscelazione nella camera anodica A è avvenuta anche con insufflazione di gas, effettuata con un tubo di silicone immerso nel di gestore fino ad una certa profondità.

#### 7.8.4 Le voltammetrie cicliche del bio-reattore

Queste sono le prime CV del bio-reattore, eseguite il giorno 14 della misura, quando c'era poco ossigeno al catodo C1:

la prima è la voltammetria ciclica fra A e C1, con l'elettrodo di riferimento Ref nella camera anodica A, a 1 mV e con scan rate di 1 mV/s:

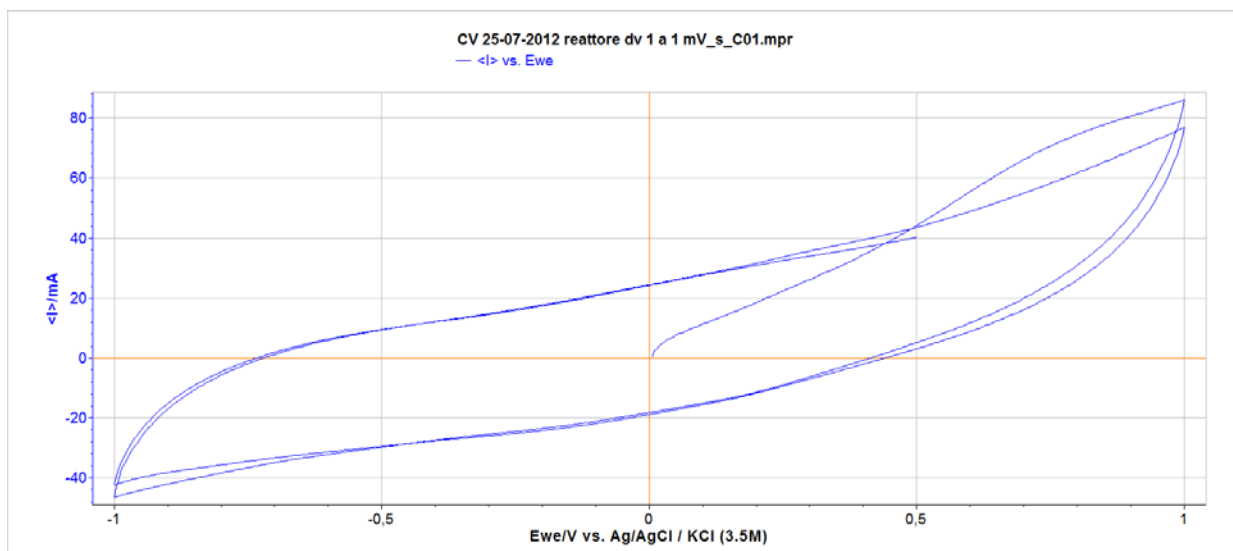


Figura 274 - CV del bio-reattore il giorno 14 di funzionamento.

la seconda è la voltammetria ciclica fra A e C1, con il Ref in A, a 0,5 mV e con scan rate di 10 mV/s:

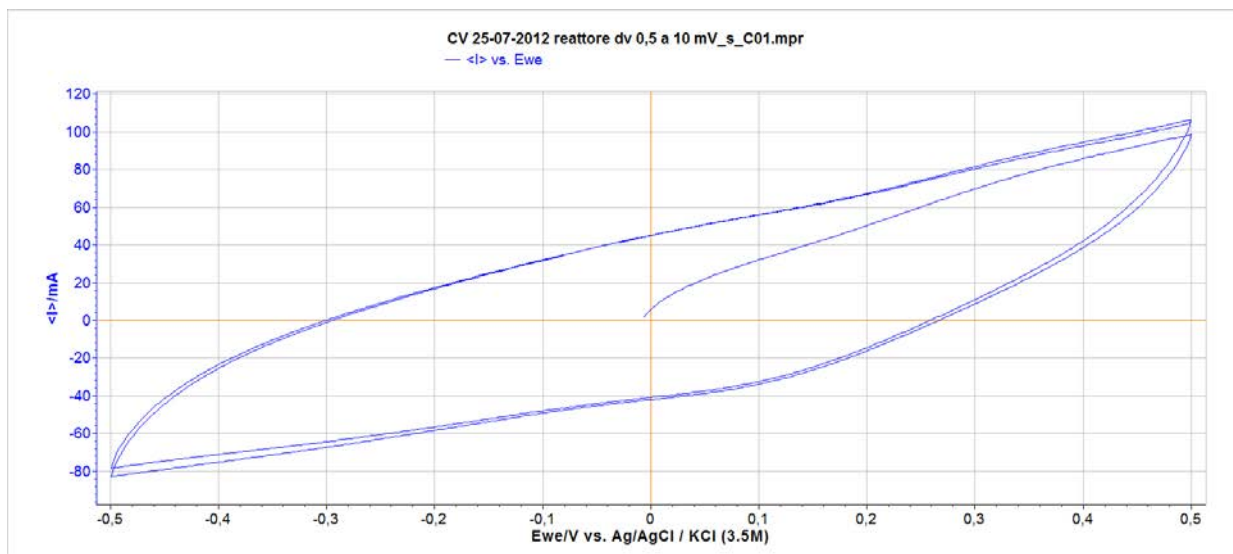


Figura 275 - CV del bio-reattore il giorno 14 di funzionamento.

infine il terzo voltammogramma è della voltammetria ciclica fra A e C1, con il Ref in A, a 1 mV e con scan rate di 20 mV/s:

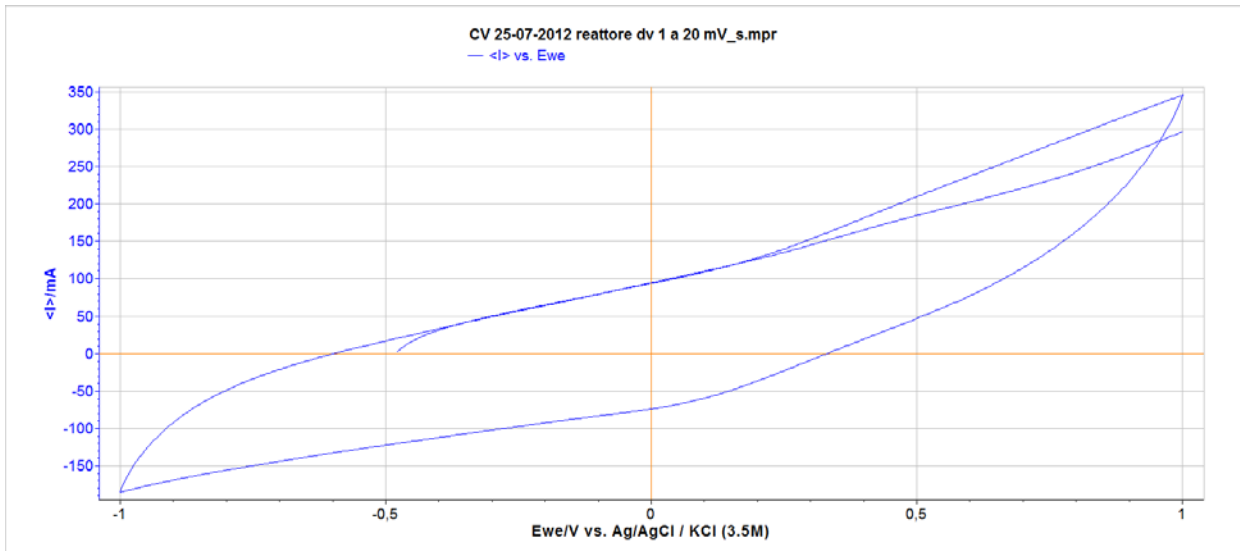


Figura 276 - CV del bio-reattore il giorno 14 di funzionamento.

Il giorno 145 della misura è stata di nuovo eseguita la voltammetria ciclica

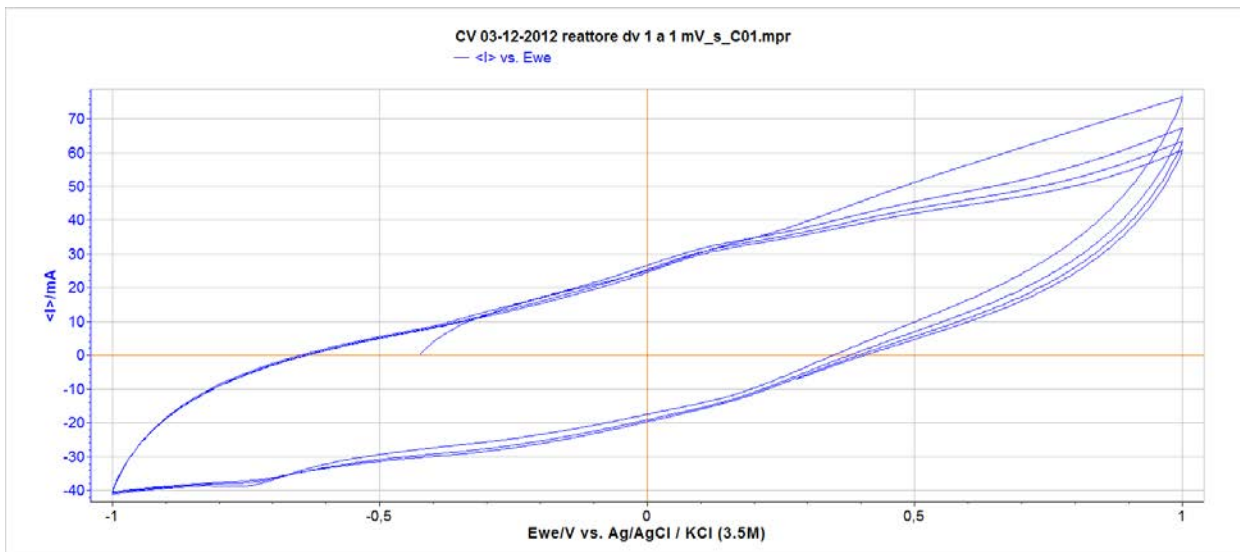


Figura 277 - CV del bio-reattore il giorno 145 di funzionamento.



## Conclusioni

Lo studio ha avuto come obiettivo la verifica della fattibilità industriale del repowering di impianti per il trattamento e la valorizzazione energetica di reflui mediante celle a combustibile microbiologiche (microbial fuel cells, MFCs) realizzate senza mediatori e senza membrana.

Da questo studio si sono ottenute indicazioni sulla realizzabilità industriale e sulla convenienza tecnica-economica di impianti MFC impiegati sia in repowering di impianti di valorizzazione energetica esistenti, che stand-alone. Attraverso l'analisi dei risultati ottenuti in laboratorio, su dei modelli e su di un impianto in scala pre-industriale, sono state stimate, qualitativamente e quantitativamente, le potenzialità di questa tecnologia rispetto alla riduzione del carico inquinante, alla produzione di energia elettrica ed all'ottenimento di un residuo finale compatibile con un suo possibile uso come ammendante di terreni agricoli.

Ho iniziato la mia attività con una approfondita rassegna bibliografica finalizzata a definire il quadro complessivo delle ricerche sulle celle a combustibile microbiche, con particolare riferimento alle loro potenzialità d'impiego in campo ambientale e energetico. Nonostante le MFC siano un dispositivo di recente ideazione, la letteratura nel settore è molto vasta ed è prevalentemente orientata verso l'ottimizzazione del funzionamento delle celle (migliorare il design, ridurre le barriere elettrochimiche, facilitare il flusso di elettroni e protoni, definire la superficie ottimale per lo sviluppo di un biofilm elettrogenico, i materiali impiegati per la loro realizzazione ed i set up adatti ad impieghi su scala industriale). Meno numerosi sono invece gli studi legati alla comprensione dei processi microbiologici che rendono attive le MFC ed alla caratterizzazione delle comunità di batteri elettrogenici.

Nel Laboratorio di Tecnologia e Chimica Applicata alla tutela dell'ambiente del Dipartimento di Ingegneria Chimica, ho partecipato alla realizzazione di nuove MFC monocamera e bicamera con ceppo batterico *Geobacter sulfurreducens*, provvedendo al reperimento dei componenti necessari (connettori, fogli di grafite, conduttori per i collegamenti elettrici, resistenze elettriche a film metallico) ed al loro assemblaggio. Ho quindi partecipato alla definizione dei processi bio-elettrochimici che poi sono stati verificati sperimentalmente nelle MFC durante gli 84 giorni della prova. Dopo la realizzazione delle MFC in batch è stato necessario verificare l'efficienza e l'efficacia dei processi bio-elettrochimici, in particolare quelli anaerobici e delle quantità di

ossigeno che rendessero ottimale il processo dell'elettron-accettore al catodo. Ho effettuato giornalmente la misura diretta con metodo voltamperometrico di tutte le grandezze elettriche delle dieci MFC realizzate, ed ho anche elaborato i dati rilevati necessari alla caratterizzazione di ciascuna MFC, effettuando anche un'accurata analisi degli errori stante i piccoli valori delle grandezze elettro-chimiche.

Questa configurazione delle MFC ha consentito una considerevole rimozione dei nitrati, ed in tutte le tipologie di microbial fuel cells si è riscontrato un abbattimento del carico organico dell'ordine del 90%.

Gli altri argomenti da me approfonditi sono stati quelli riguardanti l'esecuzione della voltammetria ciclica con l'impiego di un potenziostato (VSP dalla BioLogic Science Instruments). Nel laboratorio di Ingegneria Chimica, ho partecipato alla realizzazione di MFC monocamera e bicamera con ponte salino in agar, e con un secondo ceppo batterico, lo *Pseudomonas Aeruginosa*.

Inoltre è stato impostato lo studio e la realizzazione di altri 5 prototipi in scala di laboratorio secondo le configurazioni reattoristiche maggiormente utilizzate in letteratura: cella monocamera, con catodo all'aria e cella bicamera, "H-type".

Per ciascuna delle due configurazioni è stata realizzata una batteria di MFC, che sono state fatte funzionare per 81 giorni: in particolare si sono realizzate tre celle a combustibile microbiche del tipo H-type e due del tipo monocamera. Le celle si differenziano le une dalle altre sia per il tipo di configurazione, monocamera o bicamera, sia per il materiale col quale è realizzato l'elettrodo, presente nel compartimento anodico e in quello catodico, sia per la diversa concentrazione del "medium" utilizzato come alimentazione; in questa fase si è variata la tipologia dell'alimentazione e la concentrazione (molto interessante è stato l'impiego di frullato di minestrone vegetale).

Sono state da me poi realizzate altre cinque MFC bicamera, di cui quattro con elettrodi piani in carbonio pressato su carta e una con elettrodi piani in grafite siliconata, che abbiamo fatto funzionare per 70 giorni al fine di definire l'influenza della superficie dell'elettrodo anodico, a parità delle altre caratteristiche costruttive. In particolare, le due monocamera hanno lavorato in condizioni analoghe alle corrispondenti due bicamere sia per quanto riguarda il terreno d'alimentazione che per la tipologia di elettrodi, al fine di raffrontare le diverse performance variando la configurazione della MFC.

Per superare i problemi riscontrati nella sperimentazione preliminare e ai fini della costruzione di un sistema di riferimento in scala industriale, è stata programmato progettato e

realizzato un bio-reattore da 16 litri alimentato in continuo con digestato. Ho collaborato alla progettazione e realizzazione della stazione di misura multicanale idonea al rilevamento dei principali parametri elettro-chimico-fisici delle celle in batch e del bio-reattore; con essa è stato possibile variare la resistenza elettrica di carico, e realizzare un circuito di misura voltamperometrico, che esegue la misura con un solo multimetro digitale oppure con un oscilloscopio digitale a 2 canali.

Il lavoro sul bio-reattore da 16 litri ha riguardato principalmente il superamento dei problemi riscontrati nella sperimentazione preliminare, e la costruzione di un sistema idoneo ad uno scale-up industriale; la mia attività ha principalmente riguardato la misura di tutte le grandezze elettriche, quali la corrente, la tensione a circuito chiuso e a circuito aperto ed i potenziali redox delle semicelle. Il lavoro di ricerca è terminato dopo 207 giorni di misurazione delle grandezze elettriche e biochimiche; fondamentale è stata la fase di definizione e di applicazione del ciclo di gestione, che ha richiesto un impegno quotidiano per ovviare a tutte le problematiche connesse con l'impiego del digestato. Ho studiato ed applicato delle nuove tecniche voltammometriche alle MFC già in funzione, quali la spettroscopia di impedenza elettrochimica (EIS) che hanno avuto un discreto interesse anche nei meeting nazionale ed internazionali a cui sono state presentate.

Ho anche contribuito alla realizzazione di 6 elettrodi per la camera catodica del bio-reattore, a forma di tubo a sezione quadrata in acciaio inossidabile con areazione interna.

Ho contribuito alla costruzione di 6 MFC nel Laboratorio del Dipartimento di Biologia e Biotecnologie "Charles Darwin" della Università di Roma SAPIENZA per la sperimentazione con 4 diversi tipi di anodo (acciaio, spugna di acciaio, grafite siliconata e foglio di grafite) verso un catodo di grafite e di altre 2 da impiegare per sviluppare un modello computazionale delle MFC idoneo a simulare il comportamento dinamico in termini di grandezze integrali.

Ho impostato e portato a compimento la fase di studio del fenomeno del "power overshoot" per le MFC con la elaborazione computazionale dei dati.

I risultati ottenuti sono stati molteplici ed in alcuni casi di grande interesse: in particolare i valori massimi della corrente e della potenza elettrica prodotta in ciascuna fase e per ciascuna MFC della tipologia sopra citata; altrettanto interessante è stato analizzare i risultati delle misure potenziostatiche per definire i meccanismi di trasferimento che operano in consorzi microbici che si sviluppano nelle MFC inoculate con sostanza organica complessa. Tali conoscenze sono infatti indispensabili per migliorare l'ingegnerizzazione microbiologica ed elettrochimica delle MFC. Le tecniche potenziostatiche che ho applicato in laboratorio, quali la voltammetria ciclica, la spettroscopia di impedenza elettrochimica ci hanno consentito di effettuare degli studi sui

processi di interazione tra i batteri e i materiali conduttivi da noi impiegati. Sono riuscito a definire un modello circuitale della tipologia di MFC da noi realizzata che ci ha consentito di ottenere dei risultati in ottimo accordo con quelli reali misurati in laboratorio.

La tecnica potenziostatica “cronoamperometrica” ha consentito di determinare le efficienze coulombiche delle MFC.

Alcune delle tecniche potenziostatiche più recenti sono state poi da me studiate ed attuate, come la Voltammetria a Scansione Lineare (Linear Sweep Voltammetry), che mi ha consentito di realizzare una curva di polarizzazione e di potenza delle nostre MFC e anche della “funzione derivata prima”, nell’analisi dei picchi di riduzione e di ossidazione nelle MFC, che venivano rilevate in laboratorio.

Recentemente è iniziato lo start-up di altre 5 MFC bicamera del tipo di quelle comunemente impiegate nei maggiori Centri di Ricerca internazionali, per studi relativi alla valutazione delle potenzialità di queste celle nell’abbattimento dei nitrati presenti in digestati tal-quale.

Alla luce dei risultati ottenuti attraverso le sperimentazioni effettuate, sia con le celle in batch mono- e bi-camera, che con il reattore in continuo da 16 litri alimentato con digestato tal-quale, si può concludere quanto segue:

- attualmente, l’impiego delle MFC per il recupero dell’energia residua presente nel digestato in uscita dai sistemi di biodigestione anaerobica mediante produzione diretta di energia elettrica (i.e., come possibili sistemi di bottom repowering) non è maturo, e a mio avviso richiederà ancora molti anni di studio per arrivare ad una possibile realizzazione industriale;
- ciò che invece appare essere molto promettente è l’impiego delle MFC come sistemi per l’abbattimento dei nitrati presenti nei digestati, al fine di consentirne l’uso come ammendanti agricoli.

Proprio per questo, gli studi sul reattore da 16 litri continueranno nei prossimi anni al fine:

- di ottimizzare il processo bio-elettro-chimico finalizzato all’abbattimento dei nitrati presenti nei digestati;
- e di procedere ad uno scale-up del reattore per realizzare un prototipo in scala industriale da installare presso la sede dell’Ente CRA di Monterotondo (RM); la ricerca verrà finanziata dal MIPAAF nell’ambito di un progetto che vedrà coinvolti Ente CRA, ENAMA, ENEA, Università di Torino e “SAPIENZA” Università di Roma.

## Riferimenti Bibliografici

- [1] F. Ascenzioni, L. Di Palma, A. Geri, “Da materiali di scarto a preziose risorse: le nuove frontiere delle bioenergie. Prospettive e possibili impieghi delle Microbial Fuel Cells”, *Esposizione Internazionale di Macchine per l'Agricoltura - EIMA*, Bologna, 10 Novembre 2010.
- [2] Gestore Sistema Elettrico, GSE Rapporto Statistico 2009 “Impianti a fonti rinnovabili”.
- [3] MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO, MDSE “Piano di azione nazionale per le energie rinnovabili (direttiva 2009/28/CE)”, 11 giugno 2010.
- [4] C. Sukkasem, S. Xu, S. Park, P. Boonsawang, H. Liu, “Effect of nitrate on the performance of single chamber air cathode microbial fuel cells”, *Water Research*, Vol. 42, No 19, Dicembre 2008, pp. 4743-4750.
- [5] B. Cohen, “The Bacterial Culture as an Electrical Half-Cell”, *Journal of Bacteriology*, Vol. 21, 1931, pp. 18-19.
- [6] M. G. DelDuca, J. M. Friscoe, R. W. Zurilla, “Developments in Industrial Microbiology”, *American Institute of Biological Sciences*, Vol. 4, 1963, pp. 81-84.
- [7] I. Karube, T. Matasunga, S. Suzuki, S. Tsuru, “Continuous hydrogen production by immobilized whole cells of *Clostridium butyricum*”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, Vol. 144, No. 2, Settembre 1976, pp. 338-343.
- [8] I. Karube, T. Matsunaga, S. Tsuru, S. Suzuki, “Biochemical cells utilizing immobilized cells of *Clostridium butyricum*”, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 19, No. 11, Novembre 1977, pp. 1727-1733.
- [9] R. M. Allen, H. P. Bennetto, “Microbial fuel cells: Electricity production from carbohydrates”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Vol. 37, No. 39-40, 1993, pp. 27-40.
- [10] T. Chen, S. C. Barton, G. Binyamin, Z. Gao, Y. Zhang, H. -H. Kim, A. Heller, “A miniature biofuel cell”, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 123, No. 35, 2001, pp. 8630-8631.
- [11] H. Liu, S. Cheng, B. E. Logan, “Production of electricity from acetate or butyrate using a single-chamber microbial fuel cell”, *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 32, No. 2, Gennaio 2005, pp. 658-662.
- [12] W. Habermann, E. -H. Pommer, “Biological fuel cells with sulphide storage capacity”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 33, No. 1, Aprile 1991, pp. 128-133.
- [13] D. R. Lovley, “Microbial fuel cells: novel microbial physiologies and engineering approaches”, *Curr. Opin. Biotech.*, Vol. 17, No. 3, Giugno 2006, pp. 327-332.

- [14] S. E. Oh, B. E. Logan, "Hydrogen and electricity production from a food processing wastewater using fermentation and microbial fuel cell technologies", *Water Research*, Vol. 39, No. 19, Novembre 2005, pp. 4673-4682.
- [15] B. H. Kim, I. S. Chang, G. M. Gadd, "Challenges in microbial fuel cell development and operation", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 76, No. 3, Giugno 2007, pp. 485-494.
- [16] G. M. Delaney, H. P. Bennetto, J. R. Mason, H. D. Roller, J. L. Stirling, C. F. Thurston, "Electron-transfer coupling in microbial fuel cells: 2. Performance of fuel cells containing selected microorganism-mediator-substrate combinations", *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, Vol. 34, No. 1, Marzo 1984, pp. 13-27.
- [17] A. M. Lithgow, L. Romero, I. C. Sanchez, F. A. Souto, C. A. Vega, "Interception of electron-transport chain in bacteria with hydrophilic redox mediators", *J. Chem. Research*, Vol. S, 1986, pp.178-179.
- [18] B. H. Kim, H. J. Kim, M. S. Hyun, D. H. Park, "Direct electrode reaction of Fe (III) reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*", *J. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 9, 1999, pp. 127-131.
- [19] A. P. Cuong, S. J. Jung, N. T. Phung, J. Lee, I. S. Chang, B. H. Kim, H. Yi, J. Chun, "A novel electrochemically active and Fe(III)-reducing bacterium phylogenetically related to *Aeromonas hydrophila*, isolated from a microbial fuel cell", *FEMS Microbiol. Lett.*, Vol. 223, No. 1, 2003, pp.129-134.
- [20] B. Min, S. Cheng, B. E. Logan, "Electricity generation using membrane and salt bridge microbial fuel cells", *Water Research*, Vol. 39, No. 9, 2005, pp. 1675-86.
- [21] Y. Choi, S. Jung, S. Kim, "Development of Microbial Fuel Cells Using *Proteus Vulgaris*", *Bulletin of the Korean Chemical Society*, Vol. 21, No. 1, 2000, pp. 44-48.
- [22] P. L. Yue, K. Lowther, "Enzymatic Oxidation of C1 compounds in a Biochemical Fuel Cell", *The Chemical Engineering Journal*, Vol. 33, No. 1, 1986, pp. B69-B77.
- [23] R. A. Bullen, T. C. Arnot, J. B. Lakeman, F. C. Walsh, "Biofuel cells and their development", *Biosensors & Bioelectronics*, Vol. 21, No. 11, 2005, pp. 2015-2045.
- [24] H. P. Bennetto, "Electricity Generation by Micro-organisms", *Biotechnology Education*, Vol. 1, No. 4, 1990, pp. 163-168.
- [25] B. E. Logan, B. Hamelers, R. Rozendal, U. Schroder, J. Keller, S. Freguia, P. Aelterman, W. Verstraete, K. Rabaey, "Microbial fuel cells: Methodology and technology", *Environmental Science & Technology*, Vol. 40, No. 17, Luglio 2006, pp.5181-5192.
- [26] J. M. Tront, J. D. Fortner, M. Plötze, J. B. Hughes, A. M. Puzrin, "Microbial fuel cell biosensor for in situ assessment of microbial activity", *Biosensors and Bioelectronics*, Vol. 24, No. 4, 2008, pp. 586-590.
- [27] L. M. Tender, S. A. Gray, E. Groveman, D. A. Lowy, P. Kauffman, J. Melhado, R. C. Tyce, D. Flynn, R. Petrecca, J. Dobarro, "The first demonstration of a microbial fuel cell as a viable power supply: Powering a meteorological buoy", *Journal of Power Sources*, Vol. 179, No. 2, Maggio 2008, pp. 571-575.

- [28] I. S. Chang, H. Moon, J. K. Jang, B. H. Kim, "Improvement of a microbial fuel cell performance as a BOD sensor using respiratory inhibitors", *Biosensors and Bioelectronics*, Vol. 20, No. 9, Marzo 2005, pp. 1856-1859.
- [29] B. H. Kim, I. S. Chang, G. C. Gil, H. S. Park, H. J. Kim, "Novel BOD (biological oxygen demand) sensor using mediator-less microbial fuel cell", *Biotechnology Letters*, Vol. 25, 2003, pp. 541-545.
- [30] H. Moon, I. S. Chang, K. H. Kang, J. K. Jang, B. H. Kim, "Improving the dynamic response of a mediatorless microbial fuel cell as a biochemical oxygen demand (BOD) sensor", *Biotechnol Letters*, Vol. 26, No. 22, Novembre 2004, pp. 1717-1721.
- [31] K. H. Kang, J. K. Jang, T. H. Pham, H. Moon, I. S. Chang, B. H. Kim, "A microbial fuel cell with improved cathode reaction as a low biochemical oxygen demand sensor", *Biotechnology*, Vol. 25, No. 16, Agosto 2003, pp. 1357-1361.
- [32] S. Cheng, B. E. Logan, "Ammonia treatment of carbon cloth anodes to enhance power generation of microbial fuel cells", *Electrochem. Commun.*, Vol. 9, No. 3, Marzo 2007, pp. 492-496.
- [33] P. Clauwaert, W. Verstraete, "Methanogenesis in membraneless microbial electrolysis cells", *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 82, No. 5, Aprile 2009, pp. 829-836.
- [34] Z. He, S. D. Minter, L. T. Angenent, "Electricity Generation from Artificial Wastewater Using an Upflow Microbial Fuel Cell", *Environ. Sci. Technol.*, Luglio 2005, Vol. 39, No. 14, pp. 5262-5267.
- [35] J. Heilmann, B.E. Logan, "Production of Electricity from Proteins Using a Microbial Fuel Cell", *Water Environ. Res.*, Vol. 78, No. 5, Maggio 2006, pp. 531-537.
- [36] S. Ishii, T. Shimoyama, Y. Hotta, K. Watanabe, "Characterization of a filamentous biofilm community established in a cellulose-fed microbial fuel cell", *BMC Microbiology*, Vol. 8, No. 6, Gennaio 2008, pp. 6-18.
- [37] B. E. Logan, C. Murano, K. Scott, N. D. Gray, I. M. Head, "Electricity generation from cysteine in a microbial fuel cell", *Water Res.*, Vol. 39, No. 5, Marzo 2005, pp. 942-952.
- [38] B. Min, B. E. Logan, "Continuous electricity generation from domestic wastewater and organic substrates in a flat plate microbial fuel cell", *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 38, No. 21, Novembre 2004, pp. 5809-5814.
- [39] K. Rabaey, G. Lissens, S. D. Siciliano, W. Verstraete, "A microbial fuel cell capable of converting glucose to electricity at high rate and efficiency", *Biotechnol Lett.*, Vol. 25, No. 18, Settembre 2003, pp. 1531-1535.
- [40] K. Rabaey, K. Van de Sompel, L. Maignien, N. Boon, P. Aelterman, P. Clauwaert, L. De Schampelaire, H.T. Pham, J. Vermeulen, M. Verhaege, P. Lens, W. Verstraete, "Microbial fuel cells for sulfide removal", *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 40, No. 17, Settembre 2006, pp. 5218-5224.

- [41] K. Rabaey, P. Clauwaert, P. Aelterman, W. Verstraete, "Tubular microbial fuel cells for efficient electricity generation", *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 39, No. 20, Ottobre 2005, pp. 8077-8082.
- [42] S. Cheng, B. A. Dempsey, B. E. Logan, "Electricity generation from synthetic acid-mine drainage (AMD) water using fuel cell technologies", *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 41, No. 23, Settembre 2007, pp. 8149-8153.
- [43] H. Liu, R. Ramnarayanan, B. E. Logan, "Production of electricity during wastewater treatment using a single chamber microbial fuel cell", *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 38, No. 7, Febbraio 2004, pp. 2281-2285.
- [44] Y. Feng, X. Wang, B. E. Logan, H. Lee, "Brewery wastewater treatment using air-cathode microbial fuel cells", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 78, No. 5, Aprile 2008, pp. 873-880.
- [45] L. P. Huang, B. E. Logan, "Electricity generation and treatment of paper recycling wastewater using a microbial fuel cell", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 80, No. 2, Agosto 2008, pp. 349-355.
- [46] P. Aelterman, K. Rabaey, P. Clauwaert, W. Verstraete, "Microbial fuel cells for wastewater treatment", *Water Sci. Technol.*, Vol. 54, No. 8, 2006, pp. 9-15.
- [47] P. Clauwaert, P. Aelterman, H. T. Pham, L. De Schampelaire, M. Carballa, K. Rabaey, W. Verstraete, "Minimizing losses in bio-electrochemical systems: the road to applications", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 79, No. 6, Luglio 2008, pp. 901-913.
- [48] G. Hoogers, "Fuel Cell Components and Their Impact on Performance", Capitolo 4 in "Fuel Cell Technology Handbook", Hoogers, G. 2003, Ed. CRC: Boca Raton, FL.
- [49] Y. Fan, E. Sharbrough, H. Liu, "Quantification of the internal resistance distribution of microbial fuel cells", *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 42, No. 21, Novembre 2008, pp. 8101-8107.
- [50] B. E. Logan, S. Cheng, V. Watson, G. Estadt, "Graphite fiber brush anodes for increased power production in air-cathode microbial fuel cells", *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 41, No. 9, Maggio 2007, pp. 3341-3346.
- [51] S. Oh, B. E. Logan, "Proton exchange membrane and electrode surface areas as factors that affect power generation in microbial fuel cells", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 70, No. 2, Marzo 2006, pp. 162-169.
- [52] S. Oh, B. Min, B.E. Logan, "Cathode performance as a factor in electricity generation in microbial fuel cells", *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 38, No. 18, Settembre 2004, pp. 4900-4904.
- [53] E. Marsili, J. B. Rollefson, D. B. Baron, R. M. Hozalski, D. R. Bond, "Microbial biofilm voltammetry: direct electrochemical characterization of catalytic electrode-attached biofilms", *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 74, No. 23, Dicembre 2008, pp. 7329-7337.
- [54] GSE Rapporto Statistico 2010 "Impianti a fonti rinnovabili", Gestore Sistema Elettrico.



- [55] B. E. Logan, "Direct electricity or hydrogen generation from wastewater and other waste biomass using microbial fuel cell technologies", Invited keynote, Pennsylvania Association of Environmental Professionals (PAEP), State College, PA, 13 Maggio 2009.
- [56] Y. Feng, H. Lee, X. Wang, Y. Liu, W. He, "Continuous electricity generation by a graphite granule baffled air-cathode microbial fuel cell", *Bioresource Technology*, Vol. 101, No. 2, Gennaio 2010, pp. 632-638.
- [57] H. Rismani-Yazdi, S. M. Carver, A. D. Christy, O. H. Tuovinen "Cathodic limitations in microbial fuel cells: An overview", *Journal of Power Sources*, Vol. 180, No. 2, Giugno 2008, pp. 683-694.
- [58] K. Rabaey, W. Verstraete, "Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation", *Biotechnology*, Vol. 23, No. 6, Giugno 2005, pp. 291-298.
- [59] Presentation "Intro to MFCs & Build Instructions", Keegoo Tech Teaching Material, 2011.
- [60] I. Ieropoulos, J. Greenman, C. Melhuish, "Microbial fuel cells based on carbon veil electrodes: Stack configuration and scalability", *International Journal of Energy Research Int.*, Vol. 32, No. 13, Ottobre 2008, pp. 1228-1240.
- [61] Logan, B.E., "Bioenergy production using microbial fuel cell technologies", Invited seminar, Stanford University, Palo Alto, CA, 15 Gennaio 2010.
- [62] K. P. Nevin, H. Richter, S. F. Covalla, J. P. Johnson, T. L. Woodard, A. L. Orloff, H. Jia, M. Zhang, D. R. Lovley, "Power output and columbic efficiencies from biofilms of *Geobacter sulfurreducens* comparable to mixed community microbial fuel cells", *Environmental Microbiology*, Vol. 10, No. 10, Ottobre 2008, pp. 2505-2514.
- [63] I. S. Chang, H. Moon, O. Bretschger, J. K. Jang, H. I. Park, K. H. Neilson, B. H. Kim, "Electrochemically active bacteria (EAB) and mediator-less microbial fuel cells", *Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 16, No. 2, Febbraio 2006, pp. 163-177.
- [64] S. Freguia, K. Rabaey, Y. Zhiguo, J. Keller, "Non-catalyzed cathodic oxygen reduction at graphite granules in microbial fuel cells", *Electrochimica Acta*, Vol. 53, No. 2, Luglio 2007, pp. 598-603.
- [65] K. Watanabe, "Recent developments in microbial fuel cell technologies for sustainable bioenergy", *J Biosci Bioeng.*, Vol. 106, No. 6, Dicembre 2008, pp. 528-536.
- [66] D. H. Park, J.G. Zeikus "Improved fuel cell and electrode designs for producing electricity from microbial degradation", *Biotechnol. Bioeng.*, Vol. 81, No. 3, Febbraio 2003, pp. 348-355.
- [67] K. Rabaey, et al., "Bacteria generate current through production and/or use of soluble redox mediators", In *Annual meeting of the American Chemical Society 2004*, American Chemical Society.
- [68] H. Liu, B. E. Logan, "Electricity generation using an air-cathode single chamber microbial fuel cell in the presence and absence of a proton exchange membrane", *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 38, No. 14, Luglio 2004, pp. 4040-4046.

- [69] J. A. Jr. Menicucci, H. Beyenal, E. Marsili, R. Raajan Angathevar Veluchamy, G. Demir, Z. Lewandowski, "Sustainable Power Measurement for a Microbial Fuel Cell", *AIChE Annual Meeting 2005*, Cincinnati, USA.
- [70] J. P. Kumar, M. Tio, F. Hsiung, S. Akopyan, L. Gabay, R. Seger, B. Z. Shilo, K. Moses, "Dissecting the roles of the Drosophila EGF receptor in eye development and MAP kinase activation", *Development*, 1998, Vol. 125, No. 19, pp. 3875-3885.
- [71] W. G. Characklis, "Biofilm processes", in *Biofilms*, W.G. Charackis, , K.C. Marshall, ed. New York: Wiley-Interscience, 1990, pp. 195-207.
- [72] I. Raad, W. Costerton, U. Sabharwal, M. Sacilowski, E. Anaissie, G. P. Bodey, "Ultra structural analysis of indwelling vascular catheters: a Quantitative relationship between luminal colonization and duration of placement", *J. Infect. Dis.*, 1993, Vol. 168, pp. 400-407.
- [73] D. Stickler, N. Morris, M.C. Moreno, N. Sabbuba, "Studies on the formation of crystalline bacterial biofilms on urethral catheters", *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 1998, Vol. 17, pp. 649-652.
- [74] M. A. J. Ferguson, M. Duszenko, G. S. Lamont, P. Overath, G. A. M. Cross, "Biosynthesis of Trypanosoma brucei variant surface glycoproteins: N-glyeosylation and addition of a phosphatidylinositol membrane anchor", *J. Biol. Chem.*, 1986, Vol. 261, pp. 356-362.
- [75] R. F. Nickel, G. Ubbink, I. Van der Gaag, F. J. Van Sluijs, "Persistent Müllerian duct syndrome in the Basset Hound Tijdschr. Diergeneeskd", 1992, Vol. 117, Suppl. 1, pp. 31S.
- [76] R. M. Donlan, W. Costerton, "Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms", *Clinical Microbiological Reviews*, 2002, Vol. 15, No. 2, pp. 167-193.
- [77] Z. Lu, R. Tombolini, S. Woo, S. Zeilinger, M. Lorito, J. K. Jansson, "In Vivo Study of Trichoderma-Pathogen-Plant Interactions, Using Constitutive and Inducible Green Fluorescent Protein Reporter Systems", *Appl. Environ. Microbiol.*, Maggio 2004, Vol. 70, No. 5, pp. 3073-3081.
- [78] D. R. Bond, D. R. Lovley, "Electricity production by Geobacter sulfurreducens attached to electrodes", *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, Vol. 69, pp. 1548-1555.
- [79] B. H. Kim, H. S. Park, H. J. Kim, G. T. Kim, I. S. Chang, J. Lee, N. T. Phung, "Enrichment of microbial community generating electricity using a fuel-cell-type electrochemical cell", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2004, Vol. 63, No. 6, pp. 672-681.
- [80] K. Rabaey, N. Boon, S. D. Siciliano, M. Verhaege, W. Verstraete, "Biofuel cells select for microbial consortia that self-mediate electron transfer", *Appl. Environ. Microbiol.*, Settembre 2004, Vol. 70, No. 9, pp. 5373-5382.
- [81] G. Reguera, K. P. Nevin, J. S. Nicoll, S. F. Covalla, T. L. Woodard, D. R. Lovley, "Biofilm and nanowire production leads to increased current in Geobacter sulfurreducens fuel cells", *Appl. Environ. Microbiol.*, Novembre 2006, Vol. 72, No. 11, pp. 7345-7348.

- [82] G. Reguera, R. B. Pollina, J. S. Nicoll, D. R. Lovley, "Possible nonconductive role of *Geobacter sulfurreducens* pilus nanowires in biofilm formation", *J. Bacteriol.*, Marzo 2007, Vol. 189, No. 5, pp. 2125-2127.
- [83] S. T. Shimoyama, Y. Hotta, K. Watanabe, "Characterization of a filamentous biofilm community established in a cellulose-fed microbial fuel cell", *BMC Microbiol.*, Gennaio 2008, Vol. 8, No. 6, pp. 1-12.
- [84] G. T. Kim, G. Webster, J. W. T. Wimpenny, B. H. Kim, H. J. Kim, A. J. Weightman, "Bacterial community structure, compartmentalization and activity in a microbial fuel cell", *J. Appl. Microbiol.*, Settembre 2006, Vol. 101, No. 3, pp. 698-710.
- [85] L. M. Tender, C. E. Reimers, H. A. Stecher III, D. E. Holmes, D. R. Bond, D. A. Lowy, K. Pilobello, S. J. Fertig, D. R. Lovley, "Harnessing microbially generated power on the seafloor", *Nat. Biotechnol.*, Agosto 2002, Vol. 20, No. 8, pp. 821-825.
- [86] A. A. L. Zinatizadeh, A. R. Mohamed, G. D. Najafpour, M. H. Isa, H. Nasrollahzadeh, "Kinetic evaluation of palm oil mill effluent digestion in a high rate up-flow anaerobic sludge fixed film bioreactor", *Process Biochem.*, Maggio 2006, Vol. 41, No. 5, pp. 1038-1046.
- [87] B. E. Logan, J. M. Regan, "Electricity-producing bacterial communities in microbial fuel cells", *Trends in Microbiology*, Vol. 14, No. 12, Dicembre 2006, pp. 512-518.
- [88] C. M. Eggleston, J. Voeroes, L. Shi, B. H. Lower, T. C. Droubay, P. J. S. Colberg, "Binding and direct electrochemistry of OmcA, an outer-membrane cytochrome from an iron reducing bacterium, with oxide electrodes: a candidate biofuel cell system", *Inorg. Chim. Acta*, 2008, Vol. 361, pp. 769-777.
- [89] T. H. Pham, N. Boon, P. Aelterman, P. Clauwaert, L. De Schampelaire, L. Vanhaecke, K. De Maeyer, M. Höfte, W. Verstraete, K. Rabaey, "Metabolites produced by *Pseudomonas* sp. enable a Gram-positive bacterium to achieve extracellular electron transfer", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Gennaio 2008, Vol. 77, No. 5, pp. 1119-1129.
- [90] U. Schroder, "Anodic electron transfer mechanisms in microbial fuel cells and their energy efficiency", *Physical Chemistry Chemical Physics*, Gennaio 2007, Vol. 9, No. 21, pp. 2619-2629.
- [91] J. A. Gralnick, D. K. Newman, "Extracellular respiration", *Molecular Microbiology*, Luglio 2007, Vol. 65, No. 1, pp. 1-11.
- [92] B. H. Kim, T. Ikeda, H. S. Park, H. J. Kim, M. S. Hyun, K. Kano, K. Takagi, H. Tatsumi, "Electrochemical activity of an Fe(III)-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens* IR-1, in the presence of alternative electron acceptors", *Biotechnol. Tech.*, Luglio 1999, Vol. 13, No. 7, pp. 475-478.
- [93] Y. A. Gorby, S. Yanina, J. S. McLean, K. M. Rosso, D. Moyles, A. Dohnalkova, T. J. Beveridge, I. S. Chang, B. H. Kim, K. S. Kim, D. E. Culley, S. B. Reed, M. F. Romine, D. A. Saffarini, E. A. Hill, L. Shi, D. A. Elias, D. W. Kennedy, G. Pinchuk, K. Watanabe, S. Ishii, B. Logan, K. H. Nealson, J. K. Fredrickson, "Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Giugno 2006, Vol. 103, No. 30, pp. 11358-11363.

- [94] G. Reguera, K. D. McCarthy, T. Mehta, J. S. Nicoll, M. T. Tuominen, D. R. Lovley, "Extracellular electron transfer via microbial nanowires", *Nature*, Giugno 2005, Vol. 435, pp. 1098-1101.
- [95] R. M. Allen, H. P. Bennetto, "Microbial fuel cells – electricity production from carbohydrates", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1993, Vol. 39/40, pp. 27-40.
- [96] C. E. Reimers, L. M. Tender, S. Fertig, W. Wang, "Harvesting energy from the marine sediment–water interface", *Environ. Sci. Technol.*, Gennaio 2001, Vol. 35, No. 1, pp. 192-195.
- [97] D. R. Bond, D. R. Lovley, "Evidence for involvement of an electron shuttle in electricity generation by *Geothrix fermentans*", *Applied and Environmental Microbiology*, Aprile 2005, Vol. 71, No. 4, pp. 2186-2189.
- [98] D. R. Lovley, "Bug juice: harvesting electricity with microorganisms", *Nature Reviews Microbiology*, Luglio 2006, Vol. 4, pp. 497-508.
- [99] K. Rabaey, J. Rodriguez, L. L. Blackall, J. Keller, D. Batstone, W. Verstraete, K. H. Nealson, "Microbial ecology meets electrochemistry: electricity-driven and driving communities", *The ISME Journal*, Febbraio 2007, Vol. 1, No. 1, pp. 9-18.
- [100] A. E. Franks, K. P. Nevin, R. H. Glaven, D. R. Lovley, "Microtoming coupled to microarray analysis to evaluate the spatial metabolic status of *Geobacter sulfurreducens* biofilms", *The ISME Journal*, Aprile 2010, Vol. 4, No. 4, pp. 509-519.
- [101] M. A. Kato, C. I. Torres, B. E. Rittmann, "Conduction-based modeling of the biofilm anode of a microbial fuel cell", *Biotechnol. Bioeng.*, Dicembre 2007, Vol. 98, No. 6, pp. 1171-1182.
- [102] P. Aelterman, S. Freguia, J. Keller, W. Verstraete, K. Rabaey, "The anode potential regulates bacterial activity in microbial fuel cells", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Marzo 2008, Vol. 78, No. 3, pp. 409-418.
- [103] J. C. Biffinger, J. Pietron, R. Ray, B. Little, B. R. Ringeisen, "A biofilm enhanced miniature microbial fuel cell using *Shewanella oneidensis* DSP10 and oxygen reduction cathodes", *Biosens. Bioelectron.*, Marzo 2007, Vol. 22, No. 8, pp. 1672-1679.
- [104] C. I. Torres, A. K. Markus, B. E. Rittmann, "Proton transport inside the biofilm limits electrical current generation by anode-respiring bacteria", *Biotechnol. Bioeng.*, Agosto 2008, Vol. 100, No. 5, pp. 872-878.
- [105] A. E. Franks, K. P. Nevin, H. Jia, "Novel strategy for 3D real-time imaging of microbial fuel cell communities: monitoring the inhibitory effects of proton accumulation within the anode biofilm", *Energ. Environ. Sci.*, 2009, Vol. 2, No. 1, pp. 113-119.
- [106] E. Katz, A. N. Shipway, I. Wilner, in: *Handbook of Fuel Cells – Fundamentals, Technology, and Application*, Vielstich W, Lamm A, Gasteiger HA (Eds). John Wiley & Sons, Ltd, Chichester UK 2003, pp. 355-381.

- [107] R. A. Rozendal, H. V. M. Hamelers, C. J. N. Buisman, "Effects of membrane cation transport on pH and microbial fuel cell performance", *Environ. Sci. Tech.*, Settembre 2006, Vol. 40, No. 17, pp. 5206-5211.
- [108] G. P. Di Sansebastiano, N. Paris, S. Marc-Martin, J. M. Neuhaus, "Regeneration of a lytic central vacuole and of neutral peripheral vacuoles can be visualized by green fluorescent proteins targeted to either type of vacuoles", *Plant Physiol.*, 2001, Vol. 126, pp. 78-86.
- [109] P. Stoodley, Z. Lewandowski, J. D. Boyle, H. M. Lappin-Scott, "Structural deformation of bacterial biofilms caused by short-term fluctuations in fluid shear: an in situ investigation of biofilm rheology", *Biotechnol. Bioeng.*, 1999, Vol. 65, pp. 83-92.
- [110] M. E. Davey, G. A. O'Toole, "Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Dicembre 2000, Vol. 64, No. 4, pp. 847-867.
- [111] N. R. Stanley, B. A. Lazazzera, "Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation", *Mol. Microbiol.*, Maggio 2004, Vol. 52, No. 4, pp. 917-924.
- [112] H. G. Schlegel, "Allgemeine Mikrobiologie", Ed. Thieme - 7° edizione - Stoccarda (Germania), 1992.
- [113] M. Madigan, "Biology of Microorganisms", Ed. Pearson - 13° edizione - (Italia) 2012.
- [114] T. Raivio, T. J. Silhavy, "Transduction of envelope stress in Escherichia coli by the Cpx two-component system", *J. Bacteriol.*, 1997, Vol. 179, pp. 7724-7733.
- [115] C. -C. Hung, P. H. Santschi, "Spectrophotometric determination of total uronic acids in seawater using cation exchange separation and pre-concentration by lyophilization", *Analyt. Chim. Acta*, 2001, Vol. 427, pp. 111-117.
- [116] G. O'Toole, H. B. Kaplan, R. Kolter, "Biofilm formation as microbial development", *Annual Review of Microbiology*, Ottobre 2000, Vol. 54, pp. 49-79.
- [117] F. Brombacher, R. A. Kastelein, G. Alber, "Novel IL-12 family members shed light on the orchestration of Th1 responses", *Trends Immunol.*, Aprile 2003, Vol. 24, No. 4, pp. 207-12.
- [118] C. Heilmann, O. Schweitzer, C. Gerke, N. Vanittanakom, D. Mack, F. Gotz, "Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming Staphylococcus epidermidis", *Mol. Microbiol.*, 1996, Vol. 20, pp. 1083-1091.
- [119] S. E. Cramton, C. Gerke, N. F. Schnell, W. W. Nichols, F. Götz, "The intercellular adhesion (ica) locus in Staphylococcus aureus and is required for biofilm formation", *Infect. Immun.*, 1967, pp. 5427-5433.

- [120] P. I. Watnick, R. Kolter, "Steps in the development of a *Vibrio cholerae* biofilm", *Molecular Microbiology*, 1999, Vol. 34, pp.586-595.
- [121] F. H. Yildiz, G. K. Schoolnik, "Vibrio cholerae O1 El Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Marzo 1999, Vol. 96, pp. 4028-4033.
- [122] G. A. O'Toole, K. A. Gibbs, P. W. Hager, P. V. Phibbs, R. Kolter, "The global carbon metabolism regulator Crc is a component of a signal transduction pathway required for biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*", *J. Bacteriol.*, 2000, Vol. 182, pp. 425-431.
- [123] F. Götz, "Staphylococcus and biofilms", *Mol. Microbiol.*, Marzo 2002, Vol. 43, No. 6, pp. 1367-1378.
- [124] B. Min, O. B. Roman, I. Angelidaki, "Importance of temperature and anodic medium composition on microbial fuel cell (MFC) performance", *Biotechnol. Lett.*, Vol. 30, 2008, pp. 1213-1218.
- [125] I. Ieropoulos, J. Winfield, J. Greenman, "Effects of flow-rate, inoculum and time on the internal resistance of microbial fuel cells", *Bioresource Technology*, Vol. 101, Gennaio 2010, pp. 3520-3525.
- [126] X. Zhu, J. C. Tokash, Y. Hong, B. E. Logan, "Controlling the occurrence of power overshoot by adapting microbial fuel cells to high anode potentials" *Bioelectrochemistry*, Vol. 90, Novembre 2012, pp. 30-35.
- [127] D. Pant, A. Singh, G. Van Bogaert, S. I. Olsen, P. S. Nigam, L. Diels, K. Vanbroekhoven, "Bioelectrochemical systems (BES) for sustainable energy production and product recovery from organic wastes and industrial wastewaters", *RSC Advances*, 2012, Vol. 2, pp. 1248-1263.
- [128] C. Picioreanu, I. M. Head, K. P. Katuri, M. C. M. van Loosdrecht, K. Scott, "A computational model for biofilm-based microbial fuel cells", *Water Res.*, 2007, Vol. 41, pp. 2921-2940.
- [129] Z. W. Du, H. R. Li, T. Y. Gu, "A state of the art review on microbial fuel cells: a promising technology for wastewater treatment and bioenergy", *Biotechnol. Adv.*, 2007, Vol. 25, pp. 464-482.
- [130] B. E. Logan, "Scaling up microbial fuel cells and other bioelectrochemical systems", *Appl Microbiol. Biotechnol.*, Febbraio 2010, Vol. 85, No. 6, pp. 1665-1671.
- [131] Allen J. Bard, Larry R. Faulkner, "Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications", Ed. Wiley John & Sons Inc. - 2° ed., New York USA, Dicembre 2000.

- [132] P. Protti, "Introduzione alle moderne tecniche di Analisi Voltammetriche e Polarografiche", Ed. AMEL ELETTROCHEMISTRY Srl - IV ed., 2001.
- [133] S. J. You, Q. L. Zhao, J. N. Zhang, J. Q. Jiang, C. L. Wan, M. A. Du, S. Q. Zhao, "A graphite-granule membrane-less tubular air-cathode microbial fuel cell for power generation under continuously operational conditions", 2007, *Journal of Power Sources*, Vol. 173, No. 1, pp. 172-177.
- [134] X. Zhu, J. C. Tokash, Y. Hong, B. E. Logan, "Controlling the occurrence of power overshoot by adapting microbial fuel cells to high anode potentials", *Bioelectrochemistry*, Vol. 90, Aprile 2013, pp. 30-35.
- [135] E. Marsili, J. Sun, D. R. Bond, "Voltammetry and growth physiology of *Geobacter sulfurreducens* biofilms as a function of growth stage and imposed potential", *Electroanalysis*, Aprile 2010, Vol. 22, No. 7-8, pp. 865-874.
- [136] B. Cercado-Quezada, M.-L. Delia, A. Bergel, "Testing various food-industry wastes for electricity production in microbial fuel cell", *Bioresource Technology*, Aprile 2010, Vol. 101, No. 8, pp. 2748-2754.
- [137] S. Srikanth, S. Venkata Mohan, P. N. Sarma, "Positive anodic poised potential regulates microbial fuel cell performance with the function of open and closed circuitry", *Bioresource Technology*, Luglio 2010, Vol. 101, No. 14, pp. 5337-5344.
- [138] Y. Zeng, Y. F. Choo, B.-H. Kim, P. Wu, "Modelling and simulation of two-chamber microbial fuel cell", *Journal of Power Sources*, Gennaio 2010, Vol. 195, No. 1, pp. 79-89.
- [139] A. Ter Heijne, H. V. M. Hamelers, V. De Wilde, R. A. Rozendal, C. J. N. Buisman, "A bipolar membrane combined with ferric iron reduction as an efficient cathode system in microbial fuel cells", *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 40, No. 17, Luglio 2006, pp. 5200-5205.
- [140] A. Shantaram, H. Beyenal, R. R. A. Veluchamy, Z. Lewandowski, "Wireless sensors powered by microbial fuel cells", *Environ. Sci. Technol.*, Luglio 2005, Vol. 39, No. 13, pp. 5037-5042.
- [141] S. You, Q. Zhao, J. Zhang, J. Jiang, S. Zhao, "A microbial fuel cell using permanganate as the cathodic electron acceptor", *J. Power Sour.*, Novembre 2006, Vol. 162, No. 2, pp. 1409-1415.
- [142] J. B. Benziger, M. B. Satterfield, W. H. J. Hogarth, J. P. Nehlsen, I. G. Kevrekidis, "The power performance curve for engineering analysis of fuel cells", *Journal of Power Sources*, Gennaio 2006, Vol. 155, No. 2, pp. 272-285.

Sitografia:

- [143] <http://www.microbialfuelcell.org>;
- [144] [http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Pseudomonas\\_aeruginosa#Classification](http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Pseudomonas_aeruginosa#Classification);
- [145] <http://www.microbialfuelcell.org/www/index.php/General/Anode-process-microbial-oxidation-of-substrate.html>;
- [146] [http://illuminate.usc.edu/index/article/134/microbial%20fuel%20cells/University of Southern California MURI project “microbial fuel cells”](http://illuminate.usc.edu/index/article/134/microbial%20fuel%20cells/University%20of%20Southern%20California%20MURI%20project%20microbial%20fuel%20cells);
- [147] [http://www.buildup.it/Portal/index.asp?location=Quesiti%20tecnici&section=Corrosione &objCode=25265&template=](http://www.buildup.it/Portal/index.asp?location=Quesiti%20tecnici&section=Corrosione&objCode=25265&template=)
- [148] <http://www.itabia.it/index.php>
- [149] <http://www.keegotech.com/>;
- [150] [http://it.wikipedia.org/wiki/Pila\\_a\\_combustibile\\_microbiologica](http://it.wikipedia.org/wiki/Pila_a_combustibile_microbiologica);