



Università  
Ca' Foscari  
Venezia

Corso di Laurea  
magistrale  
in Scienze  
Ambientali

Tesi di Laurea

Fermentazione di rifiuti organici in miscela  
con fanghi di depurazione per la produzione  
di acidi grassi volatili e valutazione delle rese  
dopo pretrattamento di cavitazione

**Relatrice**

Prof.ssa Cristina Cavinato

**Correlatori**

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

**Laureanda**

Alice Lanfranchi  
858516

**Anno Accademico**

2019/ 2020

*A mio fratello Francesco,  
perché con te accanto le sfide della vita adulta  
conservano la gioia e la leggerezza  
di un gioco da bambini*

## SOMMARIO

1. Introduzione .....	7
1.1 L'economia circolare .....	8
1.2 La transizione europea verso l'economia circolare .....	10
1.3 Produzione di acidi grassi volatili .....	14
1.4 Il processo di digestione anaerobica .....	18
1.4.1 Idrolisi ed acidogenesi .....	21
1.4.2 Acetogenesi .....	21
1.4.3 Metanogenesi.....	22
1.5 La cavitazione.....	25
1.5.1 Il passaggio di stato liquido-aeriforme .....	25
1.5.2 Definizione di ebollizione.....	25
1.5.3 Definizione di cavitazione.....	26
1.5.4 Tipologie di cavitazione.....	29
1.5.5 Utilizzo della cavitazione nel pretrattamento delle matrici organiche.....	30
1.6 Scopo della tesi .....	34
2. Materiali e metodi .....	36
2.1 Caratterizzazione dei substrati utilizzati e inoculo .....	36
2.2 Processi di cavitazione.....	37
2.3 Test di fermentazione.....	39
2.4.1. Test batch .....	41
2.4.2. Test in semicontinuo.....	42
2.4.3. Rese.....	42
2.4 Test del potenziale di biometanazione ( <i>Biochemical Methane Potential, BMP</i> ).....	44
2.5 Analisi microbiologiche.....	48
3. Risultati .....	49
3.1 Caratterizzazione dei substrati utilizzati e inoculo.....	49
3.2 Processi di cavitazione.....	52
3.3 Test di fermentazione.....	58
3.3.1 Test batch .....	58
3.3.2 Test in semicontinuo.....	69
3.4 Test del potenziale di biometanazione .....	77
3.5 Struttura della comunità microbica .....	83
4. Conclusioni .....	92
Ringraziamenti.....	93
Bibliografia .....	94
Sitografia.....	105

## Indice delle figure

Figura 1. Earth Overshoot Day dal 1970 ad oggi (Earth Overshoot Day, 2021).....	9
Figura 2. Schema dell'economia circolare. Sono illustrati separatamente e dettagliatamente i flussi dei materiali biologici e dei materiali tecnici (Ellen MacArthur Foundation, 2019). .....	10
Figura 3. Gerarchia della gestione dei rifiuti (DEFRA, 2011).....	11
Figura 4. I 17 obiettivi dello sviluppo sostenibile definiti dalle Nazioni Unite (UN, 2020). .....	12
Figura 5. Il Green Deal europeo (Commissione Europea, 2019). .....	13
Figura 6. Processi chimici di conversione dei carbossilati, tra cui gli AGV, in combustibili o solventi attraverso passaggi biochimici in coltura pura, elettrochimici o termochimici (Agler et al., 2011). ..	17
Figura 7. Diagramma complesso delle fasi coinvolte nella digestione anaerobica. Modificato da Gujer&Zehnder (1983). .....	19
Figura 8. Influenza della temperatura sulla cinetica biologica (Brock., 2016). .....	20
Figura 9. Tassonomia degli <i>Archaea</i> metanogeni (Demirel&Scherer, 2008; Ferry&Kastead, 2007). .....	23
Figura 10. Diagramma di stato dell'acqua. Immagine tratta da Diagramma di stato dell'acqua (youmath.it) .....	26
Figura 11. Variazione della pressione e condizioni di flusso in uno strumento per la cavitazione (tubo Venturi) (Carpenter et al., 2017).....	26
Figura 12. Formazione di un microgetto e impatto con la parete. Immagine tratta da The Compton Group - research (ox.ac.uk).....	27
Figura 13. Sintesi dei fenomeni fisico-chimici che si verificano durante la cavitazione (CNR, 2020 adattato da Carpenter et al., 2017).....	28
Figura 14. Erosione dovuta alla cavitazione in una girante monocanale di un impianto di trattamento delle acque reflue (Thamsen et al., 2008). .....	28
Figura 15. Contenitore cubico utilizzato nella prima cavitazione. ....	38
Figura 16. Contenitore tronco-conico utilizzato nella seconda cavitazione. ....	39
Figura 17. Fermentatore da banco (RES Italia). .....	40
Figura 18. Sistema a vasi comunicanti utilizzato per misurare il volume di biogas prodotto nei test BMP.....	45
Figura 19. Calcolo del volume cumulativo netto di biogas prodotto dal substrato (DBFZ, 2021). ...	47
Figura 20. Composizione degli scarti mercatali estivi. ....	49
Figura 21. Composizione degli scarti mercatali autunnali.....	50
Figura 22. Fango di depurazione osservato al microscopio con ingrandimento 10x (prima cavitazione). .....	52
Figura 23. Miscela cavitata osservata al microscopio con ingrandimento 10x (prima cavitazione). ..	53
Figura 24. Fango di depurazione osservato al microscopio con ingrandimento 10x (seconda cavitazione). .....	53
Figura 25. Miscela cavitata osservata al microscopio con ingrandimento 10x (seconda cavitazione). .....	53
Figura 27. Miscela cavitata inserita in un cilindro da 250 mL. ....	54
Figura 26. Miscela non cavitata inserita in un cilindro da 250 mL. ....	54
Figura 28. Frazione della miscela cavitata trattenuta da un filtro con $\varnothing= 1$ mm. ....	55
Figura 29. Frazione della miscela non cavitata trattenuta da un filtro con $\varnothing= 1$ mm. ....	55
Figura 30. Miscela cavitata setacciata con un filtro con $\varnothing= 1$ mm. ....	55
Figura 31. Miscela non cavitata setacciata con un filtro con $\varnothing= 1$ mm. ....	55
Figura 32. Andamento della produzione di AGV nel primo test batch (substrato cavitato e non cavitato).....	59
Figura 33. Andamento del pH e della produzione di AGV nel primo test batch (substrato cavitato). .....	59

Figura 34. Andamento del pH e della produzione di AGV nel primo test batch (substrato non cavitato).....	60
Figura 35. Profilo degli AGV nel primo test batch (substrato cavitato).....	61
Figura 36. Profilo degli AGV nel primo test batch (substrato non cavitato).....	62
Figura 37. Andamento della produzione di AGV nel secondo test batch (substrato cavitato e non cavitato).....	63
Figura 38. Andamento della produzione di AGV e del pH nel secondo test batch (substrato cavitato).....	64
Figura 39. Andamento della produzione di AGV e del pH nel secondo test batch (substrato non cavitato).....	64
Figura 40. Attività cumulativa totale del cavitato e del non cavitato nel secondo test batch.....	65
Figura 41. Andamento del profilo degli AGV del substrato cavitato nella fase di stabilità del secondo test batch (gCOD <sub>AGV</sub> /L).....	65
Figura 42. Andamento del profilo degli AGV del substrato non cavitato nella fase di stabilità del secondo test batch (gCOD <sub>AGV</sub> /L).....	66
Figura 43. Valori medi del profilo degli AGV del substrato cavitato nella fase di stabilità del secondo test batch (%).....	67
Figura 44. Valori medi del profilo degli AGV del substrato non cavitato nella fase di stabilità del secondo test batch (%).....	67
Figura 45. Andamento della produzione di AGV nel secondo test (substrato cavitato e non cavitato).....	71
Figura 46. Andamento della produzione di AGV e del pH nel secondo test (substrato cavitato).....	71
Figura 47. Andamento della produzione di AGV e del pH nel secondo test (substrato non cavitato).....	72
Figura 48. Attività del cavitato e del non cavitato nel semicontinuo.....	72
Figura 49. Andamento del profilo degli AGV del substrato cavitato nella fase di stabilità del semi-continuo (gCOD <sub>AGV</sub> /L).....	73
Figura 50. Andamento del profilo degli AGV del substrato non cavitato nella fase di stabilità del semi-continuo (gCOD <sub>AGV</sub> /L).....	74
Figura 51. Valori medi del profilo degli AGV del substrato cavitato nella fase di stabilità del semi-continuo (%).....	75
Figura 52. Valori medi del profilo degli AGV del substrato non cavitato nella fase di stabilità del semi-continuo (%).....	76
Figura 53. Andamento dell'SGP dei substrati (fango, scarti mercatali, miscela cavitata e non cavitata).....	79
Figura 54. Andamento dell'SMP dei substrati (fango, scarti mercatali, miscela cavitata e non cavitata).....	79
Figura 55. Attività dei substrati nei test BMP (m <sup>3</sup> /kgTVS*d).....	80
Figura 56. Attività dei substrati nei test BMP (m <sup>3</sup> /tTQ*d).....	80
Figura 57. Andamento dell'SGP del fermentato e della frazione solida (cavitato e non cavitato).....	81
Figura 58. Andamento dell'SMP del fermentato e della frazione solida (cavitato e non cavitato).....	81
Figura 59. Attività del fermentato e della sua frazione solida nei test BMP (m <sup>3</sup> /kgTVS*d).....	82
Figura 60. Attività del fermentato e della sua frazione solida nei test BMP (m <sup>3</sup> /tTQ*d).....	82
Figura 61. Phyla del cavitato alla fine del test.....	84
Figura 62. Classi del cavitato alla fine del test.....	84
Figura 63. Ordini presenti nel cavitato alla fine del test.....	85
Figura 64. Famiglie presenti nel cavitato alla fine del test.....	85
Figura 65. Generi presenti nel cavitato alla fine del test.....	85
Figura 66. Specie presenti nel cavitato alla fine del test.....	85
Figura 67. Phyla presenti nel non cavitato alla fine del test.....	86
Figura 68. Classi presenti nel non cavitato alla fine del test.....	86
Figura 69. Ordini presenti nel non cavitato alla fine del test.....	87

Figura 70. Famiglie presenti nel non cavitato alla fine del test.....	87
Figura 71. Generi presenti nel non cavitato alla fine del test.....	87
Figura 72. Specie presenti nel non cavitato alla fine del test.....	87

## Indice delle tabelle

Tabella 1. AGV più richiesti dal mercato, le maggiori compagnie coinvolte nel loro business e principali applicazioni dei composti derivati.....	15
Tabella 2. Parametri operativi dei processi di cavitazione.....	38
Tabella 3. Condizioni operative adottate nei test batch.....	41
Tabella 4. Parametri di processo del test di fermentazione in semi-continuo.....	42
Tabella 5. Parametri applicati per lo svolgimento dei test BMP sui substrati singoli e sulle miscele.....	45
Tabella 6. Parametri applicati per lo svolgimento dei test BMP sull'effluente della fermentazione e sulla sua frazione solida.....	46
Tabella 7. Caratteristiche degli scarti mercatali.....	50
Tabella 8. Caratterizzazione dei fanghi prelevati durante il periodo di studio (media) e del fango del 3/12.....	51
Tabella 9. Caratterizzazione del digestato anaerobico.....	51
Tabella 10. Caratteristiche delle miscele prima del pretrattamento di cavitazione.....	56
Tabella 11. Caratteristiche delle miscele cavitate.....	57
Tabella 12. Parametri di processo e rese rilevati in corrispondenza del picco di concentrazione degli AGV nel primo test batch.....	60
Tabella 13. Portata e composizione del biogas prodotto dal primo test batch di fermentazione dopo aver virato verso la metanogenesi (substrato cavitato).....	62
Tabella 14. Portata e composizione del biogas prodotto dal primo test batch di fermentazione dopo aver virato verso la metanogenesi (substrato non cavitato).....	63
Tabella 15. Parametri e rese del secondo test batch nella fase di stabilità.....	68
Tabella 16. Confronto tra la concentrazione di AGV e le rese ottenute nel primo e nel secondo test batch per ciascun substrato.....	69
Tabella 17. Parametri e rese del test in semi-continuo nella fase di stabilità.....	77
Tabella 18. Valori finali dei test BMP dei substrati (fango, scarti mercatali, miscela cavitata e non cavitata).....	79
Tabella 19. Valori finali dei test BMP del fermentato e della frazione solida (cavitato e non cavitato).....	82
Tabella 21. Gradiente di eluizione applicato nell'analisi HPLC degli AGV.....	108
Tabella 22. Programmata di temperatura applicata nell'analisi gascromatografica degli AGV.....	109

## Elenco degli acronimi

AGV: acidi grassi volatili

BMP: potenziale di biometanazione (*biochemical methane potential*)

F/M: *food/microorganisms*

FORSU: frazione organica dei rifiuti solidi urbani

HRT: tempo di ritenzione idraulica (*hydraulic retention time*)

OL: carico organico (*organic loading*)

OLR: tasso di carico organico (*organic loading rate*)

pCOD: richiesta chimica di ossigeno nel particolato

PHA: poli-idrossi-alcanoati

sCOD: richiesta chimica di ossigeno solubile

SGP: produzione specifica media di biogas (*average specific biogas production*)

SMP: produzione specifica media di metano (*average specific methane production*)

tCOD: richiesta chimica di ossigeno totale

TQ= tal quale

TS: solidi totali

TVS: solidi totali volatili

## 1. Introduzione

La scarsità delle risorse ed il cambiamento climatico dovuto all'immissione di quantità crescenti di CO<sub>2</sub> in atmosfera continuano a ribadire la necessità di abbandonare il tradizionale modello economico lineare e di attuare la transizione all'economia circolare, in cui un aspetto fondamentale è il recupero dei rifiuti e la loro trasformazione in prodotti commercializzabili ed energia.

Nel contesto urbano i due principali flussi di rifiuti sono i fanghi di depurazione e gli scarti alimentari, che sono destinati a crescere parallelamente all'aumento della popolazione. Si stima che nel 2020, in Europa, siano state generate circa 13 milioni di tonnellate (materia secca) di fanghi di depurazione (Collivignarelli et al., 2019). La produzione annuale di scarti alimentari ammonta a 2 miliardi di tonnellate, di cui 1,3 prodotte dall'Europa e dagli altri paesi occidentali. Questa enorme quantità di scarti alimentari viene prodotta durante tutto il ciclo di vita del cibo: a livello europeo, il 53% proviene dalle utenze domestiche, il 30% dall'industria agroalimentare, il 12% dalla ristorazione ed il 5% dalla vendita al dettaglio (Stenmarck et al., 2016). Secondo l'IPCC, ogni anno in Europa vengono prodotte 0,48 tonnellate pro capite di rifiuti solidi urbani, di cui il 32% è costituito da scarti alimentari (Towprayoon, 2019). Considerando che la popolazione europea è costituita da 446 milioni di cittadini, si stima una produzione di circa 78 milioni di tonnellate di scarti alimentari (EUROSTAT, 2020).

Nella maggior parte dei casi, i due flussi vengono trattati separatamente: i fanghi di depurazione vengono digeriti, disidratati e depositati in discarica, mentre i rifiuti organici vengono compostati (Moretto et al., 2019). Questa strategia è svantaggiosa sia dal punto di vista economico che ambientale: i digestori anaerobici negli impianti di trattamento delle acque reflue spesso lavorano in condizioni di basso carico e bassa efficienza (Bolzonella et al., 2005), mentre il compostaggio aerobico dei rifiuti organici è un processo ad alta intensità energetica (Moretto et al., 2019). Il trattamento integrato dei fanghi di depurazione e dei rifiuti organici, sperimentato mediante codigestione anaerobica (Mata-Alvarez et al., 2014; Moretto et al., 2020a; Mattioli et al., 2017), migliora la resa del processo grazie ad un rapporto C/N più favorevole per i microrganismi e diluisce i composti tossici eventualmente presenti nei fanghi di depurazione, quali metalli pesanti e residui di farmaci.

Un approccio innovativo per la gestione integrata di questi due flussi di scarto consiste nella loro valorizzazione secondo il modello della bioraffineria di terza generazione, che combina più processi per ottenere composti chimici ad alto valore aggiunto ed energia (Battista et al., 2020). Uno di questi processi è la fermentazione, che consente di ottenere acidi grassi volatili (AGV), composti di grande interesse commerciale in quanto precursori di composti chimici ridotti e substrati adatti per la sintesi di biopolimeri e lipidi (Battista et al., 2020; Cho et al., 2017; Strazzera et al., 2018). Il tradizionale trattamento di digestione anaerobica, invece, permette di ottenere solo



prodotti con un basso valore di mercato, come biogas e ammendanti, e degrada solo il 35-60% della sostanza organica contenuta nei fanghi di depurazione e nei rifiuti organici (Yin et al., 2016b).

Il primo processo all'interno di una bioraffineria è il pretrattamento dei substrati, con lo scopo di prepararli agli stadi successivi mediante (Li et al., 2017):

- a) La riduzione delle dimensioni del substrato;
- b) L'estrazione di composti chimici più semplici in modo da favorire la fermentazione;
- c) Ridurre il grado di cristallinità dei substrati.

In questo lavoro di tesi il pretrattamento dei substrati è stato effettuato con la cavitazione idrodinamica, un pretrattamento fisico-chimico a bassa intensità energetica che disgrega i materiali aumentandone quindi la biodisponibilità (Bhat & Gogate, 2021). L'obiettivo è massimizzare il recupero di composti chimici ad alto valore aggiunto (AGV) e di energia dai due principali flussi di scarto del metabolismo urbano, combinando la fermentazione e la digestione anaerobica.

Nel processo di fermentazione, la resa e la distribuzione degli AGV sono il risultato della composizione e dell'attività della comunità microbica, il cui studio può aiutare a comprendere il processo di fermentazione e l'effetto delle condizioni applicate. Un'ampia gamma di microrganismi è implicata nel processo di fermentazione e sono necessari ulteriori studi per determinare il ruolo ricoperto da ogni microrganismo (Ramos-Suarez et al., 2021). Per le ragioni sopracitate, in questo lavoro di tesi è stata determinata la composizione della comunità microbica dei fermentatori per entrambe le condizioni testate (cavitato/non cavitato), mediante sequenziamento della regione V4 del 16s rRNA.

## **1.1 L'economia circolare**

Una delle sfide più grandi per la società contemporanea è conciliare la domanda crescente di risorse con la limitatezza dell'unico pianeta a nostra disposizione: c'è una sola Terra ma, stimando una popolazione di 9,6 miliardi entro il 2050, sarebbero necessari almeno tre pianeti per sostenere lo stile di vita attuale (UN, 2021). Si prevede che il consumo globale di biomasse, combustibili fossili, metalli e minerali raddoppierà entro i prossimi quarant'anni e che la produzione annuale di rifiuti aumenterà del 70% entro il 2050 (World Bank, 2018).

Fin dalla prima rivoluzione industriale è stato adottato un modello economico lineare in cui il prodotto diventa rifiuto dopo l'utilizzo, fondato sull'erronea convinzione che le risorse siano illimitate (Ellen MacArthur Foundation, 2021). Questo modello economico causa il sovrasfruttamento delle risorse naturali, avvicinando ogni anno la data dell'*Earth Overshoot Day*, il giorno in cui l'umanità esaurisce le risorse che la Terra può fornire in un anno (figura 1) (Earth Overshoot Day, 2021).

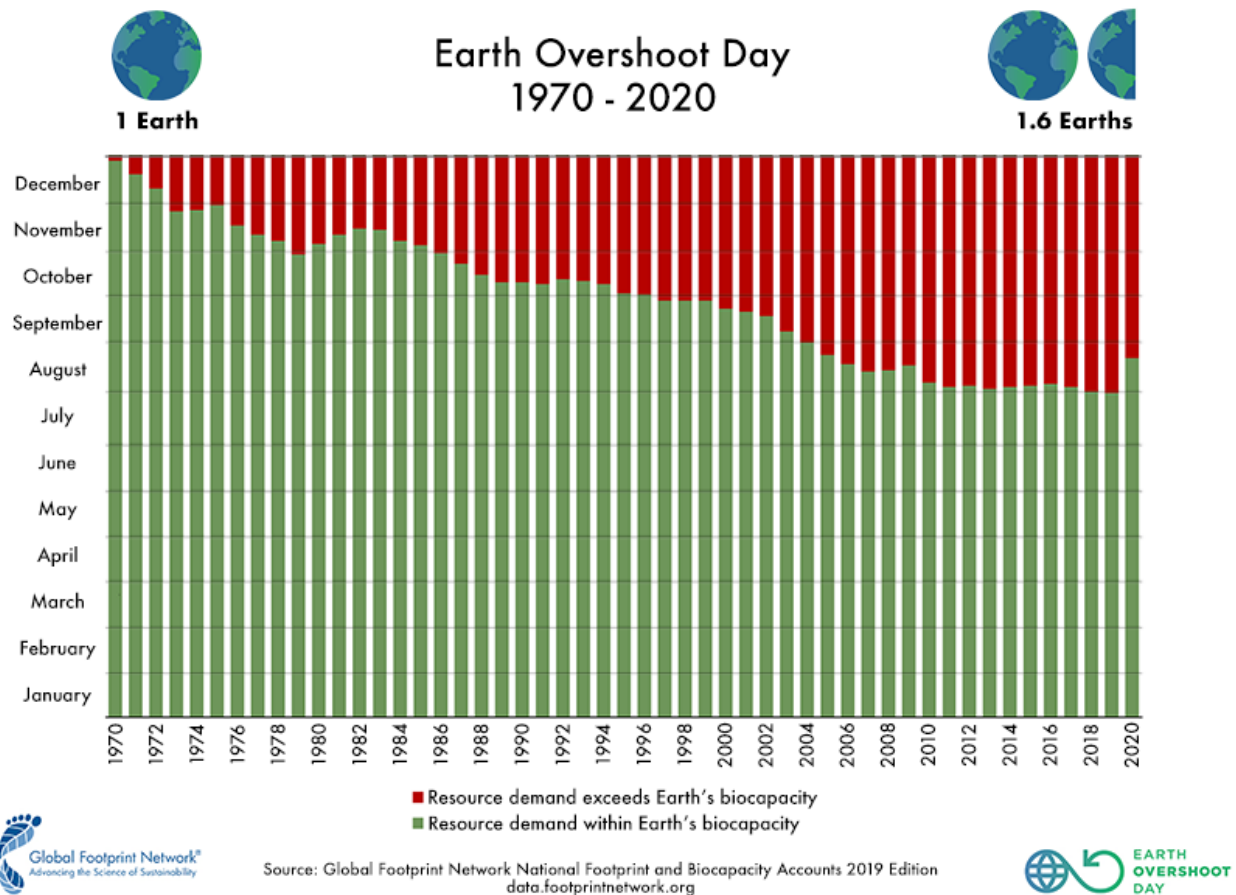


Figura 1. Earth Overshoot Day dal 1970 ad oggi (Earth Overshoot Day, 2021).

Sotto la crescente pressione della scarsità delle risorse e di una legislazione sempre più stringente sta emergendo un nuovo modello economico, l'economia circolare, definita come "un modello economico rigenerativo in cui l'apporto di materie prime, i rifiuti, le emissioni e gli sprechi energetici siano ridotti al minimo rallentando, chiudendo e restringendo i cicli dell'energia e dei materiali. Questo può avvenire progettando beni fatti per durare a lungo, per i quali sia prevista la manutenzione, il riparo, il riutilizzo, la rigenerazione, la ristrutturazione ed il riciclo" (Geissdoerfer et al., 2017).

Al contrario dell'economia lineare, l'economia circolare conferisce valore ai rifiuti e richiede un nuovo rapporto con i materiali, che vengono distinti in (figura 2):

- Materiali biologici, in verde, che possono essere reimmessi in natura, dove verranno biodegradati restituendo all'ambiente gli elementi di cui sono composti;
- Materiali tecnici, in blu, che non possono essere reimmessi in natura, ma devono essere riciclati il più possibile all'interno del sistema in modo da estrarre tutto il valore contenuto in essi.

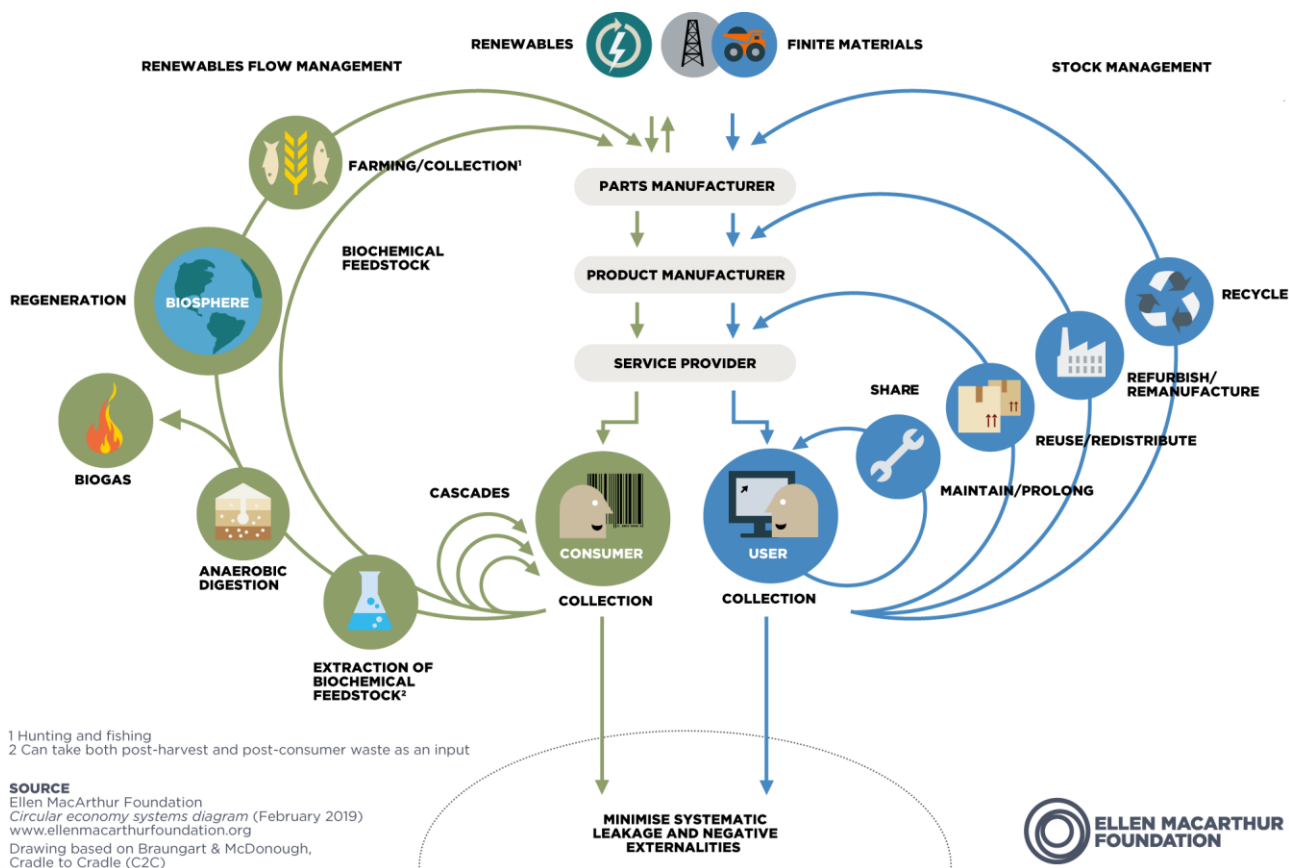


Figura 2. Schema dell'economia circolare. Sono illustrati separatamente e dettagliatamente i flussi dei materiali biologici e dei materiali tecnici (Ellen MacArthur Foundation, 2019).

## 1.2 La transizione europea verso l'economia circolare

L'Unione Europea è stata una delle prime istituzioni ad implementare la transizione verso l'economia circolare, con la codificazione della Direttiva 75/442/EEC nella Direttiva 2006/12/EC. La Direttiva 2006/12/EC è stata successivamente aggiornata con l'introduzione della Direttiva 2008/98 EC, nota come Waste Framework Directive (WFD). La WFD stabilisce i concetti e le definizioni fondamentali nella gestione dei rifiuti, illustrando tra l'altro il criterio dell'*end-of-waste*, per cui un rifiuto cessa di essere tale e diventa una materia prima secondaria (European Commission, 2019).

La WFD ha stabilito i principi basilari della gestione dei rifiuti, secondo cui questi devono essere gestiti in modo tale da non arrecare danno alla salute umana e all'ambiente, rispettando la gerarchia riportata in figura 3 (DEFRA, 2011; European Commission, 2019):

- i) prevenzione della produzione di rifiuti, ad esempio impiegando meno materiale nella progettazione dei beni ed utilizzandoli più a lungo;
- ii) riutilizzo, tramite la riparazione, la ristrutturazione e la manutenzione dei beni o di alcune loro parti;
- iii) riciclo, ovvero la trasformazione dei rifiuti in nuovi materiali o prodotti;
- iv) altre forme di riciclo, come la digestione anaerobica e la termovalorizzazione, ed infine lo smaltimento in discarica e l'incenerimento senza recupero di energia.



Figura 3. Gerarchia della gestione dei rifiuti (DEFRA, 2011).

La WFD ha introdotto il principio “chi inquina paga” e la responsabilità estesa del produttore, secondo cui i produttori sono responsabili degli impatti ambientali delle loro merci lungo tutto il loro ciclo di vita (European Commission, 2019). La Direttiva stabilisce come obiettivo il riciclo del 50% dei rifiuti domestici e del 70% dei rifiuti edili entro il 2020 ed ha introdotto l’obbligo per gli stati membri di adottare un piano di gestione dei rifiuti e politiche di prevenzione della loro produzione. (European Commission, 2019).

Attualmente, l’Unione Europea ha aggiornato la strategia per la transizione ad un’economia circolare approvando il *Green Deal* europeo nel dicembre 2019 e adottando un nuovo piano d’azione per l’economia circolare.

Il *Green Deal* è una nuova strategia di crescita che si pone l’obiettivo di trasformare l’UE in una società equa e prospera, dotata di un’economia moderna, competitiva e capace di utilizzare le risorse in maniera efficiente e sostenibile, disaccoppiando la crescita economica dallo sfruttamento delle risorse (Commissione Europea, 2019). Il *Green Deal* europeo è parte integrante della strategia della Commissione Europea per attuare l’Agenda 2030 e gli obiettivi di sviluppo sostenibile delle Nazioni Unite, che sono suddivisi in 17 obiettivi (figura 4) e 169 punti chiave, focalizzati nell’implementazione dello sviluppo sostenibile (economico, sociale ed ambientale) nelle cinque aree d’importanza critica per l’umanità e per il pianeta, definite “le 5 P”: Persone, Pianeta, Prosperità, Pace e Partnership (United Nations, 2015; Commissione Europea, 2019).

# SUSTAINABLE DEVELOPMENT GOALS



Figura 4. I 17 obiettivi dello sviluppo sostenibile definiti dalle Nazioni Unite (UN, 2020).

Uno degli obiettivi fondamentali del *Green Deal*, sintetizzati in figura 5, è la modernizzazione e decarbonizzazione delle industrie ad alta intensità energetica e di risorse, tra cui quella dei prodotti chimici ed in particolare delle materie plastiche. Come riportato nel documento ufficiale: “Tra il 1970 e il 2017 l'estrazione di materiali a livello mondiale è triplicata ed è in continua crescita, costituendo fonte di gravi rischi a livello globale. Circa la metà delle emissioni totali di gas a effetto serra e più del 90% della perdita di biodiversità e dello stress idrico sono determinati dall'estrazione di risorse e dai processi di trasformazione di materiali, combustibili e alimenti. Benché abbia iniziato la transizione, l'industria dell'UE contribuisce tuttavia ancora al 20% delle emissioni di gas a effetto serra dell'UE. Essa è ancora troppo "lineare" e dipende dal flusso di nuovi materiali estratti, scambiati e trasformati in merci e, infine, smaltiti come rifiuti o emissioni. Soltanto il 12% dei materiali utilizzati proviene dal riciclaggio.” (Commissione Europea, 2019).

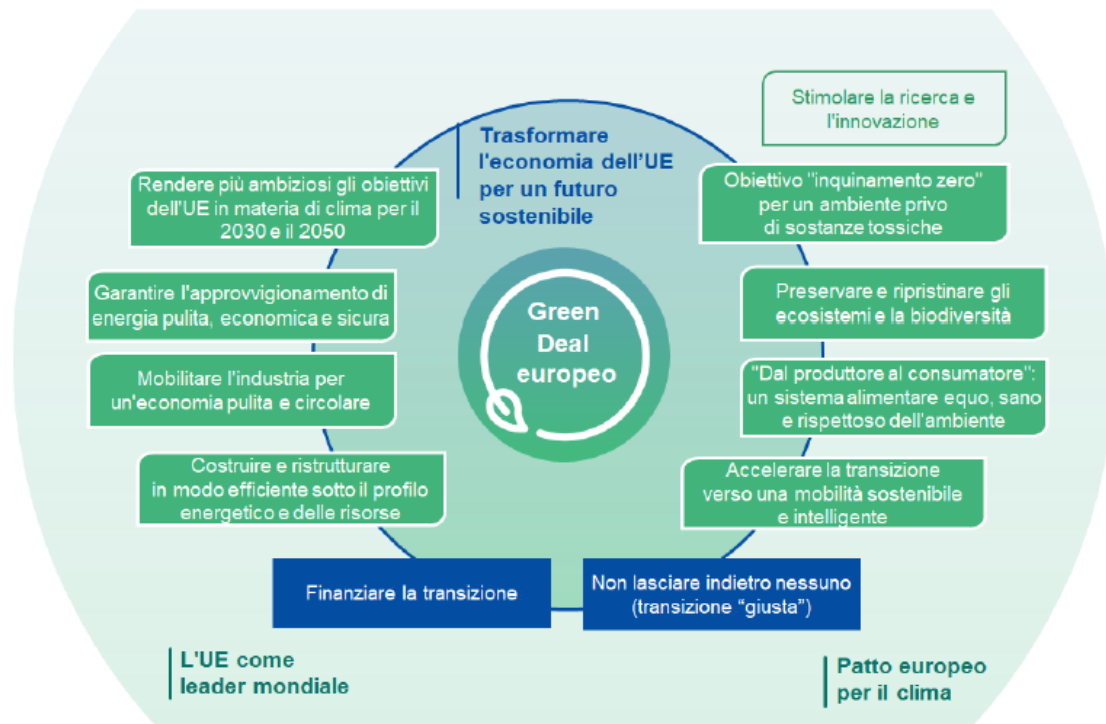


Figura 5. Il Green Deal europeo (Commissione Europea, 2019).

Il nuovo piano d'azione per l'economia circolare traccia le linee guida per accelerare la trasformazione richiesta dal Green Deal Europeo, proseguendo le azioni per l'economia circolare implementate fin dal 2015 e aggiornate con la Direttiva 2018/851, che modifica la WFD del 2008 (Commissione Europea, 2015; 2018). In particolare, la Direttiva 2018/851 chiarisce i criteri dell'*end-of-waste*, ovvero le condizioni per cui un rifiuto cessa di essere tale, sancendo che: "La persona fisica o giuridica che: a) utilizza, per la prima volta, un materiale che ha cessato di essere considerato rifiuto e che non è stato immesso sul mercato; o b) immette un materiale sul mercato per la prima volta dopo che cessa di essere considerato un rifiuto, provvede affinché il materiale soddisfi i pertinenti requisiti ai sensi della normativa applicabile in materia di sostanze chimiche e prodotti collegati. Le condizioni di cui al paragrafo 1 devono essere soddisfatte prima che la normativa sulle sostanze chimiche e sui prodotti si applichi al materiale che ha cessato di essere considerato un rifiuto". Inoltre, tale direttiva sottolinea l'importanza di monitorare lo sviluppo dei criteri nazionali dell'*end-of-waste* negli stati membri e individua la necessità di stabilire criteri comuni a livello europeo (Commissione Europea, 2018).

Di fatto, la transizione ad un'economia circolare può avvenire solo se l'energia e le materie prime provengono da fonti rinnovabili. Questo richiede lo sviluppo di tecnologie di trattamento dei flussi di scarto ricchi di sostanze biodegradabili che siano in grado di ricavarne composti chimici e bioenergia, adottando l'approccio della bioraffineria, definita come "la trasformazione sostenibile della biomassa in una gamma di prodotti commercializzabili e in energia" (Atasoy et al., 2018; de Jong&Jungmeier, 2015; Lindorfer et al., 2019). La scelta migliore dal punto di vista della sostenibilità è la bioraffineria di terza generazione, che utilizza un'ampia varietà di biomassa

residua, come quella agricola, il letame, la frazione organica dei rifiuti solidi urbani (FORSU), gli scarti alimentari, gli scarti agroindustriali, gli scarti mercatali e i fanghi di depurazione (Jambo et al., 2016), questi ultimi due utilizzati nel presente lavoro di tesi. La bioraffineria di terza generazione è una struttura molto promettente che, combinando diversi substrati e processi, si stima che potrebbe soddisfare una buona parte della domanda europea di composti chimici, energia e materiali entro il 2030, e precisamente si prevede che (Strazzera, 2020):

- la produzione del 30% dei composti chimici avverrà a partire da composti a base biologica. Per i composti chimici ad alto valore aggiunto e per i polimeri, la percentuale potrebbe raddoppiare;
- il 25% dell'energia necessaria per il settore europeo dei trasporti sarà fornita dai biocarburanti;
- Il 30% del calore e dell'energia generati in Europa proverranno dalle biomasse.

Il primo processo di trasformazione della biomassa residua in una bioraffineria di terza generazione consiste nella bioconversione ad acidi carbossilici a catena corta, che fungono da intermediari per la produzione di bioenergia e di composti chimici (Lindorfer et al., 2019). Tra questi, gli acidi grassi volatili (AGV) sono la classe di composti più importante.

### **1.3 Produzione di acidi grassi volatili**

Gli acidi grassi volatili (AGV) sono composti alifatici monocarbossilati a catena corta lineare, costituiti da catene carboniose sature con un numero di atomi di carbonio che va da due (acido acetico) a sei (acido esanoico) (Strazzera et al., 2018). Gli AGV hanno moltissime applicazioni nell'industria alimentare, cosmetica, tessile, bioenergetica e farmaceutica (Bhatia & Yang, 2017). I gruppi funzionali degli AGV li rendono estremamente utili per l'industria chimica, specialmente nell'ottica di implementazione della bioraffineria: gli acidi carbossilici sono i precursori di composti chimici ridotti e dei loro derivati (esteri, chetoni, aldeidi, alcoli e alcani) nella chimica organica tradizionale e sono substrati adatti per la produzione di biopolimeri, come i poli-idrossi-alcanoati (PHA) e di biocarburanti quali metano ed idrogeno (Battista et al., 2020; Strazzera et al., 2018).

Esistono diversi tipi di AGV, ciascuno con proprietà e applicazioni diverse, tra cui gli acidi formico, etanoico (acetico), propanoico (propionico), butanoico (butirrico), pentanoico (valerico), 2-idrossipropanoico (lattico) ed esanoico (caproico). Complessivamente, il mercato globale degli AGV ha una dimensione di oltre 13 milioni di tonnellate/anno ed un valore di mercato di oltre 8 miliardi di dollari (Kim et al., 2018). Tra questi, i più richiesti sul mercato sono illustrati in tabella 1. Il mercato globale degli acidi acetico, propionico e butirrico raggiungerà le 18500 kilotonnellate entro il 2020, che includono, con un tasso annuo di crescita composto (CAGR) del 4,27%, 18296,90 kilotonnellate di acido butirrico entro il 2023 (Mordor Intelligence, 2018); con un CAGR

del 15,1%, 105 kilotonnellate di acido butirrico entro il 2020 (Marketsandmarkets, 2018) e, con un CAGR del 2,7%, 470 kilotonnellate di acido propionico entro il 2020 (Research Grand View, 2018).

Tabella 1. AGV più richiesti dal mercato, le maggiori compagnie coinvolte nel loro business e principali applicazioni dei composti derivati.

AGV	Compagnie coinvolte nel business degli AGV (Bhatia & Yang, 2017)	Composti chimici derivati dagli AGV e applicazione
<p><b>Acido acetico</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Dimensioni del mercato globale: 12,1x10<sup>6</sup> ton/yr (2014)</li> <li>• Prezzo: 0,55\$/kg (2014)</li> <li>• Tasso di crescita: 4-5% annuo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hoechst Celanese (Irving, Texas US)</li> <li>• Monsanto Co. (Texas)</li> <li>• BP Chemicals (Hull, UK)</li> <li>• Samsung-BP (Ulsan, South Korea)</li> <li>• BP Petronas (Kertih, Malaysia)</li> <li>• Shandong Hualu Hengsheng Chemical Co. Ltd (China)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aceto: l'acido acetico al 5-20% viene utilizzato come condimento per conservare i cibi (Budiman et al., 2016)</li> <li>• Etilacetato: utilizzato nell'industria cosmetica come profumo e come solvente per l'inchiostro (Bhatia &amp; Yang, 2017)</li> <li>• Polivinilacetato: utilizzato nell'industria tessile per produrre fibre acriliche (Pal &amp; Nayak, 2017)</li> <li>• Butilacetato: solvente per l'inchiostro (Bhatia &amp; Yang, 2017)</li> <li>• Propilacetato: solvente per l'inchiostro (Bhatia &amp; Yang, 2017)</li> <li>• Acetato di calcio e magnesio: decongelante (Todd &amp; Walters, 1990)</li> <li>• Altre applicazioni: sintesi di pesticidi, di gomme e plastiche; patinatura della carta (Kim et al., 2018)</li> </ul>
<p><b>Acido propionico</b> (Kim et al., 2018):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Dimensioni del mercato globale: 3,9x10<sup>5</sup> ton/yr (2013)</li> <li>• Prezzo: 1,36 \$/kg (2007)</li> <li>• Tasso di crescita: 4% annuo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Chemische Werke Hu'ls (Germany)</li> <li>• Distillers Company (Britain), USSR (Russia)</li> <li>• Celanese Chemical Company (US)</li> <li>• And Eastman Chemical (US)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acido propionico: conservazione dei cibi; inibisce la crescita di <i>Aspergillus flavus</i>, dei <i>Bacillus</i> aerobi, di <i>Salmonella</i> e dei lieviti (Balamurugan et al., 1999)</li> <li>• 2,2-dicloropropionato di sodio: sintesi di erbicidi (Bhatia &amp; Yang, 2017; Kumar &amp; Babu, 2006)</li> <li>• Etere propionico e benzil propionato: intermedio di profumi (Kumar &amp; Babu, 2006)</li> <li>• Anidride propionica e acido cloropropionico: intermedi farmaceutici (Kumar &amp; Babu, 2006)</li> <li>• Altre applicazioni: sintesi della vitamina E e di solventi ecocompatibili per rivestimenti (Moresi &amp; Parente, 2014)</li> </ul>
<p><b>Acido butirrico</b> (Kim et al., 2018):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Dimensioni del</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Polymer Plastics Company, LC (Carson city USA)</li> <li>• Rotuba (Linden)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acido butirrico: previene la colonizzazione da <i>Salmonella</i> nel pollame (Van Immerseel et al., 2005); utilizzato come agente</li> </ul>



<p>mercato globale: 1,2x10<sup>5</sup> ton/yr (2014)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Prezzo: 1-1,5 \$/kg (2014)</li> <li>• Tasso di crescita: 14% annuo</li> </ul>	<p>USA)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Finoric LLC (Houston &amp; Midland, Texas USA)</li> <li>• Jiangsu Ruijia Chemistry Co., Ltd (China)</li> </ul>	<p>antisommossa per il suo odore sgradevole (Bhatia &amp; Yang, 2017)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Metilbutirrato: agente aromatizzante</li> <li>• Butirrato e suoi derivati con cellulosa e acetato: produzione di fibre e materiali plastici (Zigová &amp; Šturdík, 2000).</li> <li>• Etilbutirrato e butilbutirrato: precursori per la produzione di biocarburanti (Bhatia &amp; Yang, 2017)</li> <li>• Precursore nella sintesi di vari farmaci utilizzati nel trattamento del cancro e delle emoglobinopatie (Celasco et al., 2014)</li> <li>• Altre applicazioni: integratore e antibiotico nella nutrizione animale (Jiang et al., 2018)</li> </ul>
<p><b>Acido isobutirrico</b> (Kim et al., 2018):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Dimensioni del mercato globale: 5x10<sup>4</sup> ton/yr (2017).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eastman Chemical Company (Kingsport USA),</li> <li>• Jayshree Aromatics Pvt Ltd (Gujrat, India),</li> <li>• Fooding group Ltd (Shanghai China)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Metil isobutirrato ed etil isobutirrato: aroma fruttato nei succhi di frutta (Bhatia &amp; Yang, 2017)</li> <li>• Metacrilato: precursore del polimetacrilato, un biomateriale (Zhang et al., 2011)</li> <li>• Saccarosio di isobutirrato acetato: emulsionante per inchiostro da stampa (Zhang et al., 2011)</li> <li>• Isobutil isobutirrato: materiale di copertura per substrati plastici (Verardi et al., 1997)</li> </ul>
<p><b>Acido isovalerico</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Dimensioni del mercato globale: N.D. (2017).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Elan Chemical Company Inc. (Newark USA),</li> <li>• CTC Organics (Ellenwood USA),</li> <li>• Inoue Perfumery MFG. Co. Ltd (Okusawa Tokya)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mentil isovalerato, metil isovalerato ed etil isovalerato: aromatizzanti nei cibi (Bhatia &amp; Yang, 2017)</li> <li>• Metil isovalerato ed etil isovalerato: utilizzati in ambito farmaceutico per la loro attività spasmolitica (Suerbaev et al., 2014)</li> </ul>
<p><b>Acido lattico</b> (Kim et al., 2018):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Dimensioni del mercato globale: 7.1 x10<sup>5</sup> ton/yr (2013)</li> <li>• Prezzo: 1.3-1.6 \$/kg (2013)</li> <li>• Tasso di crescita: 15.5% annuo</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acido-L-lattico: emulsionanti, polimeri biodegradabili, usato in medicina come antisettico e antifermentativo (Kim et al., 2018)</li> <li>• Poli-L-lattati: regolatori di crescita delle piante (Kim et al., 2018)</li> <li>• Etil lattato: solvente biodegradabile (Kim et al., 2018)</li> </ul>

Come suggerisce questo sintetico elenco, gli AGV sono i precursori di moltissimi composti ad alto valore aggiunto, motivo per cui l'interesse nella loro produzione sta continuando a crescere (Kim et al., 2018). Infatti, gli AGV possono subire processi di esterificazione, riduzione e chetonizzazione che li convertono in carbonili, esteri, alcoli e alcheni per la produzione di carburanti e solventi, come indicato in figura 6 (Aglar et al., 2011). Inoltre, possono essere utilizzati come composti di partenza per vari processi biologici, tra cui principalmente la produzione di bioenergia, la rimozione biologica dei nutrienti nel processo di depurazione delle acque reflue e la sintesi di biopolimeri (Strazzera et al., 2018).

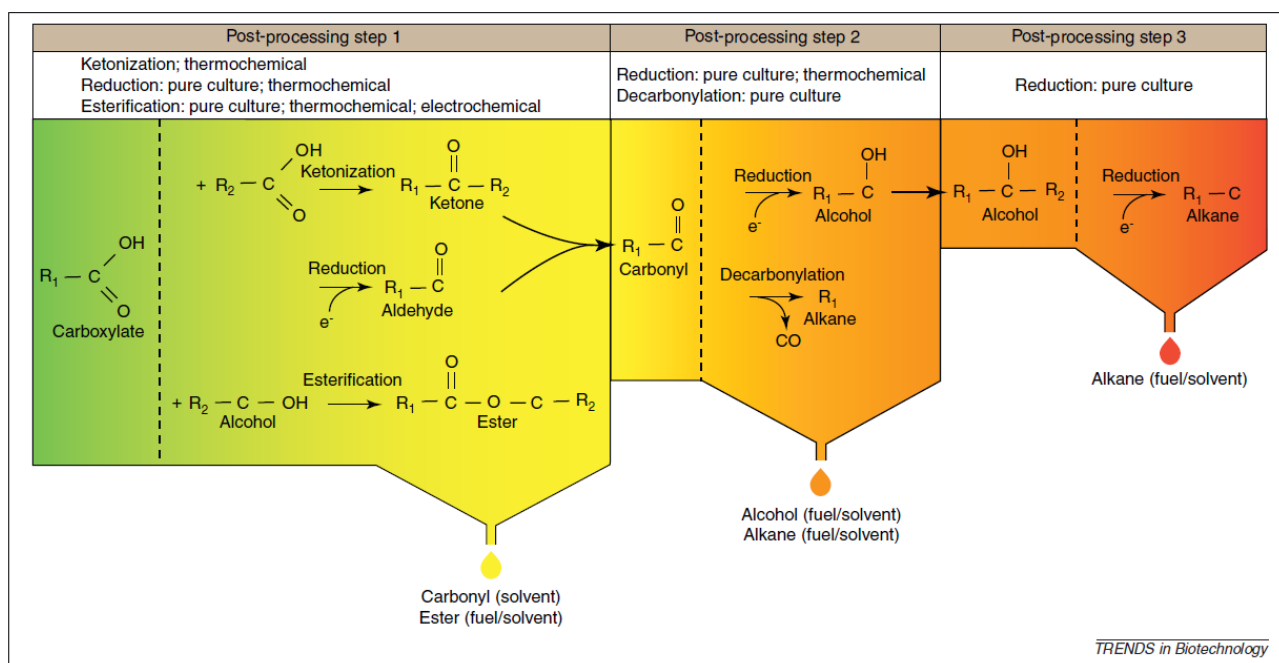


Figura 6. Processi chimici di conversione dei carbossilati, tra cui gli AGV, in combustibili o solventi attraverso passaggi biochimici in coltura pura, elettrochimici o termochimici (Aglar et al., 2011).

La produzione degli AGV può avvenire per via sintetica da composti petrolchimici oppure per via biologica attraverso il processo di fermentazione. Attualmente, la domanda di AGV è soddisfatta per il 90% attraverso la sintesi da composti petrolchimici, che ha costi significativamente inferiori (Atasoy et al., 2018). Tuttavia, questo tipo di processo ha impatti ambientali notevoli: infatti, genera emissioni di gas serra, richiede grandi quantità di composti chimici e di energia e produce molti rifiuti e acque reflue sia durante la produzione che a valle di essa. Tali impatti, insieme all'esaurimento imminente delle fonti di petrolio, rendono indispensabile il passaggio alla produzione di AGV mediante processi biologici, che permetterebbe l'utilizzo di fonti di carbonio rinnovabili come materia prima, aumentando la sostenibilità del processo sia dal punto di vista ambientale che economico (Atasoy et al., 2018; Bhatia & Yang, 2017; Sarkar et al., 2016). A questo si aggiunge il fatto che spesso i consumatori sono disposti a pagare un prezzo maggiore

per i beni prodotti attraverso processi biologici, facilitandone così l'immissione sul mercato (Baumann & Westermann, 2016).

La produzione degli AGV attraverso la via fermentativa è stata sperimentata utilizzando varie fonti di carbonio come substrato. Tra queste, gli zuccheri puri (glucosio, xilosio etc.) consentono di ottenere una produttività alta con pochi prodotti collaterali, ma tale vantaggio viene annullato dal costo della materia prima (Feng et al., 2010; Zhu & Yang, 2004). Per questo, la ricerca si è concentrata sulla produzione di VFA da biomasse di scarto, tra cui gli scarti alimentari (Arras et al., 2019; Greses et al., 2020; Cheah et al., 2019; Dahiya & Mohan, 2019; Jiang et al., 2013; Yin et al., 2016a) e i fanghi di depurazione (Jankowska et al., 2015), spesso in codigestione (Moretto et al., 2019). Tradizionalmente si utilizzano colture pure di specifici ceppi di batteri, che permettono di ottenere rese alte (Bhatia & Yang, 2017). Nonostante ciò, la ricerca si è indirizzata verso la fermentazione mediante colture microbiche miste, che pur avendo rese inferiori è particolarmente vantaggiosa perché non richiede condizioni sterili e riduce il rischio di contaminazione (Bhatia & Yang, 2017). Inoltre, le colture microbiche miste permettono di utilizzare come substrato le biomasse di scarto, tra cui i due principali flussi di rifiuti del metabolismo urbano: gli scarti alimentari e i fanghi derivanti dalla depurazione delle acque reflue (Jankowska et al., 2015; Moretto et al., 2019; 2020b). Infatti, la capacità di metabolizzare un ampio spettro di molecole organiche permette a questo tipo di comunità batterica di utilizzare substrati complessi come gli scarti alimentari, composti da carboidrati, lipidi e proteine (Jankowska et al., 2015). Questo permette di eliminare il costo della materia prima, che rappresenta un passo fondamentale nel rendere economicamente competitivi gli AGV prodotti attraverso la via fermentativa. Inoltre, è indispensabile migliorare la resa di AGV ottimizzando i parametri di processo e le condizioni operative.

#### **1.4 Il processo di digestione anaerobica**

La digestione anaerobica è un processo biologico attraverso cui la sostanza organica viene degradata in assenza di ossigeno molecolare ( $O_2$ ) o legato ad altri elementi, come i nitrati ( $NO_2^-$ ,  $NO_3^-$ ), ad opera di numerosi ceppi batterici che vivono in simbiosi (Lim & Wang, 2013; APAT, 2005). I prodotti principali sono il biogas, composto in media dal 65% di metano ( $CH_4$ ) e dal 35% di anidride carbonica ( $CO_2$ ), e il digestato (APAT, 2005; Zabranska&Pokorna, 2018). La digestione anaerobica consiste in quattro processi biochimici che avvengono in sequenza, schematizzati in figura 7: idrolisi, acidogenesi, acetogenesi e metanogenesi (APAT, 2005). La produzione degli AGV per via biologica avviene attraverso le prime tre fasi, che costituiscono il processo fermentativo. Al contrario della fase metanogenetica, la fase fermentativa non richiede condizioni strettamente anaerobiche.

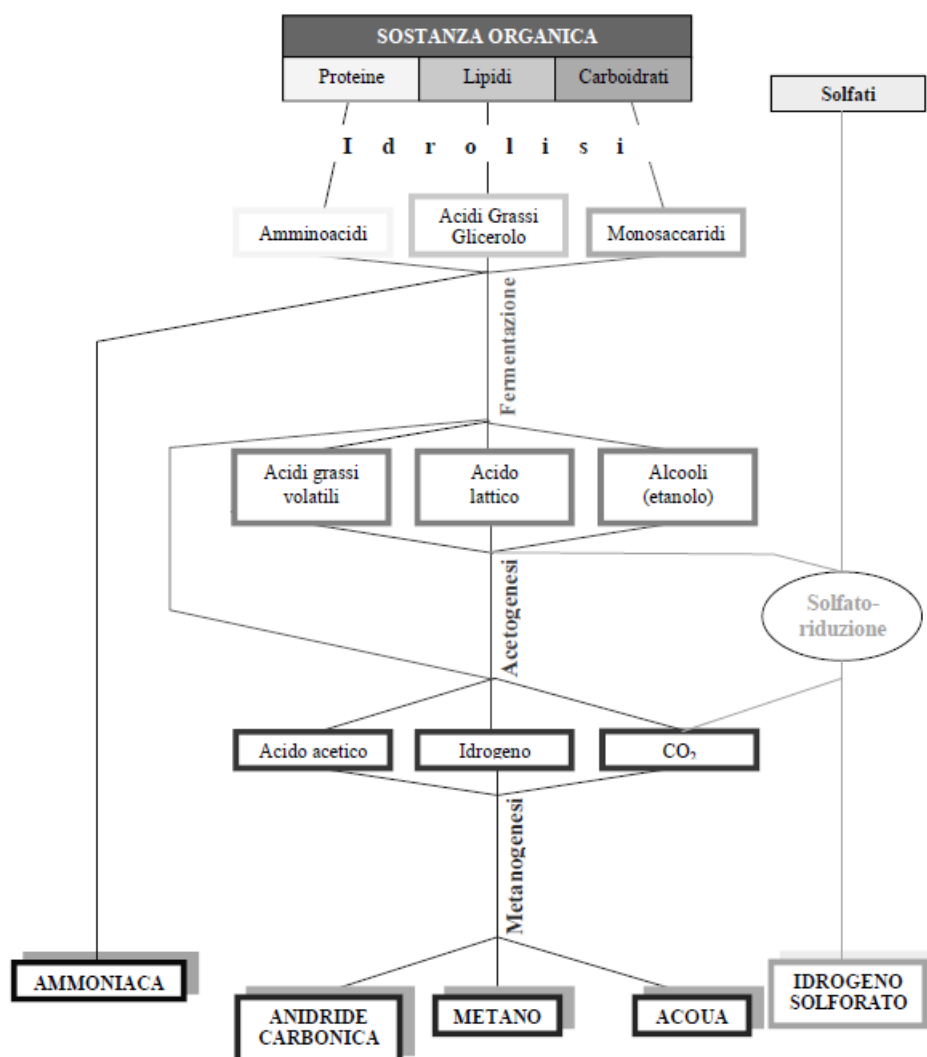


Figura 7. Diagramma complesso delle fasi coinvolte nella digestione anaerobica. Modificato da Gujer&Zehnder (1983).

L'equilibrio tra le diverse fasi della bioconversione è fondamentale perché il processo sia efficiente ed è influenzato da vari fattori tra cui la temperatura, il pH, l'alcalinità e la concentrazione e la biodisponibilità di micro e macronutrienti (Ahring et al., 2001; Conrad&Wetter, 1990; Demirel&Scherer, 2011; Ju et al., 2008).

L'attività biologica anaerobica avviene in un intervallo di temperatura compreso tra -5 e +70°C, ad opera di molte specie di microrganismi classificabili in base al loro intervallo termico ottimale di crescita (APAT, 2005):

- Psicrofili (T<20°C)
- Mesofili (20°C<T<40°C)
- Termofili (T>45°C).

Il passaggio da un regime di temperatura ad un altro determina una variazione sostanziale della comunità batterica. Infatti, come illustrato in figura 8, le cinetiche di crescita delle popolazioni batteriche presentano dei picchi in corrispondenza di intervalli di temperatura ben definiti e specie-specifici (APAT, 2005).

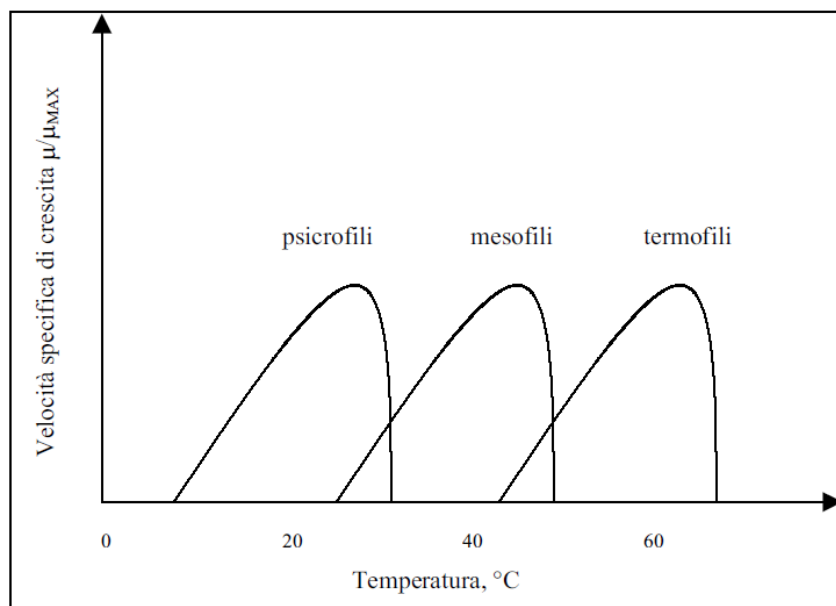


Figura 8. Influenza della temperatura sulla cinetica biologica (Brock, 2016).

Nella digestione anaerobica controllata, la temperatura viene mantenuta in uno di questi tre intervalli a seconda delle caratteristiche del substrato e del bilancio tra energia richiesta e resa di produzione del biogas (Cavinato, 2011). Dato che la crescita batterica e i processi di conversione sono più lenti a basse temperature, le condizioni psicrofile richiedono un tempo di ritenzione (HRT) maggiore e quindi volumi dei reattori maggiori, mentre in mesofilia i volumi necessari sono inferiori (Cavinato, 2011).

Il pH fornisce un'indicazione della stabilità del mezzo di reazione: per valori compresi tra 6.5 e 8 il processo è considerato stabile (Cavinato, 2011). L'alcalinità indica la capacità tamponante del sistema e la sua stabilità, fornendo una prima misura approssimativa della concentrazione di acidi grassi volatili (AGV) presenti nel mezzo (APAT, 2005).

I microrganismi responsabili della digestione anaerobica appartengono a quattro gruppi, che si differenziano sia per i substrati, sia per i prodotti del loro metabolismo: i batteri idrolitico-fermentativi, acetogenici proton-riduttori, metanogeni idrogenotrofi e metanogeni acetoclastici (APAT, 2005; Zabranska&Pokorna, 2018). La complessità del sistema anaerobico è dovuta proprio al fatto che alcune famiglie di microrganismi compiono solo alcuni dei processi biochimici che costituiscono la digestione anaerobica (APAT, 2005). L'associazione sintrofica implica che i cataboliti di ciascuno stadio rappresentino i metaboliti dello stadio successivo; per questo, l'interruzione di uno dei passaggi è sufficiente a bloccare l'intero processo (APAT, 2005).

L'industrializzazione biotecnologica di questo processo naturale ha permesso di implementare il passaggio dal concetto iniziale di stabilizzazione estensiva della sostanza organica in ambienti naturali ai processi industriali per la produzione di biogas (APAT, 2005). I substrati organici utilizzati sono gli scarti del metabolismo urbano ed industriale, quali le acque derivanti dall'industria agro-alimentare, i fanghi di supero degli impianti di trattamento acque reflue, le deiezioni animali, le biomasse di natura agricola, i residui organici industriali e la frazione organica dei rifiuti solidi urbani (FORSU) (APAT, 2005). Per questo, la digestione anaerobica può rivestire un ruolo fondamentale nella transizione ad un'economia circolare, obiettivo primario del *Green Deal* europeo (Commissione Europea, 2019).

#### **1.4.1 Idrolisi ed acidogenesi**

Il primo passaggio della digestione anaerobica è l'idrolisi, che consiste nella degradazione di substrati organici complessi quali proteine, grassi e carboidrati, particolati o solubili, in composti semplici, quali amminoacidi, acidi grassi e monosaccaridi (APAT, 2005). L'idrolisi è la fase limitante per i substrati in forma particolata (Eastmann & Ferguson, 1981), che spesso subiscono un pretrattamento per aumentarne la biodisponibilità e quindi incrementare l'efficienza della digestione anaerobica (Lim & Wang, 2013; Yin et al., 2016a). Tale aspetto è tanto più rilevante quanto più è articolata la struttura del substrato da degradare.

I batteri idrolitici, responsabili di questa prima fase, secernono enzimi extracellulari che favoriscono la trasformazione delle macromolecole complesse in composti a struttura più semplice (Bastidas-Oyanedel, 2015). In particolare, i polisaccaridi solitamente vengono convertiti in zuccheri monomerici o dimerici. L'amido e la cellulosa vengono trasformati in glucosio, mentre l'emicellulosa è degradata a galattosio, arabinosio, xilosio, mannosio e glucosio. Le proteine sono scisse in amminoacidi, piccoli peptidi, ammoniaca ( $\text{NH}_3$ ) e  $\text{CO}_2$  dalle proteasi. Le lipasi idrolizzano i lipidi trasformandoli in acidi grassi a catena corta e lunga e in glicerolo (Gerardi, 2003; Insam et al., 2010; Mitchell & Gu, 2010). I microrganismi idrolizzanti possono anche colonizzare il materiale particolato e degradarlo (Vavilin et al., 1996). Infine, gli oligomeri e i monomeri così ottenuti sono disponibili per il trasporto all'interno delle cellule dei microrganismi acidogenici fermentanti (APAT, 2005). Il processo fermentativo acidogenico avviene ad opera di questi ultimi, che ossidano i substrati organici semplici a piruvato, che viene poi trasformato in acidi grassi volatili, perlopiù a catena corta (propionico e butirrico), alcoli, chetoni ed ammoniaca (APAT, 2005). La produzione di acidi provoca un abbassamento del pH, che deve essere costantemente monitorato per evitare l'inibizione dei microrganismi responsabili delle fasi successive (Sun et al., 2020).

#### **1.4.2 Acetogenesi**

I substrati generati nella fase di idrolisi ed acidogenesi vengono trasformati dai batteri acetogeni in acido acetico, acido formico,  $\text{CO}_2$  ed idrogeno molecolare ( $\text{H}_2$ ) (APAT, 2005). Secondo Angelidaki et al (1998), bisogna considerare due diversi meccanismi a seconda che la degradazione avvenga

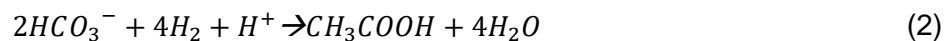
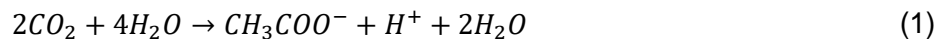
a partire da acidi grassi a catena lunga (LCFA, *long chain fatty acids*) o da acidi grassi a catena corta (SCFA, *short chain fatty acids* o VFA, *volatile fatty acids*).

L'acetogenesi avviene principalmente attraverso due diverse reazioni biochimiche:

- Metabolismo ossidativo dei prodotti organici dell'idrolisi
- Respirazione del bicarbonato

Nel primo caso, i batteri acetogeni necessitano dei batteri metanogeni idrogenotrofi, che sono in grado di ossidare H<sub>2</sub>, perché l'ossidazione dei prodotti organici dell'idrolisi è termodinamicamente favorevole solo in presenza di reazioni che utilizzino H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> per produrre metano (CH<sub>4</sub>) (Angelidaki et al., 1998; APAT; 2005). Per questo, la pressione parziale dell'idrogeno all'interno del reattore può influire significativamente sull'andamento della digestione: se è elevata, la produzione di acido propionico e di acido butirrico è favorita a scapito della sintesi di acido acetico, riducendo così la produzione di metano (Angelidaki et al., 1998).

La seconda reazione di formazione dell'acido acetico avviene ad opera di batteri autotrofi, che consumano CO<sub>2</sub> ed H<sub>2</sub> attraverso le seguenti reazioni (Eq. 1 e 2):



Tale reazione consuma idrogeno, determinando un calo della pressione parziale del gas e favorendo quindi la produzione di acido acetico attraverso il metabolismo ossidativo dei prodotti dell'idrolisi (Bastidas-Oyanedel et al., 2015).

### 1.4.3 Metanogenesi

La catena trofica anaerobica si conclude con la produzione di metano, l'unico composto non reattivo dell'intero processo di digestione anaerobica, che pertanto ne costituisce il prodotto finale (APAT, 2005).

La metanogenesi avviene ad opera di microrganismi metanogeni appartenenti al regno degli *Archaea*, la cui tassonomia è illustrata in figura 9 (Zabranska&Pokorna, 2018).

Domain	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species			
Archaea	Methanogenic archaea	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	<i>Methanobacterium</i>	<i>Methanobacterium formicicum</i>			
						<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>			
						<i>Methanobacterium bryantii</i>			
					<i>Methanobrevibacter</i>	<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>			
						<i>Methanobrevibacter arboriphilus</i>			
						<i>Methanobrevibacter smithii</i> (formly)			
						<i>Methanobacterium ruminantium</i>			
						<i>Methanosphaera</i>			
					Methanococci	Methanococcales	Methanothermaceae	<i>Methanothermobacter</i>	
								<i>Methanothermus</i>	
		<i>Methanocaldococcus</i>	<i>Methanocaldococcus infernus</i>						
		<i>Methanotorris</i>							
		<i>Methanococcus</i>	<i>Methanococcus vannielli</i> <i>Methanococcus voltae</i>						
		<i>Methanothermococcus</i>							
		Methanomicrobia	Methanocellales	Methanocellaceae			<i>Methanocorpusculum</i>		
				Methanocorpusculaceae			<i>Methanomicrobium</i>	<i>Methanomicrobium mobile</i>	
				Methanomicrobiaceae			<i>Methanoculleus</i>		
							<i>Methanofolius</i>		
					<i>Methanogenium</i>				
			Methanosarcinales		Methanoregulaceae				
	Methanospirillaceae			<i>Methanospirillum</i>	<i>Methanospirillum hungatei</i>				
	Methanosarcinaceae			<i>Methanosarcina</i>	<i>Methanosarcina barkeri</i> <i>Methanosarcina mazei</i> <i>Methanosarcina acetivorans</i>				
				<i>Methanococcoides</i>					
				<i>Methanohalobium</i> <i>Methanohalophilus</i> <i>Methanolobus</i> <i>Methanomethylovorans</i> <i>Methanomicrococcus</i> <i>Methanosalsum</i> <i>Methanosaeta</i>					
Methanopyri	Methanopyrales	Methanosetaeaceae	<i>Methanosaeta</i>	<i>Methanothermococcus okinawensis</i>					
		Methanothermococcaceae							
		Methanopyraceae							

Figura 9. Tassonomia degli *Archaea* metanogeni (Demirel&Scherer, 2008; Ferry&Kastead, 2007).

I diversi tipi di batteri metanogeni sono in grado di metabolizzare solo alcuni tipi di substrato seguendo tre vie metaboliche: idrogenotrofa, acetoclastica e metilotrofa (Zabranska&Pokorna, 2018). Solo *Methanosarcina* spp., genere peraltro morfologicamente molto vario, è in grado di utilizzare fino a 9 diversi substrati (Galagan, 2002).

### La via idrogenotrofa

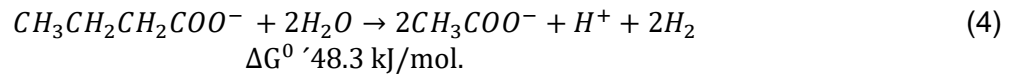
La conversione di CO<sub>2</sub> ed H<sub>2</sub> a CH<sub>4</sub> avviene mediante la via idrogenotrofa attraverso il ciclo di Wolfe, in cui l'idrogeno funge da donatore di elettroni insieme all'acido formico e ad alcuni alcoli (Thauer, 2012). La reazione semplificata è la seguente:



I metanogeni idrogenotrofi sono noti da tempo come componenti di tutte le comunità microbiche dei digestori anaerobici studiate finora (Zabranska & Pokorna, 2018). La loro attività è fondamentale per la stabilità dell'intero processo di digestione anaerobica. Infatti, mantengono la concentrazione di H<sub>2</sub> ad un livello tale da stabilizzare l'acetogenesi (inferiore a 5.28 Pa in



condizioni standard), che avviene ad opera di microrganismi sensibili ad elevate concentrazioni di H<sub>2</sub> secondo l'equazione seguente (Zabranska & Pokorna, 2018):



### La via acetoclastica

La via metabolica acetoclastica consiste nella metabolizzazione dell'acido acetico a metano e anidride carbonica secondo la seguente reazione (Zabranska&Pokorna, 2018):

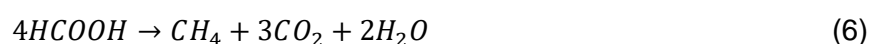


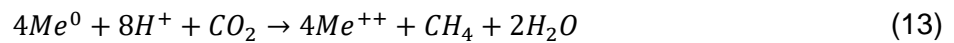
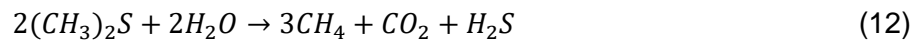
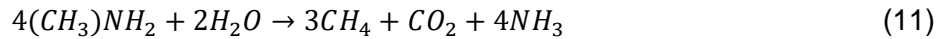
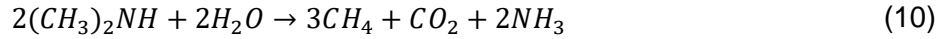
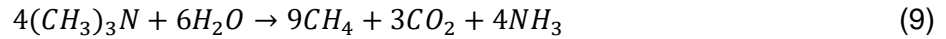
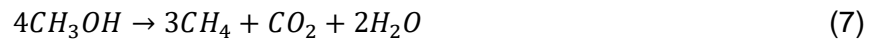
I microrganismi acetoclastici più abbondanti appartengono alle famiglie delle *Methanosarcinaceae* e delle *Methanosaetaceae*. Le *Methanosarcinaceae* predominano ad alte concentrazioni di NH<sub>3</sub> e AGV, ad esempio nei digestori di reflui zootecnici, dove si trovano spesso sotto forma di ammassi irregolari che li proteggono dalle condizioni ambientali sfavorevoli (El-Mashad et al., 2004). Le *Methanosaetaceae*, invece, sono molto più sensibili a tali composti e prevalgono a basse concentrazioni di acido acetico, nei digestori dei fanghi di depurazione e nei fanghi granulari (Karakashev et al., 2005; Shin et al., 2001; Zheng et al., 2000).

*Methanosarcinaceae* e *Methanosaetaceae* sono adattate a condizioni termiche diverse: le prime sono dominanti in condizioni termofile, in cui le seconde non sono mai state osservate (Demirel&Scherer, 2008). La fase operativa del reattore è un altro fattore che determina la tipologia di microrganismi acetoclastici presenti: le *Methanosarcinaceae* prevalgono in condizioni di instabilità, ad esempio nella fase di avviamento di un reattore, al contrario delle *Methanosaetaceae* che prediligono condizioni in cui il processo ha raggiunto la stabilità (Angenent et al., 2002; McMahon et al., 2001; Yu et al., 2005; Demirel&Scherer, 2008).

### La via metilotrofa

La recente determinazione del metodo di conservazione dell'energia e dei flussi di elettroni nelle colture di metanogeni idrogenotrofi ha permesso di identificare i metanogeni metilotrofi (Costa&Leigh, 2014). I microrganismi metilotrofi metabolizzano i substrati C<sub>1</sub> come metanolo, acido formico, metilammine, metilsolfuri ed etanolammine metilate (Watkins et al., 2012). I principali composti chimici di partenza vengono trasformati in CH<sub>4</sub> attraverso le reazioni 6-13 (Demirel&Scherer, 2008):





## 1.5 La cavitazione

La cavitazione è un fenomeno consistente nella formazione di zone di vapore in un fluido omogeneo, che implodono producendo un rumore caratteristico (Franc & Michel, 2005). Per comprendere tale fenomeno, è opportuno analizzarlo insieme all'altro processo con cui un liquido passa alla fase vapore, l'ebollizione.

### 1.5.1 Il passaggio di stato liquido-aeriforme

Un liquido può passare allo stato aeriforme in due modi (figura 10): a pressione costante, raggiungendo la temperatura di ebollizione, o a temperatura costante abbassando la pressione fino a quella di vapore saturo (Chang&Goldsby, 2015). La pressione di vapore saturo è la pressione esercitata dalla fase aeriforme sulla fase condensata (solida o liquida) della stessa sostanza quando tali fasi sono in equilibrio termodinamico tra loro, ovvero quando il numero di particelle che passano allo stato aeriforme è uguale a quello delle particelle che passano alla fase liquida (Chang&Goldsby, 2015).

### 1.5.2 Definizione di ebollizione

L'ebollizione consiste nel passaggio dallo stato liquido allo stato aeriforme in seguito al riscaldamento del liquido, che aumenta gradualmente lo stato di eccitazione delle sue particelle fino al raggiungimento della temperatura di ebollizione, ovvero la temperatura alla quale la tensione di vapore di un liquido è uguale alla pressione esterna (Chang&Goldsby, 2015). Per definizione, dunque, al variare della pressione esterna varia la temperatura di ebollizione: per ogni temperatura esiste un diverso valore di tensione di vapore, il cui andamento è crescente con la temperatura (Chang&Goldsby, 2015).

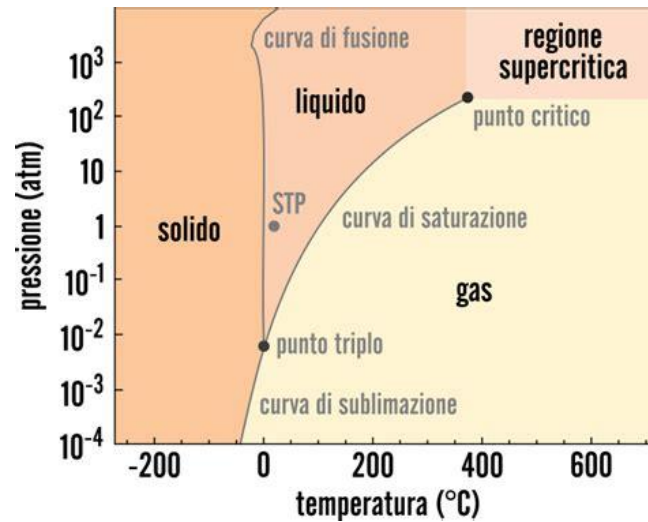


Figura 10. Diagramma di stato dell'acqua. Immagine tratta da [Diagramma di stato dell'acqua \(youmath.it\)](http://youmath.it)

### 1.5.3 Definizione di cavitazione

A temperatura costante, la diminuzione della pressione di un liquido fino a raggiungere la sua tensione di vapore determina la formazione di microbolle o cavità di vapore. Le bolle si generano in una regione di fluido a bassa pressione e crescono fino a raggiungere un diametro massimo in condizioni di espansione isoterma, come illustrato in figura 11 (Carpenter et al., 2017). Quando si trovano in una zona di fluido a pressione maggiore di quella della zona di formazione implodono violentemente formando un microambiente estremamente reattivo detto *hot spot*, in cui vengono raggiunte temperature dell'ordine dei 10000 K, pressioni dell'ordine dei GPa (Dular et al., 2016), sforzi di taglio (Badve, Bhagat & Pandit, 2015), onde di pressione e microgetti ad alta velocità (Carpenter et al., 2017).

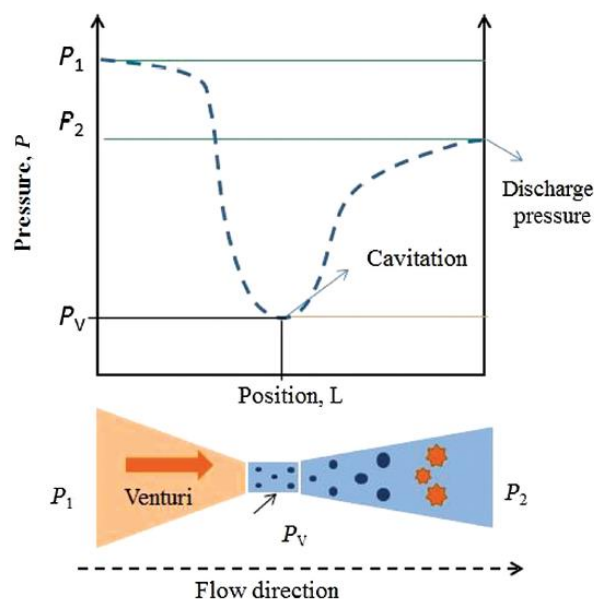


Figura 11. Variazione della pressione e condizioni di flusso in uno strumento per la cavitazione (tubo Venturi) (Carpenter et al., 2017).

I microgetti si generano dalle bolle situate in prossimità di pareti solide, che causano un collasso asimmetrico della bolla (figura 12). La parte della bolla che si trova più lontana dalla parete viene spinta all'interno della bolla stessa e fuoriesce dal lato opposto, generando un microgetto che impatta ad alta velocità sulla parete.

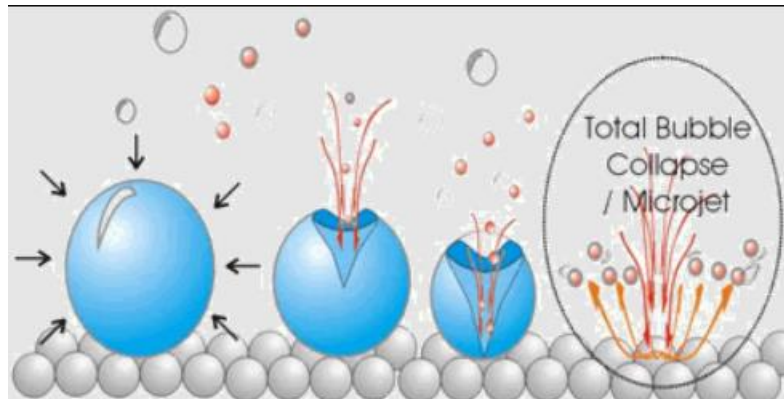


Figura 12. Formazione di un microgetto e impatto con la parete. Immagine tratta da [The Compton Group - research \(ox.ac.uk\)](http://www.comptonresearch.ox.ac.uk)

La dinamica delle bolle di cavitazione è complessa in quanto determinata da molti processi: la turbolenza diffusa, i cambiamenti di fase, gli scambi di calore che si verificano a diverse scale e che avvengono in diverse zone, come l'interfaccia con le superfici solide, l'interno del fluido e l'area in prossimità delle bolle (CNR, 2020). In sintesi, le principali trasformazioni sono le seguenti, sintetizzate anche in figura 13 (CNR, 2020):

- **All'interno delle bolle:** micro-pirolisi e migrazione delle sostanze idrofobiche;
- **All'interfaccia liquido-bolla:** ossidazione;
- **Intorno alle bolle:** effetti meccanici, microporosità, macinazione, rottura;
- **Nel liquido:** degassamento, riscaldamento volumetrico, turbolenza, aumento della massa e degli scambi di calore.

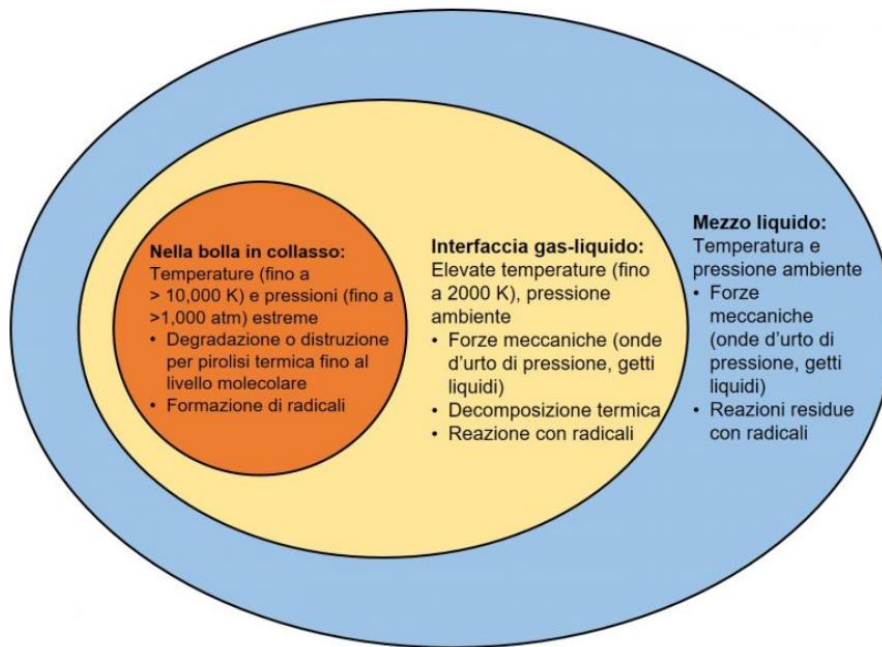


Figura 13. Sintesi dei fenomeni fisico-chimici che si verificano durante la cavitazione (CNR, 2020 adattato da Carpenter et al., 2017).

In passato, la cavitazione era conosciuta solo come un fenomeno poco desiderabile riscontrato nelle turbine, nelle pompe, nelle eliche delle navi e nelle valvole, dove può causare vibrazioni, rumore, erosione ed altri danni provocati dai microgetti (figura 14). Negli ultimi decenni è stata riscoperta per le sue potenzialità nell'efficiamento di processi fisici, chimici e biochimici (Carpenter et al., 2017).



Figura 14. Erosione dovuta alla cavitazione in una girante monocanale di un impianto di trattamento delle acque reflue (Thamsen et al., 2008).

#### 1.5.4 Tipologie di cavitazione

Si distinguono due tipologie di cavitazione, a seconda della modalità con cui viene abbassata la pressione del fluido:

- Cavitazione acustica
- Cavitazione idrodinamica.

#### Cavitazione idrodinamica

In questo lavoro di tesi è stata applicata la cavitazione idrodinamica, che avviene facendo passare il fluido attraverso un restringimento (un orifizio o un venturimetro) in modo da aumentarne la velocità e quindi abbassarne la pressione fino alla tensione di vapore (Davello, 2018). L'intensità del collasso delle bolle è minore rispetto alla cavitazione acustica, ma vengono generate più cavità (Carpenter et al., 2017).

L'intensità della cavitazione si esprime con il numero di cavitazione  $\sigma$  (Eq. 14) (Carpenter et al., 2017):

$$\sigma = \frac{P_2 - P_V}{\frac{1}{2} \rho v_0^2} \quad (14)$$

dove:

$P_2$ : pressione a valle del restringimento (Pa);

$P_V$ : tensione di vapore del fluido (Pa);

$\rho$  : densità del fluido ( $\text{kg/m}^3$ );

$v_0$ : velocità del fluido nel restringimento in m/s.

Tale espressione deriva dal teorema di Bernoulli. Considerando il flusso in un tubo venturi come quello rappresentato in figura 9, in assenza di cavitazione, secondo Bernoulli deve valere l'Eq. 15 (Davello, 2018):

$$z_0 + \frac{P_0}{\gamma} + \frac{v_0^2}{2g} = z_2 + \frac{P_2}{\gamma} + \frac{v_2^2}{2g} \quad (15)$$

dove il pedice "0" indica le quantità nella strozzatura ed il pedice "2" quelle a valle di essa.

I termini geodetici si possono elidere se si considerano due punti alla stessa quota e dato che la velocità del restringimento è molto più grande di quella a valle, l'Eq. 16 diventa:

$$\frac{P_0}{\gamma} + \frac{v_0^2}{2g} = \frac{P_2}{\gamma} \quad (16)$$

ovvero tutto il carico nella strozzatura è uguale alla pressione a valle.

Durante la cavitazione, parte dell'energia del fluido viene usata per produrre le bolle di vapore, quindi:

$$\frac{P_2}{\gamma} < \frac{P_0}{\gamma} + \frac{v_0^2}{2g} \quad (17)$$

dove  $P_0=P_V$  e dunque  $\sigma \leq 1$  (Badve et al., 2015).

Quando la velocità del fluido è molto elevata e la pressione molto bassa, una piccola bolla può espandersi fino a diventare una supercavità. La maggiore pressione del liquido circostante rispetto a quello della cavità spinge il liquido sotto la bolla, che nel frattempo si è dilatata nella direzione del flusso (Dular et al., 2016). In pratica, la cavità si estende a valle del restringimento che l'ha generata (orificio o gola del venturi) finché non viene risucchiata dal liquido, rimanendo sempre a contatto con la parete solida. A questo punto forma una bolla molto più grande e piena di vapore (Dular et al., 2016).

#### **1.5.5 Utilizzo della cavitazione nel pretrattamento delle matrici organiche**

La cavitazione, sia ultrasonica che idrodinamica, è stata sperimentata soprattutto per il pretrattamento dei fanghi attivi e delle acque reflue, mentre gli studi che la applicano agli scarti alimentari sono meno numerosi e testano solo la cavitazione ultrasonica. È stato condotto un solo studio su una miscela di fanghi attivi e della frazione organica dei rifiuti solidi urbani (FORSU), in cui il pretrattamento di cavitazione ultrasonica ha determinato un aumento del 60% nella rimozione di sCOD e del 24% nella resa di biometanazione nei test BMP in semi-continuo rispetto alla miscela non cavitata (Cesaro et al., 2012).

#### **Cavitazione dei fanghi attivi**

I fanghi attivi sono costituiti principalmente da biomassa, sostanze polimeriche extracellulari (EPS) ed acqua (Laspidou et al., 2002). La lisi delle cellule che compongono i fanghi attivi è difficoltosa e questo comporta lunghi tempi di ritenzione nella digestione anaerobica, che possono arrivare fino a 60 d (Metcalf, Eddy & Tchobanoglous, 1991; Lafitte-Trouqué et al., 2002). Per questo è opportuno pretrattarli, in modo da disgregare i fiocchi e rompere le membrane cellulari e quindi aumentare il tasso di idrolisi e la resa di biometanazione. Tali effetti sono stati ottenuti con la cavitazione, che sembra essere un pretrattamento promettente perché presenta costi e tempi ridotti, non richiede l'utilizzo di composti chimici, non produce altri rifiuti ed è un processo semplice da gestire (Bhat & Gogate, 2021). La cavitazione può essere ultrasonica o idrodinamica e, anche se la prima sembra raggiungere un maggior grado di solubilizzazione del fango ed è stata studiata più approfonditamente, la seconda garantisce un'efficienza energetica ed un potenziale di scalabilità maggiori, che rendono necessario studiare l'ottimizzazione del processo (Bhat & Gogate, 2021). La cavitazione determina cambiamenti fisici, chimici e biologici nei fanghi attivi, che devono essere misurati con parametri opportuni.

### ***Parametri fisici***

Dal punto di vista fisico, la cavitazione determina la riduzione delle dimensioni dei fiocchi dei fanghi attivi, rompendone quindi la stabilità strutturale. Tuttavia, finora le dimensioni dei fiocchi sono state considerate solo negli studi sulla cavitazione ultrasonica (UC), in cui è stato individuato un tempo di trattamento ottimale pari a 20 min (Mao et al., 2004) o, più recentemente, pari a 10 min (Li et al., 2016). La maggior parte degli studi sulla cavitazione idrodinamica (HC), invece, non hanno considerato la riduzione delle dimensioni dei fiocchi di fango, ma si sono concentrati sulle variazioni nel COD e nel potenziale di biometanazione. Nei pochi lavori in cui sono state misurate le dimensioni dei fiocchi, sono stati dimostrati effetti simili a quelli della sonocavitazione, con una riduzione pari al 30 % circa (Jung et al., 2014; Cai et al., 2018). In entrambi i tipi di cavitazione, la disgregazione dei fiocchi è più efficace se il loro diametro è superiore a 4,4-5  $\mu\text{m}$ , perché questo determina forze di legame più deboli (Nguyen et al., 2017).

La cavitazione determina anche una diminuzione della massa del fango dovuta alla solubilizzazione del contenuto organico, che si misura in termini di riduzione dei solidi disciolti o sospesi (TSS) nel fango o di aumento del COD solubile (sCOD) nella frazione liquida (Zhang et al., 2007). È stato osservato un rapporto lineare tra la diminuzione dei TSS e la durata della cavitazione, che conferma una lisi cellulare continua durante il pretrattamento (Zhang et al., 2007). L'energia richiesta per raggiungere la solubilizzazione massima varia tra i diversi studi, perché oltre che dai parametri della cavitazione dipende anche dalle proprietà del fango. Inoltre, non è ancora stato raggiunto un accordo su quale sia il parametro fondamentale tra TSS, TS e TVS. Alcuni studi sostengono che la riduzione del tempo di idrolisi e l'aumento della produzione di metano nel processo di digestione anaerobica richiedano una riduzione più consistente dei TVS, che quindi dovrebbero essere il parametro fondamentale (Erden & Filibeli, 2010; Salsabil et al., 2009), anche se la maggior parte degli studi riportano solo i valori dei TS.

### ***Parametri chimici***

Il contenuto organico e il materiale cellulare ed extracellulare inclusi gli EPS vengono disintegrati grazie agli effetti chimico-fisici della cavitazione e rilasciati nella frazione liquida, aumentando il sCOD del fango (Bougrier, Carrère & Delgenes, 2005). Pertanto, insieme alle dimensioni dei fiocchi dei fanghi attivi, il sCOD è un parametro fondamentale nel determinare l'efficienza del pretrattamento di cavitazione ed aumenta in tutti gli studi condotti, sia con HC che con UC. In particolare, Lee et al. (2013) ottengono un grado di disintegrazione del COD pari al 23,7% dopo 20 min di cavitazione idrodinamica, mantenendo una pressione in ingresso e in uscita pari a 7 e 0,7 bar rispettivamente, con un flusso pari a 21,2 m/s in corrispondenza della piastra forata ed un numero di cavitazione pari a 2,79. Al contrario, Mancuso et al. (2019) osservano un grado di disintegrazione del COD pressochè nullo dopo un'ora di cavitazione idrodinamica a  $T=20^{\circ}\text{C}$ , applicando però una pressione di soli 2 bar. Le prestazioni migliorano notevolmente combinando lo



stesso pretrattamento di cavitazione idrodinamica con un pretrattamento termoalcalino (2 atm, pH 10, 50°C), che determina un grado di disintegrazione del COD pari al 53% (Mancuso et al., 2019).

La lisi cellulare provocata dalla cavitazione determina anche l'aumento dell'azoto ammoniacale nella frazione liquida e la conseguente diminuzione dell'azoto organico nel fango (Feng et al., 2009; Salsabil et al., 2009).

### ***Potenziale di biometanazione (BMP)***

Il potenziale di biometanazione è il parametro di maggiore interesse, perché determina l'efficacia del pretrattamento di cavitazione per lo scopo per cui viene applicato, ovvero il miglioramento della biodegradabilità del fango nel processo di digestione anaerobica, che dovrebbe consentire una maggiore produzione di metano e tempi di ritenzione inferiori (Bhat & Gogate, 2021). Gli studi effettuati sulla cavitazione ultrasonica e idrodinamica mostrano un aumento del 40-50% con entrambi i tipi di pretrattamento (Habashi et al., 2016; Habashi et al., 2018; Tian et al., 2018; Bao et al., 2015). Tale aumento è solitamente corrispondente alla percentuale di aumento del sCOD, che quindi sembra un parametro fondamentale nel determinare il grado di disintegrazione dei fanghi a cui corrisponde un aumento del potenziale di biometanazione (Bhat & Gogate, 2021).

### ***Cambiamenti nell'attività microbica***

L'obiettivo del pretrattamento di cavitazione è la rottura della membrana cellulare, in modo da favorire la digestione anaerobica. La cavitazione deve però essere ottimizzata, massimizzandone gli effetti e allo stesso tempo mantenendo l'attività microbica. Infatti, è stato osservato che l'attività microbica cresce nella prima fase del trattamento, ma che la disgregazione eccessiva delle cellule, pur determinando una maggiore solubilizzazione, comporta una diminuzione dell'attività microbica (Zhang, Zhang & Wang, 2007).

### ***Durata della cavitazione***

Una riduzione notevole delle dimensioni dei fiocchi di fanghi attivi è stata osservata già dopo i primi 15 minuti sia per UC che per HC (Garuti et al., 2018; Zhao et al., 2019). Un aumento significativo dell'sCOD con la cavitazione idrodinamica è stato osservato dopo 30-60 min di trattamento. La durata del processo è fondamentale nella cavitazione idrodinamica, perché una durata eccessiva potrebbe deteriorare il fango e annullare i benefici del pretrattamento. Uno studio ha dimostrato che la disintegrazione del fango mediante cavitazione idrodinamica avviene in due fasi. Nella prima fase, la lisi cellulare e la solubilizzazione della materia organica determinano l'aumento del sCOD. In questo momento si osserva un aumento dell'attività microbica dovuta alla rottura della membrana cellulare. Una disgregazione cellulare eccessiva determina il passaggio alla seconda fase, in cui le cellule vengono completamente danneggiate, avviene la solubilizzazione

intracellulare e il sCOD aumenta, ma l'attività microbica e il potenziale di biometanazione diminuiscono (Mancuso, Langone & Andreottola, 2017).

### ***Temperatura***

Nell'ottica di uno scale-up efficiente, non è necessario riscaldare il fango prima della cavitazione. La temperatura dovrebbe aumentare in seguito al processo di cavitazione e andrebbe eventualmente controllata con una camicia di raffreddamento, in modo da mantenerla nell'intervallo richiesto in ingresso al digestore, tipicamente 30-40 °C (Bhat&Gogate, 2021).

### ***Pressione***

La maggior parte degli studi riportano che la pressione ottimale per la cavitazione idrodinamica dei fanghi di depurazione è compresa tra i 2 e i 4 bar (Mancuso, Langone & Andreottola, 2017; Cai et al., 2018; Garuti et al., 2018). Altri due studi hanno utilizzato pressioni maggiori, pari a 10,25 e 12 bar, ma nel primo i fanghi attivi sono stati mescolati con acque reflue ricche di olii e nel secondo è stato applicato anche un pretrattamento alcalino (Habashi et al., 2016; Grübel&Suschka, 2015).

Attualmente, non c'è ancora un accordo sulla pressione ed il numero di cavitazione ottimale da applicare al pretrattamento dei fanghi attivi. Negli studi considerati, sono stati utilizzati numeri di cavitazione piuttosto bassi, compresi tra 0,07 e 0,20, e dai risultati emerge che si ottiene un maggiore grado di disintegrazione con trattamenti più brevi ad alte pressioni (Bhat&Gogate, 2021). In alternativa, la stessa quantità di energia può essere utilizzata per cavitare il fango a pressioni inferiori per più di un'ora, ottenendo lo stesso grado di disgregazione (Mancuso et al., 2019). Come già discusso nel paragrafo relativo alla durata del pretrattamento, bisogna considerare che una cavitazione troppo spinta causa il danneggiamento del materiale intracellulare, riducendo la resa di biometanazione. Per evitare questo inconveniente, nello scale-up del processo è opportuno mantenere pressioni minime (2-3 bar) e prolungare la durata del trattamento (Bhat&Gogate, 2021).

### ***Applicazioni in piena scala***

Il pretrattamento dei fanghi attivi mediante la cavitazione ultrasonica per ottimizzarne la digestione anaerobica attualmente avviene con successo in 80 impianti di trattamento delle acque reflue in tutto il mondo (Hogan et al., 2004; Neis et al., 2012). Sul pretrattamento di cavitazione idrodinamica dei fanghi attivi negli impianti in piena scala non sono presenti studi in letteratura, ma sarebbe opportuno approfondire la conoscenza di tale processo, che essendo meno energivoro della cavitazione ultrasonica è promettente dal punto di vista della sostenibilità sia ambientale che economica (Bhat&Gogate, 2021).

### ***Cavitazione degli scarti alimentari***

Negli studi sugli scarti alimentari presenti in letteratura è stata testata la cavitazione ultrasonica, che ha sempre aumentato la resa di biometanazione (BMP) dei substrati e che, secondo

Deepanraj et al. (2017) è più efficace del pretrattamento con microonde o con autoclave nel migliorare il BMP degli scarti alimentari.

Zeynali et al. (2017) hanno utilizzato un substrato analogo a quello utilizzato in questo lavoro di tesi, ovvero gli scarti di frutta e verdura del mercato all'ingrosso, che sono stati sminuzzati con un frullatore a immersione e sottoposti a 18 min di sonocavitazione a 20 kHz. La sonocavitazione ha determinato una resa di biometanazione pari a 237 mL CH<sub>4</sub>/gVS, maggiore dell'80% rispetto alla sola frullatura, che è stata anche raggiunta in tempi più brevi: il test BMP del substrato sonocavitato è terminato dopo 12 d, mentre quello del controllo dopo 22 d. Inoltre, è stata osservata una riduzione dei TS e dei TVS del 55 % e del 62 % rispettivamente, mentre il sCOD non è stato determinato.

Anche Karouach et al. (2020) hanno testato un pretrattamento meccanico (frullatura) seguito da 24 min di sonocavitazione a 40 kHz sulla la frazione organica dei rifiuti solidi urbani (OFMSW). La resa di CH<sub>4</sub> ottenuta è pari a 493 (mL CH<sub>4</sub>/gVS), maggiore del 14% rispetto al controllo. Lo stesso substrato, sottoposto solo a 60 min di sonocavitazione a 22kHz, dà una resa di biometanazione pari a 331 mL CH<sub>4</sub>/gVS, maggiore del 71% rispetto al controllo (Prajapati et al., 2018). Come per i fanghi attivi, anche nel caso degli scarti alimentari la cavitazione troppo prolungata sortisce l'effetto opposto a quello desiderato: le dimensioni delle particelle aumentano perché i radicali formati durante la cavitazione avviano la reazione di polimerizzazione (Prajapati et al., 2018; Gonzalez-Fernandez et al., 2012). La sonocavitazione degli scarti alimentari per aumentarne la resa di biometanazione è stata testata anche su un impianto pilota, in cui 30 min di pretrattamento ad una densità di 0,2 W/mL hanno aumentato la quantità e la qualità (CH<sub>4</sub>/CO<sub>2</sub>) del biogas generato (Rasapoor et al., 2019). Con un carico organico pari a 500 gVS/m<sup>3</sup>d è diminuito anche il tempo necessario a raggiungere il volume cumulativo massimo di biogas, anche se un carico pari a 1500 gVS/m<sup>3</sup>d è più conveniente dal punto di vista energetico (Rasapoor et al., 2019).

## **1.6 Scopo della tesi**

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è la valorizzazione dei due principali flussi di scarto del metabolismo urbano, i fanghi di depurazione e gli scarti alimentari, mediante il recupero di composti chimici ad alto valore aggiunto (AGV) e di energia attraverso un trattamento combinato di fermentazione e digestione anaerobica. Tale approccio è coerente con il modello della bioraffineria di terza generazione, che combina più processi per ottenere composti chimici ad alto valore aggiunto ed energia (Battista et al., 2020). La valorizzazione dei fanghi di depurazione e degli scarti mercatali può essere ottimizzata mediante un pretrattamento che disgreghi i fiocchi dei fanghi attivi e ne rompa le membrane cellulari e che aumenti la solubilizzazione del materiale organico contenuto negli scarti alimentari. In questo lavoro di tesi il pretrattamento delle matrici organiche è stato effettuato con la cavitazione idrodinamica, valutandone l'efficacia rispetto ai substrati non pretrattati.

Gli obiettivi specifici di questa tesi sono:

- La caratterizzazione e il confronto tra le miscele cavitare e non cavitare, per verificare il grado di disgregazione sia a livello visivo sia attraverso la misurazione dei parametri chimico-fisici riportati nella sezione “Materiali e metodi”. I fanghi sono stati prelevati presso l’impianto di depurazione di Fusina (VE), gli scarti mercatali sono stati recuperati presso il mercato ortofrutticolo all’ingrosso di Marghera (VE) ed entrambe le matrici sono state caratterizzate prima e dopo il pretrattamento di cavitazione;
- Il confronto delle rese di produzione di AGV in test batch, considerando sia la quantità degli AGV prodotti ( $gCOD_{AGV}/gVS_{(0)}$ ) sia il profilo degli AGV, per valutare la fattibilità di un’eventuale conversione a poli-idrossi-alcanoati (PHA). Sono stati effettuati due test batch, aumentando il carico organico e il rapporto *food/microorganisms* nel secondo test per aumentare la resa di fermentazione;
- Il confronto delle rese di produzione di AGV in processo semi-continuo, considerando sempre sia la quantità ( $gCOD_{AGV}/gVS_{(0)}$ ) che il profilo degli AGV prodotti durante la fase di stabilità;
- La caratterizzazione della comunità microbica dei fermentatori in entrambe le condizioni testate (cavitato/non cavitato), effettuata mediante sequenziamento in parallelo (*Next Generation Sequencing, NGS*) della regione V4 del 16s rRNA secondo il protocollo “a doppio step di PCR”;
- Il confronto delle rese dei test BMP dei substrati singoli e delle miscele cavitare e non cavitare, per confermare l’aumento della resa del processo di codigestione di scarti mercatali e fanghi rispetto alla digestione dei soli fanghi e per verificare l’efficacia della cavitazione come pretrattamento dei substrati da trattare mediante digestione anaerobica;
- Infine, il confronto delle rese dei test BMP per la conversione del residuo solido a metano, ai fini di verificare la fattibilità complessiva del processo, che quindi prevede il recupero della frazione liquida per la purificazione degli AGV a *building blocks* o la loro conversione a PHA.

## 2. Materiali e metodi

### 2.1 Caratterizzazione dei substrati utilizzati e inoculo

In questo studio sono stati utilizzati come substrati gli scarti del mercato ortofrutticolo all'ingrosso di Marghera (VE) ed i fanghi secondari aerobici provenienti dall'impianto di depurazione delle acque reflue di Fusina (VE). L'inoculo utilizzato nelle prove (digestato anaerobico) è stato prelevato dall'impianto di depurazione delle acque reflue di Treviso, in cui i fanghi di depurazione e la frazione organica dei rifiuti solidi urbani (FORSU) vengono trattati mediante codigestione anaerobica. Gli scarti del mercato ortofrutticolo sono stati prelevati nell'ultima settimana di luglio e nell'ultima settimana di novembre e la loro composizione segue la stagionalità dei prodotti ortofrutticoli (zucchine, melanzane, fragole, cipolle, avocado, pomodori e prugne a luglio, erba cipollina, insalata, funghi, broccoli, cavolfiori, arance e pere a novembre). Gli ortaggi sono stati ridotti di pezzatura (2-3 cm), in modo da non occludere la pompa del cavitatore, e sono stati conservati in congelatore a -20°C. Gli scarti mercatali utilizzati per comporre la miscela non cavitata sono stati ulteriormente ridotti in pezzi da circa 0,5 cm. La caratterizzazione è stata effettuata sugli scarti di entrambe le pezzature, in modo da verificare l'eventuale perdita di acqua in seguito alla riduzione in pezzi da 0,5 cm. La miscela di scarti mercatali e fanghi è stata effettuata considerando un rapporto VS/VS di 1:1 come riportato negli studi di Moretto et al. (2020b) e di Valentino et al. (2019a).

I fanghi secondari aerobici sono stati prelevati e conservati in frigorifero o all'esterno a T=3-7°C ed acclimatati prima dell'utilizzo.

Il digestato è stato prelevato all'occorrenza e degasato in stufa a 42°C per almeno 2-3 giorni prima dell'utilizzo.

Un'aliquota delle matrici è stata prelevata per la caratterizzazione. Per ciascuna matrice è stato determinato il contenuto in solidi totali (TS) e in solidi totali volatili (TVS) e la richiesta chimica di ossigeno nel particolato (pCOD) nella frazione solida. Per il fango di depurazione, per il digestato e per la miscela pre-cavitazione e cavitata è stata caratterizzata anche la frazione liquida, su cui sono stati determinati il pH, l'alcalinità, il contenuto in acidi grassi volatili (AGV), cationi (Na<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>) e la richiesta chimica di ossigeno solubile (sCOD). I metodi analitici utilizzati (APHA, 2012; APAT, 2003) sono qui brevemente descritti e riportati in Appendice I.

#### Solidi totali e solidi volatili

I solidi totali (TS) sono il residuo che permane in un crogiolo dopo l'evaporazione dell'acqua in un campione mediante essiccamento in stufa, mentre i solidi volatili (TVS o VS) sono i solidi che

vengono volatilizzati sottoponendo il residuo secco a incenerimento in muffola a  $T=550^{\circ}\text{C}$  e costituiscono un indice di valutazione delle sostanze organiche presenti in una matrice.

#### Richiesta chimica di ossigeno nel particolato (pCOD)

È la quantità di ossigeno necessaria ad ossidare chimicamente la sostanza organica presente nella frazione solida di una matrice. È stata determinata mediante digestione in ambiente acido a  $175^{\circ}\text{C}$  e successiva titolazione del bicromato in eccesso con ferroammonio solfato (FAS).

#### AGV

La concentrazione e il profilo degli AGV contenuti nei substrati e nel fermentato sono stati determinati mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (*High Performance Liquid Chromatography, HPLC*) e confermati analizzando alcuni campioni mediante gascromatografia.

#### Cationi ( $\text{Na}^+$ , $\text{NH}_4^+$ , $\text{K}^+$ , $\text{Mg}^{2+}$ , $\text{Ca}^{2+}$ )

I cationi dei substrati e del fermentato sono stati determinati mediante cromatografia ionica.

#### Richiesta chimica di ossigeno solubile (sCOD)

È la quantità di ossigeno necessaria ad ossidare chimicamente la sostanza organica presente nella frazione liquida di una matrice. È stata determinata mediante metodo colorimetrico, che prevede la digestione in ambiente acido a  $150^{\circ}\text{C}$  e la determinazione dell'eccesso di bicromato mediante la lettura dell'assorbanza a  $\lambda=600\text{ nm}$ .

#### Richiesta chimica di ossigeno totale (tCOD)

È data dalla somma del pCOD e del sCOD.

### **2.2 Processi di cavitazione**

La miscela di fanghi e scarti mercatali in rapporto 1:1 su base TVS è stata cavitata con un cavitatore BioBang® (Three-es Srl), con lo scopo di aumentare la biodisponibilità dei substrati disgregando i fiocchi dei fanghi attivi, sminuzzando gli scarti mercatali e rompendone le fibre. Il numero di cavitazione è stato mantenuto tra 0,19 e 0,30, valori che ricadono nell'intervallo indicato come ottimale per una disgregazione efficiente dei fanghi attivi (Bhat & Gogate, 2021). La prima cavitazione è stata effettuata su 101 L di miscela di scarti mercatali di luglio e di fanghi del 19/10 inseriti in un contenitore cubico (figura 15), applicando i parametri operativi indicati nella tabella 2. Al termine del pretrattamento sono stati prelevati circa 25 L di miscela. Dopo aver preso il volume necessario per i test di fermentazione e per la caratterizzazione, il rimanente è stato stoccato in congelatore a  $T=-20^{\circ}\text{C}$ .



Figura 15. Contenitore cubico utilizzato nella prima cavitazione.

Tabella 2. Parametri operativi dei processi di cavitazione.

Processo di cavitazione	Durata (min)	Giri (rpm)	Pressione (bar)	$Q_{\text{rifiuti}}$ (L/min)
1°	27	1550-1650	1,40	12-30
2°	30	1240	1,8-2	50

La disgregazione dei substrati in seguito al pretrattamento di cavitazione è stata determinata visivamente mediante osservazione con un microscopio Motic B1 Advanced Series con ingrandimento 10x e 40x, fotografando i vetrini con una fotocamera Moticom 3+ (Motic Microscopes). Le due miscele, cavitata e non cavitata, sono poi state versate in due cilindri con  $V=250$  mL per confrontarne l'aspetto e setacciate con un setaccio dal diametro pari a 1 mm (Retsch GmbH). Il substrato trattenuto dalle maglie del setaccio è stato disposto su un foglio di carta con un'unità di misura di riferimento (quadretti del foglio o righello) per valutare le dimensioni della frazione solida della miscela prima e dopo il pretrattamento di cavitazione.

La seconda cavitazione è stata effettuata su 88 L di scarti mercatali di novembre e di fanghi del 3/12 inseriti stavolta nel contenitore tronco-conico illustrato nella figura 16, nel tentativo di limitare la perdita di scarti mercatali riscontrata nella prima cavitazione e di ridurre il volume di miscela necessario per la cavitazione. Sono stati applicati i parametri operativi indicati nella tabella 2, riducendo il numero di giri in modo da limitare il surriscaldamento della miscela, la cui temperatura è stata monitorata dopo 6 min e dopo 15 min di cavitazione.



Figura 16. Contenitore tronco-conico utilizzato nella seconda cavitazione.

### **2.3 Test di fermentazione**

Tutti i test di fermentazione sono stati condotti sulla miscela di fanghi di depurazione e scarti mercatali cavitata e non cavitata utilizzando il fermentatore da banco illustrato nella figura 17, dotato di un sistema automatico di termostatazione, miscelazione e di misurazione e campionamento del biogas (RES Italia). La miscelazione e la termostatazione avvengono in maniera alternata ad intervalli di 30 s ciascuna, in modo tale che il calore fornito dalla resistenza venga distribuito omogeneamente al liquido attraverso la miscelazione, che avviene ad una velocità di 14 rpm.





Figura 17. Fermentatore da banco (RES Italia).

Tutti i test sono stati condotti in condizioni mesofile ( $37^{\circ}\text{C}$ ), ottimali per la produzione di AGV da substrati organici (Moretto et al., 2019; Garcia-Aguirre, 2017; Peces et al., 2016; Jiang et al., 2013). Infatti, le colture termofile, pur essendo favorevoli in termini cinetici alla fermentazione nella fase di start-up, possono causare aumenti incontrollati di AGV e conseguenti abbassamenti del pH del mezzo. Tale fenomeno porta all'accumulo degli AGV e all'inibizione degli stessi sul metabolismo fermentativo, con conseguente abbassamento del rendimento finale di conversione (Moretto et al., 2019; Garcia-Aguirre, 2017; Peces et al., 2016; Jiang et al., 2013). In condizioni mesofile, invece, l'attività fermentativa è stata osservata in modo continuativo e consentiva facilmente di raggiungere lo stato stazionario (Moretto et al., 2019). Le temperature termofile favoriscono la solubilizzazione della materia organica ma, come detto precedentemente, non la sua conversione ad AGV che è inferiore rispetto alle condizioni mesofile indipendentemente dal pH (Moretto et al., 2019; Jiang et al., 2013). Inoltre, le condizioni mesofile sono preferibili in prospettiva dell'implementazione del processo in un impianto in piena scala, perché richiedono meno energia (Valentino et al., 2019a).

Tutti i test sono condotti senza controllo del pH, con la possibilità di intervenire con aggiunta di NaOH per mantenerlo  $>5$ . Infatti, gli AGV sono acidi deboli, con  $\text{pK}_a = 4,76-4,90$  (HAc-HCa), quindi se  $\text{pH} < 4$  gli AGV si trovano in forma indissociata. Gli acidi indissociati sono più liposolubili e possono diffondere attraverso la membrana plasmatica; nel citosol, che ha pH neutro, si

dissociano, abbassando il pH e quindi inibendo la crescita del microrganismo. Questo riduce la solubilizzazione della materia organica e la resa di AGV (Strazzerà, 2020).

#### 2.4.1. Test batch

Le condizioni operative adottate nei test batch sono riportate nella tabella 3.

Tabella 3. Condizioni operative adottate nei test batch.

Parametro	Unità di misura	Primo test batch		Secondo test batch	
		cavitato	non cavitato	cavitato	non cavitato
Carico organico (OL) tCOD	kg <sub>tCOD</sub> /m <sup>3</sup>	21,4	22,4	33,4	34,8
Carico organico (OL) VS	kg <sub>TVS</sub> /m <sup>3</sup>	11,9	14,9	18,8	24,5
F/M tCOD	kg <sub>tCOD</sub> /kg <sub>TVS</sub>	2,86	2,95	9,51	9,92
F/M VS	kg <sub>TVS</sub> /kg <sub>TVS</sub>	1,59	1,96	5,35	6,98
Inoculo	% volume sul totale	60	60	34	34

Nel primo test batch sono stati applicati un carico organico (*organic loading*) OL=21,4 kg<sub>tCOD</sub>/m<sup>3</sup> ed un rapporto *food/microrganisms* F/M= 2,86 kg<sub>tCOD</sub>/kg<sub>TVS</sub> per il cavitato ed un OL=22,4 kg<sub>tCOD</sub>/m<sup>3</sup> ed un F/M=2,95 kg<sub>tCOD</sub>/ per il non cavitato.

L'andamento della fermentazione è stato monitorato analizzando il pH e la concentrazione e il profilo degli AGV due volte al giorno per i primi tre giorni ed una volta al giorno per i giorni successivi. Da ogni reattore sono stati campionati e pesati circa 20 mL di fermentato. Il sCOD è stato determinato quotidianamente, i cationi settimanalmente e la composizione del biogas è stata misurata ogni qualvolta il volume presente in sacca lo consentisse. Il test è stato chiuso quando il sistema ha raggiunto la fase di metanogenesi. Al termine della fermentazione sono stati determinati i TS e i TVS.

Il secondo test è stato impostato mantenendo lo stesso rapporto volumetrico tra substrati ed inoculo per il cavitato ed il non cavitato e quindi una quantità simile di tCOD. Per ottimizzare la fermentazione sono stati aumentati l'OL ed il rapporto F/M ed è stato diminuito il volume di inoculo del 50%. Sono stati applicati un OL= 33,4 kg<sub>tCOD</sub>/m<sup>3</sup> ed un F/M= 9,51 kg<sub>tCOD</sub>/kg<sub>TVS</sub> per il cavitato ed un OL= 34,8 kg<sub>tCOD</sub>/m<sup>3</sup> ed un F/M= 9,92 kg<sub>tCOD</sub>/kg<sub>TVS</sub> per il non cavitato.

Alla luce dei risultati ottenuti nel primo test batch, stavolta il pH, la concentrazione ed il profilo degli AGV sono stati monitorati una sola volta al giorno, campionando e pesando circa 20 mL di fermentato con una pipetta in vetro. Il sCOD è stato determinato quotidianamente, i cationi e

l'alcalinità settimanalmente e la composizione del biogas è stata misurata ogni qualvolta il volume presente in sacca lo consentisse. Al termine della fermentazione sono stati analizzati TS e TVS.

#### 2.4.2. Test in semicontinuo

Il passaggio a regime di alimentazione semicontinuo è stato deciso dopo aver constatato il calo della concentrazione di AGV per tre misurazioni consecutive. È stato applicato un tasso di carico organico (*organic loading rate, OLR*) pari a 8 kg<sub>TVS</sub>/m<sup>3</sup>d per entrambe le condizioni, che ha determinato un tempo di ritenzione idraulica (*hydraulic retention time, HRT*), calcolato alimentando 5 giorni su 7, pari a 5 d per il cavitato e 6,6 d per il non cavitato (tabella 4). L'OLR è stato definito sulla base delle evidenze sperimentali ottenute da Moretto et al. (2019), l'HRT coerentemente con i risultati ottenuti da Strazzerà (2020), da Moretto et al. (2019) e da Valentino et al. (2019a).

Tabella 4. Parametri di processo del test di fermentazione in semi-continuo.

Parametro	Unità di misura	Cavitato	Non cavitato
OLR	kg <sub>TVS</sub> /m <sup>3</sup> d	8	8
OLR	kg <sub>iCOD</sub> /m <sup>3</sup> d	14,2	11,4
HRT	d	5	6,6

#### 2.4.3. Rese

La resa degli AGV nei test batch (gCOD<sub>AGV</sub>/gTVS<sub>(0)</sub>) è stata calcolata secondo Moretto et al. (2019) come indicato nell'Eq. 18, in cui il volume del reattore è stato corretto sottraendo al volume di partenza quello prelevato durante i campionamenti. Per il primo test batch è stata considerata la concentrazione massima di AGV ottenuta, mentre per il secondo test la resa è stata determinata sul periodo di stabilità, calcolando anche la resa massima ottenuta in tale periodo. Ai grammi di AGV presenti nel reattore sono stati sottratti quelli presenti in ciascun substrato e nell'inoculo all'inizio del test. Per i test sulla miscela cavitata è stata calcolata sia la resa di AGV dovuta al solo processo di fermentazione, sottraendo gli AGV presenti nella miscela cavitata, sia la resa di AGV complessiva, sottraendo solo gli AGV presenti nel fango di partenza e quindi includendo quelli prodotti durante il pretrattamento di cavitazione. La resa di AGV complessiva del cavitato è indicata nelle tabelle come cavitato<sub>tot</sub>. Sullo stesso periodo considerato per le rese sono stati riportati il pH, la concentrazione ed il profilo degli AGV, quest'ultimo espresso sia in gCOD<sub>AGV</sub>/L, sia in percentuale sul totale. È stata ricavata anche l'attività cumulativa, espressa in gCOD<sub>AGV</sub>/gTVS<sub>(0)</sub>\*d e calcolata secondo l'Eq. 19.

$$Resa_{AGV} = \frac{\frac{gCOD_{AGV}(t)}{L} * V_{reattore} - \sum_{i=1}^n \frac{gCOD_{AGV}(0)}{L} * V_{(0)}}{gTVS_{(0)}} \quad (18)$$

Dove:

gCOD<sub>AGV(t)</sub>/L= concentrazione degli AGV nel campione prelevato al tempo t;

$V_{reattore}$ = volume effettivo del reattore al tempo t, al netto del volume prelevato durante i campionamenti;

n= numero di matrici inserite nel reattore;

$gCOD_{AGV(0)}/L$ = concentrazione iniziale degli AGV di una matrice;

$V_{(0)}$  = volume di una matrice presente nel reattore all'inizio del test;

$gTVS_{(0)}$ = gTVS inseriti di substrato non fermentato.

$$Attività = \frac{(gCOD_{AGV}/gTVS_{(0)})_t - (gCOD_{AGV}/gTVS_{(0)})_0}{Tempo_t - Tempo_0} \quad (19)$$

Dove:

$gCOD_{AGV}$ = quelli presenti nel volume del reattore;

$TVS_{(0)}$ = TVS dell'inoculo inseriti all'inizio del test;

$Tempo_t$ = tempo del test batch di cui viene calcolata l'attività, espresso in giorni;

$Tempo_0$ = giorno di inizio del test batch, ovvero giorno 0.

Nel test in semicontinuo la resa ( $gCOD_{AGV}/gTVS_{(0)}$ ) è stata calcolata sul periodo di stabilità secondo l'Eq. 20, riportando sia i valori medi che i valori massimi e considerando i volumi in ingresso ( $V_{IN}$ ) e in uscita ( $V_{OUT}$ )

$$Resa_{AGV} = \frac{\frac{gCOD_{AGV}}{L} * V_{OUT} - \sum_{i=1}^n \frac{gCOD_{AGV(0)}}{L} * V_{IN}}{gTVS_{IN}} \quad (20)$$

Anche nel semicontinuo la resa del cavitato è stata calcolata sia considerando solo gli AGV prodotti durante la fermentazione, sia includendo quelli generati durante la cavitazione. Relativamente allo stesso periodo considerato per le rese sono stati riportati il pH, la concentrazione ed il profilo degli AGV quest'ultimo espresso sia in  $gCOD_{AGV}/L$ , sia in percentuale sul totale. L'attività giornaliera (allo stato stazionario;  $Attività_{ST}$ ) è stata calcolata con l'Eq. 21 ed è stata espressa in  $gCOD_{AGV}/gTVS_{(0)} * d$ .

$$Attività_{ST} = \frac{\Delta_{AGV}}{TVS_{(0)} * HRT} \quad (21)$$

Dove

$TVS_{(0)}$ : TVS dell'inoculo inseriti all'inizio del test;

$\Delta_{AGV}$ : differenza tra gli AGV contenuti nel volume di reattore e quelli contenuti nel substrato alimentato.

Per tutti i test di fermentazione è stato calcolato il rapporto molare tra gli acidi grassi volatili con un numero dispari di atomi di carbonio e gli acidi grassi volatili totali (Eq. 22). Tale parametro è fondamentale per la sintesi dei poli-idrossi-alcanoati (PHA), polimeri termoplastici che possono essere sintetizzati mediante colture microbiche miste utilizzando come substrato un effluente della fermentazione con un'alta concentrazione di AGV (Valentino et al., 2019b).

$$[C3/(C3 + C2)]_{AGV} = \frac{HPr + HVa + HisoVa + HEpt}{AGV_{tot}} \quad (22)$$

#### **2.4 Test del potenziale di biometanazione (*Biochemical Methane Potential, BMP*)**

I test del potenziale di biometanazione (BMP) sono stati condotti per determinare la produzione di biogas dei substrati singoli, della miscela cavitata e non cavitata, dell'effluente della fermentazione e della sua frazione solida in condizioni mesofile (T= 42°C).

Per i test BMP sono state utilizzate bottiglie da siero con  $V_{lavoro}=0,5$  L chiuse ermeticamente con tappi di butile e ghiere di alluminio. Per ogni test è stata misurata la produzione di biogas di un bianco costituito dal solo inoculo. Il bianco è stato condotto in duplice copia, mentre il substrato è stato testato in triplice copia. Le bottiglie sono state agitate manualmente all'inizio del test e ad ogni misurazione del biogas prodotto, avvenuta giornalmente fino al raggiungimento del plateau nella curva di produzione cumulativa del biogas e a cadenza più distanziata nei giorni successivi. Il volume di biogas prodotto è stato determinato misurando il volume di acqua spostato nel sistema a vasi comunicanti illustrato in figura 18, costituito da un cilindro di vetro con  $V=250$  mL chiuso con un tappo e collegato ad un contenitore di acqua acidificata in modo da evitare la solubilizzazione del  $CO_2$  presente nel biogas.

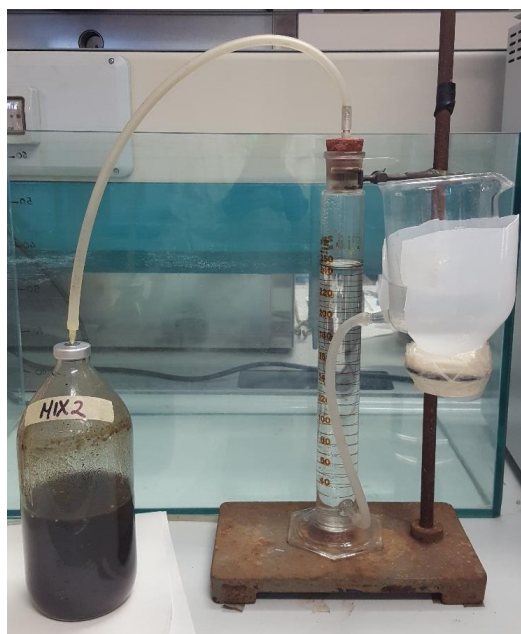


Figura 18. Sistema a vasi comunicanti utilizzato per misurare il volume di biogas prodotto nei test BMP.

Per i test effettuati sull'effluente della fermentazione e sulla sua frazione solida è stata determinata anche la composizione del biogas, raccogliendo il biogas prodotto da un'ulteriore bottiglia preparata per lo scopo in una sacca di campionamento con  $V=0,6$  L (SUPELCO, 30289-U) ed analizzandolo con un misuratore portatile MCA 100 Bio-P (ETG risorse e tecnologia s.r.l) per determinare la percentuale di  $CH_4$ ,  $CO_2$ ,  $O_2$ ,  $H_2S$  ed il potere calorifico (*calorific value*, CV). Data la scarsa rappresentatività dei test batch nel determinare l'andamento della composizione del biogas, le rese di tutti i substrati sono state comunque calcolate considerando la composizione media del biogas, costituito per il 60% da  $CH_4$  e per il 40% da  $CO_2$ .

I test sono stati condotti nelle condizioni illustrate nelle tabelle 5 e 6, mantenendo un carico organico (*organic loading*, OL) pari a  $4,5-5$   $kg_{TVS}/m^3$  ed un rapporto substrato/microrganismi (*food/microrganisms*, F/M) pari a  $0,36-0,48$  VS/VS, ottimali per la metanogenesi. Quando possibile, l'OL ed il rapporto F/M sono stati espressi anche su base tCOD ( $kg_{tCOD}/m^3$  e  $kg_{tCOD}/kgVS$ ).

Tabella 5. Parametri applicati per lo svolgimento dei test BMP sui substrati singoli e sulle miscele.

Parametro	Unità di misura	Fango	Scarti mercatali	Miscela cavitata	Miscela non cavitata
TQ inoculo	L	0,50	0,50	0,50	0,50
TVS inoculo	g	6,20	6,20	5,20	5,20
TVS substrato	$g/kg_{TQ}$	$24,44 \pm 0,15$	$82,38 \pm 5,22$	$28,38 \pm 0,02$	$35,46 \pm 1,11$
TQ substrato	g	92,55	27,51	88,26	66,23
TVS	g	2,26	2,27	2,50	2,35

substrato						
F/M	VS/VS	0,36	0,37	0,48	0,45	
F/M	kg <sub>ICOD</sub> /kgVS			0,85	0,76	
OL	kg <sub>TVS</sub> /m <sup>3</sup>	4,52	4,53	5,00	4,70	
OL	kg <sub>ICOD</sub> /m <sup>3</sup>			8,88	7,87	

Tabella 6. Parametri applicati per lo svolgimento dei test BMP sull'effluente della fermentazione e sulla sua frazione solida.

Parametro	Unità di misura	Fermentato cavitato	Fermentato non cavitato	Solido cavitato	Solido non cavitato
TQ inoculo	L	0,50	0,50	0,50	0,50
TVS inoculo	g	6,99	6,99	6,99	6,99
TVS substrato	g/kg <sub>TQ</sub>	12,55 ± 1,00	19,64 ± 1,26	120,49 ± 1,38	106,16 ± 0,30
TQ substrato	g	199,19	127,29	20,74	23,64
TVS substrato	g	2,50	2,50	2,50	2,51
F/M	VS/VS	0,36	0,36	0,36	0,36
F/M	kg <sub>ICOD</sub> /kgVS	0,85	0,74		
OL	kg <sub>TVS</sub> /m <sup>3</sup>	5,00	5,00	5,00	5,02
OL	kg <sub>ICOD</sub> /m <sup>3</sup>	11,84	10,27		

Dai dati ottenuti sono state ricavate la produzione media specifica di biogas (*average specific biogas production, SGP*), la produzione media specifica di metano (*average specific methane production, SMP*) e l'attività, misurata come m<sup>3</sup>biogas/kg<sub>TVS</sub>\*d.

I calcoli per SGP e SMP sono identici, a parte il fatto che per l'SGP si considera il volume di biogas e per l'SMP si considera il volume di CH<sub>4</sub>, e avvengono a partire dalle seguenti variabili:

- $V_{Biogas, S, i, t}$ , ovvero il volume di biogas prodotto nella bottiglia  $i$  che contiene inoculo e substrato al tempo  $t$  (mL);
- $V_{CH_4, S, i, t}$ , ovvero il volume di CH<sub>4</sub> prodotto nella bottiglia  $i$  che contiene inoculo e substrato al tempo  $t$  (mL);
- $V_{Biogas, I, j, t}$ , ovvero il volume di biogas prodotto nella bottiglia  $j$  che contiene solo l'inoculo (bianco) al tempo  $t$  (mL);
- $m_{I, i}$ , ovvero la massa di inoculo inserita nella bottiglia  $i$  (g);

- $m_{VS, S, i}$ , ovvero la massa di solidi volatili (VS) del substrato inseriti nella bottiglia  $i$  (g);
- $n$ , ovvero il numero di repliche con inoculo+substrato, pari a 3 in questo studio;
- $k$ , ovvero il numero di repliche con il solo inoculo (bianchi), pari a 2 in questo studio.

Per ogni substrato sono stati calcolati la media e lo scarto quadratico medio del volume di biogas prodotto dalle tre repliche ad ogni misurazione. Il volume cumulativo di biogas è stato calcolato sommando il volume medio di ogni misurazione e a partire da esso è stato calcolato il volume cumulativo netto di biogas ( $V_{cum, Biogas, S, t}$ ) sottraendovi il volume medio cumulativo di biogas prodotto dal bianco ( $V_{cum, Biogas, I, t}$ ) (Eq. 23, figura 19):

$$V_{cum.netto, Biogas, S, t} = V_{cum, Biogas, S, t} - V_{cum, Biogas, I, t} \quad (23)$$

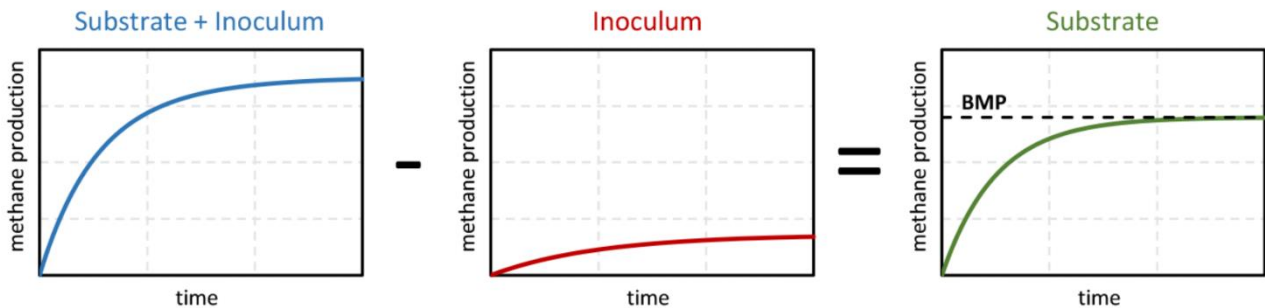


Figura 19. Calcolo del volume cumulativo netto di biogas prodotto dal substrato (DBFZ, 2021).

A partire dal volume cumulativo netto di biogas è stato calcolato l'SGP, espresso come  $m^3$ biogas/kg<sub>TVS</sub> (Eq. 24)

$$SGP = \frac{V_{cum.netto, Biogas, S, t} (m^3)}{gTVS_{substrato}} * 1000 \quad (24)$$

L'SMP è stato calcolato in termini di  $m^3_{CH_4}/kg_{TVS}$  (Eq. 25)

$$SMP = \left( \frac{V_{cum.netto, Biogas, S, t} (m^3)}{gTVS_{substrato}} * 1000 \right) * \%CH_4 \quad (25)$$

Il test BMP permette di ricavare il tasso di idrolisi del substrato, che costituisce un'informazione utile dal momento che l'idrolisi è la fase limitante dell'intero processo di digestione anaerobica. Dalla prima parte della curva sperimentale di produzione del biogas è stata determinata la costante



di idrolisi del substrato  $k_{id}$  ( $d^{-1}$ ) per un modello di idrolisi del primo ordine (Eq. 26) (Angelidaki et al., 2009):

$$\frac{dS}{dt} = -k_{id}S \quad (26)$$

dove  $S$  è il substrato biodegradabile,  $t$  è il tempo e  $k_{id}$  è la costante di idrolisi del primo ordine.

Dopo aver separato e integrato la variabile e considerata la relazione esistente tra il substrato biodegradabile e il metano generato, si ottiene l'Eq. 27:

$$\ln \frac{B_{\infty} - B}{B_{\infty}} = k_{id}t \quad (27)$$

dove  $B_{\infty}$  è il valore massimo della produzione cumulativa di metano e  $B$  è il metano prodotto ad un tempo  $t$ . Il valore della costante di idrolisi del primo ordine,  $k_{id}$ , è pari al coefficiente angolare della retta ottenuta. Tale valore è caratteristico per ogni substrato e indica il tempo necessario per fornire una determinata percentuale della quantità massima di biometano ottenibile da quel substrato (Mace et al., 2003).

I test BMP sono stati considerati conclusi quando il tasso di produzione giornaliera di biogas è risultato inferiore all'1% del volume cumulativo netto di biogas. Talvolta, i test sono stati prolungati oltre questo limite per un'ulteriore conferma dei risultati ottenuti (Holliger et al., 2020).

Al termine dei test sono stati verificati TS, TVS e sCOD, ad ulteriore conferma dei risultati ottenuti.

## 2.5 Analisi microbiologiche

Sul test di fermentazione in semi-continuo è stata analizzata la composizione della comunità microbiologica mediante il sequenziamento in parallelo (*Next Generation Sequencing, NGS*) della regione V4 del 16s rRNA secondo il protocollo "a doppio step di PCR", che consiste nell'amplificazione del DNA utilizzando primer modificati con code universali. L'amplificato viene poi purificato con beads magnetiche. In un secondo step di PCR gli Index Illumina Nextera XT vengono legati alle code universali; i campioni vengono poi normalizzati e multiplexati (BMR Genomics s.r.l.). Le sequenze ottenute sono state ripulite con Cutadapt, che rimuove gli adattatori delle sequenze, e con DADA2, che funge da filtro di qualità delle letture, stima l'errore e identifica le chimere. L'identificazione tassonomica delle sequenze risultanti avviene mediante il database SILVA, versione 132 (BMR Genomics s.r.l.).

Le analisi sono state condotte sulla miscela di fermentato dei primi giorni di stato stazionario (28, 29 e 30) e un campione della fase finale della sperimentazione (giorno 41).

### 3. Risultati

#### 3.1 Caratterizzazione dei substrati utilizzati e inoculo

Gli scarti mercatali recuperati presso il mercato ortofrutticolo di Marghera sono costituiti da proporzioni variabili di frutta e verdura di tipo diverso nella stagione estiva (figura 20) e autunnale (figura 21).

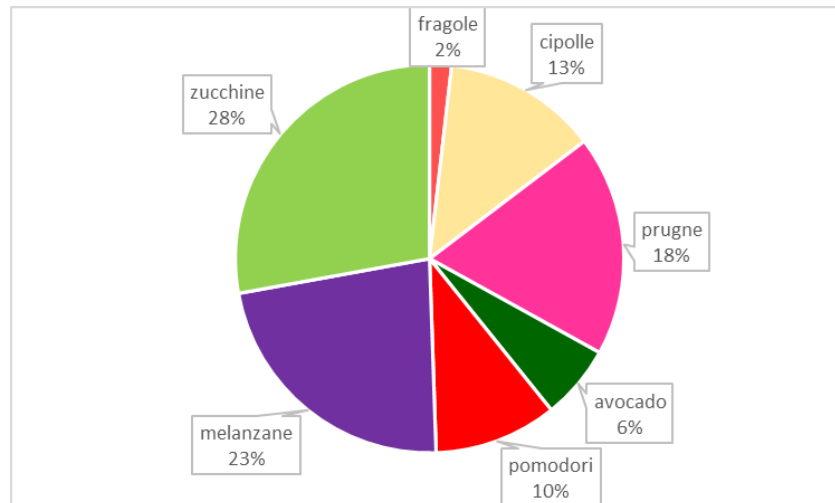


Figura 20. Composizione degli scarti mercatali estivi.

Le caratteristiche degli scarti mercatali sono rimaste pressoché costanti nei due diversi prelievi (tabella 7).

Tabella 7. Caratteristiche degli scarti mercatali.

SCARTI MERCATALI			
Parametro	Unità di misura	Estivi (06/08/20)	Autunnali (25/11/20)

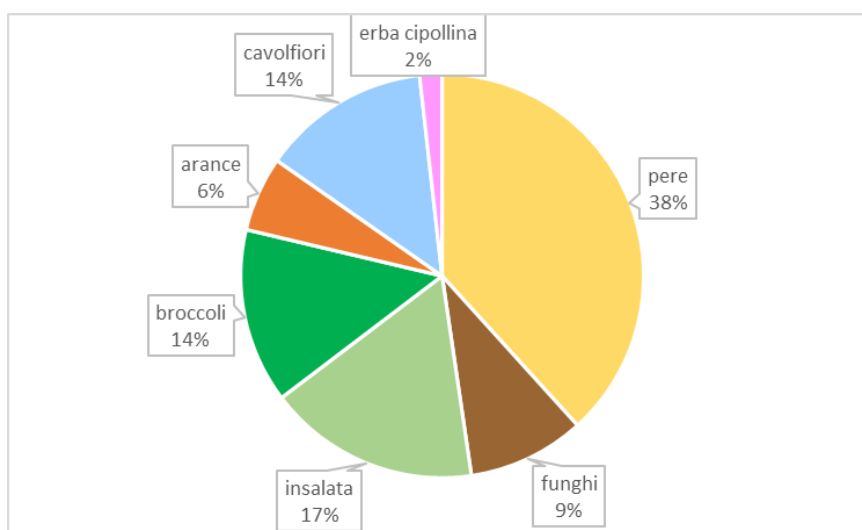


Figura 21. Composizione degli scarti mercatali autunnali.

		Valore	Dev. Std.	Valore	Dev. Std.	Valore	Dev. Std.	Valore	Dev. Std.
		Ø 2-3cm		Ø 0,5 cm		Ø 2-3cm		Ø 0,5 cm	
TS	g/kg	90,4	±3,8	98,5	±0,8	82,7	±1,9	89,8	±2,1
TVS	g/kg	82,4	±5,2	90,4	±1,9	74,8	±1,8	81,9	±2,1
TVS/TS	%	91,7	±0,4	91,8	±1,2	90,5	±0,2	91,2	±0,2
pCOD	gO <sub>2</sub> /kg	100,4	±3,1			93,4	±1,4	108,0	±11,3

La composizione dei fanghi è rimasta stabile per tutto il periodo di studio, ad eccezione dell'ultimo campione di fango che mostra una diminuzione dei TS e dei TVS pari al 30% e al 23% rispettivamente, del tCOD pari al 17% ed un aumento del sCOD pari al 312% rispetto alla media del periodo di studio (tabella 8).

Tabella 8. Caratterizzazione dei fanghi prelevati durante il periodo di studio (media) e del fango del 3/12.

FANGHI DI DEPURAZIONE					
Parametro	Unità di misura	Media		3/12/2020	
		Valori	Dev. Std.	Valori	Dev. Std.
TS	g/kg	36,2	±1,8	25,5	±0,2
TVS	g/kg	23,7	±0,7	18,2	±0,2
TVS/TS	%	65,9	±3,7	71,5	±0,1
sCOD	gO <sub>2</sub> /L	0,5	±0,3	2,1	±0,0
pCOD	gO <sub>2</sub> /kg	29,2	±3,7	22,5	±0,9
tCOD	gO <sub>2</sub> /kg	29,8	±3,7	24,6	±0,9
pH		8,363	±0,947	7,418	±0,129
alk pH 6	mg CaCO <sub>3</sub> /L	291,1	±33,9	287,5	±17,7
alk pH 4	mg CaCO <sub>3</sub> /L	568,2	±111,9	506,3	±44,2
VFA TOT	gCOD/L	0,80	±0,46	2,20	±0,04
Formico					
Acetico	gCOD/L	0,22	±0,11	0,72	±0,02
Propionico	gCOD/L	0,13	±0,07	1,20	±0,03
Butirrico e isobutirrico		0,06	±0,03	0,18	±0,01
Valerico		0,06	±0,02	0,09	±0,00
Isovalerico		0,34	±0,27		
Esanoico					
Eptanoico		0,08	±0,02		
Iso-esanoico					
Na <sup>+</sup>	mg/L	2146,3	±50,2	2290,0	±132,4
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>		90,3	±69,4	112,1	±8,3
K <sup>+</sup>		393,0	±57,1	447,9	±26,8
Mg <sup>2+</sup>		1775,3	±18,1	1874,2	±50,0
Ca <sup>2+</sup>		4771,0	±245,0	4799,1	±76,4

Le caratteristiche del digestato anaerobico con cui sono stati inoculati i test sono rimaste stabili per tutto il periodo di studio. In particolare, in media l'alcalinità parziale è pari a 2769,3 ± 536,1mgCaCO<sub>3</sub>/L e l'alcalinità totale è pari a 3293,8 ± 541,6 mgCaCO<sub>3</sub>/L (tabella 9).

Tabella 9. Caratterizzazione del digestato anaerobico

DIGESTATO ANAEROBICO			
Parametro	Unità di misura	Media	Dev. Std.
TS	g/kg	18,7	±2,2
TVS	g/kg	12,3	±1,8
TVS/TS	%	65,6	±3,6
sCOD	gO <sub>2</sub> /L	0,3	±0,1
pCOD	gO <sub>2</sub> /kg	17,1	±4,0
tCOD	gO <sub>2</sub> /kg	17,5	±4,0
pH		8,194	±0,279
alk pH 6	mg CaCO <sub>3</sub> /L	2769,3	±536,1
alk pH 4	mg CaCO <sub>3</sub> /L	3293,8	±541,6
Na <sup>+</sup>	mg/L	2312,9	±235,3

N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1091,3	±193,8
K <sup>+</sup>	918,4	±293,4
Mg <sup>2+</sup>	2004,3	±214,3
Ca <sup>2+</sup>	5109,6	±164,6

### 3.2 Processi di cavitazione

Il pretrattamento di cavitazione sembra aver disgregato i substrati di partenza in maniera efficace sia nella prima prova (figure 22 e 23) sia nella seconda (figure 24 e 25). I fiocchi dei fanghi di depurazione, visibili nelle figure 22 e 24, appaiono diradati e rimpiccioliti in seguito al pretrattamento, come mostrano le figure 23 e 25. Tuttavia, non è possibile determinare se sia avvenuta anche la lisi delle membrane cellulari.

Coerentemente con quanto verificato anche con il setacciamento, la cavitazione ha disgregato gli scarti mercatali in pezzi più piccoli rompendone le fibre, che sembrano visibili nelle figure 23 e 25. Date le loro dimensioni, non è stato possibile osservare al microscopio gli scarti mercatali prima della cavitazione, pertanto la loro disgregazione è stata valutata con il setacciamento.

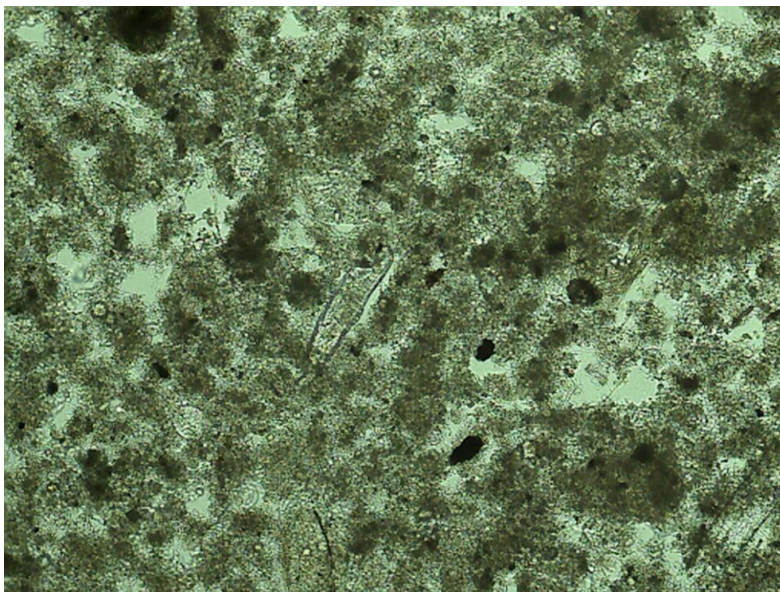


Figura 22. Fango di depurazione osservato al microscopio con ingrandimento 10x (prima cavitazione).

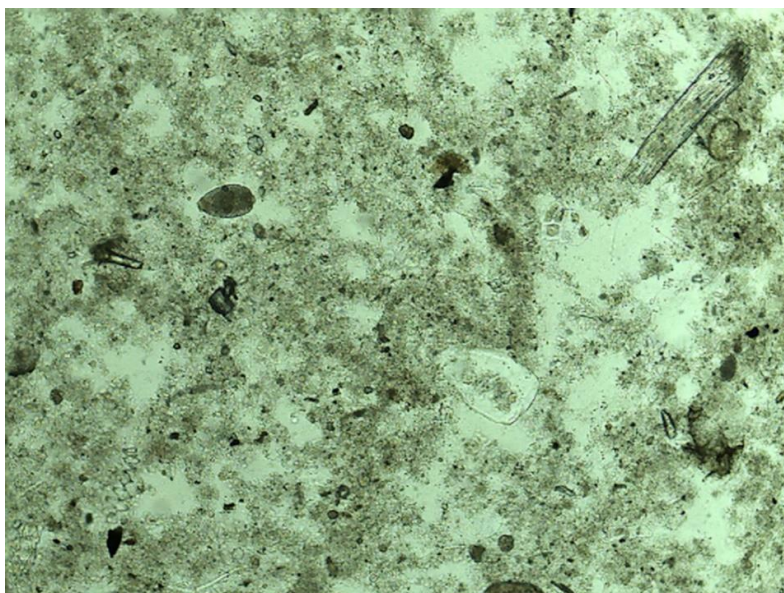


Figura 23. Miscela cavitata osservata al microscopio con ingrandimento 10x (prima cavitazione).

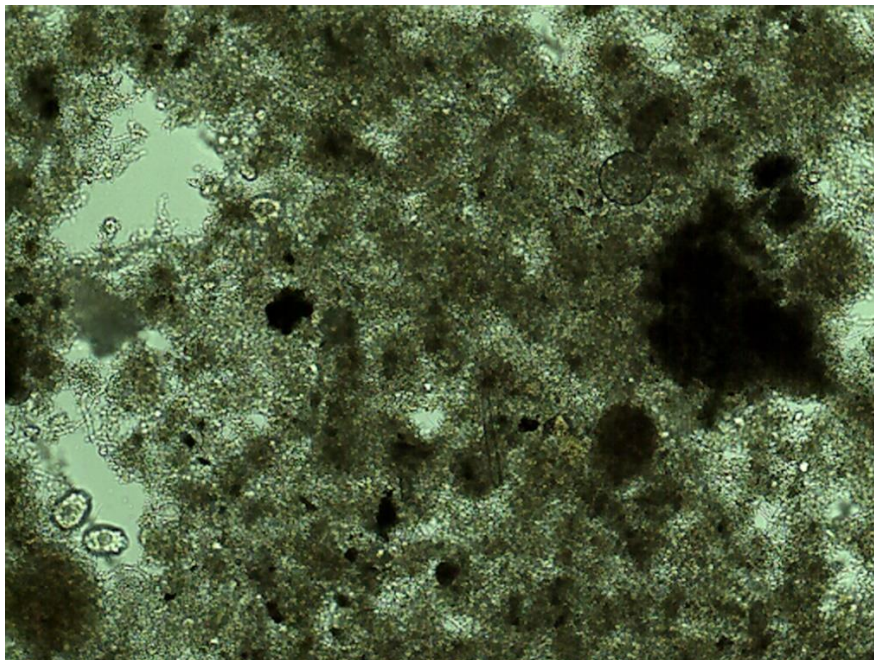


Figura 24. Fango di depurazione osservato al microscopio con ingrandimento 10x (seconda cavitazione).

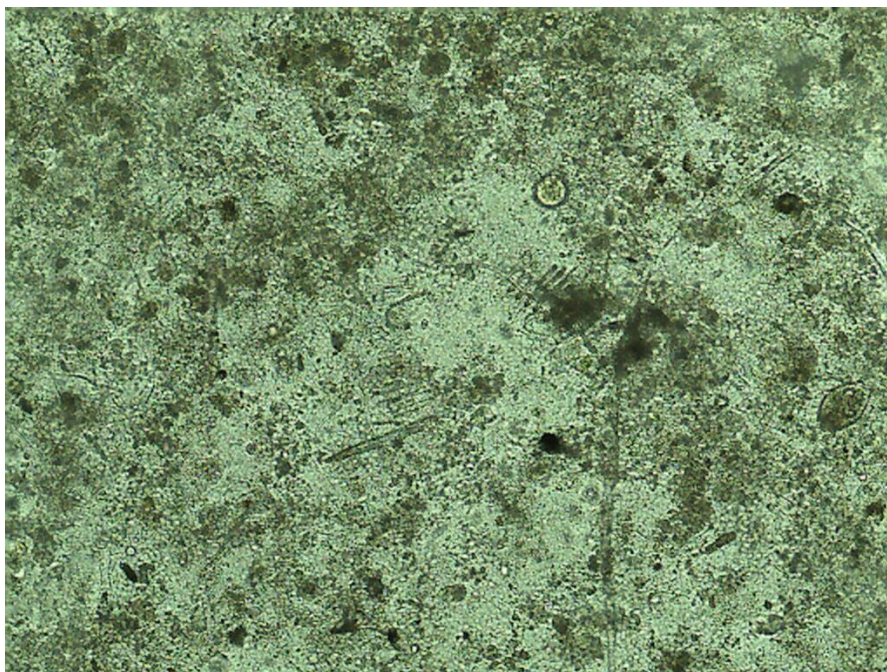


Figura 25. Miscela cavitata osservata al microscopio con ingrandimento 10x (seconda cavitazione).

L'osservazione delle due miscele inserite nei cilindri graduati non permette di apprezzare grandi differenze (figure 26 e 27), ma maneggiandole appare evidente che la miscela cavitata sia più fluida ed omogenea. Le differenze vengono rimarcate durante e dopo il setacciamento (figure 28, 29, 30 e 31). Infatti, misurando gli scarti disposti su fogli di carta, è stato osservato che la cavitazione ha ridotto il diametro degli scarti mercatali da 2-3 cm a 2-3 mm.

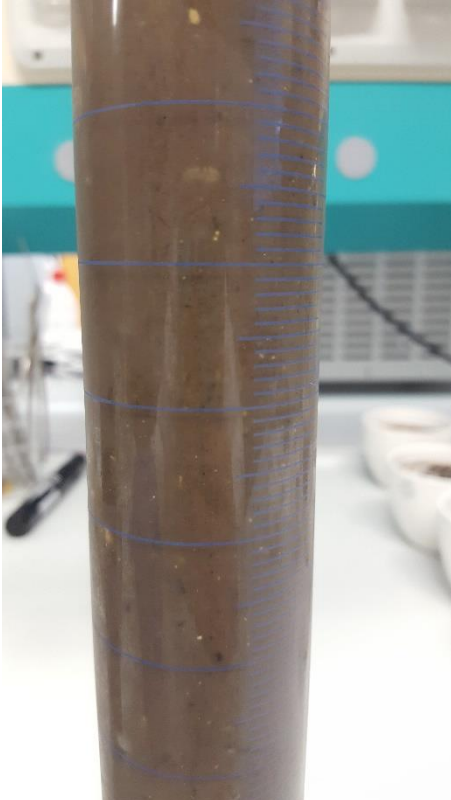


Figura 27. Miscela non cavitata inserita in un cilindro da 250 mL.



Figura 26. Miscela cavitata inserita in un cilindro da 250 mL.



Figura 31. Miscela non cavitata setacciata con un filtro con  $\varnothing=1$  mm.

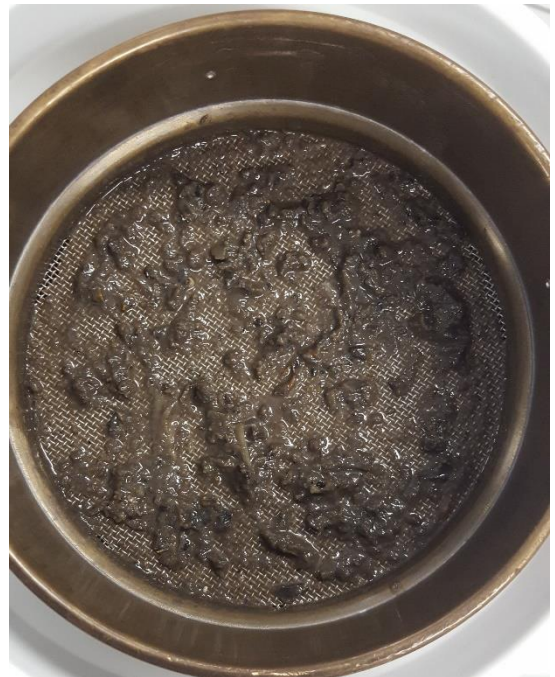


Figura 30. Miscela cavitata setacciata con un filtro con  $\varnothing=1$  mm.



Figura 29. Frazione della miscela non cavitata trattenuta da un filtro con  $\varnothing=1$  mm.



Figura 28. Frazione della miscela cavitata trattenuta da un filtro con  $\varnothing=1$  mm.

La variazione delle caratteristiche fisico-chimiche osservata visivamente è stata confermata dalle analisi di caratterizzazione delle miscele, effettuate sia prima che dopo il pretrattamento.



Le caratteristiche delle miscele pre-cavitazione, illustrate nella tabella 10, sono simili a quelle dei fanghi in termini di TS e di TVS, mentre il sCOD si attesta a valori pari a 8,8 e 9,9 gO<sub>2</sub>/L. Il pH è maggiore di 1,1-1,3 unità pH rispetto alla miscela cavitata, ma questo non modifica l'alcalinità parziale, che è simile a quella della miscela pretrattata. L'alcalinità totale delle miscele prima del pretrattamento invece è inferiore rispetto alla miscela cavitata, così come la concentrazione di AGV, specie chimiche che contribuiscono a determinare tale parametro.

Tabella 10. Caratteristiche delle miscele prima del pretrattamento di cavitazione.

<b>MISCELE PRE-CAVITAZIONE</b>					
<b>Parametro</b>	<b>Unità di misura</b>	<b>Miscela pre-cavitazione</b>		<b>Miscela pre-cavitazione</b>	
		<b>21-ott</b>		<b>03-dic</b>	
		<b>Valore</b>	<b>Dev.Std.</b>	<b>Valore</b>	<b>Dev.Std.</b>
TS	g/kg	35,8	±0,4	26,6	±2,3
TVS	g/kg	27,2	±0,9	21,2	±2,3
TVS/TS	%	75,5	±1,7	79,6	±1,8
sCOD	gO <sub>2</sub> /L	8,8	±0,1	9,9	±0,1
pCOD	gO <sub>2</sub> /kg			29,2	±0,1
tCOD	gO <sub>2</sub> /kg			39,1	±0,1
pH		7,525	±0,030	6,817	±0,045
alk pH 6	mg CaCO <sub>3</sub> /L	100,0	±0,0	375,0	±106,1
alk pH 4	mg CaCO <sub>3</sub> /L	525,0	±106,1	1050,0	±353,6
VFA TOT	gCOD/L	1,71	±0,21	1,78	±0,03
Formico		0,19	±0,01		
Acetico		0,98	±0,00	0,46	±0,00
Propionico				0,88	±0,00
Butirrico e isobutirrico		0,03	±0,05	0,24	±0,00
Valerico		0,08	±0,00	0,05	±0,00
Isovalerico		0,42	±0,15	0,08	±0,00
Esanoico				0,05	±0,01
Eptanoico				0,02	±0,03
Iso-esanoico					
Na <sup>+</sup>	mg/L	2214,2	±32,8	2141,5	±16,9
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>		278,6	±12,8	238,1	±14,6
K <sup>+</sup>		948,1	±8,9	816,6	±55,9
Mg <sup>2+</sup>		1941,7	±26,8	1864,9	±1,3
Ca <sup>2+</sup>		5138,7	±44,3	4889,2	±25,3

Le caratteristiche delle miscele cavitate sono illustrate nella tabella 11 e mostrano entrambe valori dei TS e dei TVS inferiori rispetto ai valori calcolati sui substrati inseriti. Nella prima cavitazione è stata osservata una diminuzione del 23,7% dei TS e del 22% dei TVS, che nella seconda cavitazione ha raggiunto il 39,4% di TS ed il 42,7% di TVS in meno rispetto ai valori calcolati sui substrati inseriti. I valori di sCOD invece sono aumentati del 39,0% e del 43,2% rispetto alla miscela pre-cavitazione dopo la prima e dopo la seconda cavitazione rispettivamente, principalmente a causa della disgregazione e solubilizzazione dei TS e dei TVS. Infatti, come evidenziato da Zhang et al. (2007), sia il COD che i TVS contengono composti organici, quindi la loro diminuzione nella fase solida determina direttamente l'aumento di quelli presenti nella fase liquida. L'aumento di sCOD riscontrato è maggiore di quanto ottenuto da Mancuso et al. (2019), che conducono la cavitazione idrodinamica a P=2 bar, simile a quella applicata nel presente lavoro di tesi, su una matrice costituita però dai soli fanghi attivi. La concentrazione degli AGV è aumentata notevolmente dopo il pretrattamento, passando da  $1,71 \pm 0,21$  gCOD<sub>AGV</sub>/L a  $6,80 \pm 0,07$  gCOD<sub>AGV</sub>/L nella prima cavitazione e da  $1,78 \pm 0,03$  gCOD<sub>AGV</sub>/L a  $4,8 \pm 0,04$  gCOD<sub>AGV</sub>/L nella seconda cavitazione. Il pretrattamento invece non sembra influire sul rilascio dei cationi, la cui concentrazione è simile a quella delle miscele pre-cavitazione.

Durante la seconda cavitazione è stata monitorata la temperatura della miscela, che si è mantenuta pressochè stabile, con valori di T=20°C e T=22,5 °C dopo 6 min e 15 min di cavitazione.

Tabella 11. Caratteristiche delle miscele cavitate.

<b>MISCELE CAVITATE</b>							
<b>Parametro</b>	<b>Unità di misura</b>	<b>Miscela cavitata</b>			<b>Miscela cavitata</b>		
		<b>Valore</b>	<b>21-ott</b>		<b>Valore</b>	<b>03-dic</b>	
<b>Dev. Std.</b>	<b>Valori calcolati sui substrati</b>		<b>Dev. Std.</b>	<b>Valori calcolati sui substrati</b>			
TS	g/kg	37,3	±0,0	48,9	24,5	±0,4	40,4
TVS	g/kg	28,4	±0,0	36,4	18,9	±2,0	32,9
TVS/TS	%	76,0	±0,0		77,0	±7,0	
sCOD	gO <sub>2</sub> /L	12,3	±0,7		14,1	±1,1	
pCOD	gO <sub>2</sub> /kg	38,0	±0,5		22,3	±1,8	
tCOD	gO <sub>2</sub> /kg	46,2	±0,5		36,4	±1,8	
pH		6,641	±0,014		5,535	±0,052	
alk pH 6	mgCaCO <sub>3</sub> /L	100,0					
alk pH 4	mgCaCO <sub>3</sub> /L	737,5					
VFA TOT	gCOD/L	6,80	±0,07		4,79	±0,04	
Formico					2,19	±0,00	
Acetico					1,58	±0,00	
Propionico		6,45	±0,08		0,73	±0,00	
Butirrico e isobutirrico							

Valerico		0,15	±0,00		0,13	±0,00	
Isovalerico		0,19	±0,00		0,13	±0,00	
Esanoico							
Eptanoico					0,03	±0,04	
Iso-esanoico							
Na <sup>+</sup>	mg/L	2116,8	±27,3		2190,0	±16,8	
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>		263,8	±35,1		280,5	±26,8	
K <sup>+</sup>		1092,3	±41,8		830,9	±14,8	
Mg <sup>2+</sup>		1794,1	±33,4		1859,3	±5,2	
Ca <sup>2+</sup>		4939,3	±85,4		4851,5	±20,3	

### 3.3 Test di fermentazione

#### 3.3.1 Test batch

Le figure 32, 33 e 34 mostrano l'andamento della concentrazione degli AGV e del pH del primo test batch di fermentazione, avviato in via esplorativa con un OL= 21,4 kg<sub>tCOD</sub>/m<sup>3</sup> ed un F/M= 2,86 kg<sub>tCOD</sub>/kg<sub>TVS</sub> per il cavitato ed un OL=22,4 kg<sub>tCOD</sub>/m<sup>3</sup> con un F/M=2,95 kg<sub>tCOD</sub>/kg<sub>TVS</sub> per il non cavitato. Dato che il campionamento è stato effettuato due volte al giorno per i primi tre giorni, il tempo sull'asse delle ascisse è stato espresso in ore.

Entrambi i test sono stati condotti senza controllo del pH, che alla prima misurazione del giorno 1 è risultato pari a  $7,320 \pm 0,037$  ed a  $7,430 \pm 0,163$  per il cavitato ed il non cavitato rispettivamente, per poi scendere a  $6,851 \pm 0,006$  ed a  $7,055 \pm 0,195$  in corrispondenza del picco massimo di concentrazione degli AGV. Come mostrato nelle figure 32, 33 e 34, la produzione di AGV è aumentata costantemente fino ad un picco, raggiunto nel giorno 6 (136,8 h) dal substrato cavitato e nel giorno 7 (160,6 h) dal substrato non cavitato, in cui la concentrazione degli AGV ha toccato  $7,26 \pm 0,35$  gCOD<sub>AGV</sub>/L ed  $8,85 \pm 0,15$  gCOD<sub>AGV</sub>/L rispettivamente. I parametri di processo, le rese ed il profilo degli AGV sono stati determinati sul picco massimo e sono riportati nella tabella 12.

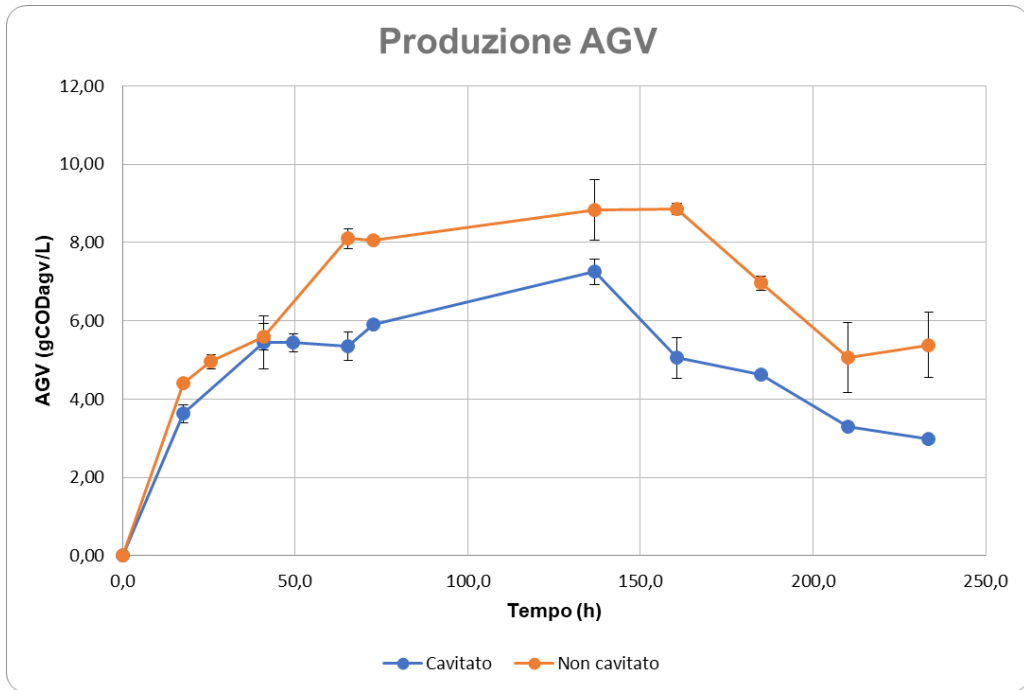


Figura 32. Andamento della produzione di AGV nel primo test batch (substrato cavitato e non cavitato).

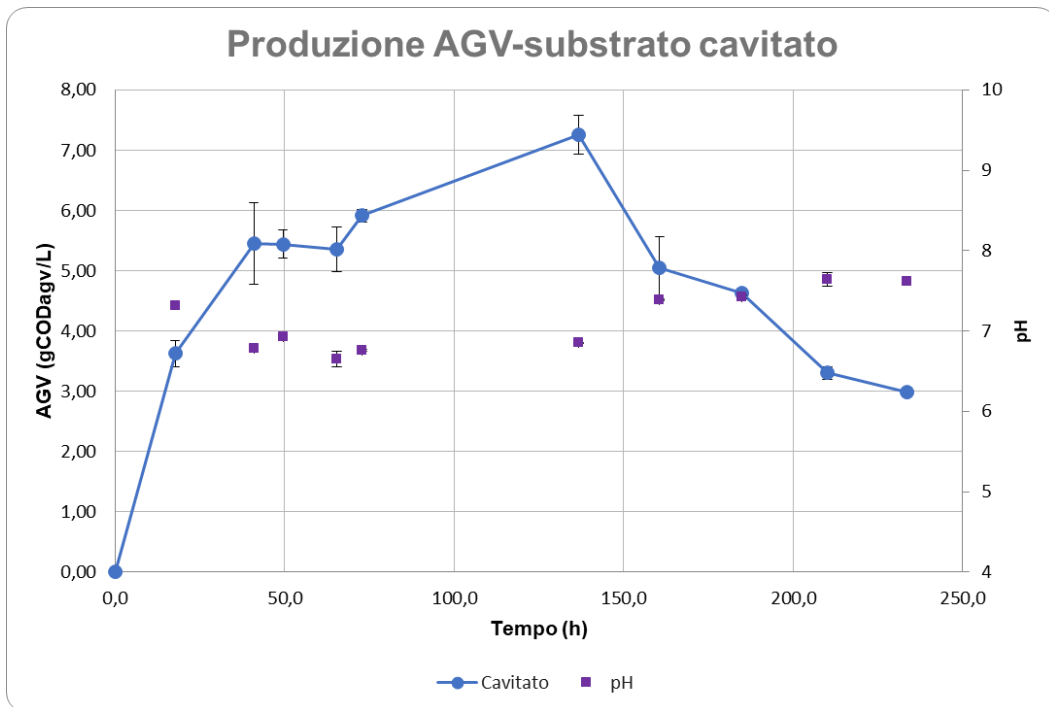


Figura 33. Andamento del pH e della produzione di AGV nel primo test batch (substrato cavitato).

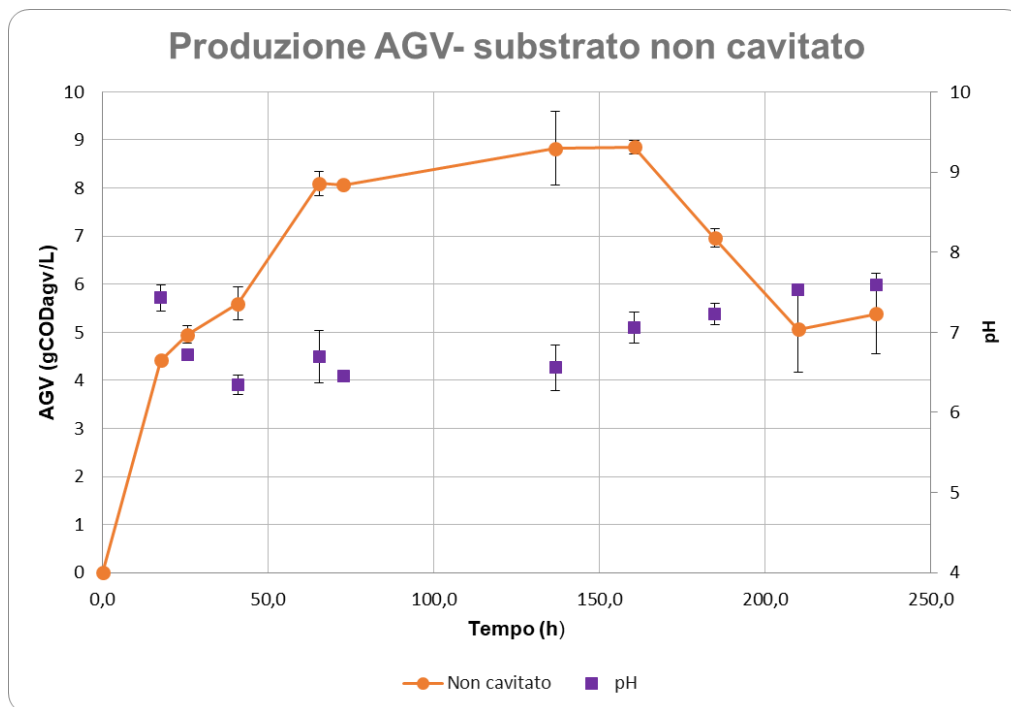


Figura 34. Andamento del pH e della produzione di AGV nel primo test batch (substrato non cavitato).

La concentrazione di AGV maggiore è stata raggiunta dal non cavitato, che si trova ad un pH leggermente superiore, pari a  $7,055 \pm 0,195$ .

La resa complessiva del cavitato, che include gli AGV prodotti durante la cavitazione, è pari a  $0,58 \pm 0,03 \text{ gCOD}_{AGV}/\text{g}_{VS(0)}$  ed è confrontabile con quella del non cavitato, che è pari a  $0,55 \pm 0,01 \text{ gCOD}_{AGV}/\text{g}_{VS(0)}$ . Al contrario, la resa del cavitato dovuta al solo processo di fermentazione, ottenuta sottraendo gli AGV contenuti nella miscela cavitata agli AGV prodotti nel batch, è pari a  $0,35 \pm 0,03 \text{ gCOD}_{AGV}/\text{g}_{VS(0)}$  ed è inferiore del 36,7 % in confronto a quella del non cavitato.

Tabella 12. Parametri di processo e rese rilevati in corrispondenza del picco di concentrazione degli AGV nel primo test batch.

Parametro	Unità di misura	Cavitato		Cavitato <sub>tot</sub>		Non cavitato	
		Valore	Dev. Std.	Valore	Dev. Std.	Valore	Dev. Std.
pH		6,851	$\pm 0,006$			7,055	$\pm 0,195$
AGV	$\text{gCOD}_{AGV}/\text{L}$	7,26	$\pm 0,35$			8,85	$\pm 0,14$
Acido acetico	$\text{gCOD}_{AGV}/\text{L}$	2,52	$\pm 0,10$			2,16	$\pm 0,52$
Acido propionico	$\text{gCOD}_{AGV}/\text{L}$	0,87	$\pm 0,00$			2,06	$\pm 0,03$
Acido butirrico e isobutirrico	$\text{gCOD}_{AGV}/\text{L}$	1,68	$\pm 0,20$			1,82	$\pm 0,17$
Acido valerico	$\text{gCOD}_{AGV}/\text{L}$					0,14	$\pm 0,20$
Acido	$\text{gCOD}_{AGV}/\text{L}$	2,19	$\pm 0,10$			2,51	$\pm 0,15$

isovalerico							
Acido esanoico	$\text{gCOD}_{\text{AGV}}/\text{L}$					0,16	$\pm 0,23$
Acido acetico	%	34,8	$\pm 0,7$			24,4	$\pm 5,5$
Acido propionico	%	12,0	$\pm 0,4$			23,2	$\pm 0,0$
Acido butirrico e isobutirrico	%	23,1	$\pm 1,6$			20,6	$\pm 1,5$
Acido valerico	%					1,6	$\pm 2,3$
Acido isovalerico	%	30,2	$\pm 0,6$			28,4	$\pm 2,1$
Acido esanoico	%					1,8	$\pm 2,6$
$[\text{C}_3/(\text{C}_3+\text{C}_2)]_{\text{AGV}}$	moli/moli			0,29	$\pm 0,01$	0,36	$\pm 0,02$
Resa	$\text{gCOD}_{\text{AGV}}/\text{g}_{\text{VS}(0)}$	0,35	$\pm 0,03$	0,58	$\pm 0,03$	0,55	$\pm 0,01$

Il profilo degli AGV è diverso per il substrato cavitato (figura 35) rispetto al non cavitato (figura 36) relativamente agli acidi acetico e propionico. Infatti, nel primo l'acido acetico ammonta al  $34,8 \pm 0,7$  % ed il propionico al  $12,0 \pm 0,4$  %, mentre nel secondo l'acido acetico costituisce il  $24,4 \pm 5,5\%$  del totale e l'acido propionico il  $23,2 \pm 0,0$  %. Infine, nel non cavitato è stata identificata una percentuale minore degli acidi valerico ed esanoico, assenti invece nel cavitato e omessi nei grafici del profilo degli AGV. Il rapporto molare  $[\text{C}_3/(\text{C}_3+\text{C}_2)]_{\text{AGV}}$ , calcolato sul valore di concentrazione massima degli AGV, è pari a  $0,29 \pm 0,01$  per il cavitato e a  $0,36 \pm 0,02$  per il non cavitato. La concentrazione e la percentuale di ciascun AGV sono riportati nella tabella 12.

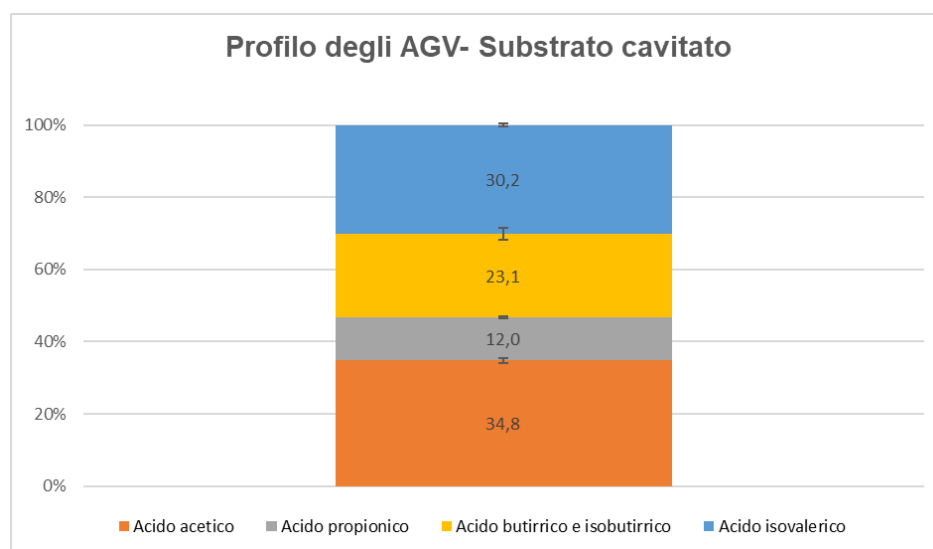


Figura 35. Profilo degli AGV nel primo test batch (substrato cavitato).

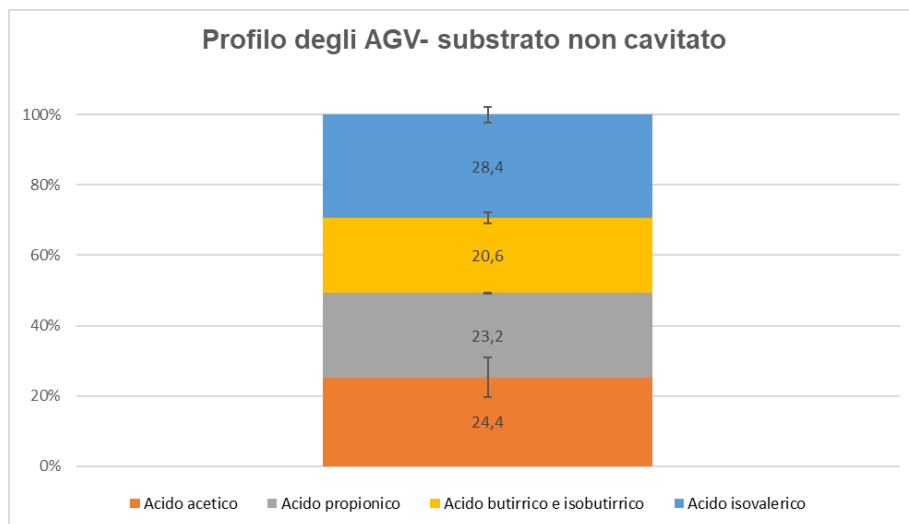


Figura 36. Profilo degli AGV nel primo test batch (substrato non cavitato).

Questo primo test batch è stato chiuso nel tredicesimo giorno, dopo aver confermato con tre misurazioni successive che il sistema aveva virato verso la metanogenesi. Tale condizione è stata identificata sia dal pH, che al giorno 8 (184,9 h) era risalito a  $7,423 \pm 0,024$  per il cavitato ed a  $7,231 \pm 0,135$  per non cavitato, sia dall'analisi della composizione del biogas campionato automaticamente nella sacca di ciascun reattore, riportata nelle tabelle 13 e 14.

Tabella 13. Portata e composizione del biogas prodotto dal primo test batch di fermentazione dopo aver virato verso la metanogenesi (substrato cavitato).

Tempo giorni	Tempo ore	Q biogas		Composizione %							
				CH <sub>4</sub>	CO <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> S				
		L/d		Valori	Dev.Std.	Valori	Dev.Std.	Valori	Dev.Std.	Valori	Dev.Std.
8	184,9	1,787	±0,031	55,81	±1,63	36,90	±1,26	0,97	±0,17	334	±68
9	210,1	1,756	±0,075	68,03	±0,20	28,14	±0,46	0,98	±0,11	200	±3
10	233,5	1,0395	±0,049	69,87	±0,46	25,43	±0,30	1,34	±0,08	146,5	±1
13	306,1	0,846	±0,016	70,97		25,01		1,33		118	

Tabella 14. Portata e composizione del biogas prodotto dal primo test batch di fermentazione dopo aver virato verso la metanogenesi (substrato non cavitato).

Tempo giorni	Tempo ore	Q biogas		Composizione %							
		L/d		CH <sub>4</sub>		CO <sub>2</sub>		O <sub>2</sub>		H <sub>2</sub> S	
		Valori	Dev.Std.	Valori	Dev.Std.	Valori	Dev.Std.	Valori	Dev.Std.	Valori	Dev.Std.
8	184,9	1,878	±0,205	53,12	±1,32	39,96	±0,93	0,91	±0,06	460	±13
9	210,1	2,280	±0,385	66,23	±2,67	30,96	±2,60	0,87	±0,13	235	±6
10	233,5	1,505	±0,251	70,21	±1,13	26,72	±1,45	0,99	±0,06	164	±8
13	306,1	1,105	±0,009	71,11	±0,24	25,50	±0,13	1,19	±0,10	145	±21

Nel secondo test, l'aumento dell'OL e del rapporto F/M, impostati a 33,4 kg<sub>iCOD</sub>/m<sup>3</sup> e 9,51 kg<sub>iCOD</sub>/kg<sub>TVS</sub> per il cavitato e a 34,8 kg<sub>iCOD</sub>/m<sup>3</sup> e 9,92 kg<sub>iCOD</sub>/kg<sub>TVS</sub> per il non cavitato, ha permesso di aumentare la concentrazione degli AGV rispetto al primo test già a partire dalla fase batch di avviamento del reattore, in cui è stata raggiunta la stabilità in entrambe le condizioni testate. Le figure 37, 38 e 39 mostrano l'andamento della concentrazione degli AGV e del pH per tutta la durata del test. Dato che il pH non è mai sceso sotto a 5, valore limite per la fermentazione acidogenica, non è stato necessario correggerlo.

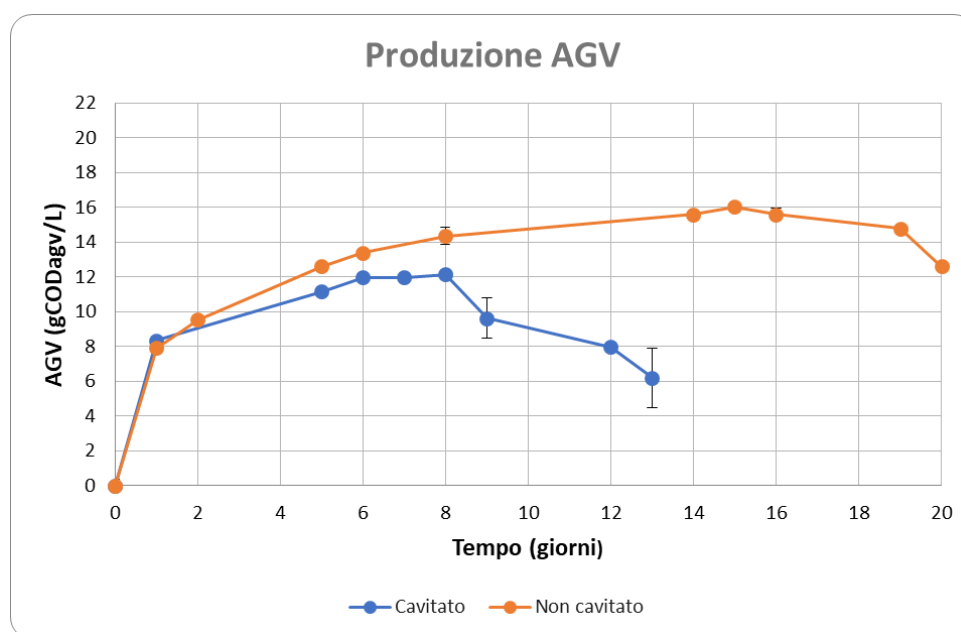


Figura 37. Andamento della produzione di AGV nel secondo test batch (substrato cavitato e non cavitato).



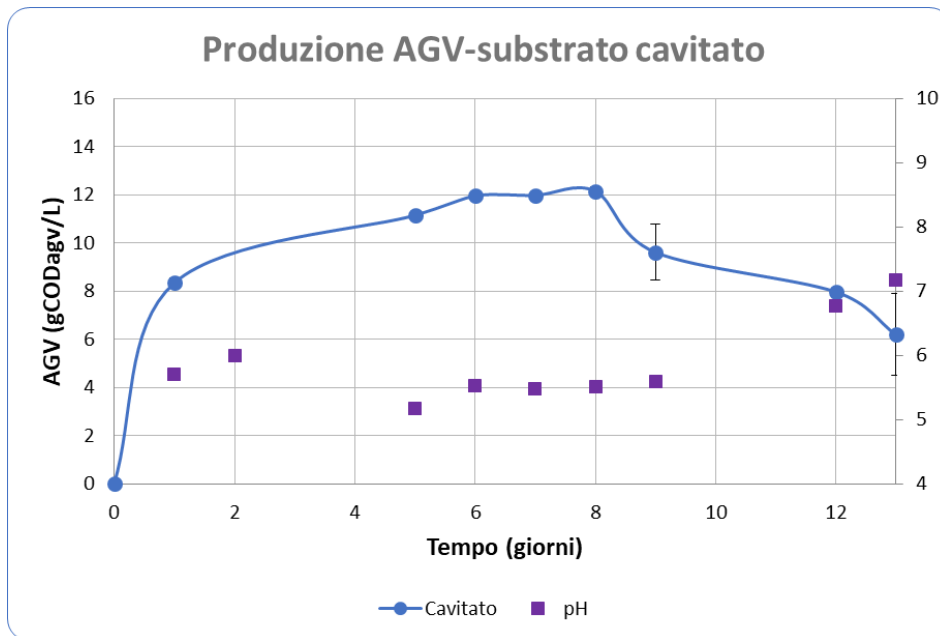


Figura 38. Andamento della produzione di AGV e del pH nel secondo test batch (substrato cavitato).

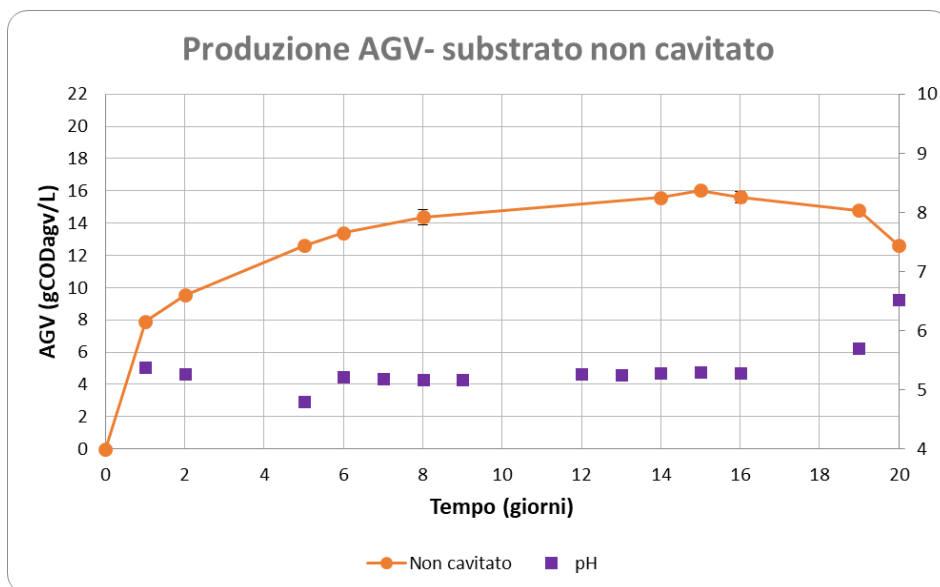


Figura 39. Andamento della produzione di AGV e del pH nel secondo test batch (substrato non cavitato).

Nella fase batch, la concentrazione degli AGV è aumentata costantemente fino a raggiungere la stabilità per entrambe le condizioni. Il cavitato è rimasto stabile dal giorno 5 al giorno 8 inclusi, con una concentrazione media pari a  $11,82 \pm 0,45$  gCOD<sub>AGV</sub>/L ed un pH pari a  $5,425 \pm 0,171$ . Il non cavitato ha raggiunto la stabilità più lentamente, nei giorni 14, 15 e 16, pur ottenendo una concentrazione media maggiore, pari a  $15,75 \pm 0,25$  gCOD<sub>AGV</sub>/L, ed un pH pari a  $5,287 \pm 0,011$ . Nonostante la differenza nella concentrazione di AGV, l'attività cumulativa è simile per le due condizioni. Il cavitato<sub>tot</sub> ha raggiunto un valore massimo di attività cumulativa pari a 2,30 gCOD<sub>AGV</sub>/gVS<sub>(0)</sub>\*d e il non cavitato pari a 2,17 gCOD<sub>AGV</sub>/gVS<sub>(0)</sub>\*d (figura 40).

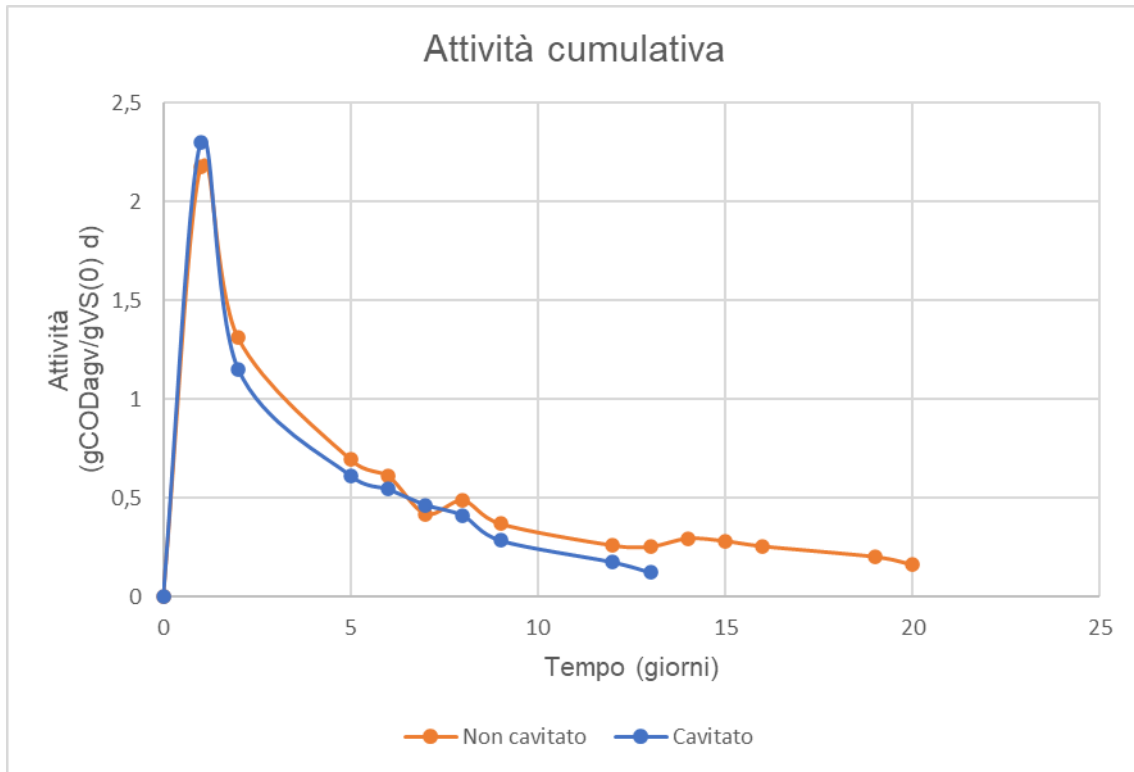


Figura 40. Attività cumulativa totale del cavitato e del non cavitato nel secondo test batch.

Anche il profilo degli AGV è rimasto stabile, come mostrato nelle figure 41 e 42 che riportano l'andamento della concentrazione di ciascun AGV nel tempo.

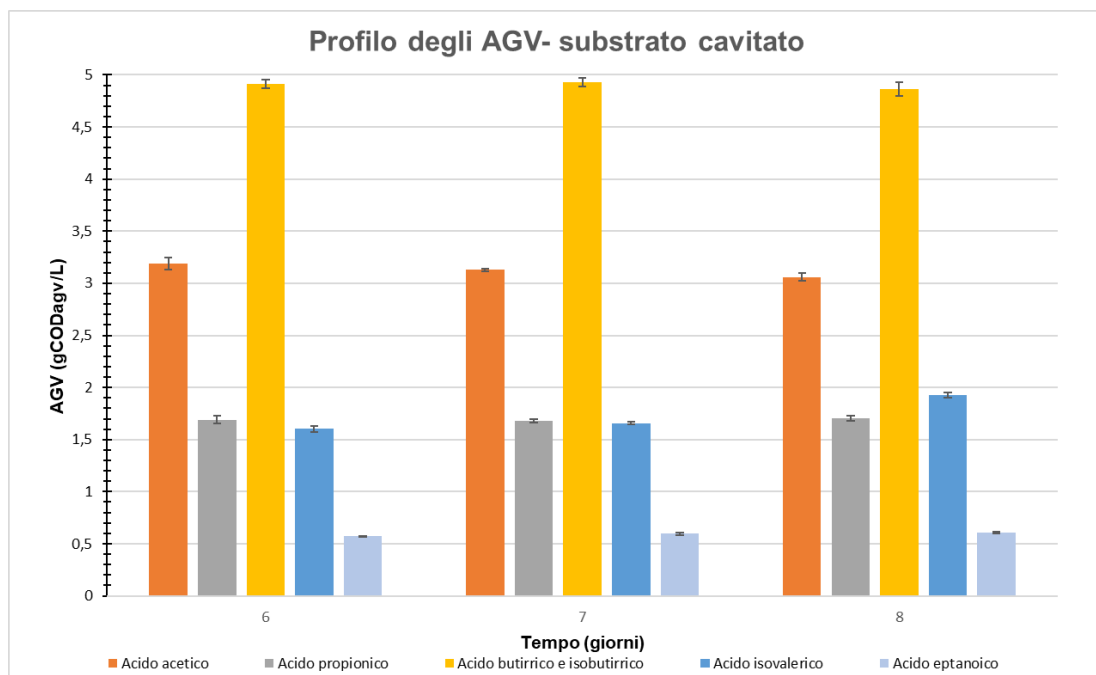


Figura 41. Andamento del profilo degli AGV del substrato cavitato nella fase di stabilità del secondo test batch (gCOD<sub>AGV</sub>/L).

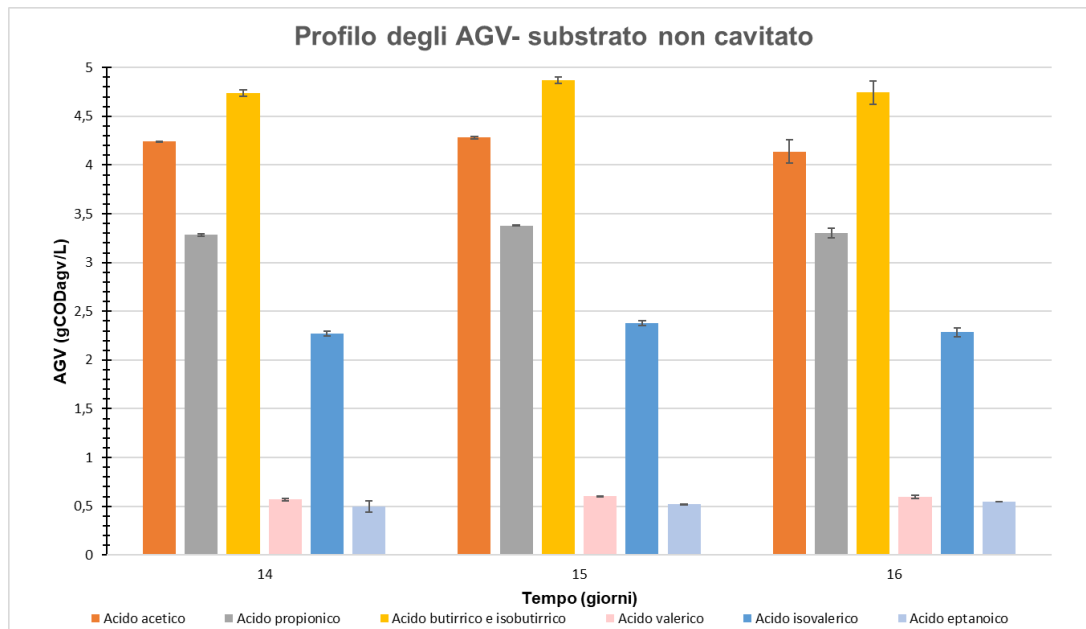


Figura 42. Andamento del profilo degli AGV del substrato non cavitato nella fase di stabilità del secondo test batch (gCOD<sub>AGV</sub>/L).

Il profilo degli AGV presenta alcune differenze tra il substrato cavitato (figura 43) ed il substrato non cavitato (figura 44). Nel primo gli acidi butirrico e isobutirrico raggiungono il  $40,7 \pm 0,7$  %, mentre nel secondo costituiscono il  $30,4 \pm 0,0$  %. Inoltre, il cavitato ha una percentuale minore di acido propionico, pari al  $14,0 \pm 0,1$  % contro il  $21,1 \pm 0,1$  % del non cavitato, e non ha prodotto acido valerico. Rispetto al primo test batch non varia solo la concentrazione, ma anche il profilo degli AGV: nel cavitato aumenta la concentrazione degli acidi butirrico e isobutirrico, che passano dal  $23,1 \pm 1,6$  % al  $40,7 \pm 0,7$  % a scapito dell'acido acetico, che passa dal  $34,8 \pm 0,7$  % al  $26,0 \pm 0,75$ , e dell'acido isovalerico, che passa dal  $30,2 \pm 0,6$  % al  $14,4 \pm 1,31$  %. La concentrazione degli acidi butirrico e isobutirrico aumenta anche nel non cavitato, dove passa dal  $20,6 \pm 1,5$  % al  $30,4 \pm 0,0$  % a scapito dell'acido isovalerico, che passa dal  $28,4 \pm 2,1$  % al  $14,7 \pm 0,14$  %, mentre la concentrazione di acido acetico resta simile. Infine, nel primo test batch l'acido eptanoico era assente sia nel cavitato che nel non cavitato. Nel non cavitato, invece, era invece presente l'acido esanoico, anche se in percentuale minima. Il rapporto molare  $[C_3/(C_3+C_2)]_{AGV}$ , calcolato sul periodo di stabilità degli AGV, è pari a  $0,28 \pm 0,02$  per il cavitato e a  $0,36 \pm 0,00$  per il non cavitato.

Le percentuali e le concentrazioni medie di ciascun AGV nel periodo di stabilità sono riportate nella tabella 15, insieme ai parametri di processo e alle rese.

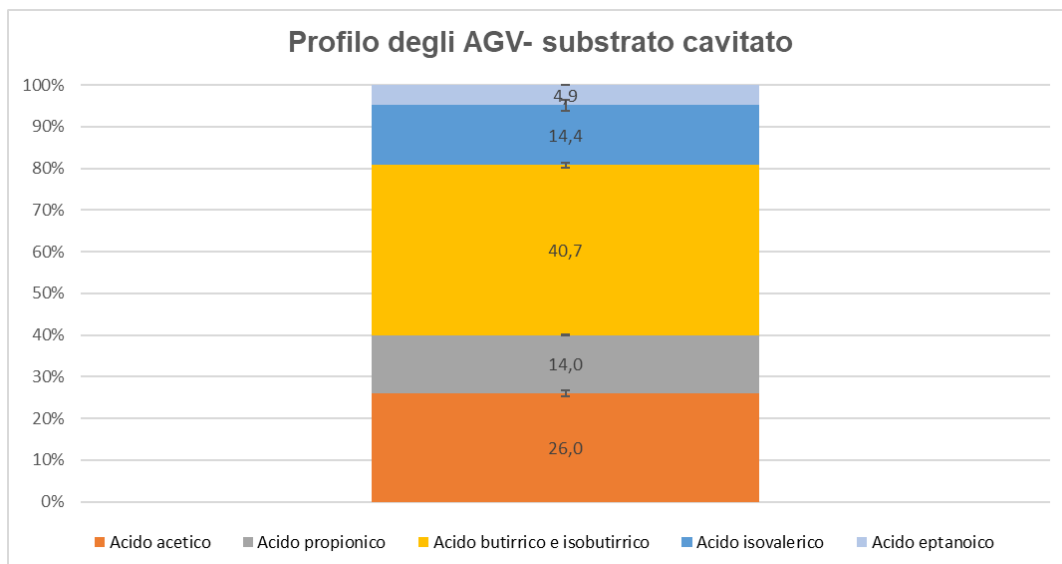


Figura 43. Valori medi del profilo degli AGV del substrato cavitato nella fase di stabilità del secondo test batch (%).

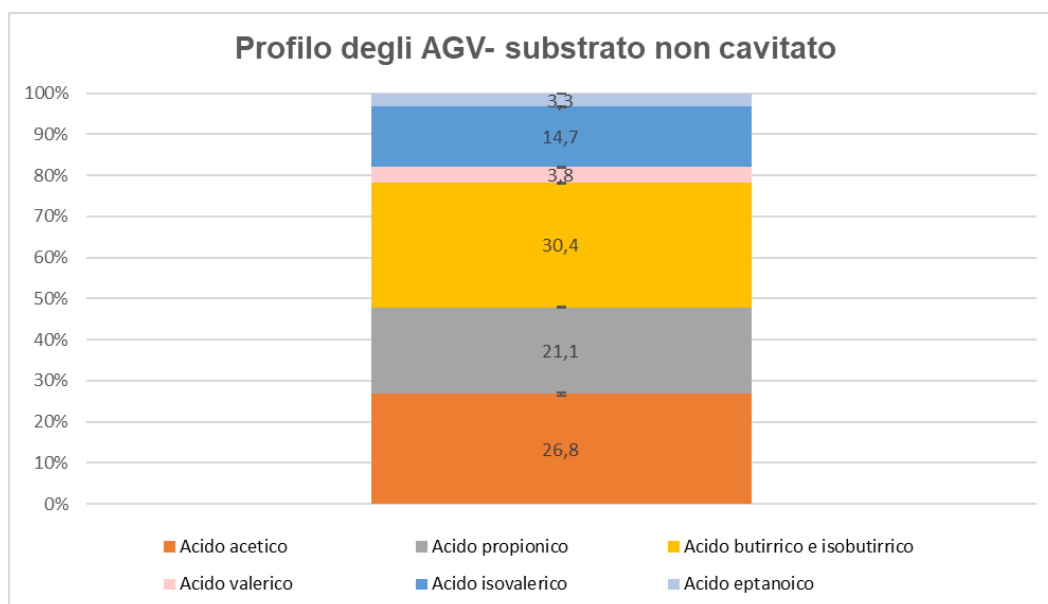


Figura 44. Valori medi del profilo degli AGV del substrato non cavitato nella fase di stabilità del secondo test batch (%).

La resa complessiva del cavitato, che include anche gli AGV prodotti durante la cavitazione, è pari a  $0,60 \pm 0,02 \text{ gCOD}_{AGV}/\text{g}_{VS(0)}$  ed è pressochè identica a quella del non cavitato, che è pari a  $0,60 \pm 0,01 \text{ gCOD}_{AGV}/\text{g}_{VS(0)}$ . Invece, la resa del cavitato dovuta al solo processo di fermentazione, ottenuta sottraendo gli AGV contenuti nella miscela cavitata agli AGV prodotti nel batch, è pari a  $0,38 \pm 0,02 \text{ gCOD}_{AGV}/\text{g}_{VS(0)}$  ed è inferiore del 37% in confronto alla resa del non cavitato. Come riportato nella tabella 16, il secondo test batch ha riportato concentrazioni di AGV e rese maggiori in entrambe le condizioni. Alla luce di questi risultati, i reattori sono stati alimentati in semi-continuo dopo aver constatato il calo della concentrazione di AGV per tre misurazioni consecutive.

Tabella 15. Parametri e rese del secondo test batch nella fase di stabilità.

Parametro	Unità di misura	Cavitato		Cavitato <sub>tot</sub>		Non cavitato	
		Valore	Dev. Std.	Valore	Dev. Std.	Valore	Dev. Std.
pH		5,425	± 0,171			5,287	± 0,011
AGV	gCOD <sub>AGV</sub> /L	11,82	± 0,45			15,75	± 0,25
Acido acetico	gCOD <sub>AGV</sub> /L	3,09	± 0,05			4,21	± 0,10
Acido propionico	gCOD <sub>AGV</sub> /L	1,69	± 0,02			3,34	± 0,06
Acido butirrico e isobutirrico	gCOD <sub>AGV</sub> /L	4,90	± 0,05			4,81	± 0,09
Acido valerico	gCOD <sub>AGV</sub> /L					0,60	± 0,01
Acido isovalerico	gCOD <sub>AGV</sub> /L	1,79	± 0,19			2,33	± 0,07
Acido eptanoico	gCOD <sub>AGV</sub> /L	0,60	± 0,00			0,54	± 0,01
Acido acetico	%	26,0	± 0,75			26,8	± 0,35
Acido propionico	%	14,0	± 0,08			21,1	± 0,06
Acido butirrico e isobutirrico	%	40,7	± 0,65			30,4	± 0,02
Acido valerico	%					3,8	± 0,09
Acido isovalerico	%	14,4	± 1,31			14,7	± 0,14
Acido eptanoico	%	4,9	± 0,12			3,3	± 0,16
[C <sub>3</sub> /(C <sub>3</sub> +C <sub>2</sub> )] <sub>AGV</sub>	moli/moli			0,28	± 0,02	0,36	± 0,00
Resa	gCOD <sub>AGV</sub> /g <sub>VS(0)</sub>	0,38	± 0,02	0,60	± 0,02	0,60	± 0,01
[AGV] <sub>max</sub>	gCOD <sub>AGV</sub> /L	12,16	± 0,16			16,04	± 0,01
Resa <sub>max</sub>	gCOD <sub>AGV</sub> /g <sub>VS(0)</sub>	0,39	± 0,01	0,62	± 0,01	0,61	± 0,00

Tabella 16. Confronto tra la concentrazione di AGV e le rese ottenute nel primo e nel secondo test batch per ciascun substrato.

Test	Substrato	[AGV]		Resa	
		gCOD <sub>AGV</sub> /L		gCOD <sub>AGV</sub> /gVS <sub>(0)</sub>	
		Valore	Dev.Std.	Valore	Dev.Std.
1°	Cavitato	7,26	± 0,35	0,35	± 0,03
2°	Cavitato	11,82	± 0,45	0,38	±0,02
1°test/2°test %		<b>-38,6</b>		<b>-7,9</b>	
1°	Cavitato <sub>tot</sub>			0,58	± 0,03
2°	Cavitato <sub>tot</sub>			0,60	±0,02
1°test/2°test %				<b>-3,3</b>	
1°	Non cavitato	8,85	± 0,15	0,55	± 0,01
2°	Non cavitato	15,75	± 0,25	0,6	±0,01
1°test/2°test %		<b>-43,8</b>		<b>-8,3</b>	

### 3.3.2 Test in semicontinuo

Alimentando i reattori in semi-continuo la concentrazione di AGV ha ricominciato a crescere, fino a raggiungere valori stabili dal giorno 26 al giorno 40 inclusi per il cavitato, pari a 3,8 HRT, e dal giorno 26 al giorno 41 inclusi per il non cavitato, pari a 2,6 HRT. Data la diminuzione dei TS e TVS dei fanghi procurati con l'ultimo prelievo e data la maggiore perdita di TS e TVS riscontrata nella seconda cavitazione, nell'ultimo periodo l'HRT è diminuito, passando da 5 d a 3,3 d per il cavitato e da 6,6 d a 5,2 d per il non cavitato. Le figure 45, 46 e 47 mostrano l'andamento della concentrazione degli AGV e del pH per tutta la durata del test, separando la fase batch di avviamento del reattore dalla fase di alimentazione in semi-continuo con una riga che taglia il grafico verticalmente.

Il cavitato, alimentato in semi-continuo dal giorno 13, ha raggiunto una concentrazione stabile pari a  $12,94 \pm 0,63$  gCOD<sub>AGV</sub>/L dopo 12 giorni (figura 46). Il non cavitato, alimentato in semi-continuo dal giorno 20, ha raggiunto una concentrazione stabile di  $18,23 \pm 0,51$  gCOD<sub>AGV</sub>/L dopo 6 giorni, la metà del tempo impiegato dal cavitato (figura 47). Complessivamente, i due reattori sono arrivati a stabilità nello stesso giorno e mostrano un'efficienza della fermentazione piuttosto buona se confrontata con lavori simili presenti in letteratura. La concentrazione di AGV raggiunta dal non cavitato è simile a quella ottenuta da Valentino et al. (2019), che ha toccato i 19,5 gCOD<sub>AGV</sub>/L utilizzando però un substrato più ricco costituito da fanghi attivi ispessiti e dalla frazione organica dei rifiuti solidi urbani (FORSU). Il test è stato svolto in condizioni confrontabili con questo lavoro di

tesi, ovvero in mesofilia (37°C), con un OLR=6,5-7 kgTVS/m<sup>3</sup>\*d, con un rapporto volumetrico tra i substrati 70:30 e a pH incontrollato, mentre l'HRT era maggiore e pari a 6 d. Al contrario, il cavitato ha raggiunto una concentrazione inferiore di circa 5 gCOD<sub>AGV</sub>/L rispetto al non cavitato, ma ha mostrato un'attività maggiore del 20% rispetto al non cavitato, pari a 1,01 gCOD<sub>AGV</sub>/gTVS<sub>(0)</sub>\* d. Le concentrazioni raggiunte in entrambe le condizioni sono confrontabili con quelle ottenute in uno studio sulla fermentazione mesofila di soli scarti alimentari, in cui è stato applicato un HRT= 3,5 d, simile a quello del cavitato alimentato con la miscela risultante dalla seconda cavitazione (Cheah et al., 2019). In questo studio, la concentrazione degli AGV è oscillata tra 3,65 ± 0,67 e 11,73 ± 2,37 g<sub>AGV</sub>/L a seconda delle caratteristiche degli scarti alimentari, che sono variate tra un prelievo e l'altro; è stato applicato un OLR=17,5 kgTVS/m<sup>3</sup>\*d ed il pH è stato mantenuto a 6. Al contrario, nel presente lavoro di tesi la concentrazione degli AGV ha raggiunto un valore stabile, pari a 7,84 ± 0,67 g<sub>AGV</sub>/L per il cavitato ed a 10,79 ± 0,33 g<sub>AGV</sub>/L per il non cavitato, nonostante l'HRT del cavitato fosse di soli 3,3, d. Tuttavia, le concentrazioni raggiunte sono inferiori a quelle ottenute da Moretto et al. (2019; 2020b), che hanno utilizzato sempre fanghi attivi ispessiti e FORSU in rapporto volumetrico 70:30, effettuando però un pretrattamento termico del substrato, che è stato portato a T=72°C per 72 h (Moretto et al., 2019) o per 48 h (Moretto et al., 2020b). Nel primo caso, è stata raggiunta una concentrazione di AGV pari a 39 ± 3 gCOD<sub>AGV</sub>/L, con HRT=6 d, OLR=7,7 kgVS/m<sup>3</sup>\*d e mantenendo il pH a 9 mediante aggiunta di NaOH (Moretto et al., 2019). Nel secondo caso, sono stati prodotti 30 ± 3 gCOD<sub>AGV</sub>/L a pH incontrollato, con HRT=5 d ed OLR=12-15 kgTVS/m<sup>3</sup>\*d. Pertanto, la fermentazione degli scarti mercatali e dei fanghi potrebbe essere ulteriormente ottimizzata, considerando però che negli studi citati sono stati utilizzati substrati più ricchi di sostanza organica biodegradabile, ovvero FORSU e fanghi attivi ispessiti.

Il pH, che negli ultimi tre giorni di batch era risalito a 7,168 ± 0,040 per il cavitato e a 6,521 ± 0,049 per il non cavitato, nella fase di stabilità si è assestato a 5,508 ± 0,138 per il cavitato e a 5,354 ± 0,016 per il non cavitato, che ha subito oscillazioni minori. Tale risultato è in accordo con quanto osservato nelle fermentazioni a pH incontrollato condotte utilizzando substrati e condizioni operative simili, in cui il pH si è assestato attorno a 5,0-5,5 grazie all'effetto tampone del fango (Valentino et al., 2019a; Moretto et al., 2020b; Wu et al., 2016). Gli studi in letteratura indicano che un pH compreso tra 5,5 e 6 è ottimale per la fermentazione della FORSU e dei rifiuti agroindustriali, poiché favorisce l'accumulo degli AGV e l'inibizione della metanogenesi (Bolzonella et al., 2018; Valentino et al., 2018; Jiang et al., 2013; Greses et al., 2020). La resa maggiore nella cofermentazione di scarti alimentari e fanghi di depurazione è stata ottenuta mantenendo un pH=9 (Moretto et al., 2019). Tuttavia, è stata raggiunta un'ottima resa anche fermentando gli stessi substrati a pH incontrollato, dimostrando quindi che un pretrattamento efficace può eliminare il costo e gli impatti dovuti al controllo del pH, se il fermentato così ottenuto ha le caratteristiche adatte per le applicazioni successive (Valentino et al., 2019).

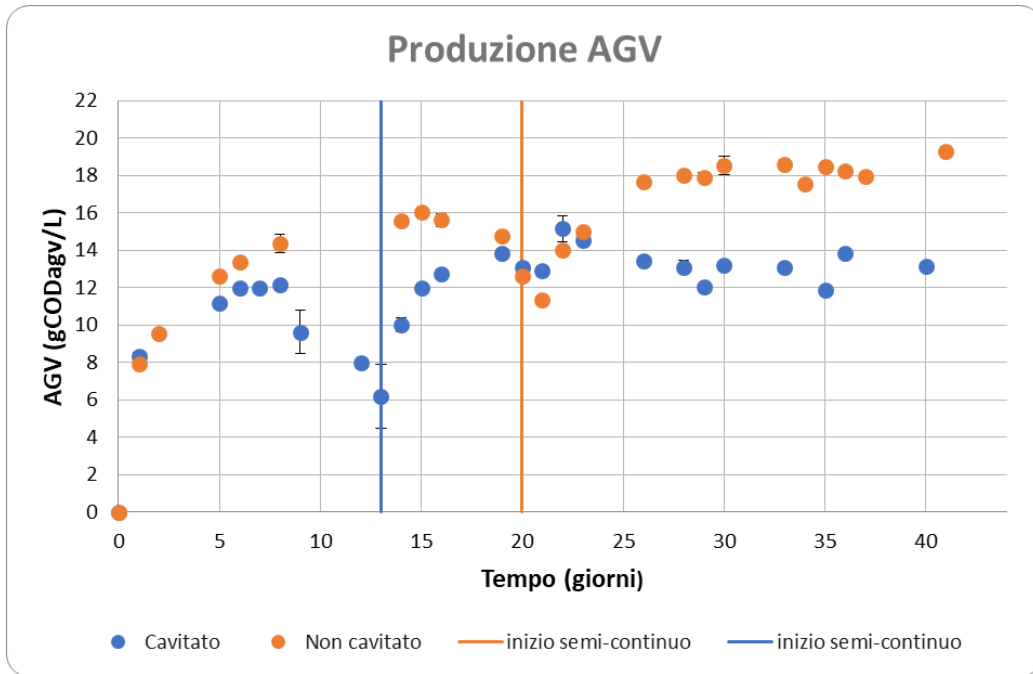


Figura 45. Andamento della produzione di AGV nel secondo test (substrato cavitato e non cavitato).

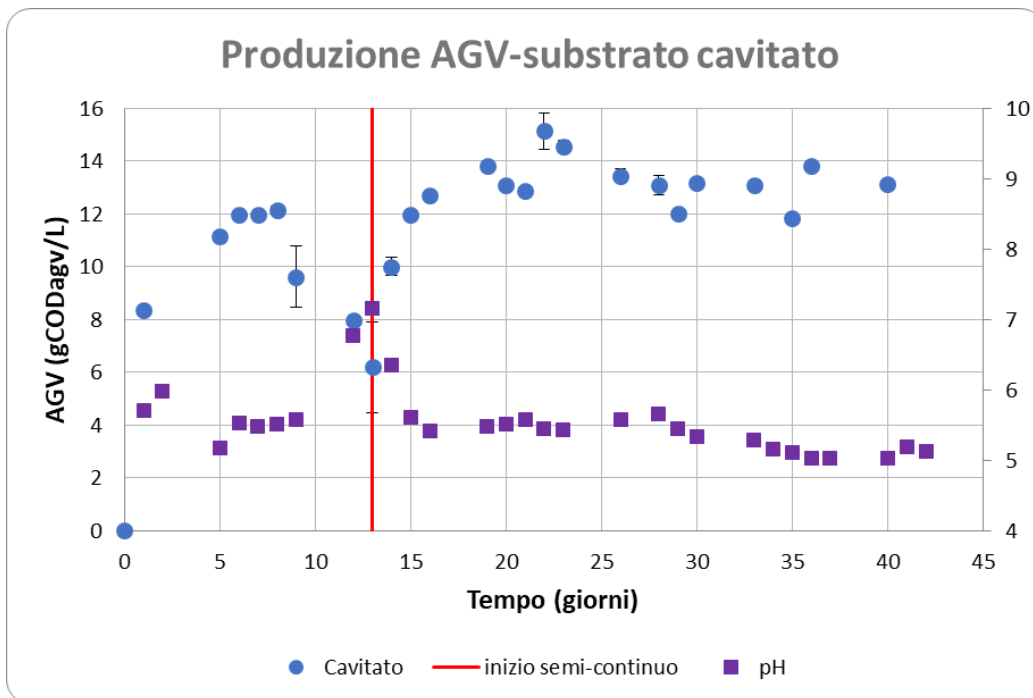


Figura 46. Andamento della produzione di AGV e del pH nel secondo test (substrato cavitato).



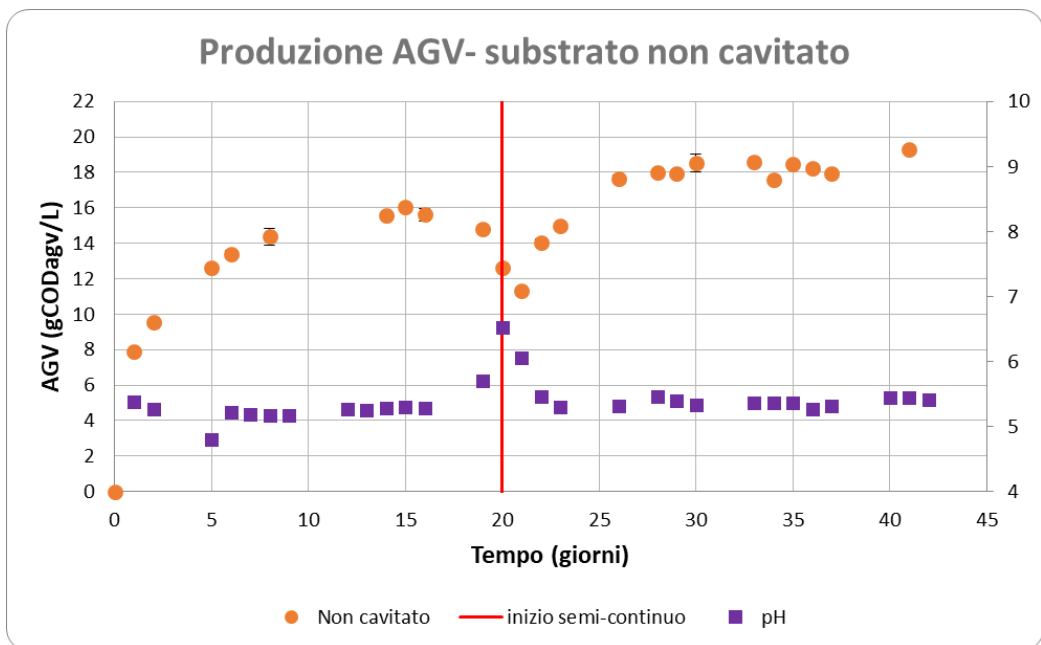


Figura 47. Andamento della produzione di AGV e del pH nel secondo test (substrato non cavitato).

L'attività misurata nel periodo di alimentazione in semicontinuo ha mostrato un andamento crescente in entrambe le condizioni, arrivando a  $1,01 \text{ gCOD}_{AGV}/\text{gTVS}_{(0)} \cdot \text{d}$  per il cavitato e a  $0,84 \text{ gCOD}_{AGV}/\text{gTVS}_{(0)} \cdot \text{d}$  per il non cavitato, la cui attività è inferiore nonostante raggiunga una maggiore concentrazione di AGV (figura 48).

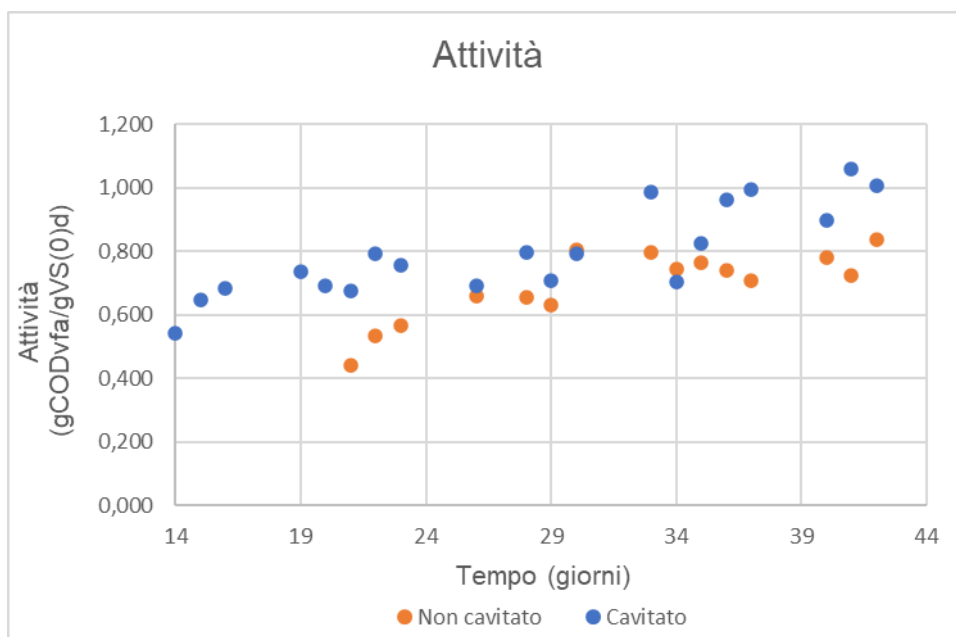


Figura 48. Attività del cavitato e del non cavitato nel semicontinuo.

Come mostrato nelle figure 49 e 50, il profilo degli AGV è rimasto stabile dal giorno 26 al giorno 42 inclusi relativamente agli acidi acetico, propionico, butirrico ed isobutirrico, che sommati hanno

costituito il 59,9% ed il 50,8% del totale per il cavitato e per il non cavitato rispettivamente. La percentuale degli altri acidi è risultata meno stabile, probabilmente a causa della variabilità delle caratteristiche dei substrati con cui sono stati alimentati i reattori. Da quando il cavitato (figura 49) è stato alimentato con la miscela cavitata autunnale (giorno 29), è stata osservata una progressiva diminuzione della percentuale di acido isovalerico dal 40,2% del giorno 28 al 17,8% del giorno 42. L'acido eptanoico è andato aumentando, seppur con qualche oscillazione, dall'8,7% del giorno 29 al 16,1% del giorno 42. Dal giorno 36 è stato sempre presente l'acido iso-esanoico, che in tutta la durata del test era stato riscontrato solo nei giorni 23 e 26, la cui concentrazione è progressivamente aumentata dal 3,1 al 5,4%. L'acido valerico è comparso solo occasionalmente ed in percentuali minime, pari al 3,3-4,3% del totale.

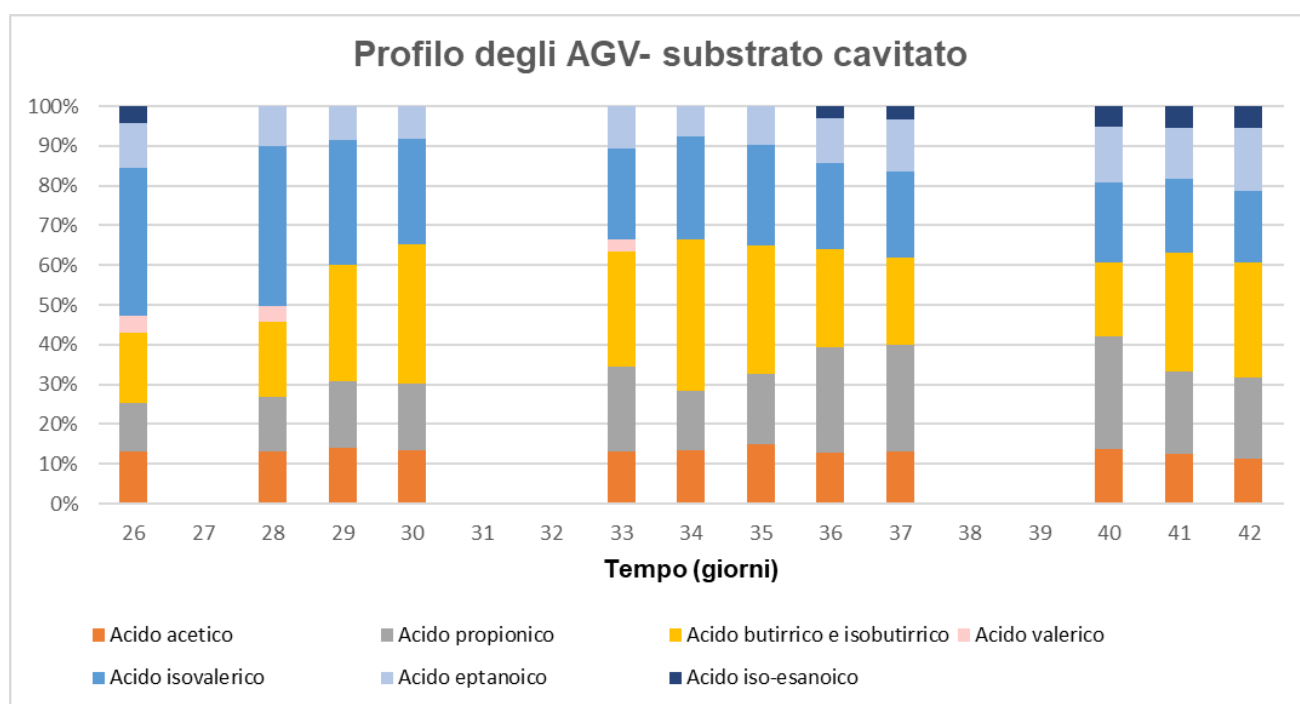


Figura 49. Andamento del profilo degli AGV del substrato cavitato nella fase di stabilità del semi-continuo ( $gCOD_{AGV}/L$ ).

Il profilo degli AGV principali ha mostrato un andamento più stabile nel non cavitato (figura 50), in cui comunque le percentuali degli acidi isovalerico, eptanoico ed iso-esanoico sono variate, analogamente a quanto osservato nel cavitato. La percentuale di acido isovalerico è diminuita progressivamente, passando dal 25,5 % del giorno 26 al 12,3 % del giorno 42 e l'acido eptanoico è andato aumentando, passando dall'8 % del giorno 26 al 22,2 % del giorno 42. L'acido iso-esanoico è stato riscontrato per la prima volta in tutta la durata del test nel giorno 33, con una percentuale che è aumentata dal 4,1 % al 14,3 % del giorno 42. Al contrario del cavitato, l'acido valerico è stato riscontrato durante tutto il periodo di stabilità, con una percentuale media del  $6,6 \pm 1,1$  %.

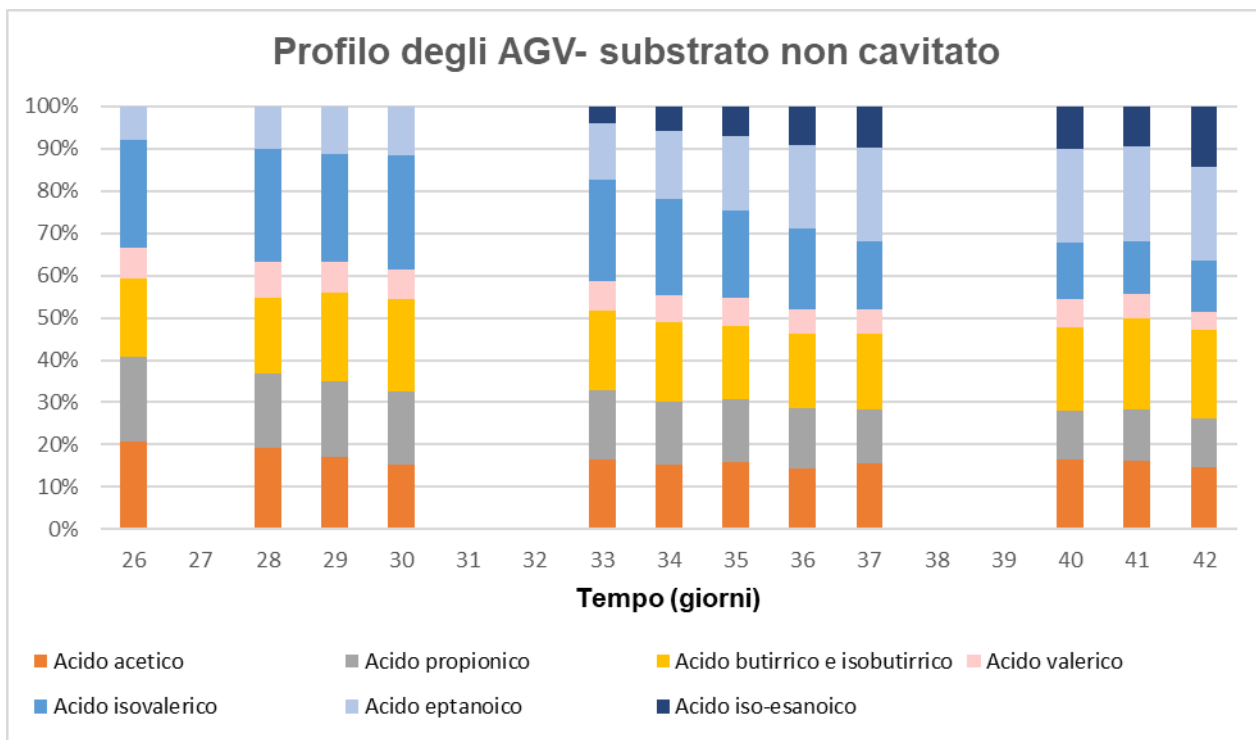


Figura 50. Andamento del profilo degli AGV del substrato non cavitato nella fase di stabilità del semi-continuo ( $\text{gCOD}_{\text{AGV}}/\text{L}$ ).

Le percentuali medie degli AGV durante tutto il periodo di stabilità sono risultate simili per il cavitato (figura 51) ed il non cavitato (figura 52), ad eccezione dell'acido valerico che è stato riscontrato solo occasionalmente nel cavitato, mentre ha costituito il  $6,6 \pm 1,1\%$  del non cavitato.

Un profilo degli AGV simile a quello riscontrato in questo lavoro di tesi è stato ottenuto da Moestedt et al. (2019) nel processo di fermentazione dei fanghi di depurazione con  $\text{pH}=6,1$ . In questo studio, la somma degli acidi acetico, propionico, butirrico ed isobutirrico ha rappresentato circa il 60% del totale, mentre il restante era costituito dagli acidi iso-valerico, iso-esanoico ed eptanoico, in percentuali simili a quelle riscontrate in questo lavoro di tesi (Moestedt et al., 2019). Anche il profilo degli AGV ottenuto da Feng et al. (2018) nel processo di fermentazione di scarti alimentari a  $\text{pH} 6$  è risultato confrontabile con quello riscontrato in questo lavoro di tesi relativamente all'acido acetico (16%) e agli AGV con 5 atomi di carbonio, rappresentati però dal valerico (29%) e non dall'iso-valerico. L'acido butirrico (39,9%) è stato il prodotto principale, con un'abbondanza decisamente maggiore rispetto al propionico (8,9%), mentre nel processo in semi-continuo studiato in questo lavoro di tesi la differenza nell'abbondanza di questi due acidi è risultata meno marcata. L'acido butirrico ha raggiunto percentuali confrontabili con Feng et al. (2018) solo nel secondo test batch, in cui ha rappresentato il 40,7% degli AGV nel cavitato ed il 30,4 % nel non cavitato. Anche nello studio di Moretto et al. (2019) gli AGV predominanti sono stati l'acetico (22-25%), il propionico (22-28%) ed il butirrico (20-22%), con concentrazioni non trascurabili di acido valerico, esanoico ed eptanoico. La distribuzione dei tre acidi più abbondanti ha presentato alcune differenze rispetto a questo lavoro di tesi, in cui l'acido acetico è stato riscontrato in percentuali

inferiori (13,2-16,4%), così come il propionico (15,1-19,7%) mentre il butirrico e l'isobutirrico costituivano il 27% nel cavitato. Questo è probabilmente dovuto sia alla diversa tipologia di scarti alimentari, costituiti da OFMSW anziché da scarti mercatali, sia alle diverse condizioni operative (pH=9), sia alla tipologia di pretrattamento (termico). La predominanza degli acidi acetico (22-23%), propionico (10-11%) e butirrico (41-42%) è stata confermata anche da uno studio condotto su OFMSW e fanghi attivi a pH=5,0-5,5 da Valentino et al. (2019), in cui sono state riscontrate anche concentrazioni non trascurabili di acido valerico (11-12%), iso-valerico (2-3%), esanoico (8-9%) ed eptanoico (4-6%).

Complessivamente, è stato ottenuto un profilo degli AGV coerente con quello riportato negli studi sulla cofermentazione di scarti alimentari e fanghi attivi presenti in letteratura, con alcune differenze principalmente imputabili alla tipologia di scarti alimentari e alle diverse tipologie di pretrattamento effettuate nei diversi studi. La distribuzione degli AGV indica la via metabolica prevalente, che in questo caso è la via metabolica acido-mista (glucosio → acetato+propionato+butirrato+altri AGV) (Zhou et al., 2018). La particolarità del profilo degli AGV ottenuto in questo lavoro di tesi è costituita da una buona concentrazione degli acidi iso-valerico e propionico, che insieme all'eptanoico sono gli AGV con numero dispari di atomi di carbonio utilizzati nel calcolo del rapporto molare  $[C_3/(C_3+C_2)]_{AGV}$ .

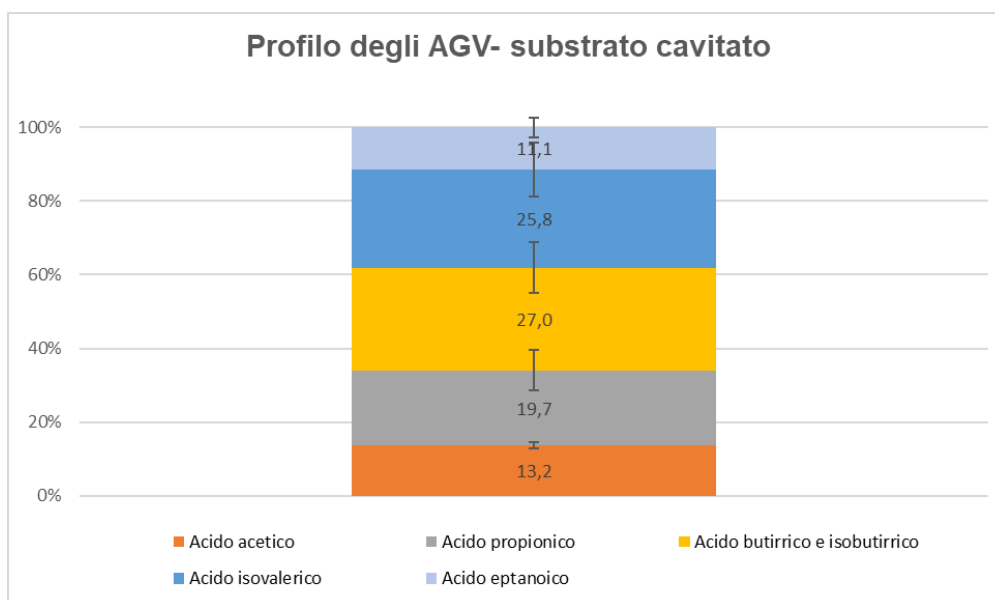


Figura 51. Valori medi del profilo degli AGV del substrato cavitato nella fase di stabilità del semi-continuo (%).

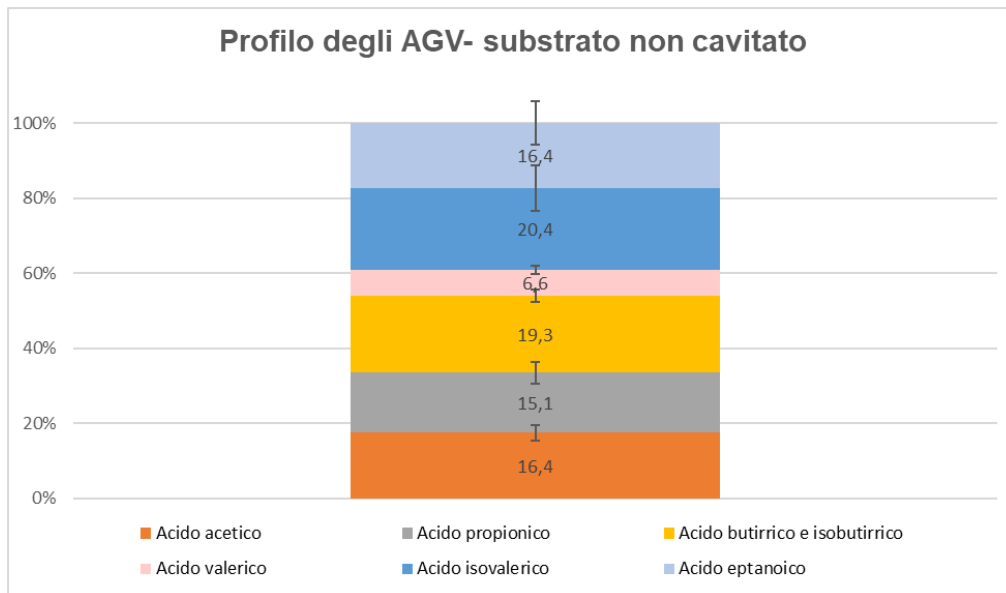


Figura 52. Valori medi del profilo degli AGV del substrato non cavitato nella fase di stabilità del semi-continuo (%).

Il rapporto molare  $[C_3/(C_3+C_2)]_{AGV}$ , calcolato sul periodo di stabilità, è risultato pari a  $0,53 \pm 0,04$  per il cavitato e a  $0,48 \pm 0,04$  per il non cavitato. Tali valori sono decisamente più alti di quelli ottenuti negli studi sulla fermentazione di substrati simili, pari a  $0,20 \pm 0,02$  in Valentino et al. (2019a;2019b) ed a  $0,38 \pm 0,03$  in Moretto et al. (2019), che ha ottimizzato il processo di fermentazione raggiungendo una concentrazione pari a ben  $39 \pm 3$  gCOD<sub>AGV</sub>/L. L'aumento del rapporto molare  $[C_3/(C_3+C_2)]_{AGV}$  ottenuto è potenzialmente interessante, perché dovrebbe permettere di sintetizzare PHA con una percentuale maggiore di monomeri non-3HB e quindi con una finestra di lavorazione più ampia (Bengtsson et al., 2010).

Le percentuali e le concentrazioni medie di ciascun AGV nel periodo di stabilità sono riportate nella tabella 17, insieme ai parametri di processo e alle rese.

La resa complessiva del cavitato è risultata pari a  $0,53 \pm 0,07$  gCOD<sub>AGV</sub>/g<sub>VS(0)</sub> ed è confrontabile con quella del non cavitato, pari a  $0,52 \pm 0,06$  gCOD<sub>AGV</sub>/g<sub>VS(0)</sub>. Tali valori sono superiori alla resa di 0,41-0,44 gCOD<sub>AGV</sub>/g<sub>VS(0)</sub> ottenuta da Valentino et al. (2019), che ha fermentato OFMSW e fanghi attivi senza pretrattamento, e alla resa di 0,40 gCOD<sub>AGV</sub>/g<sub>VS(0)</sub> raggiunta da Strazzera (2020) nella fermentazione di scarti alimentari sintetici e fanghi senza pretrattamento. Tuttavia, le rese ottenute in questo lavoro di tesi potrebbero essere aumentate ottimizzando il processo di fermentazione. Infatti, sono inferiori alle rese ottenute da Moretto et al. (2019; 2020b) applicando un pretrattamento termico (T=72°C), pari a 0,77 e 0,65 gCOD<sub>AGV</sub>/g<sub>VS(0)</sub>, e sono inferiori al valore di 0,79 gCOD<sub>AGV</sub>/g<sub>VS(0)</sub> ottenuta da Yin et al. (2016a) sottoponendo gli scarti alimentari ad un pretrattamento idrotermale (T=160°C).

Al contrario, la resa del cavitato dovuta al solo processo di fermentazione è risultata pari a  $0,33 \pm 0,10$  gCOD<sub>AGV</sub>/g<sub>VS(0)</sub> ed è inferiore del 36,6 % in confronto a quella del non cavitato.

Le rese medie calcolate sul periodo di stabilità (giorni 26-40 per il cavitato e 26-41 per il non cavitato) sono inferiori del 13-14% rispetto alle rese del batch.

Tabella 17. Parametri e rese del test in semi-continuo nella fase di stabilità.

Parametro	Unità di misura	Cavitato		Cavitato <sub>tot</sub>		Non cavitato	
		Valore	Dev. Std.	Valore	Dev. Std.	Valore	Dev. Std.
pH		5,508	±0,138			5,354	±0,016
[AGV]	gCOD <sub>AGV</sub> /L	12,94	± 0,63			18,29	± 0,49
Acido acetico	gCOD <sub>AGV</sub> /L	1,76	± 0,04			3,01	± 0,36
Acido propionico	gCOD <sub>AGV</sub> /L	2,49	± 0,81			2,94	± 0,39
Acido butirrico e isobutirrico	gCOD <sub>AGV</sub> /L	3,31	± 0,81			3,41	± 0,30
Acido valerico	gCOD <sub>AGV</sub> /L	0,52	± 0,90			1,25	± 0,14
Acido isovalerico	gCOD <sub>AGV</sub> /L	3,31	± 1,61			4,17	± 0,71
Acido eptanoico	gCOD <sub>AGV</sub> /L	1,36	± 0,26			2,61	± 0,87
Acido isoetanoico	gCOD <sub>AGV</sub> /L	0,21	± 0,30			0,72	± 0,75
Acido acetico	%	13,5	± 0,6			16,6	± 2,0
Acido propionico	%	19,5	± 5,9			15,8	± 2,5
Acido butirrico e isobutirrico	%	26,5	± 7,2			18,9	± 1,5
Acido valerico	%	3,2	± 6,3			6,9	± 0,7
Acido isovalerico	%	25,3	± 10,9			22,0	± 4,8
Acido eptanoico	%	10,4	± 2,0			15,2	± 5,1
Acido isoetanoico	%	1,6	± 2,2			4,6	± 4,3
[C <sub>3</sub> /(C <sub>3</sub> +C <sub>2</sub> )] <sub>AGV</sub>	moli/moli			0,53	±0,04	0,48	±0,04
Resa	gCOD <sub>AGV</sub> /g <sub>VS(0)</sub>	0,33	± 0,10	0,53	±0,07	0,52	± 0,06
[AGV] <sub>max</sub>	gCOD <sub>AGV</sub> /L	15,15	± 0,07			19,28	± 0,11
Resa <sub>max</sub>	gCOD <sub>AGV</sub> /g <sub>VS(0)</sub>	0,48	± 0,01	0,65	±0,01	0,64	± 0,02

### 3.4 Test del potenziale di biometanazione

L'andamento del SGP e dell'SMP dei substrati (fango, scarti mercatali, miscela cavitata e non cavitata) è rappresentato nelle figure 53 e 54. I valori finali, riportati nella tabella 18, sono confrontabili con gli studi presenti in letteratura. L'SGP del solo fango, pari a  $0,108 \pm 0,018$  m<sup>3</sup>biogas/kgTVS, è coerente con i valori riportati in letteratura per i fanghi secondari o misti, compresi tra 0,15 e 0,35 m<sup>3</sup>biogas/kgTVS (Leite et al., 2016; Metcalf, Eddy & Tchobanoglous, 1991). Allo stesso modo, l'SGP e l'SMP dei soli scarti mercatali, pari a  $0,587 \pm 0,001$  m<sup>3</sup>biogas/kgTVS e  $0,352 \pm 0,001$  m<sup>3</sup>CH<sub>4</sub>/kgTVS rispettivamente, sono confrontabili con i valori degli studi effettuati sugli scarti della lavorazione della frutta, che hanno mostrato un SGP di 0,35-0,68 m<sup>3</sup>biogas/kgTVS ed un SMP di 0,18-0,35 m<sup>3</sup>CH<sub>4</sub>/kgTVS (TIS, 2004), e sui residui delle colture alimentari, che hanno dato un SGP pari a 0,50-0,70 Nm<sup>3</sup>biogas/kgTVS (Reale et al., 2009). I valori

riscontrati per la FORSU invece sono leggermente superiori, con un SGP=0,75 m<sup>3</sup>biogas/kgTVS ed un SMP=0.45 ± 0.02 m<sup>3</sup>CH<sub>4</sub>/kgTVS, probabilmente a causa della diversa composizione del substrato, più ricco di materia organica biodegradabile rispetto agli scarti mercatali (Micolucci et al., 2018). La codigestione dei fanghi e degli scarti mercatali in rapporto 1:1 TVS/TVS ha aumentato notevolmente l'SGP e l'SMP rispetto alla digestione dei soli fanghi, raggiungendo valori di 0,476 ± 0,019 m<sup>3</sup>biogas/kgTVS e 0,285 ± 0,019 m<sup>3</sup>CH<sub>4</sub>/kgTVS, come già osservato in diversi studi, che riportano un SGP=0,50-0,51 m<sup>3</sup>biogas/kgTVS con una percentuale di CH<sub>4</sub>= 57-63% nella digestione anaerobica di una miscela di fanghi attivi e FORSU (Moretto et al., 2020a; Mattioli et al., 2017). I risultati dei test BMP effettuati sulle miscele mostrano che il pretrattamento di cavitazione non ne ha modificato le rese, che restano molto simili a quelle della miscela non cavitata (tabella 18). Questo risultato è in contrasto con quanto riportato in letteratura: Cesaro et al. (2012) riportano un aumento del 24% nella resa di biometanazione di una miscela di fanghi attivi e FORSU pretrattata con la sonocavitazione in un processo semi-continuo e tutti gli studi che applicano la sonocavitazione degli scarti alimentari ottengono un aumento del potenziale di biometanazione (Deepanraj et al., 2017). Inoltre, gli studi effettuati sulla cavitazione ultrasonica e idrodinamica dei fanghi attivi mostrano un aumento del potenziale di biometanazione pari al 40-50% con entrambi i tipi di pretrattamento (Habashi et al., 2016; 2018; Tian et al., 2018; Bao et al., 2015). Di solito, tale aumento corrisponde alla percentuale di aumento del sCOD, che quindi sembra un parametro fondamentale nel determinare il grado di disintegrazione dei fanghi a cui corrisponde un aumento del potenziale di biometanazione (Bhat & Gogate, 2021). Questo potrebbe indicare che l'aumento dell'sCOD della miscela riscontrato in questo lavoro di tesi dopo la cavitazione idrodinamica è stato dato principalmente dalla disgregazione degli scarti mercatali e che è necessario ottimizzare il processo per ottenere una rottura efficiente delle cellule che costituiscono i fanghi attivi.

I test sulle miscele potevano considerarsi chiusi al giorno 24, in cui la produzione di biogas è risultata inferiore all'1% del volume cumulativo netto di biogas, ma sono stati prolungati per ulteriore conferma dei risultati ottenuti.

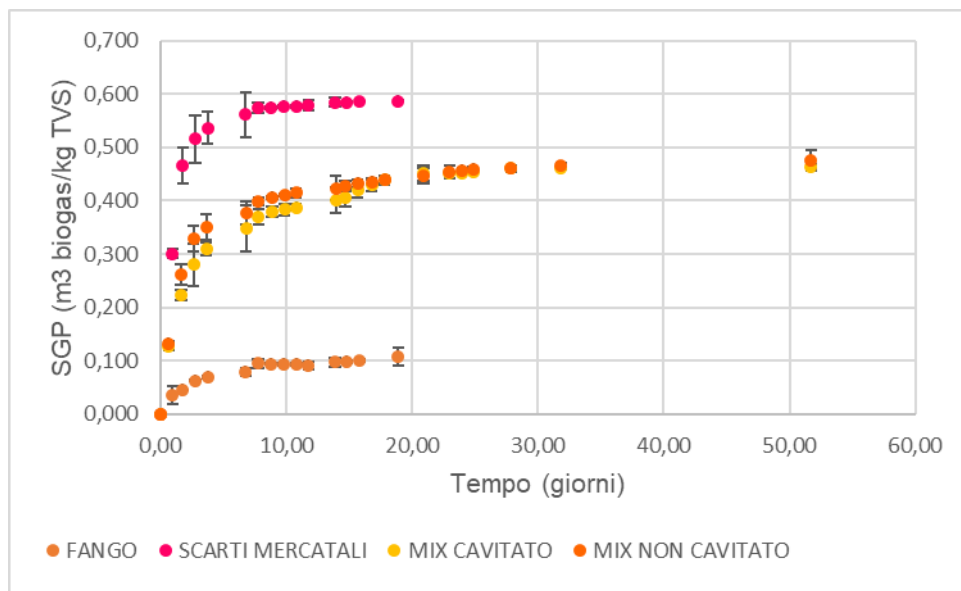


Figura 53. Andamento dell'SGP dei substrati (fango, scarti mercatali, miscela cavitata e non cavitata).

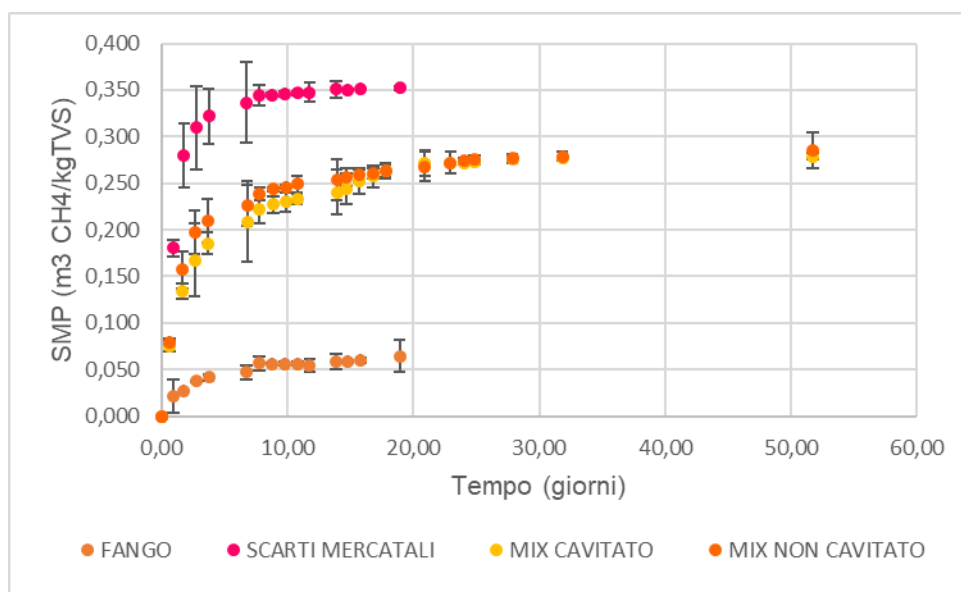


Figura 54. Andamento dell'SMP dei substrati (fango, scarti mercatali, miscela cavitata e non cavitata).

Tabella 18. Valori finali dei test BMP dei substrati (fango, scarti mercatali, miscela cavitata e non cavitata).

	Unità di misura	Fango	Scarti mercatali	Miscela cavitata	Miscela non cavitata
<b>SGP</b>	m <sup>3</sup> biogas/kg <sub>TVS</sub>	0,108	0,587	0,465	0,476
<b>SMP</b>	m <sup>3</sup> CH <sub>4</sub> /kg <sub>TVS</sub>	0,065	0,352	0,279	0,285
<b>Confidenza</b>		0,018	0,001	0,004	0,019
<b>Durata</b>	giorni	19	19	52	52



L'attività dei substrati è riportata sia su base TS che su base TQ nelle figure 55 e 56, in cui si osserva che l'attività delle miscele è decisamente superiore a quella del solo fango.

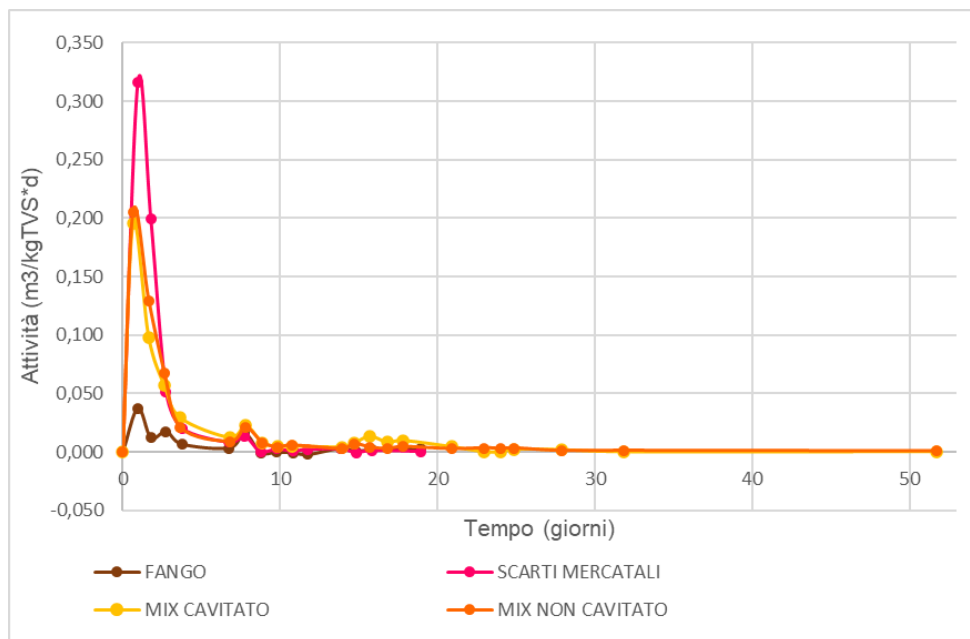


Figura 55. Attività dei substrati nei test BMP ( $m^3/kgTVS*d$ ).

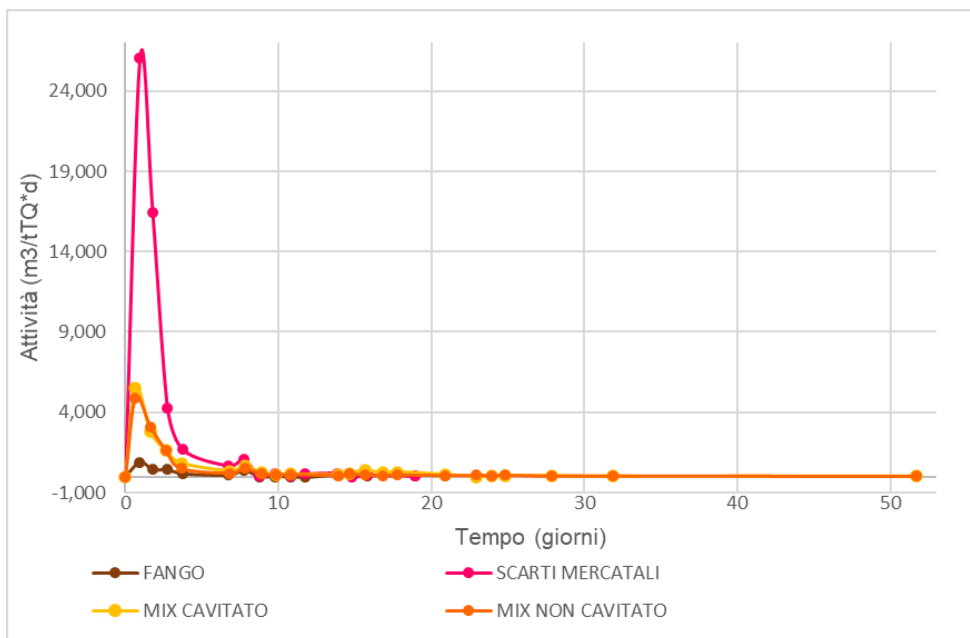


Figura 56. Attività dei substrati nei test BMP ( $m^3/tTQ*d$ ).

L'andamento dell'SGP e dell'SMP del fermentato e della sua frazione solida sono raffigurati nelle figure 57 e 58. I valori finali, indicati nella tabella 19, mostrano un  $SGP=0,42 \pm 0,0$   $m^3biogas/kgTVS$  per la frazione solida del fermentato cavitato ed un  $SGP=0,34 \pm 0,01$   $m^3biogas/kgTVS$  per la frazione solida del fermentato non cavitato. La differenza tra i due potrebbe essere attribuita alla migliore separazione solido-liquido del non cavitato, che è più denso e costituito da scarti con pezzatura più grossolana rispetto al cavitato. Tali valori sono leggermente

inferiori a quelli ottenuti da Moretto et al. (2020b) in un processo continuo, pari a  $0,44 \pm 0,02$  m<sup>3</sup>biogas/kgTVS costituiti per il 62-63% da CH<sub>4</sub>. Tuttavia, bisogna considerare che gli autori hanno diluito la frazione solida del fermentato con i fanghi attivi, aggiungendo quindi materiale organico rapidamente biodegradabile al COD lentamente biodegradabile rimasto nella frazione solida del fermentato.

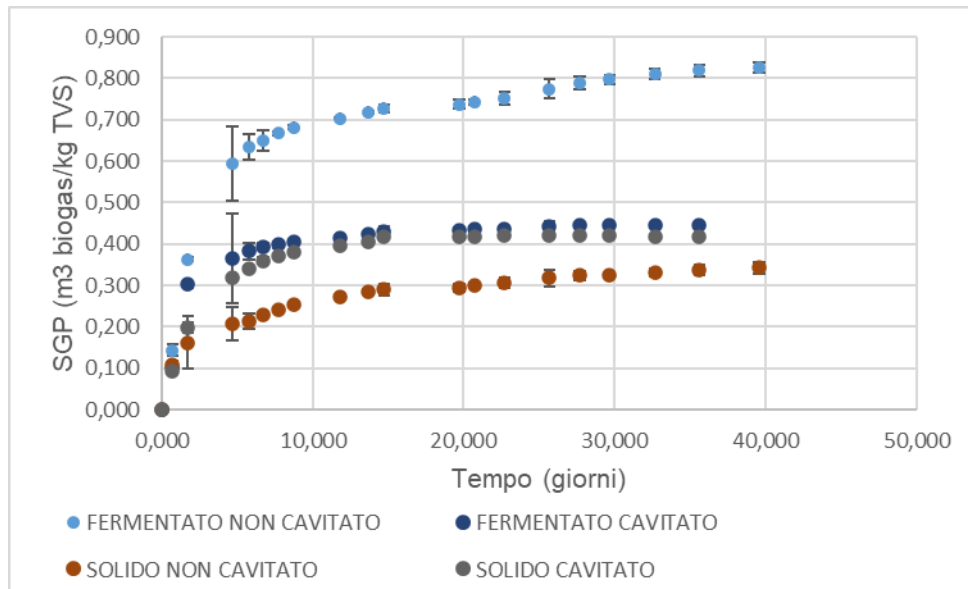


Figura 57. Andamento dell'SGP del fermentato e della frazione solida (cavitato e non cavitato).

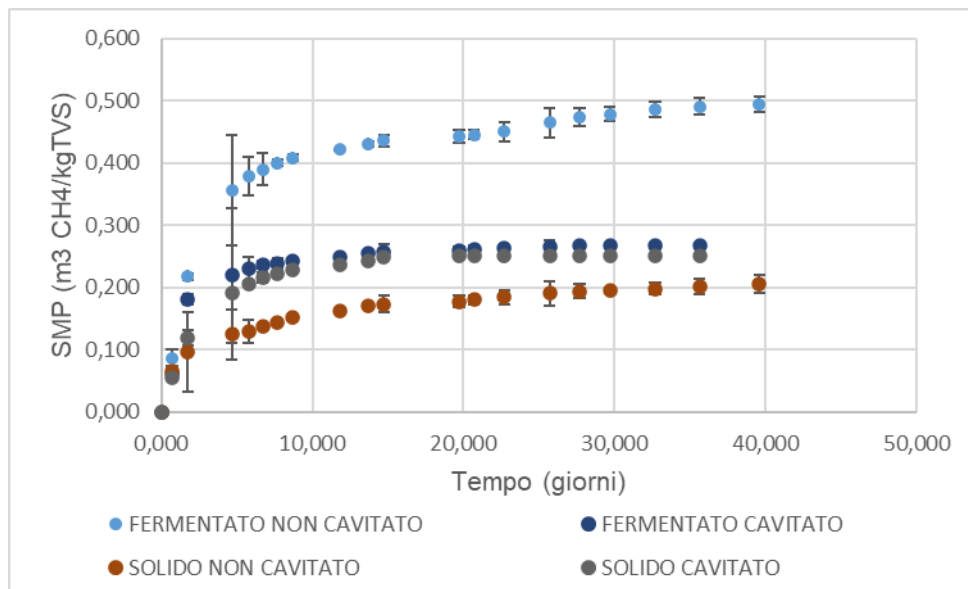


Figura 58. Andamento dell'SMP del fermentato e della frazione solida (cavitato e non cavitato).

Tabella 19. Valori finali dei test BMP del fermentato e della frazione solida (cavitato e non cavitato).

	Unità di misura	Fermentato cavitato	Fermentato non cavitato	Fraz. solida cavitata	Fraz. solida non cavitata
<b>SGP</b>	m <sup>3</sup> biogas/kg <sub>TVS</sub>	0,445	0,825	0,418	0,343
<b>SMP</b>	m <sup>3</sup> CH <sub>4</sub> /kg <sub>TVS</sub>	0,267	0,495	0,251	0,206
<b>Confidenza</b>		0,001	0,012	0,001	0,014
<b>Durata</b>	giorni	36	40	36	40

L'attività del fermentato e della sua frazione solida sono riportate sia su base TS che su base TQ nelle figure 59 e 60.

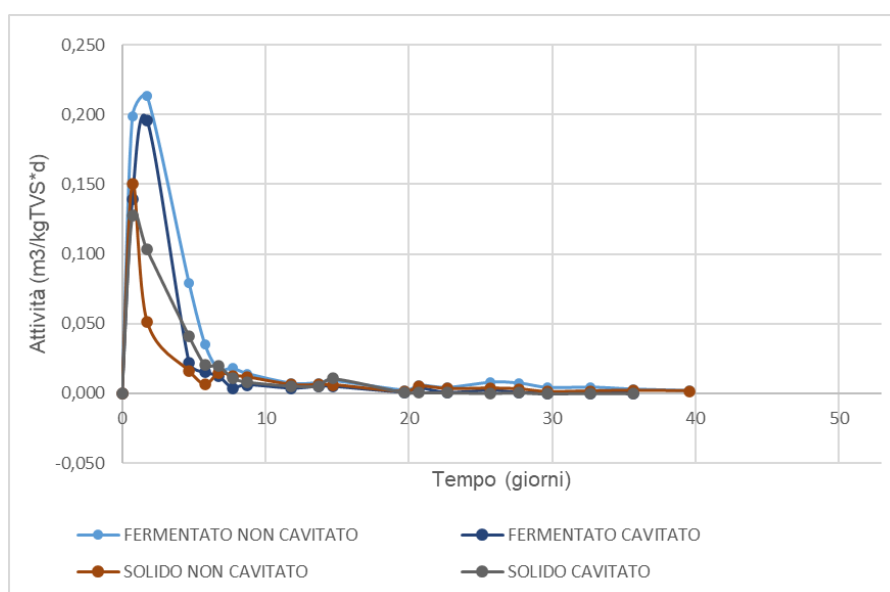


Figura 59. Attività del fermentato e della sua frazione solida nei test BMP (m<sup>3</sup>/kgTVS\*d).

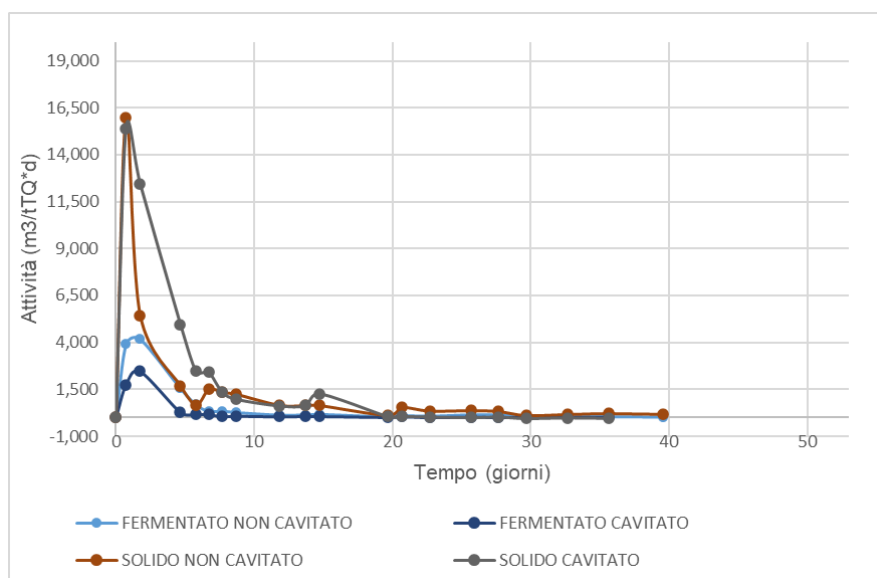


Figura 60. Attività del fermentato e della sua frazione solida nei test BMP (m<sup>3</sup>/tTQ\*d).

### 3.5 Struttura della comunità microbica

Come descritto nei materiali e metodi, le analisi della comunità microbiologica sono state condotte sui campioni di fermentato all'inizio dello stato stazionario ed alla fine del test. Non è stato ritenuto necessario caratterizzare la comunità microbiologica dell'inoculo (digestato anaerobico), che è già stata ampiamente studiata ed è composta principalmente dai phyla *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi* ed *Euryarchaeota* (Greses et al., 2020; Li et al., 2019). La letteratura conferma che la distribuzione dei prodotti della fermentazione dipende dal tipo di substrato, dal pH e dalle condizioni di fermentazione piuttosto che dal tipo di inoculo (Atasoy et al., 2019; Atasoy et al., 2020). L'inoculo determina il tipo di microrganismi introdotti nel sistema, ma la loro abbondanza relativa dipende dal tipo di substrato e dalle condizioni operative (Ramos-Suarez, 2021).

I risultati delle analisi microbiologiche condotte sui campioni di fermentato cavitato e non cavitato sono presentati di seguito. La discussione è riportata in coda ai risultati, suddivisa per phylum.

#### Inizio dello stato stazionario

Nei campioni prelevati all'inizio dello stato stazionario è stato identificato un numero di sequenze simile per il cavitato (101758) ed il non cavitato (106098), attribuibili principalmente ai phyla *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Proteobacteria*. Tra questi, i *Firmicutes* sono dominanti in entrambe le condizioni e costituiscono il 52,6% della comunità del cavitato ed il 47% del non cavitato e sono rappresentati dai generi *Mitsuokella*, *Megasphaera*, *Solobacterium*, *Ruminococcus\_1*, *Succiniclasicum* e *Lactobacillus*. Tra questi generi, il più abbondante nel cavitato è *Megasphaera* (16,1%), mentre gli altri sono presenti in percentuali che vanno dal 6,3 al 2,1%. Nel non cavitato i generi principali sono *Mitsuokella* (17,1%) e *Megasphaera* (13,9%), mentre gli altri sono presenti in percentuali inferiori al 5%.

I *Bacteroidetes*, invece, sono più abbondanti nel cavitato, in cui rappresentano il 25,7% del totale, che nel non cavitato, di cui costituiscono il 13,1%. In entrambi i casi il genere dominante è *Prevotella\_7*, con un'abbondanza del 20,6% nel cavitato, in cui è il genere principale, e del 5,1% nel non cavitato.

Al contrario, i *Proteobacteria* sono meno abbondanti nel cavitato (10,8%) e più abbondanti nel non cavitato (26,7%). Sono rappresentati da diversi generi, tra cui *Dechloromonas*, *Thauera*, *Lautropia*, *Rhodoferax*, *Sutterella*, *Ferribacterium* e *Sulfuritalea*.

La differenza principale tra le due condizioni all'inizio dello stato stazionario, quindi, risiede nella diversa abbondanza dei *Proteobacteria* e dei *Bacteroidetes*, probabilmente imputabile al processo di cavitazione, che potrebbe aver disgregato i carboidrati presenti nel substrato, sfavorendo quindi i *Proteobacteria*, implicati nella loro degradazione, e favorendo i *Bacteroidetes*, responsabili della degradazione delle proteine.

## Fine del test

L'analisi della comunità microbiologica del cavitato alla fine del test ha rivelato 79694 sequenze, circa 20000 in meno che all'inizio della fase di stabilità. Il phylum più abbondante è sempre quelli dei *Firmicutes* (47,4%), seguito dai *Proteobacteria* (19,7%) e dai *Bacteroidetes* (18,4%). Si osserva che l'abbondanza degli *Actinobacteria* è aumentata notevolmente, passando dal 6,7% all'inizio della stabilità all'11,1% (figura 61). A questi phyla appartengono le classi più abbondanti, i *Negativicutes* (38,7%), i *Bacteroidia* (18,3%), che rappresentano la quasi totalità dei *Bacteroidetes*, i *Gammaproteobacteria* (16,6%) ed i *Coriobacteriia* (10,8%), che rappresentano la quasi totalità del phylum *Actinobacteria* (figura 62).







	Taxon	%
	Firmicutes	47.4%
	Proteobacteria	19.7%
	Bacteroidetes	18.4%
	Actinobacteria	11.1%
	Nitrospirae	1.2%
	Others / Unclassified	2.2%

Figura 61. Phyla del cavitato alla fine del test.







	Taxon	%
	Negativicutes	38.7%
	Bacteroidia	18.3%
	Gammaproteobacteria	16.6%
	Coriobacteriia	10.8%
	Bacilli	5.0%
	Others / Unclassified	10.6%

Figura 62. Classi del cavitato alla fine del test.

La famiglia più rappresentata è sempre quella delle *Veillonellaceae* (38,5%), seguita dalle *Prevotellaceae* (12,7%) e dalle *Atopobiaceae* (10,8%), mentre le *Ruminococcaceae* costituiscono solo lo 0,6% e le *Erysipelotrichaceae* lo 0,7%. Invece, è aumentata la percentuale delle *Burkholderiaceae* e delle *Rhodocyclaceae* (figura 64). Il restante 28% è costituito da famiglie con abbondanza inferiore al 4,9%, tutte identificate, che contribuiscono alla diversità della comunità microbica.

Si osservano quattro generi dominanti, mentre tutti gli altri sono presenti in percentuali inferiori al 3%. I più abbondanti sono *Mitsuokella* (20,4%) e *Megasphaera* (16,8%) (phylum *Firmicutes*) di cui sono state identificate le specie *Mitsuokella uncultured\_bacterium* (17,4%) e *Megasphaera Ambiguous\_taxa* (3,6%) (figure 65 e 66). Segue poi *Prevotella\_7* (12,5%) e *Olsenella* (10,8%), che rappresenta l'intera famiglia delle *Atopobiaceae*. Sono state individuate molte altre specie con

abbondanza inferiore all'1,5%, molte delle quali non classificabili, che contribuiscono alla diversità della comunità microbica.

Taxon	%
Selenomonadales	38.7%
Bacteroidales	13.1%
Betaproteobacteriales	10.9%
Coriobacteriales	10.8%
Lactobacillales	5.0%
Others / Unclassified	21.5%

Figura 63. Ordini presenti nel cavitato alla fine del test.

Taxon	%
Veillonellaceae	38.5%
Prevotellaceae	12.7%
Atopobiaceae	10.8%
Burkholderiaceae	5.2%
Rhodocyclaceae	4.9%
Others / Unclassified	27.9%

Figura 64. Famiglie presenti nel cavitato alla fine del test.

Taxon	%
Mitsuokella	20.4%
Megasphaera	16.8%
Prevotella_7	12.5%
Olsenella	10.8%
uncultured	3.1%
Lactococcus	2.5%
Ferribacterium	2.1%
Lactobacillus	2.1%
Clostridium_sensu_stricto_1	1.7%
Thauera	1.5%
Others / Unclassified	26.5%

Figura 66. Generi presenti nel cavitato alla fine del test.

Taxon	%
Mitsuokella uncultured_bacterium	17.4%
Prevotella_7 unidentified_rumen_bacterium_12-7	5.7%
Prevotella_7 Ambiguous_taxa	3.8%
Megasphaera Ambiguous_taxa	3.6%
Clostridium_sensu_stricto_1 Clostridium_perfringens	1.5%
Others / Unclassified	68.0%

Figura 65. Specie del cavitato alla fine del test.

L'analisi della comunità microbiologica del non cavitato alla fine del test ha rivelato 96647 sequenze, circa 10000 in meno che all'inizio della fase di stabilità. Il phylum più abbondante stavolta è quello dei *Proteobacteria* (48,3%), seguito dai *Bacteroidetes* (24,6%) e dai *Firmicutes* (12,8%) (figura 67). A questi stessi phyla appartengono, nello stesso ordine, le tre classi più abbondanti: i *Gammaproteobacteria* (40,5%), i *Bacteroidia* (23,9%) e i *Negativicutes* (5,8%) (figura 68).







	Taxon	%
	Proteobacteria	48.3%
	Bacteroidetes	24.6%
	Firmicutes	12.8%
	Actinobacteria	6.4%
	Chloroflexi	1.9%
	Others / Unclassified	6.0%

Figura 68. Phyla presenti nel non cavitato alla fine del test.







	Taxon	%
	Gammaproteobacteria	40.5%
	Bacteroidia	23.9%
	Negativicutes	5.8%
	Alphaproteobacteria	5.5%
	Coriobacteriia	5.3%
	Others / Unclassified	19.0%

Figura 67. Classi presenti nel non cavitato alla fine del test.

Tra le famiglie più abbondanti emergono quelle delle *Rhodocyclaceae* (19,7%) e delle *Burkholderiaceae* (11,5%), entrambe appartenenti al phylum *Bacteroidetes*, classe *Gammaproteobacteria*, ordine *Betaproteobacteriales*. La seconda famiglia più rappresentata è quella delle *Prevotellaceae* (12,4%) (phylum *Bacteroidetes*, classe *Bacteroidia*, ordine *Bacteroidales*), mentre le *Veillonellaceae* diminuiscono notevolmente rispetto all'inizio della stabilità, costituendo solo il 4,6% della comunità (figura 70). Sono presenti molte altre famiglie con un'abbondanza inferiore al 4%, tutte identificate, che contribuiscono alla diversità della comunità microbica.

I generi più abbondanti sono *Ferribacterium* (13,9%), della famiglia *Rhodocyclaceae*, e *Prevotella\_7* (12,4%), della famiglia *Prevotellaceae*, entrambi presenti anche all'inizio della fase di stabilità ma in percentuali inferiori, pari al 3,0 e al 5,1% rispettivamente. *Mitsuokella* è sempre presente, passando però da genere dominante a rappresentare solo il 2,4% della comunità. Infine, si osserva che l'abbondanza di *Olsenella* aumenta, passando dallo 0,7% al 5,3% (figura 71). A livello di specie, ad eccezione delle prime 5 indicate in figura 72, la comunità microbica appare composta da molte specie diverse con un'abbondanza inferiore all'1%, che contribuiscono alla

diversità della comunità microbica. Tuttavia, non è stato possibile identificare una buona parte di esse.

Taxon	%
Betaproteobacteriales	32.4%
Bacteroidales	13.9%
Chitinophagales	7.2%
Selenomonadales	5.8%
Coriobacteriales	5.3%
Others / Unclassified	35.4%

Figura 72. Ordini presenti nel non cavitato alla fine del test.

Taxon	%
Rhodocyclaceae	19.7%
Prevotellaceae	12.4%
Burkholderiaceae	11.5%
Atopobiaceae	5.3%
Veillonellaceae	4.6%
Others / Unclassified	46.5%

Figura 69. Famiglie presenti nel non cavitato alla fine del test.

Taxon	%
Ferribacterium	13.9%
Prevotella_7	12.4%
uncultured	9.0%
Olsenella	5.3%
Mitsuokella	2.4%
Dokdonella	2.1%
metagenome	2.1%
Ferruginibacter	1.9%
Ambiguous_taxa	1.9%
Rhodoferax	1.8%
Others / Unclassified	47.2%

Figura 71. Generi presenti nel non cavitato alla fine del test.

Taxon	%
Prevotella_7	11.4%
unidentified_rumen_bacterium_12-7	
Mitsuokella uncultured_bacterium	1.7%
Acidaminococcus Ambiguous_taxa	1.1%
Arcobacter Arcobacter_cryaerophilus	1.1%
uncultured	1.1%
uncultured_Saprosiraceae_bacterium	
Others / Unclassified	83.6%

Figura 70. Specie presenti nel non cavitato alla fine del test.



## Discussione

Le analisi condotte hanno permesso di individuare un numero simile di sequenze all'inizio della fase di stabilità, pari a 101758 per il cavitato ed a 106098 per il non cavitato. Il numero di sequenze diminuisce nei campioni prelevati alla fine del test, in cui le sequenze riscontrate nel cavitato ammontano a 79694, quelle nel non cavitato a 96647. In entrambi i casi, quindi, il numero di sequenze è diminuito con il tempo, e questo potrebbe essere dovuto ad una speciazione della comunità microbiologica. La diminuzione del cavitato è più accentuata e potrebbe essere dovuta alla diminuzione dell'HRT, che potrebbe aver determinato il *washout* dei microrganismi che presentano le cinetiche di crescita più lente.

La comunità microbica dei campioni analizzati è composta quasi esclusivamente da microrganismi appartenenti al regno dei *Bacteria*, mentre gli *Archaea* sono assenti o presenti in minima percentuale (0,1-0,8%). Questo indica che per favorire i microrganismi fermentativi è sufficiente applicare le condizioni operative che favoriscono la fermentazione, senza la necessità di applicare pretrattamenti o composti chimici volti a sopprimere i metanogeni, come sperimentato in alcuni studi (Yin et al., 2016a; Sarkar&Mohan, 2017).

In tutti i campioni, la struttura della comunità microbica individuata è coerente con quanto riportano gli studi condotti sugli scarti alimentari (Yin et al., 2016a; Zhang et al., 2020; Greses et al., 2020) e sui fanghi di depurazione (Iglesias-Iglesias et al., 2019; Gao et al., 2019). Infatti, i phyla dominanti sono quelli dei *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* e *Actinobacteria*.

### Firmicutes

I *Firmicutes* sono sempre i più abbondanti nel cavitato e all'inizio della stabilità nel non cavitato, con percentuali che vanno dal 47 al 52,6%, simili a quelle osservate nella fermentazione degli scarti alimentari (Yin et al., 2016a), dei fanghi di depurazione (Gao et al., 2019) e di acque marroni e scarti alimentari (Lim et al., 2013). I batteri del phylum *Firmicutes* sono coinvolti nelle fasi di idrolisi e acidogenesi del processo di fermentazione anaerobica e pertanto riescono a degradare i composti organici contenuti negli scarti mercatali vegetali ed in particolare i carboidrati (Garcia-Peña et al., 2011).

In ogni campione sono state identificate le classi *Negativicutes*, *Clostridia*, *Bacilli*, *Erysipelotrichia*.

La classe dominante è quella dei *Negativicutes*, rappresentata perlopiù dalla famiglia delle *Veillonellaceae* e in misura minore da quella delle *Acidaminococcaceae*.

A livello di famiglia, le *Veillonellaceae* (*Firmicutes*, *Negativicutes*, *Selenomonadales*) sono sempre le più abbondanti nel cavitato, in cui aumentano dal 22% all'inizio della fase di stabilità al 38,5% alla fine del test. Nel non cavitato, invece, la loro abbondanza diminuisce alla fine del test, passando dal 33,8% al 4,6%. Diversi studi identificano i microrganismi appartenenti alle

*Veillonellaceae* come produttori di propionato attraverso il consumo di H<sub>2</sub> e la degradazione del lattato o del succinato, ma le caratteristiche metaboliche variano tra le diverse specie (Cohen et al. 1985; Mariakakis et al. 2011). Tuttavia, alla loro diminuzione nel non cavitato non è seguita da una variazione nel profilo degli AGV, probabilmente grazie alla diversità dei microrganismi presenti.

Alla famiglia delle *Veillonellaceae* appartengono i generi *Mitsuokella* e *Megasphaera*, che sono dominanti nel non cavitato all'inizio della stabilità, in cui rappresentano rispettivamente il 17,1% ed il 13,9% della comunità, e nel cavitato alla fine del test, in cui rappresentano rispettivamente il 20,4% ed il 16,8% della comunità. *Megasphaera* è il secondo genere più abbondante (16,1%) anche nel cavitato all'inizio della stabilità, in cui invece *Mitsuokella* rappresenta solo il 4,9%. Nel non cavitato alla fine del test, invece, *Mitsuokella* rappresenta solo il 2,4% e *Megasphaera* lo 0,7% della comunità.

I microrganismi del genere *Megasphaera* sono anaerobi obbligati non sporigeni che nei processi di fermentazione possono produrre gli acidi acetico, propionico, butirrico e valerico a partire da acido lattico e glucosio e possono utilizzare gli acidi lattico ed acetico per produrre acido butirrico ed H<sub>2</sub> (Moreno-Andrade et al., 2015; Weimer & Moen, 2013). Uno studio sulla variazione del profilo dei VFA e della comunità microbica nel processo di fermentazione acidogenica degli scarti alimentari ha mostrato che *Megasphaera* diventa dominante a pH compresi tra 5 e 6, con un'abbondanza del 24,26-27,54%, e che riveste un ruolo cruciale nella conversione dell'acido lattico ad acido acetico (Feng et al., 2018). Tali caratteristiche sono coerenti con quanto osservato nel non cavitato all'inizio della stabilità e nel cavitato alla fine del test. Inoltre, i microrganismi del genere *Megasphaera* sono considerati presunti produttori di H<sub>2</sub> nei processi di fermentazione mesofila (Cabrol et al., 2017). In uno studio che tratta le acque reflue delle melasse di un'industria di raffinazione della canna da zucchero con una fermentazione alcolica, *Megasphaera elsdenii* è il principale presunto produttore di H<sub>2</sub> ed etanolo: infatti, è stata identificata una sequenza che codifica per il gene della Fe-idrogenasi che conferma il contributo di questa specie alla produzione di H<sub>2</sub> (Xing, Ren & Rittmann, 2008). La stessa specie è dominante ed è considerata la principale produttrice di H<sub>2</sub> anche in altri processi di fermentazione che non operano in condizioni di anaerobiosi stretta (Marounek, Fliegrova & Bartos 1989; Ohnishi et al. 2010, 2012). Anche nella fermentazione del siero di latte con inoculo costituito da fango acidogenico e nella fermentazione degli scarti alimentari *Megasphaera* è uno dei principali presunti produttori di H<sub>2</sub> (Castellò et al., 2009; Moreno-Andrade et al., 2015). Tuttavia, il ruolo ed il contributo di *Megasphaera* alla produzione di H<sub>2</sub> non sono ancora chiari (Cabrol et al., 2017).

I microrganismi appartenenti al genere *Mitsuokella* sono stati rinvenuti solo in uno studio sulla cofermentazione di scarti alimentari e fanghi di depurazione con un'abbondanza dell'8,54% nella miscela di alimentazione e del 5,38% nella fermentazione condotta a pH 7 (Cheng et al., 2014). Le

informazioni reperibili in letteratura su *Mitsuokella* sono molto scarse e la sua presenza sembra una peculiarità del processo di fermentazione condotto in questo lavoro di tesi.

### *Bacteroidetes*

I *Bacteroidetes* sono fra i tre phyla più abbondanti in tutti i campioni, con una percentuale che va dal 13,1% al 25,7%, simili a quelle osservate negli studi condotti sulla fermentazione dei fanghi di depurazione (Iglesias-Iglesias, 2019), di scarti alimentari (Yin et al., 2016a), di acque marroni e scarti alimentari (Lim et al., 2014) e nella fermentazione del glucosio (Atasoy et al., 2019).

I *Bacteroidetes* sono notoriamente implicati nella degradazione delle proteine, che vengono metabolizzate per generare NH<sub>3</sub> ed AGV quali acetato, propionato e succinato (Rivière et al., 2009). Sembra che la loro crescita non venga influenzata dai carboidrati, ma che sia invece favorita dagli idrolisati delle proteine (Rosenberg et al., 2014). Inoltre i *Bacteroidetes*, insieme ai *Firmicutes*, idrolizzano i carboidrati negli esosi e pentosi che li costituiscono e che vengono quindi metabolizzati attraverso la fermentazione acido-mista, in cui il piruvato è il principale composto intermedio, e infine trasformati in AGV (Hong et al., 2011).

In ogni campione i *Bacteroidetes* dominanti appartengono alla classe *Bacteroidia*, ordine *Bacteroidales*, famiglia *Prevotellaceae*, genere *Prevotella*. È sempre presente anche la classe *Ignavibacteria* ma in percentuali minime (0,5-0,6%), e nel solo cavitato alla fine del test sono state individuate anche le classi *Chitinophagales* (7,2%), *Flavobacteriales* (1,3%), *Sphingobacteriales* (0,9%) e *Cytophagales* (0,6%).

Il genere *Prevotella* è costituito da microrganismi asaccarolitici, anaerobici e proteolitici, in grado di produrre NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ed acidi organici durante la fermentazione degli amminoacidi. La produzione di ammonio contribuisce a neutralizzare gli acidi, mantenendo stabile il pH (Lim et al., 2014).

### *Proteobacteria*

Anche i *Proteobacteria* sono fra i tre phyla più abbondanti di tutti i campioni, in accordo con quanto riscontrato negli studi presenti in letteratura su substrati simili (Iglesias-Iglesias 2019, Lim et al., 2013; Yin et al., 2016a). Sono presenti in percentuale maggiore nel non cavitato, in cui alla fine del test diventano dominanti, passando dal 26,7% al 48,3%. Il loro aumento si osserva anche nel cavitato, in cui passano dal 10,8% al 19,7% alla fine del test.

I *Proteobacteria* sono costituiti per la maggior parte da microrganismi aerobi o anaerobi facoltativi e, nei processi di fermentazione, sono implicati nelle fasi di idrolisi e di acidificazione (Chen et al., 2016).

In ogni campione i *Proteobacteria* dominanti appartengono alla classe *Gammaproteobacteria*, ordine *Betaproteobacteriales*, famiglie *Rhodocyclaceae* e *Burkholderiaceae*. In tutti i campioni

sono presenti anche le classi *Alphaproteobacteria* e *Deltaproteobacteria*, ma in percentuali inferiori (0,2- 6%). La presenza degli *Alphaproteobacteria* è stata associata alla degradazione dei carboidrati, presenti nei substrati forniti (Chen et al., 2017). I *Betaproteobacteriales* sono stati riscontrati solo in alcuni studi riguardanti la fermentazione di scarti alimentari (Wu et al., 2015) e di fanghi di depurazione (Wu et al., 2016; Iglesias-Iglesias, 2019), mentre non sono presenti nel resto della letteratura studiata e pertanto sembrano caratteristici del processo di fermentazione svolto in questo lavoro di tesi.

Stando alle nostre conoscenze, la famiglia delle *Rhodocyclaceae* è stata identificata in uno studio sulla fermentazione di scarti alimentari e fanghi di depurazione sia singolarmente che in miscela, in cui è rappresentata principalmente dai generi *Thauera* e *Dechloromonas*, identificati anche in questo lavoro di tesi (Wu et al., 2016). Un altro studio riporta che le *Rhodocyclaceae* sono una delle famiglie principali in un processo BNR acclimatato con il liquido proveniente dalla fermentazione degli scarti alimentari, in cui i generi *Thauera* e *Dechloromonas* sono implicati nella rimozione del nitrato (Tang et al., 2018; Hu et al., 2020).

### *Actinobacteria*

Gli *Actinobacteria* sono stati rinvenuti in tutti i campioni con una percentuale crescente dall'inizio della fase di stabilità alla fine del test. Sono più abbondanti nel cavitato, in cui passano dal 6,7 all'11,1%, mentre nel non cavitato passano dall'1,2% al 6,4%. In ogni campione gli *Actinobacteria* dominanti appartengono alla classe *Coriobacteriia*, ordine *Coriobacteriales*, famiglia *Atopobiaceae*, genere *Olsenella*. Sono presenti anche le classi *Actinobacteria* e *Acidimicrobiia*, seppur con percentuali minime (0,1-0,6%).

I microrganismi appartenenti a questo phylum giocano un ruolo importante nella degradazione della cellulosa, generando propionato ed acetato. In particolare *Olsenella*, il genere aerotollerante che rappresenta la quasi totalità degli *Actinobacteria* determinati in questo studio, è un noto produttore di acido lattico, acido acetico ed H<sub>2</sub> nel processo di fermentazione degli scarti alimentari a pH 5-6 (Feng et al., 2018; Li et al., 2011; Olsen et al., 1991). Si ipotizza che il metabolismo del glucosio da parte di *Olsenella* avvenga attraverso la via metabolica di Embden-Meyerhof-Parnas, l'unica in grado di convertire il piruvato ad acetil-CoA con produzione di H<sub>2</sub> (Feng et al., 2018). Sono stati identificati sia nelle fermentazioni dei residui agroindustriali (Greses et al., 2020), sia in quelle dei fanghi di depurazione (Iglesias-Iglesias et al., 2019) e pertanto ci si aspettava la loro presenza nella comunità microbiologica di questo lavoro di tesi.

## 4. Conclusioni

Nel presente lavoro di tesi è stata studiata la valorizzazione degli scarti mercatali vegetali e dei fanghi di depurazione, combinando la co-fermentazione per la produzione di composti ad alto valore aggiunto (AGV) e la digestione anaerobica della frazione solida del fermentato per la produzione di biogas.

Inoltre, è stata valutata l'efficacia del pretrattamento di cavitazione idrodinamica della miscela, che a livello visivo ha determinato il rimpicciolimento ed il diradamento dei fiocchi dei fanghi attivi e la disgregazione degli scarti mercatali. A livello chimico, ha determinato un aumento del sCOD pari al 39% nella prima cavitazione ed al 43% nella seconda, principalmente dovuto alla solubilizzazione dei TS e TVS, che infatti hanno subito una diminuzione. A livello applicativo, l'efficacia del pretrattamento è stata valutata sulla produzione degli AGV e sulle rese di biometanazione. Infine, è stata analizzata la struttura della comunità microbiologica per verificare eventuali differenze.

Per quanto riguarda la produzione di AGV, è stato osservato che l'attività del cavitato nel regime di alimentazione semi-continuo è aumentata del 20% rispetto al non cavitato, con un valore di 1,01 gCOD<sub>AGV</sub>/gTVS<sub>(0)</sub> d. Tuttavia, la cavitazione non ha determinato un aumento delle rese, che sono simili per le due condizioni in tutti i test effettuati e nel semi-continuo si assestano intorno ad un buon valore pari a 0,52-0,53 gCOD<sub>AGV</sub>/gTVS<sub>(0)</sub>, maggiore rispetto ad alcuni studi su substrati simili (Strazzera, 2020; Valentino et al., 2019a) ma inferiore alle rese ottenute con un pretrattamento termico, pari a 0,77 e 0,65 gCOD<sub>AGV</sub>/gTVS<sub>(0)</sub> (Moretto et al., 2019;2020b) o idrotermale, pari a 0,79 gCOD<sub>AGV</sub>/gTVS<sub>(0)</sub> (Yin et al., 2016a).

Il processo di co-fermentazione in semi-continuo ha mantenuto la stabilità per 3,8 HRT nel cavitato e per 2,6 HRT nel non cavitato, nonostante la variazione dell'HRT dovuta nelle caratteristiche dei substrati e della miscela dopo la seconda cavitazione, indicando che il processo è in grado di tollerarle. La variazione dell'HRT è stata più pronunciata per il cavitato, che è sceso a 3,3 d riuscendo però a mantenere una produzione stabile.

Il profilo degli AGV è simile nelle due condizioni ed è costituito principalmente dagli acidi acetico, propionico e butirrico, che costituiscono il 51-60% del totale. Il rapporto molare  $[C_3/(C_3+C_2)]_{AGV}$  ottenuto, leggermente più alto per il cavitato nel semi-continuo ( $0,53 \pm 0,04$ ), è maggiore di quanto riscontrato in letteratura (Moretto et al., 2019; Valentino et al., 2019a;2019b) e sembra particolarmente favorevole per l'utilizzo del fermentato per la sintesi di PHA, perché dovrebbe consentire di ottenere un polimero con una percentuale maggiore di monomeri non-3HB e quindi con una finestra di lavorazione più ampia (Bengtsson et al., 2010).

Infine, l'analisi della comunità microbica ha rivelato una struttura tipica delle fermentazioni, costituita quasi esclusivamente da *Bacteria* appartenenti ai phyla *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* e *Actinobacteria*, notoriamente implicati nelle fasi di idrolisi e acidogenesi. In

entrambe le condizioni il numero di sequenze identificate diminuisce dall'inizio dello stato stazionario alla fine del test, indicando probabilmente una speciazione della comunità microbiologica. La diminuzione del cavitato è più accentuata e potrebbe essere dovuta al *washout* dei microrganismi che presentano le cinetiche di crescita più lente, causato dall'HRT particolarmente basso. Alla fine del test si osserva anche un'abbondanza diversa dei phyla principali tra il cavitato e il non cavitato, che però non determina una variazione del profilo degli AGV, probabilmente grazie alla diversità dei microrganismi presenti.

Nel processo di fermentazione, quindi, la cavitazione idrodinamica ha permesso di omogeneizzare la miscela con un pretrattamento energeticamente poco dispendioso (Bhat & Gogate, 2021) e che ha consentito di ottenere una produzione di AGV stabile con un HRT di soli 3,3 d, tra i più bassi riscontrati in letteratura per la fermentazione acidogenica, grazie alla solubilizzazione della materia organica presente nei substrati e alla produzione di AGV nella fase di cavitazione. Tuttavia, non è stato ottenuto un miglioramento delle rese, che però potrebbe essere conseguito modificando i parametri applicati nel processo di cavitazione (P, T, durata del processo) in modo da potenziarne gli effetti.

I risultati dei test BMP dei substrati singoli e in miscela sono in accordo con i dati presenti in letteratura, ma non è stato osservato un aumento della resa di biometanazione per la miscela cavitata, al contrario di quanto atteso. Per i fanghi attivi, la letteratura riporta un aumento in percentuale del BMP pari alla percentuale di aumento del sCOD dovuto alla cavitazione (Habashi et al., 2016; 2018; Tian et al., 2018; Bao et al., 2015). Questo potrebbe indicare che l'aumento dell'sCOD della miscela riscontrato in questo lavoro di tesi dopo la cavitazione idrodinamica è stato dato principalmente dalla disgregazione degli scarti mercatali e che è necessario ottimizzare il processo per ottenere una rottura efficiente delle cellule che costituiscono i fanghi attivi.

Infine, le rese dei test BMP per la conversione della frazione solida del fermentato a CH<sub>4</sub> sono confrontabili con quelle presenti in letteratura e quindi confermano la fattibilità complessiva del processo, come valutata da Valentino et al. (2019a).

## **Ringraziamenti**

Ringrazio la relatrice ed i correlatori per il supporto fornitomi ed il Green Propulsion Laboratory, laboratorio di ricerca e sviluppo di Veritas s.p.a., per aver messo a disposizione il fermentatore ed il cavitatore utilizzati in questo lavoro di tesi. Vorrei ringraziare anche il personale tecnico dell'università Ca' Foscari, in particolare Alessandro Bonetto che mi ha supportata nelle analisi chimiche. Infine, ma non per importanza, va il ringraziamento alla mia famiglia e agli amici che hanno illuminato questo tratto di strada.

## Bibliografia

- Agler, M. T., Wrenn, B. A., Zinder, S. H. & Angenent, L. T. (2011). Waste to bioproduct conversion with undefined mixed cultures: the carboxylate platform. *Trends in Biotechnology* 29 (2), 70-78. Doi: 10.1016/j.tibtech.2010.11.006.
- Ahring, B. K., Ibrahim, A. A. & Mladenovska, Z. (2001). Effect of temperature increase from 55 to 65°C on performance and microbial population dynamics of an anaerobic reactor treating cattle manure. *Water Research* 35(10), 2446-2552. Doi: 10.1016/S0043-1354(00)00526-1
- Angelidaki I., Ellegaard L., Ahring B.K. (1998). Matematisk model for dynamisk simulering of den anaerobe biogas proces. Inst. Miljøteknology, DTU EFP-1383/96-0004
- Angelidaki, I., Alves, M., Bolzonella, D., Borzacconi, L., Campos, J. L., Guwy, A. J., Kalyuzhnyi, S., Jenicek, P., & Van Lier, J. B. (2009). Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: A proposed protocol for batch assays. *Water Science and Technology*. <https://doi.org/10.2166/wst.2009.040>
- Angenent, L.T., Sung, S., Raskin, L. (2002). Methanogenic population dynamics during startup of a full-scale anaerobic sequencing batch reactor treating swine waste. *Water Res.* 36: 4648–4654. Doi: 10.1016/S0043-1354(02)00199-9
- APAT-IRSA/CNR (2003). Metodologie analitiche per il controllo della qualità delle acque. Poligr. e Zecca dello Stato Roma, Ital. 29, 575–581.
- APHA/AWWA/WEF (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Stand. Methods 541.
- Arras, W., Hussain, A., Hausler, R. & Guiot, S. R. (2019). Mesophilic, thermophilic and hyperthermophilic acidogenic fermentation of food waste in batch: effect of inoculum source. *Waste Management* 87:279–287. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.02.011>
- Atasoy, M., Eyice, O., & Cetecioglu, Z. (2020). A comprehensive study of volatile fatty acids production from batch reactor to anaerobic sequencing batch reactor by using cheese processing wastewater. *Bioresource Technology*, 311, 123529.
- Atasoy, M., Eyice, O., Schnürer, A., & Cetecioglu, Z. (2019). Volatile fatty acids production via mixed culture fermentation: Revealing the link between pH, inoculum type and bacterial composition. *Bioresource technology*, 292, 121889..
- Atasoy, M., Owusu-Agyeman, I., Plaza, E. & Cetecioglu, Z. (2018). Bio-based volatile fatty acid production and recovery from waste streams: current status and future challenges. *Bioresource Technology* 268: 773-786. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.042>
- Badve, M. P., Bhagat, M. N., & Pandit, A. B. (2015). Microbial disinfection of seawater using hydrodynamic cavitation. *Separation and Purification Technology*, 151, 31-38. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.07.020>
- Balamurugan, K., Dasu, V.V. & Panda, T. (1999). Propionic acid production by whole cells of *Propionibacterium freudenreichii*. *Bioprocess Eng* 20:109–116. doi:10.1007/s00449-010-0433-7
- Bao, H., Jiang, L., Chen, C., Yang, C., He, Z., Feng, Y., ... & Wang, A. (2015). Combination of ultrasound and Fenton treatment for improving the hydrolysis and acidification of waste activated sludge. *RSC Advances*, 5(60), 48468-48473.
- Bastidas-Oyanedel, J. R., Bonk, F., Thomsen, M. H., & Schmidt, J. E. (2015). Dark fermentation biorefinery in the present and future (bio) chemical industry. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 14(3), 473-498.

- Battista, F., Frison, N., Pavan, P., Cavinato, C., Gottardo, M., Fatone, F., Eusebi, A. L., Majone, M., Zeppilli, M., Valentino, F., Fino, D., Tommasi, T., & Bolzonella, D. (2020). Food wastes and sewage sludge as feedstock for an urban biorefinery producing biofuels and added-value bioproducts. *J Chem Technol Biotechnol* 95: 328–338. Doi: 10.1002/jctb.6096.
- Baumann, I. & Westermann, P. (2016). Microbial production of short chain fatty acids from lignocellulosic biomass: current processes and market. *Biomed Res Int* 2016:8469357. doi:10.1155/2016/8469357
- Bengtsson, S., Pisco, A. R., Johansson, P., Lemos, P. C., & Reis, M. A. (2010). Molecular weight and thermal properties of polyhydroxyalkanoates produced from fermented sugar molasses by open mixed cultures. *Journal of biotechnology*, 147(3-4), 172-179.
- Bhat, A. P., & Gogate, P. R. (2020). Cavitation-based pre-treatment of wastewater and waste sludge for improvement in the performance of biological processes: A review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 104743.
- Bhatia, S. K. & Yang, Y. (2017). Microbial production of volatile fatty acids: current status and future perspectives. *Rev Environ Sci Biotechnol* 16:327–345. doi: 10.1007/s11157-017-9431-4
- Bolzonella, D., Battista, F., Cavinato, C., Gottardo, M., Micolucci, F., Lyberatos, G., & Pavan, P. (2018). Recent developments in biohythane production from household food wastes: a review. *Bioresource technology*, 257, 311-319.
- Bolzonella, D., Pavan, P., Battistoni, P. & Cecchi, F., (2005). Mesophilic anaerobic digestion of waste activated sludge: influence of the solid retention time in the wastewater treatment process. *Process Biochem.* 40, 1453–1460. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.06.036>
- Bougrier, C., Carrère, H., & Delgenes, J. P. (2005). Solubilisation of waste-activated sludge by ultrasonic treatment. *Chemical Engineering Journal*, 106(2), 163-169.
- Brock, T. D., (2016). *Microbiologia ambientale, biomedica e industriale / Brock*. (16. ed.). Ed. Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J.; ed. italiana a cura di Colonna, B. e Zannoni, D. Pearson: Milano.
- Budiman, A. W., Nam, J.S., Park, J.H., Mukti, R.I., Chang, T.S., Bae, J.W. & Choi, M.J. (2016). Review of acetic acid synthesis from various feedstocks through different catalytic processes. *Catal Surv Asia* 20:173–193. doi:10.1007/s10563-016-9215-9
- Cai, M., Hu, J., Lian, G., Xiao, R., Song, Z., Jin, M., ... & Wei, Z. (2018). Synergetic pretreatment of waste activated sludge by hydrodynamic cavitation combined with Fenton reaction for enhanced dewatering. *Ultrasonics sonochemistry*, 42, 609-618.
- Carpenter, J., Badve, M., Rajoriya, S., George, S., Saharan, V. K., & Pandit, A. B. (2017). Hydrodynamic cavitation: an emerging technology for the intensification of various chemical and physical processes in a chemical process industry. *Reviews in Chemical Engineering*, 33(5), 433-468.
- Castelló, E., y Santos, C. G., Iglesias, T., Paolino, G., Wenzel, J., Borzacconi, L., & Etchebehere, C. (2009). Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using a UASB reactor: links between microbial community and reactor performance. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(14), 5674-5682.
- Cavinato, C. (2011). *Optimization of two phases thermophilic anaerobic digestion of biowaste for bio-hythane production*. Tesi di dottorato. Università Ca' Foscari Venezia.



- Celasco, G., Moro, L., Aiello, C., Mangano, K., Milasi, A., Quattrocchi, C. & Di Marco, R. (2014). Calcium butyrate: Anti-inflammatory effect on experimental colitis in rats and antitumor properties. *Biomed. Rep.* 2: 559–563. Doi: <https://doi.org/10.3892/br.2014.273>
- Cesaro, A., Naddeo, V., Amodio, V., & Belgiorno, V. (2012). Enhanced biogas production from anaerobic codigestion of solid waste by sonolysis. *Ultrasonics sonochemistry*, 19(3), 596-600.
- Chang, R. & Goldsby, K. (2015). *Fondamenti di chimica generale* (2 ed.). Milano: McGraw-Hill Education (Italy).
- Cheah, Y., Vidal-Antich, C., Dosta, J. & Mata-Alvarez, J. (2019). Volatile fatty acid production from mesophilic acidogenic fermentation of organic fraction of municipal solid waste and food waste under acidic and alkaline pH. *Environmental Science and Pollution Research* 26:35509–35522. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05394-6>
- Chen, Y., Jiang, X., Xiao, K., Shen, N., Zeng, R. J., & Zhou, Y. (2017). Enhanced volatile fatty acids (VFAs) production in a thermophilic fermenter with stepwise pH increase—Investigation on dissolved organic matter transformation and microbial community shift. *Water research*, 112, 261-268.
- Chen, Y., Yu, B., Yin, C., Zhang, C., Dai, X., Yuan, H., & Zhu, N. (2016). Biostimulation by direct voltage to enhance anaerobic digestion of waste activated sludge. *Rsc Advances*, 6(2), 1581-1588.
- Cho, H. U., Kim, Y. M., & Park, J. M. (2017). Enhanced microalgal biomass and lipid production from a consortium of indigenous microalgae and bacteria present in municipal wastewater under gradually mixotrophic culture conditions. *Bioresource technology*, 228, 290-297.
- Chu, C. P., Chang, B. V., Liao, G. S., Jean, D. S., & Lee, D. J. (2001). Observations on changes in ultrasonically treated waste-activated sludge. *Water research*, 35(4), 1038-1046.
- Cohen, A., Distel, B., van Deursen, A., Breure, A. M., & Van Andel, J. G. (1985). Role of anaerobic spore-forming bacteria in the acidogenesis of glucose: changes induced by discontinuous or low-rate feed supply. *Antonie van Leeuwenhoek*, 51(2), 179-192.
- Collivignarelli, M. C., Abbà, A., Carnevale Miino, M., & Torretta, V. (2019). What advanced treatments can be used to minimize the production of sewage sludge in WWTPs?. *Applied Sciences*, 9(13), 2650.
- Commissione Europea (2015). *COMUNICAZIONE DELLA COMMISSIONE AL PARLAMENTO EUROPEO, AL CONSIGLIO, AL COMITATO ECONOMICO E SOCIALE EUROPEO E AL COMITATO DELLE REGIONI L'anello mancante - Piano d'azione dell'Unione europea per l'economia circolare*, COM(2015) 614 final. Fonte: [https://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:8a8ef5e8-99a0-11e5-b3b7-01aa75ed71a1.0009.02/DOC\\_1&format=PDF](https://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:8a8ef5e8-99a0-11e5-b3b7-01aa75ed71a1.0009.02/DOC_1&format=PDF)
- Commissione Europea. (2018). *DIRETTIVA (UE) 2018/851 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 30 maggio 2018 che modifica la direttiva 2008/98/CE relativa ai rifiuti*. Fonte: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX:32018L0851>
- Commissione Europea. (2019). *COMUNICAZIONE DELLA COMMISSIONE AL PARLAMENTO EUROPEO, AL CONSIGLIO, AL COMITATO ECONOMICO E SOCIALE EUROPEO E AL COMITATO DELLE REGIONI-II Green Deal europeo*, COM/2019/640 final. Fonte: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1588580774040&uri=CELEX:52019DC0640>
- Conrad, R. & Wetter, B. (1990). Influence of temperature on energetics of hydrogen metabolism in homoacetogenic, methanogenic, and other anaerobic bacteria. *Archives of Microbiology* 155: 94-98. Doi: 10.1007/BF00291281

- Costa, K.C. & Leigh, J.A. (2014). Metabolic versatility in methanogens. *Curr. Opin. Biotechnol.* 29: 70–75. Doi: 10.1016/j.copbio.2014.02.012
- Dahiya, S. & Mohan, S. V. (2019). Selective control of volatile fatty acids production from food waste by regulating biosystem buffering: a comprehensive study. *Chemical Engineering Journal* 357:787–801. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.08.138>
- Davello, R. (2018). Progettazione di un dispositivo per la disinfezione a basso costo dell'acqua con cavitazione idrodinamica. Tesi di laurea magistrale. Politecnico di Torino.
- de Jong, E., & Jungmeier, G. (2015). Biorefinery concepts in comparison to petrochemical refineries. In *Industrial biorefineries & white biotechnology* (pp. 3-33). Elsevier. Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63453-5.00001-X>
- Deepanraj, B., Sivasubramanian, V., & Jayaraj, S. (2017). Effect of substrate pretreatment on biogas production through anaerobic digestion of food waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(42), 26522-26528.
- Demirel, B. & Scherer, P. (2008). The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. *Rev Environ Sci Biotechnol* 7: 173–190. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11157-008-9131-1>
- Department for Environment, Food & Rural Affairs (DEFRA). (2011). *Guidance on applying the Waste Hierarchy*. Reperito su: [https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/69403/pb13530-waste-hierarchy-guidance.pdf](https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/69403/pb13530-waste-hierarchy-guidance.pdf)
- Dular, M., Griessler-Bulc, T., Gutierrez-Aguirre, I., Heath, E., Kosjek, T., Klemenčič, A. K., ... & Kompare, B. (2016). Use of hydrodynamic cavitation in (waste) water treatment. *Ultrasonics Sonochemistry*, 29, 577-588. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.10.010>
- Eastman, J. A., & Ferguson, J. F. (1981). Solubilization of particulate organic carbon during the acid phase of anaerobic digestion. *Journal (Water Pollution Control Federation)*, 352-366.
- El-Mashad, H. M., Zeeman, G., Van Loon, W. K., Bot, G. P., & Lettinga, G. (2004). Effect of temperature and temperature fluctuation on thermophilic anaerobic digestion of cattle manure. *Bioresource technology*, 95(2), 191-201.
- Erden, G., & Filibeli, A. (2010). Ultrasonic pre-treatment of biological sludge: consequences for disintegration, anaerobic biodegradability, and filterability. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85(1), 145-150.
- European Commission. (2019). *Directive 2008/98/EC on waste (Waste Framework Directive)*. Reperito su: <https://ec.europa.eu/environment/waste/framework/>
- F. Reale, R. Stolica, M. Gaeta, M. Ferri, M. Sarnataro, V. Vitale, V. Analisi e stima quantitativa della potenzialità di produzione energetica da biomassa digeribile a livello regionale. Studio e sviluppo di un modello per unità energetiche. Parte 1 - Metodologia. ENEA 2009, Report RSE/2009/RSE182. Fonte: [http://www.enea.it/it/Ricerca\\_sviluppo/documenti/ricerca-di-sistema-elettrico/celle-a-combustibile/rse182.pdf](http://www.enea.it/it/Ricerca_sviluppo/documenti/ricerca-di-sistema-elettrico/celle-a-combustibile/rse182.pdf)
- Feng, K., Li, H., & Zheng, C. (2018). Shifting product spectrum by pH adjustment during long-term continuous anaerobic fermentation of food waste. *Bioresource technology*, 270, 180-188.
- Feng, X., Lei, H., Deng, J., Yu, Q., & Li, H. (2009). Physical and chemical characteristics of waste activated sludge treated ultrasonically. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 48(1), 187-194.

- Feng, X-H., Chen, F., Xu, H., Wu B., Yao, J., Ying, H-J. & Ouyang, P-K. (2010). Propionic acid fermentation by *Propionibacterium freudenreichii* CCTCC M207015 in a multi-point fibrous bed bioreactor. *Bioprocess Biosyst Eng* 33:1077–1085. doi:10.1007/s00449-010-0433-7
- Ferry, J.G. & Kastead, K.A. (2007). *Archaea: molecular and cellular biology*. Nat. Publ.Group 288–314.
- Franc, J.-P. & Michel, J.-M. (2005). *Fundamentals of cavitation*. Netherlands: Springer.
- Galagan, J.E., Nusbaum, C., Roy, A., Endrizzi, M. G., Macdonald, P., FitzHugh, W., Calvo, S., Engels, R., Smirnov, S., Atnoor, D., Brown, A., Allen, N., Naylor, J., Stange-Thomann, N., DeArellano, K., Johnson, R., Linton, L., McEwan, P., McKernan, K., Talamas, J., Tirrell, A., Ye, W., Zimmer, A., Barber, R. D., Cann, I., Graham, D.E., Grahame, D.A., Guss, A. M., Hedderich, R., Ingram-Smith, C., Kuettner, H. C., Krzycki, J. A., Leigh, J. A., Li, W., Liu, J., Mukhopadhyay, B., Reeve, J. N., Smith, K., Springer, T. A., Umayam, L. A., White, O., White, R. H., de Macario, E. C., Ferry, J. G., Jarrell, K. F., Jing, H., Macario, A.J.L., Paulsen, I., Pritchett, M., Sowers, K. R., Swanson, R.V., Zinder, S.H., Lander, E., Metcalf, W. W. & Birren, B. (2002). The genome of *M. acetivorans* reveals extensive metabolic and physiological diversity. *Genome Res.* 12: 532–542. Doi: 10.1101/gr.223902
- Gao, X., Zhang, Q., & Zhu, H. (2019). High rejection rate of polysaccharides by microfiltration benefits *Christensenella minuta* and acetic acid production in an anaerobic membrane bioreactor for sludge fermentation. *Bioresource technology*, 282, 197-201.
- Garcia-Aguirre, J., Aymerich, E., de Goñi, J. G. M., & Esteban-Gutiérrez, M. (2017). Selective VFA production potential from organic waste streams: assessing temperature and pH influence. *Bioresource technology*, 244, 1081-1088. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.187>
- Garuti, M., Langone, M., Fabbri, C., & Piccinini, S. (2018). Monitoring of full-scale hydrodynamic cavitation pretreatment in agricultural biogas plant. *Bioresource technology*, 247, 599-609.
- Geissdoerfer, M., Savaget, P., Bocken, N. M., & Hultink, E. J. (2017). The Circular Economy—A new sustainability paradigm?. *Journal of cleaner production*, 143, 757-768. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.12.048>
- Gerardi, M. H. (2003). *The microbiology of anaerobic digesters*. Wiley: Hoboken.
- Gonzalez-Fernandez, C., Sialve, B., Bernet, N., & Steyer, J. P. (2012). Comparison of ultrasound and thermal pretreatment of *Scenedesmus* biomass on methane production. *Bioresource Technology*, 110, 610-616.
- Greses, S., Tomás-Pejó, E., & González-Fernández, C. (2020). Agroindustrial waste as a resource for volatile fatty acids production via anaerobic fermentation. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122486>
- Grübel, K., & Suschka, J. (2015). Hybrid alkali-hydrodynamic disintegration of waste-activated sludge before two-stage anaerobic digestion process. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(10), 7258-7270.
- Gujer, W., & Zehnder, A. J. (1983). Conversion processes in anaerobic digestion. *Water science and technology*, 15(8-9), 127-167.
- Habashi, N., Alighardashi, A., Mennerich, A., Mehrdadi, N., & Torabian, A. (2018). Improving biogas production from continuous co-digestion of oily wastewater and waste-activated sludge by hydrodynamic cavitation pre-treatment. *Environmental technology*, 39(8), 1017-1024.

- Habashi, N., Mehrdadi, N., Mennerich, A., Alighardashi, A., & Torabian, A. (2016). Hydrodynamic cavitation as a novel approach for pretreatment of oily wastewater for anaerobic co-digestion with waste activated sludge. *Ultrasonics sonochemistry*, 31, 362-370.
- Hafner, S. D., Koch, K., Carrere, H., Astals, S., Weinrich, S., & Rennuit, C. (2018). Software for biogas research: Tools for measurement and prediction of methane production. *SoftwareX*, 7, 205-210. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.softx.2018.06.005>
- Hogan, F., Mormede, S., Clark, P., & Crane, M. (2004). Ultrasonic sludge treatment for enhanced anaerobic digestion. *Water Science and Technology*, 50(9), 25-32.
- Holliger, C.; Fruteau de Lacroix, H.; Hafner, S.D.; Koch, K.; Weinrich, S.; Astals, S.; et al. Requirements for measurement and validation of biochemical methane potential (BMP). Standard BMP Methods document 100, version 1.8. Available online: <https://www.dbfz.de/en/BMP> (accessed on October 7, 2020).
- Hong, P. Y., Wheeler, E., Cann, I. K., & Mackie, R. I. (2011). Phylogenetic analysis of the fecal microbial community in herbivorous land and marine iguanas of the Galápagos Islands using 16S rRNA-based pyrosequencing. *The ISME journal*, 5(9), 1461-1470.
- Hu, H., Ma, S., Zhang, X., & Ren, H. (2020). Characteristics of dissolved organic nitrogen in effluent from a biological nitrogen removal process using sludge alkaline fermentation liquid as an external carbon source. *Water research*, 176, 115741.
- Iglesias-Iglesias, R., Campanaro, S., Treu, L., Kennes, C., & Veiga, M. C. (2019). Valorization of sewage sludge for volatile fatty acids production and role of microbiome on acidogenic fermentation. *Bioresource technology*, 291, 121817.
- Insam, H., Franke-Whittle, I. & Goberna, M. (2010). *Microbes at work, from wastes to resources*. Springer: Berlin Heidelberg.
- Jambo, S. A., Abdulla, R., Azhar, S. H. M., Marbawi, H., Gansau, J. A., & Ravindra, P. (2016). A review on third generation bioethanol feedstock. *Renewable and sustainable energy reviews*, 65, 756-769.
- Jankowska, E., Chwialkowska, J., Stodolny, M. & Oleskiewicz-Popiel, P. (2015). Effect of pH and retention time on volatile fatty acids production during mixed culture fermentation. *Bioresource Technology* 190:274–280. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.096>
- Jiang, J., Zhang, Y., Li, K., Wang, Q., Gong, C. & Li, M. (2013). Volatile fatty acids production from food waste: effects of pH, temperature, and organic loading rate. *Bioresource Technology* 143:525–530. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.025>
- Jiang, L., Fu, H., Yang, H. K., Xu, W., Wang, J., & Yang, S. T. (2018). Butyric acid: Applications and recent advances in its bioproduction. *Biotechnology advances*, 36(8), 2101-2117.
- Ju, D.-H., Shin, J.-H., Lee, H.-K., Kong, S.-H., Kim, J.-I., Sang, B.-I. (2008). Effects of pH conditions on the biological conversion of carbon dioxide to methane in a hollow-fiber membrane biofilm reactor (Hf-MBfR). *Desalination* 234(1-3): 409-415. Doi: 10.1016/j.desal.2007.09.111
- Jung, K. W., Hwang, M. J., Yun, Y. M., Cha, M. J., & Ahn, K. H. (2014). Development of a novel electric field-assisted modified hydrodynamic cavitation system for disintegration of waste activated sludge. *Ultrasonics sonochemistry*, 21(5), 1635-1640.
- Karakashev, D., Batstone, D.J. & Angelidaki, I. (2005). Influence of environmental conditions on methanogenic compositions in anaerobic biogas reactors. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 331–338. Doi: 10.1128/AEM.71.1.331-338.2005

- Karouach, F., Bakraoui, M., El Gnaoui, Y., Lahboubi, N., & El Bari, H. (2020). Effect of combined mechanical–ultrasonic pretreatment on mesophilic anaerobic digestion of household organic waste fraction in Morocco. *Energy Reports*, 6, 310-314.
- Kaza, Silpa; Yao, Lisa C.; Bhada-Tata, Perinaz; Van Woerden, Frank. (2018). *What a Waste 2.0 : A Global Snapshot of Solid Waste Management to 2050. Urban Development*. Washington, DC: World Bank. © World Bank. <https://openknowledge.worldbank.org/handle/10986/30317> License: CC BY 3.0 IGO.
- Kim, N. J., Lim, S. J., & Chang, H. N. (2018). Volatile fatty acid platform: Concept and application. *Emerging areas in bioengineering*, 1, 173-190.
- Kumar, S. & Babu, B. (2006). *A brief review on propionic acid: a renewal energy source*. In: Proceedings of the national conference on environmental conservation (NCEC-2006), pp 459–464. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.207.1979&rep=rep1&type=pdf>
- Lafitte-Trouqué, S., & Forster, C. F. (2002). The use of ultrasound and  $\gamma$ -irradiation as pre-treatments for the anaerobic digestion of waste activated sludge at mesophilic and thermophilic temperatures. *Bioresource technology*, 84(2), 113-118.
- Laspidou, C. S., & Rittmann, B. E. (2002). A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass. *Water research*, 36(11), 2711-2720.
- Lee, I., & Han, J. I. (2013). The effects of waste-activated sludge pretreatment using hydrodynamic cavitation for methane production. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(6), 1450-1455.
- Leite, W. R. M., Gottardo, M., Pavan, P., Belli Filho, P., & Bolzonella, D. (2016). Performance and energy aspects of single and two phase thermophilic anaerobic digestion of waste activated sludge. *Renewable Energy*, 86, 1324-1331.
- Li, S. L., Lin, J. S., Wang, Y. H., Lee, Z. K., Kuo, S. C., Tseng, I. C., & Cheng, S. S. (2011). Strategy of controlling the volumetric loading rate to promote hydrogen-production performance in a mesophilic-kitchen-waste fermentor and the microbial ecology analyses. *Bioresource technology*, 102(18), 8682-8687.
- Li, X., Peng, Y., He, Y., Jia, F., Wang, S., & Guo, S. (2016). Applying low frequency ultrasound on different biological nitrogen activated sludge types: an analysis of particle size reduction, soluble chemical oxygen demand (SCOD) and ammonia release. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 112, 42-50.
- Li, Y., Jin, Y., Li, J., Li, H., Yu, Z., & Nie, Y. (2017). Effects of thermal pretreatment on degradation kinetics of organics during kitchen waste anaerobic digestion. *Energy*, 118, 377-386.
- Li, Y., Zhang, X., Xu, H., Mu, H., Hua, D., Jin, F., & Meng, G. (2019). Acidogenic properties of carbohydrate-rich wasted potato and microbial community analysis: effect of pH. *Journal of bioscience and bioengineering*, 128(1), 50-55.
- Lim, J. W. & Wang, J.-Y. (2013). Enhanced hydrolysis and methane yield by applying microaeration pretreatment to the anaerobic co-digestion of brown water and food waste. *Waste Management* 33: 813-819. Doi: 10.1016/j.wasman.2012.11.013
- Lim, J. W., Chen, C. L., Ho, I. J. R., & Wang, J. Y. (2013). Study of microbial community and biodegradation efficiency for single-and two-phase anaerobic co-digestion of brown water and food waste. *Bioresource technology*, 147, 193-201.

- Lim, J. W., Chiam, J. A., & Wang, J. Y. (2014). Microbial community structure reveals how microaeration improves fermentation during anaerobic co-digestion of brown water and food waste. *Bioresource technology*, *171*, 132-138.
- Lindorfer, J., Lettner, M., Hesser, F., Fazeni, K., Rosenfeld, D., Annevelink, B., & Mandl, M. (2019). Technical, Economic and Environmental Assessment of Biorefinery Concepts. *Developing a practical approach for characterization*. IEA (International Energy Agency). *Bioenergy: Task*, *42*(2019), 01.
- Mace, S., Bolzonella, D., Cecchi, F. & Mata-Alvarez, J. (2003). Comparison of the biodegradability of the grey fraction of municipal solid waste of Barcelona in mesophilic and thermophilic conditions. *Water Sci. Technol.* *48*(4), 21–28.
- Mancuso, G., Langone, M., & Andreottola, G. (2017). A swirling jet-induced cavitation to increase activated sludge solubilisation and aerobic sludge biodegradability. *Ultrasonics sonochemistry*, *35*, 489-501.
- Mancuso, G., Langone, M., Andreottola, G., & Bruni, L. (2019). Effects of hydrodynamic cavitation, low-level thermal and low-level alkaline pre-treatments on sludge solubilisation. *Ultrasonics sonochemistry*, *59*, 104750.
- Mao, T., Hong, S. Y., Show, K. Y., Tay, J. H., & Lee, D. J. (2004). A comparison of ultrasound treatment on primary and secondary sludges. *Water Science and Technology*, *50*(9), 91-97.
- Mariakakis, I., Bischoff, P., Krampe, J., Meyer, C., & Steinmetz, H. (2011). Effect of organic loading rate and solids retention time on microbial population during bio-hydrogen production by dark fermentation in large lab-scale. *International journal of hydrogen energy*, *36*(17), 10690-10700.
- Marketsandmarkets (2018). *Butyric Acid Market by Application (Animal Feed, Chemicals Intermediate, Food & Flavors, Pharmaceuticals, Perfumes, Others), by Type (Synthetic Butyric Acid, Renewable Butyric Acid) by Geography (APAC, North America, Europe, Row) – Global Analysis and For*. Pune, Maharashtra.
- Marounek, M., Fliegrova, K., & Bartos, S. (1989). Metabolism and some characteristics of ruminal strains of *Megasphaera elsdenii*. *Applied and environmental microbiology*, *55*(6), 1570-1573.
- Mata-Alvarez, J., Dosta, J., Romero-Güiza, M.S., Fonoll, X., Peces, M. & Astals, S. (2014). A critical review on anaerobic co-digestion achievements between 2010 and 2013. *Renew. Sustain. Energy Rev.* *36*, 412–427. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.039>.
- Mattioli, A., Gatti, G. B., Mattuzzi, G. P., Cecchi, F., & Bolzonella, D. (2017). Co-digestion of the organic fraction of municipal solid waste and sludge improves the energy balance of wastewater treatment plants: Rovereto case study. *Renewable Energy*, *113*, 980-988.
- McMahon, K.D., Stroot, P.G., Mackie, R.I. & Raskin, L. (2001). Anaerobic codigestion of municipal solid waste and biosolids under various mixing conditions—II: microbial population dynamics. *Water Res.* *35*, 1817–1827. Doi: 10.1016/S0043-1354(00)00438-3
- Metcalfe, L., Eddy, H. P., & Tchobanoglous, G. (1991). *Wastewater engineering: treatment, disposal, and reuse* (Vol. 4). New York: McGraw-Hill.
- Micolucci, F., Gottardo, M., Pavan, P., Cavinato, C., & Bolzonella, D. (2018). Pilot scale comparison of single and double-stage thermophilic anaerobic digestion of food waste. *Journal of Cleaner Production*, *171*, 1376-1385.
- Mitchell, R. & Gu, J.D. (2010). *Environmental microbiology*, 2<sup>nd</sup> edition. Wiley-Blackwell: Hoboken.

- Mordor Intelligence (2018). *Acetic Acid Market - Segmented by End-user Industry, Application, and Geography – Growth, Trends, and Forecast (2018–2023)*. Hyderabad (India).
- Moresi, M. & Parente, E. (2014). FERMENTATION (INDUSTRIAL) | production of some organic acids (citric, gluconic, lactic, and propionic). *Encycl. Food Microbiol.* 1, 804–815.
- Moretto, G., Ardolino, F., Piasentin, A., Giroto, L., & Cecchi, F. (2020a). Integrated anaerobic codigestion system for the organic fraction of municipal solid waste and sewage sludge treatment: an Italian case study. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 95(2), 418-426.
- Moretto, G., Russo, I., Bolzonella, D., Pavan, P., Majone, M., & Valentino, F. (2020b). An urban biorefinery for food waste and biological sludge conversion into polyhydroxyalkanoates and biogas. *Water research*, 170, 115371.
- Moretto, G., Valentino, F., Pavan, P., Majone, M. & Bolzonella, D. (2019). Optimization of urban waste fermentation for volatile fatty acids production. *Waste Management* 92:21–29. doi: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.05.010>
- Negi, A. S. & Anand, S. C. (1985). *A Textbook of Physical Chemistry*. New Delhi: New Age International. ISBN 978-0-85226-020-3.
- Neis, U., Banduch, I., & Nickel, K. (2012). Stimulation of aerobic and anaerobic biological processes by ultrasound. *Proc. EWA, Sustainable Wastewater management-New solutions for new problems*.
- Nghiem LD, Koch K, Bolzonella D & Drewes JE (2017). Full scale co-digestion of wastewater sludge and food waste: bottlenecks and possibilities. *Renew Sustain Energy Rev* 72, 354–362
- Nguyen, D. D., Yoon, Y. S., Nguyen, N. D., Bach, Q. V., Bui, X. T., Chang, S. W., ... & Ngo, H. H. (2017). Enhanced efficiency for better wastewater sludge hydrolysis conversion through ultrasonic hydrolytic pretreatment. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 71, 244-252.
- Ohnishi, A., Abe, S., Bando, Y., Fujimoto, N., & Suzuki, M. (2012). Rapid detection and quantification methodology for genus *Megasphaera* as a hydrogen producer in a hydrogen fermentation system. *International journal of hydrogen energy*, 37(3), 2239-2247.
- Ohnishi, A., Bando, Y., Fujimoto, N., & Suzuki, M. (2010). Development of a simple bio-hydrogen production system through dark fermentation by using unique microflora. *International journal of hydrogen energy*, 35(16), 8544-8553.
- OLSEN, I., JOHNSON, J. L., Moore, L. V. H., & Moore, W. E. C. (1991). *Lactobacillus uli* sp. nov. and *Lactobacillus rimae* sp. nov. from the human gingival crevice and emended descriptions of *Lactobacillus minutus* and *Streptococcus parvulus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 41(2), 261-266.
- Pal, P. & Nayak, J. (2017). Acetic acid production and purification: critical review towards process intensification. *Sep Purif Rev* 46:44–61. doi:10.1080/15422119.2016.1185017
- Peces, M., Astals, S., Clarke, W. P., & Jensen, P. D. (2016). Semi-aerobic fermentation as a novel pre-treatment to obtain VFA and increase methane yield from primary sludge. *Bioresource technology*, 200, 631-638. [Doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.085](http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.085)
- Prajapati, K. K., Pareek, N., & Vivekanand, V. (2018). Pretreatment and multi-feed anaerobic co-digestion of agro-industrial residual biomass for improved biomethanation and kinetic analysis. *Frontiers in Energy Research*, 6, 111.

- Ramos-Suarez, M., Zhang, Y., & Outram, V. (2021). Current perspectives on acidogenic fermentation to produce volatile fatty acids from waste. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 1-40.
- Rasapoor, M., Adl, M., Baroutian, S., Iranshahi, Z., & Pazouki, M. (2019). Energy performance evaluation of ultrasonic pretreatment of organic solid waste in a pilot-scale digester. *Ultrasonics sonochemistry*, 51, 517-525.
- Research Grand View (2018). *Global Propionic Acid Market By Application (Animal Feed, Calcium & Sodium Propionate, Cellulose Acetate Propionate)*. San Francisco.
- Riviere, D., Desvignes, V., Pelletier, E., Chaussonnerie, S., Guermazi, S., Weissenbach, J., ... & Sghir, A. (2009). Towards the definition of a core of microorganisms involved in anaerobic digestion of sludge. *The ISME journal*, 3(6), 700-714.
- Rosenberg, E., DeLong, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E., & Thompson, F. (Eds.). (2014). The prokaryotes: other major lineages of bacteria and the archaea.
- Salsabil, M. R., Prorot, A., Casellas, M., & Dagot, C. (2009). Pre-treatment of activated sludge: Effect of sonication on aerobic and anaerobic digestibility. *Chemical Engineering Journal*, 148(2-3), 327-335.
- Sarkar, O., Kumar, A.N., Dahiya, S., Krishna, K.V., Yeruva, D.K. & Mohan, S.V. (2016). Regulation of acidogenic metabolism towards enhanced short chain fatty acid biosynthesis from waste: metagenomic profiling. *RSC Adv* 6:18641–18653. doi:10.1039/c5ra24254a
- Shin, H.S., Han, S.K., Song, Y.C. & Lee, C.Y (2001). Performance of uasb reactor treating leachate from acidogenic fermenter in the two-phase anaerobic digestion of food waste. *Water Res.* 35: 3441–3447. Doi: 10.1016/S0043-1354(01)00041-0
- Stenmarck, Å., Jensen, C., Quested, T., Moates, G., Buksti, M., Cseh, B., ... & Östergren, K. (2016). *Estimates of European food waste levels*. IVL Swedish Environmental Research Institute.
- Strazzer, G. (2020). *Volatile fatty acids production from urban organic wastes for biorefinery platforms*. Tesi di dottorato. Università di Verona.
- Strazzer, G., Battista, F., Herrero Garcia, N., Frison, N. & Bolzonella, D. (2018). Volatile fatty acids production from food wastes for biorefinery platforms: a review. *Journal of Environmental Management* 226: 278-288. Doi: 10.1016/j.jenvman.2018.08039
- Suerbaev, K., Zhaksylykova, G. & Appazov, N. (2014). Synthesis of biological active esters of the isovaleric acid by isobutylene hydroalkoxycarbonylation. *J Pet Environ Biotechnol*. doi:10.4172/2157-7463.1000164
- Sun, M., Liu, B., Yanagawa, K., Ha, N. T., Goel, R., Terashima, M., & Yasui, H. (2020). Effects of low pH conditions on decay of methanogenic biomass. *Water research*, 179, 115883.
- Tang, J., Wang, X. C., Hu, Y., Pu, Y., Huang, J., Ngo, H. H., ... & Li, Y. (2018). Nitrogen removal enhancement using lactic acid fermentation products from food waste as external carbon sources: performance and microbial communities. *Bioresource technology*, 256, 259-268.
- Techno-Innovation Alto Adige S.C.p.A. (TIS) (2004). Mappatura delle biomasse avviabili a digestione anaerobica in Alto Adige - Relazione conclusiva - Ministero delle Politiche Agricole, Agrarie e Forestali Programma Nazionale Biocombustibili. Fonte: <http://www.provincia.bz.it/agricoltura/download/mappatura-biomasse.pdf>.
- Thamsen, P. U., Bubelach, T., Pensler, T., & Springer, P. (2008). Cavitation in single-vane sewage pumps. *International Journal of Rotating Machinery*. doi:10.1155/2008/354020



- Thauer, R.K. (2012). The Wolfe cycle comes full circle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109: 15084–15085. Doi: 10.1073/pnas.1213193109
- Tian, X., Ng, W. J., & Trzcinski, A. P. (2018). Optimizing the synergistic effect of sodium hydroxide/ultrasound pre-treatment of sludge. *Ultrasonics sonochemistry*, 48, 432-440.
- Todd, H.E. & Walters, D.L. (1990). Deicing compositions comprising calcium magnesium acetate double salt and processes for their production. Google Patents. <https://www.google.com/patents/US4913831>
- Towprayoon, S., Shmarin, S., Gao Q., Abdel-Aziz, A.O., Farkaš, J., Zanzottera, N.M., Ijaz, M., & Sharma C. (2019). 2019 Refinement to the 2006 IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories, IPCC, 5, 6-7.
- United Nations (2015). Transforming our world: the 2030 agenda for sustainable development. A/RES/70/1. Reperito su: [https://www.un.org/ga/search/view\\_doc.asp?symbol=A/RES/70/1&Lang=E](https://www.un.org/ga/search/view_doc.asp?symbol=A/RES/70/1&Lang=E)
- Valentino, F., Moretto, G., Gottardo, M., Pavan, P., Bolzonella, D., & Majone, M. (2019a). Novel routes for urban bio-waste management: A combined acidic fermentation and anaerobic digestion process for platform chemicals and biogas production. *Journal of Cleaner Production*. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.02.102>
- Valentino, F., Moretto, G., Lorini, L., Bolzonella, D., Pavan, P., & Majone, M. (2019b). Pilot-scale polyhydroxyalkanoate production from combined treatment of organic fraction of municipal solid waste and sewage sludge. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 58(27), 12149-12158.
- Van Immerseel, F., Boyen, F., Gantois, I., Timbermont, L., Bohez, L., Pasmans, F., Haesebrouck, F. & Ducatelle, R. (2005) Supplementation of coated butyric acid in the feed reduces colonization and shedding of *Salmonella* in poultry. *Poult Sci* 84:1851–1856. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16479940>
- Vavilin V.A., Rytov S.V. & Lokshina L.Y. (1996). A description of hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic matter. *Bioresour. Technol.*, 56: 229-237. Doi: 10.1016/0960-8524(96)00034-X
- Verardi, C.A., Meyers, L.D. & Humphrey, W.A. (1997). *Coating composition for plastic substrates and coated plastic articles*. Google Patents. <https://www.google.com/patents/US5863646>
- Watkins, A., Roussel, E.G., Webster, G., Parkes, R.J. & Sass, H. (2012). Choline and N,N-dimethylethanolamine as direct substrates for methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 8298–8303. Doi: 10.1128/AEM.01941-12
- Wu, Q. L., Guo, W. Q., Zheng, H. S., Luo, H. C., Feng, X. C., Yin, R. L., & Ren, N. Q. (2016). Enhancement of volatile fatty acid production by co-fermentation of food waste and excess sludge without pH control: the mechanism and microbial community analyses. *Bioresour. technology*, 216, 653-660.
- Wu, Q., Guo, W., Yang, S., Luo, H., Peng, S., & Ren, N. (2015). Enhancement of volatile fatty acid production using semi-continuous anaerobic food waste fermentation without pH control. *RSC advances*, 5(126), 103876-103883.
- Xing, D., Ren, N., & Rittmann, B. E. (2008). Genetic diversity of hydrogen-producing bacteria in an acidophilic ethanol-H<sub>2</sub>-coproducing system, analyzed using the [Fe]-hydrogenase gene. *Applied and environmental microbiology*, 74(4), 1232-1239.

- Yin, J., Yu, X., Zhang, Y., Shen, D., Wang, M., Long, Y. & Chen, T. (2016a). Enhancement of acidogenic fermentation for volatile fatty acid production from food waste: Effect of redox potential and inoculum. *Bioresource Technology* 216:996–1003. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.053>
- Yin, Y., Liu, Y.-J., Meng, S.-J., Kiran, E.U., Liu, Y., (2016b). Enzymatic pretreatment of activated sludge, food waste and their mixture for enhanced bioenergy recovery and waste volume reduction via anaerobic digestion. *Appl. Energy* 179, 1131-1137. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.07.083.4>
- Yu, Y., Lee, C. & Hwang, S. (2005). Analysis of community structures in anaerobic processes using a quantitative real-time PCR method. *Water Sci. Technol.* 52: 85–91. Doi: 10.2166/wst.2005.0502
- Zabranska, 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>
- Zeynali, R., Khojastehpour, M., & Ebrahimi-Nik, M. (2017). Effect of ultrasonic pre-treatment on biogas yield and specific energy in anaerobic digestion of fruit and vegetable wholesale market wastes. *Sustainable Environment Research*, 27(6), 259-264.
- Zhang K., Woodruff A.P., Xiong M., Zhou J. & Dhande Y.K. (2011). A synthetic metabolic pathway for production of the platform chemical isobutyric acid. *Chemsuschem* 4:1068–1070. doi:10.1002/cssc.201100045
- Zhang, L., Loh, K. C., Dai, Y., & Tong, Y. W. (2020). Acidogenic fermentation of food waste for production of volatile fatty acids: Bacterial community analysis and semi-continuous operation. *Waste Management*, 109, 75-84.
- Zhang, P., Zhang, G., & Wang, W. (2007). Ultrasonic treatment of biological sludge: floc disintegration, cell lysis and inactivation. *Bioresource technology*, 98(1), 207-210.
- Zhao, Y. H., Zhang, B., Tao, J., Li, Q., & Lv, B. (2019, August). Optimization of Energy Consumption of the Ultrasonic Pretreatment on Sludge Disintegration. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 592, No. 1, p. 012198). IOP Publishing.
- Zheng, D. & Raskin, L. (2000). Quantification of *Methanosaeta* species in anaerobic bioreactors using genus- and species-specific hybridization probes. *Microb. Ecol.* 39, 246–262). Doi: 10.1007/s002480000003
- Zhou, M., Yan, B., Wong, J. W., & Zhang, Y. (2018). Enhanced volatile fatty acids production from anaerobic fermentation of food waste: A mini-review focusing on acidogenic metabolic pathways. *Bioresource technology*, 248, 68-78.
- Zhu, Y. & Yang, S.T. (2004). Effect of pH on metabolic pathway shift in fermentation of xylose by *Clostridium tyrobutyricum*. *J Biotechnol* 110:143–157. doi:10.1016/j.jbiotec.2004.02.006
- Zigová, J., Šturdík, E. (2000). Advances in biotechnological production of butyric acid. *J Ind Microbiol Biotechnol* 24:153–160. doi:10.1038/sj.jim.2900795
- Zübert, C., & Östergren, K. (2016). *Estimates of European food waste levels*. IVL Swedish Environmental Research Institute, 26-28

## Sitografia

Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) (2020). HCT-agrifood lab- Cavitazione idrodinamica. Fonte: [Cavitazione idrodinamica – HCT-agrifood Lab \(cnr.it\)](http://www.cnr.it)

Deutsches Biomasseforschungszentrum gemeinnützige GmbH (DBFZ) (2021). Basics. Fonte: <https://www.dbfz.de/en/projects/bmp/basics>

Earth Overshoot Day (2021). Past Earth Overshoot Days. Fonte: <https://www.overshootday.org/newsroom/past-earth-overshoot-days/>

Ellen MacArthur Foundation (2021). What is the circular economy? Fonte: <https://www.ellenmacarthurfoundation.org/circular-economy/what-is-the-circular-economy>

Ellen MacArthur Foundation (February 2019). Circular economy systems diagram. Fonte: <https://www.ellenmacarthurfoundation.org/explore/the-circular-economy-in-detail>

EUROSTAT (2020). The EU in the world- population. Fonte: [https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=The\\_EU\\_in\\_the\\_world\\_-\\_population#Population\\_size\\_and\\_population\\_density](https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=The_EU_in_the_world_-_population#Population_size_and_population_density)

United Nations (2020). Sustainable Development Goals. Fonte: <https://www.un.org/development/desa/pd/sustainable-development-goals-0>

United Nations (2021). Sustainable Development Goals. Goal 12: Ensure sustainable consumption and production patterns. Fonte: [Sustainable consumption and production – United Nations Sustainable Development](#)

University of Oxford (2012). The Compton Group- Sonoelectrochemistry. Fonte: [The Compton Group - research \(ox.ac.uk\)](#)

YouMath (2021). Diagramma di stato dell'acqua. Fonte: [Diagramma di stato dell'acqua \(youmath.it\)](#)

## Appendice I- Metodi analitici

I solidi totali (TS) sono il residuo che permane in un crogiolo dopo l'evaporazione dell'acqua in un campione mediante essiccamento in stufa. I solidi totali sono distinti in residuo secco, determinato mediante essiccazione in una stufa Memmert UM 500 (Memmert GmbH&Co) a  $T=105^{\circ}\text{C}$  fino a peso costante (Eq. 28), e in solidi totali fissi, determinati mediante incenerimento in muffola a  $T=550^{\circ}\text{C}$  fino a peso costante. La differenza tra il valore di residuo secco e quello dei solidi totali fissi rappresenta i solidi totali volatili (TVS) (Eq. 29), che costituiscono un indice di valutazione del contenuto delle sostanze organiche del fango (APHA, 2012).

$$TS = \frac{P2 - T}{P1 - T} 1000 \quad (28)$$

$$TVS = \frac{(P2 - T) - (P3 - T)}{P1 - T} 1000 = \frac{P2 - P3}{P1 - T} 1000 \quad (29)$$

T= peso del crogiolo;

P1= peso del crogiolo e del campione;

P2= peso del crogiolo con il campione essiccato;

P3= peso del crogiolo con i solidi totali fissi (ceneri).

I solidi totali sono stati espressi come gTS/kgTQ e i solidi totali volatili come gTVS/kgTQ.

Il pCOD è stato determinato mediante reazione con  $\text{AgSO}_4$ ,  $\text{HgSO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  e  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 96% e successiva digestione in forno SpeedWave XPERT (Berghof Instruments) a  $175^{\circ}\text{C}$ .

La frazione liquida di tutti i campioni è stata separata centrifugando 40-50 g di campione con centrifuga da banco Jouan CR3i (Jouan) per 5 min a 9000 rpm ed è stata filtrata con filtro a fascia nera per determinarne il pH e l'alcalinità. Solo la separazione del fermentato solido utilizzato nei test BMP è stata effettuata con una centrifuga da banco termostata NEYA 16R (REMI Group), preraffreddando il campione a  $T= 5^{\circ}\text{C}$  e centrifugando 160-175 g di fermentato per 8 min a 4500 rpm. Circa 14 mL di campione sono stati filtrati a  $0,2 \mu\text{m}$  per determinarne il contenuto in acidi grassi volatili (AGV), cationi ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) e la richiesta chimica di ossigeno solubile (sCOD). Il pH è stato rilevato con un pHmetro HANNA HI5522 (Hanna Instruments, Inc.). L'alcalinità è stata misurata mediante titolazione potenziometrica con HCl 0,1 N con una buretta graduata di Pellet a caricamento ed azzeramento automatico secondo APAT-IRSA/CNR (APAT, 2003).

La concentrazione ed il profilo degli AGV dei substrati e del fermentato è stato determinato mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (*High Performance Liquid Chromatography, HPLC*) con un cromatografo HPLC Agilent 1100 SERIES dotato di pompa binaria, autocampionatore, termostato a colonna e Diode Array Detector (DAD). È stata utilizzata una colonna Acclaim™ Organic Acid 4x150 mm (Thermo Fisher) la cui fase stazionaria è costituita da particelle di silice con diametro pari a 5µm e porosità pari a 120 Å. La colonna è stata mantenuta a T=20°C. I campioni sono stati diluiti con acqua ultrapura MilliQ® (Merck Millipore) in modo che la concentrazione degli analiti cada all'interno della retta di calibrazione. Il metodo adottato prevede la lettura iniziale di un bianco per verificare la presenza di composti indesiderati all'interno dell'acqua. Vengono quindi letti quattro standard con una concentrazione di 1, 3, 5, 10 mM preparati a partire dalla soluzione standard Volatile Free Acid Mix CRM46975 che ha una concentrazione pari a 10 mM degli acidi formico, acetico, propionico, isobutirrico, butirrico, isovalerico, valerico, iso-esanoico, esanoico, eptanoico. Dalla lettura degli standard viene costruita la retta di calibrazione, che viene ricalcolata ogni 20 campioni per verificare eventuali variazioni nel tempo di ritenzione dei composti. Per lo stesso motivo, alla fine di ogni analisi viene analizzato uno standard. Dopo i quattro standard con cui viene costruita la retta di calibrazione, vengono analizzati un altro bianco, un altro standard e quindi i campioni. È stata effettuata un'eluizione a gradiente secondo il programma descritto nella tabella 20, con flusso costante pari a 1mL/min, in cui la fase mobile è costituita un solvente acquoso (acido metansolfonico 2,5 mM) e da un solvente organico (acetonitrile ≥99,9%, grado gradiente per HPLC).

Tabella 20. Gradiente di eluizione applicato nell'analisi HPLC degli AGV.

Tempo (min)	Acido metansolfonico (%)	Acetonitrile (%)
0-1	100	0
1-11	55	45
11-14	55	45
14-19	100	0

Come rivelatore è stato utilizzato il detector UV del DAD, impostato ad una lunghezza d'onda fissa  $\lambda=210$  nm. I risultati, forniti in mM/L, sono stati convertiti in mg/L secondo l'Eq. 30:

$$W(mg) = n\left(\frac{mM}{L}\right) * PM(g/M) \quad (30)$$

dove

W= peso

n= numero di moli

PM= peso molecolare

I risultati sono stati convertiti anche in  $\text{gCOD}_{\text{VFA}}/\text{L}$  calcolando i  $\text{gO}_2$  necessari ad ossidare una mole di ciascun AGV con il software OBA™ (Hafner et al., 2018).

Con la cromatografia HPLC è stata determinata anche la concentrazione di acido lattico nei campioni seguendo lo stesso metodo utilizzato per l'analisi degli AGV. La retta di calibrazione è stata costruita con quattro standard con una concentrazione di 1, 3, 5, 10 mM preparati a partire da lattato di sodio ( $\text{C}_3\text{H}_5\text{NaO}_3$ ).

Per confermare i valori ottenuti, alcuni campioni sono stati analizzati anche mediante gascromatografo Agilent 6890 con iniettore split-splitless e detector a ionizzazione di fiamma (FID), equipaggiato con una colonna Agilent DB-FFAP 15 m x 0,530 mm. Il gascromatografo è stato calibrato ad ogni accensione con tre standard con una concentrazione di 2,5, 5, 10 mM preparati a partire dalla stessa soluzione standard utilizzata per l'HPLC, con l'aggiunta dell'acido etilbutirrico come standard interno. L'analisi è stata effettuata iniettando il campione in modalità split nella camera termostata a  $T=220^\circ\text{C}$ , utilizzando  $\text{H}_2$  come gas di trasporto. La separazione dei composti avviene attraverso il programma di temperatura illustrato nella tabella 21, che parte da una temperatura iniziale  $T=80^\circ\text{C}$  e raggiunge una temperatura finale  $T=200^\circ\text{C}$  in tre rampe.

Tabella 21. Programmata di temperatura applicata nell'analisi gascromatografica degli AGV.

Rampa	$^\circ\text{C}/\text{min}$	$^\circ\text{C}$	Temperatura stazionaria (min)	Tempo (min)
Inizio		80	0	0
1	15	130	0	3,33
2	20	145	0	4,08
3	25	200	0	6,28
Fine corsa	0	200	2,00	8,28

I composti vengono quantificati con il detector FID, impostato a  $T=230^\circ\text{C}$ , con un flusso di  $\text{H}_2$  pari a 40 mL/min ed un flusso di aria pari a 400 mL/min.

I cationi sono stati determinati mediante cromatografia ionica con un cromatografo ionico 25 Dionex interfacciato ad un PC con il software Chromeleon 6.50 ed equipaggiato con una precolonna CG12A 2x50 mm, una colonna analitica CS12A 2x250 mm, un soppressore CSRS ULTRA II 4x250 mm ed un detector a cella conduttimetrica (Thermo Scientific). È stata effettuata un'eluizione isocratica in cui la fase mobile è costituita da una soluzione di  $\text{H}_2\text{SO}_4$  22mM preparata manualmente con 0,61 mL di  $\text{H}_2\text{SO}_4$  18 M Romil (super purity) portato a 1000 mL con acqua ultrapura MilliQ® (Merck Millipore). L'eluente viene degassificato per circa 10 min con  $\text{N}_2$  per eliminare la presenza di  $\text{CO}_2$  prima di accendere lo strumento. Una volta acceso, si lascia fluire

N<sub>2</sub>. L'analisi avviene su 0,5 mL di campione diluito 1:1000 con acqua distillata in modo che i valori ottenuti ricadano all'interno della retta di calibrazione.

Il sCOD è stato determinato mediante metodo colorimetrico, facendo reagire 2,5 mL di campione tal quale od opportunamente diluito con acqua distillata con 1,5 mL di soluzione ossidante e 3,5 mL di soluzione catalizzante. La soluzione ossidante è stata preparata inserendo 208 mL di bicromato di potassio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) 1N, 167 mL di acido solforico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) concentrato (96%) e 33,3 g di solfato di mercurio (HgSO<sub>4</sub>) in un matraccio da un litro, portando a volume con acqua distillata. La soluzione catalizzante è stata preparata inserendo 10 g di solfato di argento (AgSO<sub>4</sub>) in un matraccio ed aggiungendo 1L di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrato (96%). Il campione è stato digerito nel fornello termico a T=150°C per 2 ore e ne è stata determinata l'assorbanza a λ=600 nm con uno spettrofotometro UV-VIS serie HE1901004. La retta di calibrazione è stata costruita applicando la procedura analitica descritta sopra ad una soluzione di potassio ftalato monobasico a concentrazione nota pari a 50, 100, 250, 500, 750, 1000 mgCOD/L (APHA, 2012).

Dalla somma di sCOD e pCOD si ottiene la richiesta chimica di ossigeno totale del campione (tCOD).