



Università
Ca' Foscari
Venezia

Corso di Laurea Magistrale
in
Biotecnologie per l'ambiente
e lo sviluppo sostenibile

Tesi di Laurea

Valutazione delle rese produttive di un processo di
Dark Fermentation e valorizzazione dell'effluente tramite
fermentazione fotosintetica

Relatrice

Prof.ssa Cristina Cavinato

Correlatore

Dott. Graziano Tassinato, PhD, Green Propulsion Lab, VERITAS spa
Dott. Marco Biasiolo, Università Ca' Foscari Venezia

Laureando

Giulio Barchielli
865456

Anno accademico

2021/2022

Sommario

Elenco degli acronimi	v
Abstract	vi
1. Introduzione	7
1.1. La strada verso la sostenibilità	8
1.2. Dove siamo e dove stiamo andando: transizione energetica per un futuro più sostenibile	9
1.3. Le energie rinnovabili e il mix energetico in UE	13
1.4. L'idrogeno.....	14
1.5. Dark Fermentation	18
1.5.1. Le fasi della fermentazione.....	18
1.5.2. I parametri di processo.....	20
1.6. Photo Fermentation	21
1.6.1. Batteri rossi e fermentazione fotosintetica.....	21
1.6.2. Il ruolo della nitrogenasi.....	24
1.7. Il progetto <i>Purple-B</i>	24
2. Stato dell'arte	26
3. Scopo della tesi.....	31
4. Materiali e metodi.....	32
4.1. Dark Fermentation	32
4.1.1. Substrati e Inoculo.....	32
4.1.2. Reattoristica utilizzata	33
4.1.3. Piano Sperimentale	34
4.1.4. Metodi Analitici	35
4.2. Photo Fermentation	37
4.2.1. Inoculi e terreni di crescita	37
4.2.2. Piano Sperimentale	40
4.2.3. Metodi Analitici	41

5. Risultati e discussione.....	42
5.1. Test di Dark Fermentation.....	42
5.1.1. Analisi del pH	42
5.1.2. Analisi dei VFA	43
5.1.3. Analisi del gas prodotto.....	47
5.1.4. Caratteristiche degli effluenti della DF.....	51
5.2. Test di Photo Fermentation.....	52
5.2.1. Analisi del gas (H ₂ , CO ₂)	52
5.2.2. Analisi della crescita di biomassa	53
5.2.3. Analisi del consumo di VFA.....	55
6. Conclusioni	58
Ringraziamenti.....	59
Bibliografia.....	60
Appendice.....	66

Elenco degli acronimi

AD: *Anaerobic Digestion*

ATP: Adenosina trifosfato

CCUS: *Carbon Capture Utilisation and Storage*

CF: *Carbon Footprint*

COD: *Chemical Oxygen Demand*

DF: *Dark Fermentation*

ESA: *European Space Agency*

GHG: *Greenhouse gases*

HPLC: *High-performance liquid chromatograph*

HRT: *Hydraulic Retention Time*

OL: *Organic Loading*

OLR: *Organic Loading Rate*

ONU: Organizzazione delle Nazioni Unite

PF: *Photo Fermentation*

PHA: *Polyhydroxyalkanoates*

PHB: *Polyhydroxybutyrate*

PNSB: *Purple Non-Sulfur Bacteria*

SDGs: *Sustainable Development Goals*

TS: *Total Solids*

TVS: *Total Volatile Solids*

UE: Unione Europea

UNFCCC: *United Nations Framework Convention on Climate Change*

VFA: *Volatile Fatty Acids*

VS: *Volatile Solids*

VSS: *Volatile Suspended Solids*

Abstract

L'idrogeno (H₂) potrà svolgere un ruolo fondamentale all'interno del futuro contesto energetico globale. Il suo alto potenziale energetico e la peculiarità di non produrre gas climalteranti a seguito della sua combustione lo renderebbero il combustibile verde ideale. Affinché l'idrogeno possa essere veramente considerato una fonte di energia sostenibile, però, la sua produzione non deve generare impatti ambientali dannosi. Attualmente l'idrogeno viene prevalentemente ottenuto a partire da combustibili fossili, con scarsa considerazione delle emissioni di CO₂ conseguenti alla sua produzione. L'idrogeno può però essere prodotto in altri modi, e tra questi i processi biologici sono considerati la via più promettente in termini di sostenibilità. Questa via rientra pienamente nel contesto di Economia Circolare in quanto si possono utilizzare scarti organici di varia natura come fonte nutritiva per i batteri produttori di idrogeno, contribuendo così allo smaltimento di rifiuti ed ottenendo contemporaneamente una fonte di energia ad alta resa. Ad ora ciò che limita l'applicazione di questo processo su larga scala sono la difficoltà di stoccaggio dell'idrogeno e le rese produttive limitate dei microorganismi.

Questo lavoro si inserisce all'interno del progetto *Purple-B* di Veritas, finanziato dall'Agenzia spaziale europea (ESA) nell'ambito del programma MELISSA (*Micro-Ecological Life Support System Alternative*). Lo scopo di questo lavoro è la valutazione della produzione di acidi grassi volatili (VFA) e idrogeno (H₂) attraverso un processo di *Dark Fermentation* (DF) e di *Photo Fermentation* (PF), in cui i prodotti della DF (i VFA) vengono utilizzati come substrato per la produzione di idrogeno da parte di batteri rossi fotosintetizzanti (PNSB, *Purple non-sulfur bacteria*). Durante il test di *Dark fermentation* sono state valutate le rese di diversi carichi organici (5, 10, 15, 20, e 25 kg_{TVS} m⁻³), e il fermentato avente le migliori caratteristiche in termini di concentrazione di VFA ed ammoniaca (OL 10) è stato utilizzato come substrato per dei batteri rossi fotosintetizzanti (PNSB) in un processo di *Photo fermentation*. Sono stati utilizzati due ceppi di PNSB (*Rhodospseudomonas palustris* e *Rhodospirillum rubrum*), valutando il processo in termini di crescita cellulare e produzione di idrogeno. Entrambi i ceppi hanno mostrato un consistente incremento nella crescita cellulare quando alimentati con il fermentato, confermando la possibilità di utilizzare questa fonte di carbonio a basso costo e rinnovabile. Le condizioni di test non hanno però permesso di ottimizzare le rese di produzione di idrogeno, probabilmente a causa delle condizioni di illuminazione non ideali. Questo aspetto sarà ulteriormente approfondito nel corso del progetto *Purple-B*.

1. Introduzione

Dall'inizio del XX secolo la popolazione terrestre è quadruplicata e le proiezioni stimano un ulteriore aumento del 50 % da qui al 2100 (Arsova et al., 2022). Situazione analoga, ma meno estrema, si riscontra anche in Europa dove dal 1960 ad oggi la popolazione è aumentata del 25 %, passando da 355 a 446 milioni di persone (Eurostat, 2022a). L'economia mondiale è attualmente governata dall'utilizzo di combustibili fossili, tanto che nel 2019 solo un quarto dell'energia consumata a livello globale proveniva da fonti rinnovabili (Bhattarai et al., 2022). Ciò ha portato a livelli via via crescenti di emissioni, che hanno raggiunto 37.858 Mt di CO₂ nel solo 2021 (Crippa et al., 2022). La mancanza di efficaci strategie di gestione dei consumi sta portando ad una crisi energetica e di risorse senza precedenti. Se a questo si aggiunge un modello economico che genera quantità enormi di rifiuti e che danneggia l'ambiente, si ha un quadro preoccupante delle condizioni e del futuro del pianeta (Moretto et al., 2020). Il risultato di questo modello economico è la progressiva anticipazione dell'*Earth Overshoot Day* (Figura 1), giorno dell'anno in cui la domanda di risorse e servizi ecologici da parte dell'umanità supera la quantità di risorse che la Terra è in grado di rigenerare nello stesso anno (Earth Overshoot Day, 2023a).

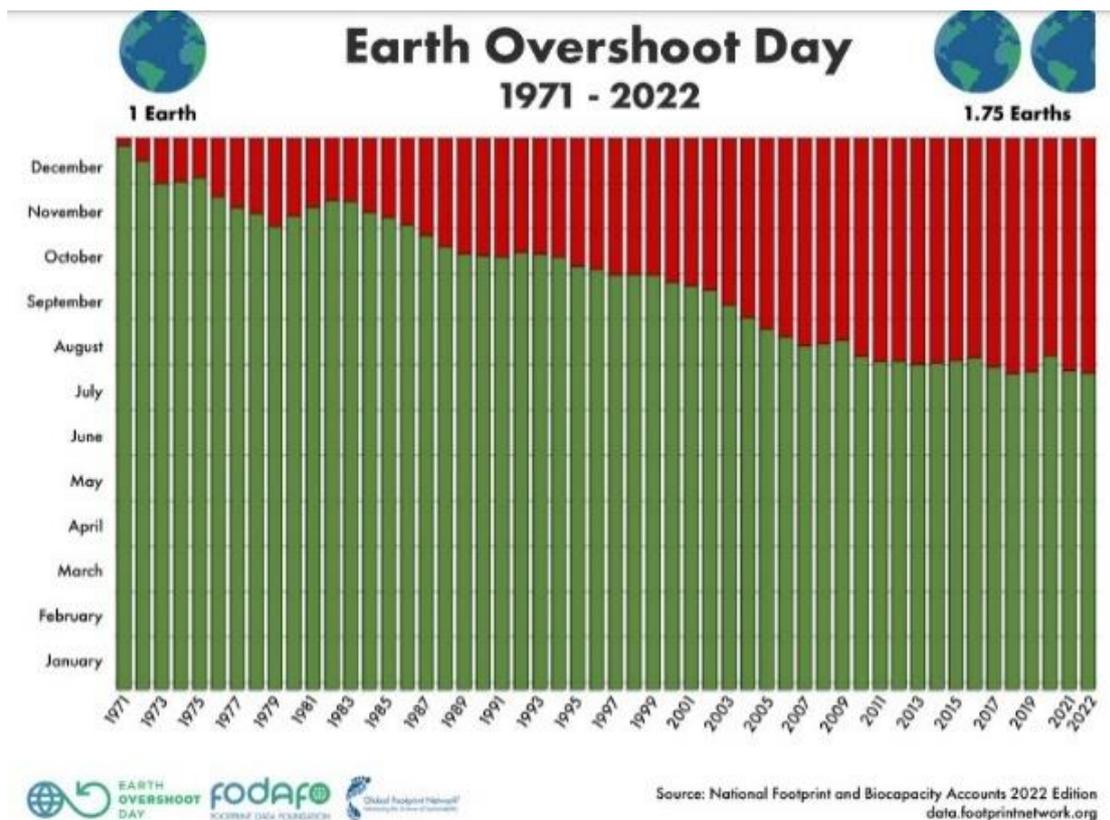


Figura 1, Earth Overshoot Day dal 1971 al 2022 (Earth Overshoot Day, 2023b)

Gli effetti più tangibili di questo sovrasfruttamento delle risorse sono l'effetto serra, la distruzione dello strato di ozono stratosferico, la perdita di biodiversità, l'eutrofizzazione e l'acidificazione dei suoli e dei corpi idrici, solo per citarne alcuni (Geissdoerfer et al., 2017). L'effetto serra e la distruzione dello strato di ozono sono a

loro volta le *driving forces* principali del cambiamento climatico, del quale da diversi anni si percepiscono gli effetti (Zandalinas et al., 2021).

Al fine di mitigare gli impatti, ridurre gli sprechi ed i consumi e combattere il surriscaldamento globale, i membri dell'ONU, sulla base della Convenzione quadro delle Nazioni Unite sui cambiamenti climatici (UNFCCC), stanno lavorando per attuare le azioni necessarie ad una transizione sostenibile verso un futuro a basse emissioni di carbonio (D'Adamo et al., 2020).

1.1. La strada verso la sostenibilità

Il concetto di sostenibilità applicato all'economia ha radici negli anni Ottanta del secolo scorso, ma prima di essere integrato nelle politiche economiche a livello nazionale e sovranazionale ha avuto bisogno di un lungo processo di elaborazione. Lo sviluppo sostenibile per come lo intendiamo oggi si basa sull'approccio *triple bottom line* (Figura 2), anche noto come "paradigma dei tre pilastri". Questo approccio fonda la sostenibilità sul rispetto di tre dimensioni principali: economia, società e ambiente. In altre parole, un sistema economico non può essere sostenibile nel tempo se anche uno solo dei tre pilastri non è rispettato (D'Adamo et al., 2020; Visintainer Lerman et al., 2021).

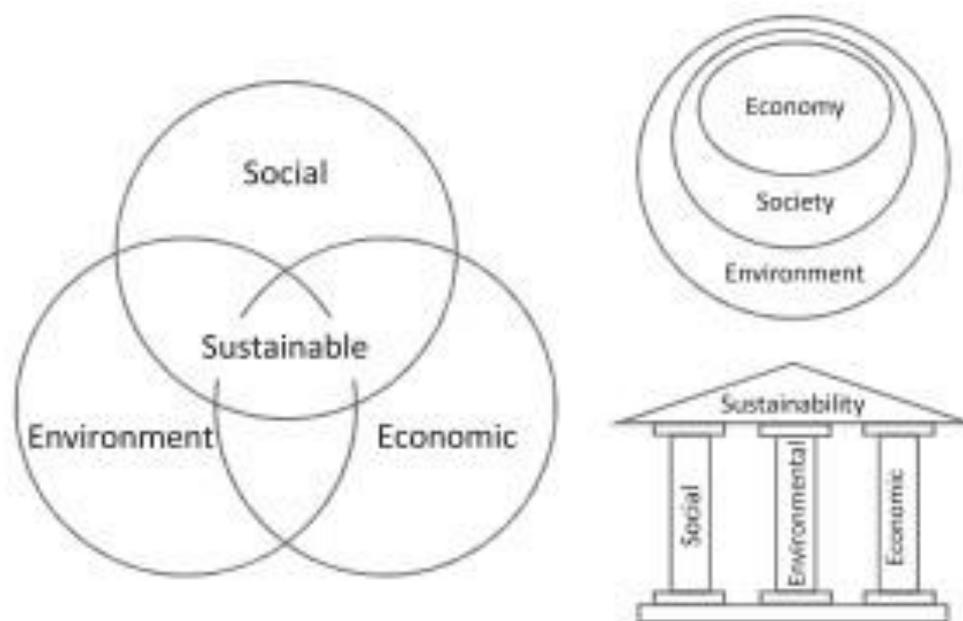


Figura 2, I tre pilastri dello sviluppo sostenibile (Purvis et al., 2019)

Come detto, nel corso degli ultimi trent'anni si sono susseguite una serie di riunioni e trattati a tema sostenibilità partendo dal Rapporto Brundtland (1987), passando per l'*Earth Summit* di Rio de Janeiro (1992), al *Millennium Summit* di New York (2000), a Rio+20 (2012) (Purvis et al., 2019; United Nations, 2022, 2023). Ma il vero cambio di rotta verso una maggiore sostenibilità si ha nel 2015 con l'approvazione di Agenda 2030 per lo Sviluppo Sostenibile che racchiude 17 Obiettivi per lo Sviluppo Sostenibile (SDGs) (Figura 3), suddivisi in un totale di 169 traguardi.

SUSTAINABLE DEVELOPMENT GOALS



Figura 3, I 17 obiettivi per lo sviluppo sostenibile (United Nations, 2023a)

Il 2015 è stato l'anno di maggiori cambiamenti nelle politiche economiche e ambientali a livello europeo e non solo, con gli Accordi di Parigi sul cambiamento climatico si vede infatti la presa di coscienza definitiva sul problema del surriscaldamento globale. Punto cardine degli accordi di Parigi è limitare "ben al di sotto" dei 2°C l'aumento della temperatura del pianeta tra i tempi preindustriali e il 2100 (Organizzazione delle Nazioni Unite, 2015; United Nations, 2015).

1.2. Dove siamo e dove stiamo andando: transizione energetica per un futuro più sostenibile

Sulle orme degli accordi di Parigi, nel dicembre 2019 la presidentessa della commissione europea Ursula von der Leyen ha presentato il *Green Deal* europeo (Kougias et al., 2021). Esso è "una nuova strategia di crescita mirata a trasformare l'UE in una società giusta e prospera, dotata di un'economia moderna, efficiente sotto il profilo delle risorse e competitiva che nel 2050 non genererà emissioni nette di gas a effetto serra e in cui la crescita economica sarà dissociata dall'uso delle risorse" (Commissione Europea, 2019). Gli obiettivi principali del *Green Deal* (Figura 4) sono la riduzione delle emissioni nette di gas serra di almeno il 55 % entro il 2030 rispetto ai livelli del 1990 oltre al raggiungimento della "carbon neutrality" entro il 2050, attraverso la decarbonizzazione della maggior parte dei settori dell'economia e supportando una mobilità intelligente e sostenibile. Il raggiungimento di questi obiettivi è però vincolato dalla partecipazione di tutti i portatori d'interesse nei vari settori: dalle costruzioni, al settore energetico e dei trasporti a quello alimentare (Fetting, 2020; Szpilko & Ejdy, 2022). Altri obiettivi sono previsti tra cui un sistema di approvvigionamento e gestione sostenibili del cibo denominato "Farm to Fork" ed un "Just Transition mechanism" volto a guidare la

transizione verso un'economia sostenibile per quei Paesi che per necessità sono rimasti ancorati ad un'economia basata sui combustibili fossili (Fetting, 2020).

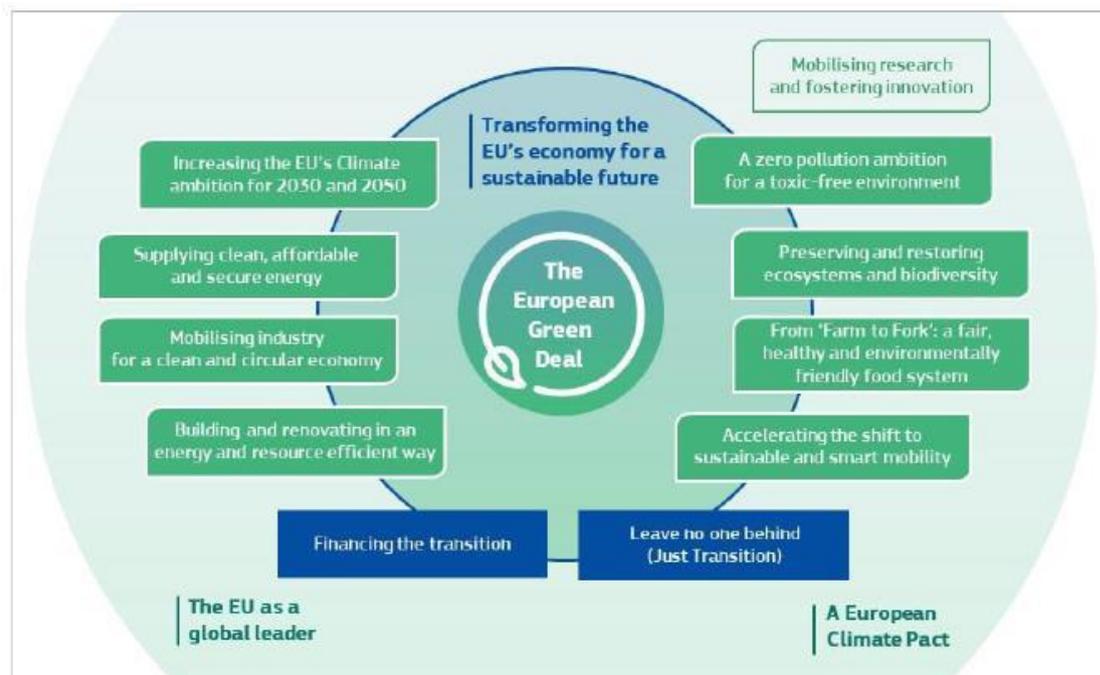


Figura 4, Il Green Deal europeo (Fetting, 2020)

Il 2015 ha visto anche l'approvazione del Piano d'azione per l'economia circolare (Vea et al., 2018). L'economia circolare (rappresentata schematicamente in Figura 5) è definita come "un sistema rigenerativo in cui materie prime, rifiuti, emissioni e sprechi energetici sono minimizzati rallentando, chiudendo e restringendo i cicli di materia ed energia. Ciò può essere raggiunto progettando beni duraturi che vengano mantenuti, riparati, riutilizzati, rigenerati, ristrutturati e riciclati" (Geissdoerfer et al., 2017). In questo approccio i materiali sono quindi progettati per essere parte di un sistema chiuso che consente la riduzione dell'uso di materie prime e la minimizzazione degli sprechi, e che mira alla produzione nulla di rifiuti.

Per fare ciò è necessario che le aziende collaborino con le autorità locali, nazionali e sovranazionali al fine di creare una filiera sostenibile, nonché un sistema di monitoraggio e di incentivi all'utilizzo di forme di energia pulita (European Commission, 2015; Organizzazione delle Nazioni Unite, 2015).

Il settore dei rifiuti è tra i cinque più impattanti in termini di emissioni con 112,3 Mt CO₂eq nel 2020. Dunque la gestione ottimale degli stessi è fondamentale per la riduzione delle emissioni di gas climalteranti (GHG) previste nel *Green Deal* e dagli accordi di Parigi, nonché per l'attuazione di un'economia circolare (Crippa et al., 2022; Eurostat, 2022b, 2022c).

Le emissioni di GHG sono quantificate ed espresse utilizzando l'impronta di carbonio (CF) (ESG360, 2021). La CF è definita come "La misura che esprime in CO₂ equivalente il totale delle emissioni di gas a effetto serra associate direttamente o indirettamente ad un prodotto durante tutto il suo ciclo di vita, ad un'organizzazione o ad un servizio" (Barnett et al., 2013). Questo parametro può essere calcolato anche per considerare tutte le emissioni prodotte dall'attività economica di uno Stato, di un continente o dell'intero pianeta. Nel 2021 i paesi che più hanno impattato sul clima sono stati Cina, Stati Uniti d'America, Giappone, India, Russia e l'UE contribuendo al 67,8 % delle emissioni globali. In particolare, l'UE ha contribuito solo al 7,3 % di questo dato per un totale di 2776 Mt CO₂eq nel 2021 pari al 27,3 % in meno rispetto al 1990, evidenziando l'impegno concreto nel ridurre gli impatti. Questo è stato possibile, nonostante l'aumento della popolazione, grazie alla transizione verso un sistema produttivo più attento all'ambiente, che ha portato alla riduzione dell'impronta di carbonio pro-capite da 9 t CO₂eq abitante⁻¹ anno⁻¹ nel 1990 a 6,3 t CO₂eq abitante⁻¹ anno⁻¹ nel 2021. L'Italia è in linea con l'UE, avendo visto una riduzione complessiva delle emissioni del 25,7 % rispetto al 1990 e una riduzione delle emissioni pro capite da 7,5 tCO₂eq abitante⁻¹ anno⁻¹ nel 1990 a 5,4 tCO₂eq abitante⁻¹ anno⁻¹ nel 2021. Confrontando la tendenza di emissioni dell'UE e dell'Italia con il resto del mondo, dove non solo il valore assoluto ma anche l'impatto pro-capite è aumentato (passando da 4,3 tCO₂eq abitante⁻¹ anno⁻¹ nel 1990 a 4,8 tCO₂eq abitante⁻¹ anno⁻¹ nel 2021) risulta evidente che la strada verso la sostenibilità a livello globale sia ancora lunga (Crippa et al., 2022).

I settori più impattanti in UE sono quello energetico (che include i trasporti, il consumo domestico e l'utilizzo industriale), quello agricolo, la gestione dei rifiuti, la produzione industriale di beni, e l'utilizzo dei suoli (Eurostat, 2022b). Tra questi, quello energetico è il settore che più contribuisce al rilascio di GHG, con oltre il 75 % delle emissioni totali. Ciò si deve al grande utilizzo di combustibili fossili come fonte primaria di energia. Dunque, per rispettare gli obiettivi imposti dal *Green Deal*, cioè rendere l'Europa il primo continente "carbon neutral" entro il 2050, bisogna ridisegnare il modo con cui l'energia è prodotta e consumata (OurWorldinData, 2020; Szpilko & Ejdy, 2022). Perché ciò possa concretizzarsi è necessaria una rapida transizione verso forme di energia pulita (Fetting, 2020).

1.3. Le energie rinnovabili e il mix energetico in UE

La transizione alle rinnovabili è il passaggio fondamentale per uno sviluppo sostenibile, non solo in Europa ma in tutto il mondo, ed è il cardine di tutte le politiche e le riunioni a tema ambientale degli ultimi anni, da Agenda 2030 agli accordi di Parigi, al *Green Deal* europeo (Bhattarai et al., 2022).

Attualmente la transizione alle rinnovabili è guidata dall'Europa (Bhattarai et al., 2022) e vede una sempre maggior diffusione di fotovoltaico, eolico, idroelettrico e dei biocarburanti come biodiesel, bioetanolo e bioidrogeno. In particolare, l'installazione del fotovoltaico è aumentata di oltre dieci volte dal 2008, superando i 134 GWp nel 2019, rendendola di conseguenza sempre più economica. Questo è dovuto al fatto che tra tutte le rinnovabili è quella più facilmente integrabile nelle abitazioni (Kougias et al., 2021; Osman et al., 2020). Nonostante l'Europa sia leader nel settore delle rinnovabili, è la Cina ad avere la maggior capacità installata di fotovoltaico (pari a 253 GWh, un terzo della capacità globale del 2020), mentre l'Australia ha il più alto tasso di fotovoltaico domestico al mondo. L'idroelettrico è utilizzato principalmente nei paesi con grandi disponibilità idriche come Brasile, Congo, Nepal e Albania; anche se è la Cina il maggior produttore di energia da idroelettrico (1302 TWh nel 2019), e detiene anche il record per la più grande centrale al mondo, la *Three Gorges Dam*, con una capacità installata di 22,5 GW (Bhattarai et al., 2022).

Nonostante i progressi degli ultimi anni, la strada verso la decarbonizzazione è ancora lunga, tanto che quasi tre quarti dell'energia prodotta in UE deriva da fonti fossili. Il petrolio è il più utilizzato (35 % del totale dell'energia prodotta in UE), seguito dal gas naturale (24 %) e dal carbone (13,6 %). L'utilizzo delle rinnovabili sta crescendo molto negli ultimi anni ma è attualmente limitato al 14% circa, poco più del nucleare (12,6 %) (Leonard et al., 2021). Secondo gli esperti delle Nazioni Unite, per raggiungere l'obiettivo di riduzione delle emissioni di CO₂ del 55 % entro il 2030 sarà necessario innalzare la quota di energia prodotta da fonti rinnovabili dal 14 % al 38,5 % (Kougias et al., 2021). Dalle stesse previsioni si prospetta che nel 2030 i combustibili fossili forniranno ancora il 50 % dell'energia. Ma il carbone, che è il più impattante in termini di effetto serra, verrà rimpiazzato dalle energie rinnovabili. Mentre dal 2030 al 2050 avverrà la progressiva eliminazione del petrolio, ed il gas naturale coprirà all'incirca il 10 % del fabbisogno energetico europeo (Leonard et al., 2021). Grandi aspettative si hanno sull'idrogeno che è visto come un promettente candidato nelle nuove agende globali per le energie rinnovabili, tanto che il *Green Deal* prevede l'installazione di almeno 6 GW di elettrolizzatori per la produzione di idrogeno verde entro il 2024 e ulteriori 40 GW entro il 2030 (Kougias et al., 2021; Osman et al., 2020).

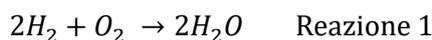
L'espansione delle rinnovabili permetterà di sostituire quasi completamente l'uso di combustibili fossili nelle città. A tal fine è necessaria l'implementazione di reti elettriche "intelligenti" chiamate *smart grid*. Le *smart grid* sono reti in grado di gestire flussi bidirezionali di informazioni ed energia grazie all'integrazione di tecnologie di rilevamento, misurazione, trasmissione e controllo. L'utilizzo di *smart grid* permette una maggior diffusione ed utilizzo delle rinnovabili, oltre ad una gestione più efficiente dei flussi di energia

elettrica ed un maggior controllo sulle spese ad essa associate (Babayomi et al., 2023; Hoang et al., 2021; Lin et al., 2020).

L'utilizzo integrato di energie rinnovabili e *smart grid* permetterà di ridurre le emissioni di CO₂ e migliorare la qualità dell'aria nei centri abitati. La generazione di energia elettrica da fonti rinnovabili non è però costante e ciò può portare a intermittenza nei flussi di energia, causando malfunzionamenti nelle reti. Per questo è necessario immagazzinare parte dell'energia prodotta dalle rinnovabili. A questo proposito l'idrogeno ha le caratteristiche ideali in quanto è un vettore energetico che può essere utilizzato per convertire e immagazzinare l'energia, e rilasciarla quando la produzione da fonti rinnovabili non dovesse essere sufficiente (Ajanovic et al., 2022; Lin et al., 2020).

1.4. L'idrogeno

L'idrogeno in forma molecolare (H₂) è un gas incolore, inodore e insapore ed ha una densità inferiore a quella dell'aria. Ha un calore specifico pari a 142 MJ Kg⁻¹ ed un potere calorifico netto pari a 120 KJ g⁻¹, circa 2,75 volte quello della benzina, 2,4 volte il metano e 6 volte il metanolo. La sua combustione (Reazione 1) non produce CO₂ o altri gas climalteranti, ma solo vapor d'acqua.



Queste caratteristiche lo rendono un combustibile migliore rispetto alle fonti fossili. La sua applicazione si estende anche a stock energetico, in particolare per integrare le fonti energetiche rinnovabili convertendo il surplus elettrico da queste fornito in una riserva energetica a medio e lungo termine. Inoltre, può essere utilizzato per de-carbonizzare i settori definiti *hard-to-abate* come i trasporti su larga scala (aerei, navi, treni, autocarri) o per fornire calore ad alta temperatura nelle industrie (Agyekum et al., 2022; Dokhani et al., 2022; Łukajtis et al., 2018; Snam, 2019).

Circa il 75 % della materia nell'universo è idrogeno, ma sulla Terra è presente prevalentemente in forma legata e non molecolare, in quanto la sua volatilità ne impedisce la ritenzione in atmosfera. Per questo motivo, a differenza del gas naturale, l'idrogeno da utilizzare come fonte di energia non può essere direttamente prelevato da riserve ambientali, ma deve essere prodotto trasformando in idrogeno molecolare (H₂) l'idrogeno legato, ad esempio, alla molecola d'acqua H₂O o ad altri composti organici n(CHO) (Agyekum et al., 2022).

Attualmente, circa il 97 % dell'H₂ prodotto nel mondo deriva dal processamento di combustibili fossili e contribuisce dunque alla liberazione in atmosfera di composti carboniosi come la CO₂ (Ajanovic et al., 2022). Le tecniche più utilizzate sono il *reforming* del metano, la gassificazione del carbone e la scissione dell'acqua (Ajanovic et al., 2022). L'elettrolisi non produce direttamente CO₂ o altri gas climalteranti, ma utilizza elettricità, e quando questa viene prodotta a fonti non rinnovabili il processo contribuisce indirettamente alla liberazione in atmosfera di gas serra (Grabarczyk et al., 2019; Kougias et al., 2021).

Fattore limitante l'uso dell'idrogeno come fonte di energia è la sua esplosività in presenza di O₂, oltre alle maggiori difficoltà di stoccaggio rispetto ad altri combustibili. Inoltre, a causa del suo basso punto di ebollizione, deve essere conservato in recipienti ad elevate pressioni. Nonostante queste difficoltà tecniche è molto probabile che l'idrogeno diventerà presto il principale carburante impiegato nel settore dei trasporti a causa del progressivo esaurimento dei combustibili fossili e della crescente attenzione nel limitare gli impatti ambientali nei vari settori (Łukajtis et al., 2018; Osman et al., 2020). Attualmente l'idrogeno trova il suo utilizzo principale in ambito industriale per la produzione di ammoniaca, acciaio e metanolo, e la sua domanda sta progressivamente incrementando, tanto che nel 2020 la richiesta complessiva è arrivata a 90 Mt. I costi associati alla sua produzione, così come le emissioni generate, variano molto a seconda delle tecniche impiegate per produrlo. Questi aspetti sono fondamentali per la commercializzazione di una nuova tecnologia, tanto più nel contesto attuale in cui vi è la necessità di generare energia a basso costo riducendo allo stesso tempo le emissioni.

A seconda del metodo produttivo applicato, l'idrogeno viene classificato in differenti colori (Figura 6) (Ajanovic et al., 2022; Ji & Wang, 2021).

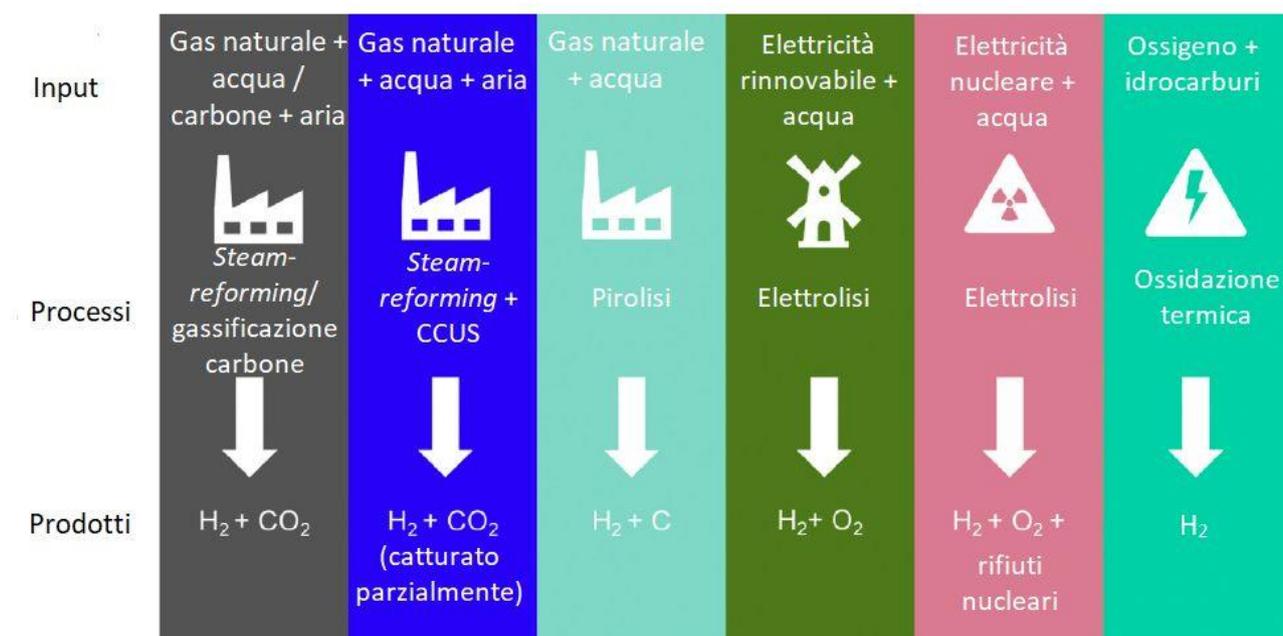


Figura 6, Colori dell'idrogeno (Ajanovic et al., 2022, modificato)

Il processo maggiormente utilizzato per la produzione di idrogeno è attualmente quello grigio, in quanto è la via di produzione più economica (da 1,34 a 2,08 \$/kg_{H₂}). La sua produzione avviene mediante *steam-reforming* del metano o gassificazione del carbone (in questo caso può essere presente in letteratura come idrogeno marrone o nero). Questi metodi di produzione si distinguono dall'idrogeno blu in quanto non è previsto l'utilizzo di alcuna tecnica di cattura delle emissioni carboniose (CCUS). Si stima che circa 830 Mt di CO₂ siano rilasciate in atmosfera ogni anno per la produzione di idrogeno grigio (Ajanovic et al., 2022; Ji & Wang, 2021). Attualmente sia il *reforming* che la gassificazione del carbone sono processi ben consolidati,

con efficienze di conversione del 60–85 % per il primo e del 74-85 % per il secondo (Dawood et al., 2020). Altri metodi poco utilizzati sono la parziale ossidazione del metano (POM) e dei prodotti del petrolio (POX) ed il *reforming* autotermico (ATR) (Ji & Wang, 2021).

Le emissioni di CO₂ legate alla generazione di idrogeno possono essere limitate implementando delle tecniche per la cattura, l'utilizzo e lo stoccaggio del carbonio (CCUS) in coda al processo produttivo. È questo il caso dell'idrogeno blu, prodotto analogamente a quello grigio tramite processi di *steam-reforming* del metano ma con l'aggiunta di tecnologie per gestire e limitare le emissioni di CO₂ in atmosfera. Queste tecniche permettono tassi di cattura del carbonio abbastanza elevati (fino al 90 %). Tuttavia, non è possibile considerare l'idrogeno blu realmente *carbon free*, in quanto, considerando anche l'energia necessaria alle operazioni di CCUS, complessivamente si ottengono emissioni di carbonio non inferiori alla metà di quelle prodotte dall'idrogeno grigio. Inoltre, queste tecniche portano ad una riduzione del 5-14 % dell'efficienza complessiva del processo di *reforming* (Noussan et al., 2021; M. Yu et al., 2021). L'utilizzo di tecniche CCUS fa sì che l'idrogeno blu sia considerato una tecnologia ponte per la transizione all'idrogeno verde (Dawood et al., 2020), nonostante il suo utilizzo sia limitato a causa degli elevati costi di queste tecniche (da 1,63 a 2,27 \$/kg_{H2}) unite ai problemi sopracitati che lo rendono economicamente e tecnicamente meno praticabile rispetto all'idrogeno grigio (Ji & Wang, 2021; Noussan et al., 2021).

Una via di produzione dell'idrogeno che può portare a un reale abbattimento delle emissioni di CO₂ è quella verde. L'idrogeno verde è il prodotto della scissione dell'acqua mediante elettrolisi, utilizzando elettricità proveniente esclusivamente da fonti rinnovabili. La sua produzione non emette alcun tipo di gas serra, e per questo motivo ha assunto particolare interesse negli ultimi anni come possibile strategia di produzione di un combustibile ideale per guidare la transizione energetica descritta nel *Green Deal* (Osman et al., 2020). Tuttavia solo lo 0,03 % dell'idrogeno ad oggi prodotto è idrogeno verde, a causa dei maggiori costi associati alla sua produzione (tra 5,78 e 23,27 \$/kg_{H2}) rispetto all'idrogeno derivante da fonti fossili (Ji & Wang, 2021; M. Yu et al., 2021).

In Figura 7 è riportata una comparazione tra i costi dell'idrogeno grigio, blu e verde. La produzione di idrogeno da elettrolisi può essere effettuata seguendo tre modalità principali. L'elettrolisi dell'acqua alcalina (ALK) è la più utilizzata, ma soffre del fatto che deve operare in continuo per evitare danni strutturali, ciò fa sì che non sia possibile utilizzare solo energia elettrica da fonti rinnovabili, inoltre si verificano problemi a basse intensità di corrente, che possono portare alla corrosione delle apparecchiature utilizzate (Holm et al., 2021; Strategy&, 2020). L'elettrolisi della membrana elettrolitica polimerica (PEM) è ideale quando l'idrogeno prodotto deve essere pressurizzato per lo stoccaggio o l'utilizzo immediato, questo perché la PEM permette di imprimere la pressione richiesta senza bisogno di ulteriori conversioni. Le celle elettrolitiche a ossidi solidi (SOEC), invece, sono da poco disponibili sul mercato ma sono oggetto di grandi aspettative grazie ai bassi costi d'investimento previsti ed alle alte efficienze (Ajanovic et al., 2022; M. Yu et al., 2021).

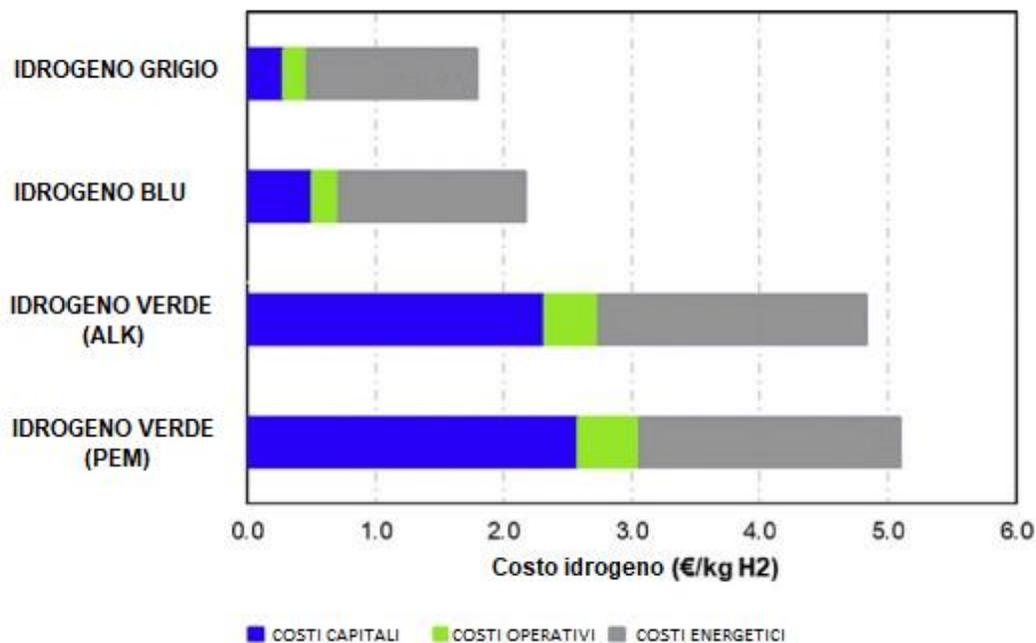


Figura 7, Costi di produzione dell'idrogeno grigio, verde e blu (Ajanovic et al., 2022, modificato)

Una via di produzione molto simile all'idrogeno verde è quella porpora. L'idrogeno porpora, infatti, è prodotto mediante elettrolisi dell'acqua alimentata da elettricità prodotta da centrali nucleari. Dunque, la sua produzione (il cui costo può variare da 3,56 a 7,00 \$/kg_{H2}) non è legata all'emissione di CO₂ o altri gas climalteranti, bensì implica lo smaltimento di scorie nucleari. Questa modalità non è però molto utilizzata, e non è prevista dalle strategie dell'Unione Europea (Ajanovic et al., 2022; Ji & Wang, 2021), anche se potrebbe portare grandi vantaggi in termini di riduzione delle emissioni. Infatti, collegare impianti di produzione di idrogeno potrebbe evitare la riduzione del numero di centrali nucleari (Scamman & Newborough, 2016) la cui operatività è importante per ridurre le emissioni di GHG previste dal *Green Deal* europeo (IAEA, 2021).

Quella verde e porpora non sono le uniche vie di produzione dell'idrogeno a zero emissioni, negli ultimi anni infatti è stata sviluppata una nuova tecnica di estrazione dell'idrogeno chiamata "acqua" che si può tradurre come verde acqua. Questa tipologia di idrogeno è chiamato così in quanto il suo colore sta a metà tra il verde e il blu, testimoniando la sua caratteristica di non produrre emissioni di carbonio pur essendo prodotto da fonti fossili. Viene prodotto con un metodo innovativo di estrazione dal petrolio contenuto nelle sabbie bituminose (*oil sands*) o da riserve convenzionali. Il processo consiste nell'immissione all'interno del terreno di O₂, che innesca l'ossidazione esotermica degli idrocarburi presenti nel suolo. Raggiunta la temperatura di 350°C il carbonio rimane intrappolato nel suolo sotto forma di ossidi mentre l'H₂ viene estratto dal pozzo attraverso delle membrane. Il costo di questa tecnica è per lo più associato alle unità di separazione dei gas utilizzate per insufflare l'O₂ ed è pari a 0,23 \$/kg_{H2} (M. Yu et al., 2021). Il problema di questa modalità di produzione è che è strettamente legata alla presenza di riserve di petrolio nel suolo o nel sottosuolo, il che non rende l'idrogeno verde acqua producibile ovunque, al contrario dell'idrogeno verde.

Una modalità di produzione completamente differente da quelle viste finora è l'idrogeno turchese, la cui peculiarità è il recupero dei prodotti di scarto del processo, caratteristica che lo rende economicamente vantaggioso. In questo caso l'idrogeno è prodotto dalla pirolisi del metano, la cui combustione rilascia come sottoprodotto carbonio sottoforma filamentosa o di nanotubi, che possono essere recuperati e venduti. Purtroppo, i vantaggi economici generati da questa tecnica non vanno di pari passo con quelli ambientali, infatti, nonostante la pirolisi del metano pur non producendo CO₂ necessita di una grande quantità di energia.

L'unica via di produzione dell'idrogeno, oltre a quella verde, che può vedere applicabilità su larga scala mantenendo allo stesso tempo performance ambientali in linea con gli obiettivi del *Green Deal* è quella biologica. Ci sono vari processi biologici che consentono di produrre idrogeno: la bio-fotolisi diretta e indiretta (Javed et al., 2022), l'elettrolisi microbica (Gautam et al., 2023), la reazione biologica WGS (*biological water-gas shift reaction*) (Amos, 2004), la *Dark Fermentation* e la *Photo Fermentation* (Pal et al., 2022). Tra questi metodi, la *Dark* e *Photo Fermentation* stanno ricevendo una grande attenzione negli ultimi anni, in quanto permettono di utilizzare microorganismi per la degradazione dei rifiuti organici, contribuendone allo smaltimento e rientrando perfettamente nel contesto di economia circolare. Molti studi hanno dimostrato, inoltre, come l'utilizzo accoppiato di *Dark Fermentation* e *Photo Fermentation* permetta di massimizzare l'utilizzo del substrato, portando ad un incremento nella produzione di H₂. (Grabarczyk et al., 2019; Keskin et al., 2011).

Attualmente, però, solo una piccola parte dell'idrogeno è prodotto per via biologica, motivo per cui non gli è stato assegnato un colore (Ajanovic et al., 2022; Osman et al., 2020). Essendo questi processi ancora in fase di studio, i costi di produzione sono relativi a sperimentazioni di laboratorio e sono stimati essere pari a 2,83 \$/kg_{H₂} per la *Photo Fermentation* e tra 2,57 e 6,98 \$/kg_{H₂} per la *Dark Fermentation* (Ji & Wang, 2021).

1.5. Dark Fermentation

La *Dark Fermentation* (DF) è un processo biologico che avviene a cura di batteri fermentanti in condizioni di anaerobiosi (assenza sia di ossigeno libero che legato). La fermentazione avviene comunemente in natura in tutti quei casi in cui sono rispettate alcune semplici condizioni del sistema: presenza di un substrato organico e nutrienti, presenza di batteri fermentanti, e assenza di ossigeno. Tramite questo processo i microrganismi anaerobici sono in grado di produrre energia (sotto forma di ATP), degradando substrati organici complessi, come lipidi, carboidrati e proteine.

1.5.1. Le fasi della fermentazione

In Figura 8 è rappresentato uno schema delle tre principali fasi in cui può essere suddiviso il processo di DF: Idrolisi, Acidogenesi e Acetogenesi. Ciascuna di queste tre fasi è garantita da gruppi specializzati e diversificati di batteri, che convertono i substrati di partenza in sottoprodotti, che verranno poi utilizzati da altri gruppi di batteri nelle fasi successive (sintrofia). Al termine del processo i prodotti principali ottenuti sono acidi grassi

a catena corta (VFA), H₂ e CO₂, oltre ad alcoli ed altre sostanze organiche (Łukajtis et al., 2018; Villanueva-Galindo et al., 2023).

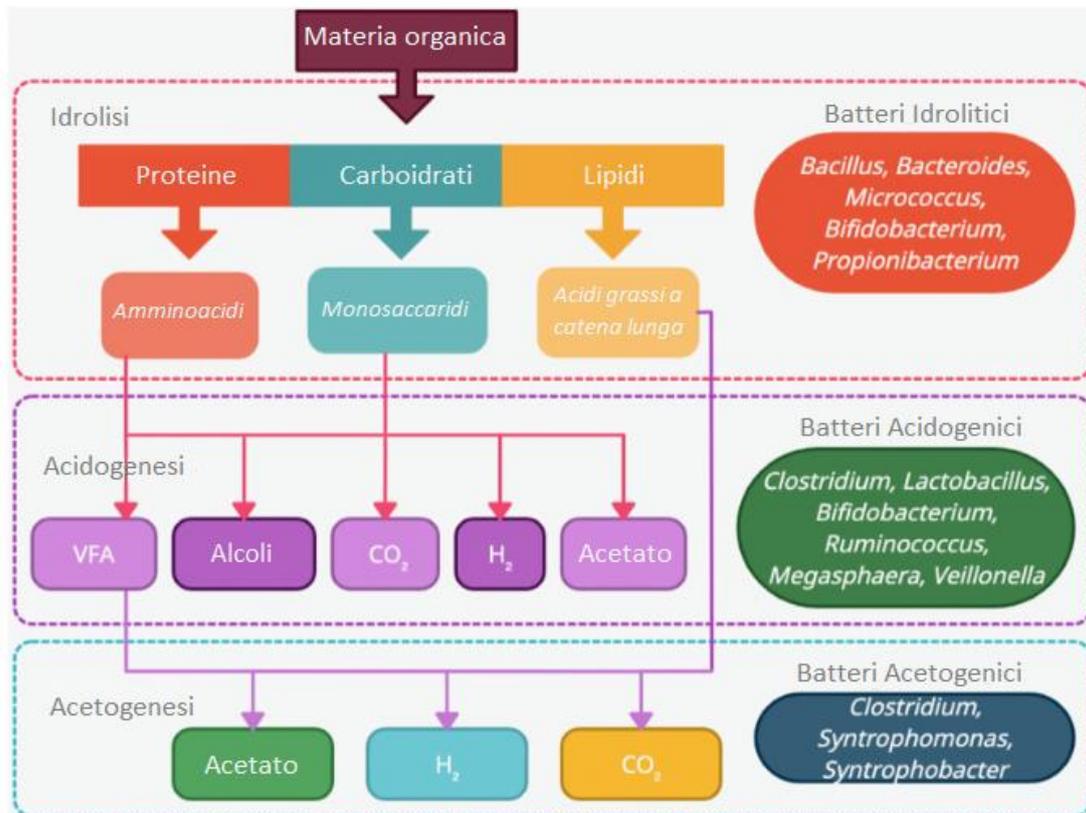
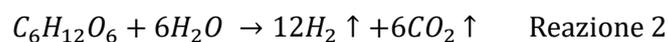


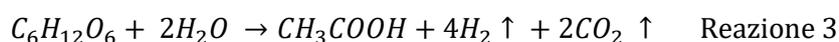
Figura 8, Fasi del processo di DF (Villanueva-Galindo et al., 2023, modificato)

Le quantità ed i rapporti di questi prodotti variano a seconda della composizione del substrato utilizzato e dei parametri operativi con cui viene settato il processo. Regolando questi parametri (come il tempo di ritenzione idraulica (HRT), il carico organico (OLR), la temperatura ed il pH) è possibile massimizzare la resa di produzione di idrogeno e di VFA per via biologica.

La fonte di carbonio ottimale per questo processo sono i carboidrati, in particolare il glucosio. Se il glucosio fosse completamente ossidato durante la fermentazione, si avrebbe la sua completa trasformazione in CO₂ e H₂, con la produzione di 12 moli di idrogeno per mole di glucosio, secondo la Reazione 2:



Questa reazione non è però termodinamicamente favorita nella DF; quindi, l'ossidazione del substrato avviene solo parzialmente, e porta alla produzione di due sottoprodotti, acido acetico o acido butirrico, secondo le Reazioni 3 e 4:



Considerando la produzione di questi due sottoprodotti, la resa reale di conversione del glucosio a idrogeno tramite *Dark Fermentation* varia nel range di 1–2,5 mol_{H₂}/mol_{glucosio} (Keskin et al., 2011; Łukajtis et al., 2018).

Come mostrato in Figura 8, la *Dark Fermentation* può portare alla formazione anche di altri VFA. I VFA (*volatile fatty acids*, acidi grassi volatili) sono acidi organici a catena corta (fino a sei atomi di carbonio) e comprendono acido acetico, propionico, butirrico, valerico ed esanoico. Sono prodotti intermedi del processo di digestione anaerobica (AD) della sostanza organica (Hultman & Alshwan, 2019), in particolare della fase fermentativa acidogenica (Valentino et al., 2021). Questi prodotti riscuotono grande interesse nel settore della bioraffineria in quanto sono precursori biologici di molti prodotti ad alto valore aggiunto come poliidrossialcanoati (PHA), biocarburanti (biogas e idrogeno), ed altri prodotti chimici come alcani, esteri e chetoni (Battista et al., 2022). Inoltre, si inseriscono ottimamente nel contesto di economia circolare in quanto possono essere prodotti a partire da rifiuti organici di varia natura (Hultman & Alshwan, 2019). La loro produzione su larga scala a partire da rifiuti organici è un processo ben consolidato in UE, in particolare in Germania e in Italia, dove si contano rispettivamente più di 1600 e 600 impianti operativi (Battista et al., 2022).

I substrati utilizzati in campo industriale per la *Dark Fermentation* possono essere rifiuti organici urbani, scarti organici industriali (reflui di frantoio, scarti caseari, birrai o di vinificazione) o anche fanghi di depurazione. I microorganismi maggiormente utilizzati in campo industriale appartengono a colture miste naturalmente presenti in fanghi anaerobici e di depurazione, oppure colture pure di microorganismi dei generi *Clostridium*, *Thermotoga* ed *Enterobacter* (Łukajtis et al., 2018).

1.5.2. I parametri di processo

Il processo di *Dark Fermentation* può essere favorito o inibito a seconda delle condizioni ambientali nel quale si verifica. Come visto nel paragrafo precedente, idrogeno e VFA sono i prodotti di maggiore interesse del processo di DF. La produzione di VFA e idrogeno risente moltissimo dei parametri di processo. In particolare, possono alterare notevolmente l'andamento del processo parametri come pH, temperatura, miscelazione, tempo di ritenzione idraulica (HRT), concentrazione di solidi volatili sospesi (VSS), carico organico (OLR), rapporto C/N e tipologia e natura del substrato utilizzato.

Il pH è probabilmente il parametro che più incide sulle rese di processo, sia per la produzione di VFA che di idrogeno. Valori troppo bassi di pH portano all'accumulo di alte concentrazioni di acidi in forma indissociata, che possono penetrare all'interno delle membrane cellulari, acidificando il citoplasma e causando lisi cellulare (Balachandar et al., 2013). Valori al contrario troppo elevati, potrebbero favorire il proliferare di metanogeni, che consumerebbero sia i VFA (metabolismo dei metanogeni acetoclastici) che l'idrogeno prodotto (metabolismo dei metanogeni idrogenotrofi). Il pH ottimale per la produzione di idrogeno tramite *Dark Fermentation* risulta essere compreso tra 5 e 6 (Balachandar et al., 2013). Per regolare il pH è possibile utilizzare sostanze chimiche (come NaOH o KOH), ma il loro impiego è sconsigliato in quanto possono dare

luogo a sottoprodotti indesiderati e ad alterazioni degli equilibri di reazione, oltre che andare ad aumentare i costi di processo.

La temperatura incide notevolmente sulle cinetiche dei microorganismi, il che può portare a variazioni dell'HRT ottimale da 24–48 ore fino a 12 giorni. In particolare, operare a regimi termofili ($T = 45\text{--}55^\circ\text{C}$) permette di lavorare ad HRT minori, ma di contro comporta spese energetiche superiori per il mantenimento di una temperatura superiore rispetto a quella adottata nei regimi mesofili ($25\text{--}45^\circ\text{C}$).

L'HRT e la composizione del substrato incidono sulla diversificazione del consorzio di microorganismi presenti nel reattore e, di conseguenza, sulla quantità e la tipologia di VFA prodotti. È provato che HRT troppo elevati (in relazione a OL, T e composizione del substrato) portano al consumo dei VFA prodotti, i quali vengono usati come substrato per la produzione di biogas da parte dei metanogeni.

Altro parametro di fondamentale importanza è la presenza di nutrienti nel sistema. Generalmente un rapporto C/N ottimale può variare da 20 a 30. Rapporti C/N troppo bassi possono portare ad un accumulo di ammoniaca, che può inibire il processo di fermentazione (Hultman & Alshwan, 2019). Molti studi hanno inoltre individuato una correlazione tra il contenuto di VSS e la produttività di VFA. In particolare è stato riscontrato che concentrazioni elevate di VSS (poste ottimali le altre condizioni) portano a massimizzare la resa di produzione di VFA (Presti et al., 2021).

In generale è importante mantenere i parametri di processo più stabili possibile per evitare che i microorganismi adottino *pathways* metabolici alternativi, portando a formazione di sottoprodotti (come alcoli o acido lattico) che riducono la produzione di VFA e idrogeno (Battista et al., 2022; Hultman & Alshwan, 2019; Micolucci et al., 2020; Presti et al., 2021).

1.6. Photo Fermentation

La *Photo Fermentation* (PF) è quel particolare processo di fermentazione condotto da batteri rossi fotosintetizzanti in condizioni anaerobiche e in presenza di una fonte luminosa. Questi batteri (PNSB, *Purple non-sulfur bacteria*) in presenza di luce e mediante l'attività dell'enzima nitrogenasi, attuano la fotosintesi anossigenica producendo H_2 e degradando composti organici.

1.6.1. Batteri rossi e fermentazione fotosintetica

I batteri rossi *sono* microorganismi fototrofi in grado di attuare differenti metabolismi in risposta alle alterazioni delle condizioni ambientali (Monroy & Buitrón, 2020). Sono largamente diffusi in molti ambienti naturali, principalmente acquatici, come lagune, stagni, laghi, mari, sedimenti e zone umide (Sundar & Chao, 2022). Sono una classe di batteri molto variegata, che comprende circa 50 generi diversi (Madigan & Jung, 2009). La capacità di attuare differenti metabolismi consente a questi microorganismi di spaziare in range molto ampi di condizioni ambientali. La fotosintesi nei batteri rossi è stata osservata a temperature tra gli 0 e i 57°C , a pH compresi tra 3 e 11, sia in ambienti di acqua dolce che di acqua salata (Madigan & Jung, 2009).

A seconda del loro metabolismo principale, questi batteri possono essere divisi in due sottocategorie: i PSB (*Purple Sulfur Bacteria*) e i PNSB (*Purple Non-Sulfur Bacteria*). I PSB si distinguono dai PNSB prevalentemente per la capacità di ossidare l'acido solfidrico (H₂S) in forme dello zolfo meno tossiche, quali lo zolfo elementare (S⁰) o il solfato (SO₄²⁻) (Madigan & Jung, 2009). I PSB preferiscono un metabolismo fotoautotrofo, che gli permette di proliferare utilizzando CO₂ come sola fonte di carbonio, analogamente a microalghe e cianobatteri. Tuttavia, a differenza di queste ultime due categorie, i batteri rossi sono in grado di effettuare la fotosintesi esclusivamente in condizioni di anossia, in quanto l'ossigeno molecolare reprime la sintesi dei pigmenti coinvolti nel processo (Madigan & Jung, 2009). I PNSB, invece, pur essendo in grado di crescere anche in fotoautotrofia o in assenza di luce, sono prevalentemente fotoeterotrofi, in grado cioè di utilizzare la luce come fonte di energia per metabolizzare composti organici come acido acetico, butirrico, malico, succinico e altri (Mishra et al., 2019).

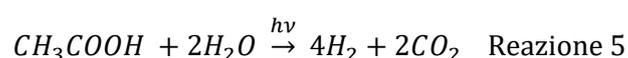
In Tabella 1 sono riportati i principali generi di PNSB e le loro caratteristiche morfologiche. Tra questi, i principali generi studiati nel settore biotecnologico sono i *Rhodobacter* (in particolare *Rba. capsulata* e *Rba. sphaeroides*), i *Rhodospirillum* (*Rsp. rubrum*), e i *Rhodopseudomonas* (*Rps. palustris*) (Madigan & Jung, 2009).

Tabella 1, Generi di batteri rossi anossigenici fotosintetizzanti (Madigan & Jung, 2009, modificato)

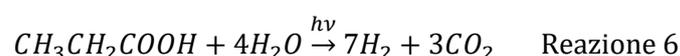
Genere	Abbreviazione	Morfologia
<i>Rhodobaca</i>	<i>Rca.</i>	Cocchi o Bacilli
<i>Rhodobacter</i>	<i>Rba.</i>	Bacilli
<i>Rhodovulum</i>	<i>Rdv.</i>	Coccobacilli
<i>Rhodopseudomonas</i>	<i>Rps.</i>	Clusters di bacilli
<i>Rhodoblastus</i>	<i>Rbl.</i>	Clusters di bacilli
<i>Blastochloris</i>	<i>Blc</i>	Clusters di bacilli
<i>Rhodomicrobium</i>	<i>Rmi</i>	Clusters di bacilli
<i>Rhodobium</i>	<i>Rbi</i>	Bacilli
<i>Rhodoplanes</i>	<i>Rpl</i>	Bacilli
<i>Rhodocista</i>	<i>Rcs</i>	Spirilli
<i>Rhodospirillum</i>	<i>Rsp</i>	Spirilli
<i>Phaeospirillum</i>	<i>Phs</i>	Spirilli
<i>Rhodopila</i>	<i>Rpi</i>	Cocchi
<i>Rhodospira</i>	<i>Rsa</i>	Spirilli
<i>Rhodovibrio</i>	<i>Rhv</i>	Vibrioni
<i>Rhodothallasium</i>	<i>Rts</i>	Spirilli
<i>Roseospira</i>	<i>Ros</i>	Spirilli
<i>Rhodospirillum</i>	<i>Rss</i>	Spirilli
<i>Rhodocyclus</i>	<i>Rcy</i>	Vibrioni curvi
<i>Rhodoferax</i>	<i>Rfx</i>	Bacilli, vibrioni
<i>Rubrivivax</i>	<i>Rvi</i>	Bacilli, bacilli curvi

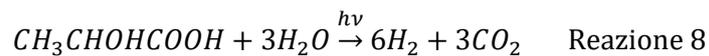
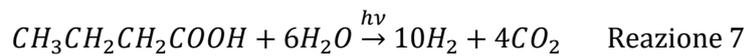
I PNSB sono molto studiati in ambito industriale e biotecnologico per la produzione di biocarburanti (H₂), ma anche per la depurazione di reflui organici di varia natura, per la produzione di biostimolanti, per la bonifica di siti contaminati, per la produzione di bioplastiche (PHB) e per la produzione di elettricità (Brown et al., 2022).

Contrariamente alla DF, l'energia necessaria al completamento della reazione è fornita dalla luce e può portare ad una resa teorica fino ad 4 moli di H₂ per mole di acido acetico; secondo la reazione 5 (Keskin et al., 2011):



Altri possibili *pathways* metabolici sono riportati nelle reazioni 6–8, a partire da acido propionico, butirrico, e lattico (Baeyens et al., 2020).

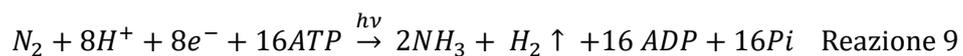




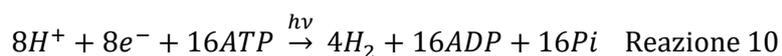
Anche in questo caso le rese reali di produzione non corrispondono a quelle stechiometriche, in quanto parte del substrato è utilizzato per la crescita cellulare e la produzione di riserve energetiche (PHB). Inoltre, parte dell' H_2 generato può essere ossidato ad H^+ nella fase di *uptake* (Keskin et al., 2011).

1.6.2. Il ruolo della nitrogenasi

La nitrogenasi è il complesso enzimatico che catalizza la riduzione dell'azoto atmosferico, con conseguente produzione di idrogeno. In natura è presente in Eterocisti cianobatteriche e nei batteri rossi non sulfurei (PNSB) (Eroglu & Melis, 2011). In presenza di azoto molecolare i PNSB utilizzano questo enzima come biocatalizzatore per la riduzione di N_2 ad ammoniaca (NH_3), utilizzando protoni, elettroni ed energia ottenuta dall'idrolisi dell'ATP (Huang et al., 2021). In queste condizioni i PNSB producono una mole di H_2 per mole di azoto fissato ad ammoniaca (Keskin et al., 2011). La reazione 9 rappresenta la produzione di idrogeno catalizzata dalla nitrogenasi in condizioni di N_2 non limitante:



La funzione primaria della nitrogenasi in natura è la fissazione dell'azoto atmosferico ad ammoniaca. Quando però deve operare in condizioni di carenza di N_2 , per mantenere l'equilibrio redox all'interno della cellula, la nitrogenasi perde il ruolo di fissatore di azoto e catalizza una sintesi di idrogeno molecolare alternativa (Reazione 10).



Entrambe le reazioni 9 e 10 portano alla produzione di idrogeno, ed entrambe richiedono un elevato consumo di energia intracellulare sotto forma di ATP. L'efficienza di produzione di idrogeno in condizioni di assenza di azoto è però significativamente maggiore, in quanto i protoni H^+ sono convertiti completamente a H_2 e non a NH_3 . (Eroglu & Melis, 2011; Ghosh et al., 2017).

L'attività di questo enzima è inibita dalla presenza di O_2 , che ne altera la struttura inattivandolo irreversibilmente. Inoltre, risente particolarmente di alte concentrazioni di NH_3 e di bassi rapporti C/N del substrato (Keskin et al., 2011).

1.7. Il progetto *Purple-B*

Questo lavoro di tesi si inserisce all'interno del progetto *Purple-B*, nato dalla collaborazione tra il *Green Propulsion Laboratory* di VERITAS, l'Università Ca' Foscari Venezia, l'Università di Padova e la start up 9-Tech. Il progetto è finanziato dell'Agenzia spaziale europea (ESA) nell'ambito del programma MELISSA (*Micro-Ecological Life Support System Alternative*). L'ESA è un ente europeo che si dedica da quasi 50 anni

all'esplorazione e all'utilizzo dello spazio, prefiggendosi lo scopo di spingere le frontiere della scienza e della tecnologia e di promuovere la crescita economica in Europa. Il programma MELISSA è stato istituito da ESA per individuare tecnologie a sistemi rigenerativi, atti alla produzione di beni primari (cibo, acqua, ossigeno, energia) durante le missioni spaziali. Lo sviluppo di queste tecnologie è finalizzato alla chiusura del ciclo dell'acqua e del carbonio tramite processi biologici ad efficienze elevate e a volumi ridotti. Questi sistemi puntano alla produzione di cibo, acqua, ossigeno ed energia, indispensabili per garantire l'autonomia delle missioni, in quanto evitano il trasporto di grosse quantità di prodotti dalla Terra che risulterebbe troppo costoso oltre che irrealizzabile in future missioni oltre la *Low Earth Orbit*.

In quest'ottica, il progetto *Purple-B* è finalizzato alla realizzazione di un sistema di *Dark-Photo Fermentation* a due stadi per il trattamento dei rifiuti prodotti dall'equipaggio di astronauti nelle stazioni orbitali. Il primo stadio mira alla trasformazione dei rifiuti organici in VFA, da alimentare successivamente in un sistema a batteri rossi fotosintetizzanti immobilizzati su una matrice idrofilica. L'immobilizzazione dei batteri è finalizzata a minimizzare i volumi di refluo da alimentare nel reattore, così da incrementarne le cinetiche di conversione e per consentire al sistema di operare in condizioni di bassa gravità. L'obiettivo principale è massimizzare la produzione di idrogeno, depurando al tempo stesso i rifiuti organici e creando un link diretto tra rifiuto ed energia.

2. Stato dell'arte

Le rese di produzione ottenibili tramite il processo di *Dark Fermentation* sono fortemente connesse all'attività microbica, alle caratteristiche del substrato trattato e ai parametri operativi selezionati. Le rese di produzione, sia di idrogeno che di VFA, possono calare drasticamente quando il consorzio batterico non è bilanciato. Nel caso in cui non siano rispettati i parametri di processo (trattati nel Paragrafo 1.5.2), si potrebbe incorrere nel proliferare di microorganismi metanogeni, con conseguente diminuzione delle rese di produzione di VFA (a causa del consumo di acido acetico da parte dei metanogeni acetoclastici) unitamente alla diminuzione delle rese di produzione di idrogeno (consumato invece dai metanogeni idrogenotrofi). Per ridurre la proliferazione di microorganismi indesiderati, è possibile effettuare dei pretrattamenti sull'inoculo di partenza, per selezionare specifici gruppi funzionali di batteri. Luo et al. (2022) hanno studiato l'effetto di diversi pretrattamenti sulle rese di produzione di idrogeno nel processo di *Dark Fermentation*, osservando come l'utilizzo di un inoculo pretrattato con soluzioni acide o alcaline possa incrementare le rese di produzione del 70 %, rispetto a un controllo non trattato. Tuttavia, l'applicazione di questo genere di pretrattamenti risulta ancora tecnicamente difficile ed economicamente svantaggiosa, come evidenziato da Rajesh Banu et al. (2020).

La co-fermentazione di fanghi municipali e di substrati organici è una strategia spesso impiegata per garantire il bilanciamento dei nutrienti durante la fermentazione e per ottimizzare le rese di conversione dei reflui organici in VFA. Dalla co-fermentazione di scarti organici (frazione umida dei rifiuti prodotti da una mensa) e di fanghi di supero Cheng et al. (2016) hanno ottenuto la massima produzione di VFA ($9,71 \text{ g L}^{-1}$) applicando un rapporto di co-fermentazione di 3:1 (su base VS) in test batch, producendo prevalentemente acido acetico e butirrico (94,3 % del totale di VFA prodotti), valori leggermente superiori rispetto alla fermentazione dei soli scarti organici ($8,69 \text{ g L}^{-1}$, di cui il 90,4 % di acetico e butirrico). Sbilanciando il rapporto con quantità superiori di fango di supero, rispettivamente 2:2 e 1:3, la produzione massima di VFA è scesa a $6,96$ e $3,51 \text{ g L}^{-1}$. Moretto et al. (2019) hanno studiato la co-fermentazione di fanghi di supero e FORSU (miscelati in rapporto 65:35 su base volume) in batch in condizioni di mesofilia e di termofilia, e valutando gli effetti della correzione del pH, eseguita esclusivamente a inizio sperimentazione. La produzione massima di VFA ($30 \text{ g}_{\text{VFA(COD)}} \text{ L}^{-1}$) è stata ottenuta in condizioni di mesofilia correggendo il pH a 9 a inizio test, mentre nel test a pH non controllato la produzione massima è risultata considerevolmente minore ($18,6 \text{ g}_{\text{VFA(COD)}} \text{ L}^{-1}$).

I VFA prodotti nel processo di *Dark Fermentation* possono essere utilizzati da batteri rossi fotosintetizzanti (PNSB) per la produzione di ulteriore idrogeno attraverso il processo di fotofermentazione (PF) (Baeyens et al., 2020).

La produzione di idrogeno per via fotofermentativa tramite PNSB risulta essere particolarmente promettente, visto che consente di ottenere dell'idrogeno ad elevata purezza, utilizzando un diversificato

stock di composti organici, e ottenendo delle elevate rese teoriche di conversione. A seconda del ceppo di PNSB utilizzato, della fonte di carbonio impiegata e del sistema di illuminazione adottato, le rese del processo possono variare considerevolmente. In genere, l'efficienza di conversione del substrato organico a idrogeno varia tra il 38 e l'84 %, mentre l'efficienza di conversione della luce tra l'1,1 e il 4,8 % (Adessi, 2013). Uno dei principali fattori che limitano la produzione su scala industriale di bioidrogeno tramite *Photo Fermentation* è appunto la bassa efficienza di conversione della luce, che per poter rendere il processo economicamente accessibile dovrebbe raggiungere circa il 10 % (Basak & Das, 2007). L'illuminazione della coltura di PNSB e l'ottimizzazione della configurazione reattoristica ricoprono quindi un ruolo essenziale nel massimizzare le rese del processo.

Laocharoen & Reungsang (2014) hanno ottenuto le rese di produzione migliori ($11,08 \text{ mL}_{\text{H}_2} \text{ L}^{-1}$ e $3,80 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{malico}}$) con *Rhodobacter sphaeroides* ad un'intensità luminosa di 6,000 lux. Inoltre, hanno evidenziato come sottoporre la coltura a diversi fotoperiodi (fasi di illuminazioni seguite da fasi di oscurità) porti alla diminuzione delle rese di produzione di idrogeno, non rendendolo una strategia di illuminazione efficace. Gokfiliz & Karapinar (2017) hanno verificato le rese di produzione di *Rhodopseudomonas palustris* 420L a diverse intensità di illuminazione, osservando un aumento nella produzione di idrogeno all'aumentare dell'intensità di illuminazione applicata al sistema. Su colture a biomassa sospesa, inoltre, l'efficienza di illuminazione risulta essere intrinsecamente connessa alla concentrazione della biomassa. Luxem et al. (2022) hanno osservato infatti come l'incremento di concentrazione di PNSB, studiando *Rps. palustris*, non porti ad un incremento nella produzione di idrogeno ma, al contrario, ne rallenti la produzione, a causa di fenomeni di *self-shading* causati dalla densità cellulare, che limita la penetrazione dei raggi di luce all'interno della coltura stessa. Per far fronte a ciò sono state studiate delle applicazioni di PNSB su reattori a biomassa immobilizzata, allo scopo di limitare la crescita cellulare e garantire la massima penetrazione della luce all'interno della coltura. In uno studio condotto da Singh et al. (2013), l'applicazione di questa tecnologia ha permesso di ottenere tassi di produzione superiori ($22,7 \text{ mmol}_{\text{H}_2} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), rispetto a quelli ottenuti su biomassa sospesa ($12,3 \text{ mmol}_{\text{H}_2} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Inoltre, queste colture risultano essere più tolleranti per quanto riguarda gli sbalzi di temperatura, di pH, e di carico organico, stabilizzando la produzione di idrogeno nel lungo periodo (Sivagurunathan et al., 2015). Tuttavia, le colture a biomassa sospesa consentono di ottenere dei migliori coefficienti di trasferimento di massa, favorendo la conversione del substrato organico a idrogeno (Mishra et al., 2019).

In uno studio comparativo condotto da Hu et al. (2018), vengono studiate le rese di produzione di idrogeno da parte di *Rps. palustris*, *Rba. sphaeroides*, *Rba. capsulata*, e *Rsp. Rubrum*, Per diverse fonti di carbonio (acido acetico, butirrico, lattico e malico). Lo studio ha evidenziato come i ceppi di *Rhodobacter* avessero preferenza per singole fonti di carbonio: l'acido lattico per *Rba. sphaeroides* e l'acido malico per *Rba. capsulata*. *Rps. palustris* e *Rsp. Rubrum*, invece, hanno dimostrato di poter convertire in idrogeno tutti i composti organici presi in esame. Tra i ceppi studiati, inoltre, *Rps. palustris* è risultato avere le migliori

cinetiche di crescita, di produzione di idrogeno e di conversione dei substrati. Segura et al. (2021) hanno evidenziato come l'uso di miscele di VFAs abbia portato ad incrementare la crescita di *Rsp. rubrum*, rispetto a test condotti sui singoli composti organici.

Molti studi hanno dimostrato che l'uso accoppiato di *Dark Fermentation* e *Photo Fermentation* permette di massimizzare l'uso del substrato, portando ad un incremento nella produzione complessiva di H₂. I VFA e le altre sostanze prodotte nella DF possono essere utilizzate dai batteri fotofermentanti per la produzione di H₂ (Grabarczyk et al., 2019; Keskin et al., 2011). L'integrazione di *Dark Fermentation* e *Photo Fermentation* può essere effettuata in contemporanea all'interno dello stesso reattore (fermentazione *single-stage*) oppure separando spazialmente in due reattori distinti le due fasi di fermentazione (fermentazione *two-stages*), separate e successive dove i prodotti della DF (VFA) sono utilizzati per alimentare la fase fotofermentativa (Mishra et al., 2019).

Zhang et al. (2020) hanno valutato il processo di *Dark-Photo-(co-)Fermentation* (DPCF) in relazione ai singoli processi di DF e PF, utilizzando come substrato residui colturali del mais. I risultati ottenuti hanno dimostrato la maggior produttività iniziale di idrogeno ($1,88 \text{ mL}_{\text{H}_2} \text{ g}_{\text{TS}}^{-1} \text{ h}^{-1}$) ed il massimo contenuto di idrogeno nel gas prodotto (44,40 %) nello stesso periodo. Tuttavia, i parametri di processo ed il substrato utilizzati hanno evidenziato una maggiore resa di idrogeno ($141,42 \text{ mL g}_{\text{TS}}^{-1}$) ed una maggiore efficienza di conversione energetica (10,12 %) nella PF, indicando che il processo di DPCF alle condizioni adottate dagli autori risulta più vantaggioso operando a bassi HRT. Ghosh et al. (2020) hanno adottato un processo combinato di *Dark-Photo-Fermentation* a singolo stadio utilizzando un *flat plate photobioreactor* (FPPBR) per la crescita combinata di *Clostridium acetobutylicum* e *Rhodospseudomonas sp.*, operando con cicli *batch* ripetuti. Questa configurazione reattoristica ha permesso agli autori di ottenere rese fino a $4,44 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{glucosio}}$ ed un'efficienza di conversione energetica pari al 45,31 %. Questi valori sono 2,24 volte maggiori di quelli ottenuti alle stesse condizioni in un FPPBR *batch* semplice, ad indicare come la configurazione reattoristica scelta influenzi notevolmente le rese di processo. Sagnak & Kargi (2011) hanno investigato l'influenza di differenti HRT (da 1 a 10 giorni) sulla produzione e le rese di idrogeno nel processo di DF-PF a singolo stadio, utilizzando fango derivante dalla fermentazione di amido di frumento idrolizzato. Questo prodotto è stato poi utilizzato come substrato per la co-fermentazione da parte di *Rhodobacter sphaeroides* e dei microorganismi già presenti all'interno del fango. Il massimo tasso di produzione di idrogeno (85 mL d^{-1}) è stato ottenuto ad HRT pari a 96 h e la massima resa di produzione di idrogeno ($3,40 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{esoso}}$) è stata ottenuta ad HRT di 192 h. Kawaguchi et al. (2001) hanno utilizzato amido accumulato da biomassa algale per produrre idrogeno dalla co-fermentazione di *Lactobacillus amylovorus* e del microorganismo fotofermentante *Rhodobium marinum*. *L. amylovorus* che possiede attività di amilasi ha fermentato l'amido presente producendo acido lattico che è stato utilizzato da *Rbi. marinum* per la produzione di idrogeno con una resa pari a $7,2 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{esoso}}$.

Tuttavia, i processi a fasi separate (Tabella 2) permettono di ottenere rese di idrogeno maggiori. Questi processi infatti sono caratterizzati dall'utilizzo di due reattori separati mantenuti alle condizioni ottimali per la specifica fase, condizione che non è possibile ottenere in un processo a singolo stadio (Mishra et al., 2019). Caratteristica che porta, oltre a maggiori rese di produzione di idrogeno, al maggior consumo del substrato con conseguente riduzione del contenuto COD nella sostanza organica utilizzata (Niño-Navarro et al., 2020).

Niño-Navarro et al. (2020) hanno studiato il processo di *Dark-Photo Fermentation* a due stadi al fine di valutare le rese di produzione di idrogeno al variare del rapporto C/N e del livello di diluizione adottato. Come substrato per la DF, gli autori hanno utilizzato scarti di frutta e verdura e siero del latte in polvere. Le condizioni che hanno portato alla maggiore resa di idrogeno ($793,7 \text{ mL}_{\text{H}_2} \text{ g}_{\text{COD}}^{-1}$) a cui corrisponde un tasso di produzione di $62,8 \text{ mL}_{\text{H}_2} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ erano con rapporto C/N di 60 e grado di diluizione dell'effluente della DF di 1:10, mentre il più elevato tasso di produzione ($157,5 \text{ mL}_{\text{H}_2} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) è stato riscontrato con C/N di 39 e diluizione 1:2. Gli autori hanno inoltre caratterizzato la comunità microbiologica usata nella prima fase (DF) notandone una alterazione della composizione in relazione al C/N adottato. Özgür et al. (2010) hanno studiato l'effetto che l'aggiunta di ammoniaca ha sulla produzione di idrogeno nella DF, la maggiore resa ($4,2 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{saccarosio}}$) è stata ottenuta in assenza di ammoniaca. Tale effluente è stato poi utilizzato nella PF dove un ceppo modificato di *Rba. capsulatus* ha permesso di raggiungere la resa complessiva di $13,2 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{saccarosio}}$ (pari al 58 % della resa teorica massima), questa resa è stata ottenuta grazie all'aggiunta di citrato ferrico e molibdato di sodio per regolare il pH. Questo è dovuto dalla presenza del Fe che svolge funzione di cofattore per la nitrogenasi batterica. Cheng et al. (2011) hanno studiato il processo di DF-PF a due stadi utilizzando amido di manioca come substrato ed ottimizzando pH, temperatura e concentrazione del substrato (rispettivamente 6,3; 31°C e $10,4 \text{ g L}^{-1}$). La fase di PF è avvenuta per mezzo di *Rps. palustris* immobilizzato che ha permesso di ottenere la resa complessiva di $6,07 \text{ mol}_{\text{H}_2}/\text{mol}_{\text{esoso}}$ (pari al 50,6 % della resa teorica massima). Uno studio simile è stato effettuato da Su et al. (2009) utilizzando differenti concentrazioni di amido di manioca e *Rps. palustris* come microorganismo fotofermentante che ha portato alla resa complessiva di $402,3 \text{ mL}_{\text{H}_2}/\text{g}_{\text{amido}}$. La significativa differenza nelle rese di idrogeno ottenute nei due studi è dovuta all'ottimizzazione di pH e temperatura nonché all'immobilizzazione di *Rps. palustris*.

Tabella 2, Produzione di idrogeno mediante processi di Dark-Photo Fermentation

Processo	Substrato	Inoculo DF	Inoculo PF	Resa H ₂	Reference
	Amido di manioca	Fanghi attivi	<i>Rps. palustris</i>	402,3 mL g _{amido} ⁻¹	(Su et al., 2009)
Fasi separate	Scarti di frutta e verdura e siero del latte in polvere	Coltura mista con dominanza di <i>Bifidobacterium</i> (85,4 %)	Consorzio eterotrofico misto con dominanza di <i>Rps. palustris</i> (98 %)	793,7 mL _{H₂} g _{COD} ⁻¹	(Niño-Navarro et al., 2020)
	Amido di manioca	Coltura mista	<i>Rps. palustris</i>	840 ml g _{amido} ⁻¹	(Cheng et al., 2011)
	Melasse di barbabietola	<i>Caldicelluliruptor saccharolyticus</i>	<i>Rba. capsulatus DSM1710</i>	13,7 mol _{H₂} /mol _{esoso}	(Özgür et al., 2010)
	Terreno sintetico comune (SCNM)	<i>Clostridium acetobutylicum</i> (MTCC 11274)	<i>Rhodopseudomonas sp.</i> (MTCC 8756)	4,44 mol _{H₂} /mol _{glucosio}	(Ghosh et al., 2020)
Singolo stadio	Residui colturali del mais	<i>Enterobacter aerogenes</i>	HAU-M1	90 mL g _{TS} ⁻¹	(Zhang et al., 2020)
	Amido di frumento	Fango attivo	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	3,40 mol _{H₂} /mol _{esoso}	(Sagnak & Kargi, 2011)
	Biomassa algale (amido)	<i>Lactobacillus amylovorus</i>	<i>Rhodobium marinum</i>	7,2 mol _{H₂} /mol _{esoso}	(Kawaguchi et al., 2001)

3. Scopo della tesi

Questo lavoro si inserisce all'interno del progetto Purple-B di Veritas, finanziato dall'Agencia spaziale europea (ESA) nell'ambito del programma MELISSA (*Micro-Ecological Life Support System Alternative*). Purple-B è un progetto nato dalla collaborazione tra il *Green propulsion laboratory* di Veritas, l'Università Ca' Foscari Venezia, l'Università di Padova e la start up 9-Tech, con lo scopo di integrare lo smaltimento dei rifiuti organici prodotti da un equipaggio di astronauti con la produzione di idrogeno per via biologica (VERITAS, 2021).

L'attività svolta è stata focalizzata sulla valutazione della produzione di VFA e di idrogeno combinando un processo di *Dark Fermentation* (DF) e di *Photo Fermentation* (PF). A livello sperimentale, il test è stato diviso in due fasi: un processo di *Dark Fermentation* finalizzato alla produzione di VFA e uno di *Photo Fermentation* finalizzato alla conversione dei VFA a idrogeno.

Per quanto riguarda la *Dark Fermentation* sono state valutate le rese di produzione di VFA a diversi carichi organici in test *batch* su reattori in *lab-scale*. Come substrato è stato utilizzato un mix di lattuga, barbabietola e carta igienica (sulla base delle specifiche del progetto Purple-B) e fango secondario ispessito, avente sia il ruolo di inoculo di microorganismi che di co-substrato di fermentazione. Il fermentato avente le migliori caratteristiche in termini di concentrazione di VFA e di ammoniaca è stato poi utilizzato in dei test di foto fermentazione, per andare a indagare le rese di produzione di una configurazione reattoristica combinata di tipo *Dark-Photo Fermentation*. I test di *Photo Fermentation* sono stati svolti in *batch* in *lab-scale* su colture a biomassa sospesa di *Rhodospseudomonas palustris* e di *Rhodospirillum rubrum*. Durante il test sono state valutate le differenze nelle cinetiche di crescita, nel consumo di VFA e nella produzione di idrogeno tra le due specie di PNSB su fermentato e su mezzo di crescita sintetico.

4. Materiali e metodi

4.1. Dark Fermentation

4.1.1. Substrati e Inoculo

Per il test di *Dark Fermentation* è stato utilizzato come substrato un mix di lattuga, barbabietola e carta igienica (Figura 9), preparato secondo le specifiche del progetto di riferimento, *Purple-B*. I substrati sono stati omogeneizzati utilizzando un frullatore e miscelati tra loro in rapporto 6:6:1 (lattuga : barbabietola : carta igienica) su base TS, in accordo con quanto indicato nel progetto *Purple-B*. Nella fermentazione è stato inoltre utilizzato del fango secondario ispessito, prelevato da un impianto di trattamento delle acque reflue. Il fango è stato utilizzato principalmente per fornire al sistema un inoculo di microorganismi fermentanti. Tuttavia, essendo caratterizzato da biomassa mista non selezionata per la sola fermentazione, non può essere visto solamente come inoculo, ma deve essere considerato anche come co-substrato di fermentazione. In Tabella 3 sono riportati i parametri di caratterizzazione delle varie matrici utilizzate.



Figura 9, Campioni di lattuga (in alto a sinistra), barbabietola (in alto a destra), carta igienica (in basso a sinistra) e fango ispessito (in basso a destra)

Tabella 3, Parametri chimico-fisici delle differenti matrici utilizzate nel test di Dark Fermentation

Matrice	TS	TVS	TVS/TS	COD
	$g_{TS} Kg_{TS}^{-1}$	$g_{TVS} Kg_{TS}^{-1}$	%	$g_{O_2} Kg_{TS}^{-1}$
Lattuga	$88,74 \pm 3,15$	$74,29 \pm 7,17$	$83,6 \pm 5,12$	$80,06 \pm 3,57$
Barbabietola	$118,58 \pm 1,10$	$111,13 \pm 0,54$	$93,7 \pm 0,41$	$113,97 \pm 8,26$
Carta igienica	$992,75 \pm 10,25$	$958,45 \pm 43,7$	$96,5 \pm 3,41$	$1051,3 \pm 40,3$
Mix	$83,50 \pm 0,89$	$75,89 \pm 0,75$	$90,9 \pm 0,06$	$111,15 \pm 5,28$
Fango	$24,57 \pm 0,25$	$19,38 \pm 0,24$	$78,9 \pm 0,20$	$25,70 \pm 1,56$

4.1.2. Reattoristica utilizzata



Figura 10, Fermentatori batch utilizzati nei test di Dark Fermentation (RES Italia)

I test di *Dark Fermentation* sono stati condotti presso il *Green Propulsion Laboratory* di Veritas (Fusina). Per questi test sono stati utilizzati dei fermentatori da banco (Figura 10). I reattori (RES Italia) sono dotati di un sistema automatico di termostatazione, di miscelazione e di misurazione e campionamento del biogas prodotto. La miscelazione è garantita da pale ad ancora realizzate in maniera tale da scorrere sul fondo del reattore e limitare al minimo la sedimentazione di solidi. La miscelazione e la termostatazione sono state

regolate in maniera tale da avvenire in maniera alternata ogni 30 secondi, in modo tale da garantire una temperatura omogenea all'interno del reattore. Il sistema è stato progettato in maniera tale da convogliare automaticamente il gas prodotto, al superamento di una pressione di 1,2 bar nello spazio di testa dei reattori, verso un gasometro per la misurazione del volume di gas, canalizzandolo infine verso delle *bags* di stoccaggio da 10 L.

Ogni fermentatore è dotato di:

- Un sensore di temperatura (termocoppia PT100)
- Una camicia riscaldante, per fornire il calore necessario al mantenimento della temperatura
- Un sensore di pressione e un'elettrovalvola per lo scarico automatico del gas prodotto
- Un apparato di miscelazione
- Un foro richiudibile per l'alimentazione e il campionamento
- Una sacca per la raccolta del gas prodotto

Tutti i reattori erano inoltre collegati un PLC (*programmable logic controller*) attraverso il quale era possibile gestire i parametri di processo del sistema: temperatura, velocità di miscelazione, frequenza di miscelazione e frequenza di scarico del gas prodotto.

4.1.3. Piano Sperimentale

I test di *Dark Fermentation* sono stati condotti alla temperatura di $37 \pm 0,6^\circ\text{C}$, in regime di miscelazione di 14 rpm. Il mantenimento della temperatura e la miscelazione avvenivano in maniera alternata ad intervalli di 30 secondi, in modo da distribuire omogeneamente il calore fornito dalla resistenza ai substrati e all'inoculo e limitare la sedimentazione dei solidi sul fondo del fermentatore. Sono state inoltre fornite le condizioni anaerobiche insufflando N_2 nello spazio di testa dei fermentatori a inizio sperimentazione.

I test di *Dark Fermentation* sono stati condotti a differenti carichi organici (0, 5, 10, 15, 20, 25 $\text{Kg}_{\text{TVS}} \text{m}^{-3}$) (Tabella 4), considerando il fango come inoculo. Ogni test è durato dieci giorni ed ogni condizione è stata testata in duplice copia. La produzione e composizione del gas è stata monitorata per tutta la durata dei test, così da verificare l'eventuale instaurarsi di condizioni metanogeniche. Il campionamento del fermentato è stato effettuato ogni due giorni con lo scopo di determinare il pH (su cui non veniva eseguita alcuna correzione) ed il contenuto e la composizione di VFA. Al termine di ogni test è stato determinato il contenuto di ammoniaca.

Tabella 4, Test di Dark Fermentation effettuati a differenti carichi organici e rispettive condizioni operative

	Inoculo	OL MIX	OL MIX+Fango	F/M
	% fango	$Kg_{TVS} m^{-3}$	$Kg_{TVS} m^{-3}$	$VS_{feed}/VS_{inoculo}$
Controllo	100	0	19,38	0
OL 5	94,2	4,41	22,66	0,27
OL 10	86,8	9,46	27,33	0,56
OL 15	79,6	14,52	29,96	0,97
OL 20	72,9	19,36	33,49	1,42
OL 25	66,1	24,24	37,05	1,95

4.1.4. Metodi Analitici

Le analisi di caratterizzazione del fango e delle singole matrici utilizzate per comporre il mix di substrati organici sono state effettuate secondo i metodi standard APHA (*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*) (Baird et al., 2017). I campioni sono stati analizzati per calcolare il contenuto di solidi totali (TS) e di solidi volatili totali (TVS) tramite metodo gravimetrico, e per determinare la domanda chimica di ossigeno (COD) tramite metodo titrimetrico. Il metodo titrimetrico per la determinazione del COD ha previsto la digestione di un'aliquota nota di campione secco con bicromato di potassio in ambiente acido, e successiva titolazione con FAS (Ferro Ammonio Solfato).

Il biogas prodotto durante la fermentazione è stato stoccato in *bags* di raccolta da 10 L. Al raggiungimento di una quantità sufficiente di gas, le *bags* sono state collegate ad un analizzatore portatile per definirne la composizione. L'analizzatore (Biogas 5000, Geotech, Italia) ha consentito la determinazione della concentrazione di metano, di anidride carbonica e di ossigeno. L'analizzatore è equipaggiato con un sensore ad infrarossi per la quantificazione di metano e di anidride carbonica, e di una cella elettrochimica per la quantificazione dell'ossigeno.

I campioni di liquido di fermentazione prelevati durante il test sono stati analizzati per la determinazione del pH e della concentrazione e caratterizzazione dei VFA in esso disciolti. Prima di effettuare queste analisi i campioni sono stati centrifugati per 5 minuti a 4500 rpm e filtrati a 0,22 μm , così da separare e analizzare solo la frazione liquida del campione. Il pH è stato misurato con elettrodo HI1131 e pH-metro HI5521 (Hanna Instruments, Italia).

Per la determinazione dei VFA è stato utilizzato un cromatografo HPLC (high-performance liquid chromatography) Agilent SERIES 1100 dotato di una colonna per acidi organici Acclaim™ da 0,5 μm x 4 mm x

150 mm (Thermo Fischer) ed equipaggiato con un rivelatore DAD (diode array detector). Come standard è stata utilizzata la miscela di acidi volatili liberi CRM46975 (Sigma-Aldrich) contenente acido formico, acetico, propionico, n- e iso-butirrico, n- e iso-valerico, n- e iso-caproico, e n-eptanoico, ciascuno in concentrazione 10 mM. Come fase mobile è stata utilizzata una soluzione acquosa acidificata con acido metansolfonico 2,5mM (purezza $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich) e acetonitrile (purezza $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich), in rapporto 45/55. La colonna è stata mantenuta alla temperatura di 30°C e la lunghezza d'onda di rilevamento impostata a 210 nm. La concentrazione di VFA è stata calcolata utilizzando una curva di calibrazione in 4 punti da 1 a 10 mM, ottenuta diluendo la miscela standard di acidi volatili liberi (Sigma-Aldrich). La concentrazione di VFA è stata espressa in COD sulla base della loro completa conversione stechiometrica, utilizzando per il calcolo uno strumento di conversione online (OBA™_Online Biogas App, 2023).

Al termine dei test di fermentazione è stata determinata la concentrazione di ammoniaca dell'effluente secondo i metodi standard APHA, utilizzando un elettrodo ionoselettivo (HI4101, Hanna Instruments, Italia).

4.2. Photo Fermentation

4.2.1. Inoculi e terreni di crescita

Per i test di *Photo Fermentation* sono stati utilizzati due ceppi di batteri rossi non sulfurei (PNSB):

- *Rhodopseudomonas palustris* (Figura 11)

- *Rhodospirillum rubrum* (Figura 12)

forniti da BCCM (*Belgian Coordinated Collections of Microorganisms*, Gand, Belgio). Questi batteri sono stati scelti per la loro capacità di produrre idrogeno a rese elevate utilizzando substrati organici differenti.

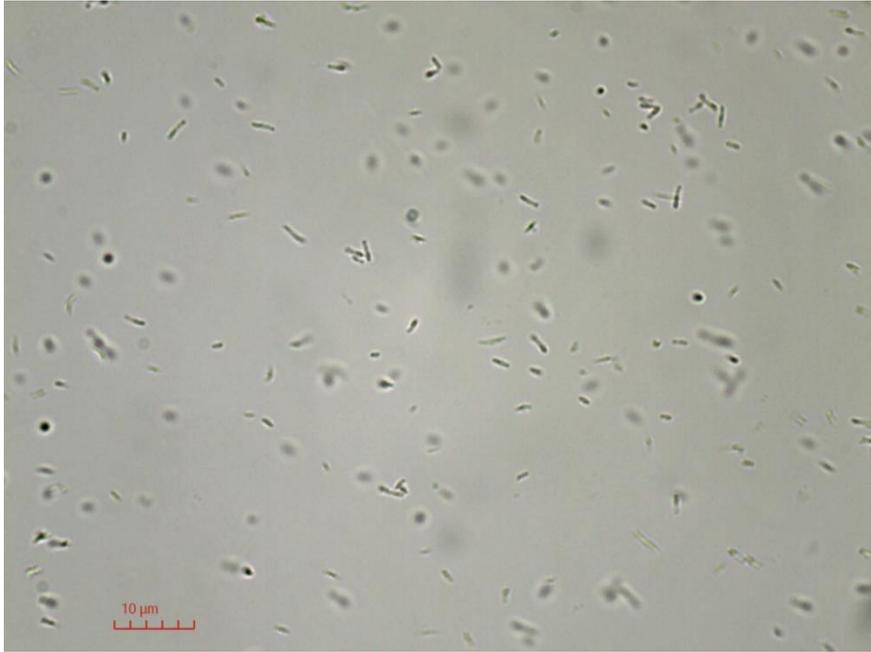


Figura 11, *Rps. palustris* ingrandito 100x al microscopio



Figura 12, *Rsp. rubrum* ingrandito 100x al microscopio

I PNSB utilizzati come inoculo sono stati mantenuti in condizioni axeniche sui terreni di crescita M80 ed RPN (Figura 13). Le concentrazioni dei due terreni sono riportate in Appendice. Il terreno M80 è stato utilizzato per il mantenimento della coltura, come indicato dalle linee guida del fornitore (BCCM), mentre il terreno RPN è stato utilizzato per produrre un inoculo sufficientemente concentrato per la predisposizione dei successivi test di *Photo Fermentation*.

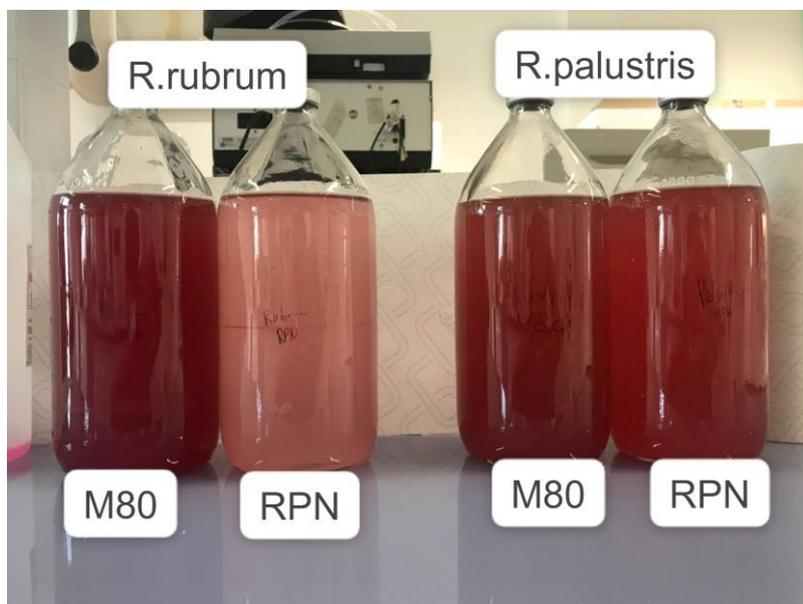


Figura 13, *Rps. palustris* e *Rsp. rubrum* sui due terreni di crescita e mantenimento (M80 e RPN)

Tabella 5, Composizione del terreno RPP utilizzato nei test di PF

	concentrazioni $g L^{-1}$		concentrazioni $mL L^{-1}$
Acido malico	4,0	Citrato ferrico ($1 g L^{-1}$)	5
Glutammato di sodio	0,4	Elementi in tracce*	1
K_2HPO_4	0,5	Vitamine**	1
KH_2PO_4	0,3		
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,4		
NaCl	0,4		
$CaCl \times 2H_2O$	0,075		

* H_3BO_3 ($0,3 g L^{-1}$), $MnCl_2 \times 4H_2O$ ($0,03 g L^{-1}$), $ZnSO_4 \times 7H_2O$ ($0,1 g L^{-1}$), $Na_2MoO_4 \times 2H_2O$ ($0,3 g L^{-1}$), $CuCl_2 \times 2H_2O$ ($0,01 g L^{-1}$), $NiCl_2 \times 6H_2O$ ($0,02 g L^{-1}$), $CoCl_2 \times 6H_2O$ ($0,02 g L^{-1}$)

**Biotina ($0,3 g L^{-1}$), Niacina ($0,03 g L^{-1}$), Tiamina dicloruro ($0,1 g L^{-1}$), Acido p-aminobenzoico ($0,3 g L^{-1}$), Piridossolio idrocloreuro ($0,01 g L^{-1}$), Vitamina B12 ($0,02 g L^{-1}$), Vitamina B5 ($0,02 g L^{-1}$)

I test di fotofermentazione sono stati condotti al fine di confrontare le rese di crescita della biomassa, di produzione di idrogeno e di consumo del substrato organico da parte dei due ceppi di batteri rossi. I test sono stati effettuati utilizzando due terreni di crescita: il terreno sintetico (RPP, Tabella 5), preparato con 4,0 g L⁻¹ di acido malico (Bianchi et al., 2010) e un terreno (FERM) preparato a partire dall'effluente di fermentazione. La modalità di preparazione del terreno RPP è riportata in Appendice.

Per la preparazione del terreno FERM è stato utilizzato il fermentato ottenuto nel test di *Dark Fermentation* a OL 10 kg_{TVS} m⁻³, selezionato sulla base del contenuto di ammoniaca e della concentrazione di VFA presenti. Il fermentato è stato prima portato a pH 6,8 dosando NaOH 6 N, poi centrifugato (9000 rpm per 5 min) e filtrato a 0,22 µm. Infine è stato diluito 1:5 con mezzo RPP, in modo tale da ottenere un mezzo con una concentrazione di composti organici paragonabile a quella del mezzo RPP, senza alterare eccessivamente la concentrazione degli altri nutrienti e micronutrienti, e abbassando la concentrazione di ammoniaca del mezzo, che altrimenti porterebbe all'inibizione della nitrogenasi (Keskin et al., 2011). In Tabella 6 sono riportate le concentrazioni di acidi grassi volatili del terreno FERM, in confronto con la concentrazione del terreno RPP.

Tabella 6, Concentrazioni di VFA nel terreno FERM e di acido malico nel terreno RPP

Composto organico	FERM	RPP	FERM	RPP
	g L ⁻¹	g L ⁻¹	g _{COD} L ⁻¹	g _{COD} L ⁻¹
Acido malico	-	4,00	-	2,86
Acido Formico	-	-	-	-
Acido Acetico	1,02	-	1,09	-
Acido Propionico	0,46	-	0,69	-
Acido n- iso-butirrico	0,31	-	0,56	-
Acido n- iso-valerico	0,37	-	0,75	-
Acido n- iso-caproico	0,94	-	2,08	-
Acido n-eptanoico	0,23	-	0,54	-
VFA _{tot} (C1–C5) ^a	2,16	4,00	3,10	2,86

^a per la somma degli acidi grassi volatili presenti nel mezzo di crescita, come da indicazioni di progetto *Purple-B*, sono stati considerati solo i VFA fino a 5 atomi di carbonio

4.2.2. Piano Sperimentale

I test di PF sono stati condotti in *batch* utilizzando otto bottiglie da 250 mL di tipo *serum bottle* (Figura 14). Ogni bottiglia è stata riempita con 200 mL di terreno di crescita (RPP o FERM), in modo da mantenere lo spazio di testa libero per la produzione di gas (H₂ e CO₂). Successivamente è stato aggiunto l'inoculo di *Rsp. rubrum* o *Rps. palustris*, alla concentrazione di $0,020 \pm 0,003 \text{ g}_{\text{PNSB}} \text{ L}^{-1}$. Ogni condizione (*Rps. palustris* RPP, *Rps. palustris* FERM, *Rsp. rubrum* RPP, *Rsp. rubrum* FERM) è stata preparata in duplicato. Le bottiglie sono state chiuse con tappi in gomma e sigillati con capsule a crimpare in alluminio, poi ogni bottiglia è stata flussata con argon (Ar) per rimuovere l'O₂ e l'N₂ dallo spazio di testa. L'argon è stato preferito all'azoto per il mantenimento delle condizioni di anaerobiosi dello spazio di testa in quanto la presenza di N₂ riduce le rese di produzione di H₂ da parte della nitrogenasi batterica (Eroglu & Melis, 2011; Keskin et al., 2011). Le bottiglie sono state incubate a 30 °C, in condizioni di illuminazione costante a 3000 Lux con lampada ad incandescenza. Il test è durato 25 giorni, i campionamenti venivano effettuati ogni 2-3 giorni e prevedevano l'analisi quantitativa del gas prodotto e l'analisi sulla concentrazione della biomassa.

Le otto bottiglie erano così suddivise:

- 2 bottiglie con: *Rhodopseudomonas palustris* su terreno FERM
- 2 bottiglie con: *Rhodospirillum rubrum* su terreno FERM
- 2 bottiglie con: *Rhodopseudomonas palustris* su terreno RPP
- 2 bottiglie con: *Rhodospirillum rubrum* su terreno RPP

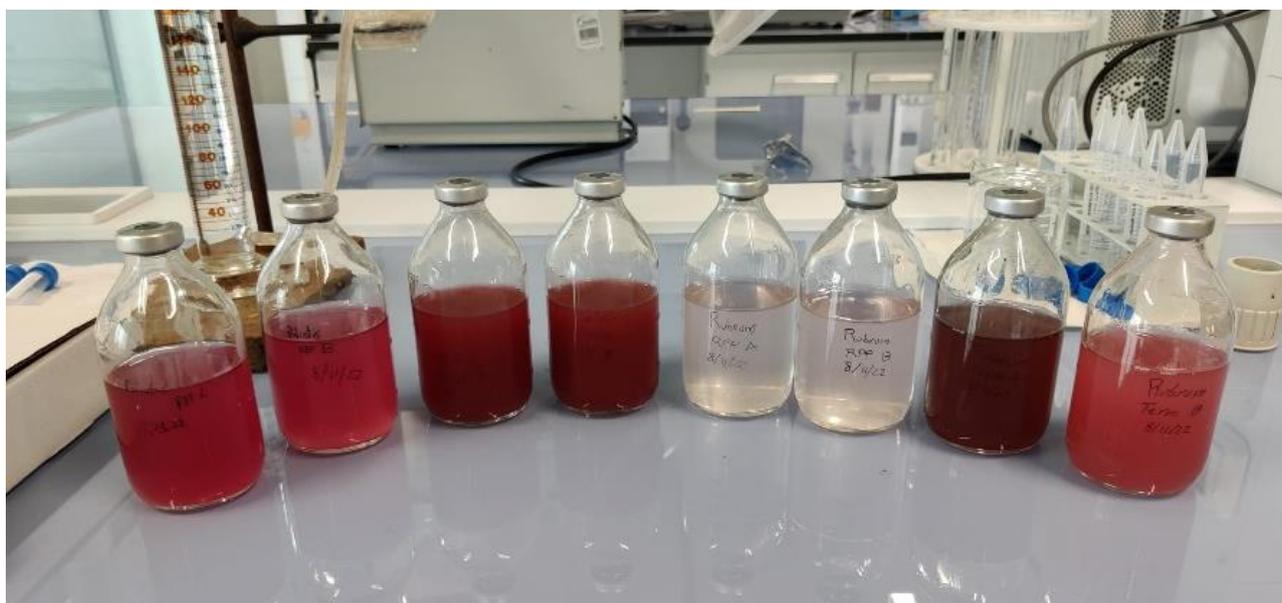


Figura 14, Le otto bottiglie utilizzate nei test di PF

4.2.3. Metodi Analitici

L'intensità luminosa è stata misurata utilizzando un luxmetro (LX1330B, Dr. Meter, USA).

La concentrazione della biomassa dei PNSB è stata determinata mediante densità ottica a 660 nm, come indicato da Yu et al. (2021) utilizzando uno spettrofotometro UV-VIS (Spectrosmart Basic, Zetalab, Italia). Per convertire i valori di densità ottica in valori di concentrazione sono state utilizzate quattro curve di calibrazione (una per *Rsp. rubrum* su RPP, una per *Rsp. rubrum* su FERM, una per *Rps. palustris* su RPP ed una su *Rps. palustris* su FERM) da 3 a 200 mg_{PNSB} L⁻¹.

I valori di concentrazione della biomassa sono stati utilizzati per calcolare il tasso di crescita (μ_{max} , d⁻¹) e la produttività massima di biomassa (P_{max} , g L⁻¹ d⁻¹), secondo le Equazioni 1 e 2:

$$\mu_{max} = \frac{\ln(X_i) - \ln(X_{i-1})}{(t_i - t_{i-1})} \quad \text{Equazione 1}$$

$$P_{max} = \frac{X_i - X_{i-1}}{(t_i - t_{i-1})} \quad \text{Equazione 2}$$

Dove X_i e X_{i-1} sono i valori di concentrazione di biomassa dei PNSB al tempo t_i e t_{i-1} .

Le concentrazioni di VFA e di acido malico nel mezzo di crescita sono state determinate utilizzando un cromatografo HPLC, con lo stesso metodo visto precedentemente (Paragrafo 4.1.4).

5. Risultati e discussione

5.1. Test di Dark Fermentation

In questo capitolo si fa riferimento alle differenti condizioni di carico organico adottate nei test di fermentazione con le etichette OL 5, OL 10, OL 15, OL 20 e OL 25. Questi valori sono indicativi del carico organico fornito dal solo substrato (MIX) utilizzato per alimentare i microorganismi nei diversi test di *Dark Fermentation*. Nella fase di analisi dei dati sono stati però considerati anche gli apporti di sostanza organica forniti dal fango utilizzato come inoculo, in quanto esso ha anche ruolo di co-substrato. In Tabella 7 sono rappresentati i carichi organici “reali” e quelli relativi al solo substrato.

Tabella 7, Carichi organici riferiti al solo substrato e reali

	OL _{MIX}	OL _{MIX+FANGO}
	Kg _{TVS} m ⁻³	Kg _{TVS} m ⁻³
Controllo	-	19,38
OL 5	4,41	22,67
OL 10	9,46	27,33
OL 15	14,52	29,96
OL 20	19,36	33,49
OL 25	24,24	37,05

5.1.1. Analisi del pH

Durante i test di DF il pH è stato monitorato periodicamente (Figura 15) al fine di valutare lo stato di avanzamento della fermentazione. Il monitoraggio del pH, unitamente alla verifica della quantità e composizione del biogas prodotto, ha permesso di valutare l'eventuale interruzione dei test nel caso in cui si fossero instaurate condizioni favorevoli all'inizio della fase di metanogenesi (innalzamento del pH oltre 6) che avrebbero portato al consumo dei VFA prodotti durante la fermentazione.

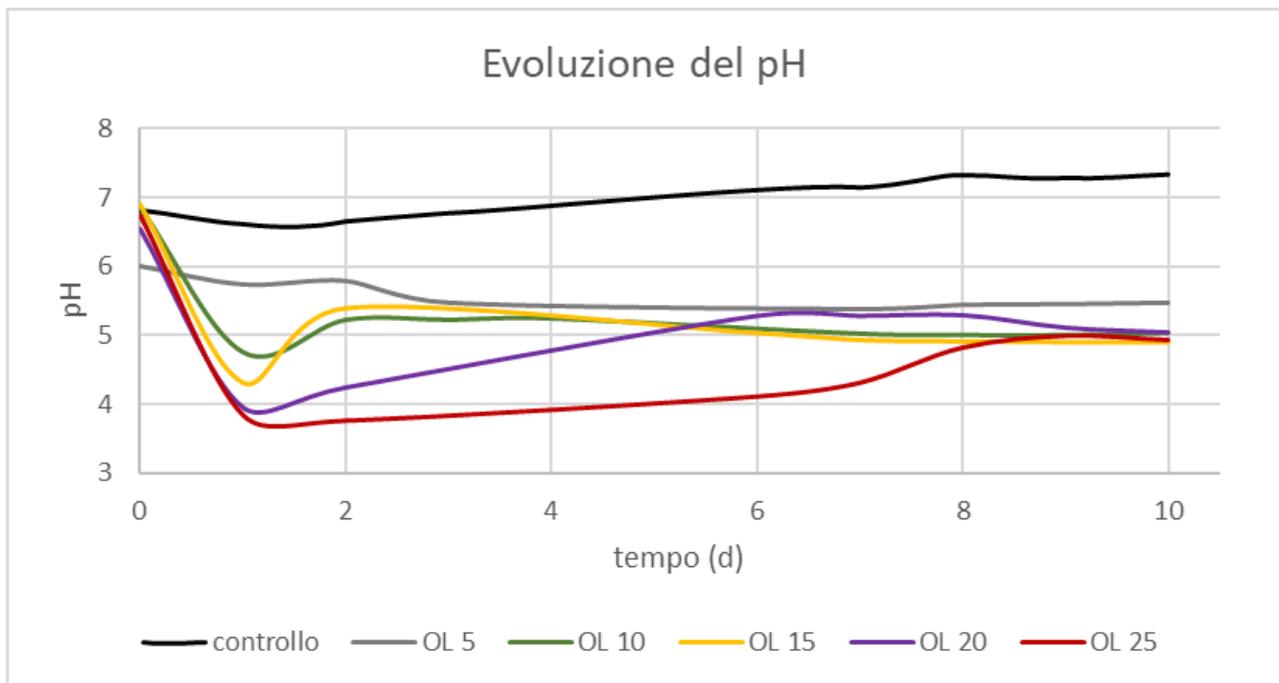
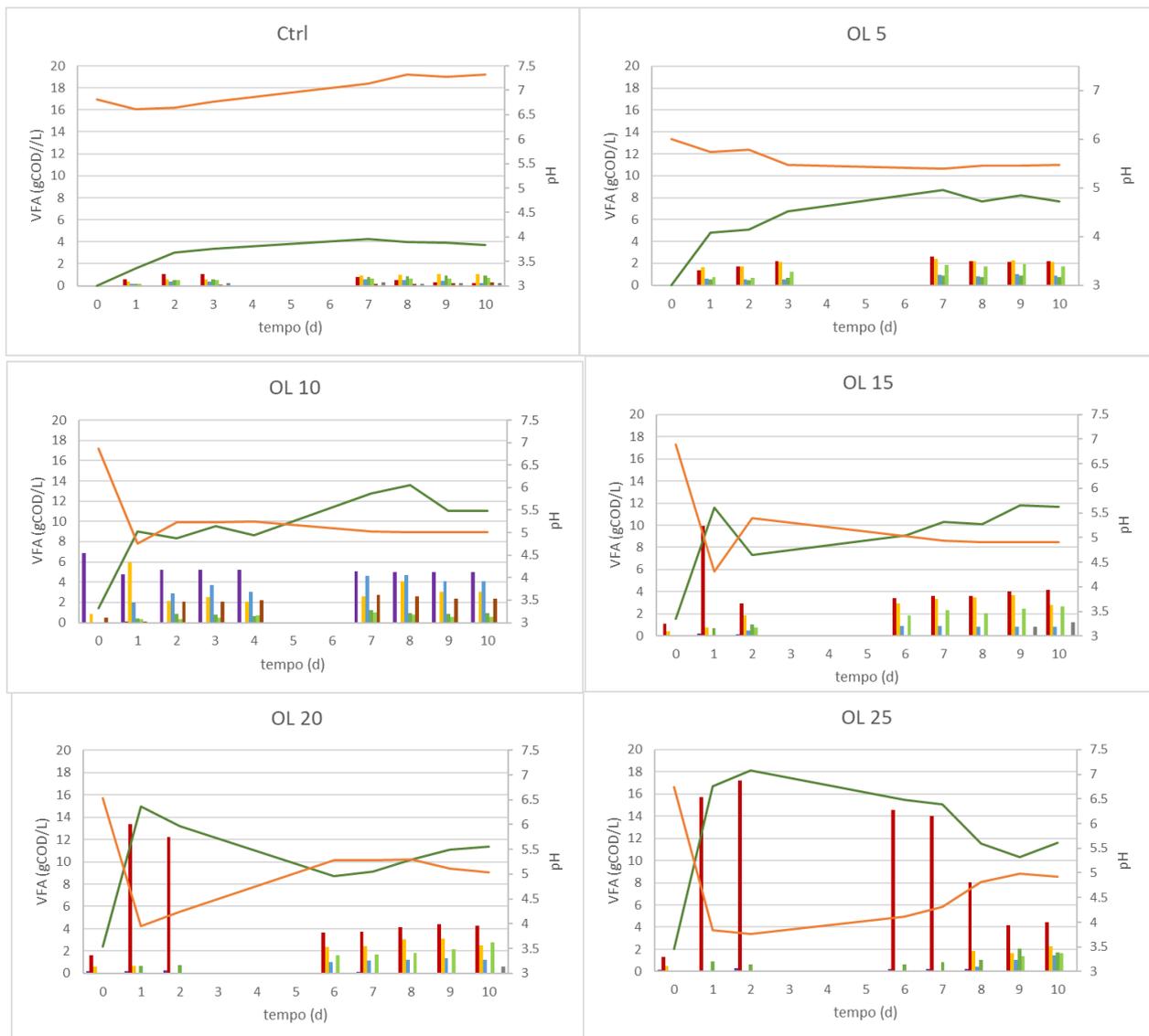


Figura 15, Andamento del pH durante i test di DF ai diversi carichi organici

Dal grafico in Figura 15 si può notare come il pH della condizione di controllo, ovvero quella caratterizzata dall'assenza di substrato (MIX), rimanga sempre a valori piuttosto elevati (in un range tra 6,5 e 7,5), a testimonianza delle quantità ridotta di VFA prodotti dalla fermentazione del solo fango. A OL 5 il pH tende ad abbassarsi, senza però scendere mai a valori inferiori a 5. In questa condizione vi è produzione di VFA, ma non in quantità sufficiente a consumare la capacità tampone del fango. Un abbassamento più marcato del pH si può notare a carichi organici maggiori (10, 15, 20 e 25) dove nelle prime 24 ore si riscontra una diminuzione sostanziale del pH a valori inferiori a 4,5 per l'OL 10 e inferiori a 4 per gli OL 15, 20 e 25. In queste condizioni la sostanza organica fornita al sistema è presente in quantità sufficiente da non costituire substrato limitante, permettendo cinetiche di degradazione del substrato più elevate rispetto ai carichi organici più bassi. La presenza di substrato non limitante permette una rapida conversione della sostanza organica presente a VFA che portano all'abbassamento repentino di pH, come osservabile in Figura 15. Con il progredire della fermentazione il pH in tutte le condizioni tende ad innalzarsi e stabilizzarsi su valori prossimi al 5, ottimali per la fase fermentativa (Micolucci et al., 2020).

5.1.2. Analisi dei VFA

In questo studio, i test di *Dark Fermentation* hanno avuto lo scopo di individuare le condizioni ottimali alla produzione di grandi quantità di VFA da utilizzare come substrato per la successiva fase di *Photo Fermentation*. Per i test di DF è stata impostata una durata di dieci giorni, in quanto si è visto che la produzione di VFA avveniva già nei primi giorni dall'inizio della fermentazione. In Figura 16 è mostrato l'andamento del pH in rapporto alla produzione di VFA alle diverse condizioni, nonché le quantità dei singoli VFA presi in esame.



■ Formico ■ Acetico ■ Prop. ■ n, iso-But
■ Iso-Valer ■ n-Valer ■ iso-Esan ■ n-Esan
■ n-Eptan — VFA TOT — pH

Figura 16, Profilo di produzione e caratterizzazione dei singoli VFA in rapporto all'andamento del pH

Come si evince dalla Figura 16 vi è una stretta correlazione tra la produzione ed il contenuto di VFA nel fermentatore ed il pH. Come già accennato, l'utilizzo di carichi organici superiori a 15 ha portato al crollo del pH sotto il 4,5 durante le prime 24 ore. Questo è dovuto principalmente alla elevata concentrazione di acido acetico. Parte dell'acido acetico individuato potrebbe però essere dovuto ad un errore di analisi in quanto, con il metodo utilizzato, l'acido lattico esce al cromatografo allo stesso tempo dell'acido acetico. Questa ipotesi è rafforzata dal fatto che, come indicato da Itoh et al. (2012), la fermentazione anaerobica ad elevati OL e senza controllo del pH può portare a un repentino abbassamento del pH stesso, fino a valori inferiori a 4, con presenza di acido lattico come specie dominante. Ciò è dovuto al fatto che i microorganismi che catalizzano la sintesi di questo prodotto, i lattobacilli, sono in grado di operare a pH estremamente bassi. In

queste condizioni essi diventano dominanti nella fase acidogenica della fermentazione, producendo principalmente acido lattico oltre ad etanolo, acido acetico e CO₂ (Villanueva-Galindo et al., 2023).

Oltre alla concentrazione di VFA del liquido di fermentazione, un altro parametro fondamentale per valutare lo stato di avanzamento del processo è la resa di acidificazione. La resa di acidificazione è definita come la quantità di acidi grassi volatili prodotti durante la fermentazione in rapporto alla quantità di sostanza organica alimentata nel sistema (espressa come TVS o come COD). Questo parametro permette di valutare sotto quale condizione di carico organico è più conveniente operare al fine di ottenere la miglior resa di produzione di VFA. In questo studio le rese di acidificazione sono state calcolate considerando il contenuto di sostanza organica, espressa in TVS o in COD, presente sia nel substrato (MIX) che nel fango utilizzato come inoculo.

In Tabella 8 è riportata la concentrazione di VFA e le rese di acidificazione a fine test, mentre in Figura 17 è riportato l'andamento delle rese di acidificazione per i diversi OL lungo tutta la durata dei test.

Tabella 8, Concentrazioni finali di VFA e rese di acidificazione finali dei test di DF

Alimentazione	Concentrazione di VFA		Resa di acidificazione	
	$g_{TVS}^a L^{-1}$	$g_{VFA(COD)} L^{-1}$	$g_{VFA(COD)} g_{TVS}^{a-1}$	$g_{VFA(COD)} g_{COD}^{a-1}$
OL 5	22,7	7,66	0,34	0,25
OL 10	27,4	11,05	0,40	0,30
OL 15	30	11,63	0,39	0,27
OL 20	33,5	11,36	0,34	0,23
OL 25	37	11,58	0,31	0,21

^a contenuto organico complessivo di MIX e fango, espresso in TVS o COD

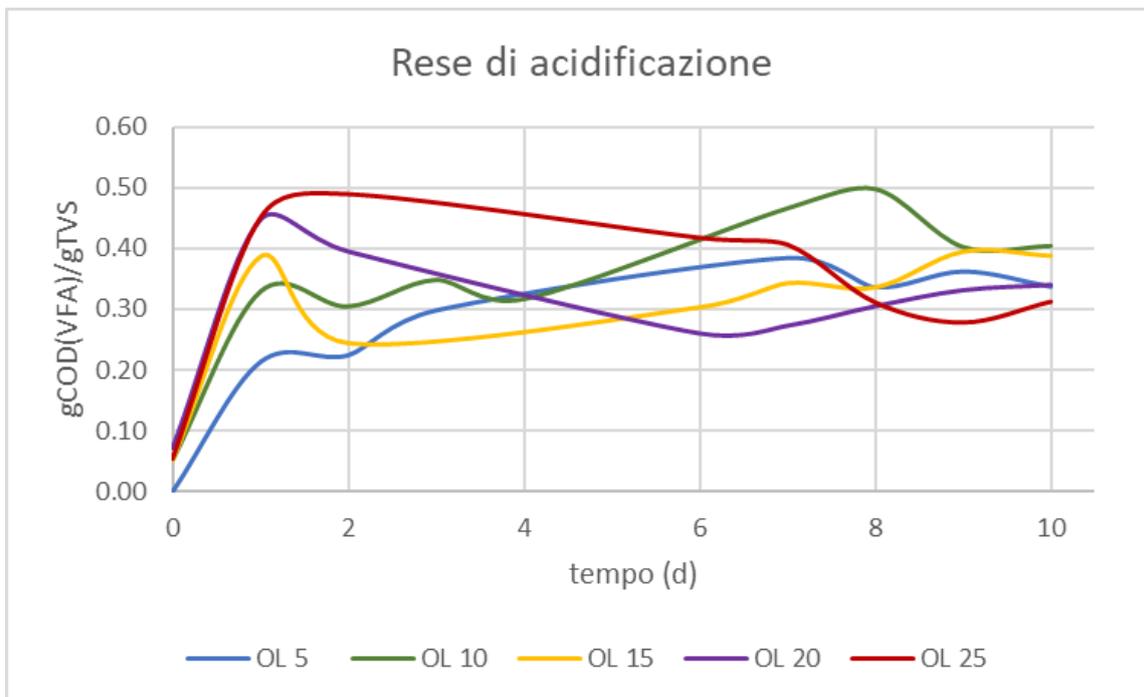


Figura 17, Andamento delle rese di acidificazione per i differenti OL

Le condizioni che hanno fornito risultati migliori a fine test sono OL 10 e OL 15, rispettivamente con una resa di 0,40 e 0,39 $\text{g}_{\text{VFA}} \text{g}_{\text{TVS}}^{-1}$. Da notare che la condizione di massimo carico organico (OL 25) mostra anche le minori rese di acidificazione a fine test. Ciò potrebbe essere dovuto a uno sfruttamento non ottimale del substrato da parte dei microorganismi coinvolti nella fermentazione, a causa dell'eccessiva diminuzione di pH verificatasi nei primi giorni di sperimentazione. In Figura 18 sono riportate le attività specifiche giornaliere di acidificazione relative alle differenti condizioni. Questo parametro, riportato come $\text{g}_{\text{VFA}} \text{g}_{\text{TVS}}^{-1} \text{d}^{-1}$, esprime la produttività giornaliera di VFA in rapporto alla sostanza organica alimentata.

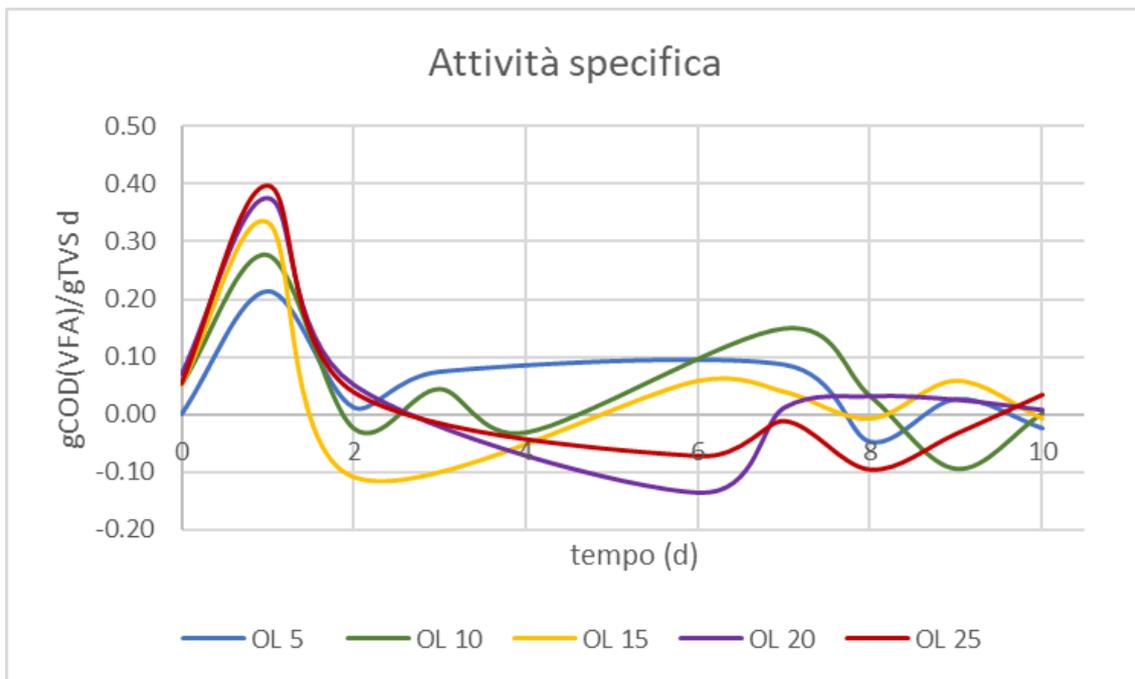


Figura 18, Attività specifica di acidificazione riscontrata alle diverse condizioni di OL

Dall'immagine in Figura 18 si può notare come la produttività giornaliera raggiunga in tutte le condizioni il suo massimo dopo 24 ore dall'inizio della fermentazione. Inoltre, la produttività delle prime 24 ore presenta valori tanto maggiori quanto maggiore è l'OL applicato. Ciò spiega la rapida caduta di pH per i carichi organici superiori a $10 \text{ kg}_{\text{TVS}} \text{ m}^{-3}$. Le curve dell'attività presentano andamenti differenti a seconda dell'OL, ma tendono tutte a uniformarsi su valori prossimi allo zero a fine test, indicando il raggiungimento della stabilità nella produzione di VFA.

5.1.3. Analisi del gas prodotto

Il gas prodotto nelle varie condizioni di fermentazione è stato monitorato costantemente e raccolto automaticamente in *bags* da 10 L. Al raggiungimento di un volume sufficiente il gas è stato analizzato per definirne la composizione. In Figura 19 è riportata la produzione cumulativa di gas ai differenti OL.

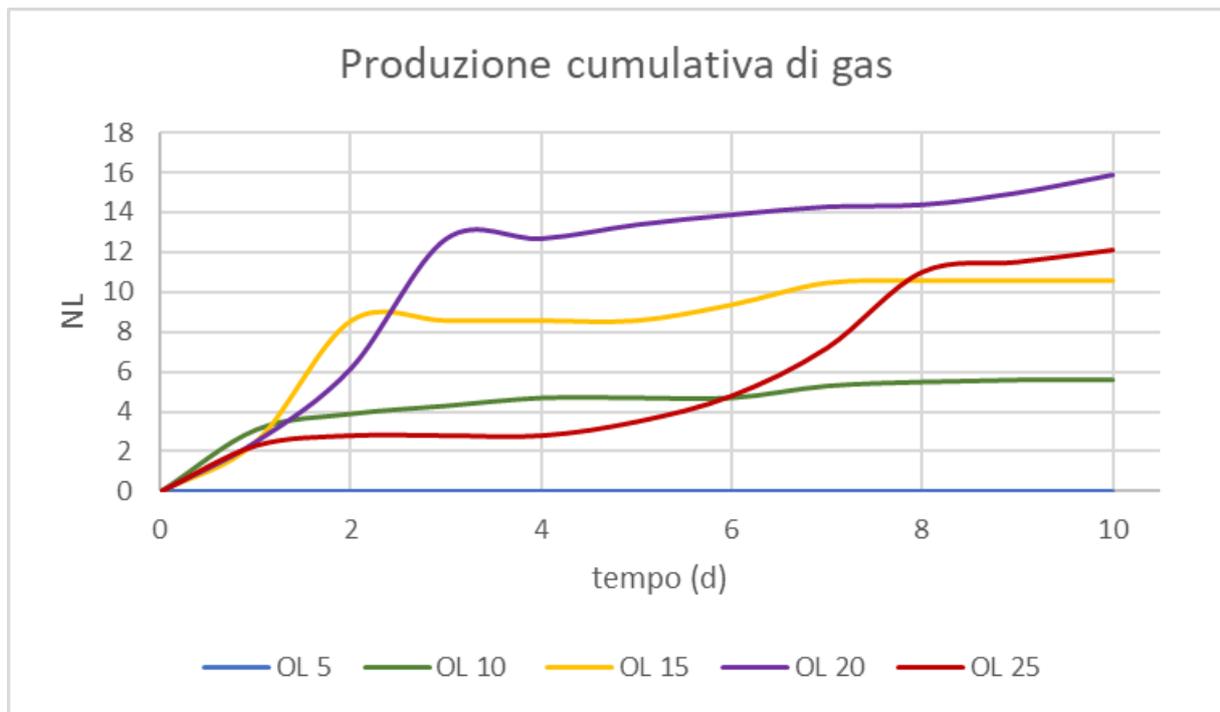


Figura 19, Produzione cumulativa di gas per i diversi OL, espressa in NL

Dal grafico in Figura 19 si nota che OL 5 non ha prodotto gas per tutta la durata del test, mentre la condizione che ha prodotto la maggior quantità di gas è stata OL 20 con 15,9 NL, di cui l'80 % nei primi tre giorni. La condizione a OL 15 e OL 25 hanno prodotto quantità simili, rispettivamente 10,6 e 12,1 NL, ma con andamenti differenti. Mentre la condizione a OL 10 ha prodotto complessivamente 5,6 NL di cui il 70 % nei primi due giorni di sperimentazione. È possibile notare come la produzione di gas sia legata all'andamento del pH (Figura 15): nelle condizioni a carico organico elevato (OL 15, 20 e 25), il picco di produzione di gas avviene sempre appena il pH sale a valori superiori a 4.

Al fine di ottenere la resa di produzione del gas, la produzione cumulativa è stata rapportata alla quantità di sostanza organica (TVS) alimentata nelle differenti condizioni ($NL \text{ kg}_{\text{TVS}}^{-1}$). Analogamente a quanto fatto per la resa di acidificazione, i TVS sono stati calcolati considerando anche l'apporto del fango utilizzato come inoculo. L'andamento ed i valori finali della produzione specifica di gas sono riportati in Figura 20 e in Tabella 9.

Tabella 9, valori di produzione cumulativa e specifica di fine test per i differenti OL

	Produzione cumulativa	Produzione specifica
	NL	NL kg _{TVS} ⁻¹
OL 5	0	0
OL 10	5,6	51,1
OL 15	10,6	88,3
OL 20	15,9	118,7
OL 25	12,1	81,8

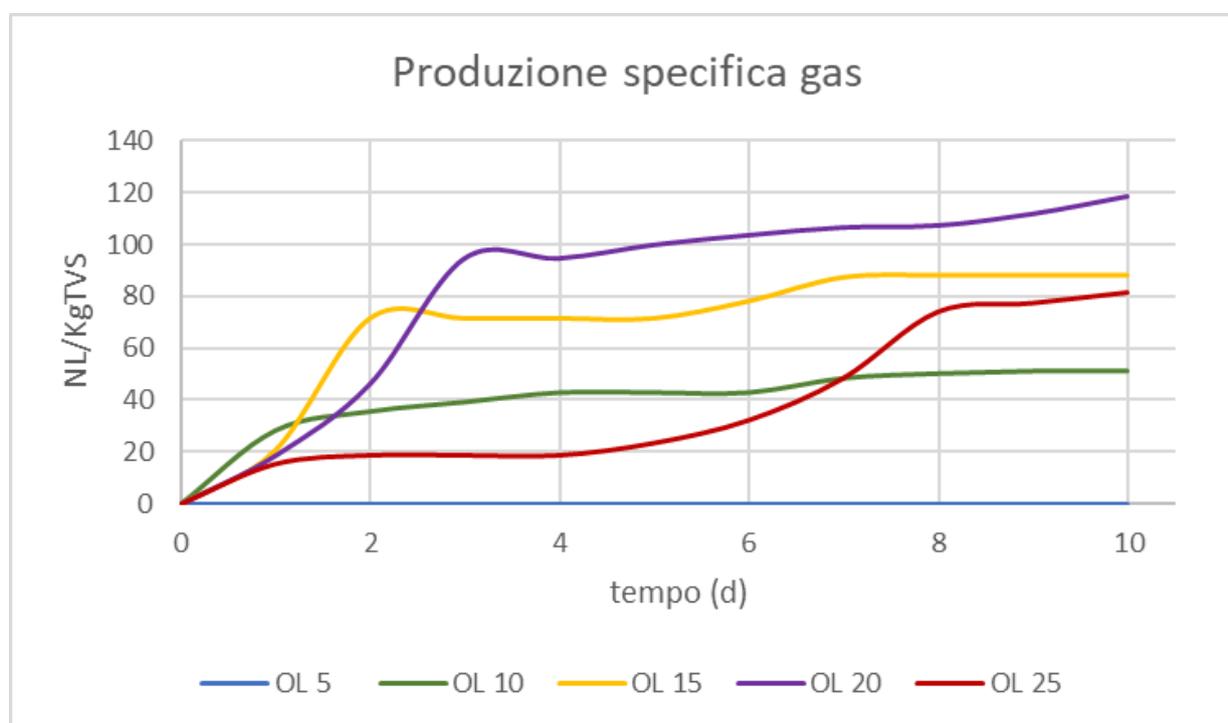


Figura 20, Produzione specifica di gas alle differenti condizioni testate, calcolata considerando il totale dei TVS presenti in inoculo e substrato

Si può notare che la condizione che presenta la più elevata produzione specifica è OL 20 con 118,7 NL kg_{TVS}⁻¹, seguita da OL 15 con 88,3 NL kg_{TVS}⁻¹. La condizione a OL 10 presenta la minor produzione specifica, pari a 51,1 NL kg_{TVS}⁻¹. Inoltre, dalla Figura 21, che esprime l'andamento dell'attività specifica di gas (NL kg_{TVS}⁻¹ d⁻¹), risulta che la maggior parte del gas (dal 70 all'80 %) è stato prodotto entro le prime 48-72 ore per gli OL 10, 15 e 20; mentre OL 25 ha prodotto il 60 % del volume totale durante gli ultimi quattro giorni, quando il pH è risalito su valori superiori a 4 (Figura 15).

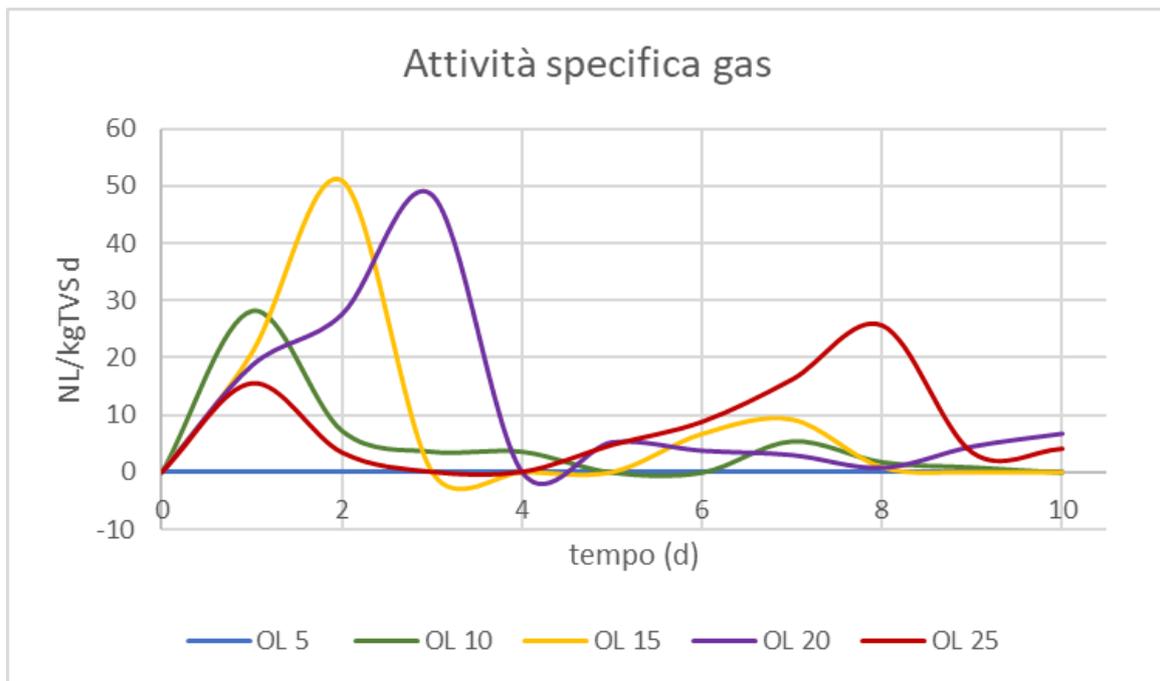


Figura 21, Attività specifica giornaliera dei diversi OL

In Tabella 10 è riportata la composizione del gas prodotto. L'analizzatore a disposizione nella sede della sperimentazione non ha però permesso la quantificazione dell'idrogeno presente nel biogas. Il gas analizzato, tuttavia, è risultato essere composto da quantità rilevanti di altri composti (tra il 16 e il 51 % del totale), indicando la possibile presenza di idrogeno nella miscela di gas, oltre che di azoto (utilizzato per flussare lo spazio di testa a inizio test). In tutte le condizioni il gas prodotto è risultato essere composto prevalentemente da CO₂. A OL 10 è stata riscontrata anche una discreta percentuale di metano (8,3 %), mentre nelle condizioni a carico superiore la percentuale non è mai salita sopra al 3 %.

Questo conferma che la fermentazione è avvenuta senza uno sviluppo consistente da parte della comunità di microrganismi metanogeni, la cui crescita è risultata inibita dai bassi valori di pH e dal breve tempo della sperimentazione.

Tabella 10, Composizione del gas prodotto al giorno 2 e 10 (fine test), dalle differenti condizioni

	CH ₄ (%)		CO ₂ (%)		Altro (%)	
	Giorno 2	Giorno 10	Giorno 2	Giorno 10	Giorno 2	Giorno 10
OL 5	-	-	-	-	-	-
OL 10	4,0	8,3	45,0	64,7	51,0	27,0
OL 15	1,5	3,1	66,2	77,8	32,3	19,2
OL 20	0,6	7,0	67,6	76,5	31,8	16,5
OL 25	0,8	1,2	53,7	81,3	31,8	17,5

5.1.4. Caratteristiche degli effluenti della DF

Le caratteristiche finali degli effluenti della DF, riportate in Tabella 11, sono state prese in considerazione per definire quale fosse il miglior substrato da utilizzare per alimentare i PNSB nella fase di PF.

Tabella 11, Caratteristiche degli effluenti dei test di DF

		OL 5	OL 10	OL 15	OL 20	OL 25
pH		5,48	5,04	4,90	5,04	4,93
Concentrazione finale di ammoniaca	mgN-NH ₄ ⁺ L ⁻¹	700,9	252,9	107,2	136,1	259,7
Concentrazione finale di VFA	g _{COD} L ⁻¹	7,66	11,05	11,63	11,36	11,58
Concentrazione massima di VFA		8,72	13,60	11,83	14,95	18,14
Resa di acidificazione	g _{VFA(COD)} g _{COD} ⁻¹	0,25	0,30	0,27	0,23	0,21
Concentrazione finale di Ac. acetico		27,8	26,6	35,2	39,3	49,7
Concentrazione finale di Ac. propionico	%	28,0	36,1	29,6	26,5	17,2
Concentrazione finale di Ac. butirrico		11,4	8,4	7,5	11,7	8,8
Concentrazione finale di Ac. valerico		32,8	27,7	21,5	20,6	23,4

I fermentati ottenuti a OL 10, 15 e 20 risultano essere i più idonei alla preparazione del terreno FERM per il test di *Photo Fermentation*, in quanto caratterizzati da un'elevata concentrazione di VFA (11,05, 11,63 e 11,36 g_{VFA(COD)} L⁻¹, rispettivamente per OL 10, 15 e 20) e da una concentrazione di ammoniaca relativamente bassa (252,9, 107,2 e 136,1 mg_{N-NH4+} L⁻¹). Tra questi si è deciso di utilizzare il fermentato ricavato a OL 10, in quanto presenta una concentrazione analoga di VFA, ma è caratterizzato dalla migliore resa di acidificazione

(0,30 $g_{VFA(COD)} g_{COD}^{-1}$ per l'OL 10, rispetto ai 0,27 e 0,23 $g_{VFA(COD)} g_{COD}^{-1}$ dell'OL 15 e 20), segno che a tali condizioni vi è la migliore conversione del substrato organico in VFA (fondamentale nell'ottica di minimizzare l'utilizzo di materie prime prevista dall'economia circolare).

5.2. Test di Photo Fermentation

I test di PF sono stati condotti utilizzando due terreni differenti: RPP e FERM. Il terreno RPP è un mezzo di crescita standard, ed è stato preparato come controllo per verificare le rese di crescita e di produzione di idrogeno della coltura di PNSB. Il terreno FERM, invece, è stato preparato a partire dall'effluente di fermentazione ottenuto a OL 10, come descritto al Paragrafo 4.2.1. La scelta su quale effluente utilizzare è stata fatta basandosi sul contenuto di VFA e di ammoniaca presenti, oltre che sulla resa di acidificazione. Il terreno FERM è stato preparato diluendo 1:5 il fermentato ottenuto a OL 10, così da ridurre il contenuto di ammoniaca e limitare l'inibizione della nitrogenasi. Il fattore di diluizione è stato scelto in maniera tale da ottenere un terreno caratterizzato da una concentrazione di composti organici simile a quella presente nel terreno standard RPP.

5.2.1. Analisi del gas (H_2 , CO_2)

In Figura 22 è rappresentata la produzione cumulativa di gas da parte delle due specie di PNSB utilizzate (*Rps. palustris* e *Rsp. rubrum*) sui due substrati selezionati in questo studio (RPP e FERM).

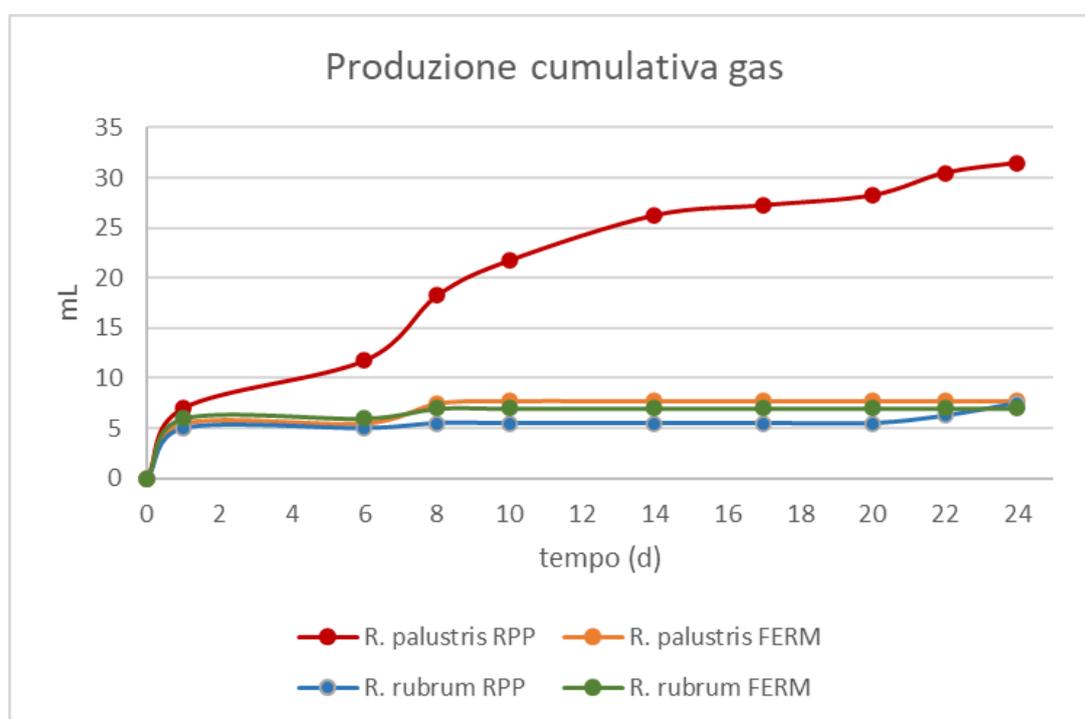


Figura 22, Produzione cumulativa di gas (H_2 , CO_2) da parte di *Rps. palustris* e *Rsp. rubrum* su differenti substrati (RPP e FERM)

La Figura 22 e la Tabella 12 (che esprime la produzione finale di gas) mostrano che solo *Rps. palustris* su terreno RPP presenta una produzione continua e apprezzabile (31,5 mL) di gas. Tutte le altre condizioni testate (*Rsp. rubrum* su RPP, ed entrambi i ceppi su FERM) non hanno invece portato ad una produzione

significativa di gas. Le quantità ridotte di gas prodotto in tutte le condizioni, inoltre, non ne hanno permesso un'analisi qualitativa per definire la composizione in H₂ e in CO₂.

La ridotta quantità di gas ottenuta in tutte le condizioni testate (soprattutto, nella condizione di controllo su mezzo RPP) indica che le condizioni operative adottate non erano favorevoli alla produzione di idrogeno. Questo può essere probabilmente ricondotto alla ridotta illuminazione applicata (3000 lux) e all'utilizzo di bottiglie piuttosto ampie come fotobioreattori, invece di cilindri stretti e alti. Questo ha ridotto l'area superficiale effettivamente illuminata, e potrebbe quindi aver portato ad una riduzione dell'efficienza di conversione della luce da parte dei microrganismi.

Tabella 12, Produzione cumulativa di gas a fine test

PNSB	Medium	Produzione totale di gas
		<i>mL</i>
<i>Rps. palustris</i>	RPP	31,5
<i>Rps. palustris</i>	Fermentato	7,75
<i>Rsp. rubrum</i>	RPP	7,5
<i>Rsp. rubrum</i>	Fermentato	7

5.2.2. Analisi della crescita di biomassa

L'analisi della produzione di gas è stata accoppiata all'analisi sulla crescita della biomassa al fine di valutare se vi fosse una correlazione tra la concentrazione dei microrganismi e il consumo del substrato organico.

In Figura 23 è riportato l'andamento della concentrazione di biomassa delle varie condizioni testate. I test su terreno FERM hanno evidenziato in entrambe le specie di PNSB testate un incremento nella proliferazione cellulare (1,08 e 1,04 g_{PNSB} L⁻¹, rispettivamente per *Rps. palustris* e *Rsp. rubrum*) rispetto al test sul terreno di controllo RPP (0,54 e 0,13 g_{PNSB} L⁻¹). La presenza di una fonte di carbonio eterogenea, come quella presente nel terreno FERM, sembra quindi aver incentivato la crescita cellulare. Questa evidenza è confermata dai valori di tasso di crescita e di produttività massima ottenuti, entrambi superiori nei test su terreno FERM rispetto che RPP.

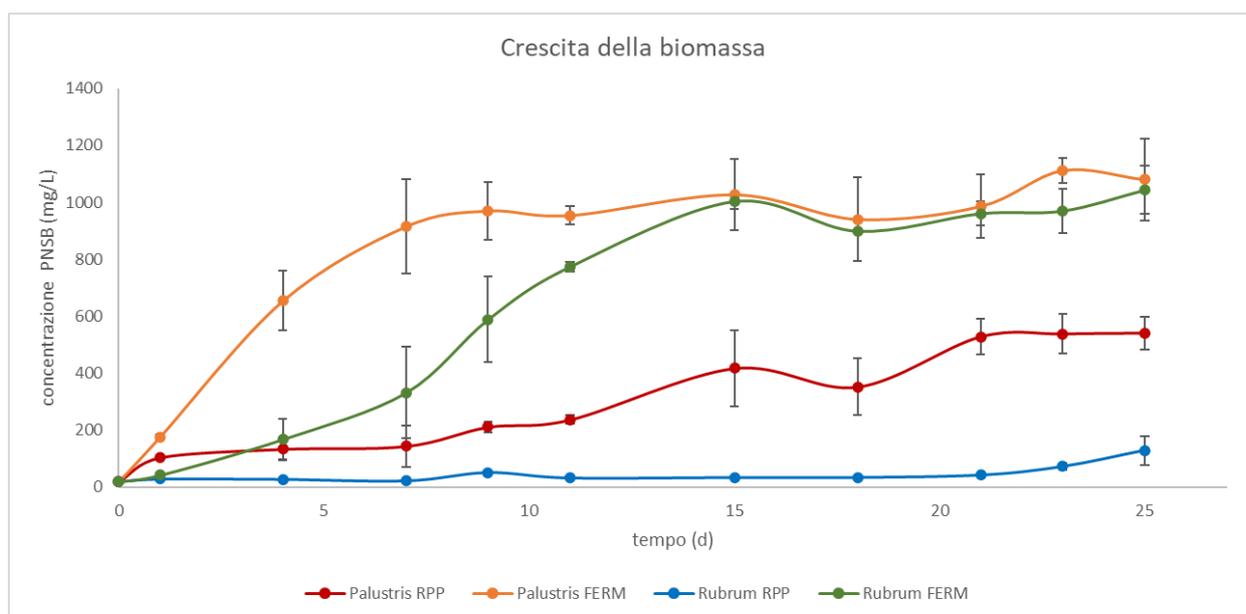


Figura 23, Curve di crescita di *Rps. palustris* e *Rsp. rubrum* su RPP e FERM.

In Tabella 13 sono riportati i valori di crescita, produttività e concentrazione finale di biomassa dei test di PF. *Rsp. rubrum* cresciuto su RPP ha raggiunto la concentrazione massima di $129,1 \text{ mg L}^{-1}$ con una produttività massima di $28,09 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, valore ottenuto negli ultimi due giorni di test. Cinetiche maggiori sono state riscontrate su *Rps. palustris* cresciuto su RPP che ha raggiunto la concentrazione finale di $541,7 \text{ mg L}^{-1}$, con un tasso di crescita e una produttività massima rispettivamente di $4,43 \text{ d}^{-1}$ e $84,31 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Il terreno FERM si è dimostrato il substrato migliore per la crescita della biomassa. *Rps. palustris* ha infatti raggiunto la concentrazione finale di $1080,03 \text{ mg L}^{-1}$, con un tasso di crescita e una produttività massima rispettivamente di $5,05 \text{ d}^{-1}$ e $159,53 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Inoltre, *Rsp. rubrum* su FERM ha presentato una concentrazione finale, un tasso di crescita, e una produttività massima rispettivamente di $1043,05 \text{ mg L}^{-1}$, $3,76 \text{ d}^{-1}$, e $128,32 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Un incremento di concentrazione analogo nella biomassa di PNSB è stato osservato anche da Policastro et al. (2022). Nel loro studio è stato inoculato *Rba. sphaeroides* su un mezzo sintetico e su un effluente di fermentazione, ottenendo per quest'ultimo una produzione totale di PNSB tripla rispetto al controllo ($1,55 \text{ g}_{\text{PNSB}} \text{ L}^{-1}$ su fermentato, rispetto a $0,56 \text{ g}_{\text{PNSB}} \text{ L}^{-1}$).

Tabella 13, Valori di concentrazione finale, produttività massima di biomassa e tasso di crescita massimo delle due specie di PNSB, cresciute su RPP e FERM

PNSB	Medium	P_{\max} $mg L^{-1} d^{-1}$	μ_{\max} d^{-1}	Concentrazione finale $mg L^{-1}$
<i>Rps. palustris</i>	RPP	84,31	4,43	541,7
	FERM	159,53	5,05	1080,03
<i>Rsp. rubrum</i>	RPP	28,09	2,16	129,1
	FERM	128,32	3,76	1043,05

In linea con quanto ottenuto da Hu et al., (2018), sia *Rps. palustris* che *Rsp. rubrum* hanno dimostrato di essere in grado di convertire un ampio numero di composti organici, incrementando le proprie cinetiche di crescita. L'elevata crescita di biomassa riscontrata nei test su terreno FERM, in linea con quanto ottenuto da Segura et al. (2021), potrebbe, però, essere collegata alla scarsa resa di produzione di idrogeno osservata su questo esperimento. Per quanto favorire la crescita della coltura cellulare possa sembrare un buon modo per promuovere la produzione di idrogeno, l'incremento nella densità cellulare potrebbe aver portato a fenomeni di *self-shading*, con conseguente diminuzione della penetrazione dei raggi luminosi, come suggerito dagli studi condotti da Luxem et al. (2022).

5.2.3. Analisi del consumo di VFA

Per comprendere quali fossero i composti organici più utilizzati dai PNSB, le concentrazioni dell'acido malico e dei vari VFA presenti nei mezzi di crescita sono state monitorate durante tutto il test. In Figura 24 sono riportati i dati di confronto tra le concentrazioni di composti organici (VFA e acido malico) e la crescita cellulare, per i test eseguiti su terreno RPP.

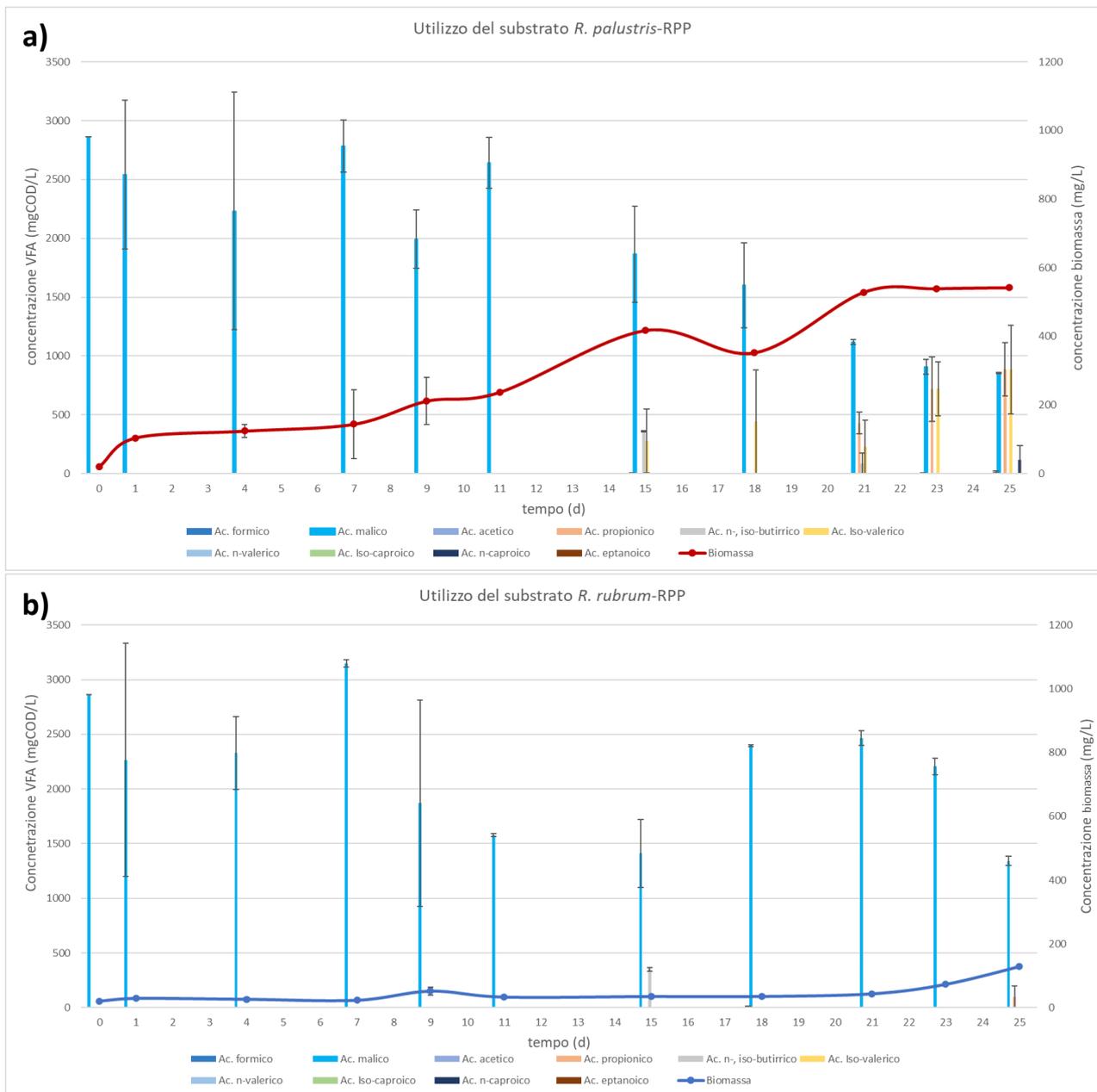


Figura 24, Curva di crescita della biomassa (*Rps. Palustris* (a) e *Rsp. Rubrum*(b)) in rapporto alla composizione del substrato (RPP)

Su *Rps. palustris* è possibile osservare una progressiva diminuzione della concentrazione di acido malico nel mezzo di crescita, e la comparsa di VFA alla fine del test (dal giorno 15 al 25). La crescita in concentrazione della coltura di *Rps. palustris* su mezzo RPP appare collegata alla diminuzione in concentrazione di acido malico. In *Rsp. rubrum*, invece, non si ha avuto una significativa crescita cellulare, e la concentrazione di acido malico sembra non seguire una chiara tendenza di diminuzione.

In Figura 25 sono riportati i dati di confronto tra le concentrazioni di composti organici (soli VFA) e la crescita cellulare, per i test eseguiti su terreno FERM.

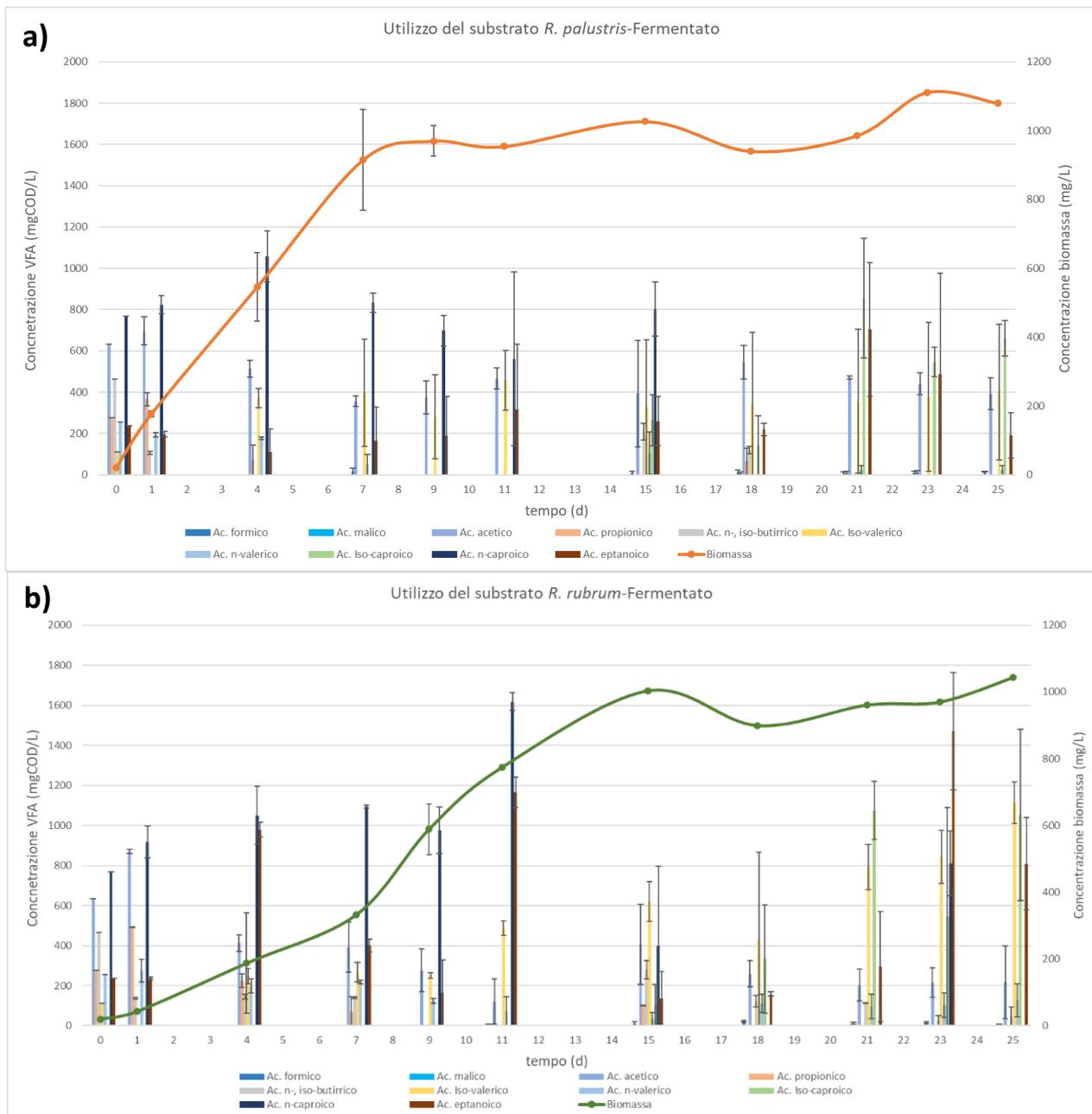


Figura 25, Curva di crescita della biomassa (*Rps. Palustris* (a) e *Rsp. Rubrum* (b)) in rapporto alla composizione del substrato (FERM)

Entrambe le specie testate hanno visto un andamento analogo, sia in merito alla crescita cellulare sia al pattern di consumo e trasformazione dei VFA. Sia su *Rps. palustris* che su *Rsp. rubrum* è possibile osservare come nei primi giorni di test vi sia una predominanza di VFA a catena più corta (acetico, propionico e butirrico), oltre a dell'acido caproico, abbondantemente presente nel terreno di partenza. Con il progredire della fermentazione, soprattutto in *Rsp. rubrum*, il profilo dei VFA risulta spostarsi verso specie a catena più lunga (valerico e caproico, oltre che eptanoico). In particolare, si può osservare come la concentrazione di acido acetico diminuisca al crescere della biomassa, mentre aumentano le concentrazioni di altri VFA come l'iso-caproico e l'iso-valerico.

6. Conclusioni

L'applicazione di differenti carichi organici nel processo di *Dark Fermentation* incide significativamente sulla produzione di VFA (ed altri acidi organici, come l'acido lattico), sia in termini di composizione che di quantità. Le rese di acidificazione più elevate sono state riscontrate nei test condotti a OL 10 e OL 15 (rispettivamente 0,40 e 0,39 $\text{g}_{\text{VFA}} \text{g}_{\text{TVS}}^{-1}$), dove l'effetto *buffer* del fango utilizzato come inoculo ha impedito un eccessivo calo del pH (avvenuto invece a carichi organici maggiori), favorendo la conversione della sostanza organica alimentata a VFA. Il fermentato avente le migliori caratteristiche in termini di resa di acidificazione, concentrazione di VFA, e concentrazione di ammoniaca è risultato essere quello ottenuto a OL 10 $\text{kg}_{\text{TVS}} \text{m}^{-3}$. Alla luce di queste caratteristiche è stato selezionato per la preparazione di un terreno di crescita (FERM) da testare in un processo di *Photo Fermentation*, condotto su due specie di PNSB: *Rhodopseudomonas palustris* e *Rhodospirillum rubrum*. I test eseguiti su terreno FERM hanno evidenziato, per entrambi i ceppi, delle cinetiche di crescita e una produzione di biomassa considerevolmente superiore a quella ottenuta su mezzo sintetico standard (RPP). Tuttavia, i test su FERM non hanno portato alla produzione di gas durante la fase di fermentazione. Questo potrebbe essere dovuto alla presenza di composti inibenti nel fermentato (come una concentrazione troppo elevata di ammoniaca), o a una non ottimale configurazione reattoristica (illuminazione e/o miscelazione). A conferma di queste ipotesi, in studi futuri, potrebbe essere interessante verificare la produzione di idrogeno dei PNSB sul fermentato prodotto a OL 15, che presentava il minor contenuto di ammoniaca ($107,2 \text{ mg L}^{-1}$) tra le condizioni testate. Inoltre, al fine di ottimizzare la produzione di idrogeno si potrebbe agire sulle configurazioni reattoristiche, cambiando ad esempio fonte di illuminazione e sua intensità, incrementando l'area superficiale dei reattori (ad esempio con cilindri al posto di bottiglie) e ottimizzando la miscelazione della coltura cellulare. In futuro, si prevede di proseguire questa linea di sperimentazioni adottando differenti configurazioni reattoristiche, al fine di incrementare l'efficienza fotosintetica dei PNSB, aumentando la superficie illuminata e limitando il *self-shading* che una coltura troppo concentrata potrebbe causare. Nel caso in cui questi accorgimenti permettessero di ottenere rese di produzione di idrogeno analoghe a quanto osservato in letteratura, si potranno predisporre dei test in semi-continuo per verificare l'adattamento della coltura agli effluenti di fermentazione nel lungo periodo.

Ringraziamenti

Ringrazio la prof ed i correlatori per avermi permesso di svolgere con successo l'attività di tirocinio e di tesi. Ringrazio inoltre il *Green Propulsion Laboratory* di Veritas per aver fornito i fermentatori e le strumentazioni necessarie. Infine, tengo a ringraziare la mia famiglia e tutti coloro che mi hanno supportato in questo percorso, in particolare Marco per il supporto e gli insegnamenti forniti.

Bibliografia

- Ab, S. L. (2016). What is organic waste. *DoItYourself*. <https://www.edcodisposal.com/signal-hill%0Ahttps://www.doityourself.com/stry/what-is-organic-waste>
- Adessi, A. (2013). *Hydrogen production using Purple Non-Sulfur Bacteria (PNSB) cultivated under natural or artificial light conditions with synthetic or fermentation derived substrates*.
- Aggesund, P. (2018). *The sustainable development way of implementing circular economy- A system thinking approach*. June. www.humangeo.su.se1
- Agyekum, E. B., Nutakor, C., Agwa, A. M., & Kamel, S. (2022). A Critical Review of Renewable Hydrogen Production Methods: Factors Affecting Their Scale-Up and Its Role in Future Energy Generation. *Membranes*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/membranes12020173>
- Ajanovic, A., Sayer, M., & Haas, R. (2022). The economics and the environmental benignity of different colors of hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy*, 47(57), 24136–24154. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.02.094>
- Alonso-Muñoz, S., García-Muiña, F. E., Medina-Salgado, M. S., & González-Sánchez, R. (2022). Towards circular economy practices in food waste management: a retrospective overview and a research agenda. *British Food Journal*, 124(13), 478–500. <https://doi.org/10.1108/BFJ-01-2022-0072>
- Amos, W. A. (2004). *Biological Water-Gas Shift Conversion of Carbon Monoxide to Hydrogen*. January, 1–21.
- Arsova, S., Genovese, A., & Ketikidis, P. H. (2022). Implementing circular economy in a regional context : A systematic literature review and a research agenda. *Journal of Cleaner Production*, 368(July), 133117. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.133117>
- Babayomi, O., Zhang, Z., Dragicevic, T., Hu, J., & Rodriguez, J. (2023). Smart grid evolution : Predictive control of distributed energy resources — A review. *International Journal of Electrical Power and Energy Systems*, 147(October 2022), 108812. <https://doi.org/10.1016/j.ijepes.2022.108812>
- Baeyens, J., Zhang, H., Nie, J., Appels, L., Dewil, R., Ansart, R., & Deng, Y. (2020). Reviewing the potential of bio-hydrogen production by fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 131(March), 110023. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110023>
- Baird, R., Bridgewater, L., American Public Health Association, American Water Works Association, & Water Environmental Federation. (2017). Standard methods for the examination of water and wastewater. In *American Public Health Association* (Vol. 1).
- Balachandar, G., Khanna, N., & Das, D. (2013). Biohydrogen Production from Organic Wastes by Dark Fermentation. In *Biohydrogen: Vol. #volume#* (1st ed.). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59555-3.00006-4>
- Barnett, A. J., Barraclough, R. W., Becerra, V., & Nasuto, S. (2013). *A history of product carbon footprint - conference paper*.
- Basak, N., & Das, D. (2007). The prospect of purple non-sulfur (PNS) photosynthetic bacteria for hydrogen production: The present state of the art. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(1), 31–42. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9190-9>
- Battista, F., Strazzera, G., Valentino, F., Gottardo, M., Villano, M., Matos, M., Silva, F., Reis, M. A. M., Matalvarez, J., Astals, S., Dosta, J., Jon, R., Massanet-nicolau, J., Guwy, A., Pavan, P., Bolzonella, D., & Majone, M. (2022). New insights in food waste, sewage sludge and green waste anaerobic fermentation for short-chain volatile fatty acids production : A review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(5), 108319. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.108319>
- Bhatarai, U., Maraseni, T., & Apan, A. (2022). Assay of renewable energy transition: A systematic literature review. *Science of the Total Environment*, 833(March), 155159. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155159>
- Bianchi, L., Mannelli, F., Viti, C., Adessi, A., & De Philippis, R. (2010). Hydrogen-producing purple non-sulfur bacteria isolated from the trophic lake Averno (Naples, Italy). *International Journal of Hydrogen Energy*,

35(22), 12216–12223. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.08.038>

- Brown, B., Wilkins, M., & Saha, R. (2022). Rhodospseudomonas palustris: A biotechnology chassis. *Biotechnology Advances*, 60(January), 108001. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.108001>
- Cheng, J., Ding, L., Lin, R., Yue, L., Liu, J., Zhou, J., & Cen, K. (2016). Fermentative biohydrogen and biomethane co-production from mixture of food waste and sewage sludge: Effects of physiochemical properties and mix ratios on fermentation performance. *Applied Energy*, 184, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.10.003>
- Cheng, J., Su, H., Zhou, J., Song, W., & Cen, K. (2011). Hydrogen production by mixed bacteria through dark and photo fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(1), 450–457. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.10.007>
- Commissione Europea. (2019). Il Green Deal europeo. *COMUNICAZIONE DELLA COMMISSIONE AL PARLAMENTO EUROPEO, AL CONSIGLIO, AL COMITATO ECONOMICO E SOCIALE EUROPEO E AL COMITATO DELLE REGIONI*, 1–26.
- Crippa, M., Guizzardi, D., Banja, M., Solazzo, E., Muntean, M., Schaaf, E., Pagani, F., & Monforti-Ferrario, F. (2022). *CO2 emissions of all world countries*. <https://doi.org/10.2760/07904>
- D’Adamo, I., Falcone, P. M., Martin, M., & Rosa, P. (2020). A sustainable revolution: Let’s go sustainable to get our globe cleaner. *Sustainability (Switzerland)*, 12(11), 10–14. <https://doi.org/10.3390/su12114387>
- Dawood, F., Anda, M., & Shafiullah, G. M. (2020). Hydrogen production for energy: An overview. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(7), 3847–3869. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.12.059>
- Dokhani, S., Assadi, M., & Pollet, B. G. (2022). Techno-economic assessment of hydrogen production from seawater. *International Journal of Hydrogen Energy*, xxxx. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.11.200>
- Earth Overshoot Day. (2023). *About Earth Overshoot Day*. <https://www.overshootday.org/about-earth-overshoot-day/>
- EEA. (2020). *EEA. (2020). Bio-waste in Europe — turning challenges into opportunities (Issue 04). Bio-waste in Europe — turning challenges into opportunities (Issue 04)*. <https://www.eea.europa.eu/publications/bio-waste-in-europe>
- Eroglu, E., & Melis, A. (2011). Photobiological hydrogen production: Recent advances and state of the art. *Bioresource Technology*, 102(18), 8403–8413. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.026>
- ESG360. (2021). *Carbon footprint: cos’è, come si misura, perché è importante conoscerla*. <https://www.esg360.it/environmental/carbon-footprint-cose-come-si-misura-perche-e-importante-conoscerla/>
- European Commission. (2015). *L’anello mancante - Piano di azione dell’Unione Europea per l’economia circolare*. 1–23. https://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:8a8ef5e8-99a0-11e5-b3b7-01aa75ed71a1.0009.02/DOC_1&format=PDF
- Eurostat. (2022a). *EU population continues to decrease for a second year*. <https://ec.europa.eu/eurostat/web/products-eurostat-news/-/ddn-20220711-1#:~:text=Over a longer period%2C the,increase of 92.3 million people>.
- Eurostat. (2022b). *Greenhouse gas emission statistics - emission inventories*. https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Greenhouse_gas_emission_statistics_-_emission_inventories
- Eurostat. (2022c). *Greenhouse gas emissions by source sector*. https://ec.europa.eu/eurostat/databrowser/view/ENV_AIR_GGE__custom_4667970/default/table?lang=en
- Eurostat. (2023). *Waste statistics*. https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Waste_statistics
- Fetting, C. (2020). The European Green Deal. In *ESDN Report* (Vol. 53, Issue December). <https://eur->

- Gautam, R., Nayak, J. K., Ressa, N. V., Steinberger-Wilckens, R., & Ghosh, U. K. (2023). Bio-hydrogen production through microbial electrolysis cell: Structural components and influencing factors. *Chemical Engineering Journal*, 455(September 2022), 140535. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.140535>
- Geissdoerfer, Martin; Savaget, Paulo; Bocken, Nancy M.P.; Hultink, E. J. (2017). The Circular Economy – a new sustainability paradigm? *Journal of Cleaner Production*, 44(0), 143, 757-768. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.12.048>
- Ghosh, S., Dairkee, U. K., Chowdhury, R., & Bhattacharya, P. (2017). Hydrogen from food processing wastes via photofermentation using Purple Non-sulfur Bacteria (PNSB) – A review. *Energy Conversion and Management*, 141, 299–314. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2016.09.001>
- Ghosh, S., Dutta, S., & Chowdhury, R. (2020). Ameliorated hydrogen production through integrated dark-photo fermentation in a flat plate photobioreactor: Mathematical modelling and optimization of energy efficiency. *Energy Conversion and Management*, 226(October), 113549. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2020.113549>
- Gokfiliz, P., & Karapinar, I. (2017). The effect of support particle type on thermophilic hydrogen production by immobilized batch dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(4), 2553–2561. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.03.041>
- Grabarczyk, R., Urbaniec, K., Wernik, J., & Trafczynski, M. (2019). Evaluation of the two-stage fermentative hydrogen production from sugar beet molasses. *Energies*, 12(21). <https://doi.org/10.3390/en12214090>
- Hoang, A. T., Pham, V. V., & Nguyen, X. P. (2021). Integrating renewable sources into energy system for smart city as a sagacious strategy towards clean and sustainable process. *Journal of Cleaner Production*, 305(April), 127161. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127161>
- Holm, T., Borsboom-hanson, T., Herrera, O. E., & Walter, M. (2021). *Hydrogen costs from water electrolysis at high temperature and pressure*. 237. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2021.114106>
- Hu, C., Choy, S. Y., & Giannis, A. (2018). Evaluation of Lighting Systems, Carbon Sources, and Bacteria Cultures on Photofermentative Hydrogen Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 185(1), 257–269. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2655-5>
- Huang, Q., Tokmina-Lukaszewska, M., Johnson, L. E., Kallas, H., Ginovska, B., Peters, J. W., Seefeldt, L. C., Bothner, B., & Raugei, S. (2021). Mechanical coupling in the nitrogenase complex. *PLoS Computational Biology*, 17(3), 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1008719>
- Hultman, S., & Alshwan, Z. (2019). *Production of Volatile Fatty Acids from Anaerobic Digestion using food waste, sludge and cow manure*.
- IAEA. (2021). *Nuclear Energy for a Net Zero World*.
- Interreg Europe. (2021). *The biowaste management challenge*. December.
- Itoh, Y., Tada, K., Kanno, T., & Horiuchi, J. I. (2012). Selective production of lactic acid in continuous anaerobic acidogenesis by extremely low pH operation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114(5), 537–539. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.05.020>
- Javed, M. A., Zafar, A. M., Aly Hassan, A., Zaidi, A. A., Farooq, M., El Badawy, A., Lundquist, T., Mohamed, M. M. A., & Al-Zuhair, S. (2022). The role of oxygen regulation and algal growth parameters in hydrogen production via biophotolysis. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(1), 107003. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.107003>
- Ji, M., & Wang, J. (2021). Review and comparison of various hydrogen production methods based on costs and life cycle impact assessment indicators. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(78), 38612–38635. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.09.142>
- Kawaguchi, H., Hashimoto, K., Hirata, K., & Miyamoto, K. (2001). H₂ production from algal biomass by a mixed culture of *Rhodobium marinum* A-501 and *Lactobacillus amylovorus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91(3), 277–282. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(01\)80134-1](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80134-1)

- Keskin, T., Abo-Hashesh, M., & Hallenbeck, P. C. (2011). Photofermentative hydrogen production from wastes. *Bioresource Technology*, *102*(18), 8557–8568. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.004>
- Kougias, I., Taylor, N., Kakoulaki, G., & Jäger-Waldau, A. (2021). The role of photovoltaics for the European Green Deal and the recovery plan. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *144*(March), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111017>
- Kougias, I., Taylor, N., Kakoulaki, G., & Jäger-Waldau, A. (2021). The role of photovoltaics for the European Green Deal and the recovery plan. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *144*(February), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111017>
- Laocharoen, S., & Reungsang, A. (2014). Isolation, characterization and optimization of photo-hydrogen production conditions by newly isolated *Rhodobacter sphaeroides* KKU-PS5. *International Journal of Hydrogen Energy*, *39*(21), 10870–10882. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.05.055>
- Leonard, M., Pisani-Ferry, J., Shapiro, J., Tagliapietra, S., & Wolf, G. (2021). The geopolitics of the European Green Deal. *International Organisations Research Journal*, *16*(2), 204–235. <https://doi.org/10.17323/1996-7845-2021-02-10>
- Lin, R., Zhao, Y., & Wu, B. (2020). Toward a hydrogen society: Hydrogen and smart grid integration. *International Journal of Hydrogen Energy*, *45*(39), 20164–20175. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.01.047>
- Łukajtis, R., Hołowacz, I., Kucharska, K., Glinka, M., Rybarczyk, P., Przyjazny, A., & Kamiński, M. (2018). Hydrogen production from biomass using dark fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *91*(April), 665–694. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.043>
- Luo, L., Sriram, S., Johnravindar, D., Louis Philippe Martin, T., Wong, J. W. C., & Pradhan, N. (2022). Effect of inoculum pretreatment on the microbial and metabolic dynamics of food waste dark fermentation. *Bioresource Technology*, *358*(April), 127404. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127404>
- Luxem, K. E., Nguyen, A. J., & Zhang, X. (2022). Biohydrogen production relationship to biomass composition, growth, temperature and nitrogenase isoform in the anaerobic photoheterotrophic diazotroph *Rhodospseudomonas palustris*. *International Journal of Hydrogen Energy*, *47*(66), 28399–28409. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.06.178>
- Madigan, M. T., & Jung, D. O. (2009). *An Overview of Purple Bacteria: Systematics, Physiology, and Habitats*. January 2016, 1–15. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8815-5_1
- Micolucci, F., Gottardo, M., Bolzonella, D., Pavan, P., Majone, M., & Valentino, F. (2020). Pilot-scale multi-purposes approach for volatile fatty acid production, hydrogen and methane from an automatic controlled anaerobic process. *Journal of Cleaner Production*, *277*(September), 124297. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124297>
- Mishra, P., Krishnan, S., Rana, S., Singh, L., Sakinah, M., & Ab Wahid, Z. (2019). Outlook of fermentative hydrogen production techniques: An overview of dark, photo and integrated dark-photo fermentative approach to biomass. *Energy Strategy Reviews*, *24*(January), 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.esr.2019.01.001>
- Monroy, I., & Buitrón, G. (2020). Production of polyhydroxybutyrate by pure and mixed cultures of purple non-sulfur bacteria: A review. *Journal of Biotechnology*, *317*(May), 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.04.012>
- Moretto, G., Russo, I., Bolzonella, D., Pavan, P., Majone, M., & Valentino, F. (2020). An urban biorefinery for food waste and biological sludge conversion into polyhydroxyalkanoates and biogas. *Water Research*, *170*, 115371. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115371>
- Moretto, G., Valentino, F., Pavan, P., Majone, M., & Bolzonella, D. (2019). Optimization of urban waste fermentation for volatile fatty acids production. *Waste Management*, *92*, 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.05.010>
- Niño-Navarro, C., Chairez, I., Christen, P., Canul-Chan, M., & García-Peña, E. I. (2020). Enhanced hydrogen production by a sequential dark and photo fermentation process: Effects of initial feedstock composition, dilution and microbial population. *Renewable Energy*, *147*, 924–936.

<https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.09.024>

- Noussan, M., Raimondi, P. P., Scita, R., & Hafner, M. (2021). *The Role of Green and Blue Hydrogen in the Energy Transition — A Technological and Geopolitical Perspective*.
- OBA™_Online Biogas App. (2023). *Calculate biogas production and BMP from raw data*. <https://biotransformers.shinyapps.io/oba1/>
- Organizzazione delle Nazioni Unite. (2015). Trasformare il nostro mondo: l'Agenda 2030 per lo Sviluppo Sostenibile (Agenda2030). *Organizzazione Delle Nazioni Unite*, 1–35. <https://unric.org/it/agenda-2030/%0Ahttps://unric.org/it/wp-content/uploads/sites/3/2019/11/Agenda-2030-Onu-italia.pdf>
- Osman, A. I., Deka, T. J., Baruah, D. C., & Rooney, D. W. (2020). Critical challenges in biohydrogen production processes from the organic feedstocks. *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00965-x>
- OurWorldinData. (2020). *Emissions by sector*. <https://ourworldindata.org/emissions-by-sector>
- Özgür, E., Mars, A. E., Peksel, B., Louwerse, A., Yücel, M., Gündüz, U., Claassen, P. A. M., & Eroğlu, I. (2010). Biohydrogen production from beet molasses by sequential dark and photofermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(2), 511–517. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.10.094>
- Pal, D. B., Singh, A., & Bhatnagar, A. (2022). A review on biomass based hydrogen production technologies. *International Journal of Hydrogen Energy*, 47(3), 1461–1480. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.10.124>
- Policastro, G., Giugliano, M., Luongo, V., Napolitano, R., & Fabbricino, M. (2022). Enhancing photo fermentative hydrogen production using ethanol rich dark fermentation effluents. *International Journal of Hydrogen Energy*, 47(1), 117–126. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.10.028>
- Presti, D., Cosenza, A., Capri, F. C., Gallo, G., Alduina, R., & Mannina, G. (2021). Influence of volatile solids and pH for the production of volatile fatty acids : Batch fermentation tests using sewage sludge. *Bioresource Technology*, 342(August), 125853. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125853>
- Purvis, B., Mao, Y., & Robinson, D. (2019). Three pillars of sustainability: in search of conceptual origins. *Sustainability Science*, 14(3), 681–695. <https://doi.org/10.1007/s11625-018-0627-5>
- Rajesh Banu, J., Kavitha, S., Yukesh Kannah, R., Bhosale, R. R., & Kumar, G. (2020). Industrial wastewater to biohydrogen: Possibilities towards successful biorefinery route. *Bioresource Technology*, 298(September 2019), 122378. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122378>
- Sagnak, R., & Kargi, F. (2011). Photo-fermentative hydrogen gas production from dark fermentation effluent of acid hydrolyzed wheat starch with periodic feeding. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(7), 4348–4353. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.01.033>
- Scamman, D., & Newborough, M. (2016). ScienceDirect Using surplus nuclear power for hydrogen mobility and power-to-gas in France. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(24), 10080–10089. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.04.166>
- Segura, P. C., De Meur, Q., Tanghe, A., Onderwater, R., Dewasme, L., Wattiez, R., & Leroy, B. (2021). Effects of mixing volatile fatty acids as carbon sources on rhodospirillum rubrum carbon metabolism and redox balance mechanisms. *Microorganisms*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091996>
- Singh, L., Wahid, Z. A., Siddiqui, M. F., Ahmad, A., Rahim, M. H. A., & Sakinah, M. (2013). Biohydrogen production from palm oil mill effluent using immobilized Clostridium butyricum EB6 in polyethylene glycol. *Process Biochemistry*, 48(2), 294–298. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.12.007>
- Sivagurunathan, P., Sen, B., & Lin, C. Y. (2015). High-rate fermentative hydrogen production from beverage wastewater. *Applied Energy*, 147, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.01.136>
- Snam. (2019). *THE HYDROGEN CHALLENGE : The potential of hydrogen in Italy*. 0–11.
- Strategy&. (2020). *The dawn of green hydrogen*.
- Su, H., Cheng, J., Zhou, J., Song, W., & Cen, K. (2009). Improving hydrogen production from cassava starch by

- combination of dark and photo fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(4), 1780–1786. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.12.045>
- Sundar, L. S., & Chao, Y. Y. (2022). Potential of Purple Non-Sulfur Bacteria in Sustainably Enhancing the Agronomic and Physiological Performances of Rice. *Agronomy*, 12(10). <https://doi.org/10.3390/agronomy12102347>
- Szpilko, D., & Ejdys, J. (2022). European Green Deal — Research Directions. a Systematic Literature Review. In *Ekonomia i Srodowisko* (Vol. 81, Issue 2). <https://doi.org/10.34659/eis.2022.81.2.455>
- United Nations. (2022). *Millennium Summit*. <https://www.un.org/en/conferences/environment/newyork2000>
- United Nations. (2023). *THE 17 GOALS*. <https://sdgs.un.org/goals#history>
- United Nations. (2015). ADOPTION OF THE PARIS AGREEMENT Proposal by the President. *21st Conference of the Parties*, 21932(December), 1–32.
- Valentino, F., Munarin, G., Biasiolo, M., Cavinato, C., Bolzonella, D., & Pavan, P. (2021). Enhancing volatile fatty acids (VFA) production from food waste in a two-phases pilot-scale anaerobic digestion process. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(5), 106062. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.106062>
- Vea, E. B., Romeo, D., & Thomsen, M. (2018). Biowaste Valorisation in a Future Circular Bioeconomy. *Procedia CIRP*, 69(May), 591–596. <https://doi.org/10.1016/j.procir.2017.11.062>
- VERITAS. (2021). *ESa ha selezionato il GpLab di Veritas per produrre idrogeno dai batteri rossi isolati dai sedimenti della Laguna di Venezia*. <https://www.gruppoveritas.it/news/esa-ha-selezionato-il-gplab-di-veritas-produrre-idrogeno-dai-batteri-rossi-isolati-dai-sedimenti>
- Villanueva-Galindo, E., Vital-Jácome, M., & Moreno-Andrade, I. (2023). Dark fermentation for H₂ production from food waste and novel strategies for its enhancement. *International Journal of Hydrogen Energy*, xxxx. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.11.339>
- Visintainer Lerman, L., Brittes Benitez, G., Gerstlberger, W., Picanço Rodrigues, V., & Frank, A. G. (2021). Sustainable conditions for the development of renewable energy systems: A triple bottom line perspective. *Sustainable Cities and Society*, 75(September), 103362. <https://doi.org/10.1016/j.scs.2021.103362>
- Yu, M., Wang, K., & Vredenburg, H. (2021). Insights into low-carbon hydrogen production methods: Green, blue and aqua hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(41), 21261–21273. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.04.016>
- Yu, S., Peng, L., Xu, Y., Song, S., Xie, G. J., Liu, Y., & Ni, B. J. (2021). Optimizing light sources for selective growth of purple bacteria and efficient formation of value-added products. *Journal of Cleaner Production*, 280, 124493. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124493>
- Zandalinas, S. I., Fritschi, F. B., & Mittler, R. (2021). Global Warming , Climate Change , and Environmental Pollution : Recipe for a Multifactorial Stress Combination Disaster Trends in Plant Science. *Trends in Plant Science*, 26(6), 588–599. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.02.011>
- Zhang, T., Jiang, D., Zhang, H., Jing, Y., Tahir, N., Zhang, Y., & Zhang, Q. (2020). Comparative study on bio-hydrogen production from corn stover: Photo-fermentation, dark-fermentation and dark-photo co-fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(6), 3807–3814. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.04.170>

Appendice

Terreni RPN e M80

Preparare separatamente la soluzione di citrato ferrico, sciogliere il sale su piastra termica in agitazione fino a formazione di colorazione giallo brillante.

Per il terreno RPN: aggiungere tutti i composti ad eccezione della soluzione di vitamine, correggere il pH a 6,8 con NaOH 1M e successivamente sterilizzare in autoclave. Al termine della sterilizzazione, aspettare che la soluzione si raffreddi e aggiungere la soluzione di vitamine, filtrata a 0,22 μm con filtro sterile (per garantire la sterilità, usare siringhe e aghi sterili e iniettare le vitamine dentro il mezzo di coltura tramite un setto di gomma).

Per il terreno M80: Aggiungere tutti i composti, correggere il pH a 6,8 con NaOH 1M e successivamente sterilizzare in autoclave.

	RPN g L^{-1}	M80 g L^{-1}
Acido malico	2,0	
NH_4Cl	0,5	0,4
KH_2PO_4	0,3	0,5
K_2HPO_4	0,5	
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,4	0,4
NaCl	0,4	0,4
$\text{CaCl} \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,075	0,05
Citrato ferrico (1 g L ⁻¹)	5 (mL L ⁻¹)	5 (mL L ⁻¹)
Estratto di malto	0,4	1
EtOH		0,5 (mL L ⁻¹)
Elementi in tracce*	1 (mL L ⁻¹)	1 (mL L ⁻¹)
Vitamine**	1 (mL L ⁻¹)	

* H_3BO_3 (0,3 g L⁻¹), $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (0,03 g L⁻¹), $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g L⁻¹), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (0,3 g L⁻¹), $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (0,01 g L⁻¹), $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (0,02 g L⁻¹), $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (0,02 g L⁻¹)

**Biotina (0,3 g L⁻¹), Niacina (0,03 g L⁻¹), Tiamina dicloruro (0,1 g L⁻¹), Acido p-aminobenzoico (0,3 g L⁻¹), Piridossolio idrocloruro (0,01 g L⁻¹), Vitamina B12 (0,02 g L⁻¹), Vitamina B5 (0,02 g L⁻¹)

Per preparare terreno solido, aggiungere al mezzo di coltura 15 g L^{-1} di agar (1,5%), scaldare fino a completo scioglimento del sale (la soluzione bolle e diventa trasparente). Aspettare che la soluzione si freddi a circa 40°C e versare il composto sulle piastre Petri per solidificare. Per garantire la sterilità delle piastre Petri, lavorare sotto cappa a flusso laminare.