



Agenzia nazionale per le nuove tecnologie,
l'energia e lo sviluppo economico sostenibile



MINISTERO DELLA TRANSIZIONE ECOLOGICA



Ricerca di Sistema elettrico

“Metodica standard per la misura dell’attività specifica idrogenotrofica SHMA e modellazione del processo”

V. Corbellini, A. Santus, M. Trionfini, F. Malpei
Politecnico di Milano – DICA



Report RdS/PTR2020/099

METODICA STANDARD PER LA MISURA DELL'ATTIVITÀ SPECIFICA IDROGENOTROFICA SHMA E MODELLAZIONE DEL PROCESSO

V. Corbellini, A. Santus, M. Trionfini, F. Malpei
Politecnico di Milano - DICA

Aprile 2021

Report Ricerca di Sistema Elettrico

Accordo di Programma Ministero dello Sviluppo Economico (oggi Ministero della Transizione Ecologica) - ENEA

Piano Triennale di Realizzazione 2019-2021 - II annualità

Obiettivo: N. 1 - Tecnologie

Progetto: 1.6 - Efficienza energetica dei prodotti e dei processi industriali

Work package: 5-Efficiamento energetico degli impianti di depurazione municipale e del trattamento delle acque reflue in ambito industriale.

Linea di attività: LA 5.8 "Metodica standard per la misura dell'attività specifica idrogenotrofica SHMA e modellazione del processo"

Responsabile del Progetto: Miriam Benedetti, ENEA

Responsabile del Work package: Davide Mattioli, ENEA

Il presente documento descrive le attività di ricerca svolte all'interno dell'Accordo di collaborazione "*Sviluppo di metodiche per la gestione del processo di upgrading biologico ex-situ: misura dell'attività specifica idrogenotrofica (SHMA) e modellazione del processo*"

Responsabile scientifico ENEA: Antonio Giuliano

Responsabile scientifico Politecnico di Milano - DICA: Prof.ssa Francesca Malpei

Indice

SOMMARIO.....	3
INTRODUZIONE.....	4
1 DESCRIZIONE DELLE ATTIVITÀ SVOLTE E RISULTATI.....	4
1.1 LA METANOGENESI IDROGENOTROFICA: RUOLO NELLA DIGESTIONE ANAEROBICA, STECHIOMETRIA E CINETICA.....	4
1.2 METODI DI MISURA DELL'ATTIVITÀ SPECIFICHE DI METANOGENESI	9
1.3 STATO DELL'ARTE SULLA MISURA SHMA CON DISCUSSIONE DELLE PROBLEMATICHE POSSIBILI E VALORI DI RIFERIMENTO DELLA SHMA	10
1.4 ESPERIENZE SPERIMENTALI PRELIMINARI ALLO SVILUPPO DI UN PROTOCOLLO	13
1.5 PROPOSTA DI METODO SHMA CON UTILIZZO METHANTUBE	22
2 CONCLUSIONI.....	27
3 RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	27

Sommario

Recentemente, l'upgrading biologico del biogas per mezzo della metanogenesi idrogenotrofa ha suscitato sempre più interesse e attenzione scientifica. Di conseguenza, studiare e sviluppare metodi per misurare l'attività specifica degli archaea che operano la metanogenesi idrogenotrofa, detta SHMA, risulta importante al fine di valutare sia prima, che durante il processo, aspetti quali: il carico alimentabile, l'inoculo più promettente per un rapido avvio del processo, l'evoluzione e la crescita di tali microorganismi, l'individuazione di effetti inibenti. Costituisce quindi un fondamentale parametro di controllo durante il processo.

In letteratura si ritrovano alcuni tentativi volti all'ottimizzazione della misura, ma fino ad ora manca un protocollo standard. Nel paragrafo 1.1 viene presentata una descrizione del processo di metanogenesi idrogenotrofa con la cinetica e stechiometria degli archaea metanigeni. Nei successivi paragrafi 1.2 e 1.3 vengono presentati rispettivamente lo stato dell'arte sui metodi di misura dell'attività specifica di metanogenesi e più specificamente sulla metanogenesi idrogenotrofa. Nel paragrafo 1.4, nell'ambito delle attività sperimentali svolte, è presentato un semplice protocollo per il test della SHMA in laboratorio, basato su test manometrici in batch. In dettaglio, si è testato il protocollo per analizzare le attività specifiche di tre fanghi anaerobici prelevati da tre diversi digestori municipali a scala reale. Sono state testate due apparecchiature manometriche, una con misurazione della pressione automatica (OxiTop®) e una con misurazione della pressione manuale (bottiglie standard). Le determinazioni dell'attività sono state condotte a una concentrazione di substrato tali da garantire di operare in condizioni di cinetica approssimabile all'ordine zero, considerata la più adatta a descrivere la cinetica di questi microorganismi [1]. Entrambi gli apparati hanno permesso di misurare la SHMA ma sono stati identificati alcuni vincoli soprattutto per l'apparato manometrico automatico.

Successivamente nel paragrafo 1.5, si riporta il lavoro svolto sullo sviluppo della metodica per la misura in modalità automatica della SHMA, con l'apparecchio MethaneTube®, sviluppato dall'azienda Biological Care in collaborazione con ENEA e l'università Agraria di Bologna per la misura di BMP in condizioni di campo. Era infatti di interesse per ENEA, oltre che per il fornitore, di valutare le potenzialità di impiego di tale apparecchio anche per la misura SHMA. In particolare, si sono analizzati e proposti sulla base della letteratura scientifica le condizioni ed i limiti di prova con riferimento a: pressione iniziale; volume di fango e di gas; metodo di miscelazione; risoluzione necessaria del pressostato; durata della prova e time-step di misurazione. Sulla base delle considerazioni e dell'analisi dei parametri operativi individuati si potrà procedere all'implementazione della metodica in campo in una successiva sperimentazione.

Introduzione

In questa sezione si riporta il lavoro svolto dal Politecnico di Milano nell'ambito dell' Accordo di programma MiSE-ENEA sulla Ricerca di Sistema Elettrico Piano Triennale di Realizzazione 2019-2021 Progetto 1.6 "Efficienza energetica dei prodotti e dei processi industriali". Il presente report fa riferimento all'attività LA 5.8. denominato "Sviluppo di metodiche per la gestione del processo di upgrading biologico ex-situ: misura dell'attività specifica idrogenotrofica (SHMA) e modellazione del processo". In dettaglio, nel primo anno si è svolta una approfondita indagine bibliografica sui metodi di misura della attività specifica di metanogenesi idrogenotrofica (Specific Hydrogenotrophic Methanogenic Activity - SHMA) attualmente esistenti. La SHMA è un parametro che esprime il carico massimo di H₂ che una determinata biomassa è in grado di convertire in CH₄ nel tempo. Permette quindi di caratterizzare un determinato fango o un determinato sistema ed eventualmente evidenziare, dalla misurazione nel tempo, eventuali fattori che inibiscono o esaltano la attività specifica come tossici e inibenti. Questo parametro riveste quindi un ruolo chiave nell'ottica di studiare sistemi in via sperimentale, sia in fase di progettazione della reattoristica e connessi parametri operativi del processo a diversa scala, sia come controllo del processo durante il suo funzionamento in continuo. Si è quindi impostata una semplice metodica di laboratorio per la sua misura, e quindi svolti dei test atti a valutarne l'applicabilità su diversi fanghi anaerobici. Si è poi svolta una analisi tecnica atta ad indicare le condizioni operative di una metodica per effettuare la misura della SHMA tramite l'utilizzo del MethanTube®, uno strumento sviluppato in collaborazione da ENEA e l'università Agraria di Bologna. Nell'ottica di ottimizzazione della configurazione impiantistica di processo prevista da Enea il lavoro sulla SHMA costituisce un fondamentale strumento di studio e comparazione delle diverse condizioni operative e tecniche.

1 Descrizione delle attività svolte e risultati

In questa sezione verranno forniti approfondimenti circa la metanogenesi idrogenotrofa, processo alla base del sistema di conversione dell'anidride carbonica e idrogeno a metano per via biologica. In maggior dettaglio, si inquadrerà il processo biochimico all'interno della catena trofica di degradazione anaerobica della sostanza organica; si descriveranno quindi la cinetica e la stechiometria della reazione, si forniranno dettagli circa le principali condizioni di processo quali pH alcalinità e ammoniaca, ed infine si riporteranno alcuni dettagli sui microorganismi, all'interno del dominio archaea, in grado di operare la metanazione biologica.

1.1 La metanogenesi idrogenotrofica: ruolo nella digestione anaerobica, stechiometria e cinetica

All'interno della catena di degradazione anaerobica del substrato organico riportato in Figura 1 Fasi del processo di digestione anaerobica [3]) hanno luogo innumerevoli reazioni simultanee e parallele, di tipo biochimico e fisico-chimiche [2]. Tra le reazioni biochimiche, ne sono state identificate quattro principali per descrivere l'intero processo: idrolisi, acidogenesi, acetogenesi e metanogenesi, il tutto realizzato dall'interazione sintropica di diversi consorzi archeo-batterici.

Le comunità microbiche anaerobiche possono essere classificate in due domini, batteri e archaea. In dettaglio, nella prima fase, batteri fermentanti e idrolitici, attraverso l'aiuto di enzimi, sono in grado di idrolizzare le macromolecole organiche complesse (carboidrati, proteine e grassi) in molecole più semplici. I metaboliti di questa fase sono i corrispettivi monomeri: monosaccaridi, aminoacidi, acidi grassi a catena lunga (LCFA) e alcoli [2]. Nella successiva fase di acidogenesi, alcuni anaerobi facoltativi, per esempio *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Paenibacillus* e *Streptococci* convertono monomeri solubili in vari prodotti metabolici gassosi e solubili, per esempio VFA, alcoli, CO₂ e H₂ [4].

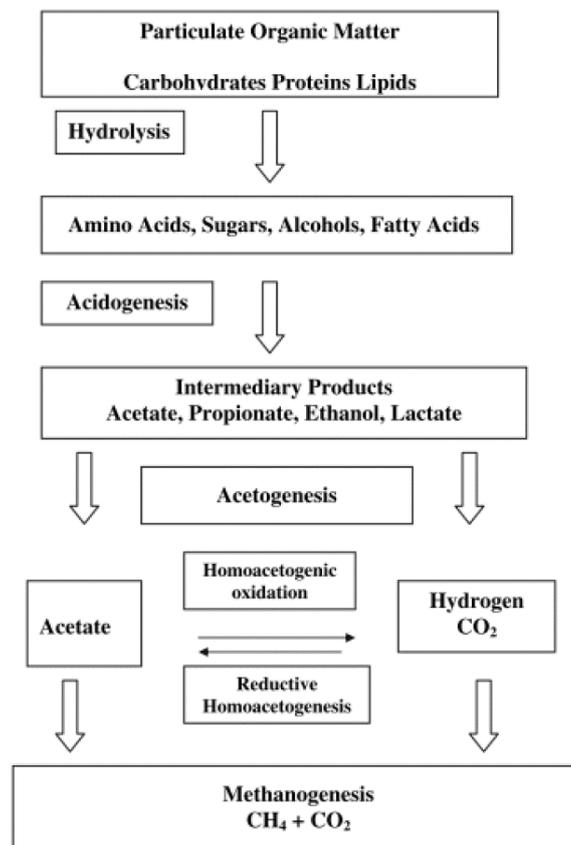


Figura 1 Fasi del processo di digestione anaerobica [3]

Nella terza fase, l'acetogenesi, i batteri acetogenici sintropici e produttori obbligati di H_2 ossidano in acetato gli acidi grassi a catena corta e lunga. L'acetogenesi sintropica è termodinamicamente favorevole solo a basse pressioni H_2 (<10 Pa) [5] e può avvenire solo in relazione sintropica con microrganismi H_2 -consumatori. La reazione sintropica inversa, detta omoacetogenesi riduttiva è eseguita principalmente dai generi *Clostridium* e *Acetobacterium* che crescono in modo chemio-lito-autotrofico su H_2 più CO_2 come fonte di energia e carbonio cellulare per produrre acetato. Infine, nella fase di metanogenesi, il CH_4 è prodotto sia da archaea metanogeni idrogenotrofi che utilizzano H_2 e CO_2 , sia da acetoclasti da acetato. CO_2 più H_2 e acetato, come descritto sopra, possono essere convertiti uno nell'altro attraverso la sintropia e la sua reazione inversa (omoacetogenesi).

Stechiometria della reazione

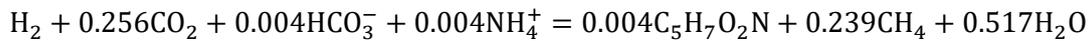
I microrganismi alla base del processo di upgrading, gli archaea idrogenotrofi sono detti chemio-autotrofi, ossia utilizzano CO_2 (o anche CO) nel metabolismo e appartenengono agli ordini *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobials*, e *Methanosarcinaceae* [6].

Essi utilizzano H_2 come donatore di elettroni e CO_2 come accettore di elettroni, come riportato nella seguente equazione [7]:



Su base molare, ogni 5 moli di reagenti gassosi si ritrovano nei prodotti 1 mole di metano gas e 2 di moli di acqua. Si osserva la necessità di disporre di 4 moli di H_2 per ogni mole di CO_2 che si voglia convertire a metano. Dunque, per far sì che il processo di upgrading biologico sia energeticamente sostenibile esso è solitamente associato al concetto di power to gas (PtG o equivalentemente P2G). Ossia quel processo che consente di stoccare l'energia in eccesso dalle rinnovabili in metano, passando attraverso uno step intermedio in cui viene prodotto idrogeno da elettrolisi necessario a convertire della CO_2 biogenica o di scarto [8].

La reazione di stechiometria complessiva, che include la crescita batterica espressa con formula chimica generica come CHON (carbonio idrogeno ossigeno e azoto), è invece riportata nella seguente equazione [9]:



Dalla reazione risulta una crescita molto ridotta [10], come tipico del metabolismo dei metanigeni ed un bilancio energetico molto favorevole. Questo è valutabile attraverso il bilancio del COD (Chemical Oxygen Demand) di reagenti e prodotti, come:

$$\text{COD}_{\text{substrato consumato}} = \text{COD}_{\text{nuova biomassa sintetizzata}} + \text{COD}_{\text{prodotti}}$$

Risulta infatti che per ogni mole di idrogeno consumato (16 gCOD/mol H₂) si ottengono circa 0,24 moli di metano (64gCOD/molCH₄), pertanto l'energia chimica associata all'idrogeno, si ritrova per il 96% nel metano.

Cinetica della reazione

La crescita degli idrogenotrofi e la conseguente produzione di metano può essere descritta con la cinetica di Monod, con una dipendenza di primo ordine rispetto alla concentrazione di biomassa, secondo la seguente equazione:

$$\mu = \mu_{\max} \prod_i^n \frac{S_i}{S_i + K_{S_i}}$$

Dove:

μ è la cinetica di crescita dei microorganismi

μ_{\max} è la massima cinetica di crescita

S_i è la concentrazione di substrato i-esimo

K_{S_i} è la costante di semisaturazione del substrato i-esimo

k_d è la costante di decadimento

La produttoria si riferisce alle concentrazioni dei due substrati H₂ o CO₂ disciolti, e altri termini che tengono conto del pH, ed eventualmente anche ai micronutrienti.

Tenuto conto del fatto che l'anidride carbonica disciolta è in genere non limitante, la crescita dei microrganismi metanigeni idrogenotrofi è generalmente espressa come:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{S + K_S} \cdot X$$

con S pari alla concentrazione di idrogeno e X alla concentrazione dei microrganismi metanigeni idrogenotrofi.

Tenuto conto della cinetica di scomparsa dei microrganismi metanigeni idrogenotrofi (k_d), la crescita netta è quindi data da:

$$\mu = \left(\mu_{\max} \frac{S}{S + K_S} - k_d \right) \cdot X$$

La velocità di conversione dei substrati (H₂/CO₂) a metano è quindi data dalla seguente espressione [11]:

$$r_x = \left(\frac{\mu_{max}}{Y}\right) \cdot \frac{X \cdot S}{(K_S + S)}$$

Dove:

μ_{max} è la massima cinetica di crescita

S è la concentrazione di substrato (idrogeno)

K_S è la costante di semisaturazione del substrato

X è la concentrazione di biomassa

Y è la resa di crescita della biomassa

Intervalli tipici dei parametri cinetici e stechiometrici contenuti nelle espressioni prima riportate sono mostrati in Tabella 1 Parametri cinetici della metanogenesi acetoclastica e idrogenotrofa [1,2,12,13]), a confronto con quelli per la metanogenesi acetoclastica oltre ai valori del tasso massimo di utilizzo specifico del substrato corrispondente a:

$$k_{max} = \mu_{max}/Y$$

Dove:

μ_{max} è la massima cinetica di crescita;

Y è la resa di crescita della biomassa.

Tabella 1 Parametri cinetici della metanogenesi acetoclastica e idrogenotrofa [1,2,12,13]

	Metanigeni acetoclasti	Metanigeni idrogenotrofi	
μ_{max}	0.1-0.4	0.15-4	d-1
k_{max}	2-7	25-35	gCOD/gCOD/d
K_S	50-600 (Acetato mgCOD/L)	1.56-13 (μ M) 5 (mM)	
Y	0.02-0.05	0.045-0.13	gSSV/gCOD
K_d	0.02-0.04	0.01-0.088	d-1

Gli idrogenotrofi mostrano sia maggiore affinità (K_S molto basse per entrambi i substrati) che un tasso di utilizzo specifico molto più alto rispetto agli acetoclasti, come dimostrato dal più alto valore di K_{max} , conseguente al più alto valore della costante di crescita massima. Si rileva peraltro anche una resa di crescita Y alquanto superiore. Nei comuni digestori anaerobici, la CO_2 è generalmente sempre disponibile in grande eccesso, per cui non risulta mai essere un substrato limitante [14]. È invece stato osservato che questi microrganismi lavorano solitamente in uno stato di substrato limitante riguardo l' H_2 [4] per via del loro ruolo regolatore della pressione parziale di H_2 da mantenere su valori inferiori di 10^{-2} Pa, inoltre se posti in condizioni di substrato non limitante (H_2), possono aumentare la loro attività metabolica di diversi ordini di grandezza [4].

pH, alcalinità e ammoniaca

La reazione di metanogenesi avviene per valori di pH compresi tra 6.5 a 8.5 (intervallo ottimale tra 7.0 e 8.0), al di sotto di 6.0 o oltre 8.5 risulta invece fortemente inibita. Inoltre il pH tende a salire in relazione ad accumuli di ammoniaca che avvengono ad esempio durante la degradazione delle proteine e a diminuire se vi è accumulo di acidi grassi volatili (VFA) in assenza di sufficiente potere tampone dato dall'alcalinità del substrato [15]. Per i valori di pH di interesse per la metanogenesi appena citati (tra 6 e 8) il principale sistema chimico che controlla il pH è il sistema di equilibrio acido-bicarbonato, che è collegato al pH o alla concentrazione di ioni idrogeno attraverso la seguente equazione:

$$[H^+] = K_1 \frac{[H_2CO_3]}{[HCO_3^-]}$$

La concentrazione di acido carbonico (H_2CO_3) è legata alla percentuale di anidride carbonica nel gas del digestore, K_1 è la costante di ionizzazione per l'acido carbonico, e HCO_3^- è la concentrazione di ioni bicarbonato, ossia parte dell'alcalinità totale del sistema. La concentrazione di ioni bicarbonato o alcalinità bicarbonica corrisponde a quella totale se la concentrazione di acidi volatili in soluzione è molto bassa [16]. In Figura 2 Relazione tra pH e concentrazione di bicarbonato e CO_2 in fase gas a 35°C [16]) vi è la rappresentazione di come il pH sia legato alla alcalinità e quindi alla % in volume di CO_2 nella fase gas in equilibrio con il liquido.

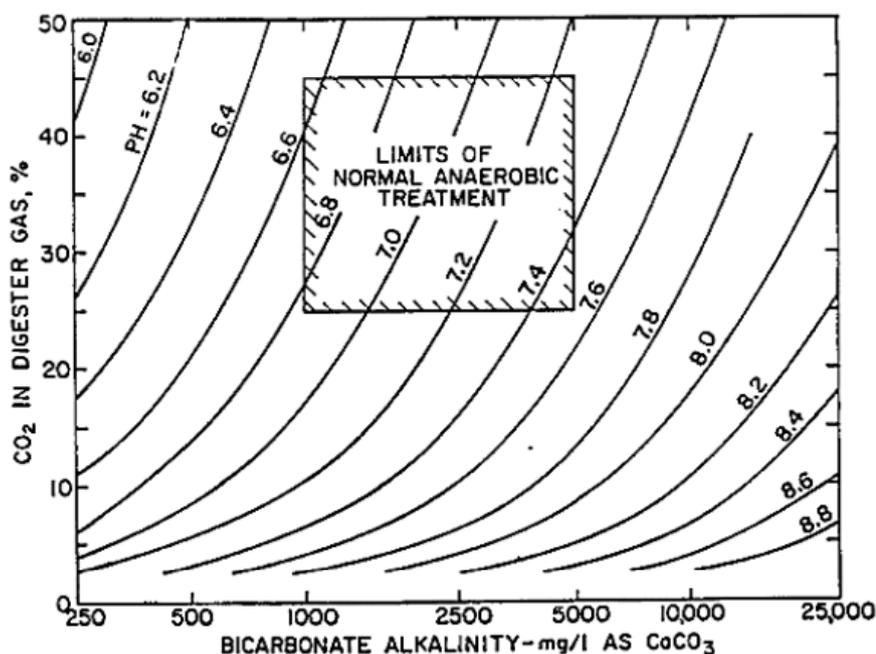


Figura 2 Relazione tra pH e concentrazione di bicarbonato e CO_2 in fase gas a 35°C [16]

Ammoniaca

Vari studi riportano che i metanigeni idrogenotrofi sono più resistenti ad alte concentrazioni di ammoniaca rispetto ai metanigeni acetoclasti [17]. Per questa particolare resistenza degli idrogenotrofi ad alti livelli di ammoniaca altri studi riportano che in corrispondenza di azoto ammoniacale pari a 3600 mg/L, su test svolti in un reattore batch, l'abbondanza relativa di idrogenotrofi è aumentata dal 2,3% al 7,0% [19]. Risulta inoltre che anche i batteri, potenzialmente sintropici associati ai metanigeni idrogenotrofi, si sono arricchiti in corrispondenza delle alte concentrazioni di ammoniaca [18].

Un recente studio, ha proposto un metodo innovativo per selezionare e arricchire un reattore di upgrading ex-situ attraverso l'aggiunta di cloruro di ammonio per aumentare la concentrazione di azoto ammoniacale. I risultati hanno mostrato che l'azoto ammoniacale ha un effetto significativo sulla produzione di CH_4 , che ha raggiunto il 94,1% quando la concentrazione di azoto ammoniacale era di 5500 mg/L. Le successive analisi microbiologiche hanno dimostrato che l'abbondanza relativa dei metanigeni idrogenotrofi aveva raggiunto un valore pari al 73,1%, mentre quella dei metanigeni acetoclasti era solo l'1,3%.

Micronutrienti

Per la crescita e la sopravvivenza dei microorganismi metanigeni risultano necessari diversi macro e micronutrienti. Tra i macronutrienti necessari, carbonio azoto fosforo e zolfo, il bisogno è di C:N:P:S=600:15:5:1. Oligoelementi come ferro, nichel, cobalto, selenio, molibdeno e tungsteno sono importanti

per la crescita e devono essere aggiunti se, ad esempio, si effettua mono-digestione di colture energetiche. Il nichel è generalmente richiesto per tutti i metanigeni perché necessario per la sintesi del cofattore cellulare F430, coinvolto nella formazione del metano [15].

Specie idrogenotrofiche

In letteratura, le analisi microbiche effettuate in reattori di digestione anaerobica hanno rivelato che le specie metanigene idrogenotrofiche sono in genere quelle più abbondanti (*Methanobacterium*, *Methanoculleus*, *Methanomicrobium* e *Methanothermobacter*) [20–22], mentre le specie metanigene acetoclaste (come *Methanosarcina*) sono in genere presenti in minore quantità. In particolare, *Methanobacterium* e *Methanothermobacter* risultano specie dominanti in varie configurazioni reattoristiche [23,24].

1.2 Metodi di misura dell'attività specifiche di metanogenesi

Si premette una breve introduzione sui metodi per la misura della attività metanogenica complessiva, che si osserva in presenza della degradazione di substrati organici e che è, come visto, dovuta alla attività contemporanea dei due ceppi metanigeni acetoclasti e idrogenotrofi, per poi passare all'analisi dei metodi più di recente allo studio per valutare l'attività metanigena dei soli idrogenotrofi.

Ci sono diverse possibilità per misurare l'attività metanogenica specifica. In termini generali, i metodi possono essere diretti o indiretti: i primi quando si tratta di un parametro direttamente legato all'attività come l'esaurimento di un substrato o di un prodotto nel tempo; i secondi quando si valuta la variazione di un parametro legato alla reazione chimico-fisica [25].

Tra i metodi diretti, quelli per la misura dell'attività metanigena possono essere ulteriormente distinti in metodo manometrico e volumetrico. Nel primo si misura la variazione di pressione nello spazio di testa e, quindi, la produzione o il consumo di gas, nel secondo si quantifica il volume di gas prodotto [25]. In entrambi i casi, la procedura si basa sul fatto che le reazioni biologiche comportano generalmente una produzione o un consumo di gas poco solubile, quindi dalla relazione tra la variazione di pressione misurata e la quantità di gas prodotta nel reattore è possibile ricavare l'attività specifica [26]. I test manometrici possono essere eseguiti sia utilizzando dispositivi automatici che con impostazione manuale: ad esempio, i metodi automatici possono impiegare sensori in grado di trasmettere il valore di pressione misurato su una membrana che è contenuta nello spazio di testa di un reattore di vetro sigillato. Nel 1984 Shelton e Tiedje [27] hanno perfezionato un metodo per determinare il potenziale di biodegradazione anaerobica con un trasduttore di pressione in esperimento batch, valutando la variabilità e la riproducibilità di questo metodo su più di 100 substrati. Un altro esempio di apparecchio automatico è il dispositivo Oxitop® (WTW, Xylem Inc.) sviluppato per la valutazione della domanda biologica di ossigeno BOD. Altrimenti, il metodo di valutazione manuale si basa sulla misurazione della pressione interna del reattore per mezzo di un manometro collegato tramite un ago direttamente ai setti di gomma. Questa procedura risulta essere molto dispendiosa in termini di tempo a causa del fatto che il test di attività spesso richiede più di 8 ore (tempo normale di lavoro del laboratorio) e richiede molto lavoro nel caso di un gran numero di repliche parallele [28].

Se la misura è riferita alla sola produzione di metano (e non di biogas), è necessario misurare la composizione del gas miscela durante la prova, sia in modalità manuale che automatica, oppure utilizzare una trappola per l'anidride carbonica (cioè NaOH) da posizionare all'interno del reattore (nei metodi manometrici) o sul flusso gassoso in uscita (nei metodi volumetrici) [26]. La misurazione automatica ha il vantaggio principale di consentire il monitoraggio a distanza del processo, ma generalmente, i costi e la manutenzione delle attrezzature come le membrane per la misurazione del gas sono più elevati rispetto alle attrezzature manuali. La misurazione del metodo volumetrico, basata sulla misurazione del volume di biogas o metano, anche in questo caso può essere eseguita sia manualmente che automaticamente. Ci sono diversi tipi di apparecchiature. Generalmente il reattore è collegato a un sistema di tubi di vetro dove il gas viene raccolto quando viene raggiunto un livello prestabilito, un sensore fotoelettrico aziona un motore che azzerava il volume e conta il numero di azzeramenti da cui si ottiene il volume di gas prodotto. In modalità manuale, si può utilizzare un pallone di Mariotte o un eudiometro. L'eudiometro consiste in un tubo di raccolta del gas montato sopra il reattore e un serbatoio; la produzione di biogas spinge la soluzione di barriera verso il

serbatoio, alterando così i due livelli. Dopo la lettura, il serbatoio viene abbassato per ripristinare i livelli, cioè per riportare la sovrappressione al valore atmosferico [25].

La opportunità di standardizzare le metodiche di misura dell'attività complessiva metanigena è da molti anni evidente ed è stata oggetto di molti studi, attività di gruppi di lavoro, circuiti inter-laboratorio, tutti mirati ad ottenere miglior ripetibilità e riproducibilità del metodo. Tra le esperienze più recenti e più rilevanti si segnala quella del gruppo avviato (Holliger, ENAC IIE Laboratory for Environmental Biotechnology) nel 2015, con 40 partecipanti da 30 laboratori di tutto il mondo, che ha portato a definire il numero minimo di repliche, la necessità di eseguire test bianco e controlli positivi, dei criteri per la durata del test, dettagli sul calcolo del BMP e, infine, criteri per il rifiuto dei test BMP [29]. Si sono anche poi definite altre caratteristiche che influenzano fortemente il risultato dei test: la tipologia di l'inoculo, la preparazione del substrato, l'impostazione del test e l'analisi dei dati con il fine ultimo di ottenere risultati validi e riproducibili. A livello italiano, si segnala poi la norma UNI/TS 11703, una norma tecnica che definisce un metodo di laboratorio, per la valutazione quantitativa e specifica della massima produzione di metano ottenibile a seguito digestione di matrici organiche liquide e solide condotte in mesofilia e ad umido, cioè su una miscela avente un tenore di solidi totali inferiore a 50 kg/m³ e in un campo di temperature compreso tra 35 e 42°C, oltre a definire tutte le condizioni e parametri di prova da adottare [30]. Analoghi studi e metodi sono stati negli anni proposti per la misura della attività di ceppi specifici del consorzio anaerobico che si sviluppa durante la degradazione di sostanza organica, quali i ceppi fermentativi idrolitici o i metanigeni acetoclasti, la cui attività viene misurata dosando acetato e prende il nome SAMA (Specific Aceticlastic Methanogenic Activity). Su tale misura si sono concentrati gli sforzi in letteratura verso la standardizzazione per questo specifico ceppo metanigeno [25];[1]. Solo di recente, in coincidenza con l'aumentare dell'interesse verso la metanogenesi idrogenotrofa, nasce l'esigenza e l'interesse di sviluppo di metodi per la misura di tale attività specifica SHMA.

1.3 Stato dell'arte sulla misura SHMA con discussione delle problematiche possibili e valori di riferimento della SHMA

In letteratura diversi autori hanno riportato valori di SHMA [1;27–33] in un ampio range di valori. Tutte le misure riportate fanno riferimento a due principali metodologie, sviluppate anni fa, volte a caratterizzare le diverse attività metanogeniche: Dolfig & Bloeman [38] e Coates et al., [39]. Entrambi sono metodi manometrici e non volumetrici, infatti le misure volumetriche non sono adatte in questo caso perché la conversione dell'H₂/CO₂ in metano genera, da 5 moli gassose dei reagenti, 1 mole di gas metano e non avviene dunque una produzione netta di gas, misurabile. Nella metodica di Dolfig & Bloeman [38] si associava alla misura della pressione anche la misura della composizione del gas ad ogni punto di campionamento, cosa che comportava la necessità di pressurizzare nuovamente con H₂/CO₂ le vials, aumentando quindi il rischio di perdita di gas e il numero di analisi. Inoltre vi è troppa vicinanza tra il limite di rilevamento GC del metano nei primi punti di misura del test di attività per via delle piccole quantità di CO₂ convertita, andando quindi ad aumentare l'errore sperimentale. La metodologia di Coates et al., [39] è sempre basata sulla misurazione della pressione dello spazio di testa ma senza misura del gas, in cui per determinare le moli di metano si considera che ad ogni passo temporale le moli di metano sono ¼ (secondo stechiometria della reazione di conversione H₂/CO₂) della variazioni di moli totali istante per istante. Per massimizzare l'interfaccia tra liquido e gas e quindi facilitare il trasferimento dell'idrogeno gas alla fase liquida, oltre all'adozione di un rapporto 1:5 tra volume liquido e volume dello spazio di testa Coates et al., [39], hanno anche posto le vials (cilindriche) all'interno dell'incubatore in posizione orizzontale anziché verticale.

Più recentemente, stante il grande interesse per il processo di upgrading del biogas chemoautotrofico vi è stata una nuova spinta nello studio della misura dell'attività SHMA e di conseguenza l'esigenza di sviluppare un protocollo verso una standardizzazione [1]. In Tabella 2 Caratteristiche dei protocolli SHMA da letteratura) si riporta uno schema con le principali caratteristiche dei principali protocolli ritrovati in letteratura.

Tabella 2 Caratteristiche dei protocolli SHMA da letteratura

	Dolfing & Bloeman [38]	Coates et al., [39]	Ripoll et al., [1]
Modalità test	Manometrico+ misura comp. gas +pressurizzazione dopo ogni misura GC	Manometrico	Manometrico
Pressione [atm] e (H₂/CO₂) iniziale	1 (80/20 H ₂ /CO ₂)	1,48 (80/20 H ₂ /CO ₂)	1 (80/20 H ₂ /CO ₂)
Fango tipologia	granulare	granulare	Granulare e disperso
Concentrazione fango [gVSS/L]	2-5	3	n.r.
Rapporto volume liquido/volume spazio di testa [-]	-	1:5	1:2
Valore agitazione [rpm]	-	180 Vials orizzontali	180
Durata del test [h]	<24	10	8-10
Temperatura [°C]	30	37	30

Le condizioni dei test indeterminate dai diversi metodi, oltre all'utilizzo o meno della composizione del gas ad ogni punto di misura, sono la durata, la pressione iniziale la tipologia di fango, la velocità di agitazione, la durata del test e la temperatura di prova. A tal proposito si riportano quindi in Tabella 3 Valori di SHMA e SAMA di letteratura) valori di SHMA e SAMA per diversi fanghi prelevati da diversa scala presenti in letteratura. Molti test differiscono per il valore di temperatura in funzione del fango utilizzato nella prova, si ritrovano infatti test SHMA per i fanghi mesofili a diverse temperature: 30 °C a 35 °C e a 37 °C (Tabella 3 Valori di SHMA e SAMA di letteratura). Una metodica standard prevedrebbe un valore di riferimento, tuttavia si ritiene che i test di attività dovrebbero essere eseguiti in condizioni che mimino l'ambiente di un dato sistema, per esempio, temperatura, pH e miscelazione [29]. E' per questo motivo inoltre che si osservano SHMA in un ampio range per una stessa tipologia di fango e stessa scala, ad esempio per fanghi WWTP su scala laboratorio si hanno valori da 16 a 319 NmICH₄/gVS/d. Queste differenze possono essere dovute anche ad altre caratteristiche quali tipologia di fango, granulare o sospeso.

Tabella 3 Valori di SHMA e SAMA di letteratura

Scala	Tipo reattore	Caratteristiche fango/substrato	Temp. °C	SHMA	SAMA	Riferimento
				NmICH ₄ /gVS/d		
Laboratorio	CSTR	WWTP	35	87*	-	[40]
Laboratorio	CSTR	WWTP	35	359**	-	
Laboratorio	UASB	Etanolo	37	385	154	
Laboratorio	UASB	Carboidrati	37	655	252	[41]
Laboratorio	UASB	Proteine	37	655	200	
Scala reale	IG	Alcoli	37	51	78	[42]
Laboratorio	EGSB.AF	VFA	37	298	371	
Scala reale	CSTR	WWTP	37	193	53	[33]

Scala reale	UASB	Birreria	37	277	116	
Scala reale	CSTR	Caseario/pesce	37	294	102	
Laboratorio	CSTR	Glicerina/maiale	37	130	4	
Scala reale	CSTR	Processi dello zucchero	37	158	81	
Scala reale	CSTR	Processi del lievito	37	291	18	
Scala reale	UASB	Birreria	30	200	112	[32]
Laboratorio	CSTR	WWTP	35	6	9	[43]
Laboratorio	CSTR	WWTP	35	7	19	
Laboratorio	Hybrid FF	WWTP	37	319	175	[35]
Laboratorio	CSTR	Latte magro	35	252	74	[31]
Scala reale	CSTR	WWTP	35	16	5	[34]
* pre- arricchimento; ** post-arricchimento						

Alcuni autori [39,44] hanno scelto di operare con basse concentrazioni di biomassa per prevenire eventuali effetti negativi della resistenza al trasferimento di massa di H₂ al liquido. Tuttavia, l'adozione di una la bassa concentrazione di biomassa ha determinato, nei primi test svolti, durate maggiori di 70 ore per un fango granulare [39]. In test successivi, gli stessi autori hanno scelto di valutare l'influenza della concentrazione della biomassa sul valore di attività sia per SAMA che per SHMA, sempre per fanghi granulari. I risultati di questi test hanno rivelato che all'aumentare della concentrazione della biomassa, tra 1.5 e 9.5 g/L, l'attività tende a scendere per SHMA da 15 a 5 mICH₄/gVSS/h. Diverso invece il comportamento per la SAMA, il cui valore all'aumentare della concentrazione di biomassa rimane pressoché costante, (Figura 3 Influenza della concentrazione di fango nei test SAMA e SHMA (a sx), influenza della pressione parziale di H₂ sull'attività specifica SHMA per fanghi granulari (a dx) [39]).

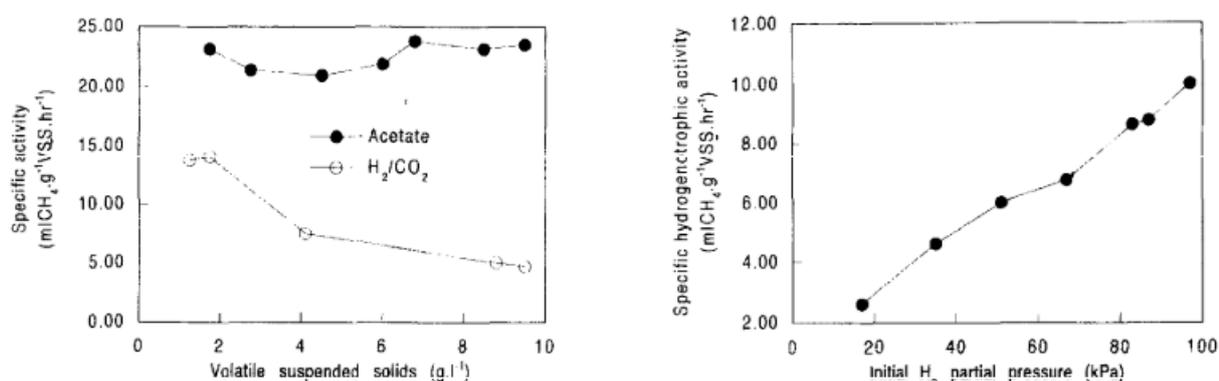


Figura 3 Influenza della concentrazione di fango nei test SAMA e SHMA (a sx), influenza della pressione parziale di H₂ sull'attività specifica SHMA per fanghi granulari (a dx) [39]

I lunghi tempi di prova osservati, tuttavia, implicano una interferenza nella misura a causa della crescita microbica significativa. Basse concentrazioni di biomassa < a 0,3 SSV·g L⁻¹ utilizzate anche da Batthad et al., [31], hanno determinato durata delle prove di circa 50-100 h.

Ripoll et al., [1] hanno stimato che adottando minori durate, ad esempio in un test di 8-10 h la crescita microbica risulta trascurabile e corrisponde circa al 0,8-1,2% degli SSV inizialmente presenti, nell'ipotesi che la resa di crescita Y della specie idrogenotrofica sia pari a 0,06 gCOD_{biomassa}/gCOD H₂ [11]. Pertanto, l'effetto della crescita microbica, così come del decadimento cellulare, la cui cinetica in accordo a Batsone ADM1 [11] è circa il 10% della crescita, possono essere ritenuti trascurabili solo in caso di basse durate.

Altro aspetto fondamentale è la pressione parziale di H₂ all'inizio della prova: è stato dimostrato che all'aumentare di questo valore aumenti in maniera lineare l'attività specifica misurata. In particolare volendo operare con una miscela stechiometrica (80/20 H₂/CO₂) e quindi con una pressione parziale dell'80% si ottiene una attività di poco sotto quella che si otterrebbe con pressioni parziali di H₂ pari a 100% (Figura 3 Influenza della concentrazione di fango nei test SAMA e SHMA (a sx), influenza della pressione parziale di H₂ sull'attività specifica SHMA per fanghi granulari (a dx) [39]). Operare al 100% di H₂ è peraltro possibile una volta verificato di avere disponibilità di CO₂ presente nel fango di prova, altrimenti si andrebbe incontro ad una situazione di substrato limitante.

Altro aspetto rilevante per i test è, come menzionato in precedenza, il valore di agitazione che influisce direttamente con il trasferimento di H₂ alla biomassa e quindi sul valore di attività specifica. Coates et al. [39], hanno dimostrato l'influenza del valore rpm sul valore misurato di SHMA come mostrato in Figura 4 Influenza del valore rpm sull'attività specifica SHMA [39]. Come si evince chiaramente dalla figura, l'attività massima è riscontrata per valori intorno ai 180 rpm.

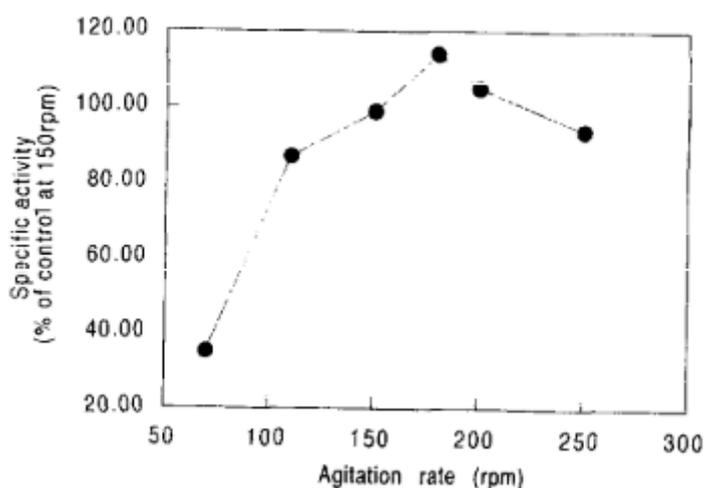


Figura 4 Influenza del valore rpm sull'attività specifica SHMA [39].

1.4 Esperienze sperimentali preliminari allo sviluppo di un protocollo

Sulla base della letteratura consultata, è stata ideata e studiata una modalità di misura in condizioni mesofile che, anche seguendo le raccomandazioni dei metodi per BMP, prevedesse bianco e duplicato di prova e condizioni di prova che non determinassero limitazioni.

Si riportano inoltre le prove sperimentali svolte sulla misura dell'attività specifica idrogenotrofica secondo il protocollo semplificato sviluppato. In particolare si sono definiti la durata, la concentrazione della biomassa, il valore di miscelazione la temperatura e la procedura del test oltre che le elaborazioni ed il trattamento dei dati sperimentali per ottenere il valore di SHMA. Viene di seguito riportato il protocollo di prova con inseriti dove necessario alcuni dettagli sulle scelte operate.

Descrizione del protocollo di misura della SHMA semplificata in condizioni mesofile

- Utilizzo di 3 vials per prova (1 bianco + 2 duplicati) da 322 ml Oxitop e 570 ml per bottiglie Standard
- Acclimatazione del fango da sottoporre a misura, per una notte in una cella termostatica alla temperatura di prova di 35°C;
- Le vials di prova hanno un rapporto tra il liquido del fango e il volume dello spazio di testa fissato pari a 1:1.

- La concentrazione di solidi volatili (VS) è stata impostata per essere non inferiore a 5 g/L per fanghi sospesi (3 g/L per fanghi granulari [39]), aggiunta eventuale di acqua per regolare la concentrazione finale VS fino a concentrazione desiderata;
- Aggiunta soluzione di oligoelementi con una proporzione del 10% al volume del liquido. Soluzione è riportata in Tabella 6 Ricetta della soluzione di oligoelementi impiegata nel test SHMA)
- Regolazione del pH iniziale nell'intervallo 7-8 se il suo valore era al di fuori dell'intervallo;
- Le vials chiuse con setti forabili in gomma e flussate per 5 minuti con N₂, e di nuovo per 5 minuti con la miscela di gas reagente H₂/CO₂ (80/20 %) pressurizzate a 1,2 atm. Il flussaggio di gas (mostrato in Figura 5 Sistemi del flussaggio di gas per OxiTop® (a sinistra) e per STB (a destra)) è stato eseguito con un sistema di 2 aghi infilati nei setti, uno collegato direttamente al cilindro contenente la miscela di gas di prova o N₂, l'altro collegato a una bottiglia che sfiatava sotto battente liquido per evitare ingressi indesiderati di O₂;
- Sono state misurate le composizioni dei gas di testa allo stato iniziale come misura di controllo dei reagenti iniettati, questo test è necessario per valutare la corretta immissione di reagenti e non determina problematiche alla prova;
- Tutte le vials sono state poi incubate in un agitatore termostatico (MPM Instruments s.r.l, Italia) a 35°C con una velocità di miscelazione di 150 rpm valore massimo possibile dello shaker utilizzato;
- Durata del test di 6 h;
- Durante il test, la pressione dello spazio di testa è misurata ogni 30 minuti nel set-up standard della bottiglia, mentre il sistema automatico OxiTop® ha fornito automaticamente 1 punto di pressione misurato ogni 12 minuti.

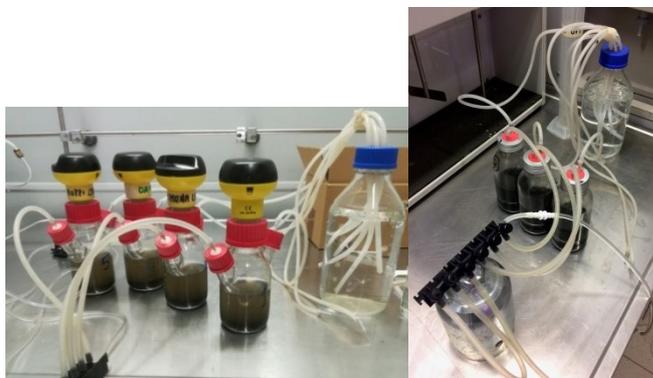


Figura 5 Sistemi del flussaggio di gas per OxiTop® (a sinistra) e per STB (a destra)

L'attività sperimentale ha previsto la misura dell'attività specifica su 3 fanghi provenienti da tre digestori municipali a scala reale. Gli esperimenti avevano come scopo quello di valutare il protocollo per una misura manometrica utilizzando due diversi apparati uno di tipo automatico ed uno di tipo manuale.

Il primo set up, OxiTop® (WTW, Xylem Inc.) è costituito da una bottiglia di vetro (V= 0,322 L) con due fori laterali sigillati da setti di gomma per le iniezioni di gas e lo sfiato (Figura 6 Bottiglia di OxiTop® (a sinistra) e bottiglie standard (a destra) utilizzate nelle prove in batch) e un trasduttore di pressione più data logger situato all'interno della testa.



Figura 6 Bottiglia di OxiTop® (a sinistra) e bottiglie standard (a destra) utilizzate nelle prove in batch

Durante il test batch, la riduzione di pressione (P) dovuta al consumo di H₂ è misurata in hPa e registrata automaticamente. Un trasduttore OxiTop®, pur consentendo un andamento semi-continuo e automatico della pressione, è in grado di misurare una variazione di pressione entro un range di $\pm 0,350$ hpa (0,345 atm), fuori da questo range la misura viene interrotta. Il secondo apparato consisteva in vials di vetro (V=0,570 L) dotate di setti di gomma e tappi di alluminio (d'ora in poi bottiglie Standard o STB) in cui la pressione viene misurata manualmente per mezzo di un manometro. Tutte le prove sono state effettuate in duplicato con un bianco (Tabella 4 Panoramica dei test SHMA eseguiti).

Tabella 4 Panoramica dei test SHMA eseguiti

WWTPs	OxiTop®	STB	bianco
Sesto S. Giovannia)	2	2	2 (1 per ogni apparato)
Bresso b)	2	2	2 (1 per ogni apparato)
Cremona c)	2	2	2 (1 per ogni apparato)

Caratteristiche dei fanghi e ricetta degli elementi in tracce

I fanghi anaerobici sono stati prelevati da digestori mesofili di 3 impianti di trattamento delle acque reflue a scala reale (Sesto San Giovanni, Bresso e Cremona) che hanno una capacità rispettivamente di a): 220'000, b): 180'000 e c): 150'000 abitanti equivalenti (AE). Le caratteristiche principali di tutti e tre i fanghi testati, sono riportate nella Tabella 5 Caratteristiche dei tre fanghi anaerobici testati), mentre la ricetta degli oligoelementi utilizzati per fornire elementi utili alla biomassa sono riportati in Tabella 6 Ricetta della soluzione di oligoelementi impiegata nel test SHMA).

Tabella 5 Caratteristiche dei tre fanghi anaerobici testati

Parametri	A(SSG)	B(Br)	C(Cr)
HRT	20	25	20
pH	7.39	7.17	7.37
Alcalinità [mgCaCO ₃ /l]	7676	5666	8454
CODs [mgCOD/l]	217	121	212
SST [g/l]	12.9	25.7	37.3
SSV [g/l]	9.8	15.8	19
Acido acetico [mg/l]	290	123	86.76

Tabella 6 Ricetta della soluzione di oligoelementi impiegata nel test SHMA

Elementi in traccia sciolti in 1 litro di acqua	g
Anhydrous potassium dihydrogen phosphate (KH ₂ PO ₄)	0.27
Disodium hydrogen phosphate dodecahydrate (Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O)	1.12
Ammonium chloride (NH ₄ Cl)	0.53
Calcium chloride dihydrate (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	0.075
Magnesium chloride hexahydrate (MgCl ₂ ·6H ₂ O)	0.1
Iron (II) chloride tetrahydrate (FeCl ₂ ·4H ₂ O)	0.02
Sodium sulphide nonahydrate (Na ₂ S·9H ₂ O)	0.1

Valutazioni cinetiche e criteri della procedura SHMA

La cinetica di consumo di H₂/CO₂ per produrre metano può essere considerata una cinetica di tipo Monod [11]. Quindi, per ottenere la massima attività specifica, il test deve essere una cinetica di ordine zero rispetto al substrato. In questo caso, la concentrazione di idrogeno deve essere molto superiore alla sua costante di semisaturazione ($S \gg K_s$). Valori di K_s nell'intervallo 0,01-0,6 mgCOD/L (8gCOD/gH₂) sono stati riportati in letteratura [45].

Partendo dalla concentrazione di H₂ disciolto si ha che questa è pari alle moli in soluzione per il peso molecolare dell'H₂:

$$C_{H_2} = n_{H_2} \cdot PM_{H_2}$$

Per ricavare le moli di H₂ bisogna calcolare la frazione molare di idrogeno disciolto come rapporto tra la pressione parziale dell'H₂ e la costante di Henry H, pari alla solubilità dell'H₂ in soluzione acquosa ($H = 7,4 \cdot 10^4$ atm a 35°C):

$$x_{H_2} = \frac{P_{H_2}}{H}$$

e la pressione parziale di idrogeno si ricava dalla pressione totale iniziale dello spazio di testa pari a 1,2 atm H₂/CO₂ (80/20):

$$P_{H_2} = P_{tot} \cdot \frac{H_2}{CO_2} = 1.2 \cdot 0.8 = 0.96 \text{ atm}$$

Dove P_{H_2} è la pressione parziale di H₂, P_{tot} è la pressione di iniziale prova. Quindi, assumendo che il valore di solubilità dell'H₂ in soluzione acquosa (a 35°C è $H = 7,4 \cdot 10^4$ atm) possa essere valido anche per i fanghi, la frazione molare di H₂ pari a x_{H_2} (rapporto tra le moli di gas dissolte e le moli di liquido) secondo Henry è:

$$P_{H_2} = H \cdot x_{H_2} \quad [atm]$$

$$x_{H_2} = \frac{P_{H_2}}{H} = \frac{0.96}{7.4 \cdot 10^4} = 1.29 \cdot 10^{-5} \quad [-]$$

Sapendo che le moli totali (n_{t,H_2O}) presenti in 1 litro di liquido (non considerando i soluti) sono:

$$n_{t,H_2O} = \frac{P_{water}}{PM_{water}} = \frac{1000}{18} = 55.6 \text{ [mol/L]}$$

E' quindi possibile calcolare il numero di moli di H_2 (n_{H_2}) presenti in soluzione acquosa:

$$n_{H_2} = x_{H_2} \cdot n_{t,H_2O} = 1.29 \cdot 10^{-5} \cdot 55.6 = 7.21 \cdot 10^{-4} \left[\frac{\text{mol } H_2}{L} \right]$$

E quindi la concentrazione di H_2 nella soluzione acquosa in equilibrio con la precedentemente calcolata pressione parziale P_{H_2} è:

$$C_{H_2} = n_{H_2} \cdot PM_{H_2} = 7.21 \cdot 10^{-4} \cdot 2 \cdot 10^3 \left(\frac{\text{mg}}{g} \right) = 1.44 \left[\frac{\text{mg } H_2}{L} \right] \cdot 8 \left[\frac{\text{gCOD}}{\text{g } H_2} \right] = 11.52 \left[\frac{\text{mgCOD}}{L} \right]$$

Quindi la condizione di cinetica di ordine zero ($S \gg K_s$) prendendo in considerazione il valore di K_s più conservativo pari a 0,6 mgCOD/L equivalente a 0.075 mg H_2 /L, viene rispettata finche viene raggiunto un valore di pressione parziale di idrogeno pari a 0,05 atm. Questo valore di pressione si determina invertendo le formule precedentemente presentate.

Il valore della SHMA viene infine espresso in $\text{NmLCH}_4 \cdot \text{gVS}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ cosi come di seguito riportato:

$$\text{SHMA} = \frac{dV_{CH_4}}{dt} \frac{1}{X} \cdot 24h$$

Dove: X (gVS) è il contenuto di VS della biomassa testata; $dV(CH_4)/dt$ $\text{NmLCH}_4 \cdot \text{h}^{-1}$ la pendenza della produzione cumulativa di metano.

Elaborazione dati di pressione e procedura di calcolo SHMA

Il primo passo della procedura di calcolo è quello di rimuovere la produzione di gas, anche se molto bassa, della prova in bianco. Ad ogni step temporale, il valore della pressione del bianco viene sottratto al valore della pressione di prova come riportato nell'equazione (1).

La produzione di CH_4 , ad ogni passo, è quindi derivata dalla misurazione della pressione dello spazio di testa del gas (2), assumendo che la riduzione della pressione sia dovuta alla sola reazione di H_2 e CO_2 a dare CH_4 . Le moli di gas CH_4 prodotte al passo $i+1$ sono uguali alla differenza tra le moli di gas al passo i e le moli di gas al passo $i+1$ divise per il valore stechiometrico pari a 4 equazione (3) cosi come indicato da Coates et al., [39]. Quindi, il volume di metano volume per ogni step (mLCH_4) viene calcolato moltiplicando le moli di metano per il volume molare a 35°C (25.28 L/mol) (4):

$$P_{net} = P_i - P_{i,blank} \quad (1)$$

$$n_{tot(i)} = \frac{(P_{net}) \cdot V_{headspace}}{R \cdot T} \quad (2)$$

$$n_{CH_4(i+1)} = \frac{n_{tot(i)} - n_{tot(i+1)}}{4} \quad (3)$$

$$(\text{NmLCH}_4)_{i+1} = n_{CH_4(i+1)} \cdot \left(\frac{22.414}{25.28} \right) \quad (4)$$

Il limite inferiore di validità della cinetica di ordine zero prima calcolato (pressione parziale H_2 nello spazio di testa pari a 0.05 atm), non è comunque mai stato raggiunto né con l'apparato automatico, né con il misuratore manuale.

Nel calcolo della costante cinetica K_0 , sono state prese in considerazione le fasi di lag che hanno influenzato le prove. In particolare, è stato considerato solo il tratto di linea retta dopo la fase di lag (circa 2 h). Per i replicati, statisticamente simili, K_0 è stato riportato per una linea di regressione cumulativa media, mentre per i replicati considerati statisticamente diversi, K_0 è stato riportato singolarmente per ogni duplicato.

Metodi analitici

I solidi totali (TS) e volatili (VS) sono stati misurati secondo i metodi standard APHA [45]. Il COD totale è stato determinato secondo il metodo 5130 APAT/IRSA-CNR (2003) [46], Analytical Methods for Water mediante digestione con $K_2Cr_2O_7$ e H_2SO_4 95-96% (Velp Scientifica, Digestore riscaldante ECO6) e titolazione con FAS (solfato ferroso di ammonio). Le misure di pressione manuali sono state effettuate con un manometro digitale (Keller LEO 2) forando il setto di gomma della vials. La composizione dei gas (CO_2 , CH_4 , H_2 , O_2 , N_2) è stata analizzata mediante gascromatografia (DANI Master GC Analyser dotato di due colonne HayeSep Q e Molesieve 5A). Il pH è stato misurato direttamente nei campioni per mezzo di un misuratore portatile multi-sonda (Hach-Lange, HQ40D).

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il software SPSS v.25 allo scopo di valutare statisticamente la riproducibilità dei replicati per ogni campione di fango dei due apparati utilizzati. Poiché le variabili non erano normalmente distribuite, è stato utilizzato il test non parametrico Mann-Whitney U (livello di significatività = 0,05). L'ipotesi nulla (H_0) è che i replicati siano statisticamente riproducibili, e viene accettata se il valore p è $>0,05$ altrimenti viene rifiutata.

Risultati

In Figura 7 Andamento della pressione [atm] e del metano cumulativo [ml CH_4] durante le prove SHMA effettuate con l'apparato OxiTop® a) b) e c)) sono riportati gli andamenti della pressione nei reattori OxiTop® e la produzione cumulativa di CH_4 nel tempo, per tutti e tre i campioni più i relativi bianchi.

Sebbene, come spiegato in precedenza, per il calcolo delle costanti cinetiche sia stato considerato solo l'intervallo di tempo di 6 ore, per permettere un confronto diretto tra i due apparati, nel caso della misura di Oxitop® sono riportate le curve registrate fino a quando i dispositivi automatici sono usciti dal range di misurabilità (10, 12 e 20 h).

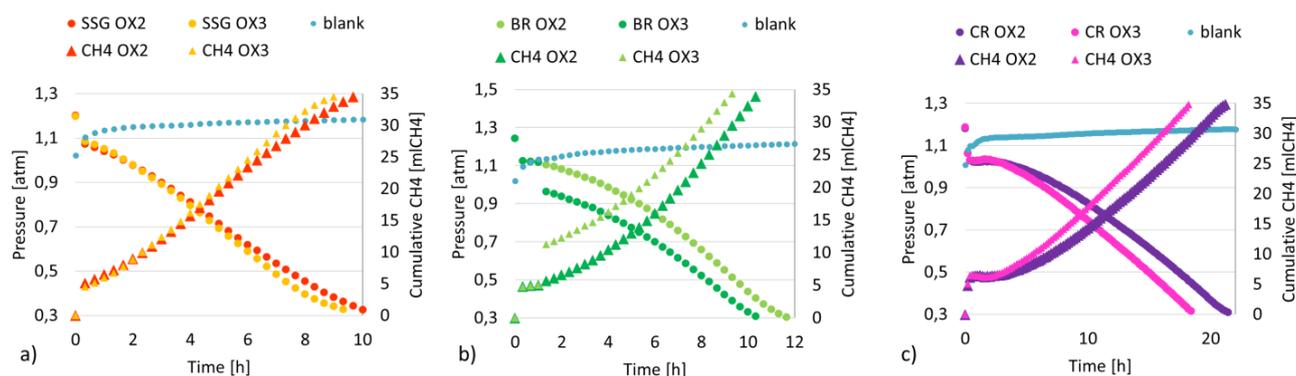


Figura 7 Andamento della pressione [atm] e del metano cumulativo [mLCH₄] durante le prove SHMA effettuate con l'apparato OxiTop® a) b) e c)

Nonostante tutti i campioni siano stati prelevati da digestori di impianti municipali a scala reale operanti in condizioni mesofile e con HRT simili, hanno dimostrato attività diverse, constatabili in via qualitativa: il fango a) è uscito dal range misurabile in 10 ore, b) in 12 ore, mentre il più lento c) è uscito da questo range in circa 20 ore.

All'inizio della prova batch, i campioni hanno mostrato una fase di ritardo variabile dovuta all'adattamento per le perturbazioni generate dalla fase di flussaggio dei reagenti nello spazio di testa, e una possibile piccola diminuzione della temperatura per permettere le operazioni di flussaggio mostrate in Figura 5 Sistemi del flussaggio di gas per OxiTop® (a sinistra) e per STB (a destra)). Questo aspetto deve essere considerato in fase di elaborazione, andando a considerare i punti a partire dalle 2 ore in su. Da notare che, a partire dall'ottava ora, a) e b) in Figura 4), hanno cambiato pendenza indicando un andamento di esaurimento del substrato più approssimato alla cinetica di primo ordine, a causa di una possibile limitazione del substrato.

I campioni relativi ai fanghi c), hanno invece mostrato la stessa pendenza per tutta la durata del test. Questo aspetto potrebbe essere legato non al fatto che la sia stata raggiunta la concentrazione limite del substrato, ma al fatto che il suo trasferimento nel liquido fosse stato limitato. Qualitativamente, una buona riproducibilità dei replicati è stata osservata nel fango a) mentre bassa per b) e c).

Tuttavia, l'analisi statistica effettuata con il test Mann-Whitney U, ha mostrato che la riproducibilità tra replicati è risultata essere statisticamente significativa per i fanghi a) e c) ma non per b) (SSG_ox; CR_ox; BR_ox; p-values rispettivamente 0.762, 0.406 e 0.019), quindi l'ipotesi H_0 per i replicati dei fanghi b), per il dispositivo automatico, è stata rifiutata come riportato in Figura 8 Riassunto dei test di ipotesi per valutare la riproducibilità tra ogni coppia di duplicati).

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of SSG_ox is the same across categories of Replicate.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,762	Retain the null hypothesis.
2	The distribution of SSG_st is the same across categories of Replicate.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,762 ¹	Retain the null hypothesis.
3	The distribution of BR_ox is the same across categories of Replicate.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,019	Reject the null hypothesis.
4	The distribution of BR_st is the same across categories of Replicate.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,887 ¹	Retain the null hypothesis.
5	The distribution of CR_ox is the same across categories of Replicate.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,406	Retain the null hypothesis.
6	The distribution of CR_st is the same across categories of Replicate.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,291 ¹	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

¹Exact significance is displayed for this test.

Figura 8 Riassunto dei test di ipotesi per valutare la riproducibilità tra ogni coppia di duplicati

In Figura 9 Andamento della pressione [atm] e del metano cumulativo [mICH₄] durante il test SHMA eseguito con l'apparato dette bottiglie standard: a) b) e c)) sono presentati l'andamento della pressione effettuata con il sistema con bottiglie dette standard.

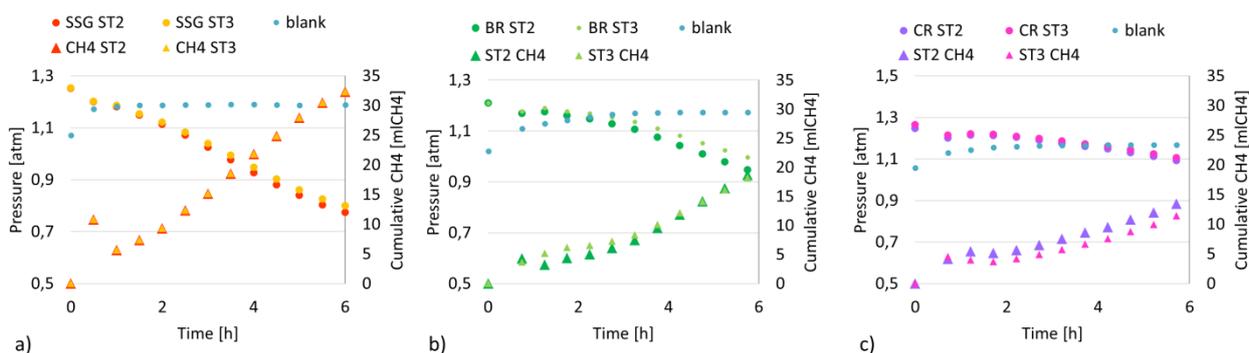


Figura 9 Andamento della pressione [atm] e del metano cumulativo [mICH₄] durante il test SHMA eseguito con l'apparato dette bottiglie standard: a) b) e c)

All'inizio di questa serie di prove batch, è stata osservata una fase di ritardo più breve rispetto all'apparato automatico, probabilmente a causa del maggiore volume di fango e un conseguente minore effetto della leggera variazione di temperatura. Con questo apparato non è possibile ottenere misure semi-continue, tuttavia consente di misurare l'andamento della pressione in una gamma più ampia di valori.

E' stato effettuato un test statistico per valutare la riproducibilità dei duplicati di prova, che qualitativamente mostravano essere più simili se confrontati con i duplicati del device automatico. Il test Mann-Whitney U ha rilevato che i duplicati sono in effetti statisticamente significativi per tutti i campioni (p-valori pari a 0,762; 0,887 e 0,291 per a) b) e c), l'ipotesi H_0 è stata sempre accettata (Figura 8 Riassunto dei test di ipotesi per valutare la riproducibilità tra ogni coppia di duplicati).

Infine in Tabella 7 Costante cinetica K_0 per ogni replica per tutti i fanghi testati) si può notare che la costante cinetica maggiore risulta quella relativa al fango a), poi a scalare quella del digestore b) e infine c). Inoltre, per i fanghi a) e b) entrambi i dispositivi hanno registrato un valore della costante cinetica simile. Mentre nel caso del fango c), il metodo manuale ha fornito valori simili tra le repliche, mentre le repliche registrate con il metodo automatico mostrano valori anomali. Le possibili cause sono attribuibili ad una perdita di pressione dovuta ad una possibile intrusione di aria attraverso i setti.

Tabella 7 Costante cinetica K_0 per ogni replica per tutti i fanghi testati

K_0 [mlCH ₄ /VS h]	OxiTop			STB		
	Replica 1	Replica 2	st.dv	Replica 1	Replica 2	st.dv
	a)	2.56	2.76	0.14	2.78	2.66
b)	1.0	0.98	0.01	0.97	0.96	0.01
c)	0.05	0.14	0.06	0.60	0.52	0.06

La Figura 10 Andamento cumulativo specifico del metano espresso in [mlCH₄ /gVS] per ogni campione di fango per i due apparati: a) b) e c) mostra per ogni campione di fango (a) b) e c) le curve di regressione lineare CH₄ cumulato normalizzate per la massa di solidi volatili (SV). Per ogni duplicato statisticamente riproducibile è stata riportata una curva ogni coppia di repliche, nel caso invece del fango b) (risultate statisticamente dissimili) è stata presentata una curva di regressione lineare per ogni replica.

Dalle curve direttamente confrontabili, entrambi i dispositivi hanno fornito pendenze simili per i fanghi a) e b), e non sono state osservate problematiche in nessuno dei due dispositivi. Al contrario, per i fanghi c) il dispositivo automatico ha mostrato una costante cinetica molto più bassa rispetto a quella riscontrata con il dispositivo a misura di pressione manuale.

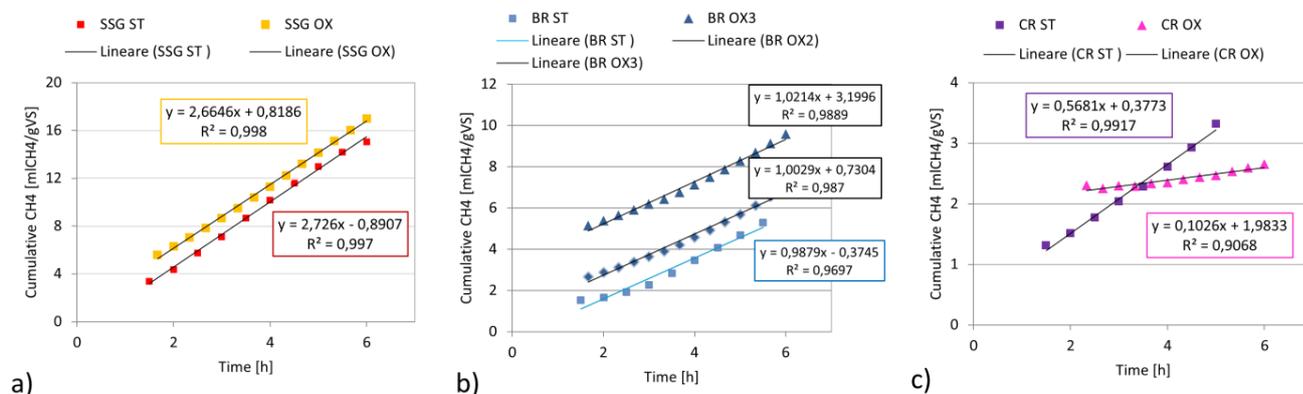


Figura 10 Andamento cumulativo specifico del metano espresso in [mlCH₄ /gVS] per ogni campione di fango per i due apparati: a) b) e c)

Il coefficiente della regressione lineare rappresenta il valore del SHMA (espresso in mlCH₄/gVS·h). I valori ottenuti sono stati trasformati in valori giornalieri e riportati nella Tabella 8 Valori della SHMA per tutte le prove batch dei tre inoculi espressi in [mlCH₄/gVS·d]). Da notare che la deviazione standard tra i dispositivi ha rilevato una buona riproducibilità tra il metodo automatico e quello manuale, tranne che per i fanghi di c).

Tabella 8 Valori della SHMA per tutte le prove batch dei tre inoculi espressi in [mlCH₄/gVS·d]

SHMA [mlCH ₄ /gVS·d]	OxiTop®	STB	St dev (OxiTop®-STB)
a)	63.9±0.1*	65.3±0.1	1.0
b)	23.8±0	23.2±0	0.42
c)	2.3±0.1	13.4±0.1	7.9

*±Standard deviation

I valori della attività SHMA ottenuti in questo lavoro, misurati su fanghi anaerobici sospesi, sono significativamente inferiori a quelli riportati da Coates et al. [39] pari a 266.4-307.2 mlCH₄/gVSS/d e da Dolfig et al [38] pari a 291.2 mlCH₄/gVSS/d. Entrambi gli autori hanno testato l'attività specifica su un fango di tipo granulare, quindi notoriamente più attivo perché più concentrato di uno sospeso.

Per valutare l'applicabilità dei due metodi si rileva che: nel caso del fango a) entrambi gli apparati hanno portato a valori SHMA molto simili, probabilmente a causa della cinetica più veloce, per il fango b) anche se le statistiche hanno riportato repliche dal metodo automatico non riproducibili, i valori SHMA erano simili (st.dev 0.42) per entrambi i metodi di misurazione. Nel caso dei fanghi c), è stato possibile misurare la SHMA solo con il metodo manuale. Il device automatico ha mostrato alcune problematiche presumibilmente legate alla tenuta dei setti della bottiglia. Lo spessore dei setti può aver influenzato sulla tenuta a causa della necessità di essere forati per il flussaggio dei reagenti gassosi (H₂/CO₂) a inizio prova.

1.5 Proposta di metodo SHMA con utilizzo Methantube

In questa sezione, verrà riportato il lavoro svolto in collaborazione ENEA sullo sviluppo della metodica per la misura della SHMA automatica con il device MethaneTube®. MethanTube® è uno strumento sviluppato dall'azienda Biological Care, in collaborazione con ENEA e l'università Agraria di Bologna con lo scopo di simulare il comportamento di un digestore e permettere la misura del Biochemical Methane Potential (BMP) di un substrato.

Questo strumento analitico, di cui si riporta una foto in Figura 11 Strumento Methantube a due serbatoi con quadro di controllo), è stato realizzato per essere utilizzato anche in condizioni non di laboratorio, nelle vicinanze dei digestori di cui si voglia analizzare il BMP del substrato. Esso ha lo scopo di replicare l'unicità dell'impianto e del substrato considerati e, di conseguenza, è stato dotato della capacità di replicare un'ampia gamma di condizioni, caratteristica che lo rende potenzialmente anche adatto a misurare l'attività specifica di metanogenesi idrogenotrofa (SHMA). Il Methantube®, di forma cilindrica, è composto da un corpo in alluminio coibentato, dotato di tracciatura, capace di mantenere una temperatura costante, nel range di +/- 1°C, e di un coperchio che viene forato e su cui vengono montate le sonde ed eventuali altri attacchi. Le prove eseguibili con questo dispositivo sono di tipo batch, della durata di alcune decine di giorni. L'apparato può lavorare con range di temperatura che variano da 25 a 70°C. Al fine di una corretta esecuzione del BMP, data la necessità di inertizzare lo spazio di testa della prova, sul coperchio dello strumento sono presenti tre fori che permettono l'ingresso e l'uscita di gas oltre ad un alloggiamento per un pressostato. Il serbatoio cilindrico, che funge da digestore ha un volume di 3,76 litri. Il serbatoio può lavorare in pressione

fino ad un valore massimo di 4 bar relativi, per questo motivo sulla testa del dispositivo è presente un quarto foro in cui è alloggiata una valvola di sicurezza che permette lo scarico del gas qualora esso dovesse raggiungere pressioni troppo elevate.



Figura 11 Strumento Methantube a due serbatoi con quadro di controllo

Al fine dello sviluppo di una metodica per la misura della SHMA si è pertanto proceduto alla scelta dei seguenti parametri operativi:

- Pressione iniziale;
- Volume di fango e di gas;
- Metodo di miscelazione;
- Risoluzione necessaria del pressostato;
- Durata della prova e timestep di misurazione.

La pressione iniziale della prova risulta di primaria importanza in quanto a sua volta interagisce con diversi parametri fisici e operativi. Nello specifico, nelle fasi di preparazione della prova, il gas nello spazio di testa del reattore viene completamente sostituito attraverso l'insufflazione di una miscela di idrogeno ed anidride carbonica in rapporto stechiometrico, ovvero 4:1, e attraverso la chiusura della valvola di uscita del gas viene continuata l'insufflazione fino al raggiungimento della pressione desiderata.

Una pressione più elevata permette una migliore solubilizzazione dell'idrogeno nel liquido attraverso l'ottenimento di una concentrazione a saturazione più alta. Questa, infatti, risulta legata alla pressione e, di conseguenza, alla $k_L a_{H_2}$ e all'idrogeno solubilizzabile attraverso le seguenti equazioni:

$$c_{s,H_2} = P_{parz,H_2} * H$$

$$\frac{dm_{H_2}}{dt} = k_L a_{H_2} * (c_{s,H_2} - c_{H_2})$$

Con H costante di Henry, $k_L a_{H_2}$ coefficiente di trasferimento di massa del sistema e c_{s,H_2} e c_{H_2} concentrazioni a saturazione e istantanea del gas nel liquido. Al fine della corretta misura della SHMA, però, risulta indispensabile la limitazione di tutti i fattori inibenti la biomassa, motivo per cui è necessario la limitazione della pressione all'interno di un range non eccessivamente elevato. Studi effettuati sulla digestione anaerobica ad alta pressione hanno infatti dimostrato una diminuzione del 33% della SMA (Specific

Methanogenic Activity) per pressioni da 3 a 31 bar [47]. Non essendo stata osservata nessuna indicazione di letteratura sull'impatto della variazione di pressione nel range da 1 a 3 bar, si è scelto, a favore di sicurezza, un valore iniziale della prova di 1,2 bar assoluti, e un valore finale di 1 bar, scelti in quanto già utilizzati nell'esecuzione delle prove con Oxytop e valutati secondo le valutazioni sulla cinetica riportate nel paragrafo 1.4. Questo numero andrà quindi validato, come tutti i parametri della prova, attraverso delle prove sperimentali, in cui saranno valutate le eventuali limitazioni o inibizioni causate dalla limitazione della solubilizzazione dei gas o dalla sovrappressione.

Il volume di fango utilizzato nella prova risulta di primaria importanza in quanto interagisce con molti parametri sperimentali ed operativi. Tra di essi troviamo: il quantitativo di biomassa presente e quindi la variazione di pressione istantanea e la durata della prova, il volume di gas che a sua volta influenza il quantitativo di substrato disponibile e la superficie specifica del liquido da cui dipende la costante di trasferimento del gas. Volumi di fango elevati, infatti, oltre a limitare il quantitativo di idrogeno e anidride carbonica disponibili alla biomassa, andranno a loro volta ad influenzare il quantitativo di metano istantaneamente producibile dalla stessa secondo la seguente equazione:

$$Q_{CH_4} = SHMA * c_{SV} * V_{fango}$$

Q_{CH_4} = volume di metano Nml(CH₄)/d

$SHMA$ = attività specifica metanogenesi idrogenotrofica Nml(CH₄)/gVS/d

c_{SV} = concentrazione di solidi volatili nel fango gVS/L

V_{fango} = volume di fango (L).

Risulta pertanto ottimale la scelta di un quantitativo limitato di fango in quanto esso permette l'esecuzione di prove caratterizzate da una minore variazione istantanea della pressione e, pertanto, in cui è possibile raccogliere un maggior numero di dati. Il quantitativo di fango scelto per la proposta di metodo è infine stato selezionato sulla base di quanto riportato da [39] che, al fine di massimizzare la superficie specifica e, quindi, la solubilizzazione del gas, e di limitare l'impatto legato alla rottura delle cellule dovuta alle forze tangenziali della miscelazione, opta per un rapporto di 5:1 tra volume del gas e del fango. Si ottiene pertanto un volume di fango di 0,63 litri e di gas di 3,13 litri. Altro fattore importante per la riuscita della prova è il metodo di miscelazione, lo strumento MethanTube® non è infatti dotato di un sistema di miscelazione interno, che risulta, però, indispensabile per l'esecuzione di una prova di SHMA, data la necessità di incrementare la solubilizzazione dei gas nel liquido.

A tal fine sono state pertanto valutate le seguenti alternative:

- Miscelazione meccanica attraverso l'allestimento di un miscelatore interno al corpo del Methantube®;
- Miscelazione magnetica per mezzo di ancoretta sommersa e agitatore magnetico;
- Miscelazione e solubilizzazione del gas per mezzo di un ricircolo del gas dallo spazio di testa sotto battente attraverso pompa volumetrica esterna.

Data la minore necessità di estesi interventi sul corpo del reattore per l'installazione dell'agitazione meccanica e il rischio che il ricircolo gas potesse sporcare la lettura della pressione nello spazio di testa, si è optato per la miscelazione magnetica, che, risulta applicabile anche grazie al corpo in alluminio del dispositivo.

Al fine di ricavare la risoluzione in bar desiderata e le caratteristiche del pressostato, si è scelto di procedere alla comparazione con una serie di strumenti disponibili a livello commerciale, si è perciò optato per un confronto con i seguenti dispositivi per la misura del BMP:

- BPA 800: 0.12 ml di risoluzione;
- Bluesens yeldmaster: milligascounter con cella da 3 ml;
- AMPTS II: 10 ml gas di risoluzione.

Sulla base della variazione di pressione osservabile per le variazioni di gas si è quindi stimata la risoluzione necessaria della misura del pressostato in condizioni mesofile e termofile. In questo caso si avrà che, a differenza di quanto osservabile per una prova con BMP, a variare saranno sia il metano che i gas substrato, ovvero CO₂ e H₂ e, di conseguenza, si è stimata la variazione di pressione in funzione del parametro misurabile, i risultati così ottenuti sono quindi riportati in Tabella 9 Risoluzione necessaria nella misura della pressione [bar] per ottenere una precisione comparabile a quella degli altri strumenti commerciali riportati).

Tabella 9 Risoluzione necessaria nella misura della pressione [bar] per ottenere una precisione comparabile a quella degli altri strumenti commerciali riportati

Parametro	Strumento	Risoluzione necessaria nella misura della pressione [bar]	
		Cond. Mesofile	Conf. Termofile
Metano prodotto	BPA 800	0,00001	0,00001
	Bluesens Yeldmaster	0,0003	0,0003
	AMPTS II	0,0009	0,001
Idrogeno rimosso	BPA 800	0,00004	0,00005
	Bluesens Yeldmaster	0,001	0,001
	AMPTS II	0,004	0,004
Idrogeno e anidride carbonica rimossi	BPA 800	0,00005	0,00006
	Bluesens Yeldmaster	0,001	0,001
	AMPTS II	0,005	0,005

Si è pertanto optato per una risoluzione obiettivo di 0,005 bar, sufficiente a misurare un'elevata quantità di punti nell'arco della prova. Sulla base di queste ipotesi si è quindi realizzata una simulazione semplificata di una prova di SHMA nel software Excel che è stata sfruttata per determinare l'ordine di grandezza della durata e del timestep di misurazione della prova necessari al fine di osservare una variazione pari alla risoluzione del pressostato. Si sono quindi fatte le seguenti ipotesi semplificative:

- Trasferimento dei gas non limitante nell'arco della prova e concentrazione istantanea all'interno del liquido pari alla concentrazione a saturazione del gas;
- SHMA influenzata dalla concentrazione del gas disciolto secondo una cinetica di Monod con costante di semisaturazione pari a 0,6 mgCOD/l;
- Concentrazione di solidi volatili del fango da testare nell'intervallo 2-9 gSV/l per valutare l'influenza di questo parametro sulla misura di attività;
- Durata della prova stimata pari al tempo necessario per raggiungere una pressione nello spazio di testa di 1 bar.

Al fine di effettuare una stima è stata quindi svolta una ricerca di letteratura dove si sono raccolti dei valori indicativi di SHMA in diverse condizioni, si è ottenuto quanto riportato in Tabella 10 Valori di SHMA da letteratura).

Tabella 10 Valori di SHMA da letteratura

Condizioni	Composizione della biomassa	SHMA [NmICH ₄ /gSV/d]	N° di dati
Mesofilia	Reflui anaerobici vari ([1]; [40])	6-665	39
Mesofilia	Fango arricchito per l'upgrading ([6])	4.750*	1
Mesofilia	Condizione limite stimata attraverso Thermodynamic electron equivalents model (Poletti, 2020)	7.747	-
Termofilia	Coltura di microrganismi idrogenotrofica pura ([48], [10])	10.220-14.980	2
Dopo arricchimento, pre arricchimento valori 240 NmICH ₄ /gSV/d			

Si è pertanto scelto di effettuare una serie di simulazioni nel campo di SHMA da 20 a 8000 mICH₄/gSV/d in quanto la condizione rappresentata dalle colture pure è stata ritenuta molto specifica (Tabella 11 Stime di durata della prova e time-step minimo necessario).

Tabella 11 Stime di durata della prova e time-step minimo necessario

SHMA [NmICH ₄ /gSSV/d]	P iniz [bar]	T [C°]	cSV [gSSV/l]	Time- step [s]	Durata [h]
20	1,20	38	8	11.696	35
50	1,20	38	8	4.679	14
100	1,20	38	8	2.339	6,9
200	1,20	38	8	1.170	3,5
500	1,20	38	8	468	1,4
1.000	1,20	38	8	234	0,7
2.000	1,20	38	8	117	0,4
4.000	1,20	38	8	58	0,2
8.000	1,20	38	8	29	0,1
100	1,20	55	8	2.218	6,6
200	1,20	55	8	1.109	3,3
500	1,20	55	8	444	1,3
1.000	1,20	55	8	222	0,7
2.000	1,20	55	8	111	0,3
4.000	1,20	55	8	55	0,2
8.000	1,20	55	8	28	0,1

I valori così ottenuti risultano essere indicativi di un minimo per la durata e un massimo per il timestep, data l'ipotesi di concentrazione disciolta pari a quella di saturazione del liquido e, quindi, di kLa molto elevata. Si osserva pertanto un ampio range di variazione per entrambi i parametri e la necessità, per fanghi con SHMA molto elevate, di partire da pressioni iniziali maggiori di 1,2 bar. Si propone quindi di individuare tre range di durata e timestep diversi in funzione di attività specifiche rispettivamente bassa media e alta (Tabella 12 Durata e timestep in base al range di SHMA).

Tabella 12 Durata e timestep in base al range di SHMA

Range di prova	bassa	media	alta
Attività [NmICH ₄ /gSSV/d]	50	100	1000
Durata [h]	20	5	1
Time step [minuti]	80	20	4

Non disponendo attualmente di un database di attività SHMA in base alla tipologia di fango, si propone di effettuare in prima battuta una misura di attività per range basso. Dal risultato della prima prova si potranno eventualmente riadattare le condizioni di prova nel caso in cui il fango mostrasse attività più alte.

2 Conclusioni

Le attività svolte per la messa a punto di metodi manometrici di misura SHMA hanno interessato 3 tipologie di apparati operanti: Oxitop (automatico), bottiglie standard (manuale), Methantube® (automatico e operante fino a 4 bar).

Nei primi due casi i metodi sono stati testati su tre diversi fanghi anaerobici ed hanno fornito le seguenti considerazioni:

- il tempo di durata della prova di 6 ore ha permesso risultati riproducibili per entrambi i metodi e per fanghi caratterizzati da diverse cinetiche.
- il rapporto tra spazio di testa e volume del liquido 1:1, non ha causato alcuna evidente problematica di trasferimento gas/liquido
- Una pressione iniziale del gas di 1,2 atm (H₂/CO₂ 80/20 %) è fisicamente possibile con la strumentazione solitamente presente in laboratorio ha permesso di condurre test con repliche statisticamente confrontabili.

In questo studio l'apparato manuale ha mostrato migliore tenuta di pressione garantendo la riproducibilità statistica delle repliche. Tuttavia, è indiscutibile la migliore flessibilità del sistema automatico utilizzato in questo studio che, pur avendo un range di pressione limitato, fornisce una curva semi-continua e consente misura di attività per un periodo di tempo più lungo. Nuovi studi dovrebbero tenere in considerazione nuovi apparati automatici che, al contempo, garantiscano una migliore tenuta e consentano di operare in un più ampio campo di pressione. Infine, ulteriori prove devono essere effettuate per valutare l'influenza dei parametri di seguito elencati sul valore di SHMA:

- rapporto liquido gas 1:1
- agitazione di 150 rpm
- la concentrazione di inoculo di 5 gVS/L.

Nel caso del Methantube®, l'analisi teorica basata sulle esperienze precedenti e la letteratura si è giunti a fornire le seguenti indicazioni di prova:

- valore iniziale della prova di 1.2 bar assoluti, e valore finale di 1 bar;
- rapporto di volume gas fango pari a 5:1 → volume di fango 0,63 l e 3,13 l di gas;
- risoluzione obiettivo di 0,005 bar, (elevato numero di punti nell'arco della prova);
- miscelazione magnetica;
- tre range di durata e time-step della prova diversi in funzione di attività specifiche rispettivamente bassa media e alta.

La metodica sviluppata in questo studio sarà studiata e testata in una campagna di sperimentazione futura.

3 Riferimenti bibliografici

- [1] Ripoll E, López I, Borzacconi L. Hydrogenotrophic activity: A tool to evaluate the kinetics of methanogens. *J Environ Manage* 2020;270. doi:10.1016/j.jenvman.2020.110937.
- [2] Pavlostathis SG, Giraldo-Gomez E. Kinetics of anaerobic treatment: A critical review. *Crit Rev Environ*

- Control 1991;21:411–90. doi:10.1080/10643389109388424.
- [3] Demirel B, Scherer P. The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: A review. *Rev Environ Sci Biotechnol* 2008;7:173–90. doi:10.1007/s11157-008-9131-1.
- [4] Aryal N, Kvist T, Ammam F, Pant D, Ottosen LDM. An overview of microbial biogas enrichment. *Bioresour Technol* 2018;264:359–69. doi:10.1016/j.biortech.2018.06.013.
- [5] Dolfig J. *Acetogenesis*. Biol Anaerob Microorg 1988.
- [6] Luo G, Angelidaki I. Integrated biogas upgrading and hydrogen utilization in an anaerobic reactor containing enriched hydrogenotrophic methanogenic culture. *Biotechnol Bioeng* 2012;109:2729–36. doi:10.1002/bit.24557.
- [7] Strevett KA, Vieth RF, Grasso D. Chemo-autotrophic biogas purification for methane enrichment: mechanism and kinetics. *Chem Eng J Biochem Eng J* 1995;58:71–9. doi:10.1016/0923-0467(95)06095-2.
- [8] Thema M, Bauer F, Sterner M. Power-to-Gas: Electrolysis and methanation status review. *Renew Sustain Energy Rev* 2019;112:775–87. doi:10.1016/j.rser.2019.06.030.
- [9] Speece RE. Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment. *Environ Sci Technol* 1983;17:416A-427A. doi:10.1021/es00115a001.
- [10] Seifert AH, Rittmann S, Herwig C. Analysis of process related factors to increase volumetric productivity and quality of biomethane with *Methanothermobacter marburgensis*. *Appl Energy* 2014;132:155–62. doi:10.1016/j.apenergy.2014.07.002.
- [11] Batstone DJ, Keller J, Angelidaki I, Kalayuzhinyi SV, Pavlostathis SG, Rozzi A, et al. Anaerobic digestion model No. 1 (ADM1). *Water Sci Technol* 2003;47:199–206. doi:10.2166/wst.2003.0647.
- [12] Angelidaki I, Treu L, Tsapekos P, Luo G, Campanaro S, Wenzel H, et al. Biogas upgrading and utilization: Current status and perspectives. *Biotechnol Adv* 2018;36:452–66. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.01.011.
- [13] Ako OY, Kitamura Y, Intabon K, Satake T. Steady state characteristics of acclimated hydrogenotrophic methanogens on inorganic substrate in continuous chemostat reactors. *Bioresour Technol* 2008;99:6305–10. doi:10.1016/j.biortech.2007.12.016.
- [14] McCarty PL, Smith DP. Anaerobic wastewater treatment. *Environ Sci Technol* 1986;20:1200–6. doi:10.1021/es00154a002.
- [15] Weiland P. Biogas production: Current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010;85:849–60. doi:10.1007/s00253-009-2246-7.
- [16] McCarty PL. Anaerobic Waste Treatment Fundamentals. *Chem Microbiol* 1964;95:107–12. doi:10.1300/J118v09n01_08.
- [17] Xu H, Wang K, Zhang X, Gong H, Xia Y, Holmes DE. Application of in-situ H₂-assisted biogas upgrading in high-rate anaerobic wastewater treatment. *Bioresour Technol* 2020;299:122598. doi:10.1016/j.biortech.2019.122598.
- [18] Wang H, Zhu X, Yan Q, Zhang Y, Angelidaki I. Microbial community response to ammonia levels in hydrogen assisted biogas production and upgrading process. *Bioresour Technol* 2020;296:122276. doi:10.1016/j.biortech.2019.122276.
- [19] Angenent LT, Sung S, Raskin L. Methanogenic population dynamics during startup of a full-scale anaerobic sequencing batch reactor treating swine waste 2002;36:4648–54.
- [20] Agneessens LM, Ottosen LDM, Voigt NV, Nielsen JL, de Jonge N, Fischer CH, et al. In-situ biogas upgrading with pulse H₂ additions: The relevance of methanogen adaption and inorganic carbon level. *Bioresour Technol* 2017;233:256–63. doi:10.1016/j.biortech.2017.02.016.
- [21] Gao M, Guo B, Li L, Liu Y. Role of syntrophic acetate oxidation and hydrogenotrophic methanogenesis in co-digestion of blackwater with food waste. *J Clean Prod* 2021;283:125393. doi:10.1016/j.jclepro.2020.125393.
- [22] Siegert M, Li XF, Yates MD, Logan BE. The presence of hydrogenotrophic methanogens in the inoculum improves methane gas production in microbial electrolysis cells. *Front Microbiol* 2014;5:1–12. doi:10.3389/fmicb.2014.00778.

- [23] Kougias PG, Treu L, Peñailillo D, Boe K, Campanaro S, Angelidaki I. Bioresource Technology Ex-situ biogas upgrading and enhancement in different reactor systems. *Bioresour Technol* 2017;225:429–37. doi:10.1016/j.biortech.2016.11.124.
- [24] Rachbauer L, Voitl G, Bochmann G, Fuchs W. Biological biogas upgrading capacity of a hydrogenotrophic community in a trickle-bed reactor. *Appl Energy* 2016;180:483–90. doi:10.1016/j.apenergy.2016.07.109.
- [25] Rozzi A, Remigi E. Methods of assessing microbial activity and inhibition under anaerobic conditions: A literature review. *Rev Environ Sci Biotechnol* 2004;3:93–115. doi:10.1007/s11157-004-5762-z.
- [26] Scaglione D, Buttiglieri G, Ficara E, Caffaz S, Lubello C. Microcalorimetric and manometric tests to assess anammox activity. *Water Sci Technol* 2009;60:2705–11. doi:10.2166/wst.2009.615.
- [27] Shelton DR, Tiedje JM. General method for determining anaerobic biodegradation potential. *Appl Environ Microbiol* 1984;47:850–7. doi:10.1128/aem.47.4.850-857.1984.
- [28] Angelidaki I, Schmidt JE, Ellegaard L, Ahring BK. An automatic system for simultaneous monitoring of gas evolution in multiple closed vessels. *J Microbiol Methods* 1998;33:93–100. doi:10.1016/S0167-7012(98)00044-X.
- [29] Holliger C, Alves M, Andrade D, Angelidaki I, Astals S, Baier U, et al. Towards a standardization of biomethane potential tests. *Water Sci Technol* 2016;74:2515–22. doi:10.2166/wst.2016.336.
- [30] UNI/TS. UNI/TS 11703 Metodo per la misura della produzione potenziale di metano da digestione anaerobica ad umido- Matrici in alimentazione, n.d.
- [31] Bhattad U, Venkiteshwaran K, Cherukuri K, Maki JS, Zitomer DH. Activity of methanogenic biomass after heat and freeze drying in air. *Environ Sci Water Res Technol* 2017;3:462–71. doi:10.1039/c7ew00049a.
- [32] Gonzalez-Estrella J, Sierra-Alvarez R, Field JA. Toxicity assessment of inorganic nanoparticles to acetoclastic and hydrogenotrophic methanogenic activity in anaerobic granular sludge. *J Hazard Mater* 2013;260:278–85. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.05.029.
- [33] Regueiro L, Veiga P, Figueroa M, Alonso-Gutierrez J, Stams AJM, Lema JM, et al. Relationship between microbial activity and microbial community structure in six full-scale anaerobic digesters. *Microbiol Res* 2012;167:581–9. doi:10.1016/j.micres.2012.06.002.
- [34] Hao X, Liu R, van Loosdrecht MCM, Cao D. Batch influences of exogenous hydrogen on both acidogenesis and methanogenesis of excess sludge. *Chem Eng J* 2017;317:544–50. doi:10.1016/j.cej.2017.02.093.
- [35] Keating C, Chin JP, Hughes D, Manesiotis P, Cysneiros D, Mahony T, et al. Biological phosphorus removal during high-rate, low-temperature, anaerobic digestion of wastewater. *Front Microbiol* 2016;7:1–14. doi:10.3389/fmicb.2016.00226.
- [36] Xu R, Xu S, Patrícya A, Zhang L, Yang Z, Liu Y. Enhancing blackwater methane production by enriching hydrogenotrophic methanogens through hydrogen supplementation. *Bioresour Technol* 2019;278:481–5. doi:10.1016/j.biortech.2019.01.014.
- [37] Liu C, Li H, Zhang Y, Chen Q. Characterization of methanogenic activity during high-solids anaerobic digestion of sewage sludge. *Biochem Eng J* 2016;109:96–100. doi:10.1016/j.bej.2016.01.010.
- [38] Dolfig J, Bloeman WGBM. Activity measurements as a tool to characterize the microbial composition of methanogenic environments. *J Microbiol Methods* 1985;4:1–12. doi:https://doi.org/10.1016/0167-7012(85)90002-8.
- [39] Coates JD, Coughlan MF, Colleran E. Simple method for the measurement of the hydrogenotrophic methanogenic activity of anaerobic sludges. *J Microbiol Methods* 1996;26:237–46. doi:10.1016/0167-7012(96)00915-3.
- [40] Corbellini V, Catenacci A, Malpei F. Hydrogenotrophic biogas upgrading integrated into WWTPs: Enrichment strategy. *Water Sci Technol* 2019;79:759–70. doi:10.2166/wst.2019.096.
- [41] Molina F, Garcia C, Roca E, Lema JM. Characterization of anaerobic granular sludge developed in UASB reactors that treat ethanol, carbohydrates and hydrolyzed protein based wastewaters. *Water Sci Technol* 2008;837–42. doi:10.2166/wst.2008.067.
- [42] McKeown RM, Scully C, Mahony T, Collins G, Flaherty VO. Long-term (1243 days), low-temperature

- (4–15 8C), anaerobic biotreatment of acidified wastewaters: Bioprocess performance and physiological characteristics. *Water Res Technol* 2009;43:1611–20. doi:10.1016/j.watres.2009.01.015.
- [43] Liu C, Li H, Zhang Y, Chen Q. Characterization of methanogenic activity during high-solids anaerobic digestion of sewage sludge. *Biochem Eng J* 2016;109:96–100. doi:10.1016/j.bej.2016.01.010.
- [44] Bhattad U, Venkiteshwaran K, Cherukuri K, Maki JS, Zitomer DH. Activity of methanogenic biomass after heat and freeze drying in air. *Water Res Technol* 2016;3:462–71. doi:10.1039/C7EW00049A.
- [45] Pavlostathis SG, Giraldo-Gomez E. Kinetics of anaerobic treatment: A critical review. *Crit Rev Environ Control* 1991;21:411–90. doi:10.1080/10643389109388424.
- [46] Apat IRSA-CNR. *Metodi analitici per le acque* Volume Primo. 2003.
- [47] Lindeboom REF, Feroso FG, Weijma J, Zagt K, Van Lier JB. Autogenerative high pressure digestion: Anaerobic digestion and biogas upgrading in a single step reactor system. *Water Sci Technol* 2011;64:647–53. doi:10.2166/wst.2011.664.
- [48] Rittmann S, Seifert A, Herwig C. Essential prerequisites for successful bioprocess development of biological CH₄ production from CO₂ and H₂. *Crit Rev Biotechnol* 2015;35:141–51. doi:10.3109/07388551.2013.820685.

Curriculum scientifico del gruppo di lavoro

Prof.ssa FRANCESCA MALPEI

Laureata in Ingegneria Civile al Politecnico di Milano, Dottore di Ricerca, professore ordinario di "Trattamento delle Acque Reflue" dal gennaio 2016.

Membro del Collegio di Dottorato in Ingegneria Sanitaria Ambientale del Politecnico di Milano dal 2005 al 2008 e, dal 2015, del Collegio Docenti del Dottorato di Ingegneria Ambientale e delle Infrastrutture.

E' responsabile scientifico dei laboratori "A.Rozzi" e di Ingegneria Ambientale del Dip.DICA del Politecnico e di "Fabbrica della Bioenergia" (Polo di Cremona, Politecnico di Milano), centro di ricerca e trasferimento tecnologico specificamente dedicato ai processi anaerobici.

Le attività di ricerca ed implementazione nell'ambito della digestione anaerobica hanno riguardato, negli ultimi 10 anni, i pretrattamenti per aumentare la biodegradabilità anaerobica, i metodi di misura e valutazione sostenibilità della degradazione anaerobica all'interno di Gruppi di lavoro del Comitato Termotecnico Italiano CTI, l'impiego di bioreattori a membrana anaerobici in ambito industriale, la produzione di bioidrogeno per dark fermentation e la metanazione di CO₂ mediante metanogenesi idrogenotrofa, per processi di upgrade biogas e power to gas.

Membro dei Comitati Scientifici del "13th IWA World Congress on Anaerobic Digestion", Santiago de Compostela (ES), 25 – 28 June 2013 e "14th IWA World Congress on Anaerobic Digestion", Vina del Mar, (Chile), 15 – 18 November 2015 e del Membro della Giunta GITISA (Gruppo Italiano Ingegneria Sanitaria Ambientale) www.gitisa.it/ (2009-2017).

Responsabile scientifico, negli ultimi 7 anni, dei seguenti progetti su bando:

- *PERFORM WATER2030 (2017-2020) Platform for Integrated Operation Research and Management of Public Water towards 2030*, Lombardy Region and EC (Por Fesr 2014-2020 axis 1 action I.1.b.1.3);
- *POLIS (2016-2017) Studying the bricks of microbial cities: characterization and structural properties of exopolysaccharides and their interaction with proteins and cations in anammox granular sludge EU H2020 – MSCA – IF- 2015*
- *ERA-NET WATER WORKS2014 Biorg4WasteWaterVal+*;
- *H2020-MSCA-IF-2014 MSCA- 661429 (POLIS)*;
- *Bioidrogeno Energia e Componenti di pregio da Siero di latte (ECOSI) ID 30116895 (Regione Lombardia) Fabbrica della Bionergia. Progetto Emblematico Fondazione Cariplo.*

Responsabile scientifico di diversi progetti su bando, tra cui l'attuale progetto PerformWater2030

Autrice di oltre 170 pubblicazioni, Indici bibliometrici (marzo 2021): 62 pubblicazioni; 1567 citazioni in 1418 articoli; H index: 23; <https://orcid.org/0000-0003-1479-377X>

In riferimento al D.Lgs. 196/2003, relativo alla tutela del trattamento dei dati personali, autorizzo espressamente all'utilizzo dei miei dati personali per le esigenze di selezione e di comunicazione

Dr. Ing. Viola Corbellini

Laureata in Ingegneria per l'Ambiente e il Territorio al Politecnico di Milano, Dottore di Ricerca, ed esercitatrice del corso di "Trattamento delle Acque Reflue".

E' attualmente ricercatrice post-DOC al Politecnico di Milano con borsa di assegnista nell'ambito del progetto PerformWater2030.

Le attività di ricerca riguardano il tema della digestione anaerobica ed in particolare la metanazione di CO₂ mediante metanogenesi idrogenotrofa per processi di upgrade biogas e power to gas, oggetto della tesi di dottorato "Biological H₂-mediated in-situ biogas upgrading" XXXI ciclo.

Ultimi lavori pubblicati:

- Corbellini, V., Feng, C., Bellucci, M., Catenacci, A., Stella, T., Espinoza-Tofalos, A., and Malpei, F. (2021) Performance Analysis and Microbial Community Evolution of In Situ Biological Biogas Upgrading with Increasing H₂/CO₂ Ratio. *Archaea*, **2021**(1), 1–15.
- Corbellini, V., Catenacci, A., and Malpei, F. (2019) Hydrogenotrophic biogas upgrading integrated into WWTPs: Enrichment strategy. *Water Science and Technology*, **79**(4), 759–770.
- Corbellini, V., Ferretti, G., Ficara, E., Leva, A., Malpei, F., and Negri, A. (2019) "Modelling and structure-tailored control of biogas plants fed on agro-food residues" in 2019 18th European Control Conference, ECC 2019.
- Corbellini, V., Kougiyas, P. G., Treu, L., Bassani, I., Malpei, F., and Angelidaki, I. (2018) Hybrid biogas upgrading in a two-stage thermophilic reactor. *Energy Conversion and Management*, **168**.

Ing. Mirko Trionfini

Laurea Magistrale in Ingegneria Civile – Civil Engineering con specialistica in Idraulica, presso Politecnico di Milano. Tesi di laurea “Upgrading biologico del biogas con processo ex-situ a scala pilota”.

Assegnista di ricerca – Sviluppo di metodiche per la gestione del processo di upgrading biologico ex-situ. Progetti 1.6 MiSE-ENEA. Accordo di programma sulla ricerca di Sistema Elettrico.

Ing. Anna Santus

Laurea magistrale in Ingegneria per l’ambiente e il territorio presso Politecnico di Milano. Tesi di laurea “Ex-situ biological biogas upgrading: model implementation”.

Attualmente dottoranda presso il Politecnico di Milano, con progetto di tesi “Experimental and modelling study on biological CO₂ reduction to CH₄”.