



Upgrading biologico *in situ* del biogas in un reattore CSTR ibrido: limiti e prospettive

Signorini A., Rosa S.

Report RdS/PTR(2021)/279

UPGRADING BIOLOGICO *IN SITU* DEL BIOGAS IN UN REATTORE CSTR IBRIDO: LIMITI E PROSPETTIVE

Signorini A., Rosa S.(ENEA)

Dicembre 2021

Report Ricerca di Sistema Elettrico

Accordo di Programma Ministero della Transizione Ecologica - ENEA

Piano Triennale di Realizzazione 2019-2021 - III annualità 2021

Obiettivo: *Sistema Elettrico*

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

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

Responsabile del Progetto: Giulia Monteleone, ENEA

Indice

SOMMARIO.....	3
1 INTRODUZIONE.....	4
2 MATERIALI E METODI	8
2.1.1 <i>Caratteristiche del substrato e dell'inoculo</i>	8
2.1.2 <i>Descrizione dell'impianto sperimentale e monitoraggio</i>	8
2.1.3 <i>Parametri di processo</i>	9
2.1.4 <i>Analisi della comunità microbica: sequenziamento Illumina</i>	10
3 RISULTATI E DISCUSSIONE	10
3.1 OTTIMIZZAZIONE DEL PROCESSO DI BIOMETANAZIONE IN SITU	10
3.1.1 <i>Incremento della velocità di ricircolo del biogas e controllo della velocità di carico organico</i>	10
3.2 COMUNITÀ MICROBICA	14
3.2.1 <i>Sequenziamento Illumina: comunità Archaea</i>	14
3.2.2 <i>Sequenziamento Illumina: comunità Bacteria</i>	15
4 CONCLUSIONI	19
5 RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	21

Sommario

Le attività di studio e di ricerca sull'ottimizzazione dei processi biologici di upgrading del biogas, *in situ* e *ex situ*, finalizzate alla produzione del biometano ($\geq 97\%$), continuano ad essere promosse ed auspicate, in particolare, negli aspetti relativi all'aumento di scala e alla replicabilità a lungo termine delle sperimentazioni e dei bilanci energetici.

La sfida del processo di biometanazione *in situ* è di perseguire l'obiettivo trovando soluzioni biotecnologiche che riducano i costi di produzione, ossia intervenendo sul processo di digestione anaerobica in impianti di biogas commerciali, prevalentemente di configurazione CSTR. Questa sfida diventa ancora più importante quando si parla di impianti con potenze inferiori a 200-300 kW e per i quali l'economia di scala delle attuali tecnologie chimico-fisiche commerciali e biologiche *ex situ*, ne esclude l'implementazione.

In questa attività di ricerca la sperimentazione è stata effettuata su una nuova configurazione reattoristica, il GSTR: un CSTR in cui una parte della fase liquida è riempita con corpi di riempimento e l'omogeneizzazione dei nutrienti è assicurata dal ricircolo gassoso. La scala di lavoro utilizzata (62L), sebbene elevata rispetto al panorama delle sperimentazioni di cui si è a conoscenza, non ha consentito di effettuare contestualmente la replicabilità del dato, per la presenza nel laboratorio DTE-BBC-BBE di un unico reattore GSTR. Pertanto, gli obiettivi dell'attività di ricerca LA3.1, hanno avuto lo scopo di replicare la sperimentazione di ottimizzazione del processo di biometanazione *in situ* nel GSTR e, successivamente, di indirizzarlo per la produzione di una miscela gassosa a più alto contenuto in metano. Contestualmente le comunità microbiche coinvolte nelle diverse fasi della sperimentazione sono state analizzate tramite tecnica NGS.

I risultati della sperimentazione svolta nel 2020, sono stati confermati in termini di efficienza di conversione di H_2 in CH_4 e di velocità di biometanazione idrogenotrofa, con la produzione di una miscela gassosa costituita da 75% CH_4 , 19% H_2 , 6% CO_2 , alla più elevata velocità di ricircolo gassoso ($235 L L_r^{-1} d^{-1}$). Successivamente, la diminuzione della velocità di carico organico ($0.89 gVS L_r^{-1} d^{-1} \pm 0.14$), ha consentito la produzione di un biogas con una concentrazione media 79.6% CH_4 , 18.0% H_2 , 2.4% CO_2 , utilizzando una velocità di ricircolo gassoso di $176 L L_r^{-1} d^{-1}$.

La ripetibilità dell'efficienza del processo è stata contrassegnata da una nuova comunità microbica, sia nella componente dei *Bacteria* sia degli *Archaea*. A guidare questo *shift* strutturale, è stata l'evoluzione dei metanogeni da una comunità di idrogenotrofi rappresentati dal genere *Methanoculleus* (famiglia *Methanomicrobiaceae*) rilevata nella passata sperimentazione, ad una comunità idrogenotrofa rappresentata da *Methanothermobacter thermautotrophicus* (famiglia *Methanobacteriaceae*) e da un genere non identificato ed appartenente alla stessa famiglia, rilevati nella corrente sperimentazione. Parallelamente, la comunità batterica è evoluta verso la dominanza di batteri appartenenti al phylum *Firmicutes*.

1 Introduzione

Sebbene il processo biologico di biometanazione, *in situ* ed *ex situ*, offra vantaggi ambientali ed economici rispetto ai processi basati su tecnologie chimico-fisiche di separazione della CO₂ dal CH₄, esistono, attualmente solo tre esempi di tecnologie biologiche PtG di upgrading del biogas su scala elevata, entrambe su configurazione CSTR [1,2].

La prima, *ex situ*, è stata sviluppata, da Electrochaea GmbH, nell'ambito del progetto P2G-Biocat, con un brevetto su un ceppo metanogeno idrogenotrofo puro e della sua soluzione nutritiva. Nel progetto su scala precommerciale (10m³), il processo, non ottimizzato, avveniva a 65°C ed alla pressione di 10 bar, con l'H₂ prodotto da un elettrolizzatore PEM da 250 KWe e il biogas da un impianto di digestione anaerobica (DA). Con queste specifiche tecniche veniva prodotto un biogas con una concentrazione di metano superiore al 99%. L'impianto su scala commerciale (1MW) è in funzione in Danimarca e inietta biometano nella rete del gas naturale.

La Microbenergy GmbH ha sviluppato entrambi i processi biologici di upgrading all'interno del progetto BioPower2Gas. Quello *in situ* è stato sviluppato iniettando H₂ prodotto da un elettrolizzatore da 120 kW, in un impianto commerciale di biogas ed operante in mesofilia (40°C) e a pressione atmosferica, e ha prodotto un incremento della concentrazione di metano nel biogas dal 50% al 75%. L'H₂ viene iniettato all'interno di una tubatura forata che passa nel fondo del reattore.

Il processo *ex situ* consiste di un metanatore biologico di 5 m³, due elettrolizzatori PEM da 150 KWe e il biogas da convertire a biometano proviene da due impianti di biogas.

Numerosi altri progetti sono operativi o in partenza in diversi paesi, ma è difficile reperire informazioni sulle tecnologie di base che li caratterizzano [3].

Il processo di biometanazione *in situ*, prima di un suo possibile trasferimento su scala precommerciale, richiede ulteriori studi e ricerche per affrontare i seguenti limiti tecnologici:

- L'incremento della velocità di trasferimento gas-liquido dell'H₂ a causa della sua bassa solubilità;
- L'inibizione del metabolismo microbico per la produzione dei prodotti intermedi della DA, in seguito all'aumento della pressione parziale di H₂ accumulato nel reattore in quanto non consumato dai metanogeni idrogenotrofi;
- L'aumento del pH a causa della riduzione della CO₂ a CH₄;
- L'aumento della scala e dei tempi di sperimentazione

In tabella 1 è presentata una sintesi dei risultati ottenuti, su scala banco e di laboratorio, delle attività di ricerca sul processo di biometanazione *in situ* in configurazione CSTR monostadio e bistadio, e comprensivi dei risultati raggiunti da questa linea di attività nella scorsa annualità [4]. I dati sono raggruppati per le seguenti caratteristiche: 1) set-up sperimentale; 2) strategie adottate per aumentare la solubilità di H₂; 3) composizione finale del biogas; 4) parametri di efficienza del processo di biometanazione; 5) parametri di monitoraggio dei processi; 6) comunità microbiche metanogene.

Tabella 1. Set up sperimentale e risultati riportati in letteratura sul processo di biometanazione *in situ* in configurazione CSTR

Experimental set up						Strategies to enhance H ₂ gas- liquid solubility			Biogas composition			Efficiency parameters		Start/end parameters of the process (DA/UP)			Microbial communities	Bibliography
WV (L)	Substrate	OLR (g VS/L _r d ⁻¹)	T (°C)	HRT (day)	H ₂ :CO ₂	H ₂ diffusion technique	Stirring (rpm)	LR/GR L/L _r d ⁻¹	CH ₄ (%)	H ₂ (%)	CO ₂ (%)	MER L/L _r d ⁻¹	ηH ₂ (%)	pH	Acetate (mM)	Propionate (mM)	Methanogens	
0.3	Sludge + straw	0.77	38	20	6:1	–	1000	–	100	nr	nr	nr	99	7.9/7.6	2.1/3.5	0.53/0.51	Methanobacterium Methanobacteriales sp. Methanomicrobium	[5]
0.6	Cattle manure + whey	1.67	55	15	4:1	Column Diffuser (14–40 μm)	150	–	75	18.4	6.6	0.39	87	7.3/7.9	0.8/2.5	0.2/0.5	M.thermoautotrophicus M. thermophilus M. defluvii M. barkeri M. mazei	[6]
0.6	Cattle manure + whey	1.67	55	15	4:1	Hollow Fiber Membrane	150	–	96.1	0	3.9	0.38	100	7.3/8.3	1.5/36	0.4/1.8	nd	[7]
1	Sewage Sludge	1	35	15	4:1	–	150	–	80.2	0	20.3	0.034	100	7.3/7.2	nr	nr	nd	[8]
3.5	Cattle manure	1.86	55	14	4:1	Two Ceramic diffuser	65	–	65	20	15	0.082	80	8/8.3	7.2/24	1.3/4	nd	[9]
11	Sewage Sludge	1.5	37	22	7:1	Aluminum tube (0.6 mm)	120	–	90.3	nr	4.5	nr.	94	7.40*	nd	nd	Methanospirillum Methanobrevibacter Methanobacterium	[10]
11.2	Swine Manure	2	37	25	4:1	Gas Distributor (1.5 mm)	228	0.93	70	nr	nr	nr	18	7.59	16.4/21	13.3/4.82	Methanosaeta (96%)	[11]
11.2	Swine Manure	2	55	25	4:1	Gas Distributor (1.2 mm)	228	0.95	78	nr.	nr	nr	60	7.77	28.9/16.5	14.1/11.6	Methanoculleus, Methanobrevibacter Methanobacterium Methanosarcina	[11]
20	Sewage sludge	1.8	35	20	4:1	Hollow Fiber Membrane	–	72/202	73.1	7.2	19.7	0.16	94	7.4/8.1	0.21/0.52	–	Methanoculleus sp., Methanospirillum sp., Methanolinea sp., Methanobacterium sp.	[12]
49	Second cheese whey	1.10	55	30	5:1	30 L HDPE Carrier (800m ² /m ³)	–	–/235	75.2	20.5	4.3	0.28	89	7.1/8.24	0.6/6	0/0	Methanoculleus (95%)	This study [4]
1.5 +2 (2R)**	Cattle Manure	0.6	35	15/20	4:1	nr	n.r.	–	89	2.3	8.8	0.034	93	7.8/8.2	nr	nr	Methanoculleus Methanoregulaceae	[13]
1.5 +2 (2R)**	Cattle Manure	1	55	25/33	4:1	nr	n.r.	–	85	8.3	6.6	0.112	92	7.9/8.5	nr	nr	Methanoculleus	[13]
6 +6 (2R)**	Cow manure	1.15/0.51	55	15/20	4:1	Stainless-steel Mott diffuser (2 μm)	140	–	40.3	47.7	12.0	0.11	31.2	7.86/8.4	2.9/9.6	2.7/2.7	nd	[14]

nr: non riportato; nd: non determinato; *: controllo in continuo del pH; **: due reattori in serie: l'effluente ed il biogas vengono convogliati al secondo reattore in cui viene aggiunto H₂.

Come si può osservare, i volumi di lavoro dei reattori utilizzati variano in un range esteso, compreso tra 0.3L – 49L. Quest'ultimo è il volume operativo del GSTR (62L totali) utilizzato in questa linea di ricerca. L'utilizzo di volumi di lavoro su scala banco e di laboratorio, se da una parte consente contestualmente sia la replicabilità della sperimentazione sia il monitoraggio del processo AD e della fase di upgrading (UP), dall'altra potrebbe inficiare la replicabilità del risultato all'aumento della scala di lavoro. Questa possibilità viene ipotizzata da Zhu et al. [11], che in uno studio di un processo di biometanazione a due stadi con volume di lavoro di 6L, misuravano un più basso valore di efficienza di utilizzo di H₂ rispetto a quello ottenuto da Bassani et al., [13] in un processo con la stessa configurazione reattoristica e con un volume di lavoro inferiore (1L). A questo proposito, è stato osservato che la velocità di trasferimento di massa gas-liquido per H₂ è significativamente dipendente dalla scala del reattore [15].

Come si può osservare dalla tabella 1, diverse soluzioni tecniche sono applicate per aumentare la solubilità dell'H₂: moduli a membrana HFM (Hollow Fiber Membrane), diffusori ceramici, colonne e distributori di gas più generici, carrier per facilitare la formazione di biofilm microbici, intensa agitazione (stirring), ricircolo del biogas. Valori di concentrazione di CH₄ idonei alla sua immissione nella rete del gas naturale, sono stati ottenuti con l'HFM e con l'immissione in continuo di H₂ in un rapporto 4H₂:1CO₂ [7]. In Agneessen et al.[5], un arricchimento del contenuto di CH₄ del 100% è stato ottenuto con una intensa agitazione (1000 rpm) e una immissione discontinua di H₂ nello spazio di testa utilizzando un rapporto H₂:CO₂≥6. Tuttavia, l'efficienza di conversione idrogenotrofa passava dal 100% (6H₂:1CO₂) al 58% (10H₂:1CO₂) con una concomitante riduzione della concentrazione di CO₂ nello spazio di testa da 16.8% (pH 7.91) a 7.9% (pH 8.43). Gli autori ipotizzano che la diminuzione dell'efficienza della metanogenesi idrogenotrofa sia da imputare alla elevata sensibilità dei metanogeni idrogenotrofi a concentrazioni della CO₂ ≤12%, e non all'incremento conseguenziale del pH. Un valore soglia di CO₂ del 15% era stato segnalato da altri autori [16].

Come mostrato in tabella 1, i valori di efficienza totale di utilizzo di H₂ (η_{H_2}) sono compresi nel range 18%-100%. Valori elevati di efficienza sono riportati anche nelle sperimentazioni in cui non è stata rilevata una corrispondente velocità di produzione di CH₄ dovuta all'idrogeno immesso (MER). Questa osservazione suggerisce che, per rendere confrontabili le efficienze del processo di biometanazione *in situ*, sia necessario integrare i due parametri aggiungendo quello relativo all'efficienza di utilizzo di H₂ nella MER.

L'incremento combinato della concentrazione e della velocità di produzione di metano aggiuntiva è stato ottenuto solo con l'utilizzo del modulo HFM [7]. Tuttavia, sia i costi connessi alla loro implementazione sia la formazione di biofilm sulla membrana che ne danneggia la permeabilità e la durata, devono essere considerati per l'eventuale utilizzo in impianti su scala commerciale [17]. La ricerca di nuovi dispositivi e/o la modifica della superficie di scambio di quelli utilizzati, è una linea di ricerca auspicata [18].

Rispetto all'inibizione del metabolismo di produzione dei prodotti intermedi della fase AD in seguito all'aumento della pressione parziale di H₂, si è osservato, in diversi lavori, un accumulo dei metaboliti solubili (acidi acetico e propionico), dovuti all'inibizione dell'acetogenesi, la seconda fase della DA che utilizza tali metaboliti per la produzione di acido acetico, H₂ e CO₂. L'acetogenesi è l'unica reazione biochimica endergonica del processo AD ed è inibita da pressioni parziali di H₂ ≥ 10⁻⁴ atm. D'altra parte l'aumento della pressione parziale di H₂, stimola il processo di omoacetogenesi che produce acido acetico da H₂ e CO₂. Se la metanogenesi acetotrofa non è attiva, si determina un accumulo di questo metabolita. Entrambi i processi possono determinare una diminuzione del pH e un arresto della AD.

In tabella 1 sono, quindi, riportati i valori iniziali (AD)/finali (UP) degli acidi acetico e propionico (mM), dove disponibili. Solo alla più bassa efficienza di utilizzo dell'H₂ non si è osservato un accumulo di tali acidi, rispetto ai valori misurati nella DA [11]. Incrementi rilevanti dell'acido acetico e propionico sono stati misurati in tutti gli altri lavori. Sebbene tali concentrazioni rilevate alla fine delle fasi UP non abbiano inibito il processo, il loro incremento dovuto all'aggiunta di H₂ richiederebbero un monitoraggio a lungo termine del processo di upgrading. Inoltre, nella tabella 1, sono riportati i valori di pH iniziali (AD)/finali (UP). Come si può osservare, il range di variazione AD/UP è molto ampio e specifico per ogni sperimentazione, ad eccezione di Corbellini et al.[10], che inseriscono il controllo del pH in continuo. Alla fine del processo UP, il range di variazione del pH è molto ampio (7.2-8.5), con valori massimi prossimi o superiori a quello considerato ottimale per la DA (6.6-7.8) e per la sua ultima fase di metanogenesi (≤ 8.5) [18,19]. I diversi

valori di pH non sembrano essere correlati alle differenti concentrazioni di CO₂ nel biogas, probabilmente anche a causa dell'effetto dovuto alla capacità tamponante del substrato utilizzato.

L'ultima colonna della tabella 1 riporta l'identità delle comunità metanogene, dove caratterizzate, e rilevate nei reattori alla fine delle fasi UP. L'identificazione è stata ottenuta utilizzando sia diverse tecniche molecolari sia diversi marker genetici. Ad esempio, Alfaro et al. [12] e Luo et al. [6] hanno utilizzato una tecnica di fingerprint molecolare tramite elettroforesi denaturante (DGGE) che consente di identificare le comunità presenti ma non di quantificarle. Tutti gli altri autori hanno fatto ricorso alla tecnica di sequenziamento di ampliconi di marker specifici (tramite tecniche NGS-Next Generation Sequencing), tra cui, il più utilizzato, è il gene 16S rRNA. Agnessen et al. [5], invece, hanno utilizzato il gene *mcrA*, marker specifico delle comunità metanogene. Questa diversità di metodiche applicate rende difficile il confronto diretto tra le diverse attività sperimentali. Tuttavia, si può osservare come molti autori identifichino comunità metanogene formate da diversi genera e/o specie, e tutte con ruolo nel metabolismo idrogenotrofo obbligato e, raramente, facoltativo. L'unica eccezione osservata è in un processo condotto in mesofilia, in cui è stata identificata una comunità di metanogeni acetoclasti obbligati [11]. La coesistenza all'interno dei reattori di diverse comunità idrogenotrofe è propria dei processi di biometanazione *in situ* in quanto tutte le reazioni metaboliche, sia della fase AD che delle fasi UP, avvengono nello stesso ambiente.

In conclusione, dalla sintesi dei risultati riportati in tabella 1 si può osservare come quelli ottenuti in questa attività, utilizzando la nuova configurazione reattoristica GSTR, con un set up di facile implementazione e con un volume di lavoro elevato, siano perfettamente inseriti, per efficienza di utilizzo di H₂ e di concentrazione di CH₄ nel biogas, nel panorama attuale della ricerca sulla biometanazione *in situ* in reattori CSTR. A conferma, il valore di MER raggiunto (0.28 L L_r⁻¹ d⁻¹) è tra i più elevati. Inoltre, la comunità metanogena identificata alla fine delle fasi UP era costituita da un unico genere, il *Methanoculleus* (95%), a differenza di quanto riportato dagli altri autori. Questa caratteristica può essere legata alla struttura del GSTR, ed, in particolare, alla presenza dell'area immobilizzata, che, favorendo la formazione del biofilm, crea microambienti che favoriscono la specializzazione funzionale delle comunità microbiche a spese della loro diversità [20]. Inoltre, la velocità di ricircolo del biogas potrebbe favorire lo sviluppo di microambienti gassosi che, aumentando l'area di interfaccia per il trasferimento di massa gas-liquido di H₂, simulerebbero il funzionamento dei Trickle Bed Reactor (TBR), utilizzati nel processo di biometanazione *ex situ* [21].

Per quanto detto, abbiamo ritenuto interessante proseguire la sperimentazione sul reattore GSTR con i seguenti obiettivi:

1. **Ripetibilità del processo di biometanazione *in situ* ottimizzato.** La sperimentazione è stata, quindi, effettuata sul reattore GSTR applicando gli stessi incrementi della velocità della pompa di ricircolo (118-176-235 L L_r⁻¹d⁻¹).
2. **Incremento della concentrazione di metano nella miscela.** La valutazione complessiva dei risultati di ottimizzazione del processo di biometanazione *in situ* prodotti nella precedente attività, ha evidenziato che la configurazione GSTR non consente di solubilizzare nella fase liquida tutto l'idrogeno iniettato per ridurre a CH₄ la CO₂ prodotta durante il processo DA, anche con l'utilizzo del ricircolo gassoso alla massima velocità di 235 L L_r⁻¹ d⁻¹. Questo parametro incide chiaramente sull'efficienza energetica di tutto il processo e, quindi, in questa fase sperimentale, è stata utilizzata una velocità costante e ridotta di ricircolo gassoso (176 L L_r⁻¹ d⁻¹). L'ottimizzazione del processo è stata effettuata riducendo il carico organico e la conseguente produzione di CO₂ dalla fase AD.

In entrambe le attività le comunità microbiche coinvolte nelle diverse fasi della sperimentazione sono state analizzate tramite tecnica NGS.

2 Materiali e metodi

2.1.1 Caratteristiche del substrato e dell'inoculo

L'attività di ricerca è proseguita utilizzando la scotta, un refluo dell'industria casearia. In Italia, l'industria lattiero-casearia è una delle principali fonti di acque reflue industriali costituite prevalentemente dal siero di latte e dalla scotta, residui altamente inquinanti per il loro elevato carico organico (BOD: ≈ 30 g/L; COD: 60-80 g/L; lattosio: 40-50 g/L). La scotta, inoltre, a differenza del siero ha un ridotto carico di lipidi (≈ 0.9 vs 3.2 g/l), proteine (≈ 3.5 vs 7.7 g/l) e una elevata salinità (7-23 mS cm⁻¹) [22].

Attualmente, la loro valorizzazione on-site per la produzione di biogas, è stata effettuata da diverse aziende del comparto lattiero caseario (<https://www.consorziobiogas.it>). Inoltre, negli studi sul processo di biometanazione *in situ* i reflui lattiero-caseari sono suggeriti come substrati idonei da usare in codigestione per contrastare l'innalzamento del pH dovuto alla riduzione della CO₂.

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

Tabella 2. Caratteristiche chimico fisiche della scotta

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

2.1.2 Descrizione dell'impianto sperimentale e monitoraggio

Si riporta in figura 2 lo schema del reattore GSTR ed i dispositivi di riferimento. La sperimentazione è proseguita a temperatura termofila (55 °C) e a pressione atmosferica.

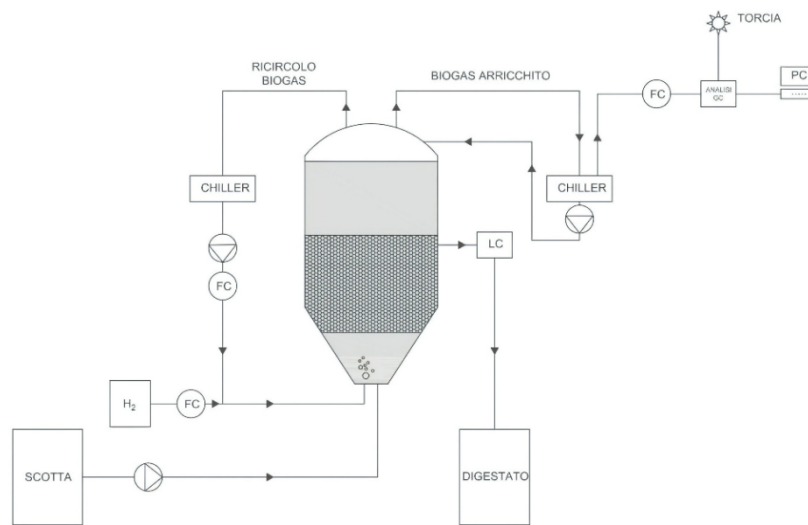


Figura 1. Schema dell'impianto GSTR (Gas Stirred Tank Reactor).

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

L'area immobilizzata è completamente immersa nella fase liquida della parte centrale del reattore e occupa un volume di circa 30 L. I supporti sono racchiusi in un sacchetto a rete per impedire la loro uscita nell'effluente con conseguente blocco della valvola di controllo del volume di lavoro del reattore. Il biogas proveniente sia dal ricircolo del gas che dalla linea di uscita è deumidificato da un refrigeratore e l'acqua condensata è restituita al digestore.

La scotta, all'interno di un contenitore refrigerato ($4\text{-}8^\circ\text{C}$), veniva introdotta in continuo al fondo del reattore, tramite una pompa peristaltica. L' H_2 puro (99%) ottenuto da un elettrolizzatore (DBS, modello PG-H2 100), veniva iniettato in continuo nella linea di ricircolo del biogas.

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

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

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

Il pH veniva controllato giornalmente con un piaccametro Delta OHM.

2.1.3 Parametri di processo

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

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

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

Il trasferimento di massa gas-liquido dell'H₂ (rt) (LH₂ Lr⁻¹ d⁻¹) è stato calcolato in accordo all'equazione 2:

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

L'efficienza di utilizzo totale di H₂ (ηH₂) e quella relativa alla produzione aggiuntiva di CH₄ (ηH₂_MER) sono stati calcolati in accordo all'equazione 4

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

$$\eta_{\text{H}_2_MER} = \frac{4 * (\text{MER})}{\text{H}_2 \text{ in.}} * 100 \quad (4)$$

In cui H₂ in. e H₂ in output gas sono la velocità di immissione e di uscita di H₂, rispettivamente e 4 è il coefficiente stechiometrico della equazione di metanazione idrogenotrofa (5):



2.1.4 Analisi della comunità microbica: sequenziamento Illumina

I campioni per l'analisi della comunità microbica sono stati raccolti nel corso dell'intera sperimentazione, alla fine delle fasi di Digestione Anaerobica (AD) e di upgrading UP1-UP3 nell'ambito dell'obiettivo 1 (ripetibilità dei dati sperimentali) e UP4-UP5 nell'ambito dell'obiettivo 2 (ottimizzazione del processo). I campioni sono stati raccolti in duplicato, suddivisi in aliquote (10 mL) e conservati a -20°C fino al loro utilizzo per l'estrazione del DNA.

L'estrazione del DNA genomico è stata svolta con il kit Isolate II plant DNA kit (Bioline, London UK) utilizzando il buffer di lisi PA1 e in accordo con il protocollo raccomandato. Tre repliche prelevate da ogni campione congelato sono state processate parallelamente e due repliche sono state sottoposte a sequenziamento. La quantità e la qualità del DNA estratto è stata valutata tramite lettura biofotometrica (Biofotometro plus, Eppendorf). Il sequenziamento dei campioni estratti è stato svolto presso il Dipartimento Scienze Agrarie dell'Università Federico II di Napoli, tramite la piattaforma Illumina Miseq. La libreria genetica per il sequenziamento è stata preparata utilizzando il frammento di 460bp corrispondente alla regione ipervariabile V3-V4 del gene 16S rRNA, utilizzando i primers universali specifici (S-D-Bact-0341F / S-D-Bact-0785R for Bacteria and Archaea domains). L'assegnazione tassonomica delle sequenze elaborate in OTUs (Operative Taxonomic Units) è stata effettuata tramite il database Greengenes con un criterio di similarità corrispondente al 97%. I dati riportati rappresentano il valore medio delle due repliche sequenziate.

3 Risultati e discussione

3.1 Ottimizzazione del processo di biometanazione in situ

3.1.1 Incremento della velocità di ricircolo del biogas e controllo della velocità di carico organico

In tabella 3 sono riportati i valori dei parametri di processo utilizzati ed i risultati ottenuti nelle diverse fasi sperimentali.

Tabella 3. Valori medi dei parametri di performance delle cinque fasi sperimentali (AD, UP1, UP2, UP3, UP4, UP5).

Parametri	AD	UP1	UP2	UP3	UP4	UP5
Carico organico (g VS L _R ⁻¹ d ⁻¹)	1.32 ± 0.10	1.22 ± 0.18	1.10 ± 0.11	1.10 ± 0.27	0.83 ± 0.12	0.89 ± 0.14
H _{2in} (L L _R ⁻¹ d ⁻¹)	/	1.76 ± 0.01	1.76 ± 0.01	1.62 ± 0.01	1.18 ± 0.01	1.32 ± 0.01
Ricircolo del biogas (L L _R ⁻¹ d ⁻¹)	176 ± 5	118 ± 5	176 ± 5	235 ± 5	176 ± 5	176 ± 5
Produzione di biogas (L L _R ⁻¹ d ⁻¹)	0.92 ± 0.04	1.39 ± 0.03	1.10 ± 0.05	1.01 ± 0.08	0.60 ± 0.03	0.73 ± 0.03
H ₂ %	/	29.7 ± 1.5	22.2 ± 1.4	17.7 ± 1.3	16.5 ± 0.3	18.0 ± 0.4
CH ₄ %	50.8 ± 1.2	58.6 ± 1.4	71.1 ± 1.6	76.6 ± 2.5	79.1 ± 1.5	79.6 ± 1.3
CO ₂ %	49.2 ± 1.2	11.7 ± 0.8	7.2 ± 1.3	6.1 ± 2.6	4.4 ± 1.4	2.4 ± 1.1
H ₂ out (L L _R ⁻¹ d ⁻¹)	/	0.41 ± 0.02	0.24 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.14 ± 0.01
CH ₄ out (L L _R ⁻¹ d ⁻¹)	0.47 ± 0.03	0.82 ± 0.03	0.78 ± 0.03	0.77 ± 0.05	0.47 ± 0.02	0.60 ± 0.01
rt (L LR-1 d-1)	/	1,35 ± 0.01	1.52 ± 0.01	1.44 ± 0.01	1.10 ± 0.01	1.20 ± 0.01
ηH ₂ (%)	/	76.6	85.6	89.1	91.6	90.0
MER (L _{CH₄} L _R ⁻¹ d ⁻¹)	/	0.35	0.32	0.31	/	/
Lattosio (mM)	1.30 ± 0.06	0.44 ± 0.08	0.41 ± 0.04	0.45 ± 0.06	0.37 ± 0.06	0.46 ± 0.08
Acido Acetico (mM)	1.32 ± 0.06	2.60 ± 0.33	2.95 ± 0.75	4.15 ± 1.54	2.30 ± 0.03	2.90 ± 0.05
Acido propionico (mM)	/	/	4.41 ± 1.3	6.81 ± 1.90	9.43 ± 0.98	7.78 ± 1.10
pH	7.00 ± 0.12	8.10 ± 0.30	7.90 ± 0.36	8.16 ± 0.34	8.13 ± 0.15	8.40 ± 0.20

Come si può osservare la velocità di carico organico presenta sia delle differenze tra le diverse fasi sperimentali che una elevata deviazione standard all'interno delle singole fasi. Tali oscillazioni sono dovute, in parte, alle diverse caratteristiche chimico-fisiche che presenta il refluo caseario alla fine del processo di produzione della ricotta ma anche ad una degradazione della scotta all'interno del contenitore refrigerato (4-8°C) usato per l'alimentazione del GSTR.

La sperimentazione iniziava con il processo di AD e l'omogeneizzazione dei nutrienti era assicurata dal ricircolo del biogas ad una velocità di 176 L L_R⁻¹ d⁻¹. Dopo 21 giorni, quando la produzione di biogas del processo AD risultava stabile (deviazione standard ≤10%), un flusso di H₂ puro (≥99%) ottenuto dall'elettrolizzatore era iniettato in continuo al fondo del reattore tramite la linea di ricircolo del biogas. Nelle successive fasi UP1 e UP2, la velocità di flusso dell'idrogeno era mantenuta costante ad un valore di 1.76 LH₂ L_R⁻¹ d⁻¹, in accordo alla equazione 5. Tuttavia, nella fase UP3 tale parametro era abbassato al valore di 1.62 LH₂ L_R⁻¹ d⁻¹ in quanto la velocità di carico organico si manteneva più bassa di quella della AD. La velocità di ricircolo del biogas era incrementata da 118 L L_R⁻¹ d⁻¹ per la fase UP1 a 176 L L_R⁻¹ d⁻¹ e a 235 L L_R⁻¹ d⁻¹ per la fase UP2 e UP3 rispettivamente.

In figura 2 sono riportati gli andamenti giornalieri dei flussi di CH₄, CO₂ e H₂ in uscita dal reattore nelle diverse fasi sperimentali. Sono anche riportate le velocità di ingresso del carico organico (VS g/giorno).

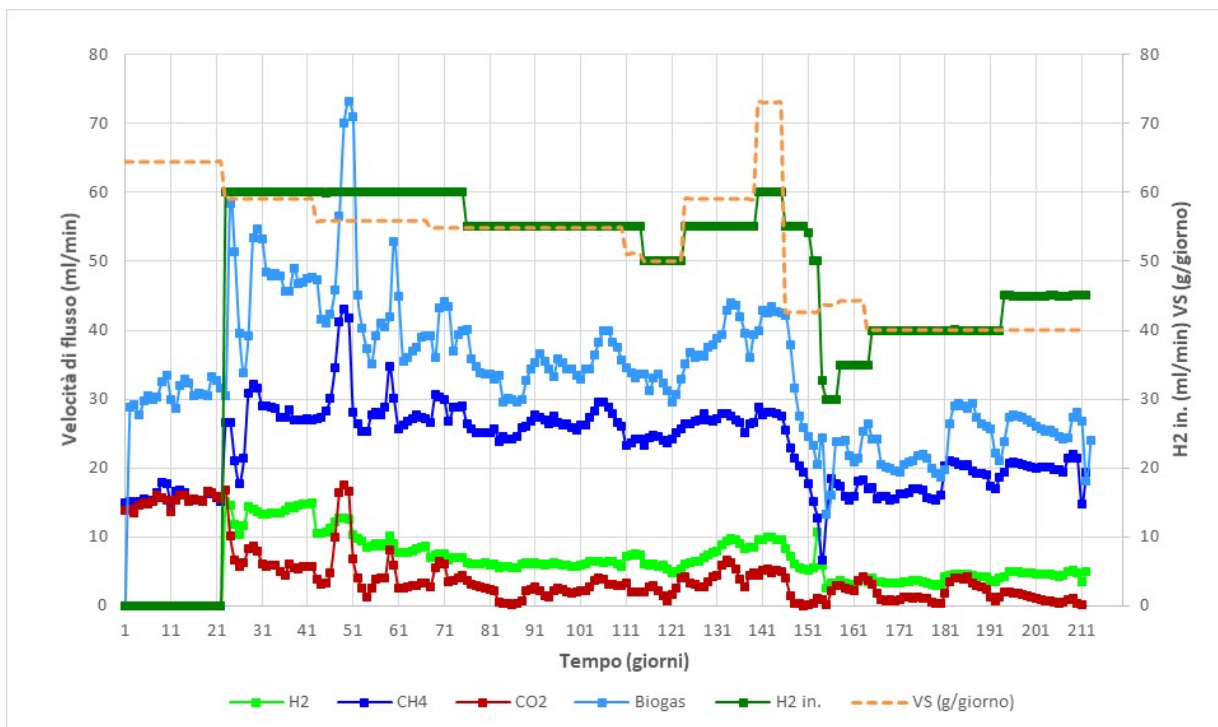


Figura 2. Andamenti giornalieri dei flussi di CH₄, CO₂, H₂ e H₂ iniettato e quantità di carico organico durante le fasi sperimentali (AD, UP1, UP2, UP3, UP4 e UP5).

Dopo circa 10 giorni dall'inizio della fase AD, si raggiungeva una produzione stabile di metano con valori medi di $0.47 \pm 0.03 \text{ LCH}_4 \text{ L}_r^{-1} \text{ d}^{-1}$. Il pH del reattore si manteneva su valori di 7.00 ± 0.12 indicando una forte capacità tampone del sistema nonostante non fosse stato applicato nessuno controllo del pH, come nella precedente sperimentazione. Il contenuto medio di CH₄ nel biogas era del $50.8 \% \pm 1.17$ e la resa media era pari a $0.357 \text{ LCH}_4 \text{ gVS}^{-1} \pm 0.03 \text{ gVS}^{-1}$.

Dopo 20 giorni veniva immesso H₂ alla velocità di $1.76 \text{ LH}_2 \text{ L}_r^{-1} \text{ d}^{-1}$ mentre la velocità di ricircolo del biogas era abbassata a $118 \text{ L L}_r^{-1} \text{ d}^{-1}$. Durante la fase UP1, (da 23 a 42 giorni), il tasso di produzione di CH₄ aumentava a $0.82 \text{ LCH}_4 \text{ L}_r^{-1} \text{ d}^{-1} \pm 0.03$ pari ad un incremento del 74% rispetto alla fase AD. Si otteneva una miscela con una composizione media percentuale di 58.6% CH₄, 11.7% CO₂ e 29.7% H₂. Il pH raggiungeva valori medi di 8.10 ± 0.30 e il coefficiente di efficienza dell'utilizzo di H₂ (η_{H_2}) era del 76.6%. L'analisi dei metaboliti solubili (Tabella 3) indicava un incremento della concentrazione di acido acetico che passava dal valore di $1.32 \text{ mM} \pm 0.12$ della fase DA a $2.60 \text{ mM} \pm 0.33$.

Nella successiva fase UP2 (da 43 a 67 giorni) la velocità di ricircolo del biogas era incrementata a $176 \text{ L L}_r^{-1} \text{ d}^{-1}$. La percentuale di CH₄ nel biogas raggiungeva il valore del $71.1 \% \pm 1.6$ con una velocità di produzione di metano di $0.78 \text{ LCH}_4 \text{ L}_r^{-1} \text{ d}^{-1} \pm 0.03$, valore comparabile a quello ottenuto in UP1. Sebbene il coefficiente di efficienza dell'utilizzo di H₂ (η_{H_2}) incrementava al valore del 85.6%, quello relativo all'utilizzo dell'idrogeno per la produzione di CH₄ si abbassava dal 79.6% al 72.1% ed anche il contributo dell'H₂ all'incremento della produzione di metano (MER) diminuiva da $0.35 \text{ LCH}_4 \text{ L}_r^{-1} \text{ d}^{-1}$ (fase UP1) a $0.32 \text{ LCH}_4 \text{ L}_r^{-1} \text{ d}^{-1}$. Inoltre, sebbene il flusso di CO₂ in uscita fosse inferiore del 50% rispetto a UP1, si registrava un valore medio di pH inferiore (7.90 ± 0.40). E' possibile ipotizzare che tali differenze erano dovute a due sversamenti, durante la fase UP2, del liquido di raffreddamento, contenete glicerina, all'interno del contenitore di alimentazione. Tali eventi sono rilevabili, come incremento istantaneo della velocità di flusso del biogas e dei correlati flussi di CH₄ e CO₂, nei giorni 50 e 60 della sperimentazione (Figura 2). Sono state, infatti, rilevate concentrazioni di glicerolo nel contenitore di alimentazione di 100g/l. Lo shock di carico organico causava un accumulo dell'acido propionico con un valore medio di $4.41 \text{ mM} \pm 1.3$.

Nella successiva fase sperimentale UP3 (da 68 a 111 giorni) la velocità di ricircolo del gas è stata aumentata a $235 \text{ L L}_r^{-1} \text{ d}^{-1}$ e la velocità di immissione dell'H₂ è stata diminuita al valore di $1.62 \text{ LH}_2 \text{ L}_r^{-1} \text{ d}^{-1}$, in quanto il carico organico subiva un forte deterioramento durante la sua permanenza nel contenitore di

alimentazione. Come si può osservare dai valori dei parametri di processo (Tabella 3), la velocità di trasferimento di massa gas-liquido dell' H_2 aumentava fino a $1.44 \pm 0.01 \text{ LH}_2 \text{ L}_r^{-1} \text{ d}^{-1}$, che corrispondeva ad un'efficienza totale di utilizzo dell' H_2 dell'89% (UP3). Allo stesso tempo veniva raggiunta una concentrazione di CH_4 nel biogas del $76.7\% \pm 2.50$ corrispondente ad un incremento del 51% rispetto al valore ottenuto nella fase AD. Il contributo dell' H_2 all'incremento della produzione di metano (MER) si abbassava al valore di $0.31 \text{ LCH}_4 \text{ L}_r^{-1} \text{ d}^{-1}$ nonostante l'efficienza di utilizzo dell'idrogeno per la produzione di CH_4 ($\eta_{H_2_MER}$) incrementava dal valore 72.1% a 76%. Il decremento del valore di MER in UP3 può essere spiegata dal fatto che nel calcolo della MER, alla velocità totale di produzione di metano viene sottratta quella ottenuta durante la fase DA che come mostrato in tabella 1 si ottiene con un più elevato carico organico. Durante questa fase si registrava un ulteriore accumulo sia dell'acido propionico ($6.81 \text{ mM} \pm 1.90$) che dell'acido acetico ($6.81 \text{ mM} \pm 1.90$). Il contenuto di CO_2 diminuiva ulteriormente raggiungendo il valore di $6.1\% \pm 2.6$, cioè del 85% inferiore alla concentrazione osservata nella fase AD. Il valore del pH si attestava mediamente a 8.16 ± 0.34 .

Il biogas presentava, quindi, una composizione media percentuale di 76.7% CH_4 , 6.1% CO_2 e 17.7% H_2 comparabile a quella ottenuta nella precedente sperimentazione (75.2% CH_4 , 4.34% CO_2 e 20.5% H_2), nonostante i differenti rapporti di $H_2:CO_2$ impostati. E' possibile ipotizzare che nella corrente sperimentazione, l'elevata variazione di carico organico e quindi, di CO_2 prodotta nella fase AD, abbia causato un'oscillazione dei rapporti $H_2:CO_2$ superiori e/o inferiori al rapporto $4H_2:1CO_2$, come mostrato dalle elevate deviazioni standard delle concentrazioni (%) di H_2 e CO_2 nella miscela (Tabella 2). Il confronto tra queste composizioni ottenute e quelle pubblicate in bibliografia ed in particolare l'elevata concentrazione di H_2 nel biogas associata alla bassa concentrazione di CO_2 , evidenziano che la configurazione GSTR non consente di solubilizzare nella fase liquida tutto l'idrogeno iniettato alla necessaria velocità per ridurre a CH_4 la CO_2 prodotta durante il processo di AD, anche con l'utilizzo del ricircolo gassoso alla velocità di $235 \text{ L L}_r^{-1} \text{ d}^{-1}$. Conseguentemente l' H_2 , ricircolato con il biogas, si accumula. La velocità di ricircolo del biogas incide chiaramente sull'efficienza energetica di tutto il processo [23] e, quindi, nella successiva sperimentazione, è stata utilizzata una velocità costante e ridotta di ricircolo gassoso ($176 \text{ L L}_r^{-1} \text{ d}^{-1}$). L'ottimizzazione del processo, finalizzata ad ottenere un biogas con una concentrazione di CH_4 più elevata, è stata effettuata riducendo la velocità di carico organico e, quindi, la conseguente produzione di CO_2 dalla fase AD.

Dalla fine della fase UP3 (giorno 110) all'inizio della fase di ottimizzazione (146 giorno) si osservava una elevata variazione della concentrazione del metano nel biogas che oscillava tra valori minimi del 63% a valori massimi di 79.8%, nonostante le modifiche effettuate sulla velocità di H_2 aggiunto. In questo periodo la scotta era rifornita settimanalmente e si registravano elevate variazioni del contenuto in lattosio. Successivamente, la velocità di carico organico veniva abbassata diluendo la scotta per ottenere una concentrazione media di lattosio di circa 25g/l (giorno 146) e per mantenere stabile la sua concentrazione, questa veniva fornita e diluita giornalmente. Con una velocità di iniezione dell' H_2 di $1.62 \text{ LH}_2 \text{ L}_r^{-1} \text{ d}^{-1}$, si otteneva un biogas con una concentrazione media di CH_4 del 79.8% e di CO_2 inferiore all'1% (148-151 giorni). Successivamente il GC in linea registrava un incremento continuo di H_2 fino ad un valore del 60% (nel grafico si può individuare dal valore medio giornaliero dell' H_2 di 43.6%). E' possibile ipotizzare che un incremento del pH a valori inibitori del processo di AD abbia determinato un parziale arresto dell'attività di upgrading del biogas. Purtroppo non è stato possibile misurare il pH perché l'incremento è avvenuto durante il fine settimana. La velocità dell' H_2 immesso è stata portata a 30 ml/min e poi progressivamente incrementata a 40 ml/min (154-164 giorni).

Nella successiva fase sperimentale di upgrading (UP4: 165-181 giorni) si otteneva un biogas con una concentrazione media di CH_4 , H_2 e CO_2 di $79.1\% \pm 1.5$, $16.5\% \pm 0.33$ e $4.40\% \pm 1.38$. Il coefficiente di efficienza dell'utilizzo di H_2 (η_{H_2}) incrementava dal valore di 89.1 (UP3) a 91.6. Il pH si attestava sul valore di 8.13 ± 0.15 . Tuttavia si registrava ancora un accumulo di acido propionico ($9.43 \text{ Mm} \pm 0.98$) mentre la concentrazione di acido acetico diminuiva a $2.30 \text{ Mm} \pm 0.03$.

Dopo una ulteriore fase di variazione del carico organico e quindi un repentino abbassamento della concentrazione di CH_4 nel biogas, l'aggiunta costante della scotta ad una velocità di carico organico di $0.89 \pm 0.14 \text{ gVS L}_r^{-1} \text{ d}^{-1}$ consentiva di ottenere un biogas con una concentrazione media di $79.6\% \pm 1.3 \text{ CH}_4$, 18.0%

$\pm 0.4 \text{ H}_2$ e $2.4\% \pm 1.1 \text{ CO}_2$. Il pH raggiungeva valori di 8.4 ± 0.20 . L'acido acetico si manteneva stabile ($2.90 \text{ Mm} \pm 0.05$) e l'acido propionico diminuiva ($7.78 \text{ Mm} \pm 0.20$). Il processo di upgrading si arrestava per una rottura strutturale del GSTR.

3.2 Comunità microbica

3.2.1 Sequenziamento Illumina: comunità Archaea

Le comunità microbiche dei campioni di effluente raccolti alla fine di ciascuna fase sperimentale (AD, UP1, UP2, UP3, UP4 e UP5) sono state analizzate mediante sequenziamento 16S su piattaforma Illumina.

La comunità microbica dei *Bacteria* ha costituito, in media, il 98%-99% dell'intera comunità presente nel GSTR, con i rimanenti 2%-1% classificati come *Archaea*.

In Figura 3 sono riportate le abbondanze relative a livello tassonomico di famiglia e genere della comunità *Archaea* rappresentata dall'unico phylum *Euryarchaeota*.

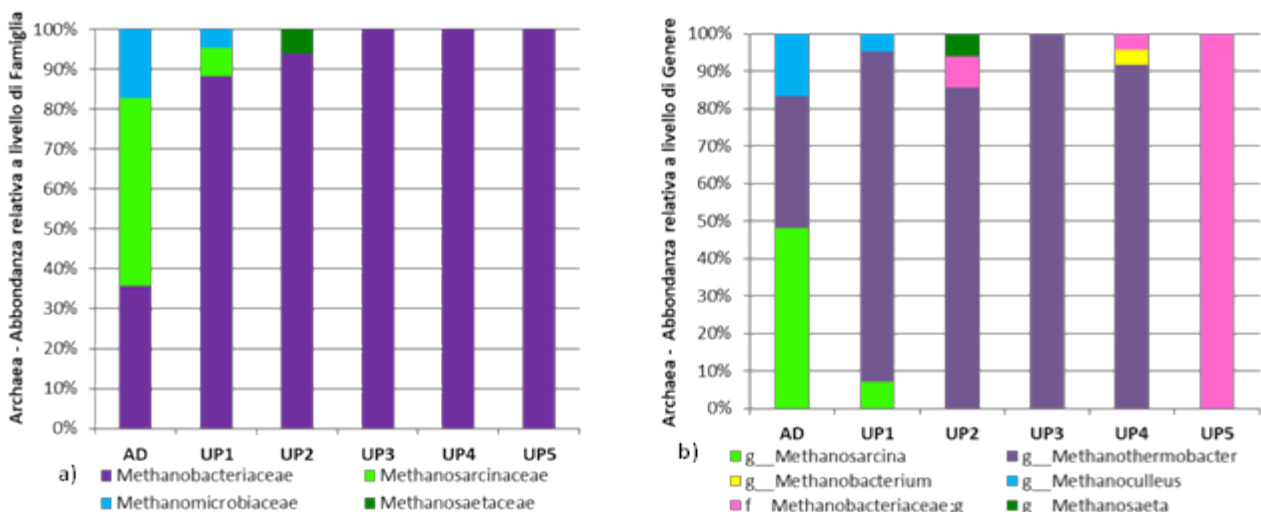


Figura 3. Abbondanze relative delle comunità Archaea a livello di Famiglia (a) e Genere (b) alla fine della fasi AD (digestione anaerobica), UP1, UP2, UP3, UP4 e UP5 (iniezione di H₂). Sono riportate le comunità con una abbondanza relativa $\geq 1\%$ (in almeno un campione).

La comunità metanogena della fase AD era dominata dai rappresentanti delle famiglie *Methanosarcinaceae* (47%), *Methanobacteriaceae* (36%) e *Methanomicrobiaceae* (17%), interamente affiliati, rispettivamente, ai generi *Methanosarcina* (metanogeni acetoclasti e idrogenotrofi), *Methanothermobacter* e *Methanoculleus* (metanogeni idrogenotrofi). Tra questi, solo la comunità *Methanothermobacter* è stata identificata a livello di specie come *M. thermotrophicus*. Durante le fasi d'iniezione d'idrogeno, si è osservato un progressivo shift verso una comunità di soli idrogenotrofi. In particolare, la famiglia *Methanobacteriaceae* è aumentata in UP1 (88%) e UP2 (94%) fino a costituire l'unica comunità di *Archaea* in UP3, UP4 e UP5. All'interno di questa famiglia e a livello di genere, la comunità metanogena ha evidenziato una distribuzione diversificata per le diverse fasi. Infatti, se in UP1 è stato identificato *Methanothermobacter* come unico genere (affiliato alla specie *M. thermotrophicus*), in UP2 e UP4, oltre al *Methanothermobacter* (86% e 92%, rispettivamente), è comparso un genere non identificato (8% e 4%, rispettivamente) che, nella fase UP5 ha colonizzato l'intera comunità. Il genere *Methanobacterium*, sempre appartenente alla stessa famiglia, è stato identificato come specifico della fase UP4 (4%). A completare la comunità di UP1 e UP3, si può osservare la presenza di metanogeni della famiglia *Methanomicrobiaceae* e *Methanosarcinaceae* (5% e 7%, rispettivamente), interamente affiliati ai rispettivi generi *Methanoculleus* e *Methanosarcina* in UP1, e la famiglia *Methanosaetaceae* (6%) (genere *Methanosaeta*) in UP2.

Da un punto di vista funzionale, l'identificazione e la distribuzione delle comunità metanogene suggerisce che nella fase AD si è delineata una comunità caratterizzata dalla co-dominanza di microorganismi

idrogenotrofi e acetoclasti. Infatti, la diminuzione degli archaea del genere *Methanosarcina*, metanogeni sia idrogenotrofi sia acetoclasti, in corrispondenza già della prima fase d'iniezione di idrogeno, e la sua scomparsa in quelle successive, permette di assegnare a questi batteri una funzione primaria nella degradazione dell'acetato. Inoltre, è interessante notare che rappresentanti del genere *Methanosaeta*, archaea acetoclasti obbligati, sono stati individuati nella fase UP2. L'accumulo degli acidi acetico ($2.95\text{mM} \pm 0.75$) e propionico ($4.41\text{ mM} \pm 1.30$) rilevato in questa fase (Tabella 3) evidenzia una condizione di stress del processo DA probabilmente causato da due sversamenti del liquido di raffreddamento, contenete glicerina, all'interno del tank di alimentazione del GSTR. Il glicerolo è un substrato facilmente fermentabile in acidi organici e alcoli e, anche se la sua introduzione nel GSTR ha prodotto un immediato aumento della velocità di flusso del biogas (Figura 2 - giorni 50-60), ha sbilanciato, nello stesso tempo, l'intero processo di biometanazione.

La progressiva e rapida colonizzazione della comunità metanogena idrogenotrofa nel GSTR durante le fasi UP1-UP5 non sorprende, mentre più interessante è lo shift a livello filogenetico tra le diverse comunità idrogenotrofe osservato sia a livello inter- (*Methanomicrobiaceae* – *Methanobacteriaceae*) sia intra- (*Methanobacteriaceae*) famiglie. Infatti, gli idrogenotrofi della famiglia *Methanobacteriaceae* hanno sostituito completamente la comunità idrogenotrofa della famiglia *Methanomicrobiaceae*, rappresentata dall'unico genere *Methanoculleus*. All'interno della famiglia *Methanobacteriaceae*, oltre a *M. thermautotrophicus*, identificato con una abbondanza relativa media di $91\% \pm 6$ nelle fasi UP1-UP4, è stata identificata in UP4 una comunità minoritaria appartenente al genere *Methanobacterium* ed in UP2 una comunità, appartenente a un genere non identificato, e che successivamente colonizza tutta la comunità metanogena di UP5. La convivenza di diverse comunità idrogenotrofe può offrire un'opportunità di crescita per quei metanogeni che possiedono una bassa affinità per l'idrogeno e che potrebbero non sopravvivere nel passaggio dalla fase DA a quelle d'iniezione di idrogeno. *M. thermautotrophicus* è un idrogenotrofo che possiede una grande duttilità: la sua crescita è assolutamente dipendente dalla riduzione della CO_2 in CH_4 tramite la via idrogenotrofa, ed è capace di adattarsi a elevate e basse quantità di idrogeno disciolto, modulando l'espressione dei geni coinvolti nella sintesi di metano [24]. Allo stesso tempo, quando la concentrazione d'idrogeno disciolto è in condizioni limitanti, come avviene nei processi DA, è in grado di entrare in una fase letargica in cui continua a produrre metano senza dissipare l'energia per la sua crescita [24]. Massimizzare il consumo di idrogeno, senza utilizzare in modo efficiente l'energia prodotta da questo processo per la crescita, può rappresentare una strategia che aiuta a mantenere le strette associazioni sintrofiche di metanogeni e batteri fermentativi.

3.2.2 Sequenziamento Illumina: comunità *Bacteria*

Le abbondanze relative dei rappresentanti della comunità *Bacteria* a livello tassonomico di Phylum e Famiglia sono mostrate in Figura 4, con le relative tabelle che mostrano i valori di diversità stimati con gli indici Shannon-Weaver e Pielou.

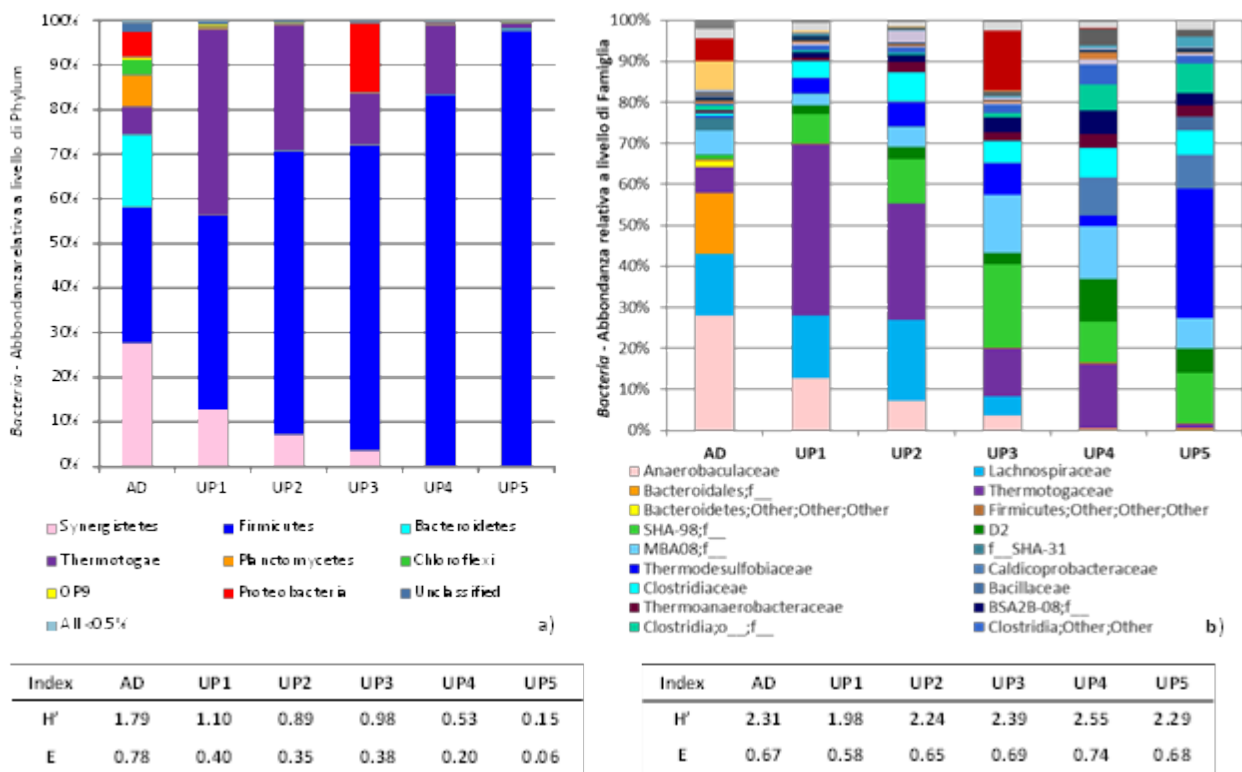


Figura 4. Abbondanze relative delle comunità *Bacteria* a livello di phylum (a) e famiglia (b) alla fine della fasi AD (digestione anaerobica), UP1, UP2, UP3, UP4 e UP5 (iniezione di H₂). Sono riportate le comunità con un'abbondanza relativa ≥ 0.5% (in almeno un campione). Le tabelle mostrano i risultati degli indici Shannon-Weaver (H') e Evenness (E).

La comunità *Bacteria* nel corso della sperimentazione, dalla fase AD alle successive fasi UP1-UP5 (Fig. 4a), è stata caratterizzata da una progressiva uniformità nella sua composizione a livello di phyla rappresentativi. Il campione AD esprime la maggiore diversità, come espresso dai più elevati valori degli indici Shannon-Weaver (H'=1.79) e Pielou's Evenness (E=0.78) e risulta composta dai membri dei phyla *Synergistetes* (28%), *Firmicutes* (30%) e *Bacteroidetes* (16%), che insieme rappresentano i tre/quarti dell'intera comunità batterica. I phyla *Planctomycetes* (7%), *Thermotogae* (6%), *Proteobacteria* (5%), *Chloroflexi* (3%) e OP9 (0.6%) completando l'intera struttura. Nel corso delle diverse fasi sperimentali in cui l'idrogeno è stato iniettato nel GSTR, la comunità batterica del phylum *Synergistetes* diminuisce progressivamente in UP1 (13%), UP2 (7%) e UP3 (4%) fino a scomparire in UP4 e UP5, mentre quella identificata nel phylum *Firmicutes* mostra la tendenza inversa, aumentando progressivamente in UP1 (43%), UP2 (63%), UP3 (68%), e UP4 (83%), fino a rappresentare l'intera comunità batterica di UP5 (98%). La comunità del phylum *Thermotogae* è aumentata decisamente in UP1 (42%), prima fase di iniezione di H₂, e diminuita successivamente in UP2 (28%), UP3 (11%), UP4 (15%), mentre ha completato l'intera comunità della fase UP5 (1%). La comunità batterica *Proteobacteria* è stata rilevata solo in UP3 (15%), mentre le comunità *Bacteroidetes*, *Planctomycetes*, *Chloroflexi* e OP9 non sono più rappresentate nelle fasi UP1-UP5. La diversità espressa dagli indici H' ed E nei campioni UP1-UP5 conferma la distribuzione appena descritta: H' ed E diminuiscono da UP1 (H'=1.10 - E=0.40) a UP5 (H'=0.15 - E=0.06), con valori intermedi in UP2 (H'=0.89 - E=0.35), UP3 (H'=0.98 - E=0.38) e UP4 (H'=0.53 - E=0.20), man mano che il phylum *Firmicutes* è diventato dominante, fino a rappresentare l'intera comunità batterica.

A livello tassonomico di famiglia (Fig. 4b), si può osservare che il phylum *Synergistetes* è rappresentato da batteri appartenenti alla famiglia *Anaerobaculaceae* (genere *Anaerobaculum*) sia nella AD, che nelle fasi UP1-UP3. Questa comunità batterica è stata identificata nel GSTR nel corso di tutta la sperimentazione svolta in precedenza e in tutti i campioni, sia della fase AD sia della fase di upgrading, ed è stata considerata svolgere un ruolo centrale nel processo AD della scotta [25,26]. La sua progressiva diminuzione nel corso delle fasi sperimentali d'iniezione d'idrogeno, fino alla completa scomparsa dalla comunità

batterica, indica che all'interno del GSTR abbiano preso il sopravvento nuove comunità fermentanti e, quindi, nuove relazioni simbiotiche tra le comunità batteriche e metanogene.

All'interno del phylum *Firmicutes* la classe *Clostridia* era la più abbondante, e al suo interno sono stati identificati batteri della famiglia *Lachnospiraceae*, nelle fasi sperimentali AD (15%), UP1 (15%), UP2 (20%) e UP3 (4%), ma non nelle successive UP4 e UP5, ed in tutti i casi l'affiliazione fino a livello di specie ha permesso di identificare il ceppo *Defluviitalea saccharophila*, un batterio saccarolitico e fermentante. Inoltre, una comunità batterica appartenente all'ordine MBA08, ma non identificata a livello di famiglia, è stata rilevata nelle fasi AD (6%), UP1 (3%), UP2 (5%), UP3 (14%), UP4 (13%) e UP5 (7%). La presenza di batteri dell'ordine MBA08 è frequentemente riportata negli studi sui sistemi di upgrading biologico del biogas [27], e molti autori associano questo gruppo batterico, basandosi sulla similarità del 90% delle relative sequenze di DNA, a *Hydrogenispora etanolica*, un batterio recentemente isolato e capace di fermentare i carboidrati [28]. In questo studio, tuttavia, la non assegnazione di questa comunità batterica ai livelli tassonomici inferiore all'ordine, non ci consente di trarre la stessa conclusione. La comunità batterica rappresentata dalla famiglia *Caldicoprobacteraceae* è stata rilevata durante le fasi UP4 (9%) e UP5 (8%), mentre nelle precedenti compariva con un'abbondanza relativa $\leq 0.5\%$. In entrambi i casi, l'intera comunità è stata identificata come genere *Caldicoprobacter*, che comprende diverse specie in grado di fermentare substrati zuccherini [29]. Analogamente, la comunità della famiglia *Clostridiaceae*, è stata rilevata nelle fasi UP1 (4%), UP2 (4%), UP3 (7%), UP4 (7%), UP5 (6%), e con più bassa rappresentatività in AD (0.6%), ed è stata identificata fino a livello di specie come *C. stercororum*, un ceppo termofilo coinvolto nella fermentazione di zuccheri disaccaridi [30], e raramente identificato negli studi di biometanazione riportati in letteratura. È evidente, quindi, come tutte le comunità batteriche descritte finora e appartenenti alla classe *Clostridia*, svolgano un ruolo primario nella fermentazione della scotta, e come la loro diversa distribuzione nelle fasi sperimentali, sia dipendente dall'iniezione d'idrogeno nel GSTR e dalla variabilità del carico organico della scotta, che, diminuisce da un massimo di $1.32 \text{ gVS L}_R^{-1}\text{d}^{-1} \pm 0.10$ (AD) a $0.89 \text{ gVS L}_R^{-1}\text{d}^{-1} \pm 0.14$ nella fase UP5 (Tabella 3 e Figura 2).

Due comunità batteriche appartenenti al phylum *Firmicutes* e all'ordine SHA-98 (classe *Clostridia*), una appartenente alla famiglia D2 e l'altra ad una famiglia non identificata, sono risultate peculiari delle fasi di aggiunta di H_2 . Infatti, i rappresentanti dell'ordine SHA-98, sono stati caratterizzati da una bassa abbondanza relativa nella fase AD (1%), e da una maggiore in UP1 (9%), UP2 (14%), UP3 (23%), UP4 (20%) e UP5 (18%). Batteri della famiglia D2 sono stati rilevati in un processo di biometanazione *ex-situ* in cui svolgono un ruolo centrale nell'ossidazione simbiotica dell'acetato (SAO) [31]. Analogamente, batteri appartenenti alle famiglie *Thermoanaerobacteraceae* e *Thermodesulfobiaceae*, oltre ad una terza non identificata, tutti compresi nell'ordine *Thermoanaerobacterales* (classe *Clostridia*), sono risultati rappresentativi delle fasi di upgrading, aumentando progressivamente da AD (1%) alle fasi UP1 (4%), UP2 (11%), UP3 (10%), UP4 (6%) e UP5 (34%). Il maggiore contributo in termini di abbondanza relativa è dovuto alla presenza di batteri della famiglia *Thermodesulfobiaceae*, tutti affiliati al genere *Coprothermobacter*: AD (0.3%), UP1 (3%), UP2 (6%), UP3 (7%), UP4 (2%) e UP5 (31%). Microorganismi del genere *Coprothermobacter* sono stati identificati frequentemente in digestori termofili, in cui svolgono una efficace attività proteolitica [32], che risulta potenziata quando si stabilisce una relazione simbiotica con la comunità metanogena idrogenotrofa, ed, in particolare con il genere *Methanothermobacter* [33]. Altri autori [34] hanno invece ipotizzato un coinvolgimento di questi batteri nella SAO, e, in particolare, in un processo di biometanazione *ex-situ* quando il pH era compreso nel range 8.5-9.0 [35]. Un ruolo certo nella SAO, è invece attribuito ai batteri del genere *Thermacetogenium* [36] che sono stati identificati nelle fasi AD (0.6%), UP1 (0.9%), UP2 (2%), UP3 (2%), UP4 (3%) e UP5 (3%) all'interno della famiglia *Thermoanaerobacteriaceae*.

Da quanto detto, è evidente come la probabile funzione svolta dalle comunità batteriche dei generi SHA-98, *Coprothermobacter* e *Thermacetogenium* sia strettamente legata alla loro relazione simbiotica con la comunità metanogena idrogenotrofa con cui collaborano, in quanto i primi ossidano l'acetato producendo H_2 e CO_2 , ed i secondi utilizzano questo substrato gassoso per la produzione di CH_4 , rendendo la prima reazione energeticamente possibile e stabilizzando, allo stesso tempo, l'intero processo di biometanazione. A conferma del ruolo fondamentale svolto dalle relazioni simbiotiche che si stabiliscono all'interno delle

comunità microbiche del GSTR, è interessante notare che, all'interno del phylum *Thermotogae*, sono stati identificati batteri appartenenti alla famiglia *Thermotogaceae*, e, in particolare, al genere S1, sia nel corso della fase AD (6%) che, dopo l'iniezione di idrogeno, in UP1 (42%), UP2 (28%), UP3 (11%), UP4 (15%) e UP5 (1%). Anche questi batteri sono coinvolti nella SAO [37], e la loro maggiore abbondanza relativa nel campione UP1 può essere in relazione alla composizione della comunità metanogena che, in questa fase, come riportato in precedenza, è costituita da una comunità mista di metanogeni idrogenotrofi e acetoclasti (Figura 3). A conferma, la comunità SAO più rappresentativa della fase UP5, dove i metanogeni idrogenotrofi sono rappresentati da un unico genere, è quella del genere *Coprothermobacter*.

All'interno del phylum *Proteobacteria*, una comunità di batteri appartenenti alla famiglia *Pseudomonadaceae*, è stata identificata nelle fasi AD (5%) e UP3 (14%). Il genere *Pseudomonas* ne rappresentava il 4% e il 12%, rispettivamente. Può sorprendere la presenza di questi batteri come peculiari di due fasi sperimentali, sostanzialmente diverse e distanziate temporalmente dalle fasi UP1 e UP2. Queste ultime, sono però caratterizzate da una comunità metanogena in evoluzione rispetto a quella di AD e che solo in UP3 è colonizzata da un'unica comunità di idrogenotrofi. Inoltre, in UP3 è stata rilevata la concentrazione più elevata degli acido acetico ($4.15\text{mM}\pm 1.54$) e un incremento del propionico ($6.81\text{mM}\pm 1.88$) e questo accumulo può aver stimolato l'attivazione dei percorsi metabolici di ossidazione dell'acetato (SAO) e del propionato (SPO). Infatti, un possibile ruolo attribuito a questa comunità batterica, che spesso coabita con le comunità di metanogeni nei processi di biometanazione, è quello di accelerare il trasferimento di elettroni tra batteri SAO e metanogeni [17].

Infine, si può notare come le comunità batteriche della famiglia *Pirellulaceae* (phylum *Planctomycetes*), SHA-31 (phylum *Chloroflexi*) e di una famiglia non identificata dell'ordine *Bacteroidetes* (phylum *Bacteroidales*) siano presenti esclusivamente nella fase AD (7%, 3% e 15%, rispettivamente). Si può ipotizzare che la scomparsa di queste comunità nelle fasi di iniezione dell'idrogeno sia in relazione alla evoluzione della comunità metanogena, ed, in particolare, alla ridotta efficienza del metabolismo acetoclastico (da AD a UP1), come evidenziato dall'accumulo di acido acetico dalla fase AD in poi (Tabella 3).

La diversità espressa dagli indici Shannon-Weaver (H') e Pielou's Evenness (E') (Figura 4b) identifica nel campione della fase UP4 i valori più elevati, sia per quanto riguarda il numero delle famiglie batteriche ($H'=2.55$) sia per la loro distribuzione ($E'=0.74$). Gli indici del campione UP3 ($H'=2.39 - E'=0.69$) sono inferiori, anche se ancora superiori a quelli della fase AD ($H'=2.31 - E'=0.67$), mentre la diversità minore appartiene alla fase UP1 ($H'=1.98 - E'=0.58$) per aumentare, poi, in UP2 ($H'=2.24 - E'=0.65$). Quest'andamento evidenzia che l'introduzione di idrogeno *in situ* nel GSTR tende a diminuire la diversità batterica nelle fasi UP1 e UP2 rispetto alla fase AD, ma successivamente, da UP3 in poi, inverte il suo effetto, inducendone un aumento. C'è inoltre da notare che la fase UP4 è preceduta da una fase di instabilità operativa di circa 50 giorni (Figura 2), caratterizzata da una grande fluttuazione sia del carico organico che della quantità di idrogeno immessi nel GSTR e che, insieme producono un accumulo di acetato che raggiunge un massimo di 22mM per poi diminuire a 7.8 mM (dati non mostrati) appena prima che la fase sperimentale UP4 sia partita. Questi parametri sono risultati poi stabilizzati in corrispondenza dell'ottimizzazione del processo nelle fasi UP4 e UP5, con una decisa riduzione di entrambi, e una conseguente stabilità della comunità batterica.

4 Conclusioni

In base alla valutazione delle esperienze sperimentali svolte nelle annualità dell'AdP (2020-2021) e allo stato dell'arte sul processo di biometanazione *in situ*, sono stati identificati i seguenti limiti e le seguenti prospettive:

- la nuova configurazione GSTR proposta si è dimostrata idonea ad incrementare sia il contenuto di CH₄ nel biogas che la sua velocità di produzione (0.31 L L_r⁻¹ d⁻¹), ottenendo una miscela gassosa costituita da 79.6% CH₄, 18.0% H₂, 2.4% CO₂, utilizzando una velocità di ricircolo del biogas di 176 LL_r⁻¹ d⁻¹. Tuttavia rimane da indagare quale ruolo potrà avere l'estensione dell'area immobilizzata all'intero volume del GSTR. Prove preliminari sembrano indicare un suo reale coinvolgimento nell'estendere l'area di interfaccia gas-liquido.
- Il peso del costo energetico legato alla velocità di ricircolo del biogas e l'insufficiente velocità di trasferimento gas-liquido di H₂ immesso nel GSTR così configurato, hanno trovato soluzione nel controllo della velocità di carico organico, il parametro chiave per arricchire in CH₄ la miscela di biogas. I risultati sperimentali hanno mostrato il 12% di incremento diminuendo la velocità di ricircolo del biogas da 235 L L_r⁻¹ d⁻¹ a 176 L L_r⁻¹ d⁻¹.
- l'accumulo di metaboliti solubili (acidi acetico e propionico, principalmente), rilevati in questa sperimentazione e nella maggior parte dei lavori pubblicati, anche con l'ottenimento di miscele con una concentrazione di metano ≥ 96%, potrebbe rappresentare un limite per il processo di biometanazione *in situ* su scala reale. D'altra parte, gli studi sul processo AD e sulla sua inibizione dovuta all'accumulo degli acidi organici volatili solubili, riportano concentrazioni limite molto diverse, probabilmente dovute alle caratteristiche della comunità microbica AD ed alla sua resilienza, intesa come potenzialità di sviluppare relazioni simbiotiche efficienti.
- la bibliografia più recente sul processo di biometanazione *in situ* converge nell'identificare un ruolo ottimale di questo processo in un "sistema ibrido", *in situ* + *ex situ*, che consentirebbe, da una parte di massimizzare l'efficienza del processo *in situ* senza alterare i parametri critici della fase AD (pH, concentrazione della CO₂, accumulo di metaboliti solubili) e dall'altra di fornire alla fase *ex situ* una miscela più stabile e in un volume di lavoro del reattore *ex situ* ridotto.
- lo studio della comunità microbica coinvolta nel processo è stata condotta nel corso della lunga operatività del GSTR (oltre i due anni), comprensiva non solo di fasi sperimentali stabili, ma anche di fasi intermedie instabili dovute a eventi accidentali (interruzioni della pompa di alimentazione, della pompa di ricircolo e dell'elettrolizzatore, interruzioni elettriche, rottura del criostato). Le informazioni ottenute hanno messo in evidenza come le dinamiche del processo di biometanazione *in situ* e delle comunità microbiche siano interdipendenti dalla capacità di adattamento a breve termine di queste ultime alle condizioni operative.
- la ripetibilità dell'efficienza del processo ottenuta nel secondo anno di attività, è stata contrassegnata da una nuova comunità microbica, sia nella componente dei *Bacteria* sia degli *Archaea*. Lo *shift* strutturale osservato all'interno dei metanogeni idrogenotrofi si è realizzato parallelamente a quello della comunità *Bacteria*, una co-evoluzione necessaria affinché si stabiliscano nuove specializzazioni funzionali simbiotiche. Infatti, affinché l'intero processo di biometanazione *in situ* sia stabile, l'iniezione di H₂ nel GSTR non deve compromettere l'efficienza di degradazione del substrato non gassoso, e quindi, delle comunità coinvolte nelle fasi dell'AD. Se entrambe le comunità, *Archaea* e *Bacteria*, conservano la loro ridondanza funzionale, allora un microorganismo può essere sostituito da un altro, meglio adattato alle mutate condizioni operative e che svolge la stessa funzione. In questo senso, quindi, un eventuale limite biologico per il processo di biometanazione *in situ* deve essere ricercato nella possibilità di instaurare relazioni simbiotiche efficienti e non solo alla identità della comunità di idrogenotrofi.
- La tecnica NGS utilizzata per l'identificazione filogenetica delle comunità microbiche ha mostrato di essere poco sensibile nell'identificazione dei livelli filogenetici inferiori (genere e specie),

condizione fondamentale per poter attribuire una funzione. Si rende, quindi, necessario implementare la tecnica NGS, sia ricorrendo a marcatori molecolari più sensibili, sia ricorrendo a strumenti di indagine più approfonditi come quelli forniti dalle scienze omiche (metagenomica, trascrittomica e proteomica).

5 Riferimenti bibliografici

- [1] M. Bailera, P. Lisbona, L.M. Romeo, S. Espatolero, Power to Gas projects review: Lab, pilot and demo plants for storing renewable energy and CO₂, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 69 (2017) 292–312. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.11.130>.
- [2] R.C. Poudel, D. Khatiwada, P. Aryal, M. Sapkota, Large-scale biogas upgrading plants: future prospective and technical challenges, in: *Emerg. Technol. Biol. Syst. Biogas Upgrad.*, Elsevier, 2021: pp. 467–491. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-822808-1.00017-9>.
- [3] M.S. M.Thema, F. Bouer, Power-to-gas: Elettrolisis and methanation status review, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 112 (2019) 775–787.
- [4] G.L. A.Signorini, S.Rosa, G.Massini, Upgrading biologico in situ del biogas in un reattore CSTR ibrido e dinamocche della comunità microbica, *ReportRdS/PTR2020/193.* (2020) 1–30.
- [5] L.M. Agneessens, L.D.M. Ottosen, N.V. Voigt, J.L. Nielsen, N. de Jonge, C.H. Fischer, M.V.W. Kofoed, In-situ biogas upgrading with pulse H₂ additions: The relevance of methanogen adaption and inorganic carbon level, *Bioresour. Technol.* 233 (2017) 256–263. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.016>.
- [6] G. Luo, I. Angelidaki, Co-digestion of manure and whey for in situ biogas upgrading by the addition of H₂: Process performance and microbial insights, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97 (2013) 1373–1381. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4547-5>.
- [7] G. Luo, I. Angelidaki, Hollow fiber membrane based H₂ diffusion for efficient in situ biogas upgrading in an anaerobic reactor, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97 (2013) 3739–3744. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4811-3>.
- [8] V. Corbellini, A. Catenacci, F. Malpei, Hydrogenotrophic biogas upgrading integrated into WWTPs: Enrichment strategy, *Water Sci. Technol.* 79 (2019). <https://doi.org/10.2166/wst.2019.096>.
- [9] G. Luo, S. Johansson, K. Boe, L. Xie, Q. Zhou, I. Angelidaki, Simultaneous hydrogen utilization and in situ biogas upgrading in an anaerobic reactor, *Biotechnol. Bioeng.* 109 (2012) 1088–1094. <https://doi.org/10.1002/bit.24360>.
- [10] F.M. V. Corbellini, C. feng, M. Bellucci, A. Catenacci, T. Stella, A. Espinoza-Tofalos, Performance Analysis and Microbial Community Evolution of In Situ Biological Biogas Upgrading with Increasing H₂/CO₂ Ratio, *Archaea.* Article ID (2021).
- [11] D.L. X. Zhu, L. Chen, Y. Chen, Q. Cau, X. liu, Differences of methanogenesis between mesophilic and thermophilic in situ biogas-upgrading systems by hydrogen addition, *J. Ind. Microbiology Biotechnol.* 46 (2019) 1569–1581.
- [12] N. Alfaro, M. Fdz-Polanco, F. Fdz-Polanco, I. Díaz, H₂ addition through a submerged membrane for in-situ biogas upgrading in the anaerobic digestion of sewage sludge, *Bioresour. Technol.* 280 (2019) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.135>.
- [13] I. Bassani, P.G. Kougias, L. Treu, I. Angelidaki, Biogas Upgrading via Hydrogenotrophic Methanogenesis in Two-Stage Continuous Stirred Tank Reactors at Mesophilic and Thermophilic Conditions, *Environ. Sci. Technol.* 49 (2015) 12585–12593. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03451>.
- [14] R. Wahid, S.J. Horn, Impact of operational conditions on methane yield and microbial community composition during biological methanation in in situ and hybrid reactor systems, *Biotechnol. Biofuels.* 14 (2021). <https://doi.org/10.1186/s13068-021-02019-4>.
- [15] M. B. Jansen, B. Jensen, L.D.M. Ottosen, Integrating H₂ injection and reactor mixing for low-cost H₂ gas-liquid mass transfer in full-scale in situ biomethanation, *Biochem. Engineering J.* 166 (2020).
- [16] D.G. Mulat, F. Mosbæk, A.J. Ward, D. Polag, M. Greule, F. Keppler, J.L. Nielsen, A. Feilberg, Effect of

exogenous hydrogen addition on process performance, methanogenesis and homo-acetogenesis pathways during an in situ biogas upgrading under thermophilic anaerobic digestion, 2016.

- [17] P.G. Kougias, P. Tsapekos, L. Treu, M. Kostoula, S. Campanaro, G. Lyberatos, I. Angelidaki, Biological CO₂ fixation in up-flow reactors via exogenous H₂ addition, *J. Biotechnol.* 319 (2020) 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.05.012>.
- [18] S. Fu, I. Angelidaki, Y. Zhang, In situ Biogas Upgrading by CO₂-to-CH₄ Bioconversion, *Trends Biotechnol.* 39 (2021) 336–347. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.08.006>.
- [19] J. Zabranska, D. Pokorna, Bioconversion of carbon dioxide to methane using hydrogen and hydrogenotrophic methanogens, *Biotechnol. Adv.* 36 (2018) 707–720. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.12.003>.
- [20] I.A. L. Treu, P.G. Kougias, B. de Diego-Diaz, S. Campanaro, I. Bassani, J. Fernendez-Rodriguez, Two-years microbial adaptation during hydrogen-mediated biogas upgrading process in a serial reactor configuration, *Bioresour. Technol.* 264 (2019) 140–147.
- [21] K.K. D. Strubing, B. Huber, M. Lebhun, J. E. Drewes, High performance biological methanation in a thermophilic anaerobic trickle bed reactor, *Bioresour. Technol.* 245 (2017) 1176–1183.
- [22] M.G. T. Zotta, L. Solieri, L. Iacumin, C. Picozzi, Valorization of cheese whey using microbial fermentations, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104 (2020) 2749–2764.
- [23] M.F.-P. N. Alfaro, I.D. F. Fdz-Polanco, Evaluation of process performance, energy consumption and microbiota characterization in a ceramic membrane bioreactor for ex-situ biomethanation of H₂ and CO₂, *Bioresour. Technol.* 258 (2018) 142–150.
- [24] J.N. Reeve, R.M. Morgan, J. Nöling, Environmental and molecular regulation of methanogenesis, in: *Water Sci. Technol.*, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(97\)00500-3](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(97)00500-3).
- [25] G. Lembo, S. Rosa, V.M. Miritana, A. Marone, G. Massini, M. Fenice, A. Signorini, Thermophilic anaerobic digestion of second cheese whey: Microbial community response to H₂ addition in a partially immobilized anaerobic hybrid reactor, *Processes.* 9 (2021) 1–16. <https://doi.org/10.3390/pr9010043>.
- [26] L. Treu, P. Tsapekos, M. Peprah, S. Campanaro, A. Giacomini, V. Corich, P.G. Kougias, I. Angelidaki, Microbial profiling during anaerobic digestion of cheese whey in reactors operated at different conditions, *Bioresour. Technol.* 275 (2019) 375–385. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.084>.
- [27] H. Porté, P.G. Kougias, N. Alfaro, L. Treu, S. Campanaro, I. Angelidaki, Process performance and microbial community structure in thermophilic trickling biofilter reactors for biogas upgrading, *Sci. Total Environ.* 655 (2019) 529–538. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.289>.
- [28] P.G. Kougias, L. Treu, D.P. Benavente, K. Boe, S. Campanaro, I. Angelidaki, Ex-situ biogas upgrading and enhancement in different reactor systems, *Bioresour. Technol.* 225 (2017) 429–437. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.124>.
- [29] M. Zamanzadeh, L.H. Hagen, K. Svensson, R. Linjordet, S.J. Horn, Anaerobic digestion of food waste - Effect of recirculation and temperature on performance and microbiology, *Water Res.* 96 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.03.058>.
- [30] R.H. Madden, Isolation and characterization of *Clostridium stercorarium* sp. nov., Cellulolytic Thermophile, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33 (1983) 837–840.
- [31] B. Wu, R. Lin, X. Kang, C. Deng, A.D.W. Dobson, J.D. Murphy, Improved robustness of ex-situ biological methanation for electro-fuel production through the addition of graphene, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 152 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111690>.

- [32] M.C. Gagliano, C.M. Braguglia, M. Petruccioli, S. Rossetti, Ecology and biotechnological potential of the thermophilic fermentative *Coprothermobacter* spp., *FEMS Microbiol. Ecol.* 91 (2015). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv018>.
- [33] K. Sasaki, M. Morita, D. Sasaki, J. Nagaoka, N. Matsumoto, N. Ohmura, H. Shinozaki, Syntrophic degradation of proteinaceous materials by the thermophilic strains *Coprothermobacter proteolyticus* and *Methanothermobacter thermautotrophicus*, *J. Biosci. Bioeng.* 112 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.07.003>.
- [34] D. Ho, P. Jensen, D. Batstone, Effects of temperature and hydraulic retention time on acetotrophic pathways and performance in high-rate sludge digestion, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014). <https://doi.org/10.1021/es500074j>.
- [35] L. Chen, S. Du, L. Xie, Effects of pH on ex-situ biomethanation with hydrogenotrophic methanogens under thermophilic and extreme-thermophilic conditions, *J. Biosci. Bioeng.* 131 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2020.09.018>.
- [36] S. Hattori, Syntrophic acetate-oxidizing microbes in methanogenic environments, *Microbes Environ.* 23 (2008). <https://doi.org/10.1264/jsme2.23.118>.
- [37] D. Li, Y. Ran, L. Chen, Q. Cao, Z. Li, X. Liu, Instability diagnosis and syntrophic acetate oxidation during thermophilic digestion of vegetable waste, *Water Res.* 139 (2018) 263–271. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.04.019>.