



Ricerca di Sistema elettrico

Upgrading biologico *in situ* del biogas in un reattore CSTR ibrido e dinamiche della comunità microbica

Signorini A., Rosa S., Massini G., Lembo G.

Report RdS/PTR2020/193

UPGRADING BIOLOGICO *IN SITU* DEL BIOGAS IN UN REATTORE CSTR IBRIDO E DINAMICHE DELLA COMUNITA' MICROBICA

Signorini A., Rosa S., Massini G. (ENEA)

Lembo G. (Università della Tuscia)

Dicembre 2020

Report Ricerca di Sistema Elettrico

Accordo di Programma Ministero dello Sviluppo Economico - ENEA

Piano Triennale di Realizzazione 2019-2021 - II annualità

Progetto: Tema 1.2 – Sistemi di accumulo, compresi power to gas, e relative interfacce con le reti

Work package: "Power to Gas" (P2G)

Linea di attività: *Power-to-Gas: Metanazione biologica in-situ - sperimentazione su reattore CSTR*

Responsabile del Progetto: Giulia Monteleone, ENEA

Responsabile del Work package: Eugenio Giacomazzi, ENEA

Indice

| | |
|--|----|
| SOMMARIO | 4 |
| 1 INTRODUZIONE | 5 |
| 2 DESCRIZIONE DELLE ATTIVITÀ SVOLTE E RISULTATI | 8 |
| 2.1 METODOLOGIA SPERIMENTALE | 8 |
| 2.2 MATERIALI E METODI | 9 |
| 2.2.1 <i>Caratteristiche del substrato e dell'inoculo</i> | 9 |
| 2.2.2 <i>Descrizione dell'impianto sperimentale e monitoraggio</i> | 9 |
| 2.2.3 <i>Parametri di processo</i> | 11 |
| 2.2.4 <i>Analisi della comunità microbica</i> | 11 |
| 2.2.5 <i>Sequenziamento Illumina</i> | 11 |
| 2.2.6 <i>Stima dell'abbondanza microbica tramite conta diretta in Microscopia ad Epifluorescenza</i> | 12 |
| 2.2.7 <i>Determinazione della frazione attiva di Bacteria e Archaea</i> | 12 |
| 2.3 RISPOSTA DELLA COMUNITÀ MICROBICA ALL'AGGIUNTA DI IDROGENO IN UN REATTORE GSTR | 12 |
| 2.3.1 <i>Performance del reattore GSTR</i> | 12 |
| 2.3.2 <i>Sequenziamento Illumina: comunità Bacteria</i> | 15 |
| 2.3.3 <i>Sequenziamento Illumina: comunità Archaea</i> | 17 |
| 2.3.4 <i>Abbondanza microbica totale e di Bacteria ed Archaea</i> | 18 |
| 2.3.5 <i>Conclusioni</i> | 19 |
| 2.4 OTTIMIZZAZIONE DEL PROCESSO DI BIOMETANAZIONE IN SITU | 20 |
| 2.4.1 <i>Efficienza del processo di upgrading del biogas</i> | 20 |
| 2.4.2 <i>Sequenziamento Illumina: comunità Bacteria</i> | 22 |
| 2.4.3 <i>Sequenziamento Illumina: comunità Archaea</i> | 25 |
| 2.4.4 <i>Conclusioni</i> | 27 |
| 3 CONCLUSIONI | 27 |
| 4 RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI | 28 |

Sommario

Il processo biologico di digestione anaerobica (AD) per la produzione di biogas da biomasse è una tecnologia ampiamente utilizzata nel settore delle energie rinnovabili. L'Italia è il secondo paese europeo dopo la Germania per numero di impianti attivi. Recentemente si sta valutando la potenzialità della AD nel processo di biometanazione in situ, con l'obiettivo di produrre un biogas con un contenuto in metano $\geq 97\%$, caratteristica che lo renderebbe idoneo alla immissione nella rete del gas naturale. In tale processo l'idrogeno, generato per elettrolisi da fonti rinnovabili, viene introdotto all'interno di un digestore anaerobico per la riduzione della CO_2 prodotta nel processo AD. La produzione e l'utilizzo dell'idrogeno "verde" si inserisce nella più ampia strategia del P2G, cioè la conversione dell'energia elettrica in energia chimica.

Il processo di biometanazione in situ, a differenza di quello ex situ in cui l' H_2 e il biogas vengono fatti convogliare in un reattore separato posto a valle del digestore, consentirebbe di ridurre i costi alle sole modifiche impiantistiche di funzionamento degli impianti su scala reale. Entrambe le tecnologie sono ancora in fase di sviluppo.

Per entrambi gli approcci, la diffusione dell' H_2 nella fase liquida è il fattore limitante del processo poiché la bassa solubilità dell' H_2 limita la sua biodisponibilità per i microorganismi.

Sono attualmente allo studio diversi dispositivi di diffusione dell' H_2 da utilizzare in reattori CSTR (Continuously Stirrer Tank Reactor), la configurazione impiantistica più comune tra gli impianti di produzione di biogas. Il più promettente, in quanto ha consentito di raggiungere un contenuto di metano idoneo alla sua immissione nella rete del gas naturale, è un modulo a membrane chiamato "Hollow Fiber Membrane" (HFM). Tuttavia la sua fattibilità in impianti su scala commerciale non è al momento economicamente praticabile ed inoltre la formazione di biofilm microbico sulla sua superficie ne danneggia la funzionalità e la durata. Generalmente questi dispositivi sono utilizzati insieme a metodi per aumentare la turbolenza all'interno del reattore, come lo stirring ed il ricircolo gassoso, allo scopo di favorire ulteriormente lo scambio di materia tra la fase liquida e quella gassosa. Dal punto di vista microbiologico l'aggiunta di idrogeno dovrebbe arricchire, nella comunità di microorganismi che operano la AD, quella che effettua la metanogenesi idrogenotrofa.

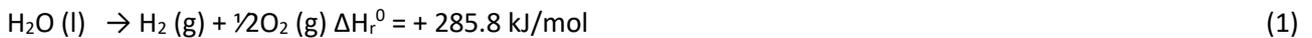
Una strategia adottata nel processo di biometanazione ex situ per arricchire questa comunità e per aumentare la superficie di scambio gas-liquido, è l'uso di supporti per favorire lo sviluppo di un biofilm microbico.

L'attività di ricerca proposta nasce dall'idea di mettere insieme l'utilizzo di corpi di riempimento ad elevata superficie specifica con il ricircolo gassoso, come strategie da applicare in un processo di biometanazione in situ, in un reattore CSTR. Questa nuova configurazione è stata chiamata GSTR (Gas Stirred Tank Reactor). I risultati dell'attività sperimentale hanno dimostrato l'idoneità della configurazione GSTR ad effettuare l'upgrading del biogas in un processo termofilo, utilizzando come substrato un refluo dell'industria lattiero-casearia. La sperimentazione svolta ha prodotto un incremento sia della produzione volumetrica di metano (+87%) che del contenuto in metano del biogas (+46%), rispetto ai valori misurati nella fase di AD. Le indagini microbiologiche hanno evidenziato l'arricchimento della comunità di metanogeni e, in particolare, la dominanza della comunità attiva nella metanogenesi idrogenotrofa. Inoltre, si è evidenziata una distribuzione sito-specifica della comunità microbica, con gruppi microbici peculiari sia della fase liquida che della matrice interstiziale all'interno dei corpi di riempimento.

1 Introduzione

Le tecnologie Power to Gas (P2G) sono considerate uno strumento cardine per la ineludibile "conversione ecologica" che l'attuale modello di sviluppo deve mettere in campo per contrastare i cambiamenti climatici dovuti alla crescente emissione nell'atmosfera di anidride carbonica (CO₂). In questo contesto, le energie elettriche rinnovabili avranno nel prossimo futuro un ruolo centrale, e tra queste, in particolare l'eolico ed il solare. Come è noto, la natura intermittente e non programmabile di queste fonti energetiche, rischia di generare problemi di stabilità e di sicurezza della rete elettrica, cioè uno sbilanciamento tra la disponibilità e la richiesta. D'altra parte le attuali capacità di stoccaggio della rete elettrica e il loro necessario ampliamento, richiederanno l'utilizzo alternativo di altri sistemi di accumulo. E' in questo contesto che nasce l'approccio P2G, la "conversione" dell'energia elettrica in energia chimica, in gas naturali sintetici, l'idrogeno (H₂) ed il metano (CH₄) [1].

La tecnologia si basa sulla combinazione di due processi, uno di natura elettrochimica e l'altro di natura chimica. Il primo è il processo di elettrolisi dell'H₂O, alimentato da elettricità rinnovabile, per la produzione di H₂ (idrogeno verde) (Equazione 1):



Il secondo si basa sulla reazione di Sabatier per la produzione di CH₄ (Equazione 2):



La tecnologia P2G consentirà, quindi, l'integrazione delle infrastrutture delle reti elettriche con la rete del gas naturale (GN). In Italia, soprattutto per gli alti livelli di penetrazione del fotovoltaico previsti per il raggiungimento degli obiettivi 2030, il Piano Nazionale Integrato per l'Energia ed il Clima afferma la necessità di "valutare i costi e i benefici di soluzioni tecnologiche P2G" [2].

E' chiaro che nella auspicata "economia ad H₂", la ricerca scientifica stia procedendo per superare gli ostacoli (immagazzinamento e trasporto su lunghe distanze) ad un suo diretto utilizzo soprattutto nel settore dei trasporti. Nel breve e medio periodo, quindi, sia la sua miscelazione in percentuali limitate (5-10%) con il metano, sia il suo utilizzo per la produzione di biometano dalla CO₂ proveniente da attività industriali o contenuta nel biogas e nel syngas prodotti da impianti alimentati a biomasse, sono le opzioni più realistiche. In particolare, la produzione di biogas da biomasse è una tecnologia ampiamente utilizzata nel settore delle energie rinnovabili. Essa si basa sul processo biologico di digestione anaerobica (AD) ed è finalizzata alla produzione di energia elettrica e calore. Il biogas è una miscela costituita prevalentemente da CH₄ (50-60%) e CO₂ (50-40%), e la cui composizione è in funzione della temperatura di esercizio e della mix di substrati utilizzati. Il suo arricchimento in CH₄ a valori idonei (≥ 97%) alla sua immissione nella rete di distribuzione del GN e per i conseguenti possibili usi, è già stata una problematica scientifica affrontata nel campo delle scienze fisico-chimiche e che ha portato allo sviluppo di una tecnologia su scala commerciale. Essa si basa sulla separazione della CO₂ dal CH₄ tramite processi chimico fisici, i quali necessitano, tuttavia, di elevati costi di investimento e risentono fortemente delle economie di scala. Questo comporta una attenta valutazione dei costi/benefici sulla realtà socio-economica dove tale tecnologia può essere applicata. In particolare, in l'Italia, che per numero di impianti di AD (2177) [3] è il secondo paese dell'Unione Europea dopo la Germania, l'ampia diffusione di impianti di piccola taglia (qualche centinaio di kW di potenza installata, o anche meno), alimentati da biomasse provenienti dal comparto agro-zootecnico ed agroindustriale, rende economicamente svantaggiose l'utilizzo di tali tecnologie. Inoltre, queste tecnologie non si inseriscono in quella P2G che deve necessariamente prevedere sia lo stoccaggio dell'energia elettrica, sia l'utilizzo della CO₂ prodotta dalla AD o da altri fonti.

In questo contesto, i processi biologici di utilizzo dell'idrogeno verde per la riduzione della CO₂ a biometano, possono offrire un valida alternativa soprattutto, come già detto, per impianti di AD di piccola taglia. La produzione biologica di CH₄ da H₂ e CO₂, è, infatti, uno dei più antichi processi sviluppatosi nel corso dell'evoluzione e operato da microorganismi autotrofi, i metanogeni idrogenotrofi. La diretta riduzione della CO₂ a CH₄ avviene attraverso il ciclo di Wolf [4], (Equazione 3):



Il processo di biometanazione del biogas può essere conseguito tramite due differenti approcci: la biometanazione *in situ*, che consiste nell'iniezione diretta di H₂ nel digestore anaerobico per la riduzione della CO₂ prodotta nel processo AD e la biometanazione *ex situ*, realizzata in un reattore separato contenente colture arricchite di metanogeni e dove pertanto è attiva solo l'ultima fase della AD, la metanogenesi idrogenotrofa che riduce la CO₂ del biogas con l'idrogeno iniettato. Entrambe le tecnologie sono ancora in fase di sviluppo.

L'attività di ricerca, oggetto di questo studio, si è focalizzata, in particolare, sul processo di biometanazione *in situ*, con l'obiettivo di contribuire a sviluppare una tecnologia efficiente ma in grado, al contempo, di facilitarne l'integrazione con gli impianti di biogas già attivi sul territorio nazionale. Infatti tale processo di upgrading del biogas, non richiedendo la costruzione di un ulteriore reattore a valle del preesistente, consentirebbe di apportare modifiche minori su quelli a scala commerciale, riducendone, al contempo i costi di upgrading.

Tuttavia, l'aggiunta di H₂ all'interno di un digestore dove avvengono tutte le quattro fasi di cui è composta la digestione anaerobica, può causare variazioni rilevanti sull'efficienza del processo, in particolare, sulle fasi che producono H₂, CO₂ e acido acetico, cioè l'acidogenesi e l'acetogenesi, rispettivamente seconda e terza fase della AD. In figura 1 è riportato lo schema completo della AD che mette in evidenza il ruolo dell'H₂. In tabella 1 sono riportate le cinetiche di reazione delle diverse fasi della digestione anaerobica.

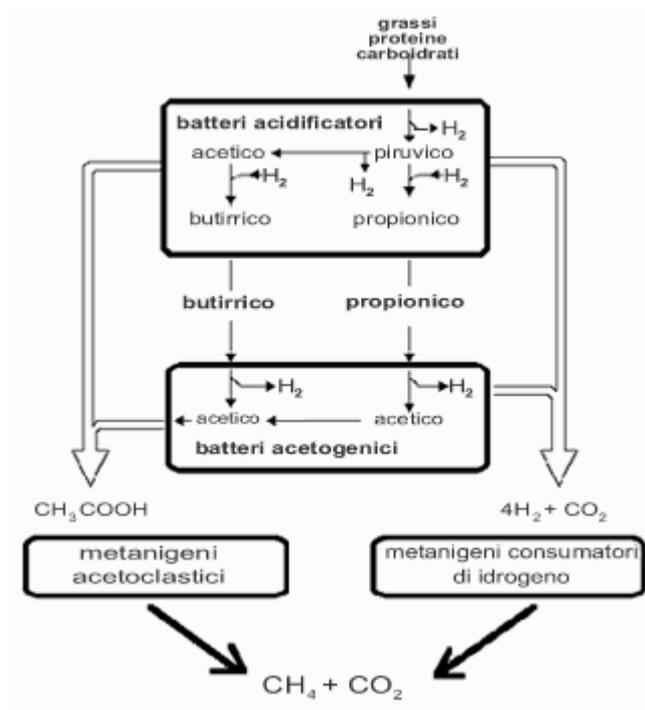


Figura 1. Schema del processo di AD e ruolo dell'H₂ (<https://www.nextville.it/index/554>).

Tabella 1. Cinetiche di reazione delle diverse fasi della digestione anaerobica [5].

| Bioreactions ¹ | ΔG^0 (kJ) |
|--|-------------------|
| Acidogenic reactions: | |
| (1) Acetate: $C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 4H_2 + 2CO_2$ | -206 |
| (2) Butyrate: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + 2CO_2 + 2H_2$ | -254 |
| (3) Propionate: $C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \rightarrow 2CH_3CH_2COOH + 2H_2O$ | -279.4 |
| (4) Lactate: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CHOHCOOH + H^+$ | -225.4 |
| (5) Ethanol: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CH_2OH + 2CO_2$ | -164.8 |
| (6) Butyrate: $2CH_3CHOHCOOH + 2H_2O \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + 2HCO_3^- + 2H^+ + 2H_2$ | -56.3 |
| (7) Valerate: $CH_3CH_2COO^- + 2CO_2 + 6H_2 \rightarrow CH_3(CH_2)_3COO^- + 4H_2O$ | -143.3 |
| (8) Valerate: $3CH_3COO^- + 3H_2 + 2H^+ \rightarrow CH_3(CH_2)_3COO^- + 4H_2O$ | -96.7 |
| (9) Valerate: $CH_3(CH_2)_2COO^- + CH_3COO^- + 2H_2 + H^+ \rightarrow CH_3(CH_2)_3COO^- + 2H_2O$ | -48.0 |
| (10) Caproate: $CH_3(CH_2)_2COO^- + 2CO_2 + 6H_2 \rightarrow CH_3(CH_2)_4COO^- + 4H_2O$ | -143.3 |
| Acetogenic reactions: | |
| (11) Propionate: $CH_3CH_2COOH + 2H_2O \rightarrow CH_3COOH + 3H_2 + CO_2$ | +76.2 |
| (12) Butyrate: $CH_3CH_2CH_2COOH + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 2H_2$ | +48.4 |
| (13) Lactate: $CH_3CHOHCOOH + 2H_2O \rightarrow CH_3COOH + HCO_3^- + 2H_2$ | -4.2 |
| (14) Ethanol: $CH_3CH_2OH + H_2O \rightarrow CH_3COOH + 2H_2$ | +9.6 |
| Methanogenic reactions: | |
| (15) Hydrogen: $4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$ | -135.0 |
| (16) Acetate: $CH_3COOH \rightarrow CH_4 + CO_2$ | -31.0 |
| (17) Formate: $4HCOOH \rightarrow CH_4 + 3CO_2 + 2H_2O$ | -304.2 |
| (18) Methanol: $4CH_3OH \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 2H_2O$ | -312.8 |
| (19) Ethanol: $2CH_3CH_2OH + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2CH_3COOH$ | -31.6 |
| Syntrophic acetate oxidizing reaction: | |
| (20) $CH_3COOH + 2H_2O \rightarrow 2CO_2 + 4H_2$ | +104.6 |
| Homoacetogenic reactions: | |
| (21) Autotrophic: $4H_2 + 2CO_2 \rightarrow CH_3COOH + 2H_2O$ | -104.6 |
| (22) Heterotrophic: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 3CH_3COO^- + 3H^+$ | -310.9 |

Infatti se l' H_2 aggiunto, non viene utilizzato dai metanogeni idrogenotrofi alla velocità con cui viene rifornito, il processo di AD può rallentarsi e arrestarsi. In particolare l'acetogenesi è l'unica fase endoergonica della AD e, quindi, non può procedere se i suoi prodotti metabolici, l'acido acetico, l' H_2 e la CO_2 non vengono prontamente consumati dai metanogeni. L'accumulo di acido acetico e di H_2 , in un meccanismo feedback negativo, può modificare le vie metaboliche della fase precedente, l'acidogenesi provocando un accumulo di acidi organici volatili più ridotti dell'acido acetico (in particolare l'acido propionico e l'acido butirrico) e quindi una diminuzione del pH verso valori inibitori della metanogenesi.

La riduzione della CO_2 a CH_4 tenderà, a sua volta, ad incrementare i valori di pH che tuttavia, se non mantenuti al di sotto del valore di 8.5, possono causare l'inibizione della fase finale della AD [6]. Inoltre, a elevati valori di pressione parziale di H_2 e a pH alcalino, un'altra via metabolica, l'omoacetogenesi, alternativa a quella di produzione di CH_4 dall' H_2 e dalla CO_2 , può prendere il sopravvento [7], con produzione di acido acetico, il cui accumulo, per quanto detto prima, può inibire il processo AD, se non viene prontamente rimosso dai metanogeni acetoclasti. Quindi, un obiettivo del processo di biometanazione in situ è quello di arricchire la comunità di metanogeni idrogenotrofi senza compromettere le relazioni metaboliche complessive della AD. E' inoltre, evidente che l'intera comunità microbica che effettua la AD sarà soggetta a cambiamenti nella struttura e nella composizione.

Per entrambi gli approcci di biometanazione, diversi studi suggeriscono che la diffusione dell' H_2 nella fase liquida sia il fattore limitante del processo poiché la bassa solubilità dell' H_2 lo rende non biodisponibile per i microrganismi [8–11]. Nel processo di biometanazione *in situ* in reattori CSTR (Continuously Stirred-Tank Reactor), la configurazione più comune negli impianti di biogas, sono state proposti principalmente diversi dispositivi di iniezione dell'idrogeno per aumentare la velocità di trasferimento di materia gas-liquido. In reattori su piccola scala (volume di lavoro $\leq 3,5$ L), l' H_2 è stato introdotto mediante colonne o diffusori ceramici [12,13], membrane a fibra cava (Hollow Fiber Membrane: HFM) o attraverso l'iniezione dell'idrogeno direttamente nello spazio di testa [14] e utilizzando, al contempo diverse velocità di rimescolamento della fase liquida. In questi studi l'aumento di CH_4 dovuto alla conversione dell' H_2 aggiunto, espresso come Methane Evolution Rate (MER), variava da 0.08 a 0.39 L Lr⁻¹ d⁻¹ con una corrispondente concentrazione di CH_4 nel biogas prodotto compresa nel range 53%-96%. Sebbene l'utilizzo di HFMs abbia

fornito i risultati migliori sia come MER che come concentrazione di metano, i costi connessi alla loro implementazione devono essere considerati per impianti su scala commerciale [15]. Inoltre, ulteriori limiti sono legati sia alla necessità di iniettare il gas ad alta pressione, sia alla formazione di biofilm sulla membrana che ne danneggia la permeabilità e la durata. Alfaro et al. (2019) hanno proposto l'utilizzo combinato di una HFM, con un rapporto area della membrana/volume del reattore 24 volte inferiore a quello utilizzato in uno studio precedente [16], con il ricircolo del biogas. La sperimentazione è stata effettuata su un reattore CSTR di 20L. Sebbene i risultati abbiano mostrato l'effetto positivo del ricircolo del biogas, l'uso del diverso modulo di diffusione dell'idrogeno, ha portato a una diminuzione della MER da 0,38 a 0,16 LCH₄ Lr⁻¹ d⁻¹ e del contenuto di CH₄ nel biogas dal 96% al 73,1% [8].

Studi sulla biometanazione *ex situ* hanno evidenziato che l'area di contatto tra la fase liquida e quella gassosa era notevolmente aumentata quando il reattore veniva riempito con differenti supporti [9,17–19]. Recentemente, Kougiyas et al. (2020) in uno studio finalizzato a determinare l'effetto sia del materiale di supporto che della velocità di ricircolo del biogas sulla riduzione della CO₂ in reattori up-flow alimentati con H₂ esogeno, hanno mostrato che nel reattore riempito con anelli di Raschig l'efficienza di utilizzo sia della CO₂ che dell'H₂ aumentava e che una elevata velocità di ricircolo del biogas era un prerequisito per ottenere elevate concentrazioni di CH₄ nel gas [20].

Sulla base delle argomentazioni esposte l'attività di ricerca sul processo di biometanazione in situ, oggetto di questa relazione, è stata condotta su un nuovo reattore CSTR modificato (volume di lavoro 49L), in cui la biomassa microbica è stata parzialmente immobilizzata su supporti di polietilene ad elevata densità (HDPE) ed il rimescolamento liquido per l'omogeneizzazione dei nutrienti è stato sostituito dal ricircolo gassoso.

L'effetto di questi supporti sul processo AD erano stati precedentemente studiati ed i risultati evidenziavano il loro ruolo nel favorire la formazione di un biofilm microbico e nell'incremento sia dell'efficienza di rimozione del substrato sia della produzione di metano [21,22].

2 Descrizione delle attività svolte e risultati

2.1 Metodologia sperimentale

Lo studio è stato effettuato usando la scotta come substrato della AD. La scelta è stata effettuata per due differenti ma correlate motivazioni:

1. In Europa, l'industria lattiero-casearia è una delle principali fonti di acque reflue industriali costituite prevalentemente dal siero di latte e dalla scotta. Quest'ultima è un sottoprodotto generato dalla produzione di ricotta: le proteine, presenti nel siero di latte vengono fatte coagulare e precipitare mediante riscaldamento (80–90 °C) e l'aggiunta di acidi e sali organici. La scotta, come il siero di latte, sono residui altamente inquinanti. In particolare la scotta ha un carico organico elevato costituito, prevalentemente, dal lattosio (40–50 g/L), con concentrazioni inferiori di grassi (0.5–8 g / L) e di proteine (0.5–8 g / L). Inoltre presenta elevati valori di salinità (7–23 mS cm⁻¹). Entrambi i reflui, se prodotti in una azienda agricola, potrebbero essere usati in codigestione con altri substrati prodotti in loco per la produzione di biogas. Al contrario la loro bassa alcalinità li rende poco adatti all'AD a meno di non effettuare controlli e aggiustamenti continui del pH. In Europa solo il 7.1% del latte prodotto è utilizzato direttamente nelle aziende agricole mentre la maggior parte viene trasferito ai caseifici [23]. Quindi lo sviluppo di processi efficienti e sostenibili di produzione di bioenergia da questi substrati sarebbe auspicabile se inseriti nel contesto più generale dell'economia circolare.
2. Negli studi sul processo di biometanazione i reflui lattiero-caseari descritti, sono suggeriti come substrati idonei a contrastare l'innalzamento del pH dovuto alla riduzione della CO₂.

Lo studio è stato condotto in termofilia (55°C) in quanto la popolazione metanogena idrogenotrofa è favorita rispetto a quella acetoclastica ed il processo di AD è più veloce. Inoltre, essendo la scotta rilasciata dal processo produttivo ad una temperatura di 80-90 °C, la conservazione del suo contenuto termico sarebbe auspicabile in termini energetici.

Definito l'approccio metodologico, l'attività di ricerca si è articolata in due distinte attività sperimentali con differenti obiettivi:

1. **Processo di digestione anaerobica termofila della scotta in un reattore CSTR modificato: risposta della comunità microbica all'aggiunta di idrogeno.** Gli obiettivi erano di valutare la fattibilità del processo AD nella nuova configurazione impiantistica, denominata GSTR (Gas-Stirred Tank Reactor) in termofilia (55°C) e usando la scotta come substrato di alimentazione e di studiare l'effetto dell'aggiunta di H₂ sulla composizione e la struttura della comunità microbica tramite due differenti tecniche di biologia molecolare (FISH e NGS).
2. **Ottimizzazione del processo di biometanazione in situ.** Gli obiettivi erano di incrementare sia la velocità di produzione del metano che il suo contenuto percentuale nel biogas aumentando la velocità di ricircolo del biogas e di studiarne gli effetti sulla composizione e la struttura della comunità microbica tramite tecnica NGS.

2.2 Materiali e metodi

2.2.1 Caratteristiche del substrato e dell'inoculo

La scotta veniva periodicamente raccolta presso Santa Maria srl, un caseificio situato a Roma. Il refluo era conservato a 20 °C e scongelato prima dell'uso. La scotta non diluita era usata come alimentazione per il reattore. A causa delle fluttuazioni del carico organico residuo derivato dal processo produttivo, si sono osservate delle variazioni nella sua composizione. Le principali caratteristiche fisiche e chimiche della scotta sono presentate nella Tabella 2.

Tabella 2. Caratteristiche chimico fisiche della scotta

| Parametri | Range |
|--|-----------|
| pH | 5.9-6.2 |
| Lattosio (gL ⁻¹) | 40-60 |
| Solidi Totali (TS) (gL ⁻¹) | 47-64 |
| Solidi Volatili (VS) (gL ⁻¹) | 40-54 |
| COD (gL ⁻¹) | 45-70 |
| Acidi grassi volatili totali (gL ⁻¹) | 1.5-2.5 |
| Proteine (gL ⁻¹) | 0.45-0.90 |
| NH ₄ ⁺ (gL ⁻¹) | 0.10-0.12 |

Il digestato, utilizzato come inoculo, era ottenuto da un impianto di biogas alimentato a scotta e situato presso il caseificio Formaggi Boccea (Roma). La temperatura di esercizio dell'impianto è di 55°C con un HRT (Hydraulic Retention Time) di 30 giorni.

La composizione della comunità microbica del digestato utilizzato come inoculo del GSTR è stata effettuata tramite la piattaforma Illumina Miseq.

2.2.2 Descrizione dell'impianto sperimentale e monitoraggio

L'esperimento è stato condotto sulla nuova configurazione GSTR con un volume di lavoro di 49 L, a temperatura termofila (55 °C) e pressione atmosferica. La Figura 2 mostra lo schema del reattore ed i dispositivi di funzionamento.

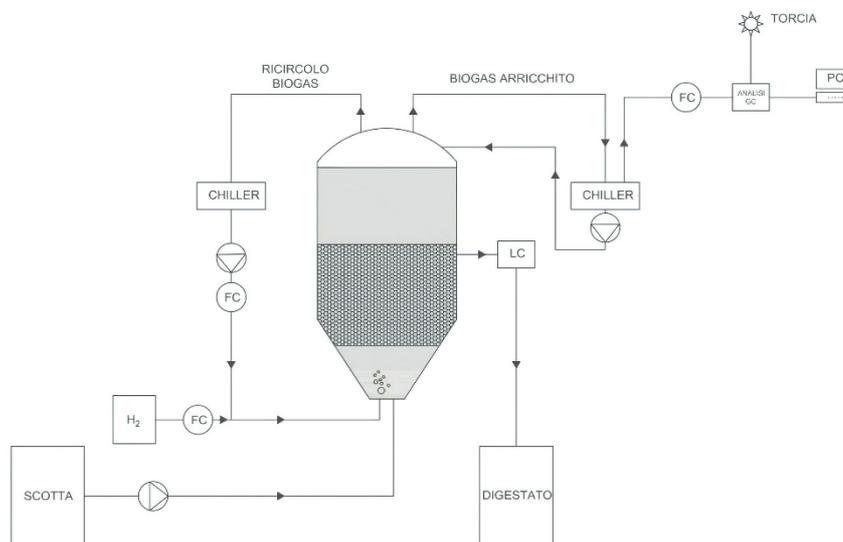


Figura 2. Schema dell'impianto GSTR (Gas Stirred Tank Reactor).

La miscelazione e l'omogeneizzazione dei nutrienti nel reattore è stata assicurata dal ricircolo continuo del biogas: una pompa a vuoto aspirava il biogas dallo spazio di testa del reattore e lo iniettava sul fondo. I supporti utilizzati per la formazione di un biofilm erano in polietilene ad alta densità (Scubla MBBR 800, HDPE) con una superficie specifica di $800 \text{ m}^2/\text{m}^3$.

L'area immobilizzata era completamente immersa nella fase liquida della parte centrale del reattore e occupava un volume di circa 15 L. I supporti erano racchiusi in un sacchetto a rete per impedire la loro uscita nell'effluente con conseguente blocco della valvola di controllo del volume di lavoro del reattore. Il biogas proveniente sia dal ricircolo del gas che dalla linea di uscita veniva deumidificato da un refrigeratore e l'acqua condensata era restituita al digestore. La scotta, all'interno di un reattore refrigerato ($4\text{-}8^\circ\text{C}$), veniva pompata in continuo al fondo del reattore.

L' H_2 puro (99%) ottenuto da un elettrolizzatore (DBS, modello PG-H2 100), era iniettato in continuo nella linea di ricircolo del biogas.

La composizione del biogas (H_2 , CH_4 , CO_2 , N_2 e O_2) è stata analizzata in un gas cromatografo MicroGas Chromatograph Varian (GC4900) in linea. Sono state utilizzate due colonne di 10 m. La prima, MS 5A, con una fase stazionaria a setacci molecolari in grado di separare i gas permanenti a basso peso molecolare, H_2 , CH_4 , N_2 e O_2 . La seconda colonna era un Poraplot U, con il divinilbenzene come fase stazionaria e in grado di separare la CO_2 . L'argon è stato utilizzato come gas di trasporto.

Le portate di biogas e di H_2 sono state monitorate online tramite flussimetri digitali (serie EL-Flow select, Bronkhorst High-Tech BV, Ruurlo Netherland). I dati erano acquisiti ogni due ore. I flussi dei diversi gas erano calcolati sulla base delle composizioni percentuali dei singoli gas presenti nel biogas

Gli acidi grassi volatili (VFA), l'acido lattico, gli alcoli e gli zuccheri contenuti nella scotta e nel digestato sono stati analizzati con un HPLC Thermo Spectrasystem, dotato di un rilevatore UV ($\lambda = 210 \text{ nm}$) e un rilevatore dell'indice di rifrazione, utilizzando il metodo di analisi isocratico a 75°C con Colonna Rezex ROA-Organic Acid H + (8%), dimensioni $300 \times 7,8 \text{ mm}$ Phenomenex, USA.

Il carico organico e l'efficienza di rimozione del carico organico sono stati determinati come contenuto in solidi totali e volatili, ed in COD sia della scotta che del digestato [24].

Il pH veniva controllato giornalmente con un piaccametro Delta OHM.

2.2.3 Parametri di processo

L'efficienza del processo di biometanazione è stata espressa come methane evolution rate (MER) cioè come incremento della velocità di produzione del metano dovuta solo all'idrogeno iniettato (Equazione 1):

$$\text{MER (LCH}_4 \text{ L}_r^{-1} \text{ d}^{-1}) = \text{CH}_4\text{UPs} - \text{CH}_4\text{AD} \quad (1)$$

In cui UPs sono le fasi di upgrading del biogas con l'H₂ e AD è il processo di controllo.

Il trasferimento di massa gas-liquido dell'H₂ (rt) (LH₂ L_r⁻¹ d⁻¹) e l'efficienza di utilizzazione (%) dell'H₂ sono stati calcolati in accordo alle equazioni 2 e 3, rispettivamente:

$$\text{rt (LH}_2 \text{ L}_r^{-1} \text{ d}^{-1}) = \text{H}_2 \text{ in.} - \text{H}_2 \text{ in output gas} \quad (2)$$

$$\eta\text{H}_2 = \frac{\text{H}_2 \text{ in.} - \text{H}_2 \text{ in output gas}}{\text{H}_2 \text{ in.}} \cdot 100 \quad (3)$$

In cui H₂ in. corrisponde alla velocità di iniezione dell'idrogeno e H₂ in output gas alla velocità di uscita dell'H₂.

2.2.4 Analisi della comunità microbica

Nella prima attività sperimentale, i campioni per l'analisi della comunità microbica sono stati raccolti alla fine delle fasi AD e UP sia dal mezzo liquido che dalla matrice interstiziale tra i supporti HDPE. Il GSTR è stato aperto al termine della fase AD per raccogliere la matrice interstiziale: il suo colore grigio scuro e la presenza di flocculi indicavano la formazione di un biofilm. Prima delle fasi UP, il GSTR è stato lavato con azoto per ripristinare la condizione anaerobica ed è stato utilizzato nelle stesse condizioni operative precedenti fino a quando non è stato più rilevato N₂. I campioni sono stati raccolti in duplicato, suddivisi in aliquote (10 mL) e conservati a -20°C fino al loro utilizzo per l'estrazione del DNA e per le analisi di ibridazione in situ a fluorescenza (FISH). I campioni raccolti sono identificati dalle sigle -AD o -UP2 (AD: fase di digestione anaerobica, UP2: fase di aggiunta di H₂) e dal sito di prelievo nel GSTR: EF (effluente), IM (matrice interstiziale).

Nella seconda attività sperimentale lavoro, i campioni per l'analisi della comunità microbica sono stati raccolti alla fine delle fasi AD e UP1 e UP4 dall'effluente. I campioni sono stati raccolti in duplicato, suddivisi in aliquote (10 mL) e conservati a -20°C fino al loro utilizzo per l'estrazione del DNA. Infine, è stato analizzato anche il campione di digestato utilizzato come inoculo dall'inizio di tutta la sperimentazione.

2.2.5 Sequenziamento Illumina

L'estrazione del DNA è stata svolta con il kit Gene MATRIX Bacterial & Yeast Genomic DNA Purification Kit (EURxLtd. Gdansk Poland) seguendo il protocollo raccomandato. La quantità e la qualità del DNA estratto è stata valutata tramite il Biofotometro (Biofotometro plus, Eppendorf). Il sequenziamento dei campioni estratti è stato svolto presso il Dipartimento Scienze Agrarie dell'Università Federico II di Napoli, tramite la piattaforma Illumina Miseq. La libreria genetica per il sequenziamento è stata preparata utilizzando il frammento di 460bp corrispondente alla regione ipervariabile V3-V4 del gene 16S rRNA, utilizzando i primers universali specifici (S-D-Bact-0341F / S-D-Bact-0785R for Bacteria and Archaea domains). L'assegnazione tassonomica delle sequenze elaborate in OTUs (Operative Taxonomic Units) è stata effettuata tramite il database Greengenes con un criterio di similarità corrispondente al 97%. Le sequenze ottenute dalla prima fase sperimentale, sono state depositate nel database Sequence Read Archive (SRA) nel dominio BioProject PRJNA681387, con i numeri di accesso: SAMN1695146 - SAMN16951461

2.2.6 Stima dell'abbondanza microbica tramite conta diretta in Microscopia ad Epifluorescenza

L'abbondanza microbica (n° tot cellule mL^{-1}) è stata determinata mediante conta diretta in microscopia ad epifluorescenza dopo colorazione con DAPI (4'-6'-diamino-2-fenilindolo) come riportato in Barra Caracciolo et al., 2005 [25]. La tecnica sfrutta la capacità della molecola DAPI di formare complessi fluorescenti con il doppio filamento di DNA delle cellule intercalandosi tra le basi Adenina e Timina. In breve, al fine di separare le cellule microbiche dalle particelle inorganiche, è stata eseguita una procedura di pulizia del campione immediatamente dopo lo scongelamento e prima dell'analisi, utilizzando il mezzo di gradiente di densità OptiPrep (Axis-Shield PoCAs, Oslo, Norvegia). Ciascun campione (3x) è stato poi fissato in formalina al 4% [26] per 4-6 h, centrifugato e risospeso in PBS 1X ed etanolo, e conservato a -20°C fino al suo utilizzo. Al momento dell'analisi, in ambiente oscurato per non far decadere la fluorescenza, il campione è stato incubato per 20' con colorante DAPI ($1\mu\text{g ml}^{-1}$) e successivamente filtrato su membrana in policarbonato (Millipore, sfondo scuro, porosità $0.2\mu\text{m}$ e diametro 25 mm) utilizzando un sistema di filtrazione con pompa da vuoto Sartorius ($< 0.02\text{ MPa}$). La membrana in policarbonato è stata posizionata su vetrino da microscopia ed esaminata con microscopio ad epifluorescenza (Axioshop 40, Zeiss, Germany) dotato di obiettivo ad immersione (ingrandimento finale 1000X) e filtro Zeiss (cod.01 - λ Eccitazione-emissione 530-470 nm).

2.2.7 Determinazione della frazione attiva di Bacteria e Archaea

La tecnica Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) è stata utilizzata per la determinazione della frazione attiva [27] di Bacteria e Archaea all'interno della comunità microbica. Allo scopo sono state utilizzate sonde molecolari oligonucleotidiche ($50\text{ ng }\mu\text{L}^{-1}$) a DNA con target per rRNA 16S, legate covalentemente con un fluorocromo all'estremità 5', al fine di impartire fluorescenza alle cellule che contengono sequenze (almeno 200) di acido nucleico complementare [28]. Il protocollo di riferimento è stato quello identificato da [29] con modifiche [25,26]. I principali passaggi eseguiti possono essere riassunti in: 1) Fissaggio dei campioni in PFA porosità $0.2\mu\text{m}$, diametro 45 mm); 2) Ibridazione su spicchi di filtro (1/8) con sonde oligonucleotidiche u(4%) come descritto per DAPI e filtrazione su membrana di policarbonato (Nucleopore, sfondo chiaro, porosità $0.2\mu\text{m}$, diametro 45 mm Nucleopore); 2) Ibridazione su spicchi di filtro (1/8) con sonde oligonucleotidiche usando le EUB, II,III marcate con fluorocromo FITC (Fluorescina - rilevabile in verde) per le cellule appartenenti al dominio dei Bacteria e ARC915 marcata con fluorocromo CY3 (Indocarbocianina - rilevabile in rosso) per le cellule del dominio degli Archaea; 3) Lavaggio del campione per rimuovere le sonde non legate e allestimento del vetrino da microscopio aggiungendo uno stabilizzatore di fluorescenza (Vectashield); 4) Osservazione al microscopio ad epifluorescenza utilizzando i filtri Zeiss cod.38 HE (λ Eccitazione-emissione 494-518 nm) e cod.43 (λ Eccitazione-emissione 545-605/670 nm)

Inoltre, tutte le ibridazioni ottenute con sonde specifiche sono state realizzate in combinazione con la colorazione DAPI per stimare l'abbondanza relativa di cellule positive di ogni sonda rispetto al totale delle cellule presenti [30].

2.3 Risposta della comunità microbica all'aggiunta di idrogeno in un reattore GSTR

2.3.1 Performance del reattore GSTR

In tabella 3 sono riportati i valori dei parametri di processo utilizzati nelle diverse fasi sperimentali che si sono succedute nel tempo. La sperimentazione iniziava con il processo di AD e l'omogeneizzazione dei nutrienti era assicurata dal ricircolo del biogas ad una velocità di $59\text{ L L}_r^{-1}\text{ d}^{-1}$. Dopo 30 giorni, quando il processo AD risultava stabile (deviazione standard $\leq 10\%$), un flusso di H_2 puro ($\geq 99\%$) ottenuto da un elettrolizzatore (DBS, model PG-H2 100), era iniettato in continuo al fondo del reattore tramite la linea di ricircolo del biogas. La velocità di flusso ($1.76\text{ L L}_r^{-1}\text{ d}^{-1}$) era impostata per ottenere, all'interno del reattore, un rapporto $\text{H}_2:\text{CO}_2$ di 2.7:1, inferiore al rapporto stechiometrico della reazione di metanazione (4:1). La velocità di ricircolo del biogas era mantenuta a $59\text{ L L}_r^{-1}\text{ d}^{-1}$. Questa fase sperimentale veniva denominata UP1. Successivamente, il flusso di idrogeno era diminuito alla velocità di $1.32\text{ L L}_r^{-1}\text{ d}^{-1}$ e la velocità di ricircolo veniva raddoppiata ($118\text{ L L}_r^{-1}\text{ d}^{-1}$). Questa fase sperimentale veniva denominata UP2.

Tabella 3. Parametri di processo utilizzati nel corso della sperimentazione

| Parametri | DA | UP1 | UP2 |
|--|-------------|-------------|-------------|
| HRT (g) | 15 ± 1 | 15 ± 1 | 15 ± 1 |
| Carico organico (gVS L _r ⁻¹ d ⁻¹) | 2.40 ± 0.12 | 2.18 ± 0.14 | 2.28 ± 0.25 |
| H ₂ in. (LH ₂ L _r ⁻¹ d ⁻¹) | - | 1.76 ± 0.01 | 1.32 ± 0.01 |
| Ricircolo del biogas (L L _r ⁻¹ d ⁻¹) | 59 ± 5 | 59 ± 5 | 118 ± 5 |
| H ₂ :CO ₂ | - | 2.7:1 | 2.1:1 |

In figura 3 sono riportati gli andamenti giornalieri dei flussi di CH₄, CO₂ e H₂ in uscita dal reattore nelle diverse fasi sperimentali. Sono anche riportate le variazioni di pH registrate durante la sperimentazione. In Tabella 3 sono riportate le medie dei parametri di performance. Quest'ultime si riferiscono al periodo sperimentale in cui viene raggiunta una produzione stabile (deviazione standard ≤10%).

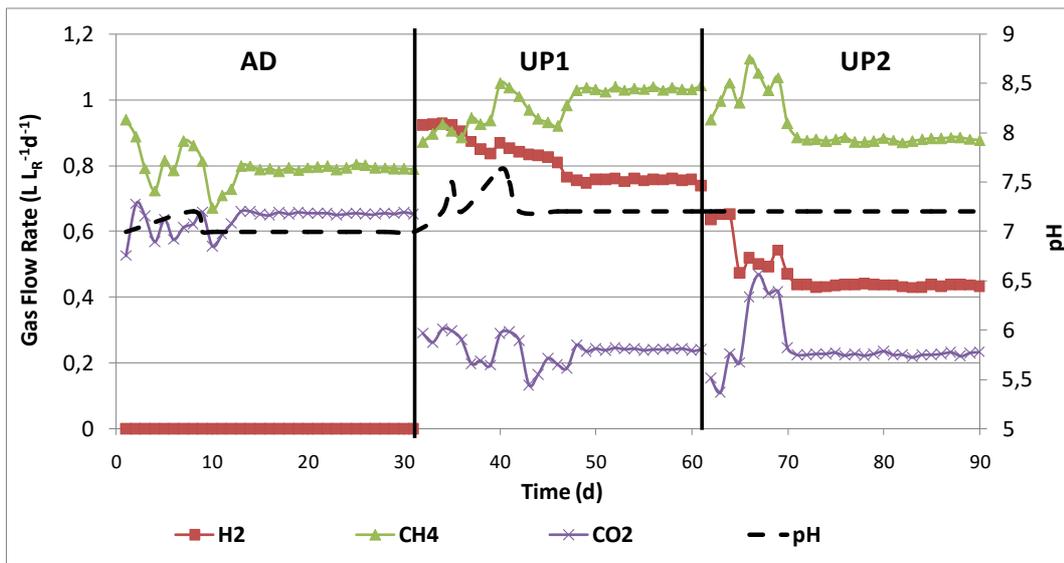


Figura 3. Andamenti giornalieri dei flussi di CH₄, CO₂, H₂ e del pH durante le tra fasi sperimentali (AD, UP1, UP2)

Tabella 4. Valori medi dei parametri di performance delle tre fasi sperimentali (AD, UP1, UP2).

| Parametri | AD | UP1 | UP2 |
|---|--------------|-------------|-------------|
| Biogas (L L_r⁻¹ d⁻¹) | 1.42 ± 0.06 | 2.05 ± 0.07 | 1.65 ± 0.18 |
| H₂% | - | 39.7 ± 3.0 | 28.4 ± 2.7 |
| CH₄% | 55.5 ± 0.8 | 48.2 ± 3 | 56.0 ± 1.9 |
| CO₂% | 45.1 ± 1.65 | 11.6 ± 1.62 | 14.8 ± 3.07 |
| H₂ out (L L_r⁻¹ d⁻¹) | - | 0.81 ± 0.06 | 0.47 ± 0.07 |
| CH₄ out (L L_r⁻¹ d⁻¹) | 0.79 ± 0.04 | 0.99 ± 0.06 | 0.92 ± 0.08 |
| r_t (L L_r⁻¹ d⁻¹) | - | 0.95 | 0.85 |
| ηH₂ (%) | - | 54 | 65 |
| Resa (LCH₄ g COD⁻¹) | 0.329 ± 0.02 | - | - |
| MER (LCH₄*L_r⁻¹d⁻¹) | - | 0.20 | 0.13 |
| Lattosio (mg L⁻¹) | 270 ± 28 | 225 ± 72 | 209 ± 10 |
| Acido acetico (mg L⁻¹) | 45 ± 10 | 53 ± 19 | 38 ± 5.2 |

Durante il periodo AD, a partire dal decimo giorno fino alla fine di questa fase, si osservava una produzione di metano con valori medi di $0.79 \pm 0,04$ LCH₄ L_r⁻¹ d⁻¹. Il pH del reattore rimaneva stabile a valori di circa 7, indicando una forte capacità tampone del sistema, sebbene nessun controllo del pH fosse stato applicato. Il contenuto medio di CH₄ nel biogas era del 55.5% con una resa specifica di 0.329 LCH₄ gCOD⁻¹. Questo valore corrisponde al 94% del valore teorico massimo (cioè 0,350 LCH₄ gCOD₋₁) [15,31]. Il substrato era quasi completamente consumato, come confermato dal basso valore medio di lattosio (270 ± 28 mg L⁻¹) rilevato nell'effluente del reattore e l'acetico l'acido era l'unico metabolita solubile presente, con un valore medio di 45 ± 10 mg L⁻¹. Al fine di verificare l'effetto del ricircolo del biogas sull'omogeneizzazione dei nutrienti nel GSTR, era eseguita anche l'analisi HPLC sulla frazione liquida prelevata in testa ed al fondo del reattore. Le concentrazioni medie di lattosio e acido acetico erano dello stesso ordine di grandezza, indicando una buona miscelazione dei reagenti.

La resa in metano, ottenuta in questo studio, è tra i valori più elevati pubblicati in bibliografia sulla AD di reflui caseari in reattori ibridi anaerobici a biofilm ($0.03\text{--}0.359$ LCH₄ gCOD⁻¹) [32,33]. Tuttavia questi studi erano condotti in mesofilia (30-37 °C). In termofilia, sono presenti pochi studi sulla AD 0.360 LCH₄ g COD⁻¹ da siero di latte diluito (10 gCOD L⁻¹) e applicando un valore di HRT di 7.5 giorni [35]. Altri autori, a parametri di processo confrontabili con questo studio (T= 55°C, HRT=15 giorni, carico organico = 2.4 g CODL⁻¹ d⁻¹), ottenevano rese di 0.100 LCH₄ g COD⁻¹ ± 0.21) e un elevato valore acido acetico nell'effluente (10 ± 1 g L⁻¹), indicando una AD instabile. La sperimentazione era stata condotta in un reattore CSTR di 3L [36]. Fernandez e al. (2015) ottenevano una resa di 0.315 ± 0.001 LCH₄ gCOD⁻¹ durante un processo AD, in termofilia, da siero di latte deproteinizzato in un reattore ASBR (Anaerobic Sequencing Batch Reactor) di 25L [37]. Sebbene la sperimentazione si discostasse nei valori di HRT (8.3 giorni) e di carico organico 4.6 ± 0.3 gCOD L⁻¹ d⁻¹ utilizzati, la comparabilità dei valori di resa ottenuti con quelli di questo studio, consente di ipotizzare che l'implementazione di supporti per favorire la formazione di biofilm e del ricircolo gassoso per l'omogeneizzazione della fase liquida, conferisca all'impianto GSTR una configurazione di funzionamento ibrida. Infatti la caratteristica dei reattori ASBR, a differenza di quelli CSTR, è quella di disaccoppiare il tempo di ritenzione solida (STR) da quella liquida (HRT).

La fase UP1 partiva dopo la fase AD e dopo dodici giorni e fino alla fine della sperimentazione (60 giorni), si otteneva una produzione stabile di metano con valori (0.99 ± 0.06 LCH₄ L_r⁻¹ d⁻¹) del 25% più elevati rispetto a quelli raggiunti nella fase AD. L'efficienza di utilizzazione dell'H₂ (ηH₂) risultava del 54%.

Tuttavia, l'incompleto consumo dell'H₂ aggiunto portava ad una diminuzione del contenuto di CH₄ del biogas che risultava composto dal 48.2% di CH₄, 39.8% H₂, e 11.6% di CO₂.

Quindi, il flusso di H₂ aggiunto veniva diminuito (1.32 LH₂ L_r⁻¹d⁻¹) e la velocità di riciclo del biogas era raddoppiata (118 LH₂ L_r⁻¹d⁻¹). La nuova fase sperimentale UP2 veniva condotta per trenta giorni.

Durante la fase stabile UP2 (raggiunta dopo 10 giorni) la produzione di metano attestava su valori di $0.92 \pm 0.08 \text{ LCH}_4 \text{ L}_r^{-1} \text{ d}^{-1}$ e la percentuale di CH_4 nel biogas risaliva al 55%. Il pH aumentava raggiungendo valori di 7.3–7.4. La produzione di metano era del 7% più elevata di quella ottenuta durante la AD. Inoltre non si osservava una variazione significativa nei valori di concentrazione del lattosio ($208 \pm 10.5 \text{ mg L}^{-1}$) e dell'acido acetico ($38 \pm 5 \text{ mg L}^{-1}$) nell'effluente. L'efficienza di utilizzo dell' H_2 incrementava dal valore del 54% della fase UP1 a quello del 65% nella fase UP2 ma il contributo dell' H_2 all'incremento della produzione di metano (MER) diminuiva da $0.20 \text{ LCH}_4 \text{ L}_r^{-1} \text{ d}^{-1}$ a $0.13 \text{ LCH}_4 \text{ L}_r^{-1} \text{ d}^{-1}$.

In accordo all'equazione 3 si sarebbero dovuti attendere valori più elevati di MER in entrambe le fasi UP. In particolare $0.24 \text{ LCH}_4 \text{ L}_r^{-1} \text{ d}^{-1}$ per UP1 e $0.21 \text{ LCH}_4 \text{ L}_r^{-1} \text{ d}^{-1}$ per UP2. Considerando che nell'effluente la concentrazione di acido acetico è trascurabile in entrambe le fasi UP, è possibile ipotizzare che l'idrogeno e l'anidride carbonica siano stati utilizzati dalla comunità di metanogeni per la formazione della biomassa [38]. I risultati dell'analisi dell'abbondanza microbica tramite tecnica FISH sembrano confermare questa ipotesi. In conclusione sebbene i risultati raggiunti in termini di contenuto di CH_4 nel biogas siano lontani dall'obiettivo che si propongono i processi biologici di upgrading del biogas, i valori di MER ottenuti dimostrano la potenzialità della nuova configurazione proposta, il GSTR, a convertire l' H_2 aggiunto e la CO_2 prodotta durante il processo AD, in CH_4 .

2.3.2 Sequenziamento Illumina: comunità Bacteria

L'abbondanza relativa dei Batteri a livello tassonomico di Phylum è riportata nella Figura 4.

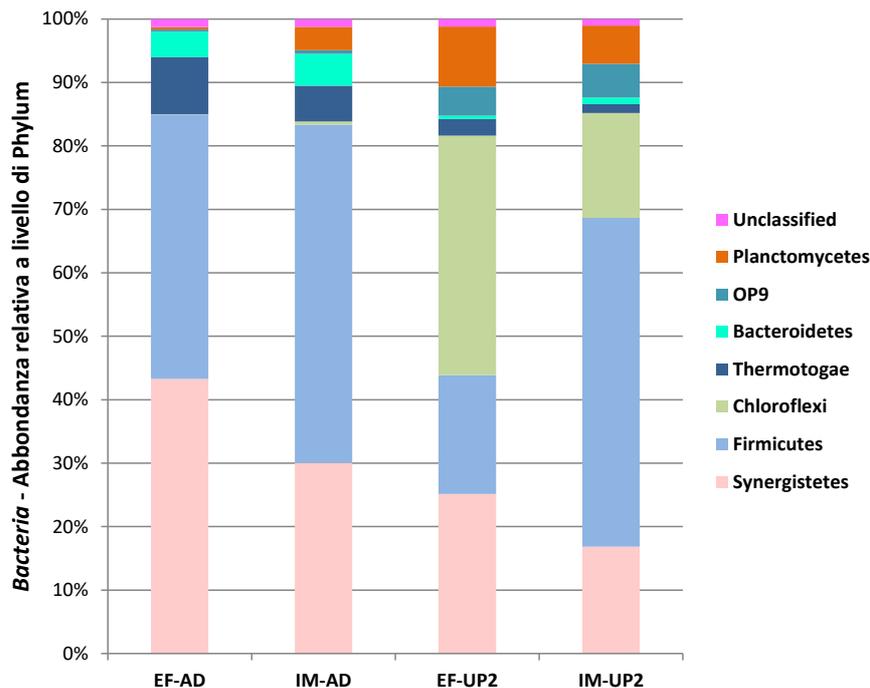


Figura 4. Abbondanze relative delle comunità Bacteria a livello di phylum alla fine delle fasi AD (digestione anaerobica) e UP2 (iniezione di H_2). Sono riportate le comunità con una abbondanza relativa $\geq 0.5\%$ (in almeno un campione). EF: effluente; IM: matrice interstiziale.

Durante la fase AD, le comunità microbiche erano dominate dai microorganismi appartenenti ai Phyla *Synergistetes* (43% e 30% rispettivamente in EF e IM) e *Firmicutes* (42% e 53% rispettivamente in EF e IM). Il profilo delle comunità microbiche è completato dalla presenza dei phyla *Thermotogae* e *Bacteroidetes*, che rappresentano rispettivamente il 9% e il 4% nel campione EF e il 6% e il 5% nel campione IM. *Planctomycetes* (4%), *Chloroflexi* (1%) e OP9 (1%) sono, inoltre, i phyla meno rappresentati e sono stati individuati solo nel campione IM. Dopo l'introduzione di H_2 nel GSTR sono stati osservati cambiamenti rilevanti nella struttura della comunità microbica sia per i campioni dell'effluente che per quelli della matrice interstiziale. Sebbene i phyla *Synergistetes* e *Firmicutes* rappresentino ancora una frazione considerevole delle comunità UP2, la loro

abbondanza relativa è notevolmente diminuita rispetto ai campioni prelevati durante la fase AD. In particolare, nel campione EF-UP2 la rappresentatività dei phyla *Synergistetes* e *Firmicutes* è diminuita, rispettivamente, al 25% e al 19%. Un andamento diverso è stato invece osservato nel campione IM-UP2, caratterizzato da una ulteriore diminuzione del phylum *Synergistetes* (17%) e da una rappresentatività pari al 51% dei microrganismi appartenenti al phylum *Firmicutes*. Lo shift strutturale più rilevante osservato all'interno della comunità Bacteria al termine della fase di aggiunta dell'idrogeno, riguarda, però, il phylum *Chloroflexi*, rappresentato da 37% e 16%, rispettivamente nei campioni EF-UP2 e IM-UP2. Tra le comunità microbiche meno rappresentate nel corso della fase AD, si può osservare un aumento delle abbondanze relative dei phyla *Planctomycetes* (9% e 6% rispettivamente in EF e IM), ed OP9 (4% e % rispettivamente in EF e IM), e, con una tendenza opposta, una diminuzione dei phyla *Thermotogae* (3% e 1% rispettivamente in EF e IM) e *Bacteroidetes* (0.5% e 1% rispettivamente in EF e IM).

Una caratterizzazione più dettagliata della comunità microbica *Bacteria* può essere dedotta dall'abbondanza relativa a livello tassonomico di Famiglia, come mostrato in Figura 5.

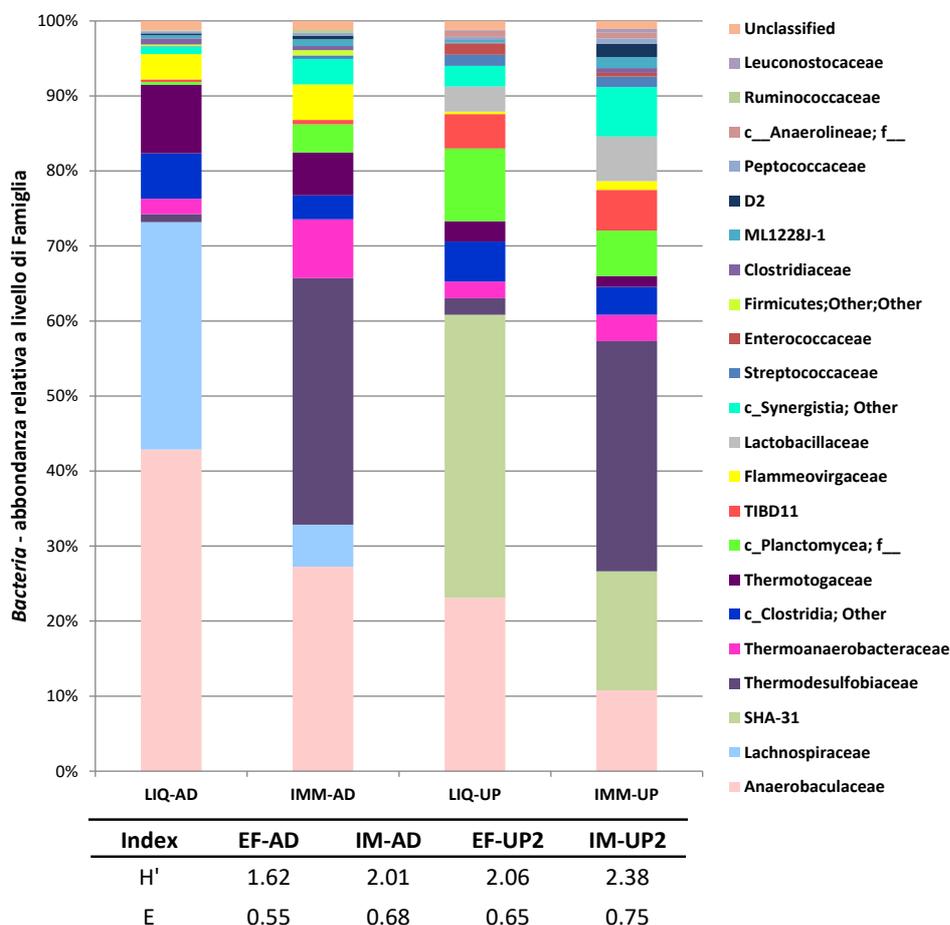


Figura 5. Abbondanze relative delle comunità Bacteria a livello di Famiglia alla fine delle fasi AD (digestione anaerobica) e UP2 (iniezione di H₂). Sono riportate le comunità con una abbondanza relativa ≥ 0.5% (in almeno un campione). EF: effluente; IM: matrice interstiziale. La tabella mostra i risultati degli indici Shannon-Weaver (H') e Evenness (E).

La famiglia *Anaerobaculaceae* è stata l'unica ad essere identificata all'interno dei *Synergistetes* ed in tutti i campioni analizzati, indipendentemente dalla fase sperimentale o dalla localizzazione all'interno del GSTR (EF-AD:42%, IM-AD:27%, EF-UP2:22%, IM-UP2:10%), suggerendo che i microrganismi appartenenti a questa famiglia svolgano un ruolo funzionale nel processo di DA della scotta. Infatti, l'identificazione tassonomica ha individuato a livello di specie il batterio *A. hydrogeniformans*, un microorganismo moderatamente termofilo, in grado di fermentare substrati se in presenza di NaCl. Queste proprietà lo rendono idoneo alla fermentazione di substrati salini e derivati dal latte, proprio come la scotta. Lo stesso batterio è stato

identificato durante la AD termofila della scotta [31], così come in un reattore CSTR monostadio, in un processo termofilo con lo stesso substrato ed un HRT di 15 giorni [36].

Il maggior numero di famiglie è stato identificato all'interno del phylum *Firmicutes*, un gruppo tassonomico che comprende microorganismi coinvolti nelle diverse fasi della AD, dall'idrolisi dei substrati alla attività sintrofica di ossidazione dell'acetato (SAO). In particolare, microorganismi appartenenti alla famiglia *Lachnospiraceae* sono risultati caratteristici della fase AD, sia nell'effluente (EF-AD: 30%) che nella matrice interstiziale della fase immobilizzata (IM-AD: 5%), anche se con una abbondanza relative inferiore. Questi batteri non sono stati identificati nell'effluente e nella fase immobilizzata alla fine della fase di aggiunta dell'idrogeno. Rappresentanti della famiglia *Thermodesulfobiaceae* sono stati identificati all'interno della matrice interstiziale sia nel corso della fase AD (IM-AD:32%) che nella successiva fase di upgrading (IM-UP:29%), mentre nei campioni di effluente, la loro presenza è risultata estremamente ridotta (EF-AD:1%, EF-UP2:2%), sebbene con una abbondanza decisamente inferiore (1%). Studi precedenti hanno attribuito a questa batteri una funzione attiva nella fase acidogenica dei substrati [39,40]. All'interno della matrice interstiziale è stato identificato come unico rappresentante della famiglia, il genere *Coprothermobacter*, un genere batterico che include membri termofili anaerobici che sono proteolitici e producono acetato, H₂ e CO₂ e la cui presenza è spesso associata a configurazioni di bioreattori che utilizzano supporti per la formazione di biofilm [41]. Infine, i membri della famiglia *Thermoanaerobacteraceae* sono stati identificati nei campioni della fase AD, con una abbondanza relative maggiore all'interno della matrice interstiziale (IM-AD:8%) rispetto all'effluente (EF-AD:2%) ed anche nei campioni raccolti alla fine della fase di aggiunta dell'idrogeno (EF-UP2: 2%, IM-UP2:3%). All'interno di questa famiglia in tutti i campioni è stato identificato un unico genere, il *Thermacetogenium*, a cui è attribuito un ruolo nell'attività metabolica SAO.

All'interno del phylum *Chloroflexi*, sono stati identificati batteri appartenenti alla famiglia SHA-31, caratteristici dell'effluente (EF-UP2: 36%) e della matrice interstiziale (IM-UP2: 15%) alla fine della fase UP2. Questi microorganismi sono considerati 'semi sintrofici' in quanto coinvolti sia nel metabolismo eterotrofo dei carboidrati che nel meccanismo di trasferimento *interspecie* di elettroni, in cooperazione mutualistica con i metanogeni[42].

La diversità delle comunità di batteri identificate nei campioni analizzati, è stata stimata mediante gli indici di diversità Shannon-Weaver (H') and Pielou's Evenness (E), riportati nella Figura 5. H' tiene conto sia del numero di famiglie identificate sia delle abbondanze relative delle medesime (maggiore è il valore di H' maggiore è la diversità), mentre E misura il grado di uniformità nella distribuzione dei batteri tra le diverse famiglie: è massimo (=1) quando tutte le famiglie sono presenti con la stessa abbondanza, ha invece valori bassi quando è presente una sola famiglia abbondante e numerose specie rare. In questo contesto, un aumento della diversità delle famiglie presenti all'interno della comunità microbica del GSTR può essere interpretato come una loro risposta adattativa, con una probabile ridondanza funzionale, alle diverse condizioni operative del processo. Il campione prelevato all'interno della matrice immobilizzata IM-UP2 ha espresso la maggiore diversità (H'=2.38 and E=0.75), suggerendo che all'interno di questa matrice l'idrogeno introdotto nel GSTR ha prodotto i cambiamenti più rilevanti della diversità all'interno della comunità microbica rispetto alla fase iniziale di AD. Inoltre, il confronto dei valori degli indici che caratterizzano l'effluente nel corso della AD (EF-AD: H'=1.62 e E=0.55) e nel corso della fase di aggiunta di idrogeno (EF-UP2: H'=2.06 e E=0.65) suggerisce che anche in questa matrice l'idrogeno ha indotto l'aumento della diversità microbica. Infine, dal confronto dei valori degli indici dei campioni IM-AD (H'=2.01 and E=0.68) e EF-AD (H'=1.62 and E=0.55) si può concludere che anche la strategia di immobilizzazione ha prodotto una maggiore diversità nella comunità dei batteri.

2.3.3 Sequenziamento Illumina: comunità Archaea

La comunità microbica *Archaea* identificata nel GSTR è risultata appartenere al phylum *Euryarchaeota*. L'abbondanza relativa complessiva della comunità dei metanogeni all'interno del GSTR è risultata molto bassa durante la fase AD, variando dallo 0.1% allo 0.40% rispettivamente nell'effluente e nella fase immobilizzata. Successivamente, in seguito all'aggiunta di H₂ nel GSTR, la popolazione metanogena è aumentata fino allo 0.64% EF-UP2 e fino all'1.42% in IM-UP2. La Figura 6 mostra l'abbondanza relativa degli *Archaea* a livello di famiglia.

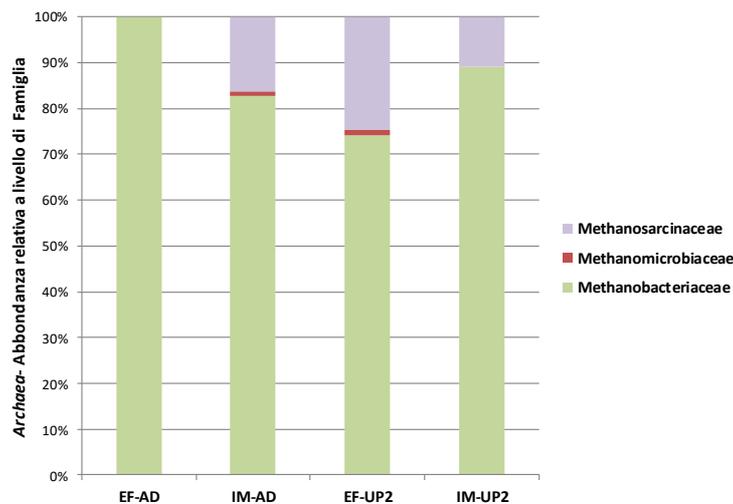


Figura 6. Abbondanze relative delle comunità Archaea a livello di Famiglia alla fine delle fasi AD (digestione anaerobica) e UP2 (iniezione di H₂). Sono riportate le comunità con una abbondanza relativa ≥ 0.5% (in almeno un campione). EF: effluente; IM: matrice interstiziale.

I membri della famiglia delle *Methanobacteriaceae* hanno dominato nelle fasi AD e di aggiunta dell'idrogeno in entrambe le matrici analizzate. Nel corso della fase AD essi costituiscono l'intera comunità dell'effluente e la parte più abbondante della fase immobilizzata (IM-AD:83%). Analogamente, alla fine della fase UP2 sperimentali di upgrading, essi costituiscono il 74% e l'89% rispettivamente in EF-UP2 e IM-UP2. Il metanogeno *Methanothermobacter thermoautrophicus*, è noto per il suo ruolo idrogenotrofo, è stato identificato sia in AD che in UP2. Il predominio della via idrogenotrofa durante la AD della scotta è stato già riportato in letteratura [31], ed è correlato alle caratteristiche saline del substrato. Inoltre, una comunità più piccola ed appartenente alla famiglia *Methanosarcinaceae*, è stata individuata in IM-AD (16%), in EF-UP2 (25%) e IM-UP2 (11%), ma non in EF-AD, ed è risultata appartenere al genere *Methanosarcina*. Questi Archaea sono considerati stabilizzatori del processo di AD per la capacità di cambiare il loro percorso metabolico della metanogenesi, da acetoclastica a idrogenotrofa, come ad esempio, quando aumenta la pressione parziale di H₂ [43].

2.3.4 Abbondanza microbica totale e di Bacteria ed Archaea

L'abbondanza microbica totale (n° totale cellule mL⁻¹) così come le frazioni di batteri appartenenti ai domini di *Bacteria* ed *Archaea* nelle diverse condizioni sperimentali sono mostrate nella Figura 7.

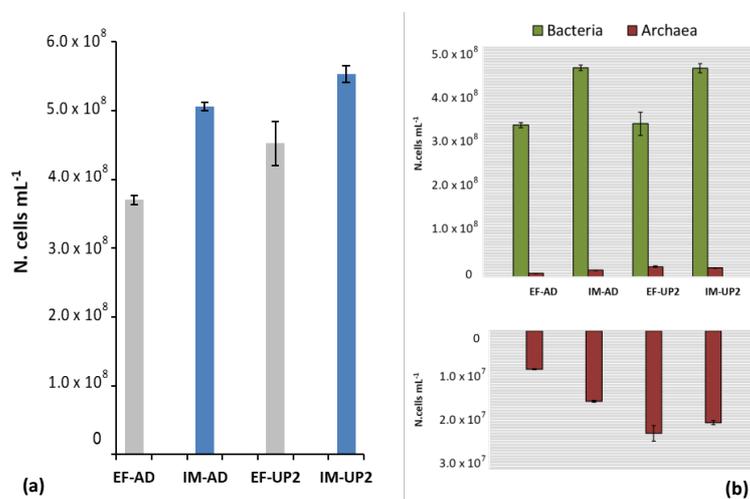


Figura 7. Abbondanza microbica (N. cellule mL⁻¹) nelle diverse condizioni sperimentali. (a) Abbondanza microbica totale rilevata mediante colorazione DAPI nell'effluente (EF, barre grigie) e nella matrice interstiziale (IM, barre blu),

prima (AD, digestione anaerobica) e dopo (UP2) l'aggiunta di H₂; (b) abbondanza di Bacteria (verde) ed Archaea (rosso) nell'effluente (EF) e nella matrice interstiziale (IM), prima e dopo l'aggiunta di H₂ (AD e UP2, rispettivamente) determinate combinando i risultati ottenuti con la tecnica FISH e quelli ottenuti mediante colorazione DAPI. In basso, gli Archaea sono mostrati a scala minore per evidenziarne le differenze tra le differenti condizioni sperimentali.

Il valore più elevato ed il valore più basso di abbondanza microbica totale sono stati rilevati rispettivamente in IM-UP2 con $5.53 \times 10^8 \pm 1.2 \times 10^7$ cellule mL⁻¹ e in EF-AD con $3.7 \times 10^8 \pm 6,24 \times 10^6$ cellule mL⁻¹ (Figura 3a). Sia nell'effluente (EF) che nella matrice interstiziale (IM), l'abbondanza microbica totale è incrementata dopo l'aggiunta di H₂, rispettivamente del 22% e 9%. Sia IM-AD che IMUP2 hanno mostrato un'abbondanza microbica totale superiore alle corrispondenti fasi effluenti, i.e. EF-AD e EF-UP2, rispettivamente del 37% e del 22%, evidenziando l'effetto positivo che la presenza di supporti immobilizzanti ha esercitato sulla comunità microbica. Le analisi condotte con tecnica FISH hanno mostrato una forte predominanza di *Bacteria* nelle comunità microbiche di tutte le condizioni sperimentali (Figura 7b), mentre il contributo degli *Archaea* è risultato essere compreso tra il 2.2% e il 5.2%, in linea con i valori generalmente rilevati nelle comunità microbiche durante il processo di AD [44]. Più in particolare, prima dell'aggiunta di H₂ le cellule di *Bacteria* rappresentavano l'89% e il 91% rispettivamente in EF-AD e IM-AD, mentre alla fine della fase UP2 la loro concentrazione è risultata diminuita rispettivamente all'80% e all'84%. L'aggiunta di H₂ ha influenzato positivamente la componente *Archaea*, soprattutto nei campioni dell'effluente EF-UP2, per il quale ne è stata rilevata una concentrazione del 5.2% corrispondente a 2.23×10^7 cellule mL⁻¹ con un aumento del 134% rispetto a EF-AD che ha mostrato una concentrazione di 0.83×10^7 cellule mL⁻¹ (Figura 3b). La percentuale di *Archaea* nella matrice interstiziale, prima e dopo l'aggiunta di H₂, è stata rispettivamente del 3.1% e 3.7%, corrispondente ad un aumento del 43% dopo l'aggiunta di H₂. Inoltre, si può affermare che la presenza di supporti HDPE abbia generato un habitat favorevole per la comunità microbica, come evidenziato sia dai valori di abbondanza microbica totale (Figura 7a) che dei Bacteria (Figura 7b) in entrambe le fasi. Più in particolare si può quindi ipotizzare che i supporti favoriscano il contatto dell'idrogeno con le cellule microbiche e forniscano anche un habitat rifugio in cui il disturbo della disposizione spaziale delle popolazioni attive nella AD, soprattutto limitandone il *wash-out*.

Anche altri autori [45] lavorando in condizioni di mesofilia, hanno osservato un aumento della componente di *Archaea* in presenza di supporti porosi ma questo studio è tra i primi a riferirsi a una condizione termofila.

2.3.5 Conclusioni

La nuova configurazione GSTR proposta si è dimostrata idonea al processo termofilo di digestione anaerobica della scotta non diluita. È stata ottenuta una resa in metano di 0.329 ± 0.17 LCH₄ gCOD⁻¹, corrispondente al 94% del suo valore teorico e a differenza di altri studi, non si è reso necessario il controllo del pH. L'aggiunta di H₂ (fase UP1) ha indotto un aumento della velocità di produzione di metano del 25% rispetto a quella ottenuta nella fase AD, senza compromettere l'efficienza di rimozione del substrato. La concentrazione di CH₄ nel biogas (UP2: 56%), tuttavia, si attestava su valori simili a quelli della fase AD (55.5%) o leggermente inferiori (UP1: 48.2%).

Dal punto di vista microbiologico, i dati sull'abbondanza microbica e quelli sulla composizione della comunità hanno mostrato che l'aggiunta nel GSTR sia dei supporti HDPE che dell'H₂ determinavano modifiche nella struttura e nella composizione della comunità di *Bacteria* e di *Archaea*. In particolare i dati sull'abbondanza microbica hanno evidenziato un aumento di entrambe le comunità all'interno dell'area immobilizzata delle fasi sperimentali AD e UP2. L'aggiunta di H₂ produceva un ulteriore arricchimento della comunità *Archaea* metanogena sia nell'area immobilizzata che nell'effluente.

Inoltre, la caratterizzazione delle comunità di *Bacteria* identificate nel GSTR, ha evidenziato che l'implementazione del reattore con i supporti HDPE ha permesso di identificare due matrici differenziate, l'effluente e la fase immobilizzata, ognuna caratterizzata da una composizione microbica sito-specifica e peculiare. Infatti, oltre ad un *core* microbico comune alle due matrici sia durante la fase AD che durante la fase di aggiunta dell'idrogeno, e rappresentato dai microorganismi coinvolti nel metabolismo della scotta ed appartenenti alla famiglia delle *Anaerobaculaceae*, è stato identificato anche un *core* microbico specifico della fase immobilizzata e rappresentato dalla famiglia *Thermodesulfobiaceae*. Infine, un *core* microbico peculiare della fase di aggiunta dell'idrogeno ed identificato sia nell'effluente che nella fase immobilizzata, è

stato identificato nella famiglia SHA-31. Nella comunità *Archaea*, sebbene sia stata rilevata la dominanza di metanogeni idrogenotrofi appartenenti alla famiglia *Methanobacteriaceae*, si è osservata l'evoluzione di una comunità di *Methanosarcinaceae* sia nella fase immobilizzata durante l'AD, sia nelle due matrici EF e IM durante la fase UP2, suggerendo una risposta adattativa, strutturale e metabolica, della comunità dei metanogeni sia alla presenza dei supporti che all'aggiunta di idrogeno.

2.4 Ottimizzazione del processo di biometanazione in situ

2.4.1 Efficienza del processo di upgrading del biogas

In tabella 5 sono riportati i valori dei parametri di processo utilizzati nelle diverse fasi sperimentali.

Tabella 5. Parametri di processo utilizzati nel corso della sperimentazione

| Parametri | AD | UP1 | UP2 | UP3 | UP4 |
|--|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| HRT (g) | 30 ± 1 | 30 ± 1 | 30 ± 1 | 30 ± 1 | 30 ± 1 |
| Carico organico (gVS L _r ⁻¹ d ⁻¹) | 1.20 ± 0.02 | 1.16 ± 0.08 | 1.16 ± 0.05 | 1.26 ± 0.09 | 1.28 ± 0.08 |
| H ₂ in. (LH ₂ L _r ⁻¹ d ⁻¹) | - | 1.18 ± 0.01 | 1.47 ± 0.01 | 1.47 ± 0.01 | 1.47 ± 0.01 |
| Ricircolo del biogas (L L _r ⁻¹ d ⁻¹) | 118 ± 5 | 118 ± 5 | 118 ± 5 | 176 ± 5 | 235 ± 5 |
| H ₂ :CO ₂ | - | 4:1 | 5:1 | 5:1 | 5:1 |

In questa attività sperimentale l'HRT del processo è stato prolungato a 30 giorni e, dal momento che la scotta è stata utilizzata non diluita, la velocità di rifornimento del carico organico risultava inferiore a quello utilizzato nella prima attività sperimentale. Come precedentemente detto, l'oscillazione del suo valore è in relazione alle diverse caratteristiche chimico-fisiche che presenta il refluo caseario alla fine del processo di produzione della ricotta.

La sperimentazione iniziava con il processo di AD e l'omogeneizzazione dei nutrienti era assicurata dal ricircolo del biogas ad una velocità di 118 L L_r⁻¹ d⁻¹. Dopo 60 giorni, quando il processo AD risultava stabile (deviazione standard ≤10%), un flusso di H₂ puro (≥99%) ottenuto da un elettrolizzatore (DBS, model PG-H2 100), era iniettato in continuo al fondo del reattore tramite la linea di ricircolo del biogas. La velocità di flusso (1.18 L L_r⁻¹ d⁻¹) è stata impostata, nella fase UP1, per ottenere all'interno del reattore un rapporto H₂: CO₂ di 4:1. La velocità di ricircolo del biogas era mantenuta a 118 L L_r⁻¹ d⁻¹. Questa fase sperimentale veniva denominata UP1. Successivamente, il flusso di idrogeno era aumentato alla velocità di 1.47 L L_r⁻¹ d⁻¹ (rapporto H₂: CO₂=5:1) e la velocità di ricircolo veniva raddoppiata (118 L L_r⁻¹ d⁻¹). Questa fase sperimentale veniva denominata UP2. Nelle successive fasi UP3 e UP4, è stata incrementata la velocità di ricircolo del biogas rispettivamente a 176 L L_r⁻¹ d⁻¹ e a 235 L L_r⁻¹ d⁻¹.

I parametri di performance delle diverse fasi sperimentali sono riassunte nella tabella 6. In figura 8 sono mostrati gli andamenti giornalieri dei flussi di biogas, CH₄, H₂ e CO₂.

Tabella 6. Valori medi dei parametri di performance delle cinque fasi sperimentali (AD, UP1, UP2, UP3, UP4).

| Parametri | AD | UP1 | UP2 | UP3 | UP4 |
|---|-------------|--------------|---------------|-------------|-------------|
| Biogas (L L _r ⁻¹ g ⁻¹) | 0.61 ± 0.02 | 0.93 ± 0.02 | 0.94 ± 0.02 | 0.87 ± 0.03 | 0.80 ± 0.03 |
| H ₂ % | / | 31.1 ± 0.71 | 33.0 ± 0.21 | 27.0 ± 0.20 | 20.5 ± 0.13 |
| CH ₄ % | 51.5 ± 0.40 | 55.8 ± 0.51 | 60. ± 0.83 | 67.8 ± 0.91 | 75.2 ± 0.53 |
| CO ₂ % | 48.5 ± 0.40 | 13.10 ± 0.65 | 7.0 ± 0.58 | 5.22 ± 0.89 | 4.34 ± 0.48 |
| H ₂ out (L L _r ⁻¹ g ⁻¹) | / | 0.29 ± 0.01 | 0.31 ± 0.01 | 0.24 ± 0.01 | 0.16 ± 0.01 |
| CH ₄ out (L L _r ⁻¹ g ⁻¹) | 0.32 ± 0.01 | 0.52 ± 0.01 | 0.57 ± 0.03 | 0.59 ± 0.02 | 0.60 ± 0.02 |
| rt (L L _r ⁻¹ g ⁻¹) | / | 0.89 ± 0.01 | 1.14 ± 0.01 | 1.22 ± 0.01 | 1.28 ± 0.01 |
| ηH ₂ (%) | / | 75 | 79 | 84 | 89 |
| MER (LCH ₄ L _r ⁻¹ g ⁻¹) | ND | 0.20 | 0.25 | 0.27 | 0.28 |
| Lattosio (mg/L) | 224 ± 13 | 168 ± 12 | 148 ± 13 | 159 ± 6.85 | 172 ± 10 |
| Acido acetico (mg L ⁻¹) | 33 ± 1.8 | 32 ± 1.5 | 41 ± 7 | 159 ± 15 | 358 ± 10 |
| pH | 7.10 ± 0.14 | 7.81 ± 0.20 | 8.12 ± 0.0.18 | 8.20 ± 0.15 | 8.24 ± 0.10 |
| VS nell'effluente (g L ⁻¹) | 4.78 ± 0.15 | 4.76 ± 0.12 | 4.81 ± 0.14 | 4.96 ± 0.21 | 4.85 ± 0.45 |

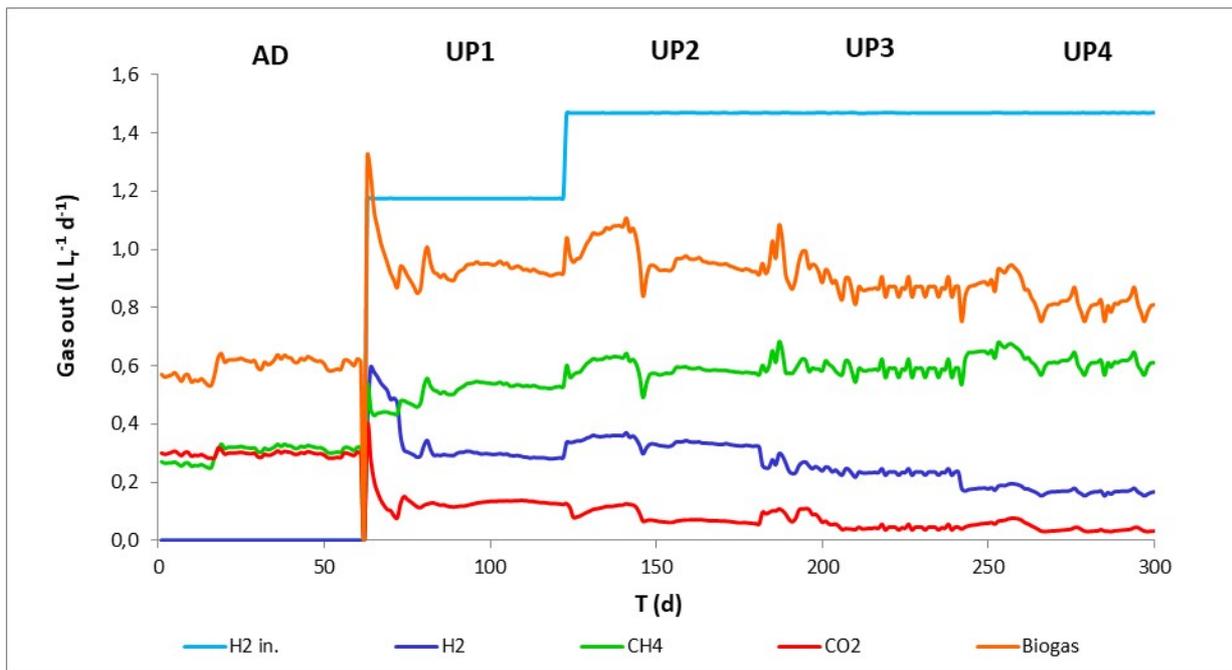


Figura 8 Andamenti giornalieri dei flussi di CH₄, CO₂, H₂ e H₂ iniettato durante le fasi sperimentali AD, UP1, UP2, UP3 e UP4).

Dopo circa 17 giorni dall'inizio della fase AD, si raggiungeva una produzione stabile di metano con valori medi di 0.32 ± 0.01 LCH₄ L_r⁻¹d⁻¹. Il pH del reattore si manteneva su valori di 7.10 ± 0.14 indicando una forte capacità tampone del sistema nonostante, anche in questa attività sperimentale, non fosse stato applicato nessuno controllo del pH. Il contenuto medio di CH₄ nel biogas era del $51.5 \pm 0.40\%$ e la resa media era pari a 0.270 ± 0.05 LCH₄ gVS⁻¹.

Dopo 60 giorni veniva iniettato H₂, alla velocità di 1.18 LH₂ L_r⁻¹ d⁻¹ mentre la velocità di ricircolo del biogas era mantenuta a 118 L L_r⁻¹ d⁻¹, come nella fase precedente. Durante lo stato stazionario di UP1, (da 80 a 120 giorni), il tasso di produzione di CH₄ aumentava a 0.52 ± 0.01 LCH₄ L_r⁻¹ d⁻¹ pari ad un incremento del 65% rispetto alla fase AD, ma la concentrazione di metano nel biogas era solo del $55.8\% \pm 0.5$. Il pH raggiungeva

valori di 7.81 e il coefficiente di efficienza dell'utilizzo di H₂ (η_{H_2}) era del 75%. Tale elevato valore unito ad una concentrazione relativamente alta di H₂ (31.10 ± 1.70) e bassa di CO₂ (13.1 ± 0.65) nel gas in uscita, suggeriva una limitazione della configurazione GSTR per ottenere un trasferimento completo di H₂ nella fase liquida.

Nella successiva fase UP2 (da 121 a 180 giorni) veniva, quindi, applicata una maggiore velocità di iniezione di H₂ ($1.47 \text{ LH}_2 \text{ L}_r^{-1} \text{ d}^{-1}$), mantenendo costante la velocità di ricircolo del biogas (ovvero $118 \text{ L L}_r^{-1} \text{ d}^{-1}$). Durante lo stato stazionario di UP2 (raggiunto dopo il giorno 22), la portata di CH₄ era di $0.57 \pm 0.02 \text{ LCH}_4 \text{ L}_r^{-1} \text{ d}^{-1}$. Il tasso di consumo di H₂ (rt) aumentava da 0.89, osservato nella fase UP1, a $1.16 \text{ LH}_2 \text{ L}_r^{-1} \text{ d}^{-1}$. La percentuale di CH₄ nel biogas raggiungeva il valore del 60%.

Il contributo dell'H₂ all'incremento della produzione di metano (MER) aumentava da $0.20 \text{ LCH}_4 \text{ L}_r^{-1} \text{ d}^{-1}$ (fase UP1) a $0.25 \text{ LCH}_4 \text{ L}_r^{-1} \text{ d}^{-1}$ e il flusso di CO₂ in uscita era inferiore del 54% rispetto a UP1, determinando un aumento del valore del pH (8.12).

Nelle successive fasi sperimentali, UP3 e UP4, la velocità di ricircolo del gas è stata aumentata rispettivamente a $176 \text{ L L}_r^{-1} \text{ d}^{-1}$ e a $235 \text{ L L}_r^{-1} \text{ d}^{-1}$. Come si può osservare dai valori dei parametri di processo (Tabella 6), la velocità di trasferimento di massa gas-liquido dell'H₂ aumentava fino a $1.28 \text{ LH}_2 \text{ L}_r^{-1} \text{ d}^{-1}$, che corrispondeva ad un'efficienza di utilizzo dell'H₂ dell'89% (UP4). Allo stesso tempo veniva raggiunta una concentrazione di CH₄ nel biogas del 75% corrispondente ad un incremento del 46% rispetto al valore ottenuto nella fase AD. Il contributo dell'H₂ all'incremento della produzione di metano (MER) raggiungeva il suo più elevato valore nell'ultima fase di sperimentazione con valori di $0.28 \text{ LCH}_4 \text{ L}_r^{-1} \text{ d}^{-1}$. Il contenuto di CO₂ diminuiva ulteriormente raggiungendo il valore di 4.34 ± 0.08 , cioè del 91% inferiore alla concentrazione osservata nella fase AD. Il valore del pH si attestava mediamente a 8.24. Il biogas presentava, quindi, una composizione media percentuale di 75.2% CH₄, 4.34% CO₂ e 20.5% H₂.

Come precedentemente riportato da altri autori [8,20], l'aumento della velocità di ricircolo del biogas migliora il processo di upgrading del biogas. I risultati raggiunti in questo studio sono confrontabili con quelli ottenuti in un reattore CSTR (20 L di volume di lavoro) implementato con un modulo a membrana e il ricircolo del biogas per aumentare la solubilità dell'H₂ [8]. Al termine della sperimentazione, gli autori ottenevano un biogas con un contenuto di CH₄, H₂ e CO₂ rispettivamente del $73\% \pm 3.4$, $7.2\% \pm 2,4$ e $19.7\% \pm 3$, applicando una velocità di ricircolo del biogas di $202 \text{ L}_r^{-1} \text{ d}^{-1}$. Inoltre era ottenuto un valore MER di $0.16 \text{ LCH}_4 \text{ L}_r^{-1} \text{ d}^{-1}$ con un valore di efficienza di utilizzo di H₂ del 94%. In confronto, nel presente studio, è stato raggiunto un valore di MER più elevato ($0.29 \text{ LCH}_4 \text{ L}_r^{-1} \text{ d}^{-1}$) ma l'efficienza di utilizzo dell'H₂ è risultata inferiore (89%), come confermato dalle differenze nel contenuto di H₂ nel biogas (20.5% vs 7.2%).

Inoltre, l'aggiunta di idrogeno non ha alterato il processo di digestione anaerobica, come confermato dai parametri di efficienza di rimozione del substrato organico nelle fasi UP1-UP4, che dimostrano come i valori medi dei solidi volatili e del lattosio residuo misurati nell'effluente risultano comparabili con quelli ottenuti nella fase AD, (Tabella 6). L'acido acetico è stato l'unico metabolita solubile rilevato nell'effluente in tutti le fasi sperimentali, anche se, in seguito all'aggiunta di H₂, si è osservato un aumento della sua concentrazione fino ad un valore di $358 \pm 10 \text{ mg L}^{-1}$ nella fase UP4.

Come già riportato nell'introduzione l'H₂ può anche essere utilizzato dai batteri omoacetogeni per produrre acetato, oltre che ad essere convertito in CH₄ dai metanogeni idrogenotrofi. D'altra parte, l'acetato può, a sua volta, essere convertito in CH₄ dai metanogeni acetoclasti. Quindi, l'accumulo di acido acetico nella fase UP4 era, probabilmente, il risultato dell'attivazione del percorso metabolico di omoacetogenesi e di una ridotta espressione della via acetoclastica da parte dei metanogeni.

2.4.2 Sequenziamento Illumina: comunità Bacteria

Nel corso della seconda serie di sperimentazione, le comunità microbiche dei campioni di effluente raccolti alla fine di ciascuna fase sperimentale (AD, UP1 e UP4) nonché del digestato termofilo utilizzato come inoculo, sono state analizzate mediante sequenziamento 16S su piattaforma Illumina.

La comunità microbica dei *Bacteria* ha rappresentato in media il 96%-99% dell'intera comunità, con i rimanenti 1%-4% classificati come *Archaea*.

Le abbondanze relative dei rappresentanti della comunità *Bacteria* a livello tassonomico di Phylum sono mostrate in Figura 9.

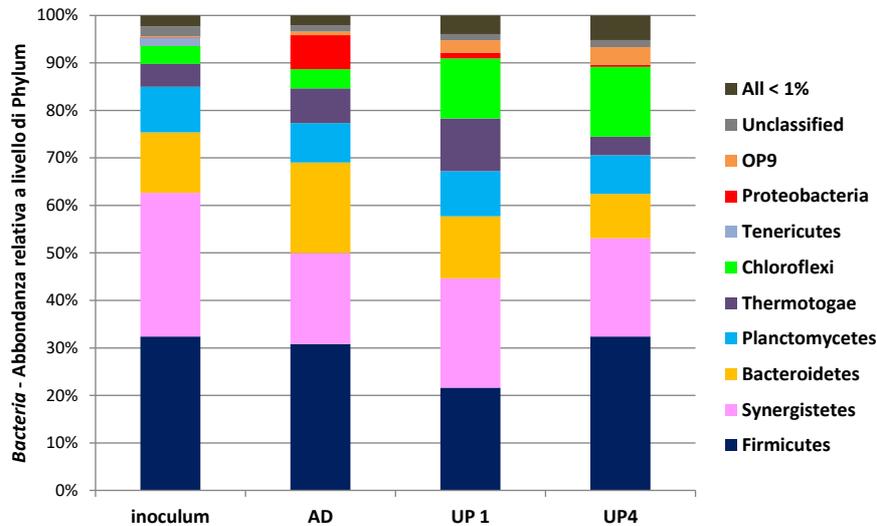


Figura 9. Abbondanze relative delle comunità Bacteria a livello di phylum nel digestato usato come inoculo, alla fine della fasi AD (digestione anaerobica), UP2 e UP4 (iniezione di H2). Sono riportate le comunità con una abbondanza relativa $\geq 1\%$ (in almeno un campione).

I phyla *Firmicutes* (33%) e *Synergistetes* (31%) rappresentavano più della metà dell'intera comunità microbica identificata nel digestato termofilo utilizzato come inoculo. Inoltre, sono risultati abbondanti i batteri appartenenti ai phyla *Bacteroidetes* e *Planctomycetes*, rappresentando rispettivamente il 13% e il 10%. Phyla rappresentativi minori sono stati identificati come *Thermotogae* (5%), *Chloroflexi* (4%) e *Tenericutes* (2%). Il profilo della comunità batterica identificata nell'inoculo è rimasta abbastanza stabile nel campione raccolto alla fine della fase AD. La differenza più rilevante è stata identificata dalla presenza dei phyla *Proteobacteria* (7%) e OP9 (1%). Inoltre, i phyla *Firmicutes* (31%), *Sinergistetes* (19%) e *Bacteroidetes* (19%) rappresentavano ancora una frazione considerevole dell'intera comunità microbica, mentre i membri di *Planctomycetes* (8%), *Thermotogae* (7%) e *Chloroflexi* (4%) sono rimasti stabili, mentre i membri *Tenericutes* sono completamente scomparsi.

Analogamente, nei campioni UP1 e UP4 raccolti alla fine delle fasi di upgrading del biogas, le abbondanze relative osservate nel corso della AD, sono rimaste stabili per i membri di *Firmicutes* (UP1: 22%, UP4: 32%), *Sinergistetes* (UP1: 23% e UP4: 21%), *Bacteroidetes* (UP1: 13%, UP4: 9%) e *Planctomycetes* (UP1: 10%, UP4: 8%), ed è stato anche osservato un aumento significativo dei membri appartenenti al phylum *Chloroflexi* (UP1: 13%, UP4: 15%). I membri di OP9 sono leggermente aumentati (UP1: 3%, UP4: 4%), mentre, al contrario, i rappresentanti del phylum *Proteobacteria* sono diminuiti in UP1 (1%) e sono scomparsi completamente in UP4.

La caratterizzazione a livello di phylum ha confermato come l'intera comunità microbica identificata nel digestato utilizzato come inoculo fosse già acclimatata al processo di AD termofilo della scotta e con lo stesso tempo di ricambio, corrispondente a 30 giorni. Inoltre, la sua composizione si è mantenuta abbastanza stabile durante le fasi sperimentali AD, UP1 e UP4, supportando le prestazioni stabili del processo AD nel GSTR. Una caratterizzazione più dettagliata all'interno della struttura microbica si ottiene dalla classificazione tassonomica a livello di famiglia (Figura 10).

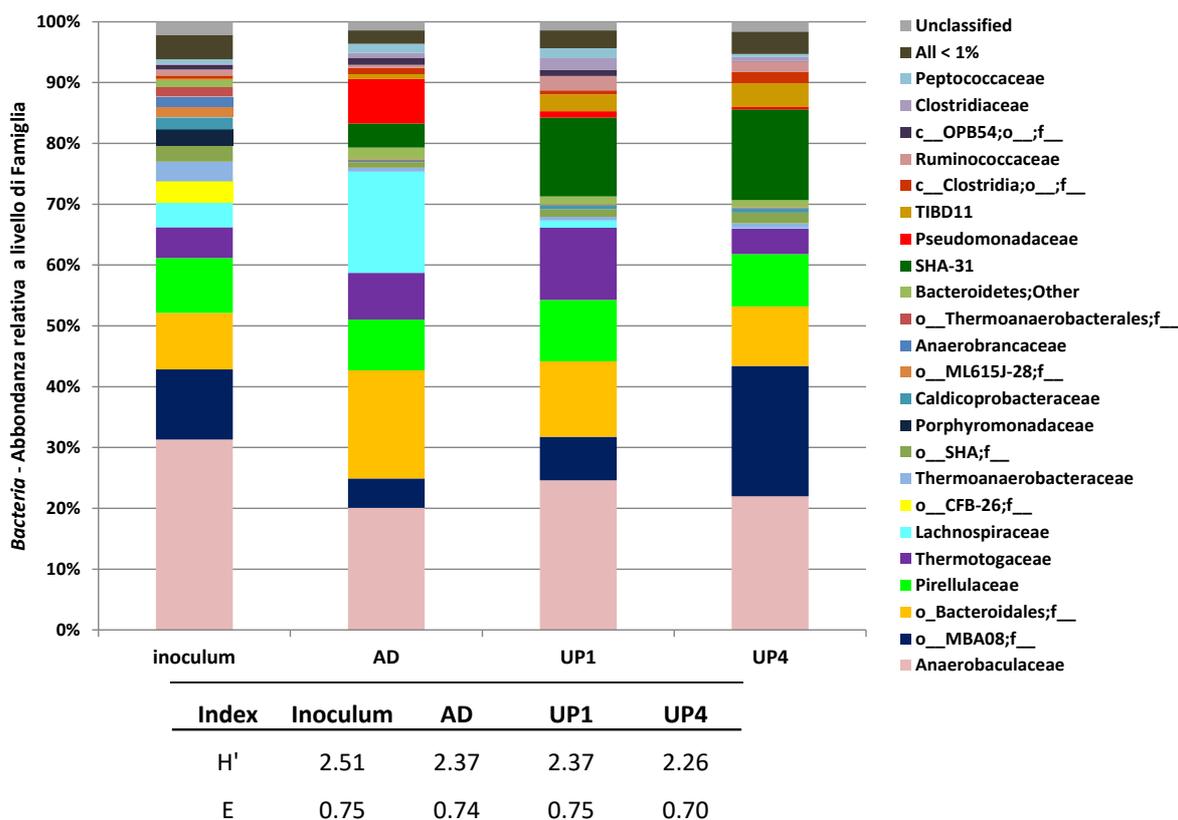


Figura 10. Abbondanze relative delle comunità Bacteria a livello di Famiglia nel digestato usato come inoculo, alla fine delle fasi AD (digestione anaerobica), UP2 e UP4 (iniezione di H2). Sono riportate le comunità con una abbondanza relativa $\geq 1\%$ (in almeno un campione). La tabella mostra i risultati degli indici Shannon-Weaver (H') e Evenness (E).

La famiglia *Anaerobaculaceae* è stata l'unica rappresentante del phylum *Synergistetes* rilevata in tutti i campioni: nell'inoculo (31%), in AD (19%), UP1 (23%) e UP4 (21%). Questa famiglia è stata affiliata come genere *Anaerobaculum*, già rilevato nel GSTR durante la precedente sperimentazione (paragrafo 2.3.2) e costituisce il core microbico direttamente coinvolto nel processo di AD della scotta [31,36,46].

All'interno del phylum *Firmicutes*, sono stati identificati batteri appartenenti ad una famiglia non identificata a livello tassonomico, ma riconducibile all'ordine MBA08 della classe *Clostridia*, sia nell'inoculo (11%), che negli effluenti AD (5%), UP1 (7%) e UP4 (20%). Questa comunità microbica, sebbene presente nel digestato utilizzato per inoculare il GSTR all'inizio delle sperimentazioni, non era mai stata rilevata nel corso della prima sperimentazione perché probabilmente presente in quantità inferiori alla capacità di rilevamento della tecnica di sequenziamento Illumina. E' probabile che l'HRT di 30 giorni utilizzato nella presente sperimentazione sia stato più favorevole per la sua proliferazione. La elevata abbondanza dei microorganismi appartenenti al genere MBA08, in grado di svolgere la fermentazione anaerobica dei carboidrati [47], è in linea con altri studi sui sistemi di upgrading biologico del biogas [48]. Batteri della famiglia *Lachnospiraceae* erano presenti nell'inoculo (4%), sono aumentati significativamente durante la fase AD (16%) e successivamente sono diminuiti in UP1 (1%) fino a scomparire in UP4. L'aumento dell'abbondanza relativa nella fase AD è in accordo con i risultati precedenti [46](Lembo et al., 2021). Nella sperimentazione corrente, l'identificazione a livello di specie come *Defluviitalea saccarophila*, ha permesso di identificare le sue proprietà metaboliche: un batterio a fermentazione termofila che produce acetato, formiato, n-butirrato e i-butirrato come prodotti principali [49]. Infine, sono stati identificati rappresentanti minori appartenenti alle famiglie *Clostridiaceae*, *Peptococcaceae*, *Ruminococcaceae*, *Natranaerobiales* e *Caldicoprobacteraceae* tutte affiliati alla classe *Clostridia* all'interno del phylum *Firmicutes*. Questi batteri, identificati nell'inoculo (5%), durante la fase AD (3%) e in entrambe le fasi UP1 (6%) e UP4 (3%), possono essere considerati come un

gruppo di microorganismi coinvolti in varie funzioni del processo di AD che vanno dall'idrolisi dei substrati al metabolismo SAO.

All'interno del phylum *Bacteroidetes*, sono stati rilevati in tutti i campioni, i rappresentanti di una famiglia non identificata a livello tassonomico ma appartenente all'ordine *Bacteriodales*: inoculo (9%), effluenti AD (17%), UP1 (12%) e UP4 (9%). Questi batteri, caratterizzati da una attività idrolitica [50], sono stati rilevati con bassa abbondanza nel corso della precedente sperimentazione [46](Lembo et al., 2021) sia nell'effluente che nella matrice interstiziale del GSTR durante la fase di AD, ma non nelle fasi di aggiunta dell'idrogeno. Pertanto, è possibile che il valore di HRT di 30 giorni abbia stabilizzato la comunità *Bacteroidetes* nel corso della AD della scotta, non risentendo successivamente, dell'aggiunta in situ di idrogeno. All'interno del phylum *Thermotogae*, sono stati identificati batteri appartenenti alla famiglia *Thermotogaceae* ed, in particolare, al genere S1 sia nell'inoculo (5%), che durante la fase AD (7%) e, dopo l'iniezione di idrogeno, sia in UP1 (11%) che UP4 (4%). Questi batteri svolgono un ruolo nel metabolismo SAO in cooperazione mutualistica con metanogeni idrogenotrofici [51].

La comunità batterica rappresentata dalla famiglia *Pirellulaceae* (ordine *Pirellulales*) all'interno del phylum *Planctomyces*, è stata rilevata nel digestato utilizzato come inoculo (9%) e si è mantenuta stabile durante le fasi sperimentali AD, UP1 e UP4 con abbondanze relative simili (8% -9%). La comunità di *Planctomyces* è scarsamente descritta in letteratura ed è sempre individuata come un gruppo minore all'interno di digestori mesofili [52,53]. La sua presenza in processi termofili è però confermata dalla precedente sperimentazione [46](Lembo et al., 20), durante la quale una famiglia non identificata a livello tassonomico e appartenente al phylum *Planctomyces*, è stata rilevata nel GSTR in tutti i campioni, ad eccezione dell'effluente della fase AD. Essendo stati rilevati nei fanghi utilizzati come inoculo, si può ipotizzare che nello studio corrente i membri della famiglia delle *Pirellulaceae* siano stati nuovamente favoriti dal tempo di ritenzione più lungo e dalla conseguente diminuzione del carico organico, come evidenziato anche da Krakat et al. [54]. Un comportamento analogo è attribuibile anche alla famiglia SHA-31 all'interno del phylum *Chloroflexi*, identificata nell'effluente AD con una abbondanza relativa del 4% che aumenta, successivamente, al 12% e al 14% rispettivamente in UP1 e UP4. Infine, vale la pena notare la presenza della famiglia delle *Pseudomonadaceae*, appartenente al phylum *Proteobacteria*, come gruppo microbico peculiare dell'effluente AD (7%). I membri di questa famiglia appartengono alla specie *fragi* a cui è attribuito un ruolo nell'accelerare il trasferimento di elettroni tra batteri sintrofici e metanogeni [47]. Questi microorganismi sono diminuiti significativamente quando l'idrogeno è stato introdotto in situ nel GSTR, suggerendo allo stesso tempo un adattamento della via microbica coinvolta nella metanogenesi.

Secondo gli indici Shannon-Weaver (H') e Pielou (E), la diversità delle comunità batteriche nell'inoculo ($H' = 2,51$ ed $E = 0,75$), durante la fase AD ($H' = 2,37$ ed $E = 0,74$), e le fasi UP1 ($H' = 2,37$ ed $E = 0,75$) e UP4 ($H' = 2,26$ ed $E = 0,70$) risultano molto simili. Ciò non sorprende, dal momento che il digestato utilizzato come inoculo era caratterizzato da una comunità microbica già acclimatata al processo AD con la scotta nonché all'iniezione di H_2 durante le attività riportate precedentemente [46].

2.4.3 Sequenziamento Illumina: comunità Archaea

La comunità microbica *Archaea* era rappresentata dall'unico phylum *Euryarchaeota*. Le abbondanze relative a livello di famiglia e di genere sono mostrate in Figura 11.

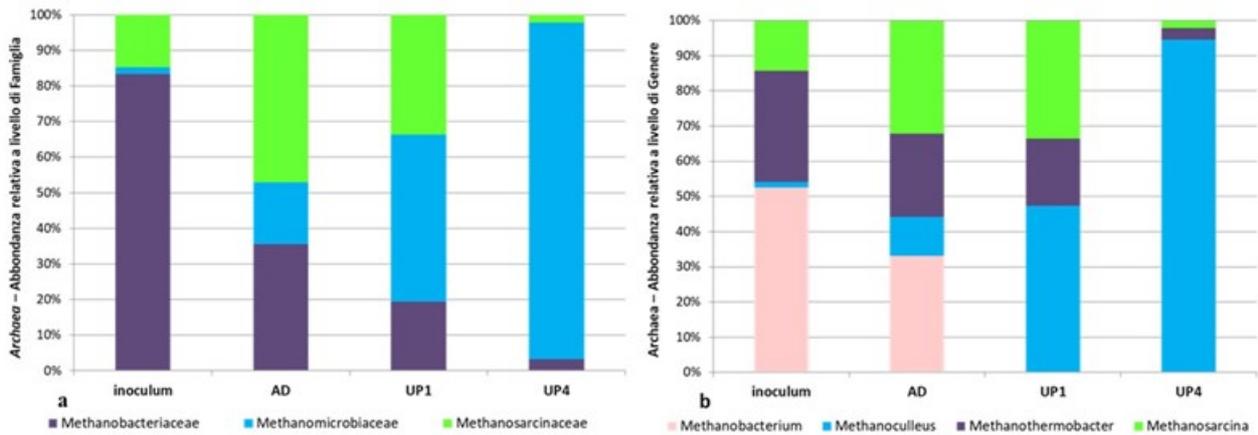


Figura 11. Abbondanze relative delle comunità Archaea a livello di Famiglia (a) e Genere (b) nel digestato usato come inoculo, alla fine delle fasi AD (digestione anaerobica), UP2 e UP4 (iniezione di H₂). Sono riportate le comunità con una abbondanza relativa ≥ 1% (in almeno un campione).

I membri della famiglia *Methanobacteriaceae* (83%) erano dominanti nel digestato utilizzato come inoculo risultando affiliati a livello tassonomico di genere a *Methanothermobacter* (32%) e *Methanobacterium* (53%), quest'ultimo identificato nella specie *thermautotrophicus*. Pertanto, una comunità dominata da metanogeni idrogenotrofi ha caratterizzato il digestato utilizzato come inoculo. Questa comunità ha colonizzato l'intera comunità di *Archea* identificata nel corso della prima sperimentazione (paragrafo 2.3.3). Inoltre, i metanogeni appartenenti alla famiglia *Methanosarcinaceae* sono stati identificati con una abbondanza minore (15%) e rappresentati da un unico genere, *Methanosarcina*. Infine, l'inoculo è stato caratterizzato da una piccola comunità di metanogeni appartenenti alla famiglia *Methanomicrobiaceae* (2%).

La comunità degli *Archea* nell'effluente è cambiata in modo significativo durante la fase AD: la famiglia delle *Methanobacteriaceae* è diminuita al 35%, e, contemporaneamente, l'abbondanza delle famiglie *Methanosarcinaceae* e *Methanomicrobiaceae* è aumentata, rispettivamente al 47% e al 17%, ed ognuna è risultata affiliata ai rispettivi generi *Methanosarcina* e *Methanoculleus*. Il genere *Methanobacterium* è invece scomparso. I principali cambiamenti osservati nella comunità dei metanogeni durante la fase AD hanno evidenziato che una nuova comunità con proprietà idrogenotrofe (*Methanoculleus*) ha sostituito la precedente (*Methanobacterium*) fornendo, probabilmente, un vantaggio alla comunità di acetoclasti *Methanosarcina*. Questi cambiamenti della comunità *Archea* sia strutturali che funzionali, hanno così definito una comunità equamente distribuita tra metanogeni idrogenotrofi e acetoclasti, che ha prodotto un processo di AD molto stabile. La comunità dei metanogeni è stata ulteriormente modificata in seguito all'immissione nel GSTR dell'idrogeno e all'inserimento del ricircolo del biogas. I metanogeni del genere *Methanoculleus* sono aumentati in UP1 (47%) fino a diventare dominanti in UP4 (94%). Allo stesso tempo, sia i membri di *Methanothermobacter* che di *Methanosarcina* sono progressivamente diminuiti in UP1 (19% e 33%, rispettivamente) e in UP4 (3% e 2%, rispettivamente). La dominanza degli idrogenotrofi del genere *Methanoculleus* ha caratterizzato la comunità degli *Archea* al termine della fase sperimentale di upgrading del biogas, in accordo con altri studi che ne hanno individuato la presenza sia negli effluenti dei digestori [31,47], che nel biofilm sviluppatosi all'interno dei supporti di immobilizzazione [19]. La dominanza di *Methanoculleus* nel nostro sistema sperimentale è stata probabilmente favorita dalla maggiore quantità di idrogeno fornita al GSTR nel corso della fase UP4. È noto infatti che l'aggiunta di idrogeno esogeno in un reattore può causare un aumento della sua pressione parziale, modificando l'equilibrio termodinamico e promuovendo altre vie metaboliche che agiscono come 'sink' dell'idrogeno [20]. La dominanza della via idrogenotrofa, e la conseguente inibizione della via acetoclastica condotta dai metanogeni *Methanosarcina*, può anche spiegare l'accumulo di acetato rilevato alla fine della fase UP4.

2.4.4 Conclusioni

I risultati di questo studio hanno evidenziato la potenzialità della configurazione GSTR nel rendere possibile il processo di biometanazione in situ tramite l'aumento della velocità del ricircolo gassoso. Alla velocità di iniezione dell' H_2 di $1.47 \text{ L L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e alla velocità di ricircolo gasso di $235 \text{ L L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ si è ottenuto un incremento della produzione di metano dell'87% (fase UP4) rispetto a quella prodotta nella fase AD. La MER, la velocità di produzione di metano dovuta all'aggiunta di H_2 , ha raggiunto valori di $0.29 \text{ LCH}_4 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, durante l'ultima fase sperimentale di upgrading del biogas (UP4). La rimozione del substrato non veniva compromessa dall'iniezione dell' H_2 che, tuttavia, produceva un incremento dell'acido acetico nell'effluente. La composizione del biogas alla fine delle fasi sperimentali di upgrading era di: 75% CH_4 , 20.5% H_2 e 4.3% CO_2 . Dal punto di vista microbiologico, i cambiamenti più rilevanti all'interno della comunità microbica del reattore GSTR, hanno riguardato la comunità *Archaea* che si è andata progressivamente arricchendo all'interno dell'intera comunità microbica, passando dal valore di 0.1% nell'inoculo, al valore di 2.7% alla fine delle fasi sperimentali di upgrading del biogas (UP4). In particolare, durante la fase AD, si è evoluta una comunità mista di metanogeni sia acetoclasti che idrogenotrofi. L'aggiunta di idrogeno esogeno durante le fasi di biometanazione del biogas ha prodotto uno shift metabolico da una comunità mista di metanogeni acetoclastici ed idrogenotrofi verso la dominanza del genere idrogenotrofo *Methanoculleus* (94%), in corrispondenza della fase sperimentale che ha prodotto l'incremento più elevato del contenuto di metano nel biogas (UP4). Il prevalere della via idrogenotrofa, e la conseguente inibizione della via acetoclastica condotta dai metanogeni *Methanosarcina*, può anche spiegare l'accumulo di acetato rilevato alla fine della fase UP4.

3 Conclusioni

La nuova configurazione GSTR proposta si è dimostrata idonea per effettuare l'upgrading del biogas nel processo termofilo di biometanazione in situ. In particolare, l'aggiunta di supporti di polietilene ad elevata densità (HDPE) per favorire lo sviluppo di un biofilm microbico, ha prodotto un arricchimento significativo delle comunità di *Archaea* e di *Bacteria* nell'area immobilizzata. Dall'altra parte, il ricircolo gassoso è risultato idoneo alla omogeneizzazione dei nutrienti all'interno del reattore e fondamentale per favorire il trasferimento di massa gas-liquido dell'idrogeno.

Il valore più elevato sia di produzione di metano dovuto all'aggiunta di idrogeno (MER: $0.29 \text{ LCH}_4 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) e sia del contenuto di metano nel biogas (75%) si è ottenuto alla velocità di iniezione dell' H_2 di $1.47 \text{ L L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e alla velocità di ricircolo gasso di $235 \text{ L L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, corrispondenti rispettivamente ad un aumento del 87% e del 46%, rispetto ai valori misurati nella fase AD.

Il punto di vista microbiologico del processo di biometanazione in situ ha avuto un ruolo fondamentale nel descrivere e quantificare gli effetti della strategia di immobilizzazione sulla comunità di microorganismi coinvolti nel processo di digestione anaerobica, consentendo di ipotizzare un possibile ruolo dell'area immobilizzata nell'estendere l'area di interfaccia gas-liquido. Un'ipotesi anche suggerita dal confronto dei risultati di questo studio con quello di Alfaro e al. 2019, che utilizza il ricircolo del biogas e un modulo a membrane (HFM) come dispositivi per aumentare la solubilità dell' H_2 [8]. A valori di contenuto di metano confrontabili, in questo studio si ottiene una MER di $0.28 \text{ LCH}_4 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, un valore dell'87% più elevato di quello ottenuto nello studio considerato ($0.16 \text{ LCH}_4 \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$). Inoltre l'analisi della composizione e della dinamica delle comunità microbiche nel corso delle diverse fasi sperimentali, ha supportato i parametri di performance ottenuti durante il processo di biometanazione in situ ed ha permesso di ipotizzare i cambiamenti nelle relazioni metaboliche sintrofiche delle diverse fasi della digestione anaerobica.

Un'importante valore aggiunto di questo lavoro è relativo al volume di lavoro del reattore GSTR (49L), che è tra i più elevati tra quelli utilizzati negli studi di biometanazione in situ. Tuttavia, questa peculiarità non ha consentito di poter effettuare la riproducibilità dei risultati come avviene, generalmente, per i reattori su scala banco.

In conclusione, sebbene il contenuto di metano raggiunto sia lontano dall'obiettivo di trasformare gli impianti di biogas in impianti di biometano ($CH_4 \geq 97\%$), questo studio sottolinea l'importanza di considerare anche la composizione del gas in uscita. Infatti, a fronte di un valore ancora elevato di idrogeno nella miscela di gas (20%), che suggerisce una limitazione del trasferimento di massa gas-liquido dell'idrogeno, il basso valore di

CO₂ raggiunto (≈ 4%) aprirebbe alla possibilità di utilizzare il GSTR per produrre un altro carburante di grande interesse, l'hythane, una miscela gassosa composta dal 10% -30% (v/v) di H₂ e dal 70% -90% (v/v) di CH₄ e utilizzata principalmente nel settore dei trasporti

In conclusione, i risultati di questa linea di ricerca suggeriscono di:

- ✓ riprodurre i risultati ottenuti in una nuova attività sperimentale
- ✓ identificare il ruolo dell'area immobilizzata nel trasferimento di massa gas-liquido
- ✓ sperimentare altre strategie per aumentare l'efficienza di utilizzo dell'idrogeno, come l'aumento della porzione dell'area immobilizzata, la modalità di immissione dell'idrogeno nel GSTR e l'utilizzo di altri supporti.

4 Riferimenti bibliografici

- [1] M. Bailera, P. Lisbona, L.M. Romeo, S. Espatolero, "Power to Gas projects review: Lab, pilot and demo plants for storing renewable energy and CO₂", *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 69 (2017), pp. 292-312.
- [2] Ministero dello Sviluppo Economico, Piano Nazionale Integrato per l'Energia e il Clima, (2019) 294.
- [3] GSE, Energia da fonti rinnovabili in Italia - Rapporto Statistico 2019.
- [4] S. Fu, I. Angelidaki, Y. Zhang, "In situ Biogas Upgrading by CO₂-to-CH₄ Bioconversion", *Trends Biotechnol.*, 39 (2021), pp. 336–347.
- [5] X. Pan, L. Zhao, C. Li, I. Angelidaki, N. Lv, J. Ning, G. Cai, G. Zhu, "Deep insights into the network of acetate metabolism in anaerobic digestion: focusing on syntrophic acetate oxidation and homoacetogenesis", *Water Res.* 190 (2021), 116774.
- [6] J. Zabranska, D. Pokorna, "Bioconversion of carbon dioxide to methane using hydrogen and hydrogenotrophic methanogens", *Biotechnol. Adv.* 36 (2018), pp. 707-720.
- [7] B. Schink, "Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation", *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61 (1997), pp. 262-280.
- [8] N. Alfaro, M. Fdz-Polanco, F. Fdz-Polanco, I. Díaz, "H₂ addition through a submerged membrane for in-situ biogas upgrading in the anaerobic digestion of sewage sludge", *Bioresour. Technol.* 280 (2019), pp. 1-8.
- [9] I. Bassani, P.G. Kougias, I. Angelidaki, "In-situ biogas upgrading in thermophilic granular UASB reactor: key factors affecting the hydrogen mass transfer rate", *Bioresour. Technol.* 221 (2016), pp. 485-491.
- [10] I. Díaz, C. Pérez, N. Alfaro, F. Fdz-Polanco, "A feasibility study on the bioconversion of CO₂ and H₂ to biomethane by gas sparging through polymeric membranes", *Bioresour. Technol.* 185 (2015), pp. 246-253.
- [11] M.R. Martin, J.J. Fornero, R. Stark, L. Mets, L.T. Angenent, "A single-culture bioprocess of methanothermobacter thermotrophicus to upgrade digester biogas by CO₂-to-CH₄ conversion with H₂", *Archaea.* (2013), pp. 1-11.
- [12] G. Luo, S. Johansson, K. Boe, L. Xie, Q. Zhou, I. Angelidaki, "Simultaneous hydrogen utilization and in situ biogas upgrading in an anaerobic reactor", *Biotechnol. Bioeng.* 109 (2012), pp. 1088-1094.
- [13] G. Luo, I. Angelidaki, "Co-digestion of manure and whey for in situ biogas upgrading by the addition of H₂: Process performance and microbial insights", *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97 (2013), pp. 1373-1381.
- [14] L.M. Agneessens, L.D.M. Ottosen, N.V. Voigt, J.L. Nielsen, N. de Jonge, C.H. Fischer, M.V.W. Kofoed, "In-situ biogas upgrading with pulse H₂ additions: The relevance of methanogen adaption and inorganic carbon level", *Bioresour. Technol.* 233 (2017), pp. 256-263.
- [15] I. Angelidaki, L. Treu, P. Tsapekos, G. Luo, S. Campanaro, H. Wenzel, P.G. Kougias, "Biogas upgrading and utilization: Current status and perspectives", *Biotechnol. Adv.* 36 (2018, pp.) 452-466.
- [16] G. Luo, I. Angelidaki, "Hollow fiber membrane based H₂ diffusion for efficient in situ biogas upgrading in an anaerobic reactor", *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97 (2013), pp. 3739-3744.
- [17] M. Burkhardt, G. Busch, "Methanation of hydrogen and carbon dioxide", *Appl. Energy.* 111 (2013), pp. 74-79.

- [18] L. Rachbauer, G. Voitl, G. Bochmann, W. Fuchs, "Biological biogas upgrading capacity of a hydrogenotrophic community in a trickle-bed reactor", *Appl. Energy*. 180 (2016), pp. 483-490.
- [19] K. Maegaard, E. Garcia-Robledo, M.V.W. Kofoed, L.M. Agneessens, N. de Jonge, J.L. Nielsen, L.D.M. Ottosen, L.P. Nielsen, N.P. Revsbech, "Biogas upgrading with hydrogenotrophic methanogenic biofilms", *Bioresour. Technol.* 287 (2019), pp. 121422.
- [20] P.G. Kougias, P. Tsapekos, L. Treu, M. Kostoula, S. Campanaro, G. Lyberatos, I. Angelidaki, "Biological CO₂ fixation in up-flow reactors via exogenous H₂ addition", *J. Biotechnol.* 319 (2020), pp. 1-7.
- [21] S. Faisal, E.S. Salama, S.H.A. Hassan, B.H. Jeon, X. Li, "Biomethane enhancement via plastic carriers in anaerobic co-digestion of agricultural wastes", *Biomass Convers. Biorefinery*, (2020). <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00779-x>.
- [22] E. V. Ramasamy, S.A. Abbasi, "Energy recovery from dairy waste-waters: Impacts of biofilm support systems on anaerobic CST reactors", *Appl. Energy*. 65 (2000), pp. 91-98.
- [23] Eurostat, Agriculture, forestry and fishery statistics — 2019 edition - Product - Eurostat, 2019. <https://ec.europa.eu/eurostat/web/products-statistical-books/-/KS-FK-19-001>.
- [24] APHA, "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 21th ed.
- [25] A. Barra Caracciolo, P. Grenni, C. Cupo, S. Rossetti, "In situ analysis of native microbial communities in complex samples with high particulate loads", *FEMS Microbiol. Lett.* 253 (2005), pp. 55-58.
- [26] H. Daims, K. Stoecker, M. Wagner, "Fluorescence *in situ* hybridization for the detection of prokaryotes", *In Osborn AM, Smith CJ (ed), Advanced methods in molecular microbial ecology*, (2005). pp. 213-239, Bio-Garland, Abingdon, United Kingdom
- [27] E. V. Blagodaskaya, Y. Kuzyajov, "Active microorganisms in soil: critical review of estimation criteria and approaches" *Soil Biology & Biochemistry*, 67 (2013), pp. 192-211.
- [28] Amann R et Ludwig W, "Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology", *FEMS Microbiology Reviews*, 24 (2000), pp. 555-565.
- [29] R.I. Amann, L. Krumholz, D. A. Stahl, "Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology", *J. Bacteriol.*, 172 (2) (1990), pp. 762-770.
- [30] M.C. Gagliano, C.M. Braguglia, A. Gallipoli, A. Gianico, S. Rossetti, "Microbial diversity in innovative mesophilic/thermophilic temperature-phased anaerobic digestion of sludge", *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22 (2015), pp. 7339-7348.
- [31] L. Treu, P. Tsapekos, M. Peprah, S. Campanaro, A. Giacomini, V. Corich, P.G. Kougias, I. Angelidaki, "Microbial profiling during anaerobic digestion of cheese whey in reactors operated at different conditions", *Bioresour. Technol.* 275 (2019), pp. 375-385.
- [32] D. Karadag, O.E. Köroğlu, B. Ozkaya, M. Cakmakci, "A review on anaerobic biofilm reactors for the treatment of dairy industry wastewater", *Process Biochem.* 50 (2015), pp. 262-271.
- [33] A. Goli, A. Shamiri, S. Khosroyar, A. Talaiekhosani, R. Sanaye, K. Azizi, "A review on different aerobic and anaerobic treatment methods in dairy industry wastewater", *J. Environ. Treat. Tech.*, 7 (2019), pp. 113-141.
- [34] F. Asunis, G. De Gioannis, P. Dessì, M. Isipato, P.N.L. Lens, A. Muntoni, A. Poletti, R. Pomi, A. Rossi, D. Spiga, "The dairy biorefinery: Integrating treatment processes for cheese whey valorisation", *J. Environ. Manage.* 276 (2020), pp. 111240.
- [35] K. Yang, Y. Yu, S. Hwang, "Selective optimization in thermophilic acidogenesis of cheese-whey wastewater to acetic and butyric acids: Partial acidification and methanation", *Water Res.* 37 (2003), pp. 2467-2477.
- [36] A. Fontana, P.G. Kougias, L. Treu, A. Kovalovszki, G. Valle, F. Cappa, L. Morelli, I. Angelidaki, S. Campanaro, "Microbial activity response to hydrogen injection in thermophilic anaerobic digesters revealed by genome-centric metatranscriptomics", *Microbiome*. 6 (2018), pp. 1-14.
- [37] C. Fernández, M.J. Cuertos, E.J. Martínez, X. Gómez, "Thermophilic anaerobic digestion of cheese whey: Coupling H₂ and CH₄ production", *Biomass and Bioenergy*. 81 (2015), pp. 55-62.
- [38] B. Lecker, L. Illi, A. Lemmer, H. Oechsner, "Biological hydrogen methanation – A review", *Bioresour. Technol.* 245 (2017), pp. 1220-1228.

- [39] I. Bassani, P.G. Kougias, L. Treu, I. Angelidaki, "Biogas Upgrading via Hydrogenotrophic Methanogenesis in Two-Stage Continuous Stirred Tank Reactors at Mesophilic and Thermophilic Conditions", *Environ. Sci. Technol.* 49 (2015), pp.12585-12593.
- [40] D. De Francisci, P.G. Kougias, L. Treu, S. Campanaro, I. Angelidaki, "Microbial diversity and dynamicity of biogas reactors due to radical changes of feedstock composition", *Bioresour. Technol.* 176 (2015), pp. 56-64.
- [41] K. Tandishabo, K. Nakamura, K. Umetsu, K. Takamizawa, "Distribution and role of *Coprothermobacter* spp. in anaerobic digesters", *J. Biosci. Bioeng.*, 114 (2012), pp. 518–520.
- [42] Xia J, J. Cheng, J.D. Murphy, "Innovation in biological production and upgrading of methane and hydrogen for use as gaseous transport biofuel", *Biotechnol. Adv.* 34 (2016), pp. 451–472.
- [43] L. Braga Nan, E. Trably, G. Santa-Catalina, N. Bernet, J.P. Delgenès, R. Escudí, "Biomethanation processes: New insights on the effect of a high H₂ partial pressure on microbial communities", *Biotechnol. Biofuels.* 13 (2020), pp. 1-17.
- [44] H.M. Pervin, P.G. Dennis, H.J. Lim, G.W. Tyson, D.J. Batstone, P.L. Bond, "Drivers of microbial community composition in mesophilic and thermophilic temperature-phased anaerobic digestion pre-treatment reactors", *Water Res.* 47 (2013), pp. 7098-7108.
- [45] A. Ferraro, G. Massini, V. Mazzurco Miritana, S. Rosa, A. Signorini, M. Fabbricino, "A novel enrichment approach for anaerobic digestion of lignocellulosic biomass: Process performance enhancement through an inoculum habitat selection", *Bioresour. Technol.* 313 (2020), pp. 123703.
- [46] G. Lembo, S. Rosa, V.M. Miritana, A. Marone, G. Massini, M. Fenice, A. Signorini, "Thermophilic anaerobic digestion of second cheese whey: Microbial community response to H₂ addition in a partially immobilized anaerobic hybrid reactor", *Processes.* 9 (2021), pp. 1-16.
- [47] P.G. Kougias, L. Treu, D.P. Benavente, K. Boe, S. Campanaro, I. Angelidaki, "Ex-situ biogas upgrading and enhancement in different reactor systems", *Bioresour. Technol.* 225 (2017), pp. 429-437.
- [48] H. Porté, P.G. Kougias, N. Alfaro, L. Treu, S. Campanaro, I. Angelidaki, "Process performance and microbial community structure in thermophilic trickling biofilter reactors for biogas upgrading", *Sci. Total Environ.* 655 (2019), pp. 529-538.
- [49] L. Jabari, H. Gannoun, J.L. Cayol, M. Hamdi, G. Fauque, B. Ollivier, M.L. Fardeau, "Characterization of *defluviitalea saccharophila* gen. nov., sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from an upflow anaerobic filter treating abattoir wastewaters, and proposal of *defluviitaleaceae* fam. nov", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62 (2012), pp. 550-555.
- [50] A. Fontana, S. Campanaro, L. Treu, P.G. Kougias, F. Cappa, L. Morelli, I. Angelidaki, "Performance and genome-centric metagenomics of thermophilic single and two-stage anaerobic digesters treating cheese wastes", *Water Res.* 134 (2018), pp. 181–191.
- [51] D. Li, Y. Ran, L. Chen, Q. Cao, Z. Li, X. Liu, "Instability diagnosis and syntrophic acetate oxidation during thermophilic digestion of vegetable waste", *Water Res.* 139 (2018, pp.) 263-271.
- [52] M.C. Nelson, M. Morrison, Z. Yu, "A meta-analysis of the microbial diversity observed in anaerobic digesters", *Bioresour. Technol.* 102 (2011), pp. 3730-3739.
- [53] D. Rivière, V. Desvignes, E. Pelletier, S. Chaussonnerie, S. Guermazi, J. Weissenbach, T. Li, P. Camacho, A. Sghir, "Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge", *ISME J.* 3 (2009), pp. 700-714.
- [54] N. Krakat, S. Schmidt, P. Scherer, "Potential impact of process parameters upon the bacterial diversity in the mesophilic anaerobic digestion of beet silage", *Bioresour. Technol.* 102 (2011), pp. 5692-5701.