



Università
Ca' Foscari
Venezia

Corso di Laurea Magistrale

Scienze Ambientali

Tesi di Laurea

Valutazione dell'attività di biometanazione idrogenotrofa su
biomassa sospesa e granulare

Relatrice

Prof.ssa Cristina Cavinato

Correlatori

Dr. Graziano Tassinato

Dr. Marco Biasiolo

Laureando

Enrico Romanato

870870

Anno accademico

2022/2023

Sommario

Elenco degli acronimi	iv
Abstract	v
1. Introduzione	4
1.1. Cambiamento climatico e sfide future	4
1.2. La digestione anaerobica	8
1.3. La biometanazione	13
1.3.1. La biometanazione in-situ ed ex-situ	13
1.3.2. Tipologie di reattori	15
2. Stato dell'Arte del processo di biometanazione	18
2.1. Parametri di processo	18
2.2. Determinazione dell'attività specifica di metanazione idrogenotrofa	21
3. Scopo della Tesi	24
4. Materiali e Metodi	25
4.1. Inoculi utilizzati	25
4.2. Caratteristiche della soluzione di coltura	25
4.3. Substrati utilizzati	26
4.4. Test di biometanazione	26
4.4.1. Piano sperimentale e set up del test	26
4.4.2 Test su biomassa sospesa	28
4.4.3 Test su biomassa granulare	29
4.4.4 Elaborazione dati	29
4.5. Metodi analitici	30
5. Risultati e Discussione	32
5.1. Digestato (biomassa sospesa)	32
5.1.1. 1 ^a RUN	32
5.1.2. 2 ^a RUN	35
5.1.3. 3 ^a RUN	38
5.2. Fanghi granulari (biomassa granulare)	42
5.2.1. 1 ^a RUN	42
5.2.2. 2 ^a RUN	45
5.2.3. 3 ^a RUN	48
5.2.4. 4 ^a RUN	51
5.3. Confronto delle rese ottenute	54
6. Conclusioni	58

Elenco degli acronimi

AD: Anaerobic Digestion

CCS: Carbon dioxide capture and storage

CSTR: Continuous stirred tank reactor

EGSB: Expanded Granular Sludge Bed

GHG: Greenhouse gases

IPCC: Intergovernmental Panel on Climate Change

MPN: Most Probable Number

OLR: Organic Loading Rate

SAO: Syntrophic acetate oxidation

SMA: Specific methanogenic activities

SMP: Specific methane production

SHMA: Specific hydrogenotrophic methanogenic activities

VFAs: Volatile Fatty Acids

UASB: Upward-flow anaerobic sludge blanket

Abstract

L'incremento demografico e le abitudini consumistiche sono alcune delle cause del cambiamento climatico. Questo comporta l'esaurimento dei combustibili fossili e il corrispondente aumento delle emissioni di gas serra. La produzione di biometano può dare un valore energetico alla CO₂. Per fare questo si sfruttano microorganismi metanogeni idrogenotrofi che partecipano alla digestione anaerobica, un processo che dipende dall'interazione mutualistica e sinergica di un consorzio di microrganismi che negli ultimi anni sta attirando l'interesse della comunità scientifica. Questo metodo, a differenza del metodo catalitico che usa la reazione di Sabatier, rappresenta un'alternativa promettente, a basso costo e a basso rischio per ridurre le emissioni di CO₂ in atmosfera. Lo scopo della tesi è stato, da un lato, quello di impostare un processo biologico che sia in grado di convertire il CO₂ e l'H₂ in CH₄, e dall'altro quello di testare il metodo di determinazione dei parametri di attività di biometanazione (*SHMA, Specific Hydrogenotrophic Methanogenic Activity e Specific Methane Potential, SMP*). L'attività di biometanazione idrogenotrofa è stata determinata per un consorzio anaerobico proveniente da digestato (biomassa sospesa), e successivamente per un inoculo di fanghi granulari (biomassa granulare), cercando di ottimizzare il processo attraverso un graduale arricchimento della biomassa tramite aggiunte progressive di H₂ e di CO₂. Questo ha permesso di confrontare le rese di processo per valutare la fattibilità e i vantaggi di un utilizzo dei fanghi granulari, biomassa che dalla letteratura scientifica sta attirando sempre di più l'attenzione.

1. Introduzione

1.1. Cambiamento climatico e sfide future

Molti ricercatori ad oggi sostengono vi sia un nesso di causalità tra lo sviluppo delle attività antropiche e l'inasprimento dei cambiamenti climatici, e identifica come driving force principale l'aumento esponenziale delle emissioni di gas serra (GHG, *Greenhouse gases*), che ha portato a far registrare un aumento della temperatura superficiale media globale di 1,1°C (periodo 2011–2020) rispetto al periodo preindustriale (1850–1900) (Calvin et al., 2023). Il biossido di carbonio di origine antropogenica è stato cruciale per l'aumento della temperatura superficiale globale dal periodo della rivoluzione industriale (Mondal et al., 2023). Durante il decennio 2010-2019, le emissioni globali di gas serra sono incrementate in modo costante principalmente a causa di pratiche insostenibili legate all'approvvigionamento energetico, all'uso del suolo, agli stili di vita e ai modelli di consumo e di produzione (Calvin et al., 2023). Nello studio condotto da Feng et al., (2012), hanno identificato, confrontando le emissioni delle varie regioni della Cina, come disparità regionali, strutture economiche, modelli di consumo delle famiglie ed esportazioni come i fattori principali da considerare nello studio delle emissioni di CO₂.

Il cambiamento climatico di origine antropica ha già portato alla manifestazione di eventi meteorologici e climatici estremi in tutto il mondo, generando impatti sulla sicurezza alimentare, sulle risorse idriche, sulla salute umana, sull'economia e la società (Calvin et al., 2023). In tutto il mondo, a partire dagli anni '50, si è verificata un'intensificazione sostanziale dei fenomeni estremi, come precipitazioni abbondanti, allagamenti estesi, siccità, frane e colate detritiche (Mondal et al., 2023). Per quanto riguarda l'Italia, nel 2023 gli eventi meteorologici estremi che hanno causato danni sono cresciuti del 22 % (378 eventi estremi rispetto ai 311 verificatisi nel 2022), in particolare per quanto riguarda le esondazioni fluviali (+170 %), le temperature record (+150 %) e le frane causate da piogge intense (+64 %) (Legambiente, Bilancio Città Clima 2023). Questi dati, già di per sé allarmanti, risultano ancora più impressionanti se confrontati con quanto accaduto nell'anno precedente, in cui gli eventi totali registrati sono stati 200, quasi la metà di quelli avvenuti nel 2023 (<https://cittaclima.it>). In Figura 1 viene riportato l'andamento della temperatura dell'aria in superficie globale nei diversi mesi dal 1940 al 2020. Si può notare come il periodo dei mesi che va da giugno a dicembre del 2023 abbiano avuto delle temperature più elevate rispetto a tutti gli altri anni riportati (<https://climate.copernicus.eu>).

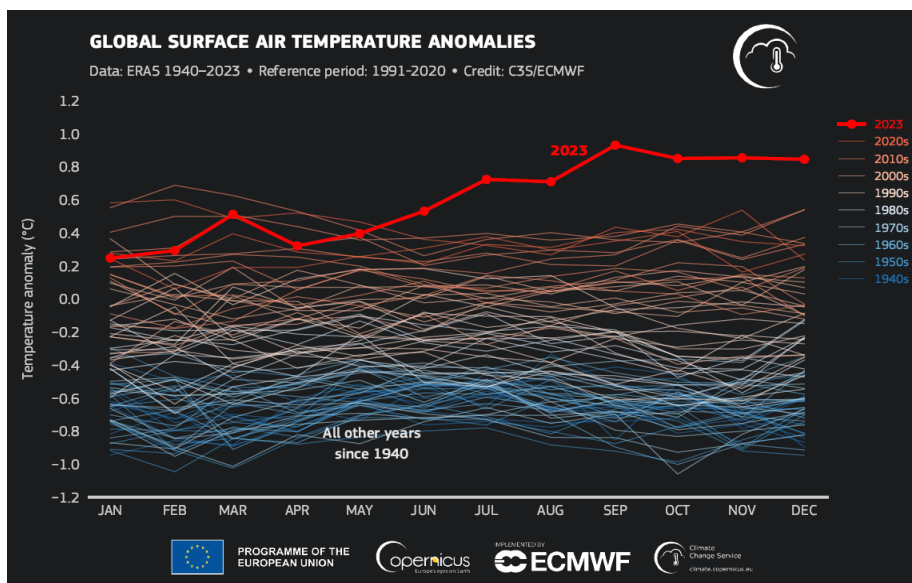


Figura 1: Anomalie mensili della temperatura dell'aria in superficie globale (°C) rispetto al periodo 1994 -2020 (<https://climate.copernicus.eu>).

Il biossido di carbonio costituisce il gas serra preponderante, contribuendo al 77% delle emissioni globali totali di gas serra, mentre il metano (CH₄) e l'ossido di diazoto (N₂O) sono rilasciati in quantità inferiori, rappresentando rispettivamente il 14% e l'8% delle emissioni totali di GHG (López et al., 2013) Tuttavia, è importante notare che questi due gas presentano potenziali di riscaldamento globale rispettivamente 23 e 298 volte superiori rispetto a quello del biossido di carbonio (López et al., 2013). Negli ultimi sei decenni, le concentrazioni atmosferiche di CO₂ hanno raggiunto 410 parti per milione (ppm), il CH₄ ha raggiunto 1866 parti per miliardo (ppb) e l'ossido nitroso (N₂O) 332 ppb (Calvin et al., 2023). Nella Figura 2 sono riportate le quote di emissioni cumulative storiche nette antropogeniche di CO₂ per regione dal 1850 al 2019 in GtCO₂.

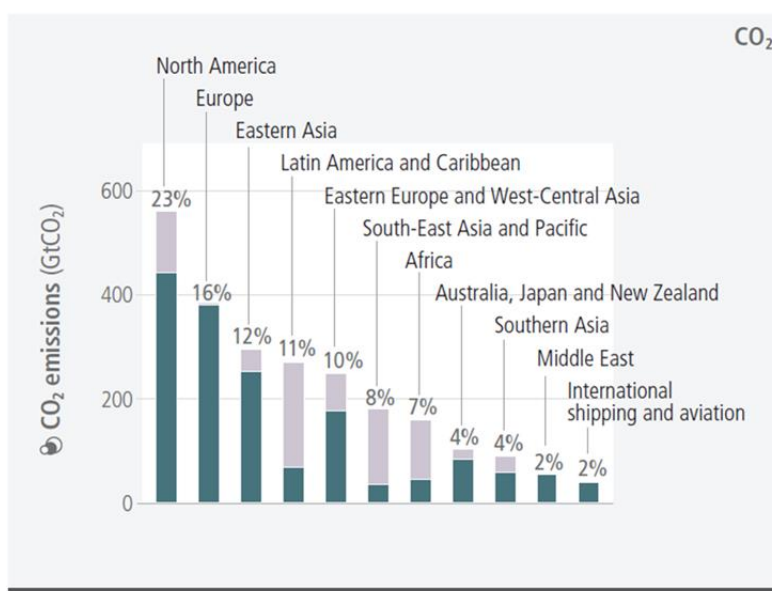


Figura 2, Emissioni cumulative storiche nette antropogeniche di CO₂ per regione dal 1850 al 2019 in GtCO₂ (Calvin et al., 2023)

Come si può notare tra le regioni con maggiore produzione di GtCO₂ abbiamo i paesi più sviluppati quali il Nord America, l'Europa e l'Asia.

Per quanto riguarda la Cina, questa ha promesso di raggiungere il picco delle emissioni di carbonio entro il 2030, per poi puntare alla neutralità di carbonio entro il 2060 e a raggiungere entro il 2035 una concentrazione media annua di PM2.5 inferiore al limite nazionale di $35 \mu\text{g m}^{-3}$ in tutte le città (Shi et al., 2023). Per quanto riguarda il contesto Europeo, in Figura 3 sono riportate le emissioni pro capite di CO₂ registrate nel 2022 per le diverse nazioni europee.

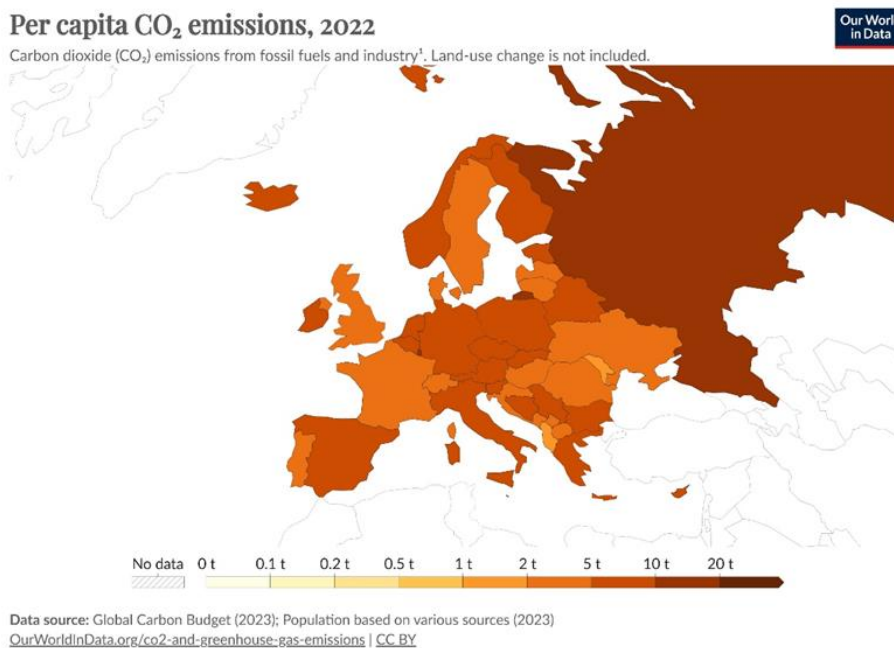


Figura 3, Emissioni pro capite di CO₂ per le nazioni dell'Europa. <https://ourworldindata.org/>

Come si può osservare dalla Figura 3, la produzione di CO₂ pro capite in Europa raggiunge un valore massimo di 20 t/abitante in Paesi come Russia e Lussemburgo, mentre la maggior parte degli altri Paesi si attesta su valori compresi tra 2 e 10 t_{CO2}/abitante (www.ourworldindata.org). L'Europa si è posta l'obiettivo di raggiungere le emissioni zero dal punto di vista del carbonio entro il 2050 seguendo gli obiettivi basati sul Green Deal europeo del 2019 (Demiral et al., 2022).

Negli ultimi decenni il problema delle emissioni di gas serra in atmosfera ha attirato molto interesse sia per ricercatori che per la classe politica, e sono stati fatti molti passi in avanti per contenere il problema e per spingere la società ad una progressiva diminuzione delle emissioni. A settembre 2020, la Commissione Europea ha promosso ulteriori riduzioni delle emissioni di CO₂ e GHG al 55% e un aumento della quota di energie rinnovabili dal 20 al 32% entro il 2030 (Bellini et al., 2022). Tuttavia, Demiral et al. (2022) affermano che questi obiettivi non siano sufficienti, in quanto molti paesi sviluppati come quelli dell'Unione Europea si stiano limitando a spostare le loro industrie ad alta intensità di inquinamento verso partner privi di regolamentazioni ambientali che offrono rifugi inquinanti, fenomeno denominato come *carbon leakage*. Di conseguenza le emissioni in Europa non vengono effettivamente ridotte, ma vengono riallocate in altri paesi. Per contrastare questa dinamica l'Unione europea deve porsi come obiettivo centrale la transizione verso

energie rinnovabili, così da attuare la decarbonizzazione (Demiral et al., 2022). L'obiettivo dei 2°C imposto dall'Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) non sembra raggiungibile se non si utilizzano sistemi di rimozione del carbonio; infatti, per mitigare il cambiamento climatico si prevede di dover rimuovere 10 Gt_{CO₂} all'anno entro il 2050 e di raddoppiare la quota di CO₂ rimosso entro la fine del secolo (Gładysz et al., 2023). Tuttavia, a detta di alcuni ricercatori anche se la concentrazione di CO₂ in atmosfera venisse riportata al livello preindustriale il sistema climatico potrebbe non tornare al suo stato iniziale (Mondal et al., 2023). Per puntare ad una progressiva diminuzione delle emissioni di CO₂ in atmosfera, i paesi devono puntare a nuove strategie di consumo e di produzione, finalizzate alla transizione verso fonti energetiche non fossili, allo sviluppo di tecnologie per la cattura e per il sequestro del CO₂, e all'utilizzo del CO₂ come materia prima (Mikkelsen et al., 2010). Una problematica che riguarda il biossido di carbonio è che, nonostante sia una fonte di carbonio abbondante e rinnovabile, pochi processi industriali sono in grado di utilizzarlo come materia prima, perché nella molecola di CO₂ il carbonio si trova allo stato più ossidato; di conseguenza, la molecola risulta poco reattiva e necessita di molta energia per essere convertita in altre sostanze (Mikkelsen et al., 2010). I metodi chimici per fissare il carbonio dal biossido di carbonio includono metodi di riduzione chimica, elettrochimica e fotochimica, metodi di idrogenazione e di fotocatalisi (Mikkelsen et al., 2010), l'assorbimento, l'adsorbimento, la combustione con ciclo chimico, la separazione a membrana, la separazione basata sull'idrato e la distillazione criogenica (Salehizadeh et al., 2020). Particolare interesse si è riversato sul CCS (*carbon dioxide capture and storage*, cattura e stoccaggio del carbonio), perché permetterebbe di ridurre le emissioni di CO₂ nell'atmosfera continuando a utilizzare i combustibili fossili (Mikkelsen et al., 2010). Il principio di questo metodo è quello di produrre un flusso concentrato ad alta pressione in modo da renderlo stoccabile in un sito apposito (Mikkelsen et al., 2010). Questi processi di cattura si dividono in cattura post-combustione, cattura pre-combustione e ossicomcombustione (Gładysz et al., 2023). Tuttavia, i metodo chimico-fisici hanno lo svantaggio di essere costosi e di necessitare di un elevato consumo energetico (Salehizadeh et al., 2020). Come alternativa ai metodi chimici tradizionali, negli ultimi anni hanno ottenuto particolare attenzione i metodi di fissazione biologica del carbonio, che rispetto ai metodi citati precedentemente danno la possibilità di lavorare in condizioni di temperatura e pressione più moderate, e senza dover utilizzare grandi quantità di sostanze chimiche (Bassani et al., 2017). Tra i metodi biologici vi sono quelli fotosintetici, che sfruttano la fotosintesi compiuta da piante, microalghe e cianobatteri (López et al., 2013) e quelli non fotosintetici che, utilizzando batteri metanogeni anaerobici idrogenotrofi, utilizzano CO o CO₂ come unica fonte di carbonio ed energia (Mikkelsen et al., 2010). Questi microrganismi, attraverso il processo della biometanazione, catturano il biossido di carbonio e lo convertono in CH₄, una molecola che possiede un importante valore energetico (Bellini et al., 2022). L'H₂ per questi batteri funge da donatore di elettroni e trasportatore di energia nella metanogenesi, ma anche nei processi di acetogenesi e omacetogenesi implicati nella digestione anaerobica (Jiang et al., 2021). Inoltre, l'aggiunta di H₂ comporta una pressione selettiva che influenza l'abbondanza relativa e la ricchezza dei diversi taxa microbici, in

particolare vengono favoriti metanogeni idrogenotrofi e batteri sintrofici (Methanoculleus, Methanothermobacter e Methanosarcina) (Bellini et al., 2022).

Tra le varie applicazioni riconducibili a quest'ultimo metodo biologico, Mikkelsen et al. (2010) riportano l'utilizzo di batteri metanogeni per poter convertire il biossido di carbonio, proveniente dagli scarichi dei forni per la produzione di ghisa, in metano. Quest'ultimo successivamente viene utilizzato come combustibile per le caldaie a vapore. L'aspetto critico è la fonte di H₂, infatti, l'idrogeno in natura non è presente in forma elementare libera, ma solo in forma legata all'interno di altri composti, come l'acqua e gli idrocarburi. L'idrogeno, quindi, non può essere estratto come le altre risorse, ma va prodotto a partire dai composti che lo contengono (attraverso l'elettrolisi dell'acqua, lo steam-reforming e la gasificazione carbone/petrolio). Tuttavia, per far sì che il processo di biometanazione sia considerato rinnovabile è necessario che l'H₂ utilizzato provenga da fonti rinnovabili (Luo & Angelidaki, 2012). Una soluzione a questo problema può essere ricercata nell'utilizzo di idrogeno verde, ossia quello prodotto per elettrolisi dell'acqua sfruttando l'eccesso di energia prodotta dell'eolico e dell'energia solare (Bassani et al., 2017; Bernacchi et al., 2014). Questo metodo innovativo, denominato *power-to-gas* (PtG), permette di immagazzinare l'energia in eccesso generata dalle turbine eoliche o dai moduli fotovoltaici (Angelidaki et al., 2018).

1.2. La digestione anaerobica

La digestione anaerobica (AD, *Anaerobic Digestion*) è un processo naturale di biodegradazione della materia organica che avviene in assenza di ossigeno (D'Bastiani et al., 2023). Il processo AD è ampiamente usato negli impianti di trattamento delle acque reflue per la gestione del fango di depurazione (Zinatizadeh et al., 2017). Il processo di digestione anaerobica porta alla produzione di una miscela di sostanze gassose chiamata biogas (Bassani et al., 2015), biomassa microbica (Chen et al., 2008) e un substrato decomposto chiamato digestato (Anukam et al., 2019). Il digestato è ricco di minerali come sali di ammonio e fosfati, e può essere ulteriormente usato per produrre ammendanti agricoli (Liu et al., 2023). Tipicamente, il biogas contiene il 60-65% di metano (CH₄), il 35-40% di biossido di carbonio (CO₂), piccole quantità di solfuro di idrogeno (H₂S), vapore d'acqua e tracce di altri gas (Deng & Hägg, 2010). Il biogas può essere ottenuto da una vasta di substrati, come alimenti organici, la frazione organica dei rifiuti solidi urbani, i già citati fanghi degli impianti di depurazione delle acque, dal letame animale e dai rifiuti organici industriali (Iglesias et al., 2021). La composizione del biogas varia a seconda dei substrati e dei parametri di processo impostati. Nella Tabella 1 vengono riportate alcune composizioni in base ad alcuni esempi di substrato digerito (Rasi et al., 2007).

Tabella 1, Composizione in % del biogas da fonti diverse (Rasi et al., 2007)

Componenti	Impianto di biogas in azienda agricola	Digestore per fognature	Discarica
CH ₄ %	55 – 58	61 – 65	47 – 57
CO ₂ %	37 – 38	34 – 38	37 – 41
N ₂ %	Traccia	Traccia	1 – 17
O ₂ %	Traccia	Traccia	0 – 2
H ₂ S%	<1	<1	<1
H ₂ O%	4 – 7	4 – 7	4 – 7
IPA%	Traccia	Traccia	Traccia

Il biogas è una fonte di energia rinnovabile in quanto prodotto a partire da biomassa organica, può essere impiegato per generare calore/elettricità utilizzabile dello stesso impianto (Sun et al., 2023), oppure per l'illuminazione pubblica, il riscaldamento delle case e altre applicazioni (Anukam et al., 2019).

Questo perché il metano presente nella miscela del gas ha un potere calorifico inferiore (LCV, *Lower Calorific Value*) elevato, pari a 36 MJ m⁻³, circa tre volte quello dell'idrogeno (10 MJ m⁻³) (Logroño et al., 2020). Tuttavia, CO₂ e altri composti residui prodotti dal processo AD, abbassano il potere calorifero del biogas, che risulta più efficiente quando caratterizzato da concentrazioni superiori di metano. Per esempio, un biogas con una percentuale di metano nell'intervallo del 60-65%, ha un LCV è approssimativamente di 20–25 MJ m⁻³ (Angelidaki et al., 2018).

Il processo della digestione anaerobica viene attuato da un consorzio di microorganismi batteri e arceobatteri dove i diversi gruppi interagiscono tra loro attraverso relazioni mutualistiche e sinergiche convertendo la materia organica complessa in monomeri solubili (amminoacidi, zuccheri semplici, acidi grassi volatili etc) (Anukam et al., 2019) La AD si divide in 4 fasi: idrolisi, acidogenesi, acetogenesi e metanogenesi (Aryal et al., 2018; Liu et al., 2023). In Figura 4 viene mostrato il processo della digestione anaerobica con i rispettivi microorganismi e i prodotti delle differenti fasi.

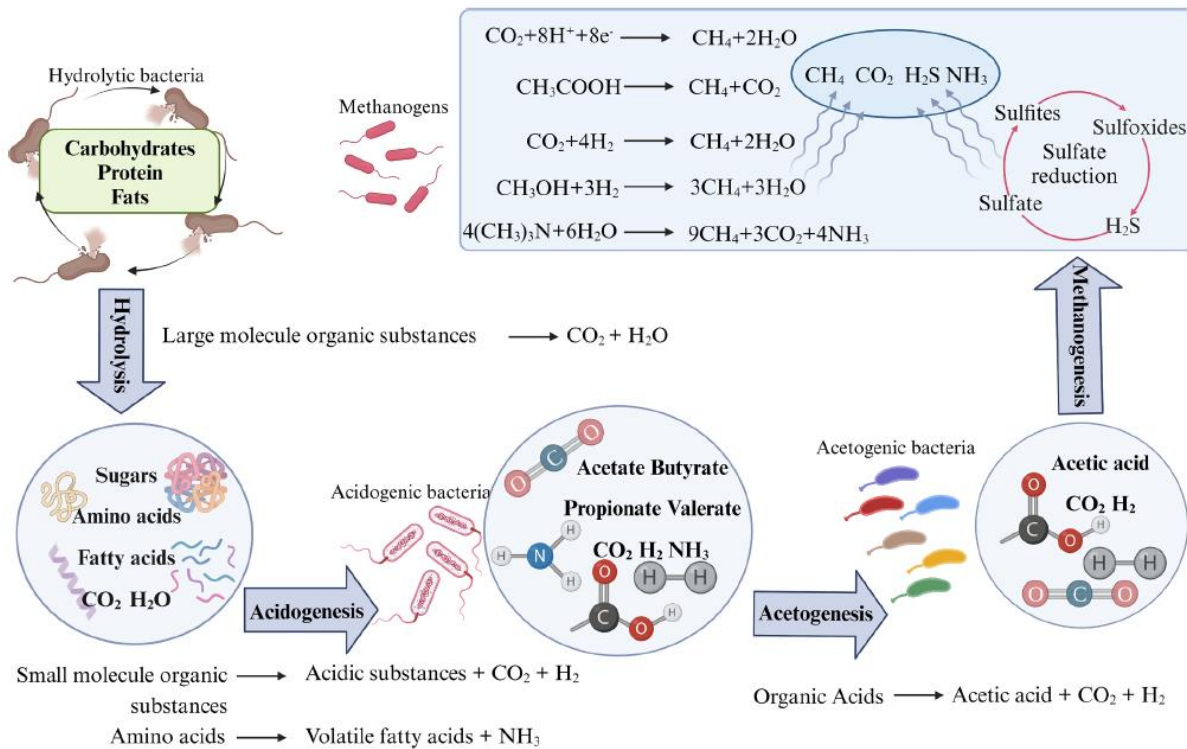
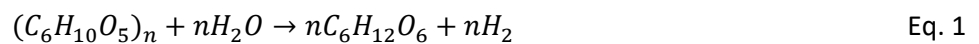


Figura 4; Rappresentazione delle fasi della digestione anaerobica (Liu et al., 2023)

Dalla Figura 4 si può vedere come durante il processo vengono prodotti anche acido solfidrico (H₂S) e ammoniaca gassosa libera (NH₃) sintetizzati rispettivamente da batteri solfato-riducenti e dai batteri ammonio-ossidanti (Liu et al., 2023).

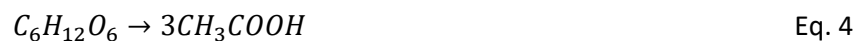
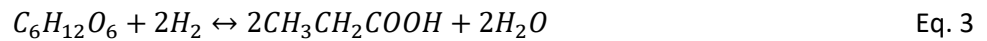
L'idrolisi è il primo step del processo di digestione anaerobica, e consiste nella rottura dei legami mediante l'aggiunta di una molecola d'acqua. L'idrolisi è una fase, che, specialmente quando viene digerita materia organica molto complessa e strutturata, può risultare il collo di bottiglia dell'intero processo, limitandone la velocità complessiva. La reazione che descrive questa fase può essere semplificata come segue (Eq. 1):



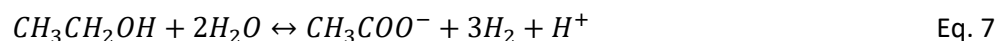
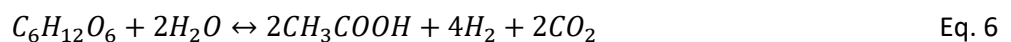
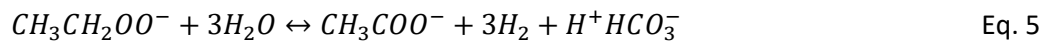
Dall'equazione (Eq. 1), si osserva che la reazione di idrolisi della cellulosa (C₆H₁₀O₅) tramite l'aggiunta di acqua (H₂O) porta alla produzione di glucosio (C₆H₁₂O₆) come prodotto principale e H₂ come sottoprodotto. La conversione da cellulosa a glucosio avviene grazie la rottura dei legami β-1,4 glicosidici che permette una successiva conversione catalitica (Anukam et al., 2019).

L'acidogenesi consiste nella fase di fermentazione, mediata dai batteri anaerobici facoltativi o obbligati, che sfrutta i composti prodotti dall'idrolisi e li converte a CO₂ e H₂ in acidi grassi volatili (VFAs, *Volatile Fatty Acids*) (Anukam et al., 2019). Poiché questa fase e quella successiva (acetogenesi) si producono

H₂ e CH₃COO⁻, è difficile separarle nettamente, tanto che in alcuni articoli sono considerate come un'unica fase (Themelis & Ulloa, 2007). Il pH gioca un ruolo essenziale nel determinare i prodotti di reazione: infatti, la produzione di VFAs aumenta quando il pH è >5, mentre a pH < 5, viene favorita la produzione di etanolo, mentre a valori di pH < 4 il processo generalmente si interrompe (Anukam et al., 2019). Le seguenti reazioni (Eq. 2 – 3 – 4) sono la sequenza reattiva che riassume la fase di acidogenesi (Barua & Dhar, 2017):



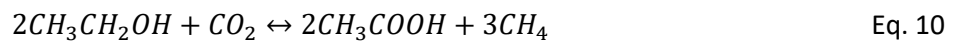
L'acetogenesi, svolta da batteri come *Methanobacterium suboxydans* e *Methanobacterium propionicum*, consiste nella conversione ad acetato (CH₃COO⁻) dei composti prodotti nella fase acidogenica precedente (Anukam et al., 2019). La serie di reazioni associata a questa fase è rappresentata dalle seguenti equazioni (Eq. 5-6-7):



Come si può notare dalle equazioni (Eq. 5 – 6 – 7), oltre alla produzione di acetato, le reazioni portano alla produzione di idrogeno. Se questo composto non fosse rapidamente rimosso dal sistema, la reazione andrebbe ad equilibrio e l'attività dei batteri acetogeni risulterebbe inibita (Anukam et al., 2019). Affinché il processo continui, quindi, è indispensabile l'attività dei batteri metanogeni idrogenotrofi che, utilizzando CO₂ e H₂ per produrre metano, spostano a destra l'equilibrio della reazione e creano una condizione termodinamicamente favorevole per permettere ai batteri fermentativi di continuare la fermentazione dei composti organici (Barua & Dhar, 2017). I principali composti prodotti nella seconda e nella terza fase sono acido acetico, acido propionico, acido butirrico ed etanolo (Themelis & Ulloa, 2007).

La metanogenesi consiste nella serie di reazioni mediate da microorganismi metanogeni anaerobi, che i composti prodotti nelle fasi precedenti in metano (Barua & Dhar, 2017). Tra le specie coinvolte in questa fase abbiamo: *Methanobrevibacter ruminantium*, *M. bryantici* e *M. thermoautotrophicum*, *Methanogenium cariaci* e *M. marisnigri* (Anukam et al., 2019).

La metanogenesi presenta come vie principali in base al tipo di substrato consumato, la via di riduzione del CO₂ (via Wood Ljungdahl o idrogenotrofa, Eq. 8) e la via acetotrofa (via acetoclastica, Eq. 9) (Garcia et al., 2000). I metanogeni acetofili producono metano dalla decarbossilazione dell'acetato (metanogenesi acetoclastica, via acetoclastica, Eq. 9), mentre i metanogeni idrogenotrofi producono metano dalla riduzione del biossido di carbonio usando l'idrogeno come riducente (metanogenesi idrogenotrofa, via idrogenotrofa, Eq. 8) (Enzmann et al., 2018). Altri substrati usati in questa fase sono l'acido metanoico (CH₃OOH), il solfato di dimetile ((CH₃)₂SO₄), il metanolo (CH₃OH), l'etanolo (CH₃CH₂OH) e la metilammina (CH₃NH₂) (Anukam et al., 2019).



Nella Figura 5 vengono rappresentate le 2 vie metaboliche della metanogenesi.

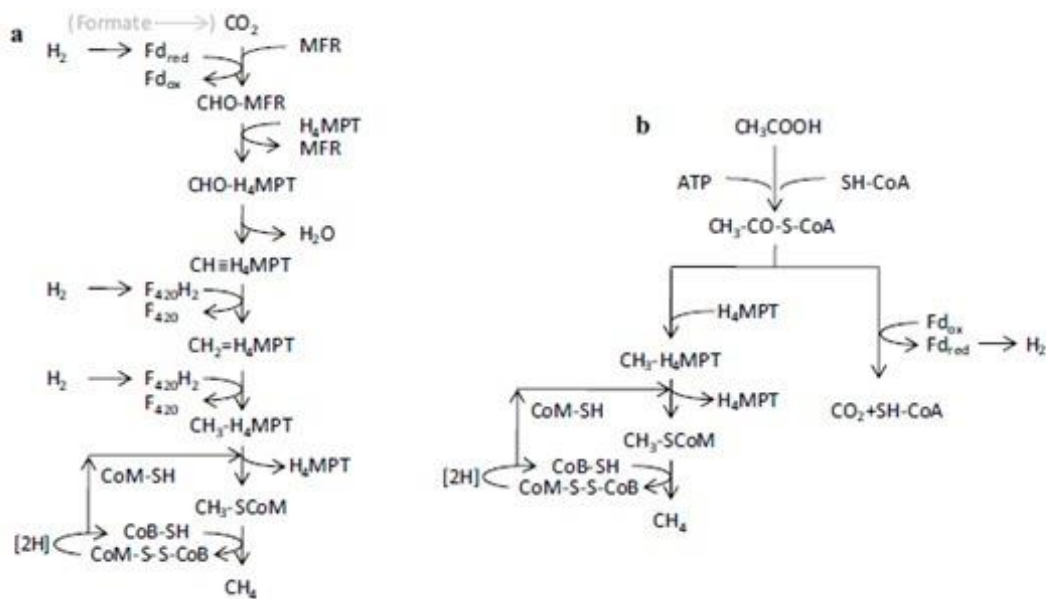


Figura 5, Vie metaboliche della metanogenesi con enzimi e coenzimi della via idrogenotrofa (a), della via acetoclastica (b) (Enzmann et al., 2018; modificato)

Si ritiene che nel processo AD il 70% del CH₄ sia prodotto direttamente dalla metanogenesi acetoclastica, mentre il 30% dalla metanogenesi idrogenotrofa (Yun et al., 2017). Nonostante questo, la via idrogenotrofa sembra essere quella più efficiente, dal punto di vista metabolico, per generare energia e fissare il carbonio (Lever, 2016), e il fatto che in un tradizionale processo di digestione anaerobica non venga prodotto più metano per questa via è tendenzialmente dovuto a limitazioni di substrato, dovuto alla scarsa presenza di idrogeno nel sistema.

1.3. La biometanazione

La biometanazione è il processo catalizzato da microorganismi metanogeni idrogenotrofi che, sfruttando l'idrogeno come donatore di elettroni, utilizzano il biossido di carbonio e lo riducono a metano (Logroño et al., 2020). La biometanazione può essere utilizzata per incrementare la percentuale di metano presente nel biogas, tramite un processo di *biological biogas upgrading*. La biometanazione viene effettuata fornendo H₂ ai batteri idrogenotrofi. Può essere effettuata in tre modi, *in-situ*, *ex-situ* e mediante processi ibridi (Kougias et al., 2017). Convertire a metano l'idrogeno, e in particolare quello prodotto da tecnologie sostenibili (e.g., quello prodotto da elettrolisi alimentata dal surplus di energia durante i picchi di produzione dell'eolico e del fotovoltaico (Wahid et al., 2019), consentirebbe di sopperire ai problemi legati all'uso del H₂ come fonte di energia. Per esempio, il trasporto e la sua gestione implicano tecnologie per utilizzo che sono ancora in fase di sviluppo, e la sua compressione comporta un elevato dispendio energetico (Alfaro et al., 2018). Il rapporto stechiometrico ottimale è 4:1 di H₂:CO₂, poiché permette un buon consumo dei substrati da parte dei microorganismi (Kozak et al., 2022). Tuttavia, la presenza di bicarbonato nell'inoculo potrebbe rendere il rapporto 4:1 insufficiente per convertire tutto il biossido di carbonio in metano (Zabranska & Pokorna, 2018). La biomassa impiegata nella biometanazione manifesta una notevole sensibilità alle variazioni di temperatura e di pH. Le condizioni mesofile e termofile rappresentano i range di temperatura ottimali per il processo, mentre il range ottimale di pH va da pH 7,0 a 8,0 e il processo viene inibito a valori inferiori a 6,0 e superiori a 8,5 (Liu & Whitman, 2008; Weiland, 2010)

1.3.1. La biometanazione in-situ ed ex-situ

La biometanazione in-situ consiste nell'iniettare idrogeno direttamente nel digestore anaerobico, dal quale proviene il biogas da arricchire (Bassani et al., 2016; Kougias et al., 2020; Luo & Angelidaki, 2012). Nella Figura 6 viene rappresentato il processo.

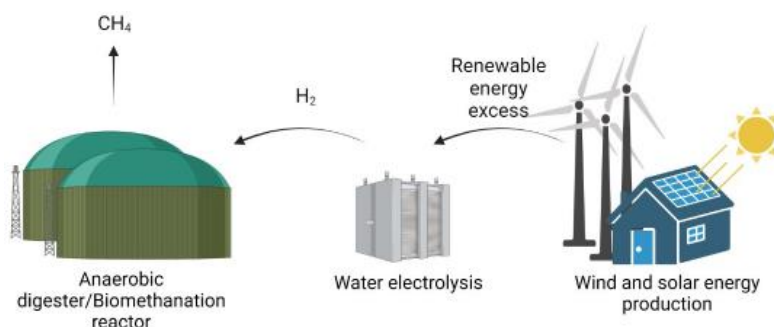


Figura 6, Schema del processo di biometanazione in situ (Bellini et al., 2022)

In questi sistemi, i batteri idrogenotrofi presenti nel sistema utilizzano l'idrogeno alimentato per convertire il biogas a biometano, convertendo cioè la CO₂ in esso contenuta, così da aumentare la concentrazione di metano della miscela. Il principale problema di questo sistema consiste nell'aumento di pH causato dalla

rimozione di CO₂. Questo perché il CO₂ disciolto nella fase liquida si dissocia in H⁺ e HCO₃⁻. La diminuzione del CO₂ nello spazio di testa causa una diminuzione della concentrazione di HCO₃⁻ nel mezzo di processo, e di conseguenza ad un abbassamento della forza tampone della forza tampone del bicarbonato e ad un incremento di pH (Tao et al., 2019). Inoltre, la pressione parziale dell'idrogeno dosato, se supera una pressione parziale di 10⁻³-10⁻⁴ atm , porterebbe ad inibizione del sistema e ad un accumulo di VFA, con conseguente diminuzione del pH e possibile collasso del sistema (Jiang et al., 2021).

I sistemi *ex-situ* si prefiggono l'obiettivo di far fronte alle problematiche (sopracitate) riscontrate nei sistemi *in-situ* (Thapa et al., 2023). La biometanazione *ex-situ* consiste nell'iniettare H₂ e CO₂ in un reattore apposito con cultura mista o pura (Kougias et al., 2017; Kozak et al., 2022; Wahid & Horn, 2021). Nella Figura 7 viene rappresentato il processo .

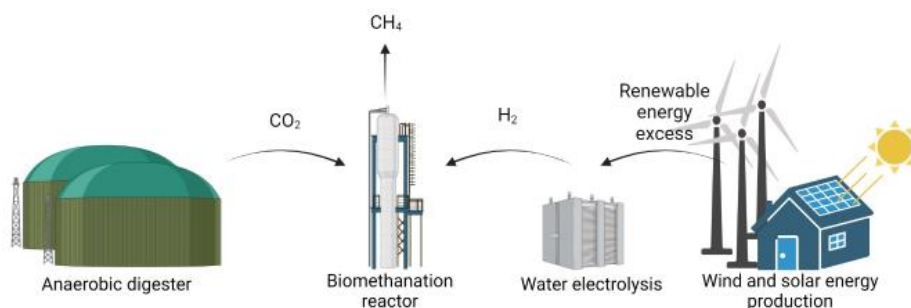


Figura 7, Schema del processo di biometanazione *ex situ* (Bellini et al., 2022)

Il processo può essere utilizzato sia per l'*upgrade* del biogas, sia per la conversione a metano di biossido di carbonio proveniente da diverse fonti, come dalla gassificazione di biomasse e da processi industriali (Bellini et al., 2022), il syngas (Guiot et al., 2011) e il gas da forno coke (Wang et al., 2013).

Sia la biometanazione *in-situ* che quella *ex-situ* hanno come problematica la produzione di idrogeno. Questo perché la sua produzione con le attuali tecnologie di elettrolizzazione, presenta elevanti costi. (Vo et al., 2018). Tuttavia, si presume che con lo sviluppo tecnologico entro il 2050 i costi per produrre l'idrogeno diminuiranno agevolando l'installazione di questi sistemi su scala reale (Thema et al., 2019).

1.3.2. Tipologie di reattori

I tipi di reattori usati nell'ambito dei processi biologici di digestione anaerobica e biometanazione sono di diverse tipologie e vengono scelti in base alla biomassa e alle caratteristiche dei substrati utilizzati. Nei paragrafi successivi vengono illustrate le principali caratteristiche dei reattori CSTR (*Continuous stirred tank reactor*) e UASB (*Upward-flow anaerobic sludge blanket*).

I reattori CSTR sono costituiti da un serbatoio cilindrico in cui c'è un continuo apporto di substrato che viene costantemente mescolato mediante: i) un sistema meccanico di miscelazione o ii) mediante continua ricircolazione del contenuto del reattore (Rusmanis et al., 2019). Nella Figura 8 viene schematizzata la struttura di un reattore CSTR. Questo tipo di configurazione di reattore più comunemente utilizzato sia in studi in-situ che ex-situ visto le sue capacità di solubilizzare substrati gassosi (Jensen et al., 2021). Il biogas per essere utilizzato dagli utenti finali deve presentare concentrazioni di metano $\geq 95\%$ e di idrogeno $< 2\%$ (Altfeld & Pinchbeck, 2013). Dalla letteratura scientifica alcuni studi che hanno utilizzato un reattori CSTR per la biometanazione sono stati in grado di produrre biogas con concentrazioni di metano $\geq 95\%$ (Bassani et al., 2015; H. Jiang et al., 2021). In questa tipologia di reattore la resa di biometanazione può essere incrementata aumentando la velocità d'agitazione, così da rompere le bolle di gas insufflate, in bolle più piccole, e all'aumentare così il trasferimento di massa gas/liquido, aumentando però allo stesso tempo anche i costi operativi (Rusmanis et al., 2019).

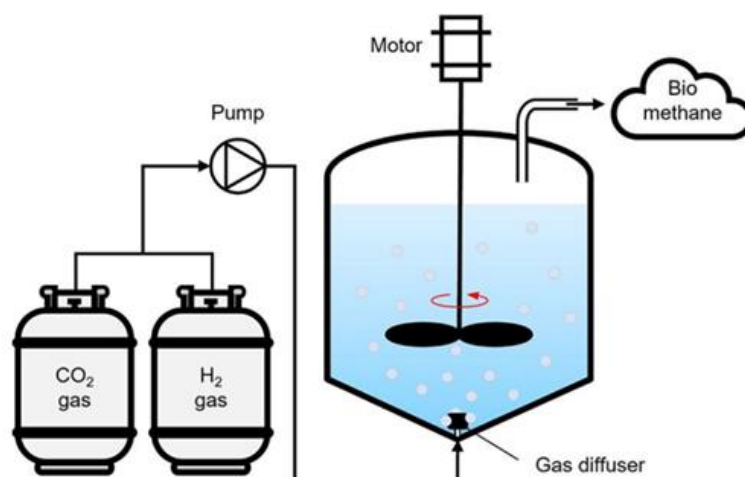


Figura 8, Schema di un reattore CSTR con H₂ esogeno e CO₂ (Thapa et al., 2023)

I reattori UASB sono costituiti da un serbatoio cilindrico e un separatore gas-liquido-solido (Chong et al., 2012). Il reattore a letto granulare espanso (EGSB, *Expanded Granular Sludge Bed*) è una variante dell'UASB, in cui viene aumentata la velocità superficiale di flusso ascendente tramite l'applicazione di un rapporto

altezza/diametro maggiore per il reattore e mediante il ricircolo del refluo (Fang et al., 2011). Nella Figura 9 viene rappresentata la struttura di un reattore UASB.

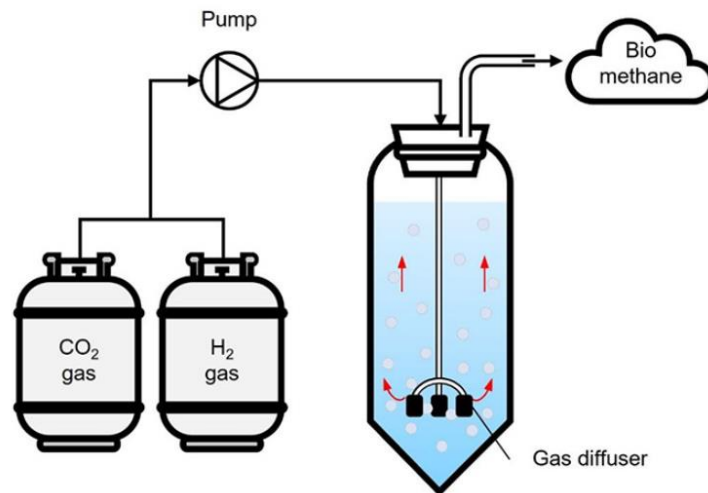


Figura 9, Schema di un reattore UASB con H₂ esogeno e CO₂ (Thapa et al., 2023)

Sia i reattori UASB che EGSB utilizzano i fanghi granulari, degli agglomerati tridimensionali di microorganismi, caratterizzati da un'elevata velocità di sedimentazione. Questa loro caratteristica consente quindi di incrementare il tempo di ritenzione dei solidi nel reattore, così da massimizzare il rapporto microorganismi-spazio e consentire di applicare al sistema carichi organici più elevati (Ghangrekar et al., 2005). In questi reattori è presente un letto composto da fango granulare (o floculato), attraversato da un flusso ascendente di liquido che, all'interno del quale sono disciolti i composti solubili da convertire convertiti a biogas (Chong et al., 2012). La forma granulare permette un alto tempo di ritenzione dei solidi grazie alle sue eccellenti proprietà di sedimentazione, fornendo il massimo rapporto microorganismi-spazio e l'applicazione di carichi più elevati rispetto al reattore UASB con fango flocculento (Ghangrekar et al., 2005). Tuttavia, uno degli svantaggi nell'utilizzare questi reattori sono i lunghi tempi di avvio che vanno dai 2 agli 8 mesi per poter formare il fango granulare anaerobico (Liu et al., 2003). Comprendere come si sviluppa la struttura dei fanghi granulari nei reattori UASB, può aiutare controllarne la formazione. Un modello proposto da Macleod et al., (1990) e quello a tre strati che viene rappresentato nella Figura 10.



Figura 10, Rappresentazione della struttura a strati dei fanghi granulari (Springael et al., 2018; modificato)

Secondo la Figura 10 nello strato esterno abbiamo una popolazione eterogenea di microorganismi acidogenici e idrolitici. Lo strato intermedio contiene microorganismi acetogenici che producono l'acido acetico, l'idrogeno e l'anidride carbonica. Questi substrati verranno poi utilizzati dai metanogeni acetoclastici e idrogenotrofi che sono situati nello strato più interno prossimo al nucleo inorganico di aggregazione (Macleod et al., 1990). La composizione batterica e la struttura del fango granulare variano a seconda dal tipo di substrato e dei parametri operativi (Molina et al., 2008). La presenza all'interno dei granuli di cavità e l'elevata vicinanza tra i diversi gruppi trofici, rende il trasferimento dei substrati e la degradazione dei composti organici estremamente efficace. I granuli possono essere disgregati da elevate forze di taglio, e per prevenire questo problema è stata studiata la possibilità di incapsulare i granuli in matrici polimeriche sia singolarmente che in cluster di granuli (Springael et al., 2018).

Diversi parametri influenzano la formazione dei granuli. Xu et al., 2018 hanno notato che un aumento del carico organico in ingresso (OLR, *Organic Loading Rate*) e della velocità di svuotamento stimola i microrganismi a secernere maggiori quantità di sostanze polimeriche extracellulari (EPS, *Extracellular polymeric Substances*) che facilitano la formazione di grandi aggregati (Xu et al., 2018). All'aumento del OLR si ha un aumento del contenuto di proteine che aumenta l'idrofobicità della superficie cellulare, facilitando la formazione dei granuli (Xu et al., 2018). Una concentrazione di VFA inferiore a 200 mg/l sembra essere utile per la formazione di fango granulare (Ghangrekar et al., 2005). L'utilizzo di questi reattori è stato riportato ampiamente nella letteratura scientifica e in alcuni studi sono stati utilizzati reattori UASB o sono state raggiunte percentuali di metano >95% paragonabili a quelle ottenute negli studi con reattori CSTR (Kougias et al., 2017).

2. Stato dell'Arte del processo di biometanazione

2.1. Parametri di processo

L'idrogeno è una molecola con bassa solubilità (Bellini et al., 2022; Mikkelsen et al., 2010). Nella biometanazione, i substrati sono iniettati nei reattori come gas, mentre i metanogeni idrogenotrofi che fungono da biocatalizzatore possono metabolizzare questi composti solo quando presenti nella fase liquida, e questo limita la riduzione del CO₂ a CH₄ (Rafrafi et al., 2021). La solubilità dei gas viene descritta dalla legge di Henry (Eq. 11) che si esprime come (Bellini et al., 2022):

$$C = H_k \times P \quad \text{Eq. 11}$$

dove C è la concentrazione del gas solubilizzato a una certa temperatura in un solvente specifico, H_k è la costante di Henry e P è la pressione parziale del gas. La solubilità del CO₂ è significativamente maggiore rispetto a quella dell'H₂ in fase acquosa perché i coefficienti delle leggi di Henry per H₂ e CO₂ in acqua a 60°C sono rispettivamente di 36 bar L mol⁻¹ e 1408 bar L mol⁻¹ (Salehizadeh et al., 2020).

Quindi solubilizzare l'idrogeno rappresenta il passo limitante sia nei processi "in situ" che "ex situ" (Ahern et al., 2015). All'aumentare della temperatura abbiamo un aumento dell'energia cinetica delle molecole di gas che limita la formazione di legami tra solvente e soluto, causando una riduzione della solubilità (Jensen et al., 2021). Anche la viscosità del fluido influenza la diffusione del gas, e questa allo stesso tempo è influenzata dalla temperatura. In particolare, all'aumento della temperatura corrisponde una diminuzione della viscosità e quindi una maggiore diffusività dei gas (Bellini et al., 2022). Questi tre parametri sono correlati con il coefficiente di trasferimento di massa ($K_L \alpha$) (Özbek & Gayik, 2001).

Per comprendere il trasferimento di massa gas/liquido ci viene in aiuto la teoria dei due film, che afferma che il gas viene trasferito dalla fase gassosa bulk all'interfaccia gas/liquido e poi si diffonde nella fase liquida bulk (Lewis & Whitman, 1924). La resistenza diffusiva al trasferimento si ha all'interfaccia tra strati stagnanti di gas e liquido adiacenti all'interfaccia gas/liquido e la forza trainante del trasferimento di massa è il gradiente di concentrazione (Jensen et al., 2021). Nella Figura 11 viene rappresentato come avviene il trasferimento di massa del gas da una bolla di gas alle cellule microbiche

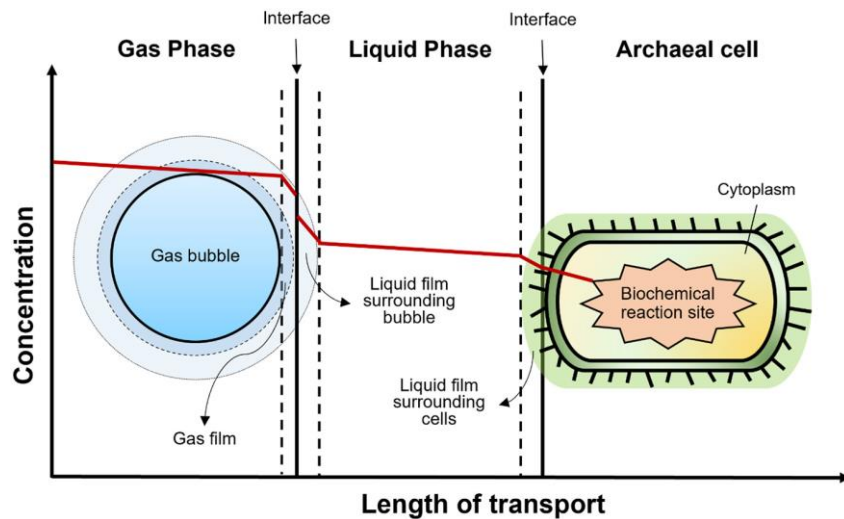


Figura 11, Trasferimento di massa gas/liquido dal gas bulk fino al sito di reazione biochimico

Se consideriamo il trasferimento di massa dell'idrogeno possiamo descrivere il fenomeno con la seguente equazione (Eq. 12) (Thapa et al., 2023):

$$Rt = 22,4K_L\alpha(H_{2g} - H_{2L}) \quad \text{Eq. 12}$$

dove Rt è il trasferimento di massa gas/liquido di H_2 ($\text{mol L}^*\text{h}^{-1}$), $K_L\alpha$ è il coefficiente di trasferimento di massa gas/liquido (h^{-1}), H_{2g} è la concentrazione di H_2 nella fase gassosa (mol L^{-1}), H_{2L} è la concentrazione di H_2 nella fase liquida (mol L^{-1}) e 22,4 è il volume in L che ha una mole di gas a temperatura e pressione standard. $K_L\alpha$ comprende altri due coefficienti: il coefficiente di film (K_L), dipendente dalle caratteristiche fisico-chimiche del gas e del liquido, e α , l'area di interfaccia per unità di volume di liquido (Özbek & Gayik, 2001). Essendo che la quantità di solidi aumenta la viscosità, e questi risultano in quantità maggiori nei fanghi usati per la metanogenesi in situ, il trasferimento di massa sembra essere favorito nei processi ex situ perché nel digestato utilizzato presenta una minor quantità di solidi (Rachbauer et al., 2017).

Se consideriamo la solubilità del gas possiamo riscrivere l'equazione come (Bellini et al., 2022):

$$Rt = 22,4K_L\alpha(H_k \times P \times H_{2g} - H_{2L}) \quad \text{Eq. 13}$$

Il basso trasferimento di massa gas/liquido dell' H_2 è una limitazione dei processi di biometanazione (Bassani et al., 2016). Una delle strategie per aumentare il trasferimento di massa dell'idrogeno, è aumentare la pressione parziale dell'idrogeno (Rafrafi et al., 2021). Tuttavia, come è stato detto in precedenza, questo potrebbe portare all'inibizione del processo e all'accumulo di VFA (Jiang et al., 2021). Per non incorrere in questo problema, si può aumentare il coefficiente di trasferimento di massa gas/liquido (Thapa et al., 2023). Tra i parametri che influenzano il coefficiente di trasferimento abbiamo: l'agitazione, la pressione, la temperatura, l'attività microbica, la progettazione del reattore e il ricircolo del gas (Jensen et al., 2021). L'incremento della velocità di agitazione è il metodo più usato per aumentare il trasferimento di massa

(Alitalo et al., 2015). Perché si riducono le dimensioni delle bolle di gas, incrementando la superficie di interfaccia gas/liquido e aumenta il $K_L\alpha$ (Jensen et al., 2021). Le velocità di agitazione variano dai 150 rpm (Bassani et al., 2015), fino ad arrivare agli 800 rpm (Luo & Angelidaki, 2012). In particolare, Luo & Angelidaki, 2012 con un reattore CSTR che lavorava in condizioni termofile per l'upgrade del biogas, passando da 500 rpm a 800 rpm hanno avuto un aumento del contenuto del metano fino al 95%. Questo perché l'alta miscelazione ha ridotto di dimensioni le bolle migliorando le interazioni gas-liquido (Luo & Angelidaki, 2012). Anche Jiang et al., 2021 aumentando la velocità di agitazione a 300 rpm hanno ottenuto delle buone rese di produzione e la conversione completa dell' H_2 alimentato. Invece, Bassani et al., 2015 hanno ottenuto delle basse percentuali di utilizzo di idrogeno (tra il 66% e il 77% di H_2 utilizzato) nei loro reattori mesofili e termofili utilizzati per l'upgrade del biogas. Kougiyas et al., (2017) affermano che aumentare la $K_L\alpha$ incrementando l'agitazione potrebbe non essere il modo migliore, in quanto mantenere elevati rpm va incidere sui costi energetici e rende il processo non economicamente sostenibile (Thapa et al., 2023). Zhu et al., 2019 testando una miscelazione intermittente e una continua, hanno riportato che il mescolamento continuo nel reattore mesofilo abbia ostacolato la produzione di metano, fenomeno invece non osservato in condizioni di termofilia. Per migliorare la superficie d'interfaccia gas/liquido e prolungare il tempo di ritenzione tra il gas (H_2) e i microorganismi, si può lavorare sul ricircolo del gas dello spazio di testa (Jensen et al., 2021). Kougiyas et al., (2017) hanno aumentato il ricircolo del gas da 4 L h^{-1} a 12 L h^{-1} in varie configurazioni reattoristiche, ottenendo un incremento nelle rese di processo all'aumentare del ricircolo, arrivando a dei contenuti di metano pari al 98%. Bassani et al., 2017 raddoppiando il ricircolo dei reattori termofili a flusso ascendente, hanno avuto un aumento del 36% del $K_L\alpha$. Comunque, anche elevati tassi di ricircolo vanno a pesare sui costi energetici (Thapa et al., 2023). Inoltre, è stato riportato che valori elevati di questo parametro possono instaurare flussi turbolenti che nei reattori con inoculi granulari rischiano di disintegrare i granuli, diminuendo la produzione di metano (Bassani et al., 2015). Anche come si disperdono le bolle di gas può influenzare il $K_L\alpha$ (Jensen et al., 2021). Bassani et al., 2017 hanno testato un diffusore in acciaio inossidabile e uno a membrana in reattori termofili, riscontrando produzioni di metano più elevate nel reattore con diffusore con pori più grandi (in acciaio). Una dinamica simile era successa anche a Luo & Angelidaki, 2012, dove l'alta miscelazione ha ridotto di dimensioni le bolle migliorando le interazioni gas-liquido. Ghofrani-Isfahani et al., 2021 utilizzando un diffusore ceramico (con diametro dei pori pari a $7 \mu\text{m}$) ha migliorato la miscelazione del gas e ottenuto un contenuto di metano pari al 97%.

Un aumento della pressione del gas porterà ad un aumento della solubilità, perché ci saranno più molecole all'interfaccia gas liquido disponibili per i microorganismi (Özbek & Gayik, 2001). Questo fatto sembra utile al miglioramento del trasferimento di massa, delle prestazioni e dei tassi di crescita dei metanogeni idrogenotrofi (Özbek & Gayik, 2001). Martin et al., 2013 in un reattore termofilo con un aumento della pressione da 101 kPa a 122 kPa hanno osservato un incremento di produzione di metano da $50,0 \text{ L}$ a $65,6 \text{ L}_{\text{CH}_4} (\text{L}^*\text{d})^{-1}$. Comunque, anche questo parametro va ad incidere sui costi energetici del processo (Thapa et al.,

2023), e quindi va valutato caso per caso se l'incremento nelle rese di processo dovuto all'applicazione di un maggior rapporto di ricircolo, come di una maggiore velocità di agitazione, è o meno economicamente ed energeticamente sostenibile.

2.2. Determinazione dell'attività specifica di metanazione idrogenotrofa

Comprendere la rilevanza della metanogenesi idrogenotrofa e acetoclastica, è cruciale per ottimizzare le condizioni operative dei reattori anaerobici (Ripoll et al., 2020). In passato sono stati studiati metodi come la conta del numero probabile (MPN, *Most Probable Number*) e la quantificazione di componenti molecolari specifici di determinati gruppi trofici (Coates et al., 1996). Tuttavia, essendo la digestione anaerobica basata sull'interazione sinergica di un consorzio di microorganismi diversificato, non è facile riuscire a definire l'abbondanza dei singoli microorganismi o definire l'attività metanogenica potenziale basandosi sulla quantificazione di singoli composti, rendendo quindi questi metodi inaffidabili (Dolfing & Mulder, 1985). Il metodo diventerebbe più affidabile estraendo e quantificando separatamente molti cofattori o coenzimi, ma questo implica tecniche complesse, impegnative e costose (Coates et al., 1996). Col passare degli anni e con il progredire delle tecnologie sono stati ideati strumenti per cercare di sopperire la mancanza di un metodo affidabile, come la quantificazione di DNA e mRNA, e l'utilizzo di molecole radiomarcate, risultando però anche in questo caso inadatti a determinare quanto siano attivi i microorganismi (Ripoll et al., 2020).

L'attività metanogenica specifica è la capacità di produzione di metano specifica per un determinato consorzio di microorganismi (Hussain & Dubey, 2017), e viene definita come la massima velocità di produzione di metano da un substrato utilizzato da una biomassa presente nel digestato (Ripoll et al., 2020). La biomassa del consorzio anaerobico viene espressa come solidi sospesi volatili (VSS). Nell'ultima fase della digestione anaerobica, il metano si forma principalmente da acetato o da H₂ e CO₂. Idrogeno e biossido di carbonio vengono usati dai metanogeni idrogenotrofi, mentre l'acetato viene usato in parte dai metanogeni acetoclastici per produrre metano, e in parte da altri batteri che tramite ossidazione acetica sinergica (SAO, *syntrophic acetate oxidation*) lo convertono nuovamente a H₂ e CO₂, nuovamente disponibile per il sistema (Sun et al., 2014). Jiang et al., (2018), con la tecnica di tracciamento con acetato marcato con ¹⁴C, hanno osservato che il 68 – 75% di CH₄ formato in un digestore anaerobico mesofilo, veniva prodotto attraverso l'ossidazione sintrofica dell'acetato accoppiata con la metanogenesi idrogenotrofica. Definire lo SMA (Attività Specifica di Metanazione, *Specific Methanogenic Activity*) può essere un metodo valido per monitorare la resa e soprattutto la potenzialità di un digestore anaerobico o di un biometanatore (Ripoll et al., 2020). Nello specifico è possibile definire e l'attività metanogenica idrogenotrofa specifica (SHMA, *Specific Hydrogenotrophic Methanogenic Activity*) per il consumo di H₂ (Ripoll et al., 2020).

Il primo metodo di determinazione dello SHMA, proposto da Dolfing & Bloemen, 1985, consiste nell'analisi a gascromatografo del gas prodotto, per definire la concentrazione dei vari componenti (H₂, CO₂ e CH₄),

combinata alla misurazione della pressione dello spazio di testa del reattore, per definire il volume di gas prodotto. Bisogna tenere in considerazione, però, che la produzione di metano per via idrogenotrofa, a differenza della produzione per via acetoclastica, non comporta un aumento di pressione dello spazio di testa del reattore, bensì una sua diminuzione, che può essere monitorata per calcolare il volume di gas prodotto tramite metanazione idrogenotrofa. Questo primo metodo, però, risulta laborioso e richiede molto tempo a causa delle molteplici misurazioni cromatografiche. Inoltre, i continui campionamenti del gas comportano una diminuzione di pressione nello spazio di testa legata non solo consumo di H₂ e CO₂, ma anche ai campionamenti stessi, complicando l'interpretazione dei dati ottenuti. Per far fronte a questo problema Coates et al., 1996 hanno proposto un metodo di determinazione dello SHMA esclusivamente manometrico, che consiste nel calcolare il numero di moli di metano prodotti solo in base alla pressione dello spazio di testa, senza analisi cromatografiche. Il metodo sarà descritto e approfondito nel paragrafo Materiali e Metodi, al Paragrafo 4.4.

Ripoll et al., 2020 hanno applicato questo metodo di determinazione su otto diversi consorzi microbici, prelevati da reattori differenti. Il metodo proposto da Ripoll et al., 2020 ha permesso di ridurre i tempi per determinare la SHMA di un digestato fino a 7 – 10 ore.

Vari autori hanno calcolato l'attività metanogenica idrogenotrofa di biomasse prelevate da diverse configurazioni di reattori CSTR e UASB (Tabella 2). Tra questi, Regueiro et al., (2012) hanno calcolato i livelli di attività metanogenica specifica su diversi reattori e differenti tipi di rifiuto notando che l'attività era influenzata dalla biomassa. Hao et al., (2017), hanno studiato come l'aggiunta di idrogeno esterno potesse inibire o favorire il processo di biometanazione in batch utilizzando un biomassa sospesa di un reattore CSTR in condizioni mesofile. Gonzalez-Estrella et al., (2013) hanno testato i granuli di un reattore UASB che trattava acque reflue da un birrificio, ottenendo uno SHMA pari a $0,57 \pm 0,03 \text{ g}_{\text{COD}} \text{ g}_{\text{VSS}}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Liu et al., (2016) hanno calcolato l'attività metanogenica specifica in digestati con diverso contenuto di solidi, perché questi possono influenzare il processo di AD nei digestori anaerobici che trattano i fanghi. Si è potuto riscontrare che un aumento dei solidi totali può diminuire l'attività metanogenica. Gli SHMA erano pari a $0,018 \pm 0,001 \text{ g}_{\text{COD}} \text{ g}_{\text{VSS}}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e a $0,021 \pm 0,004 \text{ g}_{\text{COD}} \text{ g}_{\text{VSS}}^{-1} \text{ d}^{-1}$ rispettivamente per il CSTR con alta concentrazione di TS (14,4 %_{TS}) e per il CSTR a basso carico di TS (4,2 %_{TS}). Ripoll et al., (2020) nel loro elaborato hanno calcolato i valori di SHMA e di SMP da otto diversi campioni di digestato provenienti da reattori anaerobici diversi. Nella Tabella 2 sono riportati i dati SHMA di questi studi, che saranno utilizzati per confrontare e discutere i risultati degli esperimenti ottenuti in questa tesi.

Tabella 2, SHMA dalla letteratura scientifica

Autore	Reattore di provenienza e tipo di rifiuto	SHMA $g_{\text{COD(CH}_4\text{)}} g_{\text{VSS}}^{-1} d^{-1}$	SMP _{biomassa} $g_{\text{COD(CH}_4\text{)}} g_{\text{VSS}}^{-1}$
Gonzalez-Estrella et al., (2013)	UASB in scala reale (Birrificio)	0,57 ± 0,03	-
Reguero et al., (2012)	UASB in scala reale (Latticini/pesce)	0,84 ± 0,08	-
Liu et al., (2016)	CSTR high Ts in scala reale (Fanghi da WWTP)	0,018 ± 0,001	-
	CSTR low TS in scala da laboratorio Fanghi da (WWTP)	0,021 ± 0,004	-
Hao et al., (2017)	CSTR in scala reale (Fanghi da WWTP)	0,045 ± 0,002	-
Ripoll et al., (2020)	UASB in scala reale (latticini)	0,48 ± 0,03	0,14 ± 0,03
	EGSB in scala pilota (latticini)	0,35 ± 0,01	0,41 ± 0,06
	EGSB in scala pilota (beverage)	0,26 ± 0,01	0,15 ± 0,03
	EGSB in scala da laboratorio (proteine)	0,48 ± 0,03	0,39 ± 0,05
	CSTR in scala da laboratorio (Letame)	0,072 ± 0,007	0,05 ± 0,01

Come si può intuire, lo SHMA è un ottimo strumento per comprendere e valutare le performance di un processo biologico di biometanazione. Inoltre, permette il confronto tra processi biologici che possiedono configurazioni reattoristiche diverse. Dal confronto tra i dati riportati in Tabella 2, è interessante notare che le attività dei reattori UASB con fanghi granulari di Gonzalez-Estrella et al., (2013) e di Reguero et., (2012) superino le attività metanogeniche idrogenotrofe specifiche dei reattori CSTR con biomassa sospesa di Liu et al., (2016) e Hao et al., (2017). Questo fa notare come i granuli rispetto ad una biomassa sospesa possano essere più produttivi nei processi di biometanazione.

3. Scopo della Tesi

Lo scopo generale del progetto di tesi è quello di verificare la possibilità di utilizzare un processo biologico che sfrutta consorzi anaerobici misti provenienti da fanghi granulari anaerobici, finalizzato alla conversione del biossido di carbonio e dell'idrogeno a metano (biometanazione).

Al fine di raggiungere questo obiettivo è necessario rispondere ai seguenti obiettivi specifici:

- definire, sulla base delle caratteristiche chimico-fisiche delle biomasse considerate (sospesa e granulare), i parametri operativi dei test batch;
- valutare l'attività di biometanazione idrogenotrofa della biomassa sospesa in test batch con progressivo adattamento della biomassa mediante aggiunta dei substrati (H_2 e CO_2), in modo da favorire la crescita dei microorganismi (metanogeni idrogenotrofi),
- valutare l'attività di biometanazione idrogenotrofa della biomassa granulare in test batch con progressivo adattamento della biomassa mediante aggiunta dei substrati (H_2 e CO_2), in modo da favorire la crescita dei microorganismi (metanogeni idrogenotrofi),
- confrontare le rese ottenute dalle due tipologie di biomasse utilizzate mediante analisi delle attività di biometanazione (SHMA, Specific Hydrogenotrophic Methanogenic Activity e Specific Methane Potential, SMP);
- valutazione delle problematiche legate alla solubilizzazione dei substrati gassosi.

4. Materiali e Metodi

4.1. Inoculi utilizzati

Durante le prove sperimentali sono stati utilizzati inoculi di biomassa sospesa e granulare. Come inoculo di biomassa sospesa è stato utilizzato del digestato prelevato da un digestore anaerobico mesofilo a piena scala che tratta reflui organici municipali. Come inoculo di biomassa granulare sono stati utilizzati i granuli prelevati dal reattore UASB a piena scala di un impianto di trattamento reflui industriali ad alto carico di COD.

Il digestato è stato setacciato con un setaccio a maglie da 2 mm, così da omogeneizzarlo e rimuovere eventuale materiale grossolano o inerte presente, e poi è stato degasato in stufa a 39 °C per una settimana.

I granuli sono stati setacciati con setaccio a maglia fine da 0,75 mm per rimuovere il liquido di processo in cui erano stoccati, e asciugati con tre passaggi di carta assorbente sul fondo del setaccio per rimuovere il liquido in eccesso. Dopo di che, i granuli sono stati trasferiti in un contenitore e mantenuti immersi nel mezzo basale BA (descritto al paragrafo 4.3), e lasciati a degasare in stufa a 39 °C per una settimana.

Successivamente, sia digestato che fanghi granulari sono stati caratterizzati per determinarne il contenuto di solidi totali e di solidi totali volatili (Tabella 3). Prima dell'analisi del contenuto di solidi dei fanghi granulari, dall'aliquota di campione analizzato è stato rimosso il liquido di mantenimento BA, seguendo la stessa procedura della rimozione del liquido di processo.

Tabella 3, Caratterizzazione TS e TVS degli inoculi

Inoculo	TS (g _{TS} kg _{TQ} ⁻¹)	TVS (g _{TS} kg _{TQ} ⁻¹)	TVS/TS (%)
Digestato	34,9 ± 0,2	19,2 ± 0,1	54,8 ± 0,3
Fanghi granulari	87,2 ± 0,2	73,9 ± 0,5	84,7 ± 0,1

4.2. Caratteristiche della soluzione di coltura

Come soluzione di coltura per i fanghi granulari è stato utilizzato il Basal Anaerobic medium (Angelidaki & Sanders, 2004). Per limitare la produzione di metano per via idrogenotrofa da fonti di carbonio diverse dalla CO₂ alimentata, per i test è stato utilizzato un mezzo basale modificato (BA-C) privo di carbonati. Per garantire la capacità tampone del mezzo, la concentrazione di fosfato è stata incrementata, così da bilanciare la mancanza di carbonato. Le composizioni dei due mezzi di crescita sono riportate in Tabella 4. Il mezzo di crescita BA-C è stato preparato senza il carbonato per limitare la produzione di metano legata a fonti di carbonio diverse rispetto alla CO₂ dosata nei test.

Tabella 4, Composizione del mezzo di crescita BA medium e BA-C medium

	BA medium Conc (g L ⁻¹)	BA-C medium Conc (g L ⁻¹)
NH ₄ Cl	1	1000
NaCl	0,1	100
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1212	121,2
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,05	50
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0,4	2000
NaHCO ₃	2,6	-
Resazurina	0,5 mg L ⁻¹	0,5 mg L ⁻¹
Micronutrienti	1 mL L ⁻¹	1 mL L ⁻¹
Vitamine	0,25 mL L ⁻¹	0,25 mL L ⁻¹

La soluzione di micronutrienti è stata preparata utilizzando: FeCl₂·4H₂O (2363,2 mg L⁻¹), H₃BO₃ (50 mg L⁻¹), ZnSO₄ (59,2 mg L⁻¹), CuCl₂·2H₂O (38 mg L⁻¹), MnCl₂ (50 mg L⁻¹), (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O (50 mg L⁻¹), CoCl₂·6H₂O (50 mg L⁻¹), NiCl₂·6H₂O (92 mg L⁻¹), EDTA (500 mg L⁻¹), e HCl 36% (1 mL L⁻¹). La soluzione di vitamine è stata preparata utilizzando: Biotina (4 mg L⁻¹), Acido folico (4 mg L⁻¹), Pirodossina (20 mg L⁻¹), Riboflavina (10 mg L⁻¹), Tiamina (10 mg L⁻¹), Acido P-aminobenzoico (10 mg L⁻¹), e Acido lipoico (10 mg L⁻¹).

4.3. Substrati utilizzati

Come substrati gassosi sono stati utilizzati biossido di carbonio (CO₂) e idrogeno (H₂). Il biossido di carbonio è stato prelevato da bombola con purezza 99,995 %, mentre l'idrogeno è stato prodotto con un grado di purezza > 99,99999 % tramite elettrolizzatore (Hydrogen Generator AD-180, Cinel Gas Generators s.r.l., Padova).

4.4. Test di biometanazione

4.4.1. Piano sperimentale e set up del test

Sono state condotte complessivamente 7 prove, 3 RUN con digestato (biomassa sospesa) e 4 con fanghi granulari. Le condizioni operative dei vari test sono riportate in Tabella 5.

Tabella 5, Condizioni operative RUN con biomassa sospesa e biomassa granulare

Inoculo	T °C	H ₂ alimentato (mmol)	Rapporto H ₂ :CO ₂	Sistema di miscelazione
Biomassa sospesa (Digestato)	1 RUN	16,51	4	Agitazione magnetica
	2 RUN	24,77		
	3 RUN	24,77		
Biomassa granulare (Fanghi granulari)	1 RUN	16,51	4	Agitazione orbitale
	2 RUN	24,77		
	3 RUN	28,90		
	4 RUN	24,77		

I test di biometanazione sono stati svolti seguendo il metodo manometrico riportato da Coates et al. (1996) e da Ripoll et al. (2020), e approfondito nel paragrafo 4.4.4.

In ciascuna RUN sono state utilizzate 5 bottiglie, tre repliche alimentate con CO₂ e H₂ e due repliche di bianco (bottiglie non alimentate con i substrati gassosi), allo scopo di determinare la produzione residua di biogas da parte degli inoculi. Le prove sono state condotte utilizzando delle bottiglie da 1 L (volume effettivo 1134 mL), dotate di una apertura GL 45 per la collocazione del sensore di pressione e una GL 14 per consentire l'alimentazione dei substrati (Figura 12).

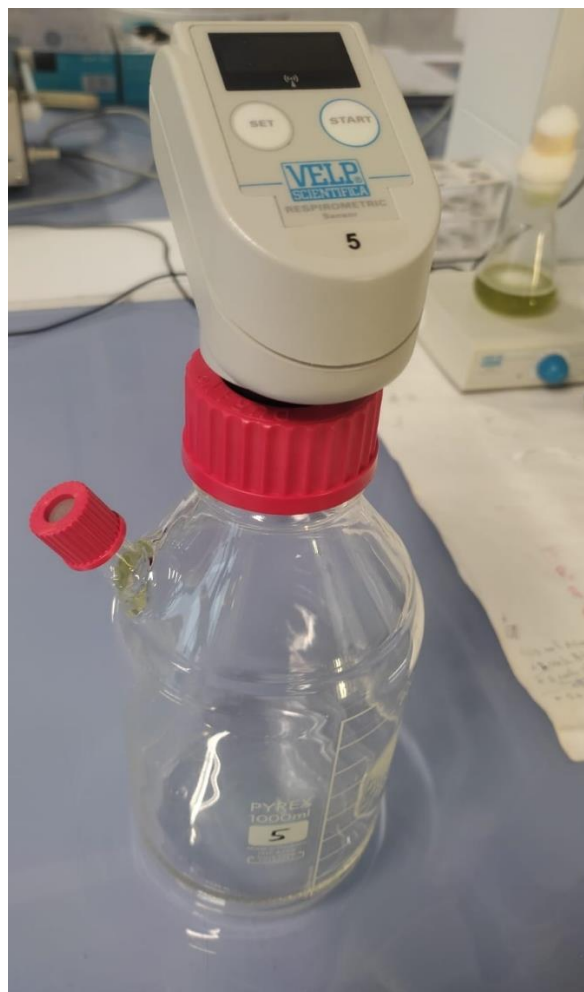


Figura 12, Bottiglia PYREX con sensore VELP® usato nei test di biometanazione

I valori della pressione delle bottiglie sono stati misurati utilizzando dei manometri digitali (BOD RESPIROMETRIC Sensor, VELP Scientifica srl, Italia), registrati automaticamente ad intervalli di 2 h dal sistema di trasmissione dati wireless associato (Wireless DataBox, VELP Scientifica srl, Italia).

4.4.2 Test su biomassa sospesa

All'inizio della RUN 1 in ciascuna bottiglia sono stati collocati 400 mL (7,66 g_{TVS}) di digestato. Inoculo e spazio di testa sono stati flussati con azoto per 5 minuti al fine di garantire la rimozione dell'ossigeno dal sistema, e in seguito le bottiglie sono state chiuse con il sensore di pressione (posizionato sull'apertura GL 45) e con un tappo con setto forabile (sull'apertura GL 14).

In ciascuna bottiglia, ad eccezione dei bianchi, sono stati iniettati con una siringa a tenuta di gas 400 mL di H₂ e 100 mL di CO₂. Successivamente le bottiglie sono state poste su agitatore magnetico e posizionate in stufa a 39 °C.

L'andamento delle pressioni dello spazio di testa è stato registrato automaticamente ogni 2 h, e il test è stato portato avanti fino a esaurimento della produzione di metano (circa 4–5 giorni per ciascuna RUN).

Al termine della prova, il gas presente nello spazio di testa è stato prelevato e analizzato per determinare la concentrazione di CH₄ prodotto e la concentrazione residua di CO₂ e H₂. Il prelievo del gas è stato effettuato dal setto forabile con siringa a tenuta di gas, fino al raggiungimento di una pressione interna alle bottiglie di circa 600 mbar assoluti, depressurizzando quindi le bottiglie.

In ciascuna delle RUN successive è stato iniettato altro substrato gassoso, senza però flussare nuovamente con azoto le bottiglie, e senza cambiare l'inoculo, allo scopo di selezionare e arricchire via via la biomassa idrogenotrofa in esso presente. La quantità di substrato iniettato nelle RUN successive è stata regolata in maniera tale da garantire il rapporto 4:1 tra H₂ e CO₂, e di non sfiorare il limite massimo di lettura del sensore. In ciascuna RUN successiva alla prima sono quindi stati iniettati 600 mL di H₂, e la quantità di CO₂ ricavata dall'Eq. 14.

$$V_{CO_2} = \frac{V_{H_2}}{4} - \left(\frac{P_{residua}}{P} \times V_{hs} \times \%_{CO_2\ residua} \right) \quad \text{Eq. 14}$$

Dove V_{H₂} è il volume di idrogeno dosato, 4 il rapporto molare tra i due composti, P_{residua} la pressione residua dello spazio di testa dopo campionamento/depressurizzazione, P la pressione atmosferica in laboratorio (per praticità semplificata a 1013,15 mbar), V_{hs} il volume dello spazio di testa, e %_{CO₂ residua} la percentuale di CO₂ residua misurata al termine della prova precedente. Le concentrazioni dei vari composti dello spazio di testa dopo l'alimentazione dei substrati gassosi sono state calcolate come rapporto molare tra le moli di ogni singolo composto e le moli totali presenti nello spazio di testa dopo alimentazione, calcolando le varie quantità sulla base della Legge dei gas perfetti (Eq. 15).

$$PV = nRT \quad \text{Eq. 15}$$

Al termine dell'ultima RUN, dopo campionamento e analisi del gas dello spazio di testa, le bottiglie sono state aperte e la biomassa è stata campionata per la determinazione di pH, alcalinità parziale e totale, e contenuto di VFA, seguendo i metodi descritti al Paragrafo 4.5.

4.4.3 Test su biomassa granulare

I test con biomassa granulare sono stati svolti impostando una condizione confrontabile con il test con biomassa sospesa, dosando quindi la stessa quantità di inoculo (in TVS) e portando a volume con il mezzo di crescita BA-C in maniera tale da mantenere lo stesso spazio di testa delle prove precedenti. In questo test, per evitare il disgregamento dei granuli di fango, l'agitazione è stata mantenuta utilizzando un agitatore orbitale (M201-OR, MPM Instruments srl, Italia) settato a 120 rpm. All'inizio della RUN 1 in ciascuna bottiglia sono stati collocati 103 mg (7,66 g_{TVS}) di granuli, ed è stato aggiunto il mezzo di crescita BA-C fino ad un volume di 400 mL, analogo alla prova precedente. Nelle fasi successive della prova su biomassa granulare è stata seguita la stessa procedura vista al Paragrafo 4.4.2 per la biomassa sospesa.

4.4.4 Elaborazione dati

La conversione di CO₂ e H₂ a CH₄ per via idrogenotrofa segue la reazione riportata in Eq. 8



Dall'Eq. 8 si vede che per la produzione di 1 mole di metano vengono consumate 5 moli complessive (1 di CO₂ e 4 di H₂). In base alla legge dei gas perfetti (Eq. 15) a temperatura e volume costante, una diminuzione di moli nella miscela di gas porta ad una diminuzione netta della pressione nello spazio di testa.

Partendo da queste considerazioni è possibile, rielaborando la legge dei gas perfetti (Eq. 15), determinare il numero di moli di metano Δn_{CH_4} prodotte per via idrogenotrofa durante il test, come mostrato in Eq. 16 (Ripoll et al., 2020):

$$\Delta n_{CH_4} = -\frac{\Delta n_{gas}}{4} = -\frac{\Delta P V_{hs}}{(4 R T)} \quad \text{Eq. 16}$$

Dove ΔP (atm) è la diminuzione di pressione nello spazio di testa; V_{hs} (L) è il volume dello spazio di testa; R (L atm K⁻¹ mol⁻¹) è la costante universale dei gas; T (K) è la temperatura; e 4 è il rapporto molare tra l'idrogeno e il biossido di carbonio alimentati. È importante quindi sottolineare che l'Eq. 16 è valida solo se viene mantenuto un rapporto costante (1:4 tra le pressioni parziali di CO₂ e di H₂) in alimentazione, e considerando trascurabile la frazione di metano disciolta nel mezzo di crescita durante il test. Dalle sole misurazioni di pressione è quindi possibile calcolare la quantità di metano prodotta per via idrogenotrofa dal consorzio microbico. Per valutare le rese di conversione del test, è stata calcolata la produzione specifica di metano (SMP, *Specific Methane Production*), espressa rispetto alla biomassa in g_{COD(CH₄)} g_{VSS}⁻¹ (Eq. 17) e rispetto alla quantità di substrato convertito in g_{COD(CH₄)} g_{COD(H₂)}⁻¹ (Eq. 18):

$$SMP_{biomassa} = \frac{n_{CH_4} \times C_{CH_4}}{X V_L} \quad \text{Eq. 17}$$

$$SMP_{H_2} = \frac{n_{CH_4} \times C_{CH_4}}{n_{H_2} \times C_{H_2}} \quad \text{Eq. 18}$$

Dove n_{CH_4} e n_{H_2} sono le moli di metano prodotte e le moli di idrogeno alimentate, C_{CH_4} e C_{H_2} sono fattori di conversione (rispettivamente $64 \text{ g}_{COD} \text{ mol}_{CH_4}^{-1}$ e $16 \text{ g}_{COD} \text{ mol}_{H_2}^{-1}$) utilizzati per convertire le moli di metano e di idrogeno in grammi di COD, V_L (L) è il volume di inoculo dosato nel test, e X ($\text{g}_{VSS} \text{ L}^{-1}$) la concentrazione di biomassa in esso contenuta.

Conoscendo l'intervallo di tempo tra due misurazioni di pressioni, è possibile costruire un grafico per rappresentare l'andamento dell' $SMP_{biomassa}$ nel tempo, e ricavare il valore di SHMA ($\text{g}_{COD} \text{ g}_{VSS}^{-1} \text{ d}^{-1}$) (Eq. 19):

$$SHMA = \frac{\Delta SMP}{\Delta t} \quad \text{Eq. 19}$$

Sulla base del numero di moli di metano prodotte a fine test, è possibile determinare anche l'efficienza di conversione rispetto al substrato alimentato, sulla base dell'Eq. 20:

$$\gamma_{H_2} = \frac{n_{CH_4}}{\frac{1}{4} \times n_{H_2}} \quad \text{Eq. 20}$$

Sempre sulla base del numero di moli di metano prodotte a fine test, è stato possibile determinare la resa volumetrica in NL di metano prodotti rispetto ai NL di substrato (CO_2 o H_2), sulla base dell'Eq. 21:

$$r_x = \frac{n_{CH_4} \times R \times T_{lab}}{P \times V_{substrato}} \quad \text{Eq. 21}$$

Dove r_x ($\text{NL}_x \text{ NL}_x^{-1}$) indica la resa volumetrica rispetto al substrato CO_2 o H_2 , T_{lab} (K) è la temperatura presente in laboratorio, $V_{substrato}$ è il volume del substrato (CO_2 o H_2) iniettato nello spazio di testa.

4.5. Metodi analitici

Il contenuto di solidi totali (TS, Total Solids) e di solidi totali volatili (TVS, Total Volatile Solids) degli inoculi sono stati determinati secondo i metodi standard APHA (Baird et al., 2017), tramite metodo gravimetrico. L'analisi è stata effettuata dosando un'aliquota rappresentativa e omogenea di campione in crogioli di ceramica, e utilizzando una bilancia tecnica (Navigator NV3202, Ohaus, Svizzera) con risoluzione $\pm 0,01 \text{ g}$. Durante l'analisi i campioni sono stati pesati dopo essiccamento in stufa a 105°C per 48h, e dopo incenerimento in muffola a 550°C per 24h.

Il pH è stato misurato a inizio e a fine test utilizzando un pH metro da banco (HI5522, HANNA Instruments, Padova). L'alcalinità è stata determinata tramite metodo standard APHA (Baird et al., 2017), tramite titolazione con soluzione acida di HCl 0,1 N fino a pH 6 e 4, e convertendo il volume di soluzione titolante utilizzato in equivalenti di carbonato di calcio.

Il contenuto di VFA è stato determinato a inizio e a fine test per verificare l'eventuale produzione di acido acetico da parte degli omoacetogeni, in quanto sono in competizione con gli idrogenotrofi per l'utilizzo

dell'idrogeno. Per l'analisi dei VFA i campioni sono stati centrifugati e filtrati a 0.2 μm e sono stati analizzati mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) utilizzando un cromatografo (serie 1100, Agilent Technologies, USA) dotato di una colonna AcclaimTM Organic Acid (Thermo Scientific) da 0,5 μm x 4,0 mm x 150 mm e un rivelatore a diodi (DAD). Come fase mobile A è stata utilizzata una soluzione acquosa di acido metansolfonico 2,5 mM (Sigma-Aldrich, purezza $\geq 99,0\%$), mentre come fase mobile B acetone nitrile (Sigma-Aldrich, purezza $\geq 99,9\%$); le due soluzioni sono state usate in un rapporto 45/55 (A/B) durante l'analisi. La colonna è stata mantenuta a 30 °C e il detector è stato impostato a una lunghezza d'onda di 210 nm. La concentrazione di VFAs è stata calcolata utilizzando una curva di calibrazione costruita in un intervallo di concentrazione da 1 a 10 mM, ottenuta mediante diluizione di uno standard di VFA (Volatile Free Acid Mix, Sigma Aldrich, materiale di riferimento certificato).

Il gas dello spazio di testa delle bottiglie è stato campionato utilizzando una siringa a tenuta di gas da 100 mL e una gas-sampling bag in Tedlar da 0,6 L. La composizione del gas è stata determinata mediante un analizzatore di biogas da campo (MCA100 Syn-H2, ETG Risorse e Tecnologia srl, Italia) equipaggiato con sensore TCD per la quantificazione dell' H_2 , una cella elettrochimica per la quantificazione dell' O_2 e un sensore ad infrarossi per la quantificazione di CH_4 e CO_2 .

Poiché durante le procedure di prelievo del gas dallo spazio di testa delle bottiglie si è osservata la contaminazione del gas raccolto nella gas-bag con aria esterna, attribuibile a una tenuta non ottimale della siringa quando soggetta a depressione, i valori letti dallo strumento sono stati corretti sulla base della quantità di ossigeno rilevato, utilizzando le Eq. 22 – 23 – 24:

$$CO_2^* = \frac{CO_2}{1 - \frac{O_2}{21\%}} \quad \text{Eq. 22}$$

$$CH_4^* = \frac{CH_4}{1 - \frac{O_2}{21\%}} \quad \text{Eq. 23}$$

$$N_2^* = \frac{N_2 - \left(O_2 \times \frac{79\%}{21\%}\right)}{1 - \frac{O_2}{21\%}} \quad \text{Eq. 24}$$

Dove CO_2^* , CH_4^* e N_2^* sono le concentrazioni dei gas nello spazio di testa delle bottiglie corrette per escludere la contaminazione da aria; CO_2 , CH_4 , O_2 e N_2 sono le percentuali lette allo strumento; e 21 e 79 % sono le concentrazioni in aria rispettivamente di ossigeno e azoto.

5. Risultati e Discussione

In questo paragrafo verranno prima riportati gli esperimenti in batch compiuti con l'inoculo di biomassa sospesa, e poi i test in batch con l'inoculo di biomassa granulare. In ogni paragrafo dedicato allo specifico inoculo verranno riportati gli SHMA, gli SMP e le rese volumetriche per ogni esperimento per dei confronti.

5.1. Digestato (biomassa sospesa)

5.1.1. 1^a RUN

In tutte le RUN le bottiglie sono state mantenute in condizioni mesofile e in agitazione. Nel Figura 13 viene rappresentato l'andamento delle pressioni (mbar) registrate durante la 1^a RUN, al netto della pressione del bianco.

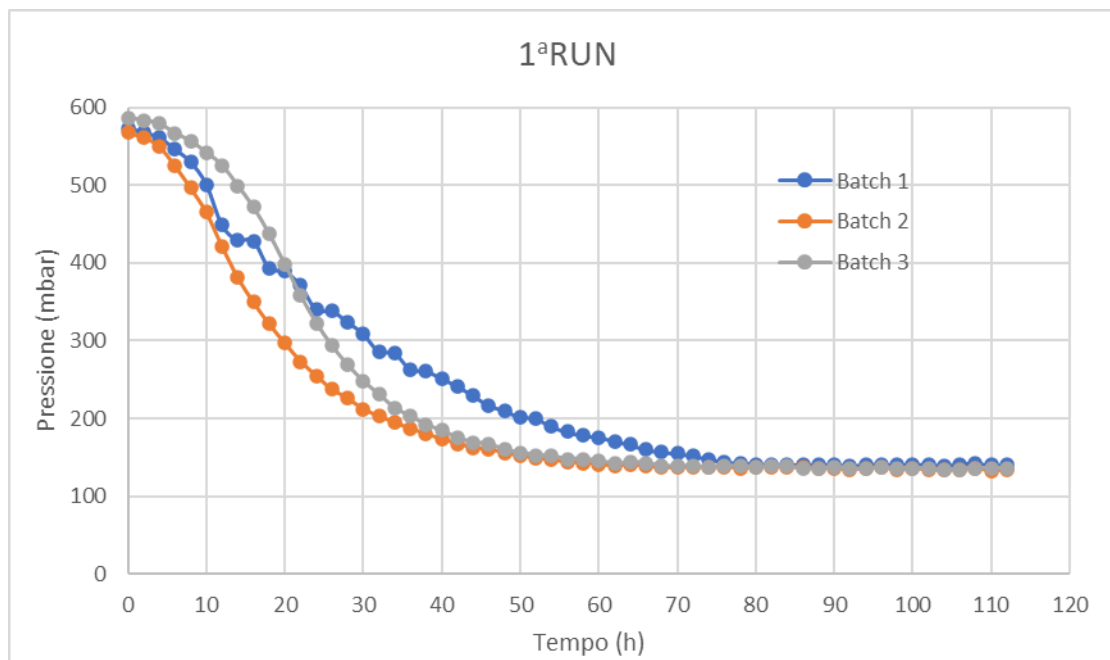


Figura 13, Andamento standardizzato delle pressione standardizzato 1^aRUN di batch con biomassa sospesa

Dalla Figura 13, si osserva come la pressione diminuisca in maniera progressiva nelle prime 60–80 h di sperimentazione, man mano che i substrati gassosi (H_2 e CO_2) vengono solubilizzati e convertiti a metano. Nelle giornate successive, nessuna bottiglia ha registrato variazioni di pressione, e il test è stato quindi interrotto.

La variabilità nell'andamento delle tre repliche è probabilmente associata a differenze nella miscelazione. A inizio test, infatti, sono stati riscontrate delle problematiche con l'agitatore magnetico del batch 3, che non riusciva a mantenere una velocità d'agitazione simile a quella delle altre due repliche. Come è stato riportato nel paragrafo 2, il trasferimento di massa gas/liquido è fortemente influenzato dall'agitazione (Jensen et al., 2021), e questo ha quindi comportato un iniziale rallentamento della solubilizzazione dei substrati in questa

replica, risolto il giorno successivo (dopo circa 14 h), sostituendo l'agitatore. L'andamento della pressione nella bottiglia 1 nell'intervallo 14–60 h deriva probabilmente da una circostanza simile, in quanto è stato osservato un funzionamento non ottimale dell'agitatore magnetico anche in questa bottiglia.

Dall'andamento delle pressioni nelle varie repliche è possibile calcolare (Eq. 16) la quantità di moli di metano prodotte e l'efficienza della conversione. In questa RUN sono stati alimentati 400 mL (16,52 mmol) di H_2 e 100 mL (4,13 mmol) di CO_2 . A fine test nelle tre repliche sono state prodotte $3,40 \pm 0,08$ mmol di CH_4 , con un'efficienza di conversione γ_{H_2} (calcolata rispetto all'idrogeno alimentato) pari a $75 \pm 1\%$ e una resa volumetrica di $0,75 \pm 0,08$ $NL_{CH_4} NL_{CO_2}^{-1}$ e di $0,18 \pm 0,01$ $NL_{CH_4} NL_{H_2}^{-1}$. Sulla base della quantità di moli di metano prodotta, è stata calcolata la produzione specifica di metano, rispetto alla biomassa ($SMP_{biomassa}$, Figura 14) e all'idrogeno alimentato (SMP_{H_2} , Figura 15)

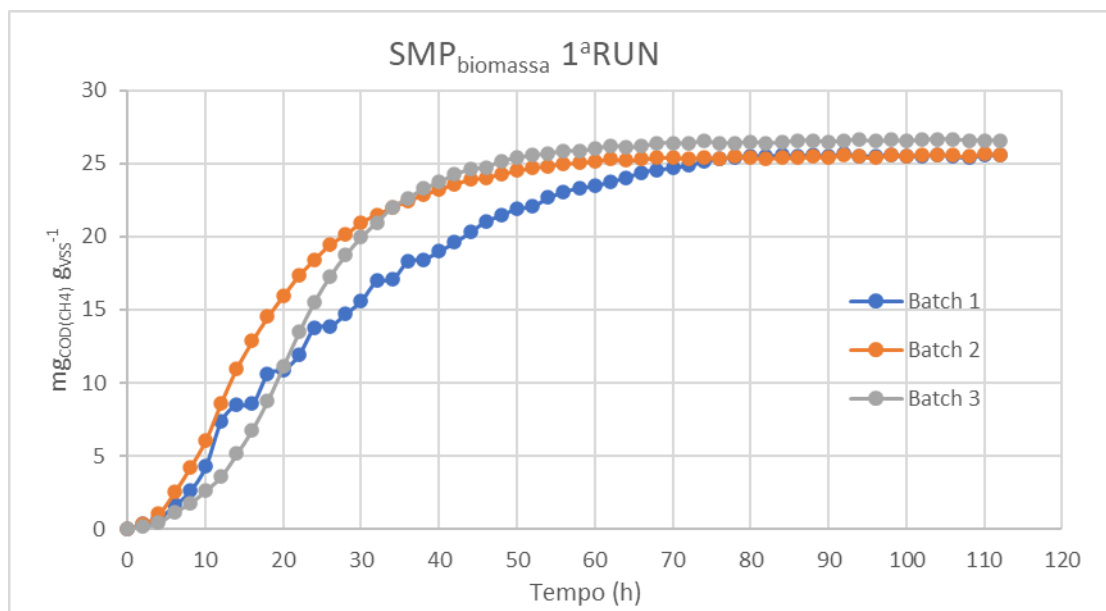


Figura 14, Andamento $SMP_{biomassa}$ 1^aRUN batch con biomassa sospesa

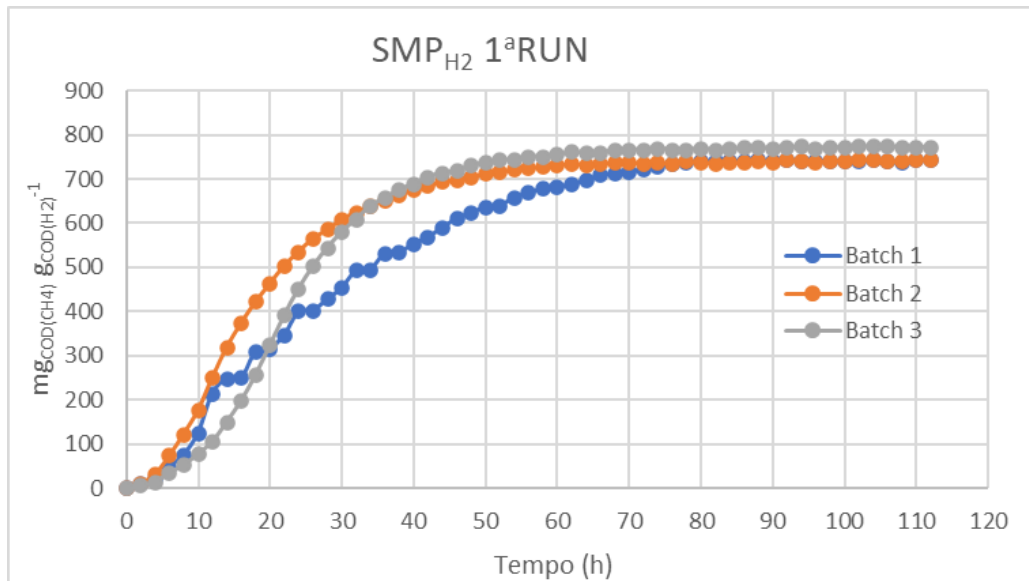


Figura 15, Andamento SMP_{H_2} 1^aRUN batch con biomassa sospesa

Dalle Figure 14 e 15 si può osservare come l'andamento dell' SMP rispecchi quanto osservato precedentemente per l'andamento delle pressioni. Vista la differenza di produzione riscontrata nella replica 1, e che questa differenza non era legata a una diversa attività dell'inoculo ma solo ad un rallentamento nella solubilizzazione dei gas dovuti ad un'inefficiente miscelazione, la replica è stata esclusa dal calcolo di SMP e SHMA medi. Dalle 80 h in poi, non vi è più stata produzione di metano, e a fine test i valori di SMP registrati sono stati rispettivamente di $26 \pm 1 \text{ mg}_{\text{COD}(\text{CH}_4)} \text{ g}_{\text{VSS}}^{-1}$ (rispetto alla biomassa) e di $757 \pm 20 \text{ mg}_{\text{COD}(\text{CH}_4)} \text{ g}_{\text{COD}(\text{H}_2)}^{-1}$ (rispetto all'idrogeno alimentato). Nella Figura 16 sono riportati gli andamenti della SHMA per ogni replica.

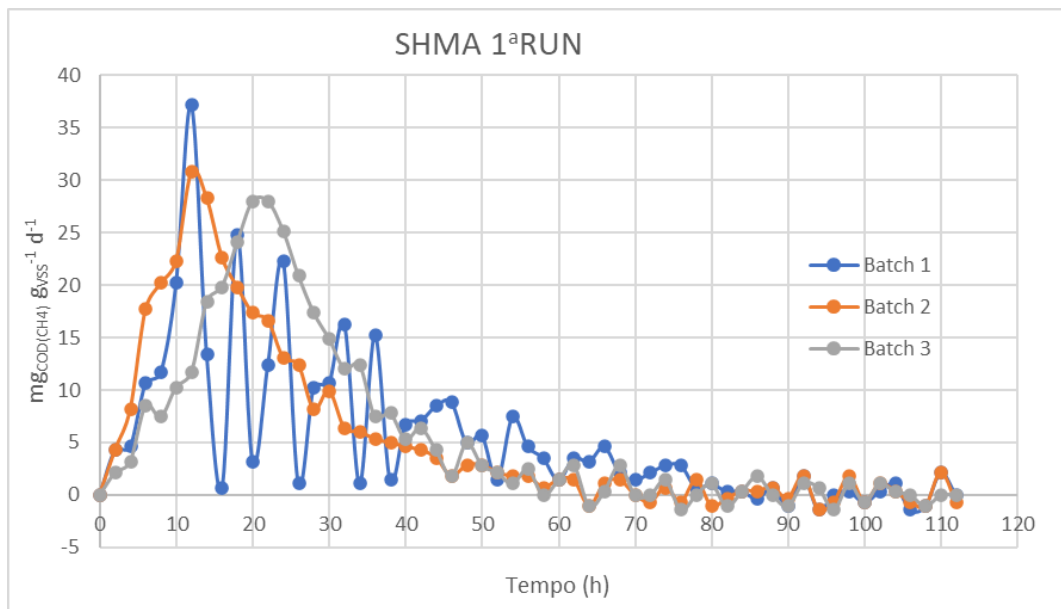


Figura 16, Andamento SHMA 1^aRUN batch con biomassa sospesa

Si può vedere dalla Figura 16, come l'andamento della SHMA del batch 1 sia irregolare e non segua gli andamenti degli altri due batch. Questo a riprova che la agitazione non stabile nel tempo ha influenzato la

produzione di metano. Come è già stato detto nel paragrafo 2, Lo SHMA è la pendenza della curva del SMP (Ripoll et al., 2020). Lo SHMA nel batch 3 è aumentato in modo costante dall'ora 2 fino all'ora 20 raggiungendo un valore pari a $27,99 \text{ mg}_{\text{COD}(\text{CH}_4)} \text{ g}_{\text{VSS}}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Confrontando la Figura 16 con la Figura 15 si può vedere come in questa fascia oraria, la pendenza della curva del batch 3 abbia una pendenza molto elevata. Il batch 2, sembra avere raggiunto il massimo dell'attività all'ora 12 con valore pari a $37,20 \text{ mg}_{\text{COD}(\text{CH}_4)} \text{ g}_{\text{VSS}}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Visto l'andamento discordante del batch 1 rispetto ai batch 2 e 3, è stato rimosso dal calcolo dello SHMA medio presente nella. Lo SHMA medio ottenuto dai picchi più alti in questa RUN è pari a $29 \pm 2 \text{ mg}_{\text{COD}(\text{CH}_4)} \text{ g}_{\text{VSS}}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

Nella Tabella 6 è riportata la composizione in percentuale del biogas della 1ª RUN, misurata alla fine della RUN con l'ETG. I valori di CH₄, CO₂ e N₂ sono normalizzati come da Eq. 22 – 23 – 24 .

Tabella 6, Composizione in % biogas della 1ª RUN con biomassa sospesa

Batch		CH ₄ *%	H ₂ *%	CO ₂ *%	N ₂ *%
Inizio	1	0,0%	32,4	8,1	59,5
RUN	2	0,0%	32,4	8,1	59,5
	3	0,0%	32,4	8,1	59,5
Fine	1	14,08	0,0	4,93	81,09
RUN	2	15,61	0,0	5,27	79,14
	3	16,16	0,0	5,34	78,54

Non è stato possibile analizzare i bianchi perché questi non hanno prodotto una quantità di biogas sufficiente per essere analizzata. Si può notare come in tutte le repliche l'H₂ sia stato completamente consumato nel processo di metanazione, mentre risulta ancora presente una discreta percentuale di CO₂, probabilmente legata in parte alla quantità prodotta dai batteri stessi per metabolismo endogeno, e in parte ai carbonati disciolti in soluzione.

5.1.2. 2ª RUN

A differenza della RUN precedente, nella RUN 2 i reattori sono stati depressurizzati (fino ad una pressione assoluta di circa 600 mbar) prima dell'alimentazione, in modo tale da riuscire ad incrementare la quantità di substrato (H₂ e CO₂) da alimentare, senza sfiorare il limite di pressione massimo letto dai sensori, e idealmente aumentare la produzione di biogas. In questa RUN sono stati iniettati 600 mL di H₂ (24,77 mmol) e 125 mL di CO₂ (5,16 mmol). La quantità di CO₂ dosata nella prova è stata determinata sulla base della quantità residua presente in ciascuna bottiglia (calcolata in base alla concentrazione di CO₂ a fine test e della pressione dello spazio di testa dopo depressurizzazione), in maniera tale da mantenere il rapporto 4:1 di H₂:CO₂. Nella Figura 17 vengono rappresentati gli andamenti delle pressioni al netto della produzione del bianco.

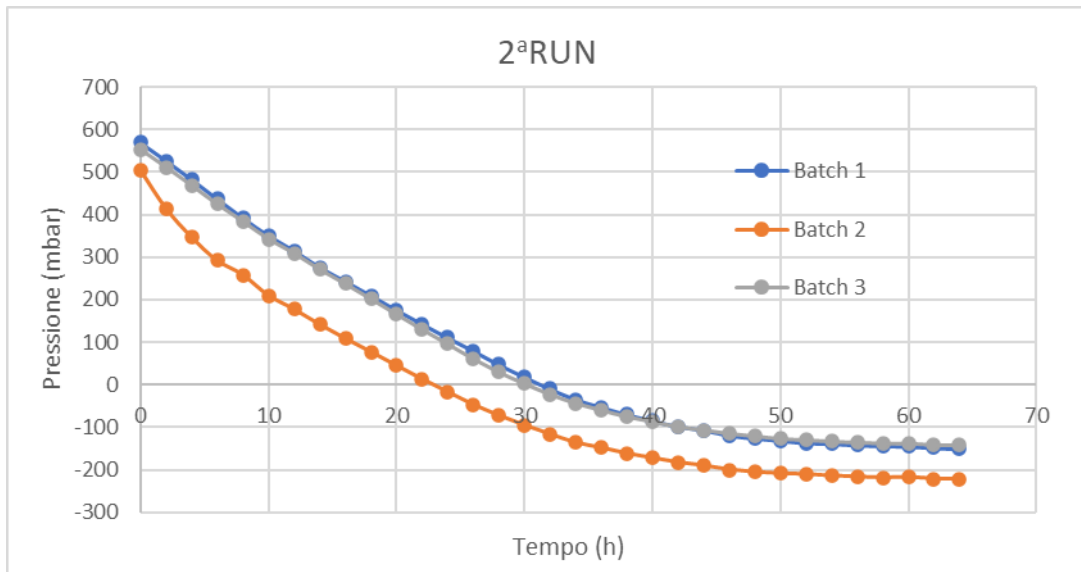


Figura 17, Andamento standardizzato della pressione 2ªRUN di batch con biomassa sospesa

Dalla Figura 17 si può notare che, rispetto alla prima RUN, l'andamento delle pressioni delle tre repliche è risultato molto più costante, a indicare che l'agitazione è stata stabile durante tutto l'arco dell'esperimento. Inoltre, sono stati raggiunti valori più bassi di pressione, a indicazione di una produzione di metano più elevata. Il plateau di produzione di biogas è stato raggiunto dopo 40–60 ore, quindi leggermente in anticipo rispetto alla RUN precedente.

Convertendo le variazioni di pressione in quantità di moli di metano prodotte, risulta una produzione massima a fine test di $4,75 \pm 0,08$ mmol di CH_4 , e un'efficienza di conversione dell'idrogeno pari al 77 ± 1 % e un resa volumetrica di $0,92 \pm 0,01$ $\text{NL}_{\text{CH}_4} \text{NL}_{\text{CO}_2}^{-1}$ e di $0,191 \pm 0,003$ $\text{NL}_{\text{CH}_4} \text{NL}_{\text{H}_2}^{-1}$. Nelle Figure 18 e 19 sono riportati gli andamenti del SMP per la biomassa e per il substrato (H_2).

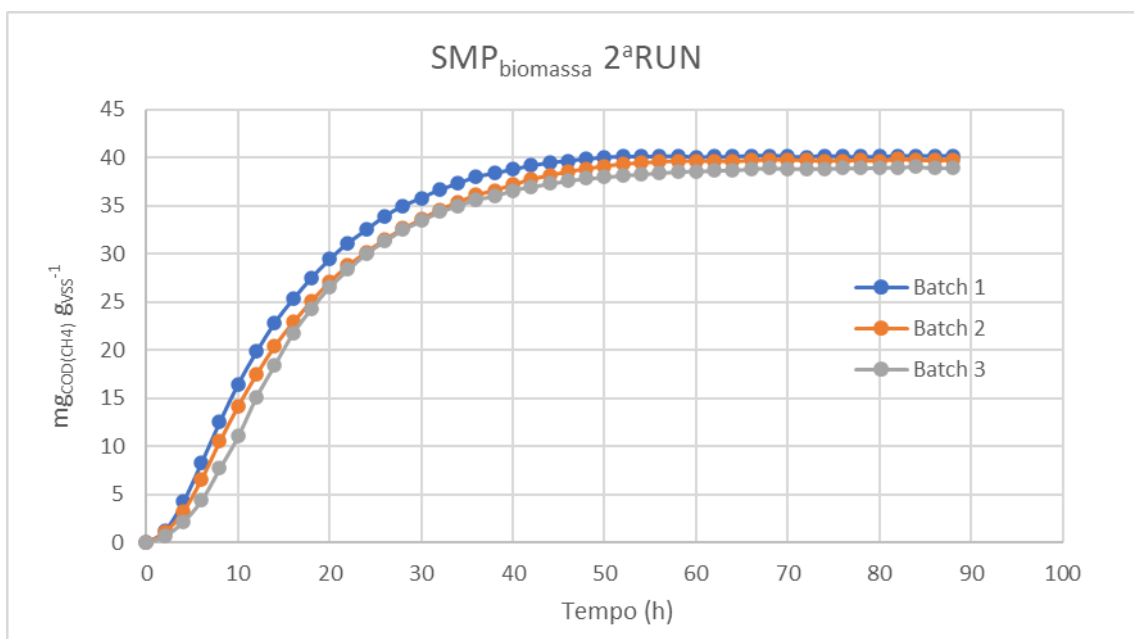


Figura 18, Andamento $\text{SMP}_{\text{biomassa}}$ 2ªRUN batch con biomassa sospesa

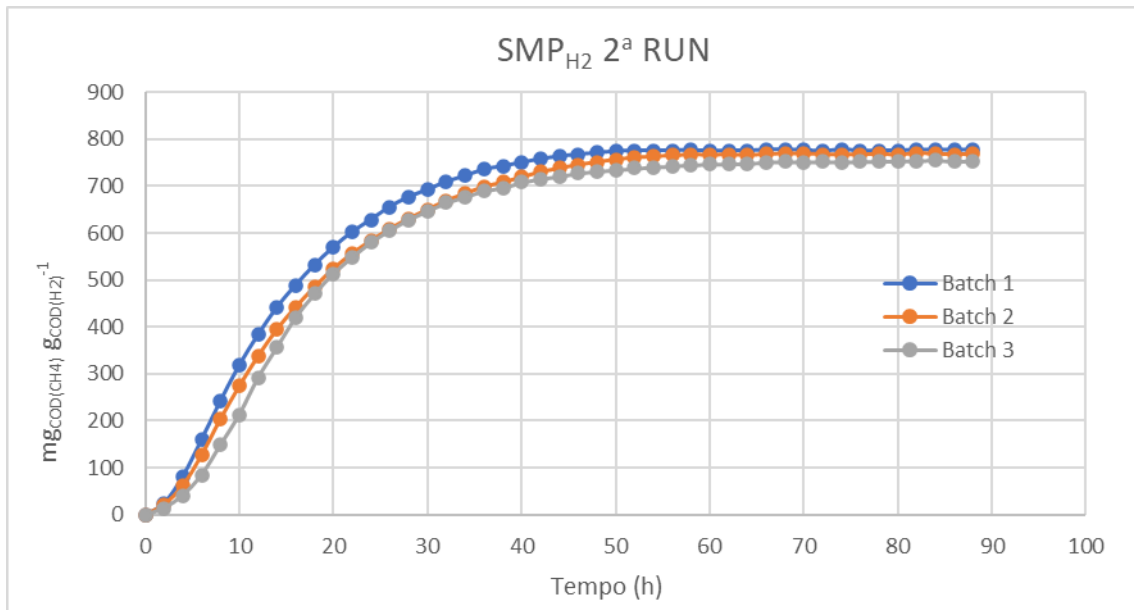


Figura 19, Andamento $SMP_{H_2} 2^a RUN$ batch con biomassa sospesa

Dalla Figura 19 si conferma la stabilità della agitazione in questa 2ª RUN. Essendo tutti gli andamenti simili, tutti i batch sono stati considerati per il calcolo dei valori medi del SMP. La produzione specifica di metano è risultata pari a $39,6 \pm 0,7 \text{ mg}_{COD(CH_4)} \text{ g}_{VSS}^{-1}$ (rispetto alla biomassa) e $766 \pm 12 \text{ mg}_{COD(CH_4)} \text{ g}_{COD(H_2)}^{-1}$ (rispetto all'idrogeno alimentato). Rispetto alla 1ª RUN c'è stato un incremento del valore di SMP rispetto alla biomassa. Questo può essere attribuito sia all'agitazione più stabile che può aver influito sul trasferimento di massa, sia all'aumento dei volumi di substrato iniettati, oltre che ad un progressivo arricchimento dei microorganismi idrogenotrofi presenti nella biomassa. Nella Figura 20 sono rappresentati gli andamenti degli SHMA della 2ª RUN.

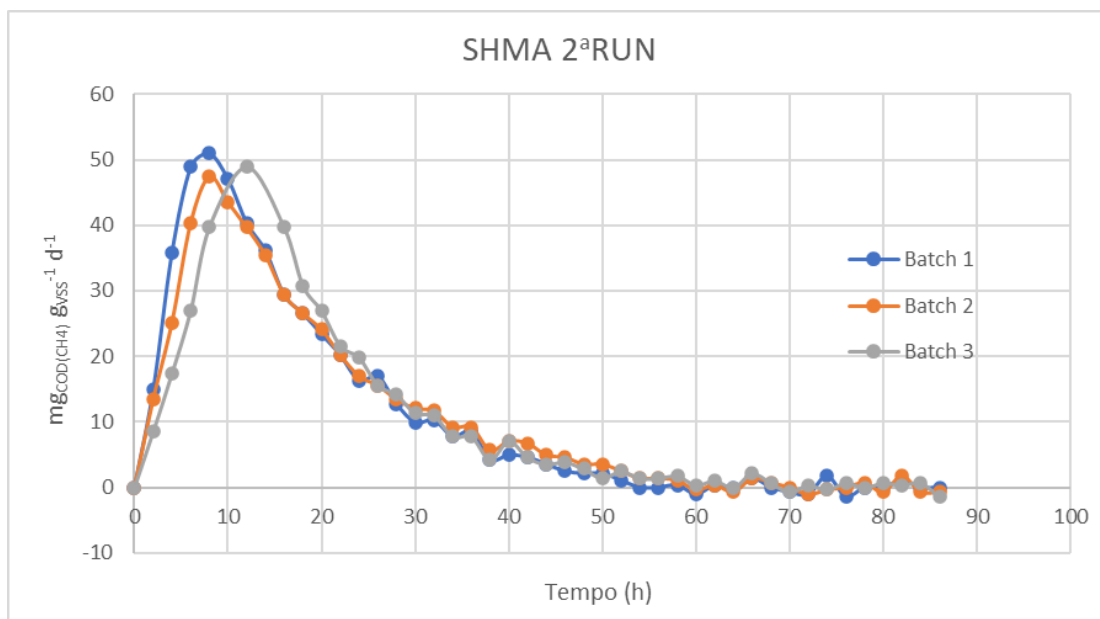


Figura 20, Andamento SHMA 2ª RUN batch con biomassa sospesa

Dalla Figura 20 si vede che il batch 1 e il batch 2 hanno avuto il picco alla ottava ora, leggermente in anticipo rispetto al picco del batch 3, registrato alla dodicesima ora. I motivi di questo discostamento non sono chiari, visto che l'agitazione per tutti i tre batch sembra essere stata pressoché costante, o comunque i rallentamenti non sono stati così evidenti. Il valore dello SHMA medio è pari a $49 \pm 2 \text{ mg}_{\text{COD}(\text{CH}_4)} \text{ g}_{\text{VSS}}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Nella Tabella 7 è riportata la composizione in percentuale del biogas della 2ª RUN, misurata alla fine della RUN con l'ETG. I valori di CH₄, CO₂ e N₂ sono normalizzati come da Eq. 22 – 23 – 24.

Tabella 7, Composizione in % biogas della 2ª RUN con biomassa sospesa

	Batch	CH ₄ *%	H ₂ *%	CO ₂ *%	N ₂ *%
Inizio RUN	1	5,8	48,6	12,2	33,4
	2	6,3	49,1	12,4	32,2
	3	6,7	48,4	12,1	32,8
Fine RUN	1	39,29	0,1	6,82	53,64
	2	35,10	0,05	5,89	57,48
	3	36,86	0,06	6,10	56,90
	5/6 bianchi	9,81	0,0	4,47	85,94

Rispetto alla 1ª RUN si ha un aumento abbastanza importante delle percentuali di metano, l'idrogeno viene completamente consumato, e vi è una percentuale residua non trascurabile di CO₂.

5.1.3. 3ª RUN

Anche in questa RUN sono stati depressurizzati i batch fino ad una pressione assoluta di circa 600 mbar prima dell'alimentazione. Nello specifico, sono stati iniettati 600 mL (24,77 mmol) di H₂ in tutti e tre i batch. Mentre sono stati iniettati 114 mL di CO₂ (4,70 mmol) nel batch 1 e 116 mL (1,78 mmol) nel batch 2 e 3, mantenendo sempre il rapporto 4:1 di H₂:CO₂. La quantità di substrato da iniettare è stata calcolata come nella RUN precedente. I bianchi sono sempre stati lasciati a pressione atmosferica. Nella Figura 21 sono rappresentati gli andamenti delle pressioni standardizzate al netto della produzione del bianco.

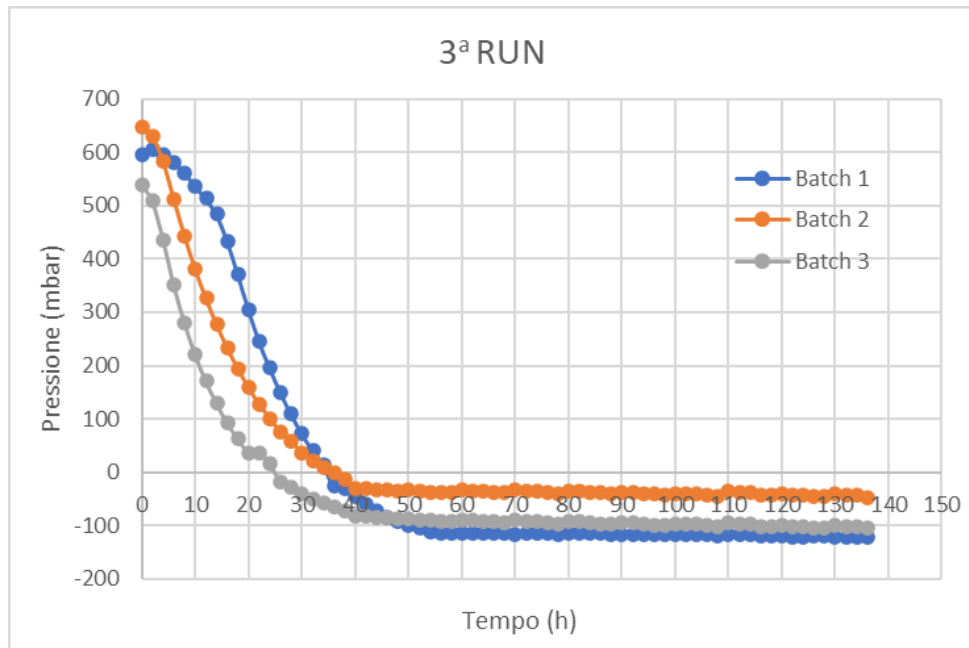


Figura 21, Andamento della pressione standardizzato 3ªRUN batch con biomassa sospesa

Dalla Figura 21 si può notare che rispetto alla seconda RUN, l'andamento delle pressioni delle tre repliche risulta meno costante, probabilmente ad indicare un'incostanza nelle agitazioni dei singoli agitatori magnetici durante tutto l'arco dell'esperimento. Il plateau di biogas è stato raggiunto dopo le 40 – 60 ore come nella 2ªRUN. Convertendo le variazioni di pressione in quantità di moli di metano prodotte, risulta una produzione massima a fine test di $4,84 \pm 0,27$ mmol di CH_4 , un'efficienza di conversione dell'idrogeno pari al $76,20 \pm 0,04$ % e una resa volumetrica di $1,02 \pm 0,06$ $\text{NL}_{\text{CH}_4} \text{NL}_{\text{CO}_2}^{-1}$ e di $0,19 \pm 0,01$ $\text{NL}_{\text{CH}_4} \text{NL}_{\text{H}_2}^{-1}$. Nelle Figure 22 e 23 sono rappresentati gli andamenti delle produzioni specifiche cumulative di metano.

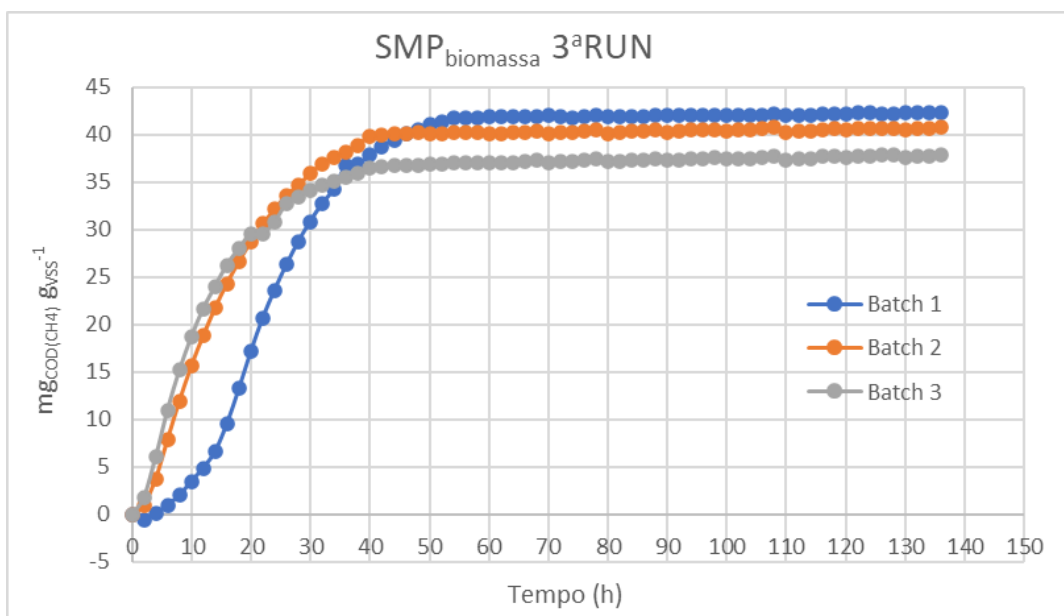


Figura 22, Andamento $\text{SMP}_{\text{biomassa}}$ 3ªRUN batch con biomassa sospesa

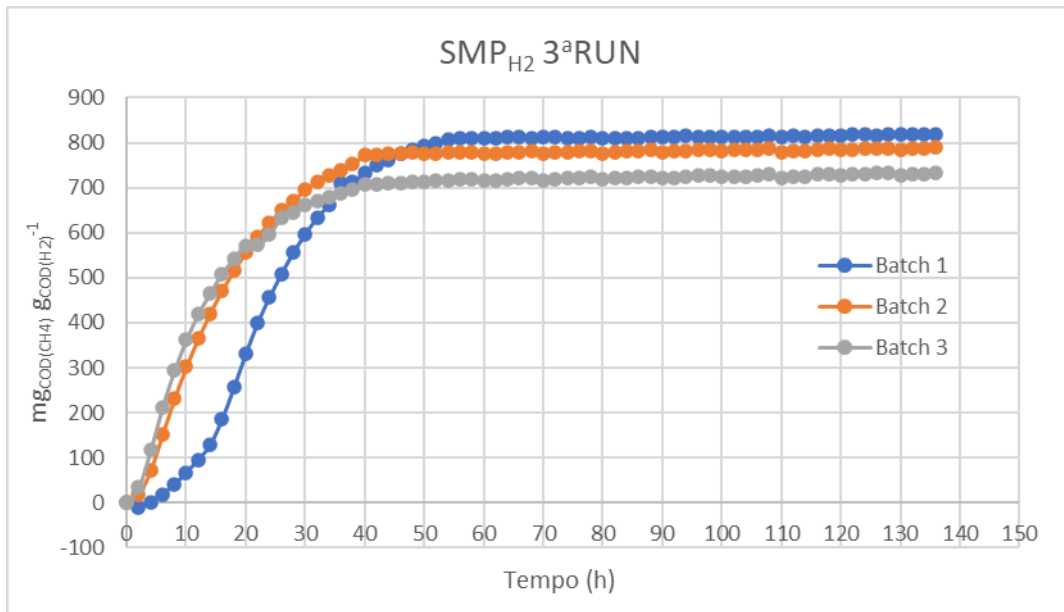


Figura 23, Andamento SMP_{H2} 3^a RUN batch con biomassa sospesa

Come si vede dalla Figura 22 e 23, la produzione di biogas si è stabilizzata per tutti e 3 i batch tra la 40^a e la 60^a ora. Orario in cui corrisponde anche il plateau di pressione nelle Figure 22 e 23. Dalla produzione specifica di metano sia per la biomassa che per il substrato, si vede che il batch 1 ha avuto un rallentamento nella produzione. Questo viene confermato anche dallo SHMA nella Figura 24. Tuttavia, alla 40^a il batch 3 ha superato la produzione del batch 2. Per questo motivo il batch 1 è stato considerato nel calcolo del valore medio degli SMP. I batch 2 e 3, sembrano avere la stessa produzione di metano dall'inizio test, fino alla 26^a ora. La media dei valori di SMP_{biomassa} in questa RUN è pari a $40 \pm 2 \text{ mgCOD(CH}_4\text{) g}_{\text{VSS}}^{-1}$ e per SMP_{H2} è pari a $780 \pm 43 \text{ mgCOD(CH}_4\text{) gCOD(H}_2\text{)}^{-1}$. Nella Figura 24 sono riportati gli andamenti degli SHMA.

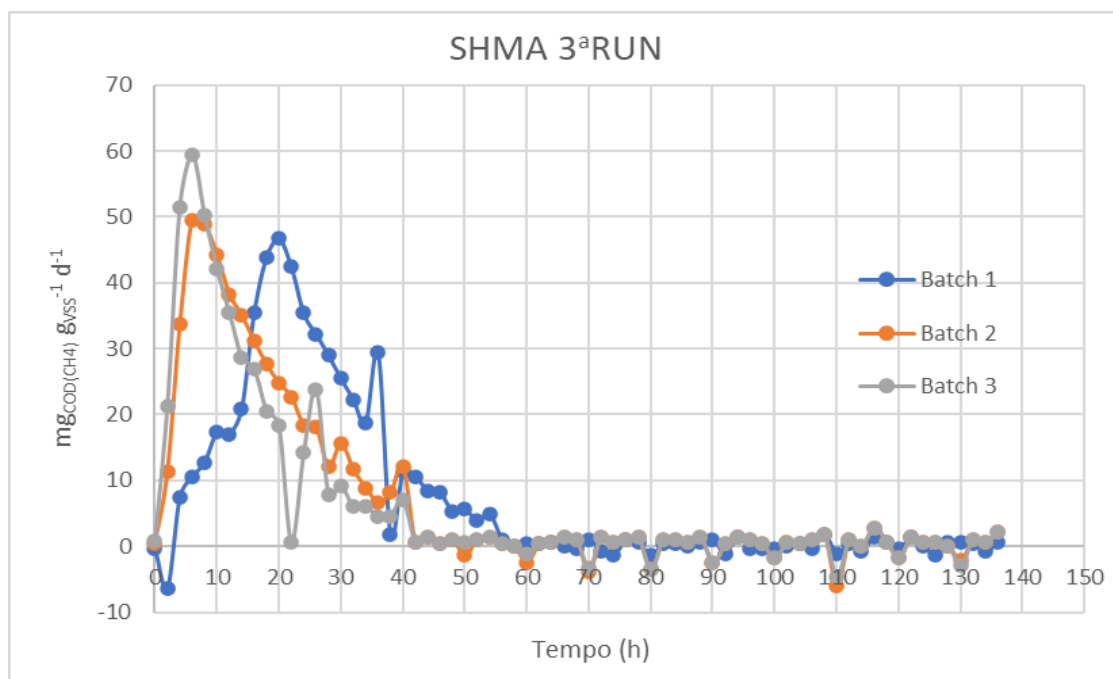


Figura 24, Andamento SHMA 3^a RUN batch con biomassa sospesa

Dalla Figura 24 si vede che il batch 3 ha avuto il picco dell'attività alla sesta ora ($59,51 \text{ mg}_{\text{COD}(\text{CH}_4)} \text{ g}_{\text{VSS}}^{-1} \text{ d}^{-1}$) mentre il batch 2 ha avuto il picco al 8ª ora ($50,30 \text{ mg}_{\text{COD}(\text{CH}_4)} \text{ g}_{\text{VSS}}^{-1} \text{ d}^{-1}$). Il batch 1 ha avuto il picco dell'attività alla 20ª ora. ($46,76 \text{ mg}_{\text{COD}(\text{CH}_4)} \text{ g}_{\text{VSS}}^{-1} \text{ d}^{-1}$). Facendo la media dei valori massimi di attività il valore dello SHMA è pari a $52 \pm 6 \text{ mg}_{\text{COD}(\text{CH}_4)} \text{ g}_{\text{VSS}}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Nella Tabella 8 è riportata la composizione in percentuale del biogas della 3ªRUN, misurata alla fine della RUN con l'ETG. I valori di CH_4 , CO_2 e N_2 sono normalizzati come da Eq. 22 – 23 – 24.

Tabella 8, Composizione in % del biogas 3ª RUN con biomassa sospesa

	Batch	CH_4 *%	H_2 *%	CO_2 *%	N_2 *%
Inizio RUN	1	16,8	47,6	12,8	22,9
	2	15,5	46,1	12,2	26,1
	3	15,9	47,2	12,5	24,5
Fine RUN	1	51,43	0,16	6,84	41,43
	2	50,57	0,33	5,59	42,86
	3	50,11	0,26	6,38	6,33
	5/6 bianchi	20,42	0,01	7,77	71,70

Rispetto alla seconda RUN si vede che la percentuale di metano è aumentata e l'idrogeno è stato quasi completamente convertito con un minimo residuo. È stato misurato il pH, l'alcalinità parziale e totale a inizio e a fine test su biomassa sospesa (Tabella 9).

Tabella 9, Alcalinità parziale e totale e pH inizio e fine test con biomassa sospesa

Misura	pH	Alk parz $\text{mg}_{\text{CaCO}_3} \text{ L}^{-1}$	Alk tot $\text{mg}_{\text{CaCO}_3} \text{ L}^{-1}$	Alk tot - Alk parz $\text{mg}_{\text{CaCO}_3} \text{ L}^{-1}$
Inizio test	$7,8 \pm 0,1$	$1,84 \pm 0,09$	$2,28 \pm 0,06$	$0,44 \pm 0,06$
Fine test	$8,23 \pm 0,04$	$2,12 \pm 0,08$	$3,05 \pm 0,12$	$0,93 \pm 0,07$

Dalla Tabella 9 si vede che il processo ha portato ad avere un pH poco superiore al range ottimale per la biometanazione (pH 6 – 8 (Weiland, 2010)), ma non a valori tali da portare all'inibizione del processo. Per quanto riguarda l'analisi dei VFA, a fine test non è stata riscontrata la produzione di acido acetico, a indicare l'assenza di competizione per l'idrogeno da parte degli omoacetogeni.

5.2. Fanghi granulari (biomassa granulare)

5.2.1. 1ª RUN

Nel Figura 25 viene rappresentato l'andamento delle pressioni (mbar) nei reattori al netto della produzione del bianco. Come nelle RUN fatte con biomassa sospesa, il test è stato portato avanti fino a stabilità delle pressioni dello spazio di testa delle bottiglie. In questa prima RUN i batch sono stati alimentati con 400 mL di H₂ (16,5 mmol) e 100 mL di CO₂ (4,1 mmol) mantenendo sempre il rapporto 4:1 di CO₂ e H₂.

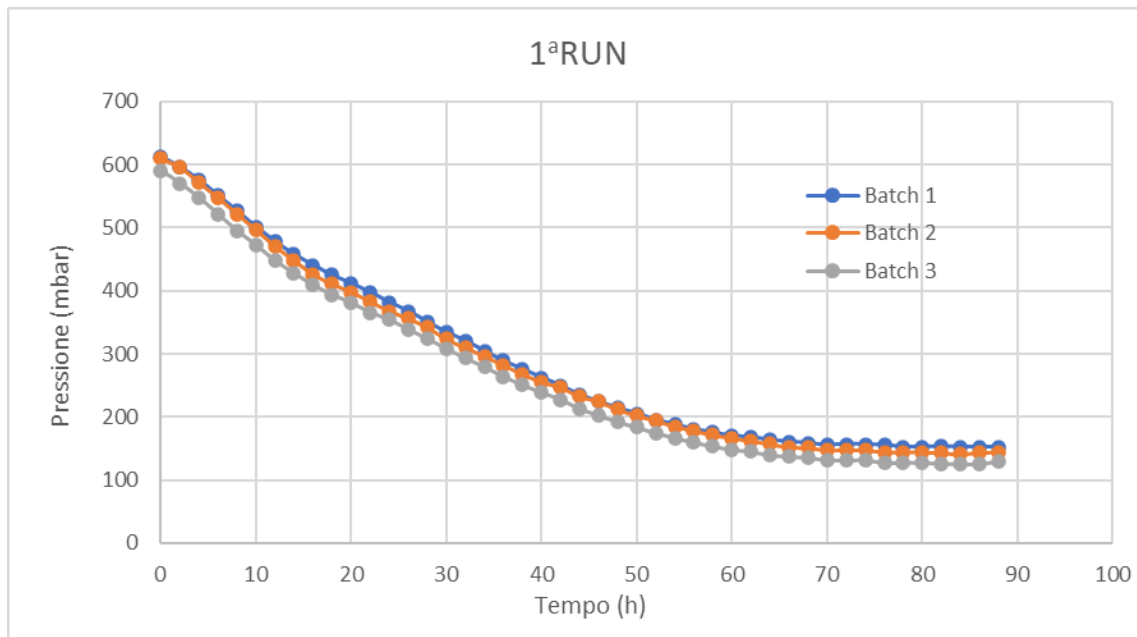


Figura 25, Andamento della pressione standardizzato 1ªRUN batch con biomassa granulare

Dalla Figura 25 si può osservare come la conversione dei substrati gassosi in metano si interrompa dopo circa 60–80 ore. L'agitatore orbitale ha consentito di mantenere una miscelazione più omogenea e costante rispetto ai singoli agitatori magnetici usati nelle RUN precedenti, e questo ha permesso di diminuire la variabilità dei dati tra una replica e l'altra, come si può osservare dal fatto che tutti e tre i reattori hanno andamenti delle pressioni comparabili tra di loro. Nella figure successive viene rappresentato l'andamento delle produzioni specifiche cumulative di metano rispetto alla biomassa (SMP_{biomassa} , Figura 26) e rispetto all'idrogeno alimentato (SMP_{H_2} , Figura 27)

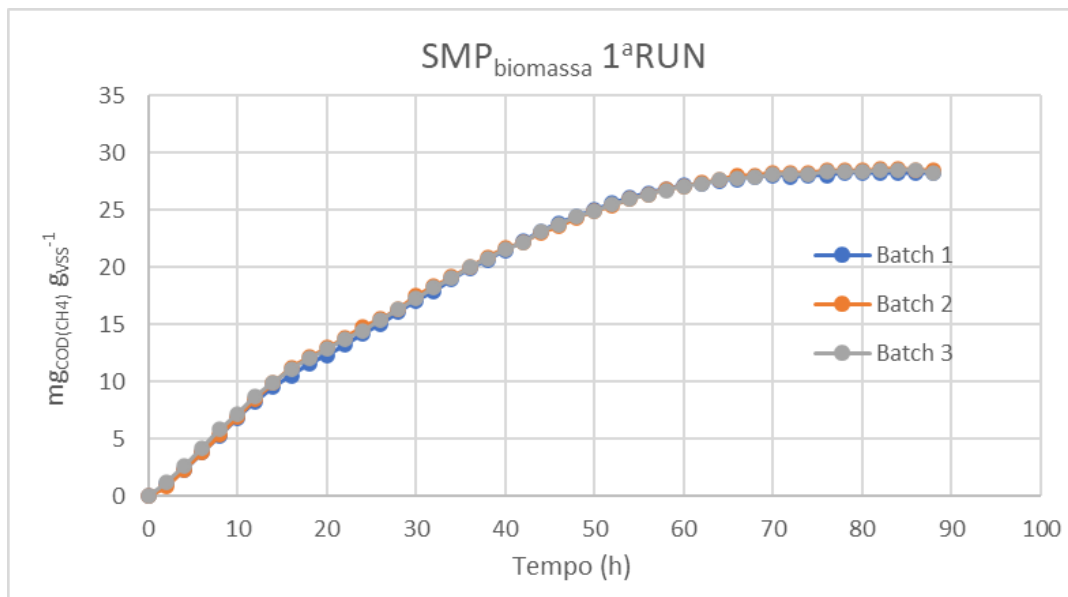


Figura 26, Andamento $SMP_{biomassa}$ 1^aRUN batch con biomassa granulare

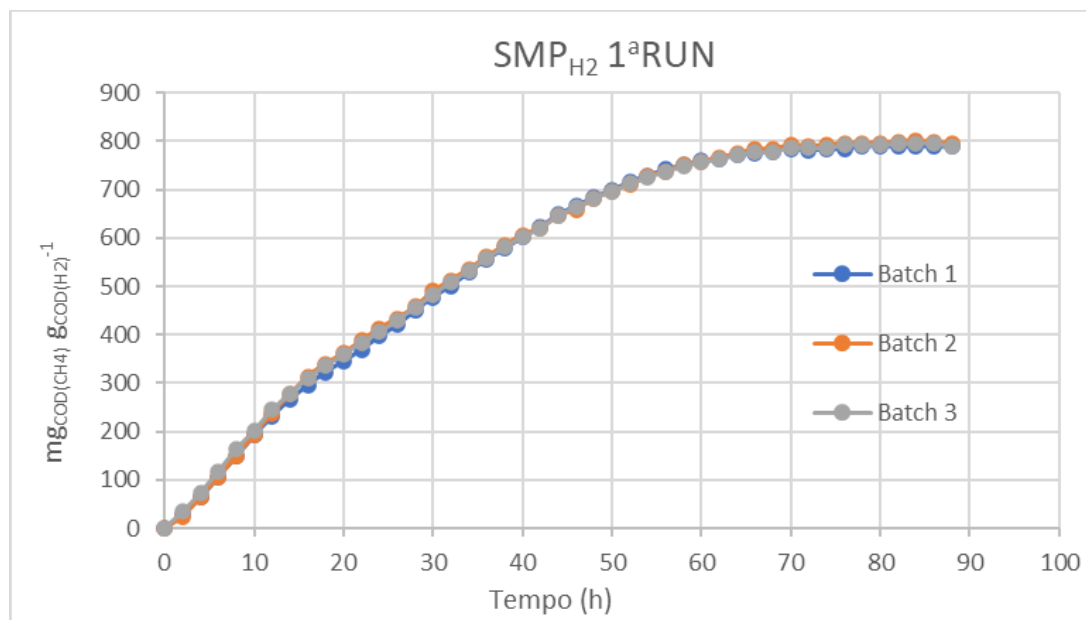


Figura 27, Andamento SMP_{H_2} 1^aRUN batch con biomassa granulare

Dalle Figure 26 e 27 si nota come gli andamenti degli SMP siano molto simili in tutte e 3 le repliche. Nella 1^a RUN con granulari è stato registrato un valore di SMP pari a $28,3 \pm 0,7 \text{ mg}_{\text{COD}(\text{CH}_4)} \text{ g}_{\text{VSS}}^{-1}$ per la biomassa e di $792 \pm 4 \text{ mg}_{\text{COD}(\text{CH}_4)} \text{ g}_{\text{COD}(\text{H}_2)}^{-1}$ rispetto all'idrogeno alimentato.

Dall'andamento delle pressioni nelle varie repliche è stata calcolata la quantità di moli di metano prodotte e l'efficienza della conversione rispetto all'idrogeno alimentato. In questa RUN sono stati alimentati 400 mL (16,52 mmol) di H_2 e 100 mL (4,13 mmol) di CO_2 . A fine test nelle tre repliche sono state prodotte $3,28 \pm 0,02 \text{ mmol}$ di CH_4 , con un'efficienza di conversione γ_{H_2} (calcolata rispetto all'idrogeno alimentato) pari a $79,2 \pm 0,4 \%$ e un resa volumetrica di $0,795 \pm 0,004 \text{ NL}_{\text{CH}_4} \text{ NL}_{\text{CO}_2}^{-1}$ e di $0,199 \pm 0,001 \text{ NL}_{\text{CH}_4} \text{ NL}_{\text{H}_2}^{-1}$.

Nella Figura 28 sono riportati gli andamenti dello SHMA in ciascuna delle repliche.

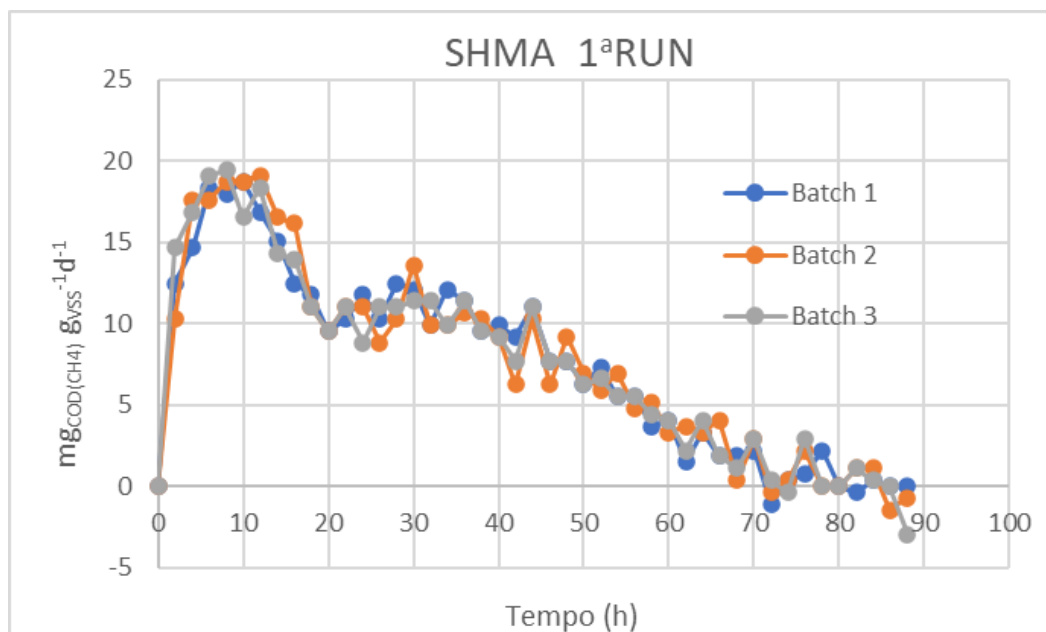


Figura 28, Andamento SHMA 1ªRUN batch con biomassa granulare

Dalla figura 28 si nota come il picco di attività in tutte le repliche sia stato registrato tra la 6ª e la 16ª ora, con un andamento delle attività piuttosto simile nel corso della prova. Visto gli andamenti simili delle repliche sono stati considerati tutti i picchi nel calcolo dello SHMA. Il valore dello SHMA medio nella prima RUN era pari a $19,0 \pm 0,4 \text{ mg}_{\text{COD}(\text{CH}_4)} \text{ g}_{\text{VSS}}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Nella Tabella 10 è riportata la composizione in percentuale del biogas della 1ªRUN con biomassa granulare, misurata alla fine della RUN. I valori di CH_4 , CO_2 e N_2 sono normalizzati come da Eq. 22 – 23 – 24.

Tabella 10, Composizione in % biogas della 1ª RUN con biomassa granulare

	Batch	$\text{CH}_4^*\%$	$\text{H}_2^*\%$	$\text{CO}_2^*\%$	$\text{N}_2^*\%$
Inizio RUN	1	0,0	32,4	8,1	59,5
	2	0,0	32,4	8,1	59,5
	3	0,0	32,4	8,1	59,5
Fine RUN	1	20,44	0,09	4,08	75,41
	2	19,60	0,13	4,00	76,25
	3	20,21	0,1	3,84	75,96
	5/6 bianchi	11,54	0	4,12	84,49

Come nelle prove precedenti, è stato osservato un consumo completo dell'idrogeno alimentato, e una percentuale residua di CO_2 nello spazio di testa, probabilmente legata alla produzione di CO_2 per metabolismo endogeno da parte dei granuli.

5.2.2. 2ª RUN

In questa 2ª RUN, i batch con biomassa sospesa sono stati depressurizzati, come è stato fatto anche nella 2ª RUN con i batch con biomassa sospesa. I reattori sono stati depressurizzati fino ad una pressione assoluta di circa 600 mbar prima dell'alimentazione e poi sono stati alimentati con 600 mL di idrogeno (24,77 mmol) e 130 mL di CO₂ (5,37 mmol). Nella Figura 29 sono rappresentati gli andamenti delle pressioni della 2ª RUN dei batch con granuli al netto della produzione del bianco.

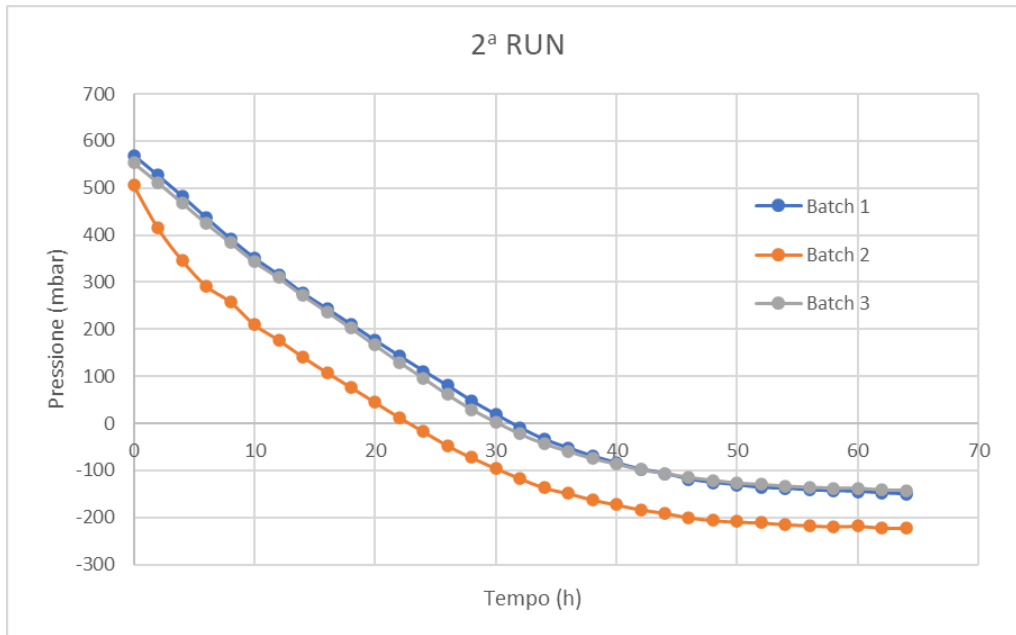


Figura 29, Andamento della pressione standardizzato 2ªRUN batch con biomassa granulare

Dalla Figura 29 il plateau di pressione è stato raggiunto tra le 40 e le 60 ore. Si può notare come l'andamento del batch 2 sia diverso dagli altri due. Questo andamento non può essere ricondotto al rallentamento dell'agitazione del batch 2, visto che in queste RUN si usa un unico agitatore per tutti i batch.

Nelle figure successive viene rappresentato l'andamento delle produzioni specifiche cumulative di metano rispetto alla biomassa ($SMP_{biomassa}$, Figura 30) e rispetto all'idrogeno alimentato (SMP_{H_2} , Figura 31).

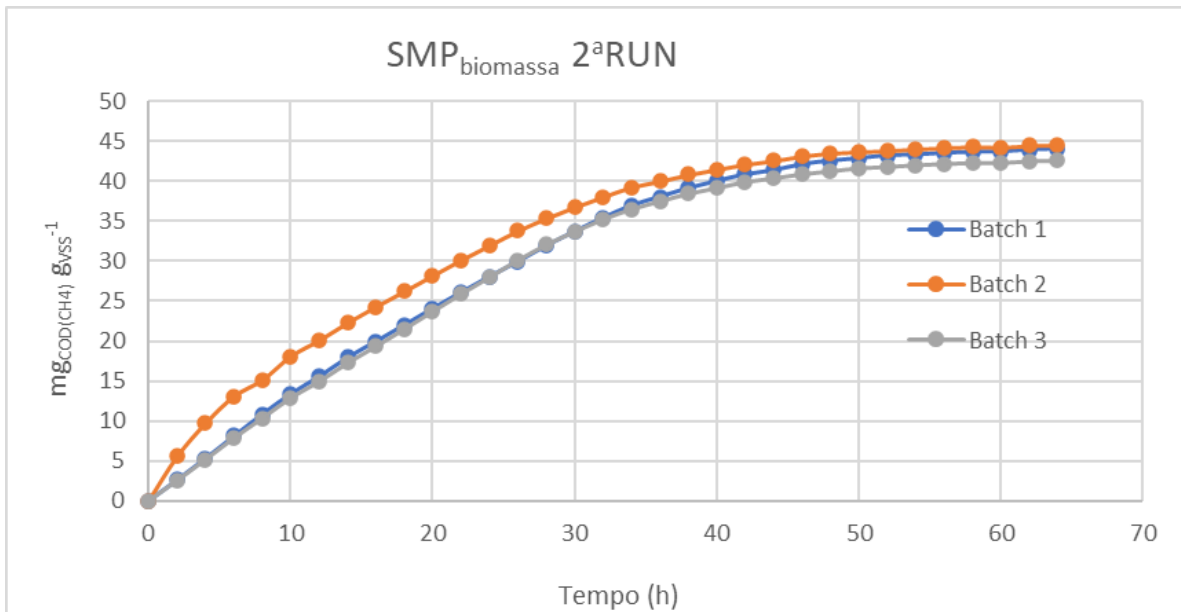


Figura 30, Andamento $SMP_{biomassa} 2^{a} RUN$ batch con biomassa granulare

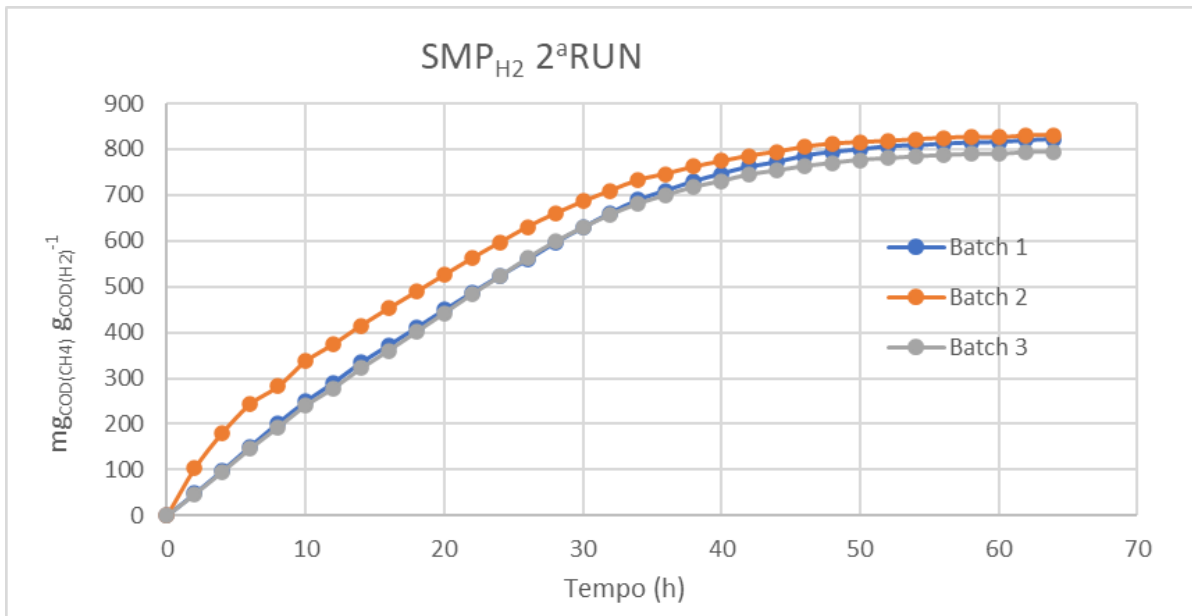


Figura 31, Andamento $SMP_{H_2} 2^{a} RUN$ batch con biomassa granulare

Dalle Figure 30 e 31, si nota che il batch 2 ha avuto un andamento leggermente diverso nelle prime 40 ore rispetto ai batch 1 e 3. Come è stato detto in precedenza, il motivo non può essere attribuito all'agitazione, perché come si è visto dalla 1^a RUN di batch con granuli, l'agitatore orbitale riesce a mantenere i 120 rpm per tutta la durata dell'esperimento. Nonostante questo, la produzione specifica del batch 2 dopo la 40^a ora si eguaglia a quella degli altri batch, e per questo motivo è stato considerato nel calcolo del valore medio del SMP. Le produzioni specifiche di metano per la biomassa e per l'idrogeno erano rispettivamente pari a $43 \pm 1 \text{ mg}_{\text{COD}(\text{CH}_4)} \text{ g}_{\text{VSS}}^{-1}$ e $815 \pm 19 \text{ mg}_{\text{COD}(\text{CH}_4)} \text{ g}_{\text{COD}(\text{H}_2)}^{-1}$. Convertendo le variazioni di pressione in quantità di moli di metano prodotte, risulta una produzione massima a fine test di $5,0 \pm 0,1 \text{ mmol}$ di CH_4 , un'efficienza di conversione dell'idrogeno γ_{H_2} pari al $81 \pm 2 \%$ e una resa volumetrica di $0,94 \pm 0,02 \text{ NL}_{\text{CH}_4} \text{ NL}_{\text{CO}_2}^{-1}$ e di $0,201 \pm$

0,004 NL_{CH4} NL_{H2}⁻¹. Nella Figura 32 sono riportati gli andamenti degli SHMA della 2^a RUN dei batch con biomassa sospesa.

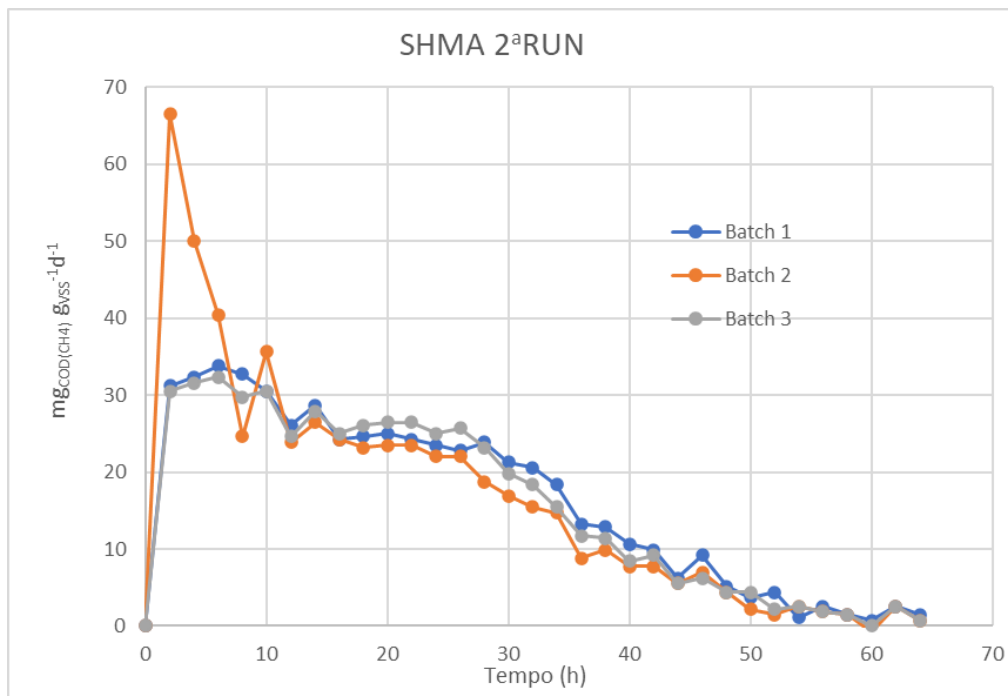


Figura 32, Andamento SHMA 2ªRUN batch con biomassa granulare

Dalla Figura 32 si può ipotizzare che ci sia stato un problema con il rilevamento della pressione nelle prime 6 ore del batch 2. Escludendo il batch 2, dalla Figura 32 si vede che il picco dell'attività è arrivato alla sesta ora per i batch 1 e 3, con valore attorno ai 30 mg_{COD(CH4)} g_{VSS}⁻¹d⁻¹. Il valore dello SHMA medio è pari a 33 ± 1 mg_{COD(CH4)} g_{VSS}⁻¹d⁻¹. Rispetto alla RUN precedente c'è stato un aumento attività metanogenica idrogenotrofa. Questo probabilmente perché la quantità di substrato è aumentata e dalla 1^a RUN con biomassa sospesa sono stati selezionati più microorganismi idrogenotrofi. Nella Tabella 11 è riportata la composizione in percentuale del biogas della 2ªRUN con biomassa sospesa, misurata alla fine della RUN. I valori di CH₄, CO₂ e N₂ sono normalizzati come da Eq. 22 – 23 – 24.

Tabella 11, Composizione in % biogas della 2ª RUN con biomassa granulare

	Batch	CH ₄ *%	H ₂ *%	CO ₂ *%	N ₂ *%
Inizio RUN	1	7,6	51,5	12,4	28,4
	2	7,4	51,2	12,5	28,9
	3	7,7	51,0	12,6	28,7
Fine RUN	1	47,95	0,21	4,96	46,58
	2	43,89	0,22	5,33	50,40
	3	41,45	0,45	3,86	54,23
	5/6 bianchi	17,11	0	6,04	76,90

Rispetto alla RUN precedente, i contenuti di metano sono aumentati. Anche in questo caso il biogas prodotto dai bianchi è stato analizzato in un'unica bag. L'idrogeno è stato convertito completamente e il valore medio dell'efficienza di conversione è pari a $83 \pm 2\%$ e risulta una percentuale residua non trascurabile di CO_2 .

5.2.3. 3ª RUN

Anche in questa RUN sono stati depressurizzati i batch, e sono aumentati ulteriormente i volumi di substrato iniettati. Il volume di H_2 era pari 700 mL di H_2 (28,90 mmol), mentre per il biossido di carbonio sono stati iniettati volumi differenti in base alla quantità residua presente in ciascuna bottiglia, per avere sempre un rapporto $\text{H}_2:\text{CO}_2$ pari a 4:1, come effettuato nei precedenti test. Nello specifico 154 mL (6,35 mmol) di CO_2 nel batch 1, 152 mL (6,27 mmol) di CO_2 nel batch 2 e 160 mL (6,60 mmol) di CO_2 nel batch 3. Nella Figura 33 sono rappresentati gli andamenti di pressione.

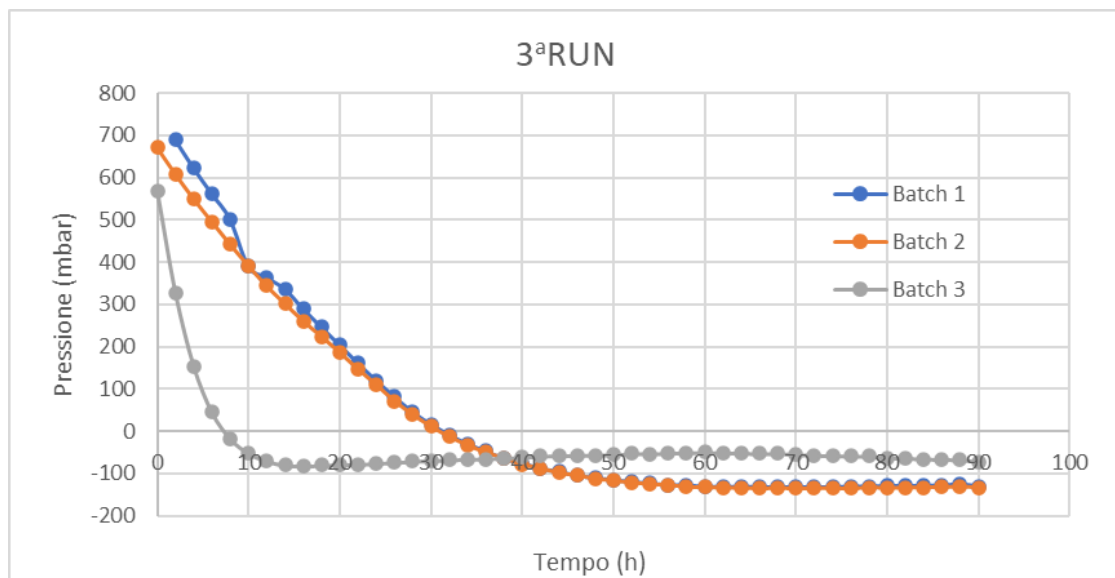


Figura 33, Andamento della pressione standardizzato 3ªRUN batch con biomassa granulare

Dalla Figura 33, si può notare come il batch 3 ha un andamento di pressione molto discordante con gli altri batch, visto che in meno di 8 ore è arrivato ad una pressione pari a quella atmosferica. Durante il campionamento del gas per l'analisi all'ETG si è potuto constatare che il setto da cui venivano fatti i campionamenti era bucato. Questo ha fatto perdere il gas all'interno del batch. Di conseguenza il batch 3 è stato escluso dall'elaborazione dei dati. I batch 1 e 2 hanno raggiunto il plateau di pressione tra le 40 e le 60 ore. Convertendo le variazioni di pressione in quantità di moli di metano prodotte solo dei batch 2 e 3, risulta una produzione massima a fine test di $5,3 \pm 0,7$ mmol di CH_4 , un'efficienza di conversione dell'idrogeno pari al $79 \pm 1\%$ e una resa volumetrica di $0,8 \pm 0,1$ $\text{NL}_{\text{CH}_4} \text{NL}_{\text{CO}_2}^{-1}$ e di $0,18 \pm 0,02$ $\text{NL}_{\text{CH}_4} \text{NL}_{\text{H}_2}^{-1}$. Sulla base della quantità di moli di metano prodotta, è stata calcolata la produzione specifica cumulativa di metano, rispetto alla biomassa ($\text{SMP}_{\text{biomassa}}$, Figura 34) e all'idrogeno alimentato (SMP_{H_2} , Figura 35)

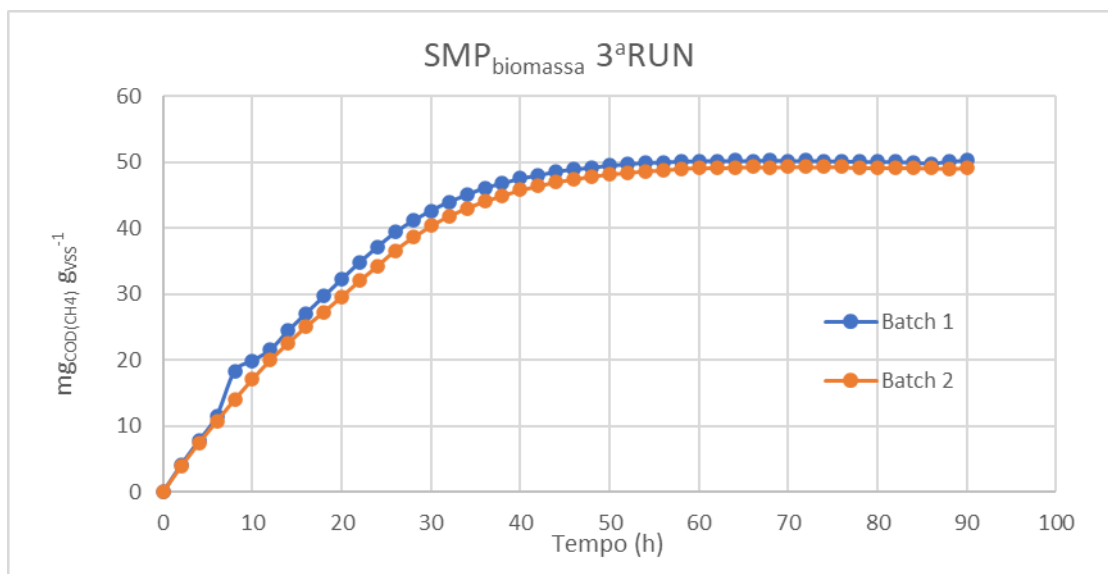


Figura 34, Andamento $SMP_{biomassa}$ 3ª RUN batch con biomassa granulare

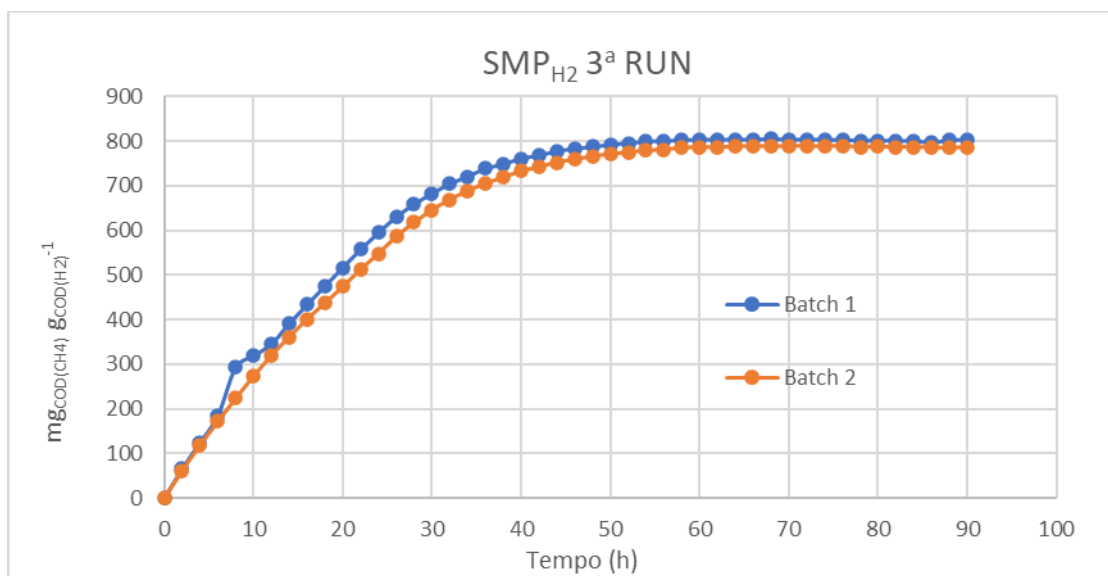


Figura 35, Andamento SMP_{H_2} 3ª RUN batch con biomassa granulare

Dalle Figure 34 e 35 , gli andamenti dei batch 1 e 2 sono molto simili e raggiungono il massimo di produzione dopo a 40ª ora. Questo a riprova che l'agitazione orbitale risulta omogenea e costante durante l'intero arco dell'esperimento rispetto all'agitazione magnetica. La media della produzione specifica cumulativa di metano per la biomassa e per l'idrogeno sono rispettivamente pari a $49,7 \pm 0,7 \text{ mg}_{\text{COD}(\text{CH}_4)} \text{ g}_{\text{VSS}}^{-1}$ e a $794 \pm 12 \text{ mg}_{\text{COD}(\text{CH}_4)} \text{ g}_{\text{COD}(\text{H}_2)}^{-1}$. Nella Figura 36 sono rappresentati gli andamenti dello SHMA ottenuti in questa RUN.

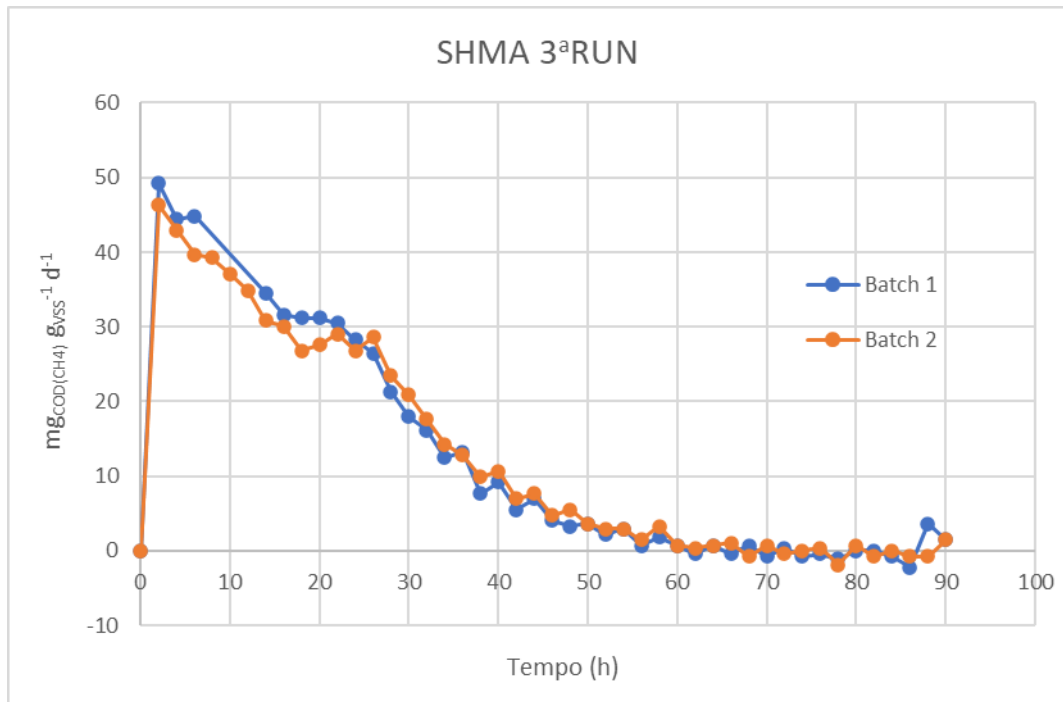


Figura 36, Andamento SHMA 3ªRUN batch con biomassa granulare

Dalla Figura 36, i picchi di attività sono stati raggiunti alla 2ª ora di RUN. Il batch 1 ha superato l'attività del batch 2. Rispettivamente i valori erano $49,22 \text{ mg}_{\text{COD}(\text{CH}_4)} \text{ g}_{\text{VSS}}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e $46,28 \text{ mg}_{\text{COD}(\text{CH}_4)} \text{ g}_{\text{VSS}}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Dalla seconda ora in poi le attività calano in modo continuo fino ad essere nulle. I valori tra le 8 e le 12 ore, sono stati rimossi perché risultavano degli errori di campionamento di sensore di pressione. Il medio dei picchi di SHMA ha raggiunto alla seconda ora è pari a $47 \pm 2 \text{ mg}_{\text{COD}(\text{CH}_4)} \text{ g}_{\text{VSS}}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Questo supera l'attività ottenuta nella seconda RUN. Nella Tabella 12 è riportata la composizione in percentuale del biogas della 3ªRUN con biomassa granulare, misurata alla fine della RUN. I valori di CH_4 , CO_2 e N_2 sono normalizzati come da Eq. 22 – 23 – 24.

Tabella 12, Composizione in % biogas della 3ª RUN con biomassa granulare

	Batch	CH ₄ %	H ₂ %	CO ₂ %	N ₂ %
Inizio RUN	1	16,1	54,6	13,7	15,7
	2	14,9	54,3	13,6	17,2
Fine RUN	1	55,70	0,48	2,38	41,25
	2	53,20	0,54	2,52	43,69

La produzione di biogas nei bianchi non ha permesso di analizzare la composizione del biogas. Il batch 3 avendo avuto perdite durante la RUN è stato escluso dalle analisi. Dalla Tabella 13 si vede che le percentuali di metano aumentate rispetto alla RUN precedente.

5.2.4. 4^a RUN

In questa RUN, è stato deciso di alimentare tutti batch con un minor volume di H₂ pari a 600 mL (24,77 mmol). I volumi di CO₂ iniettati per i batch 1,2 erano 140 mL (5,78 mmol) e 150 mL (6,19 mmol) per il batch 3. Questo è stato fatto per vedere se i volumi di idrogeno precedentemente usati, fossero la causa delle diminuzioni dei fattori di conversione. Nella Figura 37 è riportato l'andamento di pressione al netto del bianco di questa ultima RUN. Il batch 3 è stato di lavato con azoto per rimuovere l'aria entrata nello spazio di testa dalla RUN precedente.

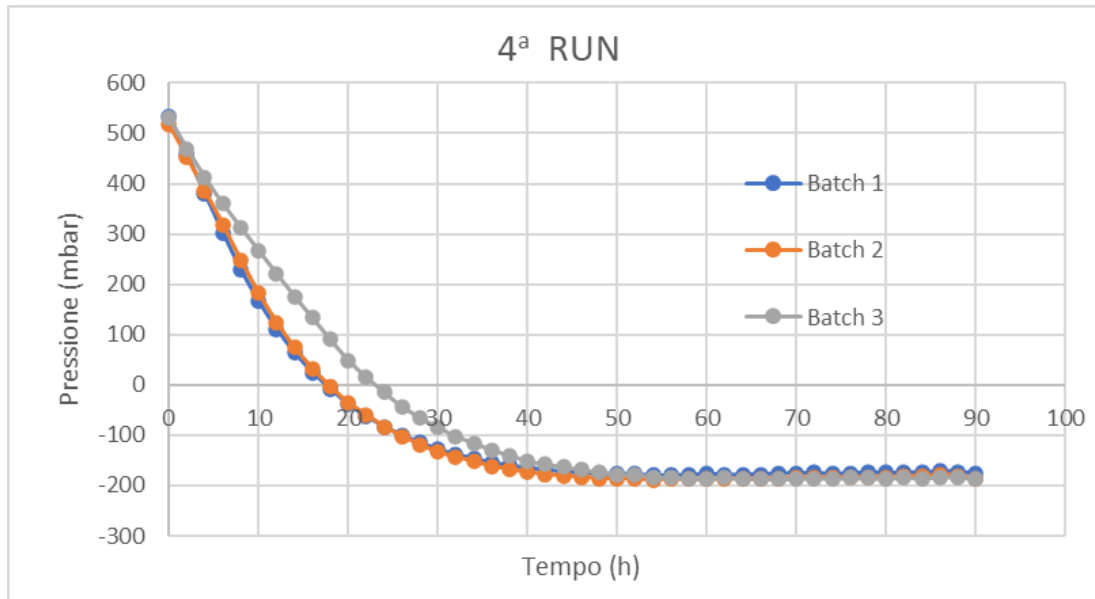


Figura 37, Andamento della pressione standardizzata 4^aRUN batch con biomassa granulata

Dalla Figura 37 come dai precedenti test, l'agitazione orbitale si conferma efficiente per la miscelazione. Mentre i batch 1 e 2 hanno andamenti molto simili, il batch 3 presenta delle pressioni leggermente più alte dalla sesta fino alla 40^a ora. Il raggiungimento del plateau rimane sempre tra le 40 e le 60 ore di esperimento. Convertendo le variazioni di pressione in quantità di moli di metano prodotte, risulta una produzione massima a fine test di $5,02 \pm 0,05$ mmol di CH₄, un'efficienza di conversione dell'idrogeno pari al $81,1 \pm 0,7$ % e una resa volumetrica di $0,851 \pm 0,008$ NL_{CH₄} NL_{CO₂}⁻¹ e di $0,203 \pm 0,002$ NL_{CH₄} NL_{H₂}⁻¹. Nelle Figure 38 e 39 sono riportate le produzioni specifiche cumulative per la biomassa e per l'idrogeno.

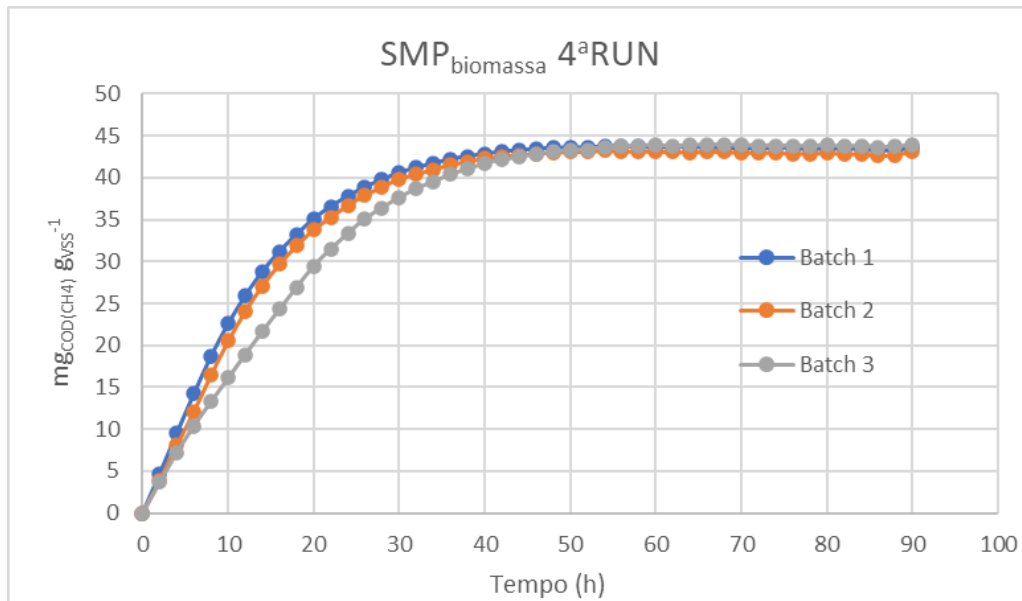


Figura 38, Andamento $SMP_{biomassa}$ 4ªRUN batch con biomassa granulare

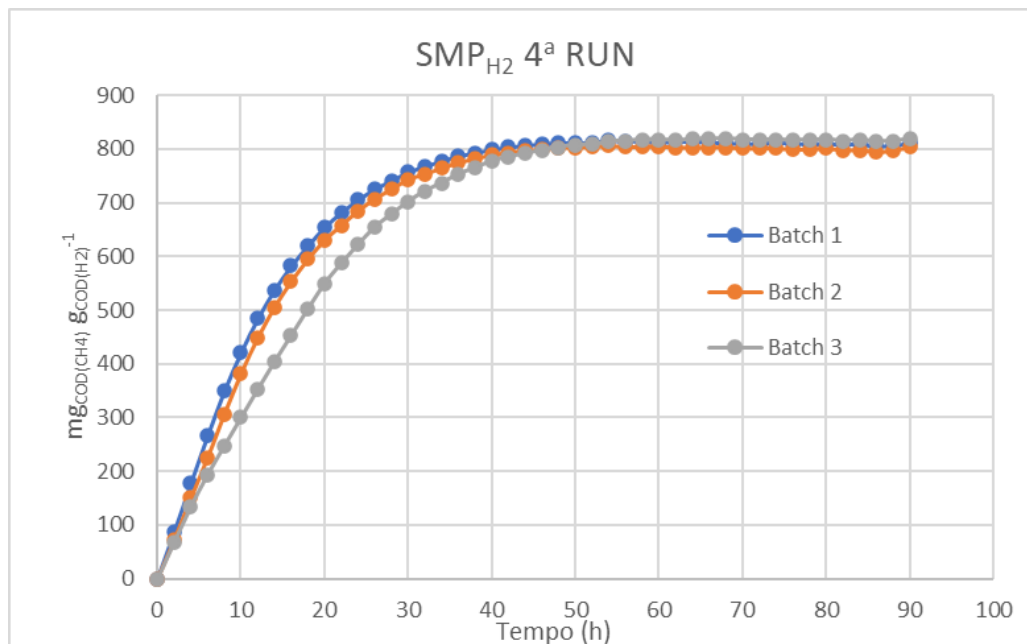


Figura 39, Andamento SMP_{H_2} 4ªRUN batch con biomassa granulare

Dalle Figure 38 e 39, il batch 3 dalla 4ª ora fino alla 30ª ha avuto produzione minore rispetto ai batch 1 e 2. Dopo la 40ª ha eguagliato la produzione degli altri batch. La produzione specifica di metano per la biomassa e per l'idrogeno sono rispettivamente pari a $43,5 \pm 0,4 \text{ mg}_{\text{COD}(\text{CH}_4)} \text{ g}_{\text{VSS}}^{-1}$ e a $811 \pm 7 \text{ mg}_{\text{COD}(\text{CH}_4)} \text{ g}_{\text{COD}(\text{H}_2)}^{-1}$. I valori ottenuti in questa RUN simili a quelli ottenuti nella 2ª RUN con granuli. In cui l'alimentazione di idrogeno era la stessa (24,77 mmol) e mentre il volume di CO_2 era minore (5,36 mmol). Tuttavia, risultano produzioni di metano più basse rispetto alla RUN precedente. Nella Figura 40 sono riportati gli andamenti dello SHMA.

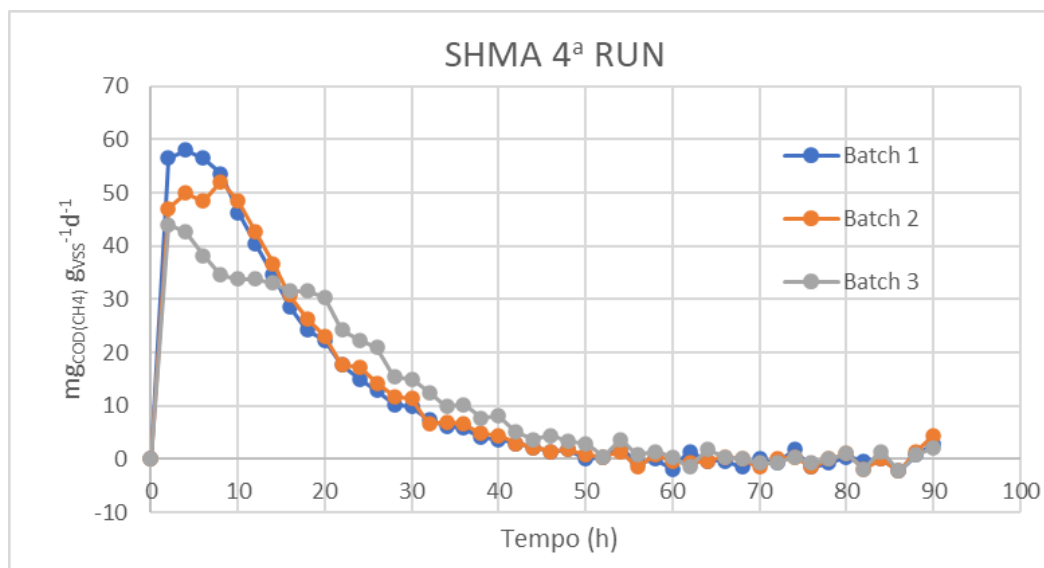


Figura 40, Andamento SHMA 4ªRUN batch con biomassa granulare

Dalla Figura 40, i picchi di attività sono arrivati nelle prime dieci ore. Il batch 3 ha avuto il picco di attività alla seconda ora con un valore pari a $44,07 \text{ mg}_{\text{COD}(\text{CH}_4)} \text{ g}_{\text{VSS}}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Il batch 2 ha raggiunto il picco alla ottava ora con un valore pari a $52,15 \text{ mg}_{\text{COD}(\text{CH}_4)} \text{ g}_{\text{VSS}}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Il batch 1 ha avuto il picco di attività alla quarta ora con valore pari a $56,03 \text{ mg}_{\text{COD}(\text{CH}_4)} \text{ g}_{\text{VSS}}^{-1} \text{ d}^{-1}$, risultando il picco più alto di tutti e tre i batch. Le differenze nelle attività non possono essere attribuite alla miscelazione, visto i precedenti esperimenti. Le differenti produzioni di metano, e la diversa attività del batch 3, possono essere dipese anche dal lavaggio di azoto, azione che per gli altri batch è stata fatta solo prima di iniziare la prima RUN. Dalla media dei picchi di attività nella terza RUN si ha ottenuto uno SHMA pari a $51 \pm 7 \text{ mg}_{\text{COD}(\text{CH}_4)} \text{ g}_{\text{VSS}}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Nella Tabella 13 è riportata la composizione in percentuale del biogas della 4ªRUN con biomassa granulare, misurata alla fine della RUN. I valori di CH_4 , CO_2 e N_2 sono normalizzati come da Eq. 22 – 23 – 24.

Tabella 13, Composizione in % biogas della 4ª RUN con biomassa granulare

	Batch	$\text{CH}_4\%$	$\text{H}_2\%$	$\text{CO}_2\%$	$\text{N}_2\%$
Inizio RUN	1	20,5	51,5	12,8	15,2
	2	19,5	51,5	12,9	16,1
Fine RUN	1	71,32	0,4	3,63	24,36
	2	66,09	0,51	3,62	29,64

Purtroppo, durante l'analisi all'ETG, la bag del batch 3 ha avuto una perdita che ha fatto uscire il biogas impedendo la sua analisi. I bianchi non avendo prodotto abbastanza biogas, non è stato possibile analizzarli. In questa RUN sono state raggiunte le più alte percentuali di metano, con un media pari a $68 \pm 3\%$. Nella Tabella 14 sono riportate le misure di pH e alcalinità all'inizio e alla fine test, relative alle RUN con biomassa sospesa.

Tabella 14, Alcalinità parziale e totale pH inizio e fine con biomassa granulare

Misura	pH	Alk parz mg _{CaCO3} L ⁻¹	Alk tot mg _{CaCO3} L ⁻¹	Alk tot - Alk parz mg _{CaCO3} L ⁻¹
Inizio test	7,2 ± 0,0	0	0	0
Fine test	7,90 ± 0,20	0,93 ± 0,04	1,29 ± 0,06	0,38 ± 0,04

Dalla Tabella 14 si vede che il pH è rimasto nel range ottimale per la biometanazione. C'è stato un leggero aumento dell'alcalinità ma non tale da inibire il processo. Come per le RUN con biomassa sospesa, non c'è stata produzione di VFA.

5.3. Confronto delle rese ottenute

Nella Tabella 15 sono stati riassunti i valori medi dei risultati delle RUN sia con biomassa sospesa che con biomassa granulare.

Tabella 15, Risultati delle RUN sia con biomassa sospesa che con biomassa granulare

	SMP _{biomassa} mg _{COD(CH4)} g _{VSS} ⁻¹	SMP _{H2} mg _{COD(CH4)} g _{COD(H2)} ⁻¹	SHMA _{med} mg _{COD(CH4)} g _{VSS} ⁻¹ d ⁻¹	γ _{H2} %	CH ₄ *% _{med} %	r _{CO2} NL _{CH4} NL _{CO2} ⁻¹	r _{H2} NL _{CH4} NL _{H2} ⁻¹
1 ^a RUN ^a	26 ± 1	757 ± 20	29 ± 2	75 ± 2	15 ± 1	0,75 ± 0,06	0,18 ± 0,01
2 ^a RUN ^a	39,6 ± 0,7	766 ± 12	49 ± 2	77 ± 1	37 ± 2	0,92 ± 0,01	0,191 ± 0,003
3 ^a RUN ^a	40 ± 2	780 ± 43	52 ± 6	76,20 ± 0,04	50,7 ± 0,7	1,02 ± 0,06	0,19 ± 0,01
1 ^a RUN ^b	28,3 ± 0,7	792 ± 4	19,0 ± 0,4	79,2 ± 0,4	20,1 ± 0,3	0,795 ± 0,004	0,199 ± 0,001
2 ^a RUN ^b	43 ± 1	815 ± 19	33 ± 1	81 ± 2	44 ± 3	0,94 ± 0,02	0,201 ± 0,004
3 ^a RUN ^b	49,7 ± 0,1	794 ± 11	47 ± 2	79 ± 1	54 ± 2	0,8 ± 0,1	0,18 ± 0,02
4 ^a RUN ^b	43,5 ± 0,4	811 ± 7	51 ± 7	81,1 ± 0,7	69 ± 3	0,851 ± 0,008	0,203 ± 0,002

^a test su biomassa sospesa

^b test su biomassa granulare

Dalla Tabella 15, si vede che dopo ogni RUN si ha un aumento delle percentuali di metano. Questo dipende anche dal fatto che dopo il campionamento del biogas presente nello spazio di testa, una piccola quantità di biogas (e quindi anche di metano) rimaneva all'interno del batch. Le rese volumetriche per il substrato di biossido di carbonio sono aumentate col proseguirsi delle RUN con biomassa sospesa, dove l'incremento maggiore è avvenuto dalla 1ªRUN alla 2ªRUN. La resa volumetrica più alta è stata ottenuta nella 3ªRUN con biomassa sospesa ($1,02 \pm 0,06 \text{ NL}_{\text{CH}_4} \text{ NL}_{\text{CO}_2}^{-1}$). Nelle RUN con biomassa granulare, la resa volumetrica è aumentata fino alla 2ªRUN con un valore massimo pari a $0,94 \pm 0,02 \text{ NL}_{\text{CH}_4} \text{ NL}_{\text{CO}_2}^{-1}$. Invece, la resa volumetrica per il substrato idrogeno rimane costante durante il proseguirsi delle RUN per entrambe le biomasse.

Le efficienze di conversione dell'idrogeno (γ_{H_2}) delle RUN con biomassa sospesa e con biomassa granulare sono rimaste costanti durante tutto l'arco degli esperimenti. Confrontando le attività metanogeniche specifiche, si osserva che nelle tre diverse RUN con biomassa sospesa l'attività minima è risultata essere pari a $29 \pm 2 \text{ mg}_{\text{COD}(\text{CH}_4)} \text{ g}_{\text{VSS}}^{-1} \text{ d}^{-1}$ mentre l'attività massima pari a $52 \pm 6 \text{ mg}_{\text{COD}(\text{CH}_4)} \text{ g}_{\text{VSS}}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Mentre per le RUN biomassa granulare, si osserva una attività minima inferiore ($19,0 \pm 0,4 \text{ mg}_{\text{COD}(\text{CH}_4)} \text{ g}_{\text{VSS}}^{-1} \text{ d}^{-1}$) ed una massima comparabile pari a $51 \pm 7 \text{ mg}_{\text{COD}(\text{CH}_4)} \text{ g}_{\text{VSS}}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

Confrontando i valori di SHMA, l'incremento delle attività dalla prima alla seconda RUN con biomassa sospesa è evidente, così come nel test con biomassa granulare; in quest'ultimo caso gli incrementi delle attività si osservano fino al terzo step. Questo incremento evidenzia il progressivo adattamento della biomassa alle condizioni di crescita, in special modo nella selezione dei microorganismi coinvolti (idrogenotrofi). Per quanto riguarda SMP per la biomassa sospesa e biomassa granulare non si può dire con certezza che questo parametro sia incrementato con il proseguirsi del RUN per via dell'elevata variabilità dei dati. Per questo motivo, bisognerebbe fare delle analisi statistiche più approfondite. Tuttavia, confrontando i parametri $\text{SMP}_{\text{biomassa}}$ e SHMA delle prime RUN rispetto alle ultime RUN, si può dedurre che ci siano stati degli incrementi nella produttività e delle attività.

Sono stati fatti dei confronti con le attività metanogeniche specifiche e con le produzioni specifiche di metano presenti nella letteratura. Nella Tabella 16, vengono riportati i dati presi dalla letteratura che dalle RUN compiute.

Tabella 16, Confronto tra dati presenti in letteratura e i risultati ottenuti dalle RUN con biomassa granulare e sospesa

Biomassa testata	SHMA	SMP _{biomassa}	r _{H2}	Autore
	mg _{COD(CH4)} g _{VSS} ⁻¹ d ⁻¹	mg _{COD(CH4)} g _{VSS} ⁻¹	NL _{CH4} NL _{H2} ⁻¹	
Biomassa granulare	570 ± 30	-	-	Gonzalez-Estrella et al., (2013)
	840 ± 80	-	-	Regueiro et al., (2012)
	480 ± 30	140 ± 30	-	
	350 ± 10	410 ± 60	-	
	260 ± 10	150 ± 30	-	Ripoll et al., (2020)
	310 ± 10	300 ± 30	-	
	480 ± 30	390 ± 50	-	
	-	-	0,18	Kozak et al., (2022)
	-	-	0,19	Bassani et al., (2017)
	51 ± 7	49,7 ± 0,1	0,203 ± 0,002	Questo studio
Biomassa sospesa	18 ± 1	-	-	Liu et al., (2016)
	21 ± 4	-	-	
	45 ± 2	-	-	Hao et al., (2017)
	72 ± 7	50 ± 10	-	Ripoll et al., (2020)
	52 ± 6	40 ± 2	0,19 ± 0,01	Questo studio

Nei test svolti con biomassa granulare è stato registrato un valore massimo di SMP pari a $49,7 \pm 0,1$ mg_{COD(CH4)} g_{VSS}⁻¹, lievemente superiore a quanto ottenuto nei test con biomassa sospesa (40 ± 2 mg_{COD(CH4)} g_{VSS}⁻¹). L'attività specifica idrogenotrofa (SHMA) dei due inoculi è però risultata comparabile, con un valore di 51 ± 7 e 52 ± 6 mg_{COD(CH4)} g_{VSS}⁻¹ d⁻¹, rispettivamente per biomassa granulare e sospesa. Le attività registrate su biomassa sospesa sono risultate superiori rispetto a quanto ottenuto da Liu et al., (2016) (18 ± 1 e 21 ± 4 mg_{COD(CH4)} g_{VSS}⁻¹ d⁻¹) e da Hao et al., (2017) (45 ± 2 mg_{COD(CH4)} g_{VSS}⁻¹ d⁻¹), mentre per quanto riguarda la biomassa granulare, le prove svolte hanno evidenziato valori inferiori rispetto a quelli ottenuti in letteratura: 570 ± 30 (Gonzalez-Estrella et al., 2013), 840 ± 80 (Regueiro et al., 2012). Questa differenza è probabilmente associata ai diversi parametri operativi impostati nel test, quali in particolare la velocità di agitazione (che influenza il trasferimento di massa gas/liquido e, di conseguenza, la disponibilità di substrato), e il rapporto tra substrato presente e biomassa disponibile. Le rese ottenute sono invece in linea con quanto ottenuto in letteratura, sia per biomassa sospesa che per quella granulare, se si prende in considerazione la resa volumetrica: su biomassa sospesa è stata ottenuta una resa di $1,02 \pm 0,06$ NL_{CH4} NL_{CO2}⁻¹ e di $0,19 \pm 0,01$ NL_{CH4} NL_{H2}⁻¹, e su

biomassa granulare di $0,94 \pm 0,02 \text{ NL}_{\text{CH}_4} \text{ NL}_{\text{CO}_2}^{-1}$ e di $0,20 \pm 0,01 \text{ NL}_{\text{CH}_4} \text{ NL}_{\text{H}_2}^{-1}$. Questi valori risultano in linea con quanto ottenuto su biomassa granulare da Kozak et al., (2022) ($0,18 \text{ NL}_{\text{CH}_4} \text{ NL}_{\text{H}_2}^{-1}$) e da Bassani et al., (2017) ($0,19 \text{ NL}_{\text{CH}_4} \text{ NL}_{\text{H}_2}^{-1}$).

Da questi test in batch con biomassa sospesa e granulare, i principali parametri operativi che possono aver condizionato le rese sono il sistema di agitazione e la quantità di substrato somministrato. Per quanto riguarda la quantità di substrato, in alcune RUN si è riscontrato un aumento dell' SMP e dello SHMA. durante le varie fasi di arricchimento con CO_2 e dell' H_2 . Purtroppo, l'elevata variabilità dei risultati ottenuti richiede un ulteriore approfondimento, supportato anche da analisi microbiologiche.

Una difficoltà riscontrata nella valutazione dei risultati ottenuti in questi test esplorativi è la disomogeneità di unità di misura e di parametri testati che rende difficile il confronto tra le varie prove sperimentali con la letteratura. Infatti, durante la ricerca bibliografica, sono stati riscontrati pochi articoli che hanno riportato parametri come l'attività metanogenica idrogenotrofa specifica, la produzione metanogenica specifica, le efficienze di conversione dei substrati e le rese volumetriche. Per questo motivo, una standardizzazione dei parametri da riportare negli studi di biometanazione conferirebbe una maggiore omogeneità che faciliterebbe il confronto bibliografico tra esperimenti con diverse configurazioni.

6. Conclusioni

In base agli obiettivi posti in questa tesi si conclude che:

- Durante il progressivo adattamento della biomassa sospesa mediante aggiunta dei substrati, l'attività di biometanazione ha raggiunto un valore massimo di SMP pari a $40 \pm 2 \text{ mg}_{\text{COD}(\text{CH}_4)} \text{ g}_{\text{VSS}}^{-1}$, un valore massimo di SHMA pari a $52 \pm 6 \text{ mg}_{\text{COD}(\text{CH}_4)} \text{ g}_{\text{VSS}}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e delle rese volumetriche pari a $1,02 \pm 0,06 \text{ NL}_{\text{CH}_4} \text{ NL}_{\text{CO}_2}^{-1}$ e di $0,19 \pm 0,01 \text{ NL}_{\text{CH}_4} \text{ NL}_{\text{H}_2}^{-1}$.
- Durante il progressivo adattamento della biomassa granulare mediante aggiunta dei substrati, l'attività di biometanazione ha raggiunto un valore massimo di SMP pari a $49,7 \pm 0,1 \text{ mg}_{\text{COD}(\text{CH}_4)} \text{ g}_{\text{VSS}}^{-1}$, un valore massimo di SHMA pari a $51 \pm 7 \text{ mg}_{\text{COD}(\text{CH}_4)} \text{ g}_{\text{VSS}}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e delle rese volumetriche pari a $0,94 \pm 0,02 \text{ NL}_{\text{CH}_4} \text{ NL}_{\text{CO}_2}^{-1}$ e di $0,203 \pm 0,002 \text{ NL}_{\text{CH}_4} \text{ NL}_{\text{H}_2}^{-1}$.
- Dal confronto dei test svolti, la biomassa granulare ha registrato un valore massimo di SMP lievemente superiore a quanto ottenuto nei test con biomassa sospesa. L'attività specifica metanogenica idrogenotrofa (SHMA) dei due inoculi risultata comparabile. Le attività registrate su biomassa sospesa sono risultate superiori rispetto a quanto ottenuto da Liu et al., (2016) e da Hao et al., (2017), mentre per quanto riguarda la biomassa granulare, le prove svolte hanno evidenziato valori inferiori rispetto a quelli ottenuti in letteratura. Le rese volumetriche ottenute sono invece in linea con quanto ottenuto in letteratura.
- Non è stato possibile approfondire e valutare le problematiche legate alla solubilizzazione dei substrati gassosi. Tuttavia, Le prove svolte evidenziano quanto il processo di biometanazione possa essere un valido strumento per la gestione delle emissioni di biossido di carbonio, ma al tempo stesso evidenziano quanto sia importante la definizione di metodi standardizzati per il calcolo dell'attività specifica di metanazione idrogenotrofa, parametro molto rilevante nella comprensione delle cinetiche di processo. Inoltre, risulta fondamentale l'identificazione dei parametri operativi ottimali per la massimizzazione delle rese del processo. Eventuali prove future potrebbero, infatti, essere focalizzate nell'ottimizzazione del trasferimento di massa gas/liquido (tramite variazione dell'agitazione o ricircolo del gas dello spazio di testa) e nella variazione del rapporto substrato biomassa. Queste prove permetterebbero di ottenere una migliore comprensione del processo biologico, e massimizzarne la resa agevolerebbe il passaggio del processo a scala reale, così da fornire un ulteriore strumento per diminuire le emissioni di biossido di carbonio, assicurando al tempo stesso un ritorno energetico dal metano prodotto.

Bibliografía

- Ahern, E. P., Deane, P., Persson, T., Ó Gallachóir, B., & Murphy, J. D. (2015). A perspective on the potential role of renewable gas in a smart energy island system. *Renewable Energy*, *78*, 648–656. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.01.048>
- Alfaro, N., Fdz-Polanco, M., Fdz-Polanco, F., & Díaz, I. (2018). Evaluation of process performance, energy consumption and microbiota characterization in a ceramic membrane bioreactor for ex-situ biomethanation of H₂ and CO₂. *Bioresource Technology*, *258*, 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.087>
- Alitalo, A., Niskanen, M., & Aura, E. (2015). Biocatalytic methanation of hydrogen and carbon dioxide in a fixed bed bioreactor. *Bioresource Technology*, *196*, 600–605. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.021>
- Altfeld, K., & Pinchbeck, D. (2013). *Admissible hydrogen concentrations in natural gas systems*. www.gas-for-energy.com
- Angelidaki, I., & Sanders, W. (2004). Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. *Environmental Science and Bio/Tecnology*.
- Angelidaki, I., Treu, L., Tsapekos, P., Luo, G., Campanaro, S., Wenzel, H., & Kougias, P. G. (2018). Biogas upgrading and utilization: Current status and perspectives. In *Biotechnology Advances* (Vol. 36, Issue 2, pp. 452–466). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.01.011>
- Anukam, A., Mohammadi, A., Naqvi, M., & Granström, K. (2019). A review of the chemistry of anaerobic digestion: Methods of accelerating and optimizing process efficiency. In *Processes* (Vol. 7, Issue 8, pp. 1–19). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/PR7080504>
- Aryal, N., Kvist, T., Ammam, F., Pant, D., & Ottosen, L. D. M. (2018). An overview of microbial biogas enrichment. *Bioresource Technology*, *264*, 359–369. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.013>
- 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*.
- Barua, S., & Dhar, B. R. (2017). Advances towards understanding and engineering direct interspecies electron transfer in anaerobic digestion. In *Bioresource Technology* (Vol. 244, pp. 698–707). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.023>
- Bassani, I., Kougias, P. G., & Angelidaki, I. (2016). In-situ biogas upgrading in thermophilic granular UASB reactor: key factors affecting the hydrogen mass transfer rate. *Bioresource Technology*, *221*, 485–491. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.083>
- Bassani, I., Kougias, P. G., Treu, L., & Angelidaki, I. (2015). Biogas Upgrading via Hydrogenotrophic Methanogenesis in Two-Stage Continuous Stirred Tank Reactors at Mesophilic and Thermophilic Conditions. *Environmental Science and Technology*, *49*(20), 12585–12593. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03451>
- Bassani, I., Kougias, P. G., Treu, L., Porté, H., Campanaro, S., & Angelidaki, I. (2017). Optimization of hydrogen dispersion in thermophilic up-flow reactors for ex situ biogas upgrading. *Bioresource Technology*, *234*, 310–319. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.055>
- Bellini, R., Bassani, I., Vizzarro, A., Azim, A. A., Vasile, N. S., Pirri, C. F., Verga, F., & Menin, B. (2022). Biological Aspects, Advancements and Techno-Economical Evaluation of Biological Methanation for the Recycling and Valorization of CO₂. In *Energies* (Vol. 15, Issue 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/en15114064>
- Bernacchi, S., Rittmann, S., H. Seifert, A., Krajete, A., & Herwig, C. (2014). Experimental methods for screening parameters influencing the growth to product yield ($Y_{(x/CH_4)}$) of a biological methane production (BMP) process performed with *Methanothermobacter marburgensis*. *AIMS Bioengineering*, *1*(2), 72–87. <https://doi.org/10.3934/bioeng.2014.2.72>

- Calvin, K., Dasgupta, D., Krinner, G., Mukherji, A., Thorne, P. W., Trisos, C., Romero, J., Aldunce, P., Barrett, K., Blanco, G., Cheung, W. W. L., Connors, S., Denton, F., Diongue-Niang, A., Dodman, D., Garschagen, M., Geden, O., Hayward, B., Jones, C., ... Ha, M. (2023). *IPCC, 2023: Climate Change 2023: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, H. Lee and J. Romero (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland.* (P. Arias, M. Bustamante, I. Elgizouli, G. Flato, M. Howden, C. Méndez-Vallejo, J. J. Pereira, R. Pichs-Madruga, S. K. Rose, Y. Saheb, R. Sánchez Rodríguez, D. Ürgé-Vorsatz, C. Xiao, N. Yassaa, J. Romero, J. Kim, E. F. Haites, Y. Jung, R. Stavins, ... C. Péan, Eds.). <https://doi.org/10.59327/IPCC/AR6-9789291691647>
- Chen, Y., Cheng, J. J., & Creamer, K. S. (2008). Inhibition of anaerobic digestion process: A review. In *Bioresource Technology* (Vol. 99, Issue 10, pp. 4044–4064). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.057>
- Chong, S., Sen, T. K., Kayaalp, A., & Ang, H. M. (2012). The performance enhancements of upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors for domestic sludge treatment - A State-of-the-art review. In *Water Research* (Vol. 46, Issue 11, pp. 3434–3470). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.03.066>
- Coates, J. D., Coughlan, M. F., & Colleran, E. (1996). Methods Simple method for the measurement of the hydrogenotrophic methanogenic activity of anaerobic sludges. *Journal Of Microbiological Journal of Microbiological Methods*, 26, 237–246.
- D’Bastiani, C., Kennedy, D., & Reynolds, A. (2023). CFD simulation of anaerobic granular sludge reactors: A review. In *Water Research* (Vol. 242). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.120220>
- Demiral, Ö., Demiral, M., & Aktekin-Gök, E. D. (2022). Extra-regional trade and consumption-based carbon dioxide emissions in the European countries: Is there a carbon leakage? *Sustainable Development*, 30(6), 1987–2001. <https://doi.org/10.1002/sd.2365>
- Deng, L., & Hägg, M. B. (2010). Techno-economic evaluation of biogas upgrading process using CO₂ facilitated transport membrane. *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 4(4), 638–646. <https://doi.org/10.1016/j.ijggc.2009.12.013>
- Dolfing, J., & Mulder, J.-W. (1985). Comparison of Methane Production Rate and Coenzyme F420 Content of Methanogenic Consortia in Anaerobic Granular Sludges. In *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*.
- Enzmann, F., Mayer, F., Rother, M., & Holtmann, D. (2018). Methanogens: biochemical background and biotechnological applications. In *AMB Express* (Vol. 8, Issue 1). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0531-x>
- Fang, C., Boe, K., & Angelidaki, I. (2011). Biogas production from potato-juice, a by-product from potato-starch processing, in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) and expanded granular sludge bed (EGSB) reactors. *Bioresource Technology*, 102(10), 5734–5741. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.013>
- Feng, K., Siu, Y. L., Guan, D., & Hubacek, K. (2012). Analyzing drivers of regional carbon dioxide emissions for China: A structural decomposition analysis. *Journal of Industrial Ecology*, 16(4), 600–611. <https://doi.org/10.1111/j.1530-9290.2012.00494.x>
- Garcia, J. L., Patel, B. K. C., & Ollivier, B. (2000). Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic Archaea. *Anaerobe*, 6(4), 205–226. <https://doi.org/10.1006/anae.2000.0345>
- Ghangrekar, M. M., Asolekar, S. R., & Joshi, S. G. (2005). Characteristics of sludge developed under different loading conditions during UASB reactor start-up and granulation. *Water Research*, 39(6), 1123–1133. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.12.018>
- Ghofrani-Isfahani, P., Tsapekos, P., Peprah, M., Kougiyas, P., Zhu, X., Kovalovszki, A., Zervas, A., Zha, X., Jacobsen, C. S., & Angelidaki, I. (2021). Ex-situ biogas upgrading in thermophilic up-flow reactors: The

- effect of different gas diffusers and gas retention times. *Bioresource Technology*, 340. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125694>
- Gładysz, P., Strojny, M., Bartela, Ł., Hacaga, M., & Froehlich, T. (2023). Merging Climate Action with Energy Security through CCS—A Multi-Disciplinary Framework for Assessment. *Energies*, 16(1). <https://doi.org/10.3390/en16010035>
- Gonzalez-Estrella, J., Sierra-Alvarez, R., & Field, J. A. (2013). Toxicity assessment of inorganic nanoparticles to acetoclastic and hydrogenotrophic methanogenic activity in anaerobic granular sludge. *Journal of Hazardous Materials*, 260, 278–285. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.05.029>
- Guiot, S. R., Cimpoaia, R., & Carayon, G. (2011). Potential of wastewater-treating anaerobic granules for biomethanation of synthesis gas. *Environmental Science and Technology*, 45(5), 2006–2012. <https://doi.org/10.1021/es102728m>
- Hao, X., Liu, R., van Loosdrecht, M. C. M., & Cao, D. (2017). Batch influences of exogenous hydrogen on both acidogenesis and methanogenesis of excess sludge. *Chemical Engineering Journal*, 317, 544–550. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.02.093>
- Hussain, A., & Dubey, S. K. (2017). Specific methanogenic activity test for anaerobic degradation of influents. In *Applied Water Science* (Vol. 7, Issue 2, pp. 535–542). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s13201-015-0305-z>
- Iglesias, R., Muñoz, R., Polanco, M., Díaz, I., Susmozas, A., Moreno, A. D., Guirado, M., Carreras, N., & Ballesteros, M. (2021). Biogas from anaerobic digestion as an energy vector: Current upgrading development. In *Energies* (Vol. 14, Issue 10). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/en14102742>
- Jensen, M. B., Ottosen, L. D. M., & Kofoed, M. V. W. (2021). H₂ gas-liquid mass transfer: A key element in biological Power-to-Gas methanation. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 147). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111209>
- Jiang, H., Wu, F., Wang, Y., Feng, L., Zhou, H., & Li, Y. (2021). Characteristics of in-situ hydrogen biomethanation at mesophilic and thermophilic temperatures. *Bioresource Technology*, 337. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125455>
- Jiang, Y., Banks, C., Zhang, Y., Heaven, S., & Longhurst, P. (2018). Quantifying the percentage of methane formation via acetoclastic and syntrophic acetate oxidation pathways in anaerobic digesters. *Waste Management*, 71, 749–756. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.04.005>
- Kougias, P. G., Treu, L., Benavente, D. P., Boe, K., Campanaro, S., & Angelidaki, I. (2017). Ex-situ biogas upgrading and enhancement in different reactor systems. *Bioresource Technology*, 225, 429–437. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.124>
- Kougias, P. G., Tsapekos, P., Treu, L., Kostoula, M., Campanaro, S., Lyberatos, G., & Angelidaki, I. (2020). Biological CO₂ fixation in up-flow reactors via exogenous H₂ addition. *Journal of Biotechnology*, 319, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.05.012>
- Kozak, M., Köroğlu, E. O., Cirik, K., & Zaimoğlu, Z. (2022). Evaluation of ex-situ hydrogen biomethanation at mesophilic and thermophilic temperatures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 47(34), 15434–15441. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.02.072>
- Lever. (2016). A New Era of Methanogenesis Research. *Trends in Microbiology*, 24(2), 82–84. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.12.006>
- Lewis, W. K., & Whitman, W. G., Jr. (1924). *Principles of Gas Absorption* (Vol. 15). UTC. <https://doi.org/10.1021/ie50180a002>
- Liu, C., Li, H., Zhang, Y., & Chen, Q. (2016). Characterization of methanogenic activity during high-solids anaerobic digestion of sewage sludge. *Biochemical Engineering Journal*, 109, 96–100. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.01.010>

- Liu, H., Wen, J., Liu, Q., Li, R., Lichtfouse, E., Maurer, C., & Huang, J. (2023). Enhanced performances of anaerobic digestion processes treating organic wastes: Role of iron and carbon based nanomaterials. In *Surfaces and Interfaces* (Vol. 43). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.surfin.2023.103548>
- Liu, Y., & Whitman, W. B. (2008). Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. In *Annals of the New York Academy of Sciences* (Vol. 1125). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1196/annals.1419.019>
- Liu, Y., Xu, H.-L., Yang, S.-F., & Tay, J.-H. (2003). Mechanisms and models for anaerobic granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactor. In *Water Research* (Vol. 37).
- Logroño, W., Popp, D., Kleinstüber, S., Sträuber, H., Harms, H., & Nikolausz, M. (2020). Microbial resource management for ex situ biomethanation of hydrogen at alkaline pH. *Microorganisms*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040614>
- López, J. C., Quijano, G., Souza, T. S. O., Estrada, J. M., Lebrero, R., & Muñoz, R. (2013). Biotechnologies for greenhouse gases (CH₄, N₂O, and CO₂) abatement: State of the art and challenges. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 97, Issue 6, pp. 2277–2303). <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4734-z>
- Luo, G., & Angelidaki, I. (2012). ARTICLE Integrated Biogas Upgrading and Hydrogen Utilization in an Anaerobic Reactor Containing Enriched Hydrogenotrophic Methanogenic Culture. *Biotechnol. Bioeng*, 109, 2729–2736. <https://doi.org/10.1002/bit.24557/abstract>
- Macleod, F. A., Guiot, S. R., & Costerton, J. W. (1990). Layered Structure of Bacterial Aggregates Produced in an Upflow Anaerobic Sludge Bed and Filter Reactor. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 56(6), 1598–1607. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/aem.56.6.1598-1607.1990>
- Martin, M. R., Fornero, J. J., Stark, R., Mets, L., & Angenent, L. T. (2013). A single-culture bioprocess of methanothermobacter thermotrophicus to upgrade digester biogas by CO₂-to-CH₄ conversion with H₂. *Archaea*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/157529>
- Mikkelsen, M., Jørgensen, M., & Krebs, F. C. (2010). The teraton challenge. A review of fixation and transformation of carbon dioxide. In *Energy and Environmental Science* (Vol. 3, Issue 1, pp. 43–81). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/b912904a>
- Molina, F., García, C., Roca, E., & Lema, J. M. (2008). Characterization of anaerobic granular sludge developed in UASB reactors that treat ethanol, carbohydrates and hydrolyzed protein based wastewaters. *Water Science and Technology*, 57(6), 837–842. <https://doi.org/10.2166/wst.2008.067>
- Mondal, S. K., An, S. Il, Min, S. K., Kim, S. K., Shin, J., Paik, S., Im, N., & Liu, C. (2023). Hysteresis and irreversibility of global extreme precipitation to anthropogenic CO₂ emission. *Weather and Climate Extremes*, 40. <https://doi.org/10.1016/j.wace.2023.100561>
- Rachbauer, L., Beyer, R., Bochmann, G., & Fuchs, W. (2017). Characteristics of adapted hydrogenotrophic community during biomethanation. *Science of the Total Environment*, 595, 912–919. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.074>
- Rafrafi, Y., Laguillaumie, L., & Dumas, C. (2021). Biological Methanation of H₂ and CO₂ with Mixed Cultures: Current Advances, Hurdles and Challenges. *Waste and Biomass Valorization*, 12(10), 5259–5282. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01283-z>
- Rasi, S., Veijanen, A., & Rintala, J. (2007). Trace compounds of biogas from different biogas production plants. *Energy*, 32(8), 1375–1380. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2006.10.018>
- Ripoll, E., López, I., & Borzacconi, L. (2020). Hydrogenotrophic activity: A tool to evaluate the kinetics of methanogens. *Journal of Environmental Management*, 270. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110937>

- Rusmanis, D., O'Shea, R., Wall, D. M., & Murphy, J. D. (2019). Biological hydrogen methanation systems—an overview of design and efficiency. In *Bioengineered* (Vol. 10, Issue 1, pp. 604–634). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/21655979.2019.1684607>
- Salehizadeh, H., Yan, N., & Farnood, R. (2020). Recent advances in microbial CO₂ fixation and conversion to value-added products. In *Chemical Engineering Journal* (Vol. 390). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.124584>
- Shi, X., Lei, Y., Xue, W., Liu, X., Li, S., Xu, Y., Lv, C., Wang, S., Wang, J., & Yan, G. (2023). Drivers in carbon dioxide, air pollutants emissions and health benefits of China's clean vehicle fleet 2019–2035. *Journal of Cleaner Production*, 391. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.136167>
- Springael, K., Ka, C., & Law, Y. (2018). ALGINATE BASED ENCAPSULATION OF MICROBIAL GRANULES AS A PROTECTIVE MEANS TO REDUCE STRESS DURING ANAEROBIC DIGESTION.
- Sun, J., Xu, Y., Nairat, S., Zhou, J., & He, Z. (2023). Prediction of biogas production in anaerobic digestion of a full-scale wastewater treatment plant using ensembled machine learning models. *Water Environment Research*, 95(6). <https://doi.org/10.1002/wer.10893>
- Sun, L., Müller, B., Westerholm, M., & Schnürer, A. (2014). Syntrophic acetate oxidation in industrial CSTR biogas digesters. *Journal of Biotechnology*, 171(1), 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.11.016>
- Tao, B., Alessi, A. M., Zhang, Y., Chong, J. P. J., Heaven, S., & Banks, C. J. (2019). Simultaneous biomethanisation of endogenous and imported CO₂ in organically loaded anaerobic digesters. *Applied Energy*, 247, 670–681. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2019.04.058>
- Thapa, A., Jo, H., Han, U., & Cho, S. K. (2023). Ex-situ biomethanation for CO₂ valorization: State of the art, recent advances, challenges, and future prospective. In *Biotechnology Advances* (Vol. 68). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108218>
- Thema, M., Bauer, F., & Sterner, M. (2019). Power-to-Gas: Electrolysis and methanation status review. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 112, pp. 775–787). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.06.030>
- Themelis, N. J., & Ulloa, P. A. (2007). Methane generation in landfills. *Renewable Energy*, 32(7), 1243–1257. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2006.04.020>
- Vo, T. T. Q., Wall, D. M., Ring, D., Rajendran, K., & Murphy, J. D. (2018). Techno-economic analysis of biogas upgrading via amine scrubber, carbon capture and ex-situ methanation. *Applied Energy*, 212, 1191–1202. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2017.12.099>
- Wahid, R., & Horn, S. J. (2021). Impact of operational conditions on methane yield and microbial community composition during biological methanation in in situ and hybrid reactor systems. *Biotechnology for Biofuels*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-021-02019-4>
- Wahid, R., Mulat, D. G., Gaby, J. C., & Horn, S. J. (2019). Effects of H₂:CO₂ ratio and H₂ supply fluctuation on methane content and microbial community composition during in-situ biological biogas upgrading. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1443-6>
- Wang, W., Xie, L., Luo, G., Zhou, Q., & Angelidaki, I. (2013). Performance and microbial community analysis of the anaerobic reactor with coke oven gas biomethanation and in situ biogas upgrading. *Bioresour Technology*, 146, 234–239. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.049>
- Weiland, P. (2010). Biogas production: Current state and perspectives. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 85, Issue 4, pp. 849–860). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2246-7>
- Xu, H., Liu, Y., Gao, Y., Li, F., Yang, B., Wang, M., Ma, C., Tian, Q., Song, X., & Sand, W. (2018). Granulation process in an expanded granular sludge blanket (EGSB) reactor for domestic sewage treatment: Impact

- of extracellular polymeric substances compositions and evolution of microbial population. *Bioresource Technology*, 269, 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.08.100>
- Yun, Y. M., Sung, S., Kang, S., Kim, M. S., & Kim, D. H. (2017). Enrichment of hydrogenotrophic methanogens by means of gas recycle and its application in biogas upgrading. *Energy*, 135, 294–302. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2017.06.133>
- Zabraska, J., & Pokorna, D. (2018). Bioconversion of carbon dioxide to methane using hydrogen and hydrogenotrophic methanogens. *Biotechnology Advances*, 36(3), 707–720. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.12.003>
- Zhu, X., Chen, L., Chen, Y., Cao, Q., Liu, X., & Li, D. (2019). Differences of methanogenesis between mesophilic and thermophilic in situ biogas-upgrading systems by hydrogen addition. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 46(11), 1569–1581. <https://doi.org/10.1007/s10295-019-02219-w>
- Zinatizadeh, A. A., Mohammadi, P., Mirghorayshi, M., Ibrahim, S., Younesi, H., & Mohamed, A. R. (2017). An anaerobic hybrid bioreactor of granular and immobilized biomass for anaerobic digestion (AD) and dark fermentation (DF) of palm oil mill effluent: Mass transfer evaluation in granular sludge and role of internal packing. *Biomass and Bioenergy*, 103, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.05.006>
- Özbek, B., & Gayik, S. (2001). The studies on the oxygen mass transfer coefficient in a bioreactor. *Process Biochemistry*, 36, 729–741. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00272-7](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00272-7)

Sitografia:

<https://cittaclima.it/wp-content/uploads/2023/12/Bilancio-CittaClima-2023-2.pdf>

<https://climate.copernicus.eu/global-climate-highlights-2023>

<https://ourworldindata.org/grapher/co-emissions-per-capita?region=Europe>