



Università
Ca' Foscari
Venezia

Corso di Laurea
Magistrale
in Scienze Ambientali
(LM-75)

Tesi di Laurea

**Fermentazione acidogenica di matrici miste
di origine urbana per la produzione di acidi
grassi volatili (VFA): effetto del tempo di
residenza idraulico in condizioni termofile**

Relatore

Ch. Prof. Francesco Valentino

Laureando

Francesco Zappalorto

Matricola 988866

Anno Accademico

2020 / 2021

Indice

1 Introduzione	2
1.1 Acidi grassi volatili (VFA)	5
1.2.1 pH	9
1.2.2 Temperatura	10
1.2.3 Hydraulic Retention Time	10
1.2.4 Organic Loading Rate	11
1.3 Materie prime e produzione di VFAs	12
1.3.1 Fango ispessito da depurazione di acque reflue urbane	12
1.3.2 Rifiuti organici/ rifiuti organici separati dalla fonte	15
1.4 Obiettivi della tesi	16
2 Materiali e Metodi	17
2.1 Matrici Utilizzate	17
2.1.1 Frazione Organica del Rifiuto Solido Urbano	17
2.1.2 Fango secondario ispessito	20
2.2 Origine e pretrattamenti delle matrici in ingresso	20
2.2.1 La FORSU	20
2.2.2 Il Fango Secondario (WAS)	21
2.3 Reattori e gestione delle condizioni di reazione	21
2.4 Metodi analitici	24
2.4.1 pH	24
2.4.2 Analisi dei VFA	24
2.4.3 Quantificazione dell'sCOD	25
2.4.4 Caratterizzazione iniziale delle matrici utilizzate come alimento	26
3 Risultati e Discussione	32
3.1 Caratterizzazione e pretrattamento delle matrici	33
3.2 Rendimento, velocità, concentrazione di prodotto e rapporto $COD_{VFA} * COD_{SOL}^{-1}$	34
4 Conclusioni	54
5 Bibliografia	55

1 Introduzione

L'industrializzazione e modernizzazione tendono ad aumentare la domanda di risorse dell'ambiente e la conseguente emissione di gas serra (GHG). La problematica nell'uso di fonti fossili per la produzione di *bulk chemicals* (come i VFA¹ che sono l'oggetto di questo studio) e carburanti, in relazione al loro impatto sul riscaldamento globale e sul cambiamento climatico, ha costretto i governi a varare politiche per limitare le emissioni ed il derivante l'incremento delle concentrazioni di diossido di carbonio in atmosfera. Attualmente VFA sono prodotti da risorse non rinnovabili come gas naturale o petrolio (Zacharof et al., 2013), (Zacharof et al., 2014), che per definizione non rappresentano una fonte sostenibile a lungo termine, oppure da colture microbiche pure alimentate su substrati organici (siero di latte, melassa, canna da zucchero, amido) che possono competere con il mercato alimentare (Zhou et al., 2018), (Longo et al., 2015). La produzione di VFA dall'industria petrolchimica si aggiunge alle emissioni di gas serra e, a titolo di esempio, la sola produzione di acido acetico contribuisce a circa 3,3 tonnellate di CO₂ equivalente per tonnellata prodotta per il suo intero ciclo di vita (Atasoy et al., 2018). La produzione di SCOA da risorse non rinnovabili è spesso basata sull'uso di catalizzatori metallici, anch'essi non rinnovabili, ed è effettuata ad alte temperature (150-200 °C per l'acido acetico e 70-150 °C per l'acido butirrico), con consumo energetico associato e potenziali problemi di sicurezza del processo che rappresentano ulteriore fonte di criticità (Dionisi et al., 2016). Da tempo è stata dimostrata la possibilità di utilizzare materie prime rinnovabili come fonte di carbonio, pertanto, in ottica di economia circolare, la valorizzazione dei rifiuti e della biomassa per la produzione di *bulk chemicals* sta diventando di crescente interesse.

All'interno delle biotecnologie implementabili in ottica di economia circolare la digestione anaerobica, che, come tecnologia industriale consolidata, è stata finora sfruttata per ottenere biogas utilizzabile come fonte di calore ed energia, può essere adattata a questo scopo. Quando il processo è finalizzato alla produzione di VFA si parla più comunemente di fermentazione anaerobica e si fa riferimento alle fasi intermedie di acidogenesi e acetogenesi durante le quali la materia organica idrolizzata viene degradata in acidi organici a catena corta come acido acetico, acido propionico, acido lattico, acido butirrico e a catena media come acido pentanoico, acido esanoico, acido eptanoico e relativi isomeri configurazionali nonché altri sottoprodotti come alcoli, ammoniaca e idrogeno (Appels et al., 2008). È stato calcolato

¹ All'interno di questo lavoro gli acronimi SCOA (Short Chain Organic Acids) e più ampiamente VFA (Volatile Fatty Acids) verranno usati per indicare sia gli stessi che gli acidi a catena media oggetto di ricerca (C5 C6 C7).

che, con la generazione globale annuale di rifiuti organici, i VFA potrebbero essere prodotti tramite AF a tassi molto più alti della loro produzione attuale (Lim et al., 2000). La preferibilità di un processo volto alla produzione di VFA piuttosto che di metano/idrogeno trova la sua giustificazione nella maggior facilità e sicurezza di stoccaggio e il trasporto di VFA e nel maggior valore aggiunto dei VFA, 50-130 dollari per tonnellata contro i 0,72 dollari al metro cubo di metano (Zhou et al., 2018). Risulta quindi evidente che la produzione di VFA attraverso AF è più attraente e affidabile rispetto alla produzione di idrogeno/metano dato l'elevato valore economico dovuto alle varie applicazioni dei VFA come prodotti chimici commerciabili o come precursori nell'industria cosmetica, alimentare, farmaceutica e chimica. Gli SCOA possono essere inoltre usati come fonte di carbonio per la rimozione di azoto e fosforo dalle acque reflue (Tilman et al., 2009), in celle a combustibile microbiche per produrre elettricità (EIA) e come substrato per sintesi di biopolimeri (Pilli et al., 2015). Inoltre, i carbossilati possono essere convertiti in esteri, carbonili, alcani o alcoli utilizzando prodotti chimici o microbici (Chang et al., 2010).

La produzione di VFA dai rifiuti organici tramite AF si configura quindi come un processo di economia circolare ad alto valore aggiunto per la valorizzazione dei rifiuti organici urbani e avviene in condizioni di reazione più blande nonché l'assenza di catalizzatori metallici. Nonostante il vantaggio economico ed ambientale della produzione di SCOA per via fermentativa, questa non ha ancora raggiunto la scala commerciale. I principali svantaggi sono la necessità di inibire la metanogenesi, la concentrazione relativamente bassa dei VFA prodotti, che implica alti costi di separazione, e i bassi volumi di produzione del processo (Atasoy et al., 2018). Quindi, al fine di rendere la produzione di SCOA tramite AF economicamente competitiva e sostenibile dal punto di vista ambientale è necessario incrementare le prestazioni del processo come la concentrazione del prodotto, la resa e la produttività essere massimizzati attraverso l'ottimizzazione delle condizioni di processo (Dionisi et al., 2016), (Lauri et al., 2021).

Al fine di rendere la produzione di VFA per via fermentativa economicamente attraente, tra i principali parametri di processo la concentrazione del substrato si presuppone avere un forte effetto sulla concentrazione del prodotto finale e sulla produttività e di conseguenza sulla sostenibilità economica del processo. Tuttavia, come riportato in Simonetti et al., 2020 poche sperimentazioni che sono state riportate hanno studiato condizioni di alta concentrazione di substrato. Nello studio condotto dagli stessi autori è stato riportato che, nelle sperimentazioni sulla fermentazione acidogenica per produrre SCOA, la concentrazione media del substrato era $53 \text{ g}_{\text{COD}} \cdot \text{L}^{-1}$ e che solo il 10% degli studi aveva una concentrazione

di substrato superiore a $128 \text{ g}_{\text{COD}} \cdot \text{L}^{-1}$; di conseguenza la concentrazione media del prodotto era inferiore a $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ e solo il 10% degli studi ha riportato concentrazioni di prodotto superiori a $23 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Simonetti et al., 2020). Questi livelli di concentrazione di prodotto sono troppo basse per lo sfruttamento commerciale di questo processo, inoltre, a differenza di altri parametri come il pH, la temperatura e il tasso di carico organico, la valutazione dell'effetto del substrato iniziale concentrazione iniziale del substrato è raramente valutata (Slezak et al., 2017). Le potenziali materie prime ad alto contenuto di sostanza organica sfruttabili come substrato sono diverse. A titolo d'esempio: il COD dei rifiuti alimentari non diluiti è stato misurato come $286 \text{ g} \cdot \text{Kg}^{-1}$ (Micolucci et al., 2018), il letame di pollame e bestiame può avere più del 20% di solidi (Sakar et al., 2009), e il contenuto di solidi di barbabietola da zucchero, erba e salice al raccolto è stato misurato nell'intervallo 20-50% (Lehtomaki et al., 2006). Lo studio di Simonetti et al., 2020 è noto come il caso di sperimentazione in cui è stata registrata la concentrazione di substrato utilizzata è la più alta finora riportata negli studi di fermentazione acidogenica per produrre SCOA ($395 \text{ g}_{\text{COD}} \cdot \text{L}^{-1}$), va da sé che nella sperimentazione svolta e documentata in questo lavoro la concentrazione di substrato è notevolmente inferiore in quanto riferita alla sola frazione solubile del COD indicata come sCOD. Rispetto alle materie prime di scarto che sono attualmente utilizzate per la AD e AF, i rifiuti alimentari sono un substrato estremamente valido grazie al loro alto contenuto di umidità, equilibrio di macronutrienti e rapporto C/N (Braguglia et al., 2018) e, tra le tecnologie di trattamento per lo smaltimento dei rifiuti alimentari, la digestione anaerobica, e per affinità anche la fermentazione anaerobica, ha anche il più basso impatto sul cambiamento climatico e sulle emissioni di gas serra (Papargyropoulou et al., 2014), (Gao et al., 2017). I rifiuti alimentari sono generati in quantità abbastanza elevate da sostituire le attuali materie prime utilizzati per produrre VFA, questa destinazione permetterebbe di limitare le conseguenze ecologiche e ambientali dovuti al suo eventuale smaltimento nonché consentire il parziale recupero di risorse depauperate a causa dello spreco alimentare. Si stima che in tutto il mondo, 1,3 miliardi di tonnellate all'anno di cibo vengono perse o sprecate (FAO, 2011), solo in Italia nel 2020 sono state perse, unendo spreco domestico e di filiera, circa 3,6 milioni di tonnellate di alimentari (Maccaferri, Il Sole 24 Ore, 2021; dati Waste Watcher International/Distal Università di Bologna per campagna Spreco Zero e rilevazioni Ipsos).

1.1 Acidi grassi volatili (VFA)

Gli acidi grassi volatili sono un gruppo di acidi carbossilici con una catena di carbonio di sette carboni o meno ($C_n \leq 7$) per molecola, ne fanno dunque parte l'acido formico (C1), acetico (C2), propionico (C3), butirrico (C4), valerico (C5), caproico (C6), eptanoico (C7) e i loro rispettivi isomeri. I VFA sono anche chiamati acidi organici a basso peso molecolare (LMW), hanno un forte carattere idrofilo (Siedlecka et al., 2008) e sono presenti in molti comparti ambientali, tra cui aria, acqua e suolo. Rappresentando prodotti primari della degradazione nonché della fermentazione della materia organica a più alto peso molecolare, i VFA sono comunemente presenti nelle acque reflue comunali, nei fanghi di depurazione, negli effluenti dell'industria alimentare, nelle acque reflue degli allevamenti di bestiame vivo, nel percolato delle discariche, nelle feci, nelle urine e sono parte responsabile del cattivo odore nell'ambiente di queste matrici. A livello biologico rappresentano gli elementi costitutivi di molti organismi viventi in quanto svolgono un ruolo importante nel metabolismo. I VFA costituiscono fonte di energia e carbonio per i microrganismi che sono coinvolti nel metabolismo del ciclo del carbonio organico sulla terra (Parawira et al., 2004) e possono essere espulsi da microrganismi, piante superiori e animali. Le vie metaboliche acidogeniche dal glucosio ai VFA sono riportate nella Figura 2. I VFA sono importanti intermedi prodotti nella via metabolica dell'AD (Figura 1); dei sei processi biochimici coinvolti nella conversione del substrato organico in CH_4 , CO_2 e H_2O , 4 corrispondono alla produzione di VFA. Le sei fasi biochimiche sono: [I] Idrolisi, [II] Fermentazione di aminoacidi e zuccheri, [III] β -ossidazione anaerobica degli acidi grassi a catena lunga, [IV] Ossidazione anaerobica dei metaboliti intermedi, [V] Conversione di acetato a CH_4 , e [VI] Conversione di $CO_2 + H_2$ in CH_4 e CO_2 (Figura 3). Le proprietà fisiche e chimiche dei VFA, il loro valore economico e le applicazioni commerciali sono presentate nella Tabella 1. I punti di ebollizione dei VFA vanno da $117^\circ C$ (per l'acido acetico) a $223^\circ C$ (per l'acido eptanoico), a loro solubilità in acqua diminuisce all'aumentare della catena di carbonio (l'acido acetico è completamente miscibile, l'acido butirrico è miscibile e l'acido eptanoico ha una solubilità di $2,4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ in acqua). Anche densità dei VFA diminuisce anche con un aumento degli atomi di carbonio per molecola.

Figura 1: Via metabolica dell'AD.

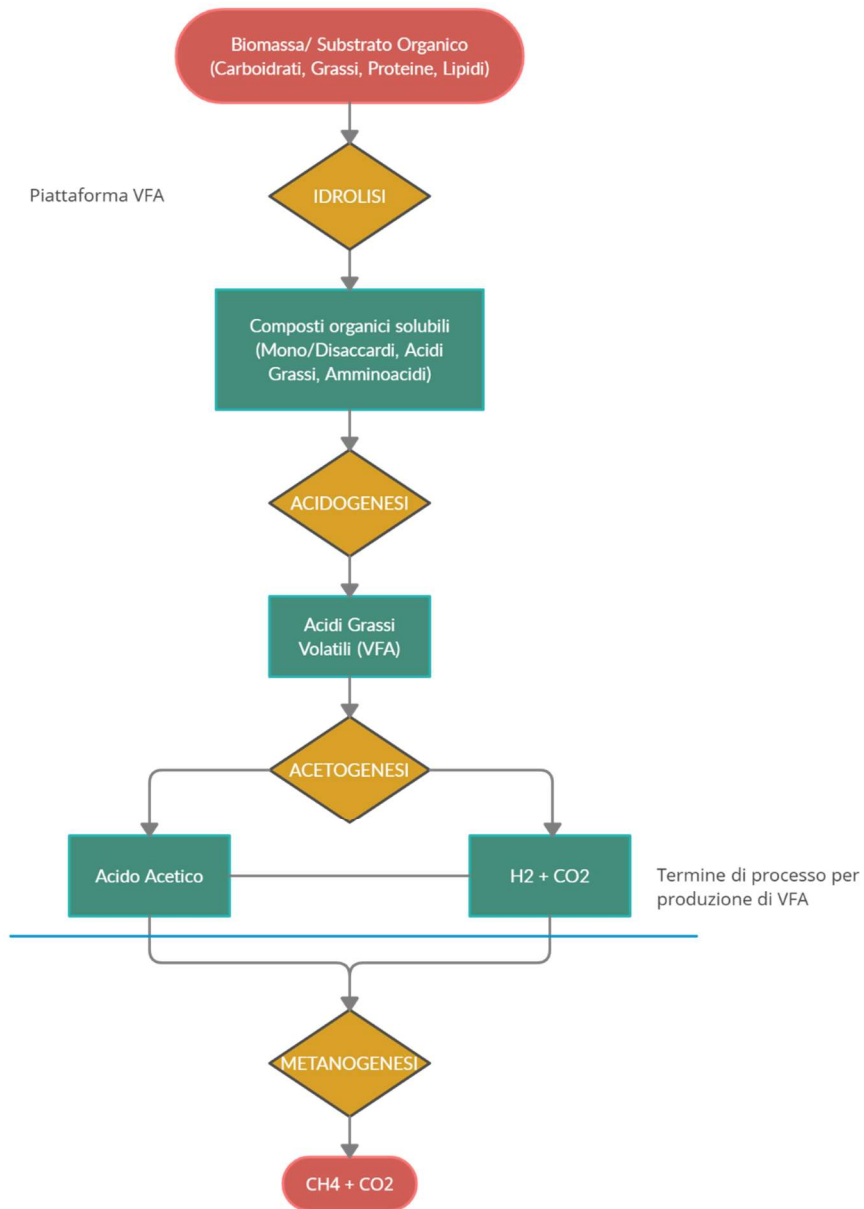


Figura 2: Vie metaboliche acidogeniche dal glucosio ai VFA

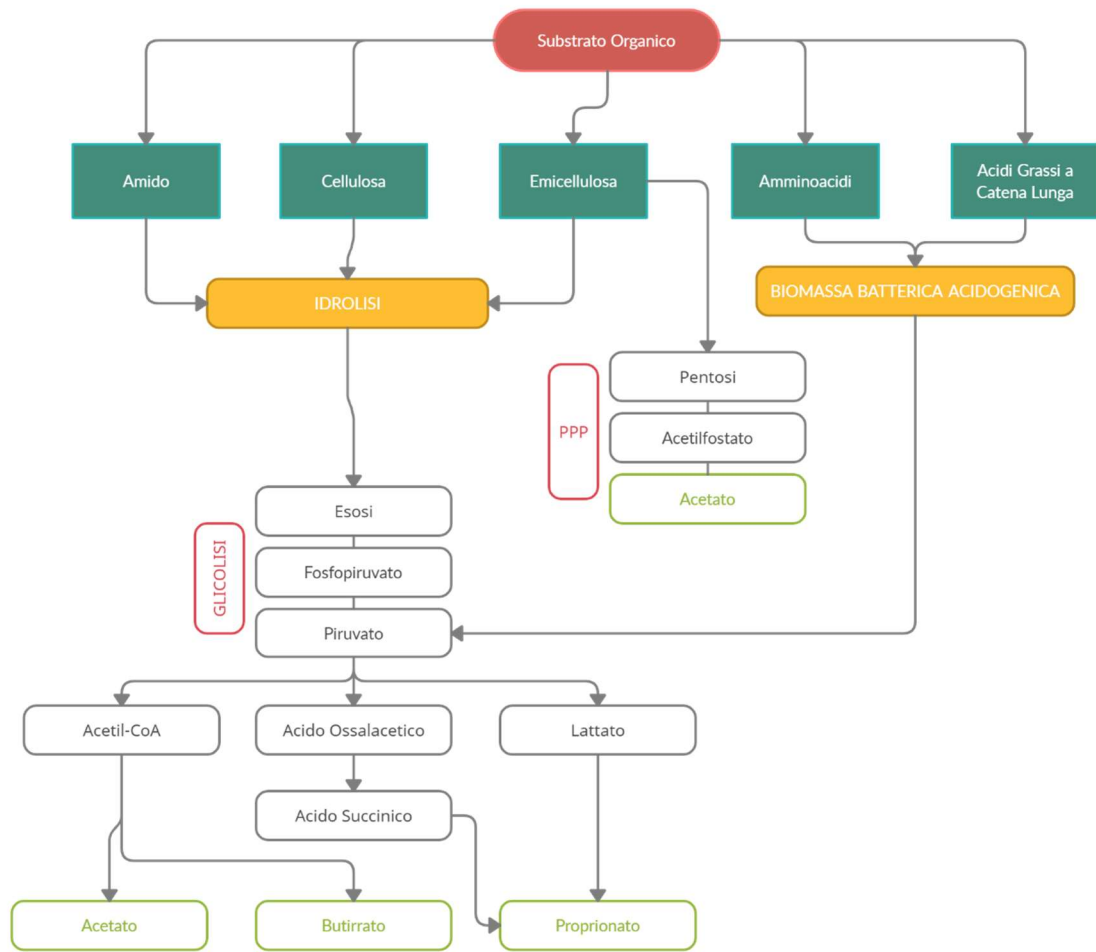


Figura 3: Processi biochimici sono coinvolti nella conversione del substrato organico in composti semplici.

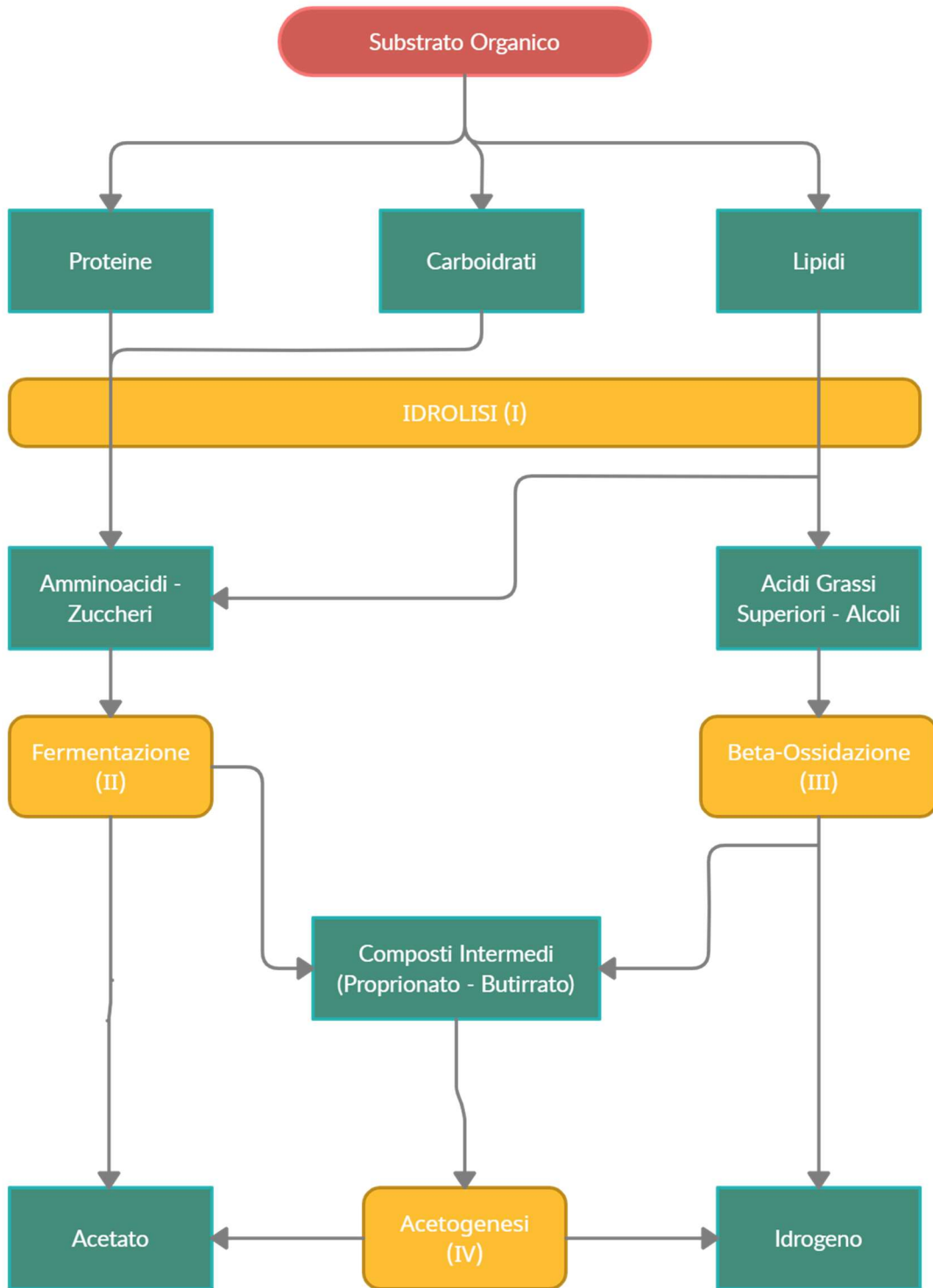


Tabella 1: proprietà fisiche e chimiche dei VFA, il loro valore economico e le applicazioni commerciali.

Common Name	Structural Formula	Mass (g·mol ⁻¹)	Density	Boiling Point	Solubility in Water (g·(dm ³) ⁻¹)	pKa a 25°C	Lewis Structure	Odour	Colour	Cost (\$·ton ⁻¹)	Commercial Application
Acetic Acid	CH ₃ COOH	60.05	1.05	117.9	Fully miscible	4.76		Vinegar Smell	Colorless liquid	400-800	Food additive solvent, ester production, chemicals, polymers, dyes, adhesives.
Propionic Acid	CH ₃ CH ₂ COOH	74.08	0.933	140.99	Miscible	4.88		Pungent	Colorless liquid	1500- 1650	Animal and human food additive, chemical intermediate, solvent, flavoring agent.
Butyrric Acid	CH ₃ (CH ₂) ₂ COOH	88.12	0.958	163.53	Miscible	4.82		Sweet smell	Colorless liquid	2000-2500	Esters used the food industry as aroma additive, food additive, flavoring, pharmaceuticals, animal feed supplement fishing bait additive.
Isobutyrric Acid	CH ₃ -CH(CH ₃)-COOH	88.12	0.947	155	210	4.84		Fusty smell	Colorless liquid	1580-1600	It is used in the leather industry. Isobutyric, 2 - methyl butyric and isovaleric are considered as essential nutrients for many predominant rumen cellulolytic bacteria.
Valeric Acid	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -COOH	102.13	0.938	186.5	40	4.82		Unpleasant	Colorless liquid	1000-2500	It is used in the synthesis of its esters. It is also used in perfumes and cosmetics.
Isovaleric Acid	CH ₃ CH(CH ₃)-CH ₂ -COOH	102.13	0.925	176	25	4.78		Mould cheese smell	Clear colorless liquid	5000-2500	Isovaleric acid inhibits the synthesis of saturated fatty acids. It is a favorable carbon source for cell growth.
Caproic Acid	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -COOH	116.16	0.927	205	10	4.88		Sharp smell	Oily colorless liquid	2250-2250	Used in pharmaceuticals
Enanthic Acid	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -COOH	130.19	0.917	223	2.6	4.89		Unpleasant rancid	Oily colorless liquid	3000-4000	It is used in the preparation of esters, such as ethyl heptanoate. It is also used in drug industry.

1.2 Parametri operativi in fermentazione anaerobica

I parametri operativi che condizionano le performance di fermentazione sono il pH, temperatura, HRT (*Hydraulic Retention Time*), OLR (*Organic Loading Rate*) e qui di seguito sono brevemente discussi.

1.2.1 pH

Il pH è uno dei fattori più importanti che influenzano significativamente l'efficienza dell'idrolisi e dell'acidificazione (Horiuchi et al., 2002; Lin e Li, 2018). Anche se i batteri anaerobici hanno un'ampia capacità di adattamento, la maggior parte degli acidogeni non può sopravvivere in condizioni estremamente acide (pH ≤ 3) o alcaline (pH ≥ 12) (Biswas et al., 2009). Il processo di acidogenesi ha mostrato scarse prestazioni in condizioni alcaline rispetto al pH neutro (Ma et al., 2016). Il pH influenza anche le frazioni dei singoli VFA, soprattutto

per quanto riguarda acido acetico, propionico e butirrico (Feng et al, 2009a). A basso pH da 4.0 a 5.0, la produzione di etanolo aumenta, mentre a pH più alti vengono prodotti più VFA (Ren et al., 1997). Il livello di acido butirrico è solitamente alto ed è la specie VFA dominante a valori di pH inferiori a 5,5, mentre l'acido acetico è prodotto come prodotto principale a pH neutro e alcalino, e le informazioni sulla dominanza dell'acido propionico sono raramente riportate (Cokgor et al., 2009; Temudo et al., 2007).

1.2.2 *Temperatura*

La temperatura è un altro fattore importante che influenza la produzione di VFA tramite fermentazione anaerobica. L'AF per la produzione di VFA dai fanghi di depurazione può essere condotta all'interno di un largo *range* di temperature da psicrofila (<20°C), mesofila (25-40°C) e termofila (45-60°C) tutte ampiamente studiate (Ferreiro e Soto, 2003; Feng et al., 2019; Kashyap et al., 2003; Zhuo et al., 2012). Molti studi di ricerca hanno indicato che un adeguato aumento della temperatura di fermentazione potrebbe portare all'aumento della produzione di VFA dal 20% a più di 2 volte (Skalsky e Daigger, 1995; Yuan et al., 2016). Questo risultato positivo è stato attribuito principalmente alla presenza di una maggiore quantità di proteine e carboidrati solubili a causa di una maggiore attività degli enzimi, come la proteasi e l' α -glucosidasi (Moser-Engeler et al., 1998). Anche se sono stati riscontrati diversi vantaggi per il funzionamento in condizioni termofile, alcuni svantaggi sono da considerare tra i quali il più importante risiede nel fatto che i microrganismi anaerobici in condizioni termofile sono più sensibili ai cambiamenti ambientali che in un processo mesofilo (Kim et al., 2006).

1.2.3 *Hydraulic Retention Time*

Il tempo di ritenzione solida (SRT) e il tempo di ritenzione idraulica (HRT) influenzano l'idrolisi dei rifiuti e la produzione di VFA durante fermentazione anaerobica (Jankowska et al., 2018). L'SRT è uguale all'HRT nella maggior parte dei casi di produzione di VFA da fanghi di depurazione, quando il substrato solido e la cultura microbica sono completamente miscelati in applicazione di un processo in continuo. La selezione di un corretto HRT/SRT può evitare il lavaggio dei batteri a crescita lenta (Ghosh e Pohland, 1974). Mentre sono necessari più di 20 giorni di digestione anaerobica per la produzione di metano, vari studi di ricerca hanno proposto che un SRT più basso tra 5 e 10 giorni è vantaggioso per la produzione di VFA dai fanghi di depurazione, perché un SRT relativamente più breve può prevenire la crescita dei metanogeni. Tuttavia, al fine di migliorare il tasso di idrolisi dei fanghi, il tempo di ritenzione dovrebbe essere ottimizzato (Ferrer et al., 2010; Miron et al., 2000; Xiong et al., 2012). Miron et al. (2000) hanno studiato l'effetto dell'SRT tra

3 e 15 giorni sull'idrolisi, acidificazione e metanogenesi di fanghi primari. I risultati hanno indicato che le condizioni acidogeniche sono prevalenti quando l'SRT è inferiore di 8 giorni, mentre il processo metanogenico prevale quando l'SRT è più lungo di 10 giorni. Risultati simili sono stati pubblicati da Yuan et al. (2009). Alcuni autori hanno suggerito che l'SRT di fanghi primari per la produzione di VFA è di 5-6 giorni, che è più breve di quello di WAS, perché il WAS è più difficile da solubilizzare a causa della sua alta frazione di biomassa cellulare (Bouzas et al, 2002; Jiang et al., 2007).

1.2.4 Organic Loading Rate

Il tasso di carico organico (OLR) indica quanti chilogrammi di substrati organici vengono caricati giornalmente per unità di volume del reattore (Wijekoon et al., 2011; Liu et al., 2019). Finora, la maggior parte degli OLR nella fermentazione anaerobica di fanghi di scarto non superano i $30 \text{ gTS} \cdot (\text{L} \cdot \text{d})^{-1}$, sia in sistemi continui o in batch (Banerjee et al., 1999; Chen et al, 2006). Nell'ottica di mantenere la stabilità del sistema, un alto OLR significa alta capacità di trattamento dei fanghi e alta produzione di VFA; quindi, la resa o la produzione di VFA aumenta con l'aumentare dell'OLR entro un intervallo ragionevole (Min et al., 2005). Tuttavia, il raggiungimento di un OLR più alto attraverso la diminuzione dell'HRT potrebbe determinare una temporanea o permanente riduzione della produzione di VFA a causa di una minore efficienza di idrolisi. L'OLR influenza significativamente anche la distribuzione dei VFA, specialmente quando l'aumento dell'OLR è dovuto all'incremento della concentrazione dell'alimento o alla diminuzione dell'HRT, in concomitanza con un passaggio da composti più ossidati a composti più ridotti, come la produzione di acido propionico derivato dal percorso lattato-propionato (Dijkstra, 1994; Li et al., 2016; Rodríguez et al., 2006). Tuttavia, se l'OLR aumenta ulteriormente oltre un certo limite, il processo di fermentazione potrebbe collassare a causa dell'accumulo di acido lattico e del calo del pH (Jouany, 2006).

1.3 Materie prime e produzione di VFAs

I ricercatori hanno testato varie materie prime rinnovabili per produrre VFA, ma la competizione che l'uso di queste materie prime ha con la produzione di cibo è fattore di divisione in ambito morale all'interno della comunità scientifica. Ci sono diverse fonti utilizzate come materie prime per la produzione di VFA, tuttavia, l'interesse è quello di utilizzare materie prime sostenibili e rinnovabili che non intacchino la fornitura alimentare. Sulla base della fonte di generazione, le materie prime sono divise in tre categorie come indicato in Tabella 2. Ci sono varietà di rifiuti e residui di biomassa economici e abbondantemente disponibili che possono servire da materie prime sostenibili e rinnovabili per la produzione in condizioni anaerobiche VFA (Baumann et al., 2016) come rifiuti organici e fanghi di depurazione (Park et al., 2004). I rifiuti solidi urbani sono una materia prima promettente per la produzione di VFA attraverso il processo di fermentazione anaerobica (Chakraborty et al., 2015). La produzione avviene notoriamente negli organismi viventi (principalmente nello stomaco dei ruminanti), durante la fermentazione nelle industrie di trasformazione alimentare che coinvolgono prodotti lattiero-caseari, alcoli, e anche nelle discariche e negli impianti di trattamento delle acque reflue (Lin et al., 2020).

Tabella 2: Categorie di materie prime utilizzabili come substrato.

Fonte di Substrato	Tipologia
Agricoltura	Biomassa algale, colture energetiche (mais, erba, girasole, ecc.), raccolti, resti di letame (di bovini, suini e pollame).
Centri urbani	Raccolta di rifiuti solidi urbani organici dai mercati e dalle famiglie, rifiuti alimentari, erba tagliata/rifiuti del giardino, rifiuti organici, ecc.
Industria	Scarti di lavorazione dell'industria alimentare e caseari, industria dell'amido, zucchero, farmaceutica, cosmetica, biochimica, cellulosa e carta, macello, ecc.

1.3.1 Fango ispessito da depurazione di acque reflue urbane

Il fango è il principale rifiuto organico prodotto durante il processo di trattamento delle acque reflue con un contenuto organico composto al (w/w) 10% di carboidrati, 50% di proteine, 10% di lipidi, e 30% di altri componenti, tra cui acido ribonucleico (RNA) e fibre (EIA). Negli ultimi anni, i componenti dei fanghi sono stati convertiti con successo in biodiesel, biogas, bioplastica, biosurfattanti, bioflocculanti, biopesticidi, etanolo, ecc. (Tyagi et al., 2009). Lee et al. (Lee et al., 2014) hanno riassunto i risultati della produzione di VFA dai fanghi e sono riportati, in ottica di panoramica dello stato di ricerca attuale, in Tabella 3.

Tabella 3: Panoramica riassuntiva sulla produzione di VFA usando i fanghi come substrato.

Type of sludge	Organic content mgCOD*L ⁻¹	Reactor type and operation conditions	Inference /VFA production	Reference
Waste Activated Sludge (WAS)	5470 ^a	Batch reactor, pH 11, 60 °C, 7d, 0.02 g SDBS ^b *gVSS ⁻¹	2561 mg TOC*L ⁻¹	[1]
WAS	i. 18657 ii. 18657	i. Batch reactor, pH 9, 35 °C, 7d ii. Batch reactor, pH 8, 55 °C, 9d,	i. 298 mg COD*gVSS ⁻¹ ii. 368 mg COD*gVSS ⁻¹	[2]
WAS	14878	Batch reactor, 21 °C, 6d	339 mg COD*L ⁻¹	[3]
WAS	14890	Batch reactor, 21 °C, 6d	191 mg COD*L ⁻¹	[3]
Mixed Sludge (1:1; primary sludge +WAS (on VSS basis))	22256	Batch reactor, 21 °C, 6d	118 mg COD*gVSS ⁻¹	[4]
Primary sludge	i. 19076 mg COD*L ⁻¹	i. The batch reactor, 35 °C, 8d	i. In control SCFA production is 187 mgCOD*gTVS ⁻¹	[5]
	ii. 19076 mg COD*L ⁻¹	ii. Pilot-scale, 35 °C, a)pH 10, NaOH, b)PH 7.1 10g*L ⁻¹ of wollastonite	Addition of wollastonite 40 g/L SCFA production is 259 mgCOD*gTVS ⁻¹ . ii SCFAs (mgCOD*L ⁻¹) a) 7453 b) 5596	
Primary sludge	i. 4550 mgVSS*L ⁻¹	Batch scale reactors i. Reactor 1 (1:1, industrial wastewater and primary sludge), pH 6.13 a) 18h HRT at 22 °C b) 30h HRT at 22 °C c) 30h HRT at 30 °C d) 30h HRT at 35 °C	a) 394±93 mg*L ⁻¹ b) 542±93 mg*L ⁻¹ c) 624±98 mg*L ⁻¹ d) 480±156 mg*L ⁻¹	[6]
	ii. 3305 mgVSS*L ⁻¹	ii. Reactor 2 (primary sludge), pH 7 a) 18h HRT at 22 °C b) 30h HRT at 22 °C c) 30h HRT at 30 °C d) 30h HRT at 35 °C	a) 273±61 mg*L ⁻¹ b) 329±52 mg*L ⁻¹ c) 210±10 mg*L ⁻¹ d) 90±05 mg*L ⁻¹	
WAS	25667 mg TSS*L ⁻¹	Pre-treatment at 100 °C for 60 min, pH 9, 6d	The maximum SCFA generation was 348.6 mg COD*gVSS ⁻¹	[7]

^a mgTOC*L⁻¹; ^bSodium dodecylbenzene sulfonate SCFA short chain fatty acid

Primary sludge	19103.2 mgVSS*L ⁻¹	pH 4 and 10, 35±1 °C, 8 days	The highest SCFAs production was 352±7 mg COD*gVSS ⁻¹ on 2 nd day at pH10	[8]
Excess sludge	13856.2 mgVSS*L ⁻¹	pH 4 and 10, 35±1 °C, 8 days	The highest CPAs production was 324±13 mg COD*gVSS ⁻¹ on 5 th day at pH10	
WAS	20720 mgVS*L ⁻¹	pH 6.73, 35±1 °C i. Blank-1 (without pre-treatment) 9 daysfermentation ii. Blank-2 (without pre-treatment) and pH adjustment, 5 days.ultrasonic pre-treatment at iii. 40 kHz and 5 days fermentation iv. 28kHz and 3 days fermentation v. 28+40 kHz and 3 days fermentation	SCFAs production mg COD*L ⁻¹ i.545 ii.3161 iii. 5809 iv. 6053 v. 7587	[9]
WAS	NA	The ratio of protein to carbohydrates (PN/PS) i. @pH =5 a). PN/PS= 1 b). PN/PS = 4 c). PN/PS = 7 ii. @pH =7 a). PN/PS= 1 b). PN/PS = 4 c). PN/PS = 7 iii. @pH =8 a). PN/PS= 1 b). PN/PS = 4 c). PN/PS = 7 iv. pH =9 a). PN/PS= 1 b). PN/PS = 4 c). PN/PS = 7 v. @pH = 10.7± 0.03 a). PN/PS= 1 b). PN/PS = 4 c). PN/PS = 7	VFAs production (mgCOD*L ⁻¹) i. @pH = 5 a). 912.5±60.2 b) 929.1±66.4 c) 899.2±55.0 ii. @pH = 7 a). 3322.1±99.8 b) 2744.7±113.5 c) 1713.4±77.6 iii. @pH = 8 a). 3045.4±90.2 b) 2442.6±53.8 c) 1784.2±82.1 iv. @pH = 9 a). 2921.6±81.2 b) 2174.4±77.9 c) 1573.4±42.2 v. @pH =10.7± 0.03 a). 3122.1±99.7 b) 2418.7±78.9 c) 1894.3±71.9	[10]

Al fine di ottimizzare il processo di fermentazione acidogenica è stato dimostrato come il pretrattamento dei substrati costituenti l'alimento aumenti la sostanza organica solubile disponibile per la biomassa batterica per la produzione di VFA. Per quanto concerne il fango ispessito, il pretrattamento termico ha dimostrato di avere un impatto positivo sulla disintegrazione dei fiocchi di fango e delle membrane cellulari, con conseguente solubilizzazione dei composti organici portando ad un miglioramento delle prestazioni durante la fase fermentativa (Haug et al., 1978; Neyens e Baeyens, 2003). L'efficacia pretrattamento termico dipende in maggior misura dalla temperatura d'esercizio applicata e mentre il tempo di reazione influisce in misura meno rilevante (Bougrier et al., 2008). La maggior parte degli studi sono stati condotti a media temperatura (55-100°C) e ad alta

temperatura (100-220°C) con una durata variabile da alcuni minuti a diverse ore (Chen et al., 2019; Choi et al., 2018; Mottet et al., 2009; Nazari et al., 2017). Un iniziale riduzione della dimensione delle particelle può essere osservata già dopo 20 minuti a una temperatura di 50°C (Audrey et al., 2011), mentre con l'aumentare temperatura il tasso di idrolisi e la disintegrazione dei fiocchi migliorano (Vavilin et al., 2008). Audrey et al. (2011). La solubilizzazione della materia organica può aumentare la biodegradazione, come previsto, tuttavia, il pretrattamento ha contribuito solo al 20% della degradazione di proteine e carboidrati dalla loro frazione totale.

1.3.2 Rifiuti organici/ rifiuti organici separati dalla fonte

Alcuni primi studi hanno già mostrato la capacità di convertire i rifiuti solidi organici in VFA (Antonopoulos et al., 1988), (D'Addario et al., 1993). Vari studi sono stati condotti per determinare il potenziale di produzione di VFA da diversi tipi di rifiuti organici come rifiuti di frutta, rifiuti vegetali, rifiuti di tè, rifiuti alimentari, rifiuti di mercato, ecc. Lim et al., 2008 hanno studiato la produzione di VFA dai rifiuti alimentari in un bioreattore anaerobico, la loro sperimentazione condotta su rifiuti alimentari ha mostrato una produzione massima di VFA a 35°C con un tempo di ritenzione di 8 giorni e pH 6. La produzione di VFA dai rifiuti di tè e dai rifiuti vegetali è stata studiata da Lata et al. su un digestore a letto imballato in cui il contenuto organico è stato trattato con il principio della lisciviazione in condizioni anaerobiche (Lata et al., 2002) e la successiva estrazione di VFA ha rivelato una produzione totale di 6 gVFA*L⁻¹ per entrambi i tipi di rifiuti. Gli autori hanno anche scoperto che la produzione di acido acetico e propionico era la principale componente del mix di acidi prodotto. La produzione di VFA dai rifiuti organici può essere effettuata da diverse vie di fermentazione. Alcune delle principali vie di fermentazione sono il tipo acetato-etanolo, il tipo propionato, il tipo butirrato, il tipo misto-acido, il tipo lattato e la via metabolica omo-acetogenica (Zhou et al., 2018). La rimozione dei fattori di inibizione e il miglioramento delle vie metaboliche sono gli aspetti principali da considerare per la produzione di VFA (Bolzonella et al., 2005).

1.4 Obbiettivi della tesi

L'obiettivo della sperimentazione è valutare come l'effetto del tempo di residenza idraulico (*Hydraulic Retention Time* - *HRT*) influenza le performance di fermentazione acidogenica utilizzando come substrato rifiuti urbani composti (*Food Waste*-FW e Fango secondario di depurazione-WAS), valutando i principali parametri di processo. La sperimentazione è stata svolta in 3 repliche differenziate per *HRT* rispettivamente a 4-5-6 giorni con colture batteriche miste in condizioni di termofilia (55°C) utilizzando bottiglie di vetro borosilicato di volume pari a 1000 ml e volume utile di reazione 900 ml. L'alimentazione è stata svolta in condizioni semicontinue, emulando quelle che sono le condizioni operative di un reattore *CSTR* (*Continuous-flow Stirred-Tank Reactor*) attraverso l'uso di agitatori con ancorette magnetiche. Durante la fermentazione, condotta per 50 giorni, la concentrazione di VFA e del COD solubile (sCOD) è stata monitorata con 2 campionamenti alla settimana su cui sono state svolte analisi target.

Investigando i diversi *HRT* si è cercata la miglior condizione operativa per il dimensionamento del processo ad una maggiore scala, in termini di concentrazione finale di VFA ottenibile (10-20 gCOD*L⁻¹), composizione del mix di acidi ottenuto e rapporto VFA*sCOD⁻¹ (0.6-0.8 COD*COD⁻¹) monitorando anche ulteriori parametri di processo come rendimento di fermentazione (gVFA*gVS⁻¹) e velocità specifica di fermentazione (mgVFA*gVS⁻¹*d⁻¹). Attenzione particolare è stata posta a particolari VFA sviluppati nel corso delle prove, principalmente acido acetico, propionico e butirrico (in quanto principali prodotti di fermentazione) e come il diverso *HRT* influenzasse la distribuzione di questi nel mix di acidi prodotti.

2 Materiali e Metodi

2.1 Matrici Utilizzate

2.1.1 *Frazione Organica del Rifiuto Solido Urbano*

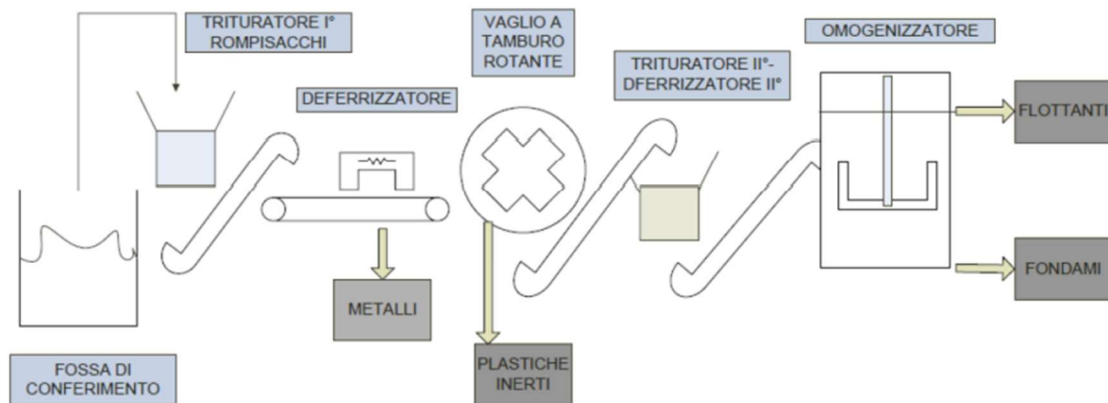
FORSU è l'acronimo con cui si indica la frazione organica e biodegradabile dei Rifiuti Solidi Urbani che comprende i rifiuti prodotti dalla manutenzione di giardini e parchi, i rifiuti alimentari e di cucina prodotti da nuclei domestici, ristoranti e punti vendita al dettaglio, e i rifiuti prodotti dall'industria alimentare (Direttiva 2008/98/CE). L'alto tenore di biodegradabilità e nutrienti di questo rifiuto lo rende un substrato ideale per i trattamenti. Per poter essere utilizzato a tale scopo è necessario, per logiche di processo, che la sua raccolta venga gestita adeguatamente e che venga sottoposto ad alcuni pretrattamenti, allo scopo di limitare al minimo la presenza di materiale inerte (come plastica, metalli ed altri materiali indesiderati), e di renderlo più idoneo ai processi biochimici.

La gestione della FORSU inizia dalla strategia di raccolta che si decide di applicare (differenziata o indifferenziata), la quale andrà influirà significativamente sia sulle caratteristiche del rifiuto che sui trattamenti ai quali potrà andare incontro. La strategia di raccolta viene identificata da molti autori (Cecchi et al., 2011) come la più importante operazione di pretrattamento dalla quale dipendono le caratteristiche del rifiuto. In caso di raccolta indifferenziata la frazione organica verrà separata dal flusso di rifiuti attraverso una selezione meccanica. Questa strategia, a causa della forte eterogeneità del rifiuto trattato, porta ad ottenere una FORSU qualitativamente scarsa, accompagnata da un contenuto di inerti e materiali non biodegradabili relativamente alto (circa 40 – 50 % TVS*TS⁻¹, CITEC Guidelines, 2004). Per quanto riguarda la fermentazione anaerobica, trattare un substrato caratterizzato da un alto contenuto di inerti e da un basso tenore di solidi volatili comporta due principali svantaggi: da un lato si otterranno delle basse rese di produzione in termini di VFA, dall'altro fermentato residuo risulterà caratterizzato da un'alta concentrazione di materiali inerti indesiderati, rendendo più complesse le operazioni di recupero del fermentato come ammendante organico. Una separazione alla fonte della frazione organica tramite raccolta differenziata permette di applicare un grado di selezione più elevato (80 – 90 % TVS*TS⁻¹, CITEC Guidelines, 2004) e ciò si traduce in costi di pretrattamento minori e rese di produzione maggiori sia in termini di VFA che di eventuale successivo recupero dell'effluente. Anche effettuando una raccolta differenziata spinta alla fonte, la FORSU necessiterà comunque di un pretrattamento per rimuovere quanto più possibile le frazioni inerti in essa inevitabilmente contenute. Queste operazioni di pretrattamento hanno il duplice fine di rimuovere dalla FORSU i materiali indesiderati e di ridurre la pezzatura del materiale

organico. Per quanto riguarda la FORSU i pretrattamenti più comunemente utilizzati sono il *Soft Wet Refine*, l'*Hard Wet Refine*, la *Screw-Press* e la Presso-Estrusione.

Il vantaggio principale dell'applicazione del *Soft Wet Refine*, implementabile in impianti a piccola e media scala, sta nel moderato fabbisogno energetico (solo 100kW di potenza installata) (Cecchi et al., 2011). Il pretrattamento prevede una serie di operazioni unitarie, aventi lo scopo di separare e omogeneizzare il flusso di rifiuti organici. La prima operazione si concretizza nella dilacerazione dei contenitori del rifiuto tramite macchine rompi-sacchi e mulini a coltelli ad alberi lenti che operano anche una grossolana riduzione della pezzatura del materiale. Per allontanare i materiali metallici segue una deferrizzazione del flusso di rifiuto organici, e da una vagliatura per la rimozione degli inerti di dimensioni maggiori. Un ulteriore affinamento della separazione viene raggiunto attraverso l'implementazione di un omogeneizzatore che consente la rimozione dei materiali inerti di minor pezzatura: tutti i materiali inerti pesanti, come sabbia, pietre, ossa e gusci saranno rimossi dal fondo, mentre gli inerti leggeri, prevalentemente plastiche, flatteranno verso l'alto e saranno intercettati sul pelo libero del reattore. In Figura 4 è schematizzato un esempio tipico di pretrattamento *Soft Wet Refine*.

Figura 4: BFD di un generico pretrattamento *Soft Wet Refine*.

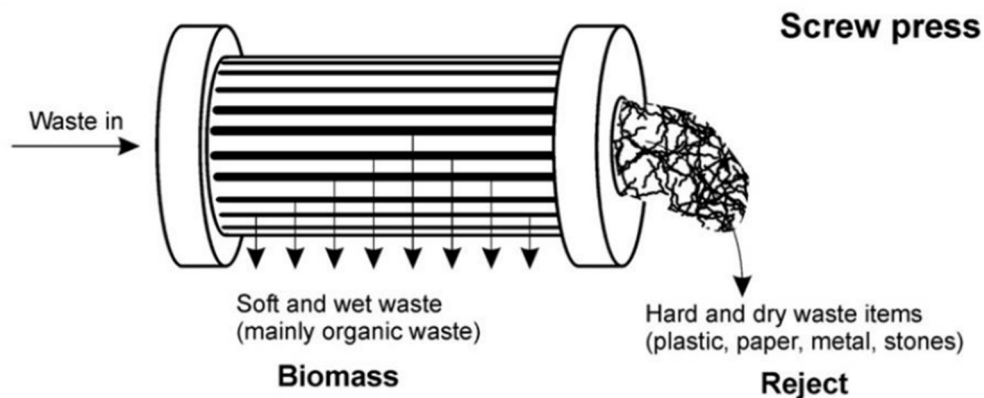


Fonte: Ca' Foscari

L'*Hard Wet Refine* è molto simile al precedente la differenza risiede nella separazione delle frazioni indesiderate dal rifiuto organico che avviene mediante l'utilizzo di un idropolpatore, caratterizzato da un'elevata richiesta energetica.

Una soluzione alternativa alle tipologie di processo precedenti è la Pressatura a vite (*Screw-Press*). La prima significativa differenza tra questo approccio e il *Wet Refine* consiste nell'ottenimento di due flussi di rifiuti in seguito al pretrattamento: uno con un alto tenore in solidi da inviare a compostaggio e uno semi-liquido da inviare al processo di interesse sia esso AD o AF (Cecchi et al., 2011). In Figura 5 è schematizzato il meccanismo di funzionamento del pretrattamento. La *Screw-Press* è costituita da una camera metallica forata all'interno della quale viene immessa la FORSU; la pressione esercitata da una vite rotante all'interno della camera spinge la FORSU contro le pareti e attraverso le fessure della stessa: in questo modo la parte più morbida e umida del rifiuto viene separata dalla parte più dura e secca, la quale rimane intrappolata all'interno della camera e viene spinta dalla vite alla zona di scarico.

Figura 5: Schema di funzionamento del pretrattamento di pressatura a vite (*Screw-Press*).



Fonte: Ca' Foscari

Il passaggio attraverso le luci delle pareti della pressa consente la separazione delle sostanze meno biodegradabili e la riduzione della pezzatura del rifiuto in una stessa operazione. Questo macchinario ha il vantaggio di funzionare con potenze specifiche installate relativamente basse (seppure superiori a un pretrattamento di tipo *Soft Wet Refine*), ed è implementabile esclusivamente su una FORSU con caratteristiche qualitative di partenza elevate, in quanto la presenza di materiali inerti comporterebbe abrasioni e malfunzionamenti della componente meccanica.

Per ultimo, la pressatura a vite è virtualmente simile al pretrattamento tramite *Screw-Press*; che si concretizza nell'immissione del rifiuto in una camera di estrusione forata, all'interno della quale la matrice viene sottoposta ad alta pressione in presenza di acqua, e ciò porta alla fluidificazione delle parti organiche e al recupero di buona parte del materiale organico che rimane però parzialmente interessato dalla presenza di materiale inerte (Cecchi et al., 2011).

Come per l'idropolpatore, le alte pressioni alla quale deve essere sottoposto il rifiuto comporteranno un elevato dispendio energetico.

2.1.2 Fango secondario ispessito

Una frazione dell'alimentazione, diversa per ogni HRT, è costituita da fango di supero prodotto nel *WWTP* di Treviso (Figura 6) prodotto durante il trattamento aerobico in linea acque.

Figura 6: L'ispessitore statico a gravità del *WWTP* di Treviso.



Fonte: Propria

2.2 Origine e pretrattamenti delle matrici in ingresso

2.2.1 La FORSU

La FORSU utilizzata nei test di fermentazione viene prelevata dall'impianto di depurazione di Treviso in gestione ad Alto Trevigiano Servizi S.r.l. dove viene utilizzata all'interno di un processo di co-digestione anaerobica al fine di ottenere biogas da inviare ad un impianto CHP per l'autosostentamento elettrico ed energetico dell'impianto stesso. La FORSU viene conferita all'impianto da Contarina S.p.A. che si occupa della raccolta dei rifiuti urbani prodotti da 49 comuni all'interno della provincia di Treviso, attraverso una raccolta differenziata alla fonte in grado di fornire quindi una frazione organica di elevata qualità. Il rifiuto che arriva all'impianto subisce un processo di *Screw Press* e la fase liquida derivante è quella utilizzata come substrato nei test. Al fine di incrementare il quantitativo di sCOD disponibile per la biomassa microbica fermentante, la fase liquida del rifiuto biodegradabile è stata sottoposta a trattamento basico dosando NaOH fino a raggiungimento di pH 11 e successivamente trattamento termico a 70°C all'interno di un reattore di tipo CSTR di volume pari a 380 L per 48 ore. Per ottenere un alimento più semplice da gestire durante la sperimentazione l'effluente del pretrattamento è stato sottoposto a centrifugazione e, delle

frazioni risultanti, la fase liquida rappresenta il substrato usato per il test mentre il cake è suscettibile di recupero all'interno di altri processi. La caratterizzazione della fase liquida della FORSU sarà brevemente riportata nel paragrafo 3.1.

2.2.2 Il Fango Secondario (WAS)

Il fango è stato prelevato dall'ispessitore statico a gravità del *WWTP* di Treviso (Figura 6), e nell'ottica di migliorare le condizioni di reazione e pertanto la resa della stessa, i fanghi di alimentazione hanno subito pretrattamento termico a 70°C per 48h e successivamente congelati per preservarne le caratteristiche (anch'esse brevemente illustrate nel paragrafo 3.1).

2.3 Reattori e gestione delle condizioni di reazione

La sperimentazione è stata condotta in 3 repliche (*Run*) differenziate per HRT (*Hydraulic Retention Time*), rispettivamente per 4–5–6 giorni, all'interno di bottiglie in vetro borosilicato *Pyrex*® da 1000 ml e volume di reazione 900 ml. Le bottiglie sono state chiuse con tappo e sigillate con *Parafilm*® per garantire il più possibile le condizioni anaerobiche di reazione. Il processo è stato condotto emulando il comportamento di reattore CSTR (*Continuous-flow Stirred-Tank Reactor*) posizionando le bottiglie su agitatori magnetici all'interno di una stufa che permettesse di mantenere le condizioni termofile (range di temperatura 45-50 °C) (Figura 7).

Figura 7: Configurazione dei reattori utilizzati per le prove sperimentali



Fonte: Propria

Le *run* sono state nominate FA (HRT 4 d), FB (HRT 5 d) e FC (HRT 6 d) e la loro alimentazione è stata effettuata a giorni alterni (3 giorni alla settimana) tramite apertura del reattore, eliminazione di volume di fermentato rappresentante il flusso di massa in uscita, di cui parte è stato utilizzato per le analisi, e sostituzione del quantitativo prelevato con alimento

fresco. Nessun inoculo iniziale è stato ritenuto necessario in quanto l'alimento gode naturalmente di una sufficiente quantità batteri fermentativi il cui sviluppo si suppone dovuto al temporaneo stoccaggio della FORSU prima del conferimento.

Operando i carichi a giorni alterni il flusso di massa in ingresso al momento dell'alimentazione è doppio, questa condizione operativa è stata ritenuta la più idonea in quanto permetteva di ridurre al minimo il contatto dell'ambiente di reazione con l'atmosfera ricca di ossigeno e consentire quindi una maggiore costanza delle condizioni a contorno del processo. Dopo ogni alimentazione, nell'ambiente di reazione è stato insufflato elio (He_g) per ridurre il più possibile la presenza di ossigeno e garantire quindi un sistema anaerobico. I volumi e valori iniziali di reazione sono indicati in Tabella 4.

Tabella 4: Volumi e carichi standard per HRT

	VOLUME (L)	HRT (d)	Q_{ALIM} ($L \cdot d^{-1}$)	Q_{FORSU} ($L \cdot d^{-1}$)	Q_{FANGO} ($L \cdot d^{-1}$)	OLR ($KgO_2 \cdot (m^3 \cdot d)^{-1}$)
FA	0.9	4	0.225	0.101	0.124	5.00
FB	0.9	5	0.180	0.080	0.100	3.97
FC	0.9	6	0.150	0.070	0.080	3.41

Per evitare la proliferazione di biomassa metanigena è necessario mantenere il pH a condizioni idonee per la fermentazione acidogenica, che si inserisce all'interno di un intervallo di valori all'interno del quale i batteri metanigeni non riescono ad operare (pH 5-6); nonché operare ad HRT relativamente brevi (4-6 giorni) che non sono compatibili con le più lente cinetiche di crescita dei metanigeni che inevitabilmente vanno incontro a *washout*. A causa della sopraggiunta impossibilità di mantenere il pH a valori desiderati con conseguente parziale sviluppo di biogas, dal giorno 32 della sperimentazione si è optato per la sospensione dell'alimentazione con FORSU pretrattata a favore di una con FORSU sottoposta esclusivamente a centrifugazione. Si vuole precisare che in figura le bottiglie FB e FC, che hanno riportato tassi di produzione di CH_4 superiori a quelle di FA, sono state dotate di una siringa (Figura 7) per il contenimento del biogas generato la cui pressione portava ad una rottura del sigillo in *Parafilm*®. Ciò si concretizzava nella perdita in atmosfera del biogas prodotto impedendone quindi il monitoraggio nonché il mantenimento delle condizioni anaerobiche di reazione. Per completezza si riporta che la configurazione con siringa per il controllo del volume di biogas è stato adottato per circa otto giorni dalla manifestazione di fase metanigena, ma questa configurazione non assicurava la tenuta stagna della bottiglia e si è optato per tornare ad un sigillo in *Parafilm*® opzione permessa anche dalla diminuzione della produzione di biogas generata dal cambio del substrato di alimentazione. Il contenuto di sostanza organica (sCOD) nell'alimento, per quanto riguarda la FORSU con

pretrattamento è pari a $34.35 \text{ gO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ e senza pretrattamento $38.7 \text{ gO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$, mentre in riferimento al fango che ha sempre subito il pretrattamento termico è pari a $8.285 \text{ gO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$.

Tabella 5: Nuovi rapporti di carico e OLR a seguito del cambio di alimentazione

	VOLUME (L)	HRT (d)	Q _{ALIM} (L*d ⁻¹)	Q _{FORSU} (L*d ⁻¹)	Q _{FANGO} (L*d ⁻¹)	OLR (KgO ₂ *(m ³ *d) ⁻¹)
FA	0.9	4	0.225	0.100	0.125	5.45
FB	0.9	5	0.180	0.080	0.100	4.36
FC	0.9	6	0.150	0.075	0.075	3.92

La fermentazione di FORSU non pretrattata può causare, nel medio periodo, il crollo del pH nel sistema arrivando così ad una totale inibizione dell'attività fermentativa. Per evitare che ciò accada si deve operare un controllo del pH; in questo caso è stato sufficiente cambiare i rapporti di fango e FORSU nell'alimentazione (ne necessario solo per FA e FB) (Tabella 5) in modo da non utilizzare *chemicals* come correttivi. Il fango, infatti dispone di un naturale contenuto di alcalinità parziale che esercita un effetto tampone sul pH man mano che i VFA si accumulano nel sistema.

Durante la fase finale della sperimentazione la maggiore acidità dell'alimento ha determinato un importante abbassamento del pH (principalmente nella *run* FA) con eventuale rischio di perdita di controllo del processo e, al fine di recuperare rapidamente le condizioni di reazione, sono stati variati i carichi in ingresso per riequilibrare il pH variando il rapporto Fango (più basico) e FORSU (più acido). Il pH, i carichi e giorni in cui sono stati effettuati sono riportati in Tabella 6, i giorni esclusi da quelli elencati sono da considerarsi con l'alimentazione di cui sopra. In questi casi la variazione del valore di OLR dovuto all'utilizzo di FORSU non pretrattata è stato ignorato in quanto l'attenzione è stata focalizzata sulla ricerca le condizioni che permettessero un incremento della resa di VFA.

Tabella 6: Rapporti di carico alternativi effettuati per la correzione del pH

FA				FB				FC			
DAY	Fango (mL)	FORSU (mL)	pH	DAY	Fango (mL)	FORSU (mL)	pH	DAY	Fango (mL)	FORSU (mL)	pH
39	350	100	4.81	40	90	90	6.6	34	100	200	7.3
42	175	50	4.83	42	90	90	6.8	36	100	200	6.7
43	400	50	4.85	43	180	180	6.1	39	40	110	6.6
46	350	100	5.99	46	180	180	6.4	40	40	110	6.5
48	280	170	6.24	48	180	180	5.6	42	80	70	5.6
								43	160	140	6.1
								46	150	150	6.7
								48	150	150	5.9

2.4 Metodi analitici

2.4.1 pH

La determinazione del pH del fermentato è stata effettuata con un pH-metro con agitatore magnetico per la miscelazione in grado di determinare i valori sia in continuo che a stabilità della misura (Figura 8). Prima di ogni misura il pH-metro è stato calibrato con 3 soluzioni a pH noto (rispettivamente a pH 4, 7, 10).

Figura 8: pH-metro in dotazione al laboratorio



Fonte: Propria

2.4.2 Analisi dei VFA

La concentrazione di VFA è stata determinata mediante l'utilizzo di un Gas Cromatografo (GC), serie Agilent 6890N equipaggiato con colonna Agilent J&W DB-FFAP (lunghezza 15 m, diametro 0.530 mm, film 1.00 μm) accoppiato con *detector* a ionizzazione di fiamma FID (Figura 9), la calibrazione è stata fatta in 3 punti utilizzando una soluzione madre contenente gli acidi grassi volatili target e come standard interno per l'analisi quantitativa è stato utilizzato acido 2-etilbutirrico.

Figura 9: Gas Cromatografo utilizzato per le analisi dei VFA



Fonte: Propria

Il metodo utilizzato, “VFA_METODO_FFAP” prevede una rampa di temperatura che cresce da 80°C, a 130°C, a 145 °C, a 200 °C e termina con una fase post *run* a 220 °C. Il campione è stato preventivamente sottoposto a filtrazione a 0.2 µm per evitare di creare ostruzioni all’interno della colonna capillare. Gli acidi target dell’analisi sono: acido acetico (C2), acido propionico (C3), acido isobutirrico (iC4), acido butirrico (C4), acido isopentanoico (iC5), acido pentanoico (C5), acido isocaproico (iC6), acido caproico (C6) e acido eptanoico (C7).

2.4.3 Quantificazione dell’sCOD

Durante la sperimentazione è stato monitorato il contenuto di COD per determinare la resa di VFA. Le analisi sono state svolte con tecnica colorimetrica utilizzando uno spettrofotometro Analytikjena Spekol 1500 (Figura 10). La procedura di analisi prevede la filtrazione del fermentato con apparato filtrante con pori a 0.2 micrometri per eliminare completamente la parte solida e ottenere esclusivamente il COD solubile.

Figura 10: Spettrofotometro utilizzato per le analisi colorimetriche



Fonte: Propria

Nella provetta utilizzata per l’analisi viene inserita un’aliquota di campione, un quantitativo noto di soluzione ossidante di dicromato di potassio ($K_2Cr_2O_7$) e di soluzione catalizzante di acido solforico (H_2SO_4) solfato d’argento (Ag_2SO_4) e di solfato mercurico ($HgSO_4$) per evitare interferenze date dai cloruri. Le *vial* sono state posizionate in termoblocco per la digestione acida a 150 °C per due ore.

Al termine della digestione è stato misurato l’assorbimento a lunghezza d’onda di 600 nm per determinare il contenuto di sCOD in $gO_2 \cdot L^{-1}$ tenendo conto della diluizione del campione.

Il quantitativo di sCOD è stato determinato con la seguente equazione:

$$sCOD = sCOD_{mis} * F.D.$$

dove:

sCOD_{mis} è il valore di concentrazione medio misurato del sCOD, ottenuto dall'analisi spettrofotometrica.

F.D. è il fattore di diluizione operato nella parte preparativa dell'analisi.

L'unità di misura è sCOD = mgO₂ * L⁻¹

2.4.4 Caratterizzazione iniziale delle matrici utilizzate come alimento.

Tutte le analisi chimiche per la caratterizzazione iniziale delle matrici usate come substrato sono state svolte su campione essiccato per 48 ore in stufa a 100 °C e successivamente polverizzato con mortaio ad esclusione dell'analisi dell'azoto ammoniacale che è stato svolto su fase liquida filtrata con filtro a fascia nera e del contenuto di ortofosfati svolta anch'essa su fase liquida sulla quale è stata effettuata un'ulteriore filtrazione a 0.2 µm.

a) Analisi dei solidi

Per quanto concerne l'analisi del contenuto in solidi del substrato, è stata adottata la procedura standard riportata in letteratura per la determinazione dei solidi totali (TS) e dei solidi volatili (TVS). I primi vengono determinati pesando dapprima il crogiolo vuoto (tara) e in seguito il crogiolo con il campione (peso umido); quest'ultimo viene quindi lasciato essiccare in stufa per due giorni a 100°C e successivamente ne viene determinato il peso secco. Il contenuto di TS espresso come gTS * Kg⁻¹ è dato dalla seguente equazione:

$$TS = \frac{P2 - P0}{P1 - P0} * 1000$$

dove:

P2 è il peso secco del crogiolo con il campione

P1 è il peso umido del crogiolo con il campione

P0 è il peso del crogiolo vuoto

Il contenuto in TVS si determina sottoponendo lo stesso campione, dal quale si è ottenuta la concentrazione di TS, ad incenerimento in muffola (Figura 11) per una notte (550°C). Essendo quindi P3 il peso in grammi del crogiolo con le ceneri del campione dopo incenerimento in muffola, il contenuto in TVS del campione si ottiene dalla seguente equazione:

$$TVS = \frac{P2 - P3}{P1 - P0} * 1000$$

Figura 11: La muffola del laboratorio



Fonte: Propria

b) Chemical Oxygen Demand

Il metodo per la determinazione della Domanda Chimica di Ossigeno (COD), prevede l'ossidazione di queste sostanze mediante soluzione di bicromato di potassio in presenza di acido solforico concentrato, di solfato di argento come catalizzatore, e di solfato di mercurio impiegato per evitare l'interferenza dei cloruri ossidabili dal bicromato. Per la digestione del campione sono stati preparati dei vessel in *Teflon*® con un'aliquota di campione secco e i reagenti poi posizionate all'interno del mineralizzatore (Figura 12) per subire il processo in due step, il primo a 175°C e il secondo a 50°C per la durata totale di un'ora. Durante questo periodo avviene l'ossidazione chimica del carbonio organico da parte del bicromato di potassio il cui eccesso è stato poi titolato con soluzione di solfato d'ammonio e ferro (FAS)

utilizzando come indicatore la ferroina. La concentrazione di COD, espressa in $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, viene determinata attraverso i seguenti calcoli:

$$COD = \frac{(B - C) * \left(\frac{V * N}{T}\right) * 8}{P}$$

dove:

B: volume di FAS usato per la titolazione del bianco (mL)

C: volume di FAS usato per la titolazione del campione (mL)

N: normalità del bicromato

V: volume di $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ usato (mL)

T: volume di FAS usato per la titolazione del titolo (mL)

8: peso equivalente dell'ossigeno ($\text{gO}_2\cdot\text{eq}^{-1}$)

L'unità di misura è: $\text{COD} = \text{mgO}_2 * \text{gTS}^{-1}$

Figura 12: Il mineralizzatore in dotazione al laboratorio



Fonte: Propria

c) Azoto Ammoniacale

Il procedimento analitico per la determinazione dell'azoto ammoniacale si basa sulla reazione dell'ammoniaca con una soluzione alcalina di tetraioduro di potassio, noto come reattivo di Nessler; si forma un composto che conferisce alla soluzione un colore giallo-arancione (l'intensità del colore aumenta all'aumentare della concentrazione). Per evitare possibili interferenze nell'analisi, nel caso di acque reflue, l'aggiunta del reattivo di Nessler avviene

dopo distillazione dell'ammoniaca in corrente di vapore (il distillatore utilizzato è un VELP SCIENTIFICA UDK 129 riportato in Figura 13). Si procede quindi mediante analisi spettrofotometrica e l'assorbanza del campione e del bianco vengono determinate alla lunghezza d'onda di 410 nm. Si risale infine alla concentrazione mediante retta di taratura, tenendo conto dell'eventuale diluizione del campione, attraverso la seguente equazione:

$$N - NH_4^+ = m * ABS * F.D.$$

dove:

ABS è il valore di assorbanza del campione determinato allo spettrofotometro.

F.D. è il fattore di diluizione operato nel campione prima di inserire il reattivo di Nessler (si riferisce ovviamente alla diluizione finale che è il prodotto delle diluizioni intermedie).

M è il coefficiente angolare della retta di calibrazione per l'analisi del N-NH₄⁺.

L'unità di misura è: N-NH₄⁺ = mg(N-NH₄⁺) * L⁻¹

Figura 13: Distillatore in corrente di vapore



Fonte: Propria

d) Azoto totale con metodo TKN

Il metodo del TKN serve per determinare la quantità totale di azoto presente nel campione (TKN = N_{ORG} + N-NH₃ + N-NH₄⁺). Inizialmente prevede la digestione acida con H₂SO₄ concentrato alla temperatura di 200 °C; si aggiungono perossidisolfato di potassio, necessario per raggiungere la temperatura prefissata, ed ossido di mercurio come catalizzatore. In questo caso il campione viene digerito in mineralizzatore in due step per un totale di tre ore. Il valore di TKN è poi determinato tramite la seguente equazione:

$$TKN = \frac{m * ABS * F.D.* V}{P}$$

dove:

m è il coefficiente angolare della retta di calibrazione per l'analisi del N-NH₄⁺

ABS è l'assorbanza ricavata dall'analisi spettrofotometrica

F.D. è il fattore di diluizione operato nel campione prima di inserire il reattivo di Nessler (si riferisce ovviamente alla diluizione finale che è il prodotto delle diluizioni intermedie)

V è il volume del matraccio in cui è stato disciolto il digerito (0,25 L)

P è il peso del campione secco (gTS)

L'unità di misura in cui si esprime il TKN è: TKN = gN * KgTS⁻¹

e) Ortofosfato

Per quanto riguarda il contenuto di ortofosfati, il procedimento analitico si basa sulla reazione degli ioni ortofosfato con il molibdato di ammonio ed il potassio antimoni-tartarato (reagente misto) con formazione di un eteropoliacido che successivamente viene ridotto mediante acido ascorbico a blu di molibdeno, un composto intensamente colorato. Si procede quindi con determinazione spettrofotometrica, determinando l'assorbanza del campione ad una lunghezza d'onda di 710 nm.

Si determina la concentrazione mediante la retta di calibrazione:

$$[PO_4^{3-}] = m * F.D.* ABS$$

dove:

ABS è il valore di assorbanza del campione determinato allo spettrofotometro.

F.D. è il fattore di diluizione operato nel campione prima di inserire il reagente misto (si riferisce ovviamente alla diluizione finale che è il prodotto delle diluizioni intermedie)

m è il coefficiente angolare dalla retta di calibrazione per l'analisi del P-PO₄³⁻

L'unità di misura è: [PO₄³⁻] = [mg(P-PO₄³⁻)] * L⁻¹

f) Fosforo totale

Il fosforo totale si determina effettuando una digestione acida della componente solida del campione mediante perossidissolfato di potassio in mineralizzatore (analogo a TKN) per portare l'intero contenuto di fosforo in forma di ortofosfato. Segue quindi la determinazione spettrofotometrica dell'ortofosfato (sempre con lunghezza d'onda a 710 nm) che sarà ora composto da quello rilasciato dal materiale organico e da quello già presente in soluzione. Il quantitativo di fosforo totale è dato dalla seguente equazione:

$$P_{TOT} = m * ABS * F.D.* V P$$

Dove:

m è il coefficiente angolare della retta di calibrazione per l'analisi del $P-PO_4^{3-}$

ABS è l'assorbanza del campione determinata mediante analisi spettrofotometrica

F.D. è il fattore di diluizione operato nel campione prima di inserire il reagente misto (si riferisce ovviamente alla diluizione finale che è il prodotto delle diluizioni intermedie)

V è il volume del matraccio in cui è stato disciolto il digerito (0,25 L)

P è il peso del campione secco (gTS)

L'unità di misura del P_{TOT} è: $P_{TOT} = gP * KgTS^{-1}$

3 Risultati e Discussione

La sperimentazione condotta in scala di laboratorio ha permesso un campionamento poco frequente (ma di elevate volumetrie) delle due matrici in questione. Sia i fanghi di depurazione che la FORSU venivano miscelati prima del pretrattamento e conservati a 4°C prima del loro utilizzo. Tale procedura si è tuttavia rivelata controproducente in termini di gestione del processo in quanto la temperatura, seppur bassa, ha consentito la proliferazione di popolazioni metanigene (portando ad una sostituzione della biomassa batterica con una biomassa prevalentemente metanigena, che tende a preferire condizioni a pH neutro/leggermente basico, con conseguente consumo di VFA per la produzione di biogas): tale evidenza è stata confermata dalla saltuaria analisi di biogas prodotto nel corso delle prove e dal valore di pH, superiore a 7.0, decisamente elevato se consideriamo l'acidità della FORSU e la totale assenza di alcalinità in questa matrice. I fanghi di depurazione, tuttavia, sono dotati di alcalinità; pertanto, lo stesso processo di produzione di metano potrebbe essere stato favorito dall'apporto di alcalinità ad opera dei fanghi secondari. Pertanto, nelle fasi successive della sperimentazione, la miscela di alimentazione è stata conservata a -20°C; passaggio obbligato per una sperimentazione in piccola scala, ma totalmente eliminabile nell'eventualità di uno scale-up di processo.

Inoltre, dopo circa 30 giorni, è stata sospesa l'alimentazione con FORSU-fanghi pretrattati e sostituita con FORSU-fanghi senza pretrattamento; il che ha permesso un autocontrollo maggiore del processo, con valori di pH più bassi (5.0-6.0) e meno favorevoli alla proliferazione delle colture metanigene. Questo ha permesso di ottenere un'ulteriore distinzione delle condizioni di reazione e valutare l'effetto che ha la presenza o assenza di pretrattamento sui parametri di processo sullo stesso HRT. I risultati riportati, nonché gli andamenti nelle successive figure, sono suddivisi in pre e post cambio di substrato di alimentazione, ovvero matrice pretrattata e non-pretrattata. Per logiche di processo non è stato possibile portare avanti la sperimentazione oltre al 50° giorno; pertanto, i dati relativi alla "fase due" non sono comprensivi di dati a "medio periodo" dunque l'interpretazione che se ne può dare è solo parziale e sarà necessaria maggiore investigazione.

3.1 Caratterizzazione e pretrattamento delle matrici

La caratterizzazione delle matrici utilizzate come alimento per il processo è illustrata nelle tabelle qui di seguito riportate, i risultati del fango sono illustrati in Tabella 7, la Tabella 8 è relativa alla FORSU utilizzata nella prima fase della sperimentazione mentre la Tabella 9 fa riferimento alla FORSU utilizzata nella seconda fase. Una distinzione per la stessa categoria di rifiuto è ritenuta necessaria in quanto la FORSU è una matrice soggetta a forte variabilità nella sua composizione sia su base spaziale che temporale, eterogeneità che è dettata dalla natura stessa del rifiuto. Sebbene entrambe le tranches FORSU siano state prelevate campionate all'interno della stessa struttura e che i campionamenti siano stati fatti all'interno di una finestra temporale non dilatata a tal punto da subire una variazione su base stagionale; assumere che la caratterizzazione delle matrici sia la stessa sarebbe sbagliato pertanto una divisione è ritenuta imprescindibile per una corretta interpretazione dei risultati ottenuti dalla sperimentazione. I dati sono relativi, oltre che a valori di TKN, P e N-NH₄⁺, a quelli ritenuti più importanti all'interno di un processo fermentativo ossia: TS (Solidi Totali), VS (Solidi Volatili), COD_{SOL} (Chemical Oxygen Demand della frazione solubile) e VFA (Acidi Grassi Volatili), quest'ultimo solo nel caso della FORSU perché nel WAS virtualmente si assume pari a zero visto lo scarso contenuto naturalmente presente in questa matrice.

Tabella 7: Caratterizzazione del fango utilizzato come alimento prima della centrifugazione.

Parametro	Unità di misura	Fango non pretrattato*	Fango Pretrattato**
TS	g*Kg ⁻¹	28.6 ± 0.4	21.6 ± 0.8
VS	g*Kg ⁻¹	22.4 ± 0.2	14.4 ± 0.2
COD _{SOL}	g*L ⁻¹	1.1 ± 0.1	8.7 ± 0.3
TKN	gN*KgTS ⁻¹	33 ± 2	-
P	gP*gTS ⁻¹	18 ± 1	-
N-NH ₄ ⁺	g*L ⁻¹	0.16 ± 0.4	0.67 ± 0.3
VFA	gCOD*L ⁻¹	-	-

*utilizzato nella seconda parte della sperimentazione (giorni 32-50)

** utilizzato nella prima parte della sperimentazione (giorni 0-32)

Tabella 8: Caratterizzazione della tranche di FORSU utilizzato come alimento nella prima fase della sperimentazione, prima della centrifugazione.

Parametro	Unità di misura	FORSU non pretrattata	FORSU Pretrattata**
TS	g*Kg ⁻¹	44 ± 1	40.2 ± 0.3
VS	g*Kg ⁻¹	37.5 ± 0.3	31 ± 1
COD _{SOL}	g*L ⁻¹	13.2 ± 0.4	21.7 ± 0.6
TKN	gN*KgTS ⁻¹	29 ± 2	-
P	gP*gTS ⁻¹	6 ± 1	-
N-NH ₄ ⁺	g*L ⁻¹	0.12 ± 0.4	0.36 ± 0.2
VFA	gCOD*L ⁻¹	3.1 ± 0.2	2.3 ± 0.3

**utilizzata nella prima parte della sperimentazione (giorni 0-32)

Tabella 9: Caratterizzazione della trancie di FORSU utilizzato come alimento nella seconda fase della sperimentazione, prima della centrifugazione.

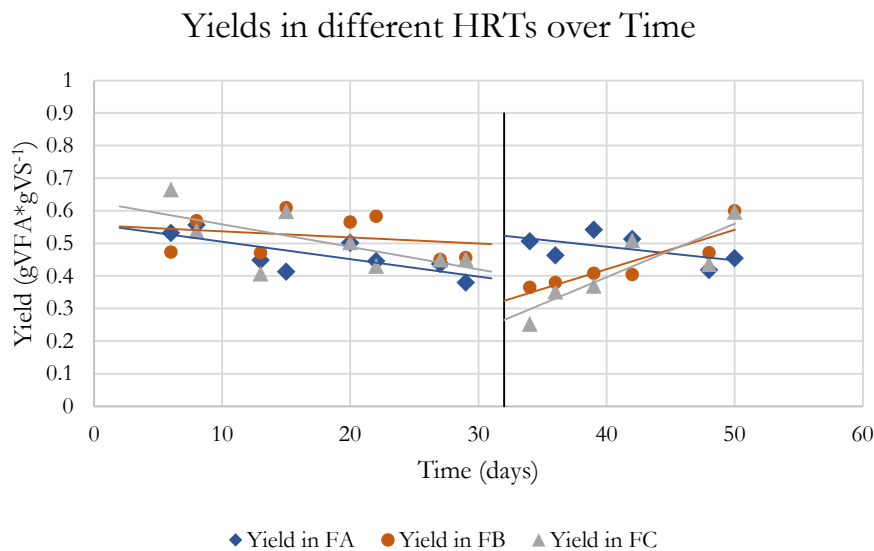
Parametro	Unità di misura	FORSU non pretrattata*
TS	g*Kg ⁻¹	54 ± 3
VS	g*Kg ⁻¹	46 ± 2
COD _{SOL}	g*L ⁻¹	30 ± 2
TKN	gN*Kg ⁻¹ TS ⁻¹	27 ± 1
P	gP*gTS ⁻¹	5.0 ± 0.3
N-NH ₄ ⁺	g*L ⁻¹	0.28 ± 0.5
VFA	gCOD*L ⁻¹	4.0 ± 0.3

*utilizzata nella seconda parte della sperimentazione (giorni 32-50)

Le caratterizzazioni qui di sopra riportate sono relative alla matrice prima della centrifugazione operazione che comporta naturalmente una riduzione dei valori a causa del minor tenore di solidi contenuti nella fase liquida ottenuta che, come già affermato nel paragrafo 2.2.1, costituisce il substrato utilizzato per la sperimentazione.

3.2 Rendimento, velocità, concentrazione di prodotto e rapporto COD_{VFA}*COD_{SOL}⁻¹².

Figura 14: Grafico a dispersione delle rese registrate durante la sperimentazione, separate per alimento utilizzato.



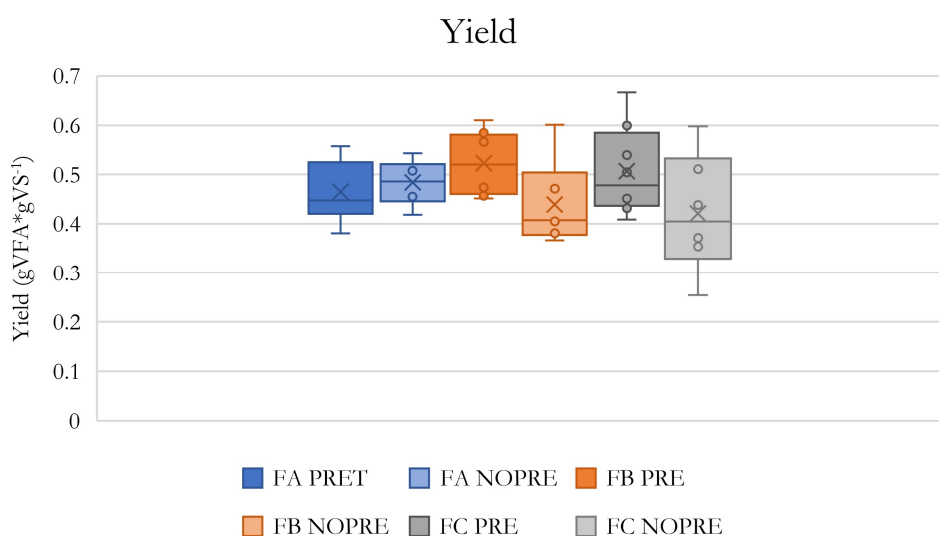
Lo *scatterplot* in Figura 14 evidenzia come nella prima fase della sperimentazione, il rendimento maggiore è stato ottenuto nella *run* FB con un valore medio di 0.52 ± 0.02 gVFA*gVS⁻¹ seguito dalla *run* FC (0.51 ± 0.03 gVFA*gVS⁻¹) e a 4 giorni (0.47 ± 0.02

² In Appendice A sono fornite tre tabelle, divise per HRT, con i dati rilevati durante la sperimentazione.

gVFA*gVS⁻¹). Il valore massimo di rendimento è stato registrato al giorno 6 nella *run* FC (0.67 gVFA*gVS⁻¹), in pratica dopo un solo HRT, periodo quindi troppo breve per considerare tale valore come rappresentative. In generale, la *run* con FB giorni ha evidenziato una maggiore stabilità nei valori di rendimento, rispetto alle altre due *runs* condotte ad HRT 4-6 giorni, il cui valore tende ad essere tendenzialmente decrescente. A seguito del cambio di substrato (giorno 32, miscela fanghi-FORSU non pretrattata), la *run* FA si è rivelata migliore, con un valore medio di rendimento di 0.48 ± 0.02 gVFA*gVS⁻¹, a seguire FB (0.44 ± 0.04 gVFA*gVS⁻¹) e HRT 6 (0.42 ± 0.05 gVFA*gVS⁻¹). Tuttavia, si nota un progressivo abbassamento di tale valore proprio nella *run* FA; in controtendenza rispetto alle altre due *runs*.

Le linee di tendenza mostrano che con substrato pretrattato, il rendimento ha un andamento decrescente nel tempo per tutte le *runs* di processo. A seguito del cambio di alimentazione, il rendimento di FA si è attestato a valori più elevati per poi riprendere il suo andamento decrescente. Gli HRT 5 e 6 si sono subito attestati ai valori i più bassi dell'intero periodo di sperimentazione per poi dimostrare una crescita registrando il tetto di rendimento relativo alla seconda fase pari a 0.60 gVFA*gVS⁻¹. L'interruzione del processo fermentativo non ha probabilmente concesso di osservare eventuali variazioni di tale parametro: in termini di durata, le tre *runs* condotte con alimentazione non pretrattata hanno avuto una lunghezza temporale compresa tra 3-5 HRT, ovvero un tempo probabilmente non sufficiente per una valutazione effettiva e rappresentativa del rendimento di fermentazione.

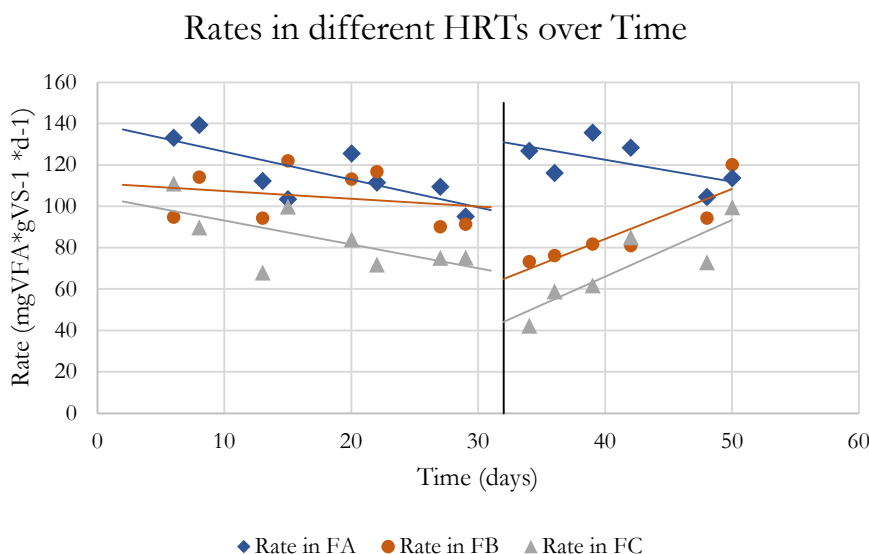
Figura 15: Boxplot relativo alle rese registrate durante la sperimentazione separate per tipologia di alimento utilizzato.



I *boxplot* in Figura 15 forniscono una chiara visione di come solo per la *run* FA l'applicazione del pretrattamento abbia generato ad una maggior variabilità del rendimento, mentre per FB e FC il pretrattamento abbia permesso ottenere dei valori di rendimento più costanti.

Il valore di mediana nella FA si attesta $0.45 \text{ gVFA} \cdot \text{gVS}^{-1}$ contro lo $0.49 \text{ gVFA} \cdot \text{gVS}^{-1}$ registrato durante la seconda fase, comportamento diverso rispetto alla *run* FB che ha visto decrescere la mediana da 0.52 a $0.41 \text{ (gVFA} \cdot \text{gVS}^{-1})$ e alla FC, da 0.48 a $0.40 \text{ (gVFA} \cdot \text{gVS}^{-1})$. Definire il processo migliore in termini di rendimento risulta non unidirezionale, ma in ottica di compromesso, rinunciando quindi ad una minor variabilità e preferendo valori superiori, la *run* FB con substrato pretrattato consentirebbe una maggior rendimento di processo rispetto alla FA, anche a fronte della minor pendenza della retta di tendenza della prima. La replica FC risulta invece da escludere a causa dell'inferiore stabilità nel tempo. C'è tuttavia da considerare il tempo relativamente breve delle *runs* condotte con alimentazione non pretrattata, anche a fronte degli andamenti crescenti dei rendimenti con HRT 5-6 giorni. Tale evidenza sperimentale apre a chiaramente a successive investigazioni.

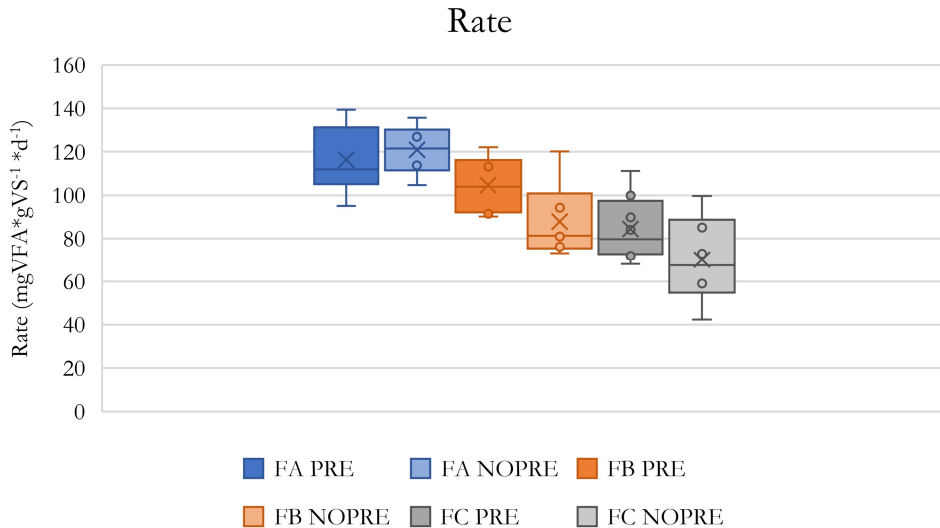
Figura 16: Grafico a dispersione delle velocità di generazione di VFA registrate durante la sperimentazione, separate per alimento utilizzato.



Per quanto riguarda le velocità di produzione (Figura 16) nella prima fase della sperimentazione tutte e 3 le *runs* hanno mostrato un andamento decrescente nel tempo, soprattutto le *runs* FA e FC. Dopo il cambio di alimentazione (giorno 32), le *runs* FB e FC hanno mostrato un cambio netto di tendenza mentre FA ha registrato valori superiori ai precedenti, ma in progressiva diminuzione nel tempo. Considerando la sperimentazione condotta con alimentazione pretrattata, i valori medi più alti sono stati ottenuti con la *run* FA

($116 \pm 5 \text{ mgVFA} \cdot \text{gVS}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) seguita da FB ($105 \pm 5 \text{ mgVFA} \cdot \text{gVS}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) e FC ($84 \pm 5 \text{ mgVFA} \cdot \text{gVS}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). L'ordine si mantiene anche dopo il cambio di alimentazione, durante la quale solo la FA esibiva un andamento decrescente, registrando tuttavia valori medi superiori alla fase precedente ($121 \pm 5 \text{ mgVFA} \cdot \text{gVS}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). Le *runs* FB e FC hanno esibito valori rispettivamente pari a 88 ± 7 e $70 \pm 8 \text{ mgVFA} \cdot \text{gVS}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. Il valore massimo di velocità è stato registrato dalla *run* FA sia nella prima fase che dopo il cambio di substrato rispettivamente pari a 139 e $136 \text{ mgVFA} \cdot \text{gVS}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ raggiunti al giorno 8 e 39 di sperimentazione. In relazione ai valori medi esibiti, tali evidenze sono in accordo con gli HTR adottati; ovvero valori di HRT inferiori sembrano selezionare biomasse più veloci nella loro attività fermentativa. C'è tuttavia da considerare la stabilità nell'andamento di tale parametro, sicuramente non ideale nella FA. Come detto precedentemente, la condizione di funzionamento migliore potrebbe essere rappresentata dalla HRT 5 giorni, con alimentazione pretrattata, in termini di compromesso tra valor medio e stabilità del parametro. Resta tuttavia aperta la discussione nella parte di sperimentazione dedicata alla matrice non pretrattata, i cui valori di velocità sembravano tendenzialmente crescenti senza tendere ad una reale condizione di stabilità.

Figura 17: Boxplot relativo alle velocità registrate durante la sperimentazione, spartate per tipologia di alimento utilizzato.

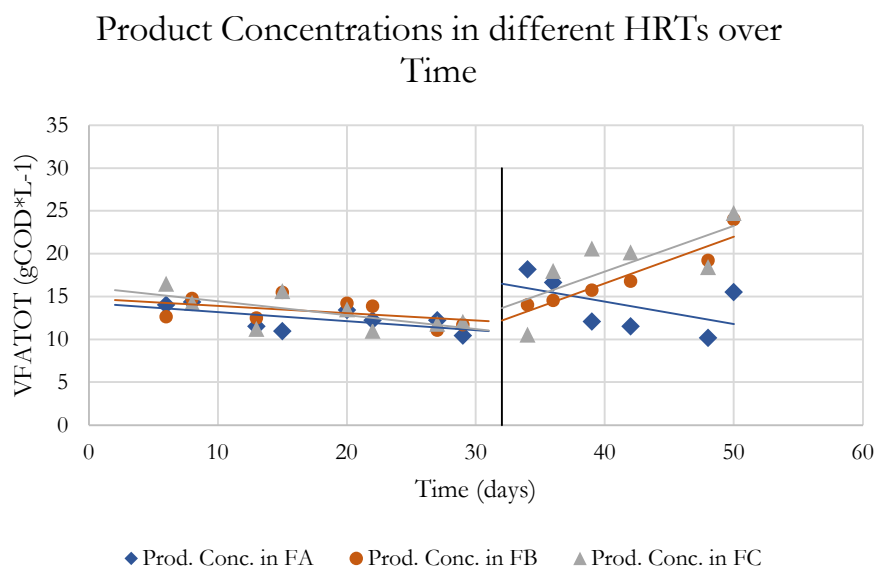


I *boxplot* in Figura 17 confermano che la *run* FA detiene le performance migliori in termini di velocità, inoltre l'assenza del pretrattamento non solo abbassa la variabilità, ma comporta anche un aumento della mediana da 112 a $122 \text{ mgVFA} \cdot \text{gVS}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. Il comportamento della FA è in controtendenza rispetto alle altre due *runs* in quanto entrambe denotano un aumento di variabilità e un valore di mediana inferiore. Con assenza di pretrattamento, la mediana di FB decresce da 104 a $81 \text{ mgVFA} \cdot \text{gVS}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ mentre FC mostra una riduzione da 80 a $67 \text{ mgVFA} \cdot \text{gVS}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. Anche per quanto concerne la velocità di produzione la *run* FB dimostra

più costanza in confronto alle altre due durante la prima fase anche se si assesta a valori inferiori rispetto alla *run* FA. La forte decrescita temporale della velocità vista nella *run* FA rende quest'ultima poco attraente. Rimane interessante anche la conduzione del processo con substrato non pretrattato che comporta, nella *run* FB, un'importante crescita temporale, non attestandosi tuttavia a valori superiori rispetto alla prima fase. Per cause precedentemente citate, non si può escludere una successiva stazionarietà del processo. Pertanto, sulla base dei dati a disposizione, anche in termini di velocità di fermentazione così come per il rendimento di fermentazione, il valore di HRT 5 giorni (con miscela pretrattata), rappresenta la scelta migliore nella conduzione del processo fermentativo.

La concentrazione di prodotto (Figura 18) è uno dei parametri fondamentali nella valutazione di un processo di fermentazione acidogenica. Durante la fase condotta con substrato pretrattato era evidente una scarsa variabilità dei valori; tra l'altro, tali valori sembravano essere simili per tutte le *run* di processo. L'analisi dei valori medi per FA, FB e FC ha rivelato dati pari rispettivamente a 12.4 ± 0.5 , 13.3 ± 0.5 e 13.2 ± 0.7 gCOD*L⁻¹. Il massimo è stato raggiunto al giorno 6 nella *run* FC registrando 16.5 gCOD*L⁻¹. Con il cambio di alimentazione la dispersione dei valori delle tre *runs* è notevolmente aumentata, la FA ha mantenuto, dopo breve un rialzo, l'andamento decrescente della prima fase. Per quanto concerne FB e FC oltre a registrare un rialzo vi è stato un cambio di tendenza che ha portato a registrare i valori di massimo di concentrazione di prodotto rispettivamente 24 e 24.7 gCOD*L⁻¹. I valori medi della seconda fase si sono rivelati tuttavia maggiori dei precedenti in tutte e tre le *run*: 14 ± 1 (FA), 17 ± 2 (FB) e 19 ± 2 (FC).

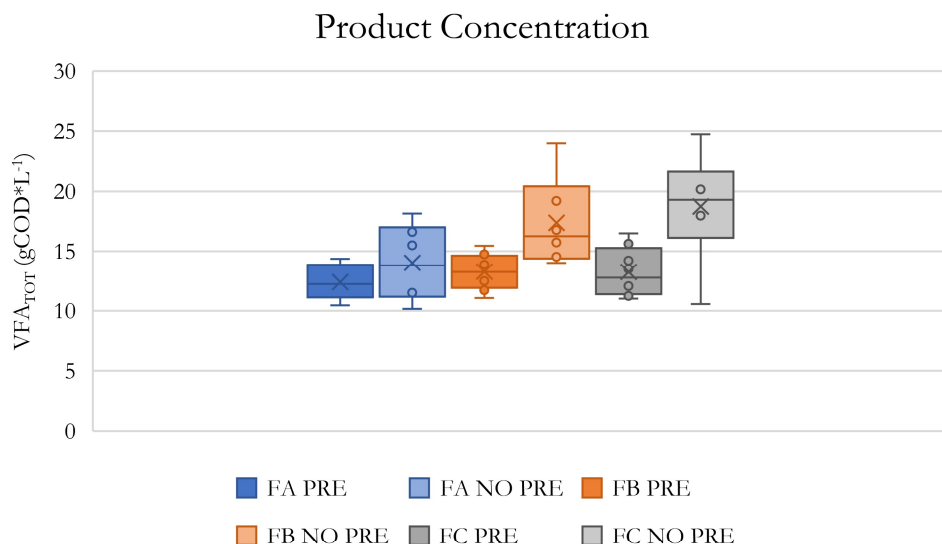
Figura 18: Grafico a dispersione delle concentrazioni di prodotto registrate durante la sperimentazione, separate per tipologia di substrato utilizzato.



Tuttavia, come discusso per i precedenti parametri, gli andamenti dei VFA nel tempo risultano poco stabilizzati nelle *runs* condotte con alimentazione non pretrattata. Non risulta ancora chiaro se il pretrattamento effettivamente tenda a stabilizzare i prodotti di fermentazione così come le performance di processo. L'assenza di tale step, pertanto, dovrebbe essere ulteriormente investigata in quanto, probabilmente, la durata delle *runs* condotte con alimentazione non pretrattata non è stata sufficiente a garantire performance costanti di fermentazione.

Il boxplot in Figura 19 conferma l'aumento della variabilità di concentrazione di prodotto a seguito dell'alimentazione con alimentazione non pretrattata, anche la mediana risulta maggiore in tutti i casi, la *run* FC risulta essere quella meno stabile durante la seconda fase mentre la FA è il più stabile durante la prima.

Figura 19: Boxplot relativo alle concentrazioni di prodotto registrate durante la sperimentazione, separate per tipologia di alimento utilizzato.

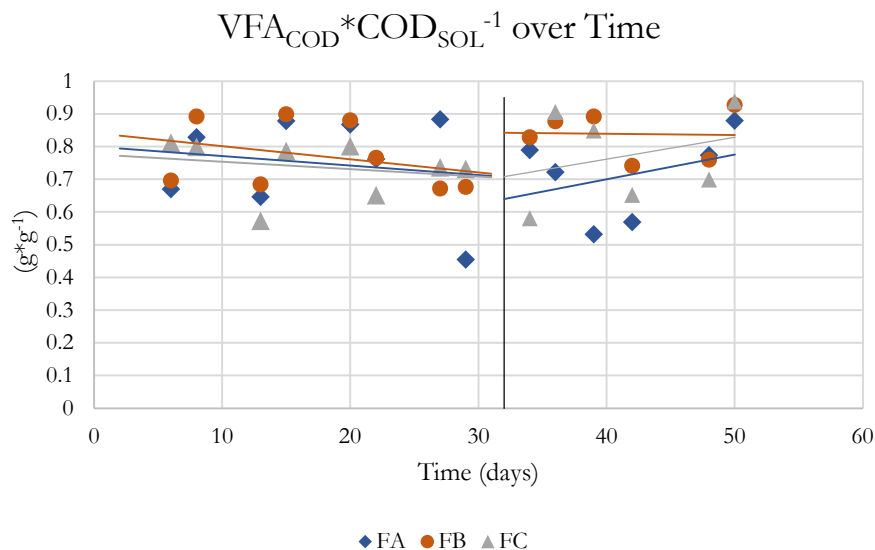


Nonostante la maggior stabilità di processo da parte di tutte le *runs* di processo con substrato pretrattato, la maggior concentrazione di prodotto durante la seconda fase potrebbe far preferire un processo meno stabile. C'è tuttavia da considerare che la FORSU stessa non era sempre costante in termini di caratteristiche chimico-fisiche (prime fra tutte TS, VS e COD_{SOL}): la FORSU utilizzata nella seconda fase (senza pretrattamento) aveva un contenuto di TS e VS molto più elevato rispetto a quella utilizzata nella prima fase della sperimentazione. L'incremento quindi di VFA nel corso delle *runs* con alimentazione non pretrattata era principalmente imputabile alla variazione delle caratteristiche della FORSU, e non all'effetto positivo dell'assenza di pretrattamento. Tale discussione è tra l'altro supportata dai valori di rendimento e velocità, i quali non registrano incrementi in nessuna delle tre *runs* condotte con alimentazione non pretrattata (si vedano le figure 17 e 15). Nelle corse FB e FC entrambi

i valori del primo quartile sono superiori ai valori del terzo quartile delle rispettive corse della prima fase. Ciò permetterebbe di considerare più vantaggioso un processo a maggior variabilità ma che permetta un minimo di produzione più alto. Il valore di minimo fa in questo caso da discriminante nella scelta del processo, in quanto l'HRT 5 ha un minimo superiore rispetto a quello del processo ad HRT maggiore, il che permette di considerarlo come il più idoneo per un'applicabilità ad una maggiore scala.

In termini di rapporto tra VFA (considerati come COD) e il COD solubile durante la prima fase in tutte le *runs* si è riscontrato un andamento negativo (Figura 20), ma con valori medi congrui pari a $0.75 \pm 0.05 \text{ COD}_{\text{VFA}} \cdot \text{COD}_{\text{SOL}}^{-1}$ (FA), $0.77 \pm 0.04 \text{ COD}_{\text{VFA}} \cdot \text{COD}_{\text{SOL}}^{-1}$ (FB) e $0.74 \pm 0.03 \text{ COD}_{\text{VFA}} \cdot \text{COD}_{\text{SOL}}^{-1}$ (FC).

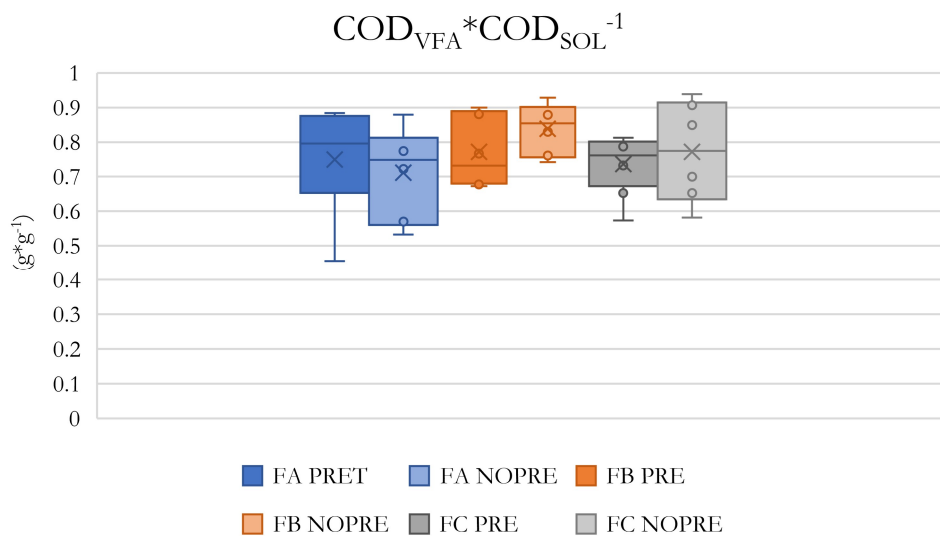
Figura 20: Grafico a dispersione del rapporto VFA (come CODsol) e il CODsol registrate durante la sperimentazione, separate per tipologia di alimento utilizzato.



Il processo FB ha registrato il valore maggiore della prima fase con una punta di $0.90 \text{ COD}_{\text{VFA}} \cdot \text{COD}_{\text{SOL}}^{-1}$ raggiunta al giorno 15. Nella seconda fase FB ha denotato una leggera tendenza negativa al contrario delle altre due *runs* che sono andate in forte controtendenza rispetto al periodo precedente. I valori medi sono aumentati in tutti e tre i casi rispettivamente $0.71 \pm 0.05 \text{ COD}_{\text{VFA}} \cdot \text{COD}_{\text{SOL}}^{-1}$ (FA), $0.84 \pm 0.03 \text{ COD}_{\text{VFA}} \cdot \text{COD}_{\text{SOL}}^{-1}$ (FB) e $0.77 \pm 0.06 \text{ COD}_{\text{VFA}} \cdot \text{COD}_{\text{SOL}}^{-1}$ (FC). L'analisi dei *boxplot* (in Figura 21) rivela una diversa reazione per ogni *run* al cambio di substrato. Per la *run* FA la variabilità aumenta ma il punto di massimo rimane lo stesso ($0.88 \text{ COD}_{\text{VFA}} \cdot \text{COD}_{\text{SOL}}^{-1}$) allo stesso tempo la mediana diminuisce (da 0.80 a $0.75 \text{ COD}_{\text{VFA}} \cdot \text{COD}_{\text{SOL}}^{-1}$). Differente invece è la situazione per FB che dimostra un miglioramento dei risultati con una mediana maggiorata (da 0.73 a $0.85 \text{ COD}_{\text{VFA}} \cdot \text{COD}_{\text{SOL}}^{-1}$) e una minor variabilità. FC subisce a causa dell'aumento di substrato un considerevole aumento di variabilità ma tenendo una mediana quasi invariata (0.76 a 0.77

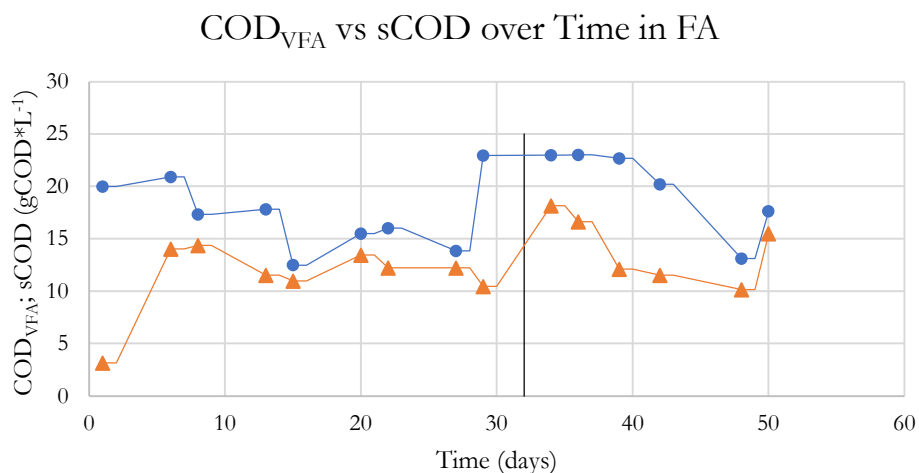
$COD_{VFA} * COD_{SOL}^{-1}$). Sia da *scatterplot* che da *boxplot* è evidente come il processo FB sia superiore agli altri due, anche se la maggior stabilità di processo sia stata raggiunta da FC durante la prima fase, i valori raggiunti non sono alti come quelli invece ottenuti con FB che tra le sue due fasi preferisce quella successiva al cambio di alimentazione, con un primo quartile più elevato e una variabilità inferiore anche se i valori di punta sono congrui alla prima fase.

Figura 21: Boxplot relativo ai valori del rapporto VFA (come CODsol) e il CODsol registrati durante la sperimentazione separate per tipologia di alimento utilizzato.



In merito all'andamento temporale della concentrazione di prodotto (misurato in COD) e del sCOD per singola *run*, si può notare che per FA (Figura 22) come i valori tendano ad avvicinarsi nei giorni 9, 15, 21, 23 e 27 mentre per il resto del periodo di sperimentazione, sia

Figura 22: Grafico a dispersione relativo all'andamento temporale della concentrazione di VFA (come CODsol) e il COD solubile totale nella run FA.

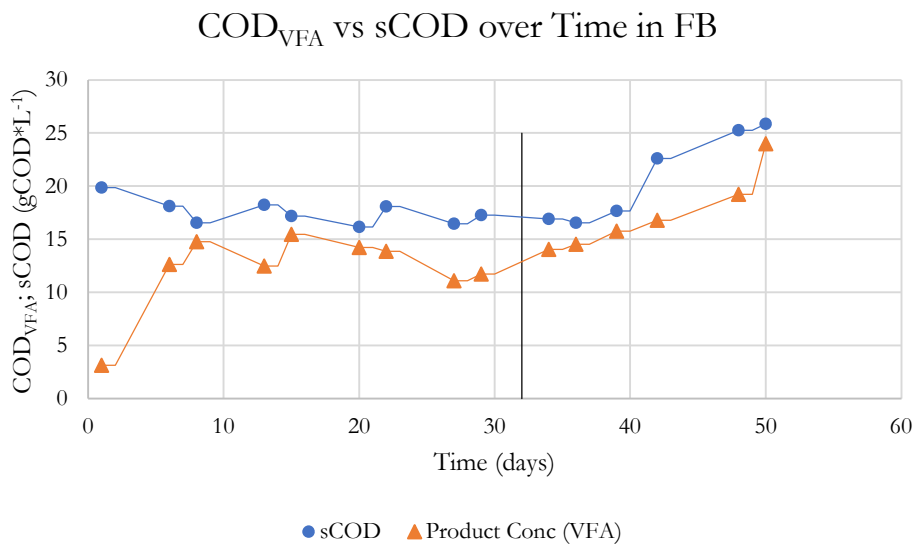


(Linea verticale di demarcazione fine alimentazione a substrato pretrattato a favore di substrato non idrolizzato.)

prima che seconda fase la percentuale di COD_{VFA} all'interno del sCOD è decisamente inferiore. Nonostante la congruità dei valori della prima fase, che rendono l'applicazione del substrato pretrattato più attraente, l'andamento non costante di entrambi i parametri nel tempo non esclude FA per la scalabilità del processo.

Risulta evidente come l'assenza di pretrattamento della matrice incida sull'efficienza di acidificazione e come solo negli ultimi cinque giorni si nota un riallineamento dei valori facendo supporre un acclimatamento della biomassa alle nuove condizioni. Ulteriore conferma del fatto che tale sperimentazione meriti maggior attenzione a future investigazioni.

Figura 23: Grafico a dispersione relativo all'andamento temporale della concentrazione di VFA (come COD_{sol}) e il COD solubile totale nella run FB.



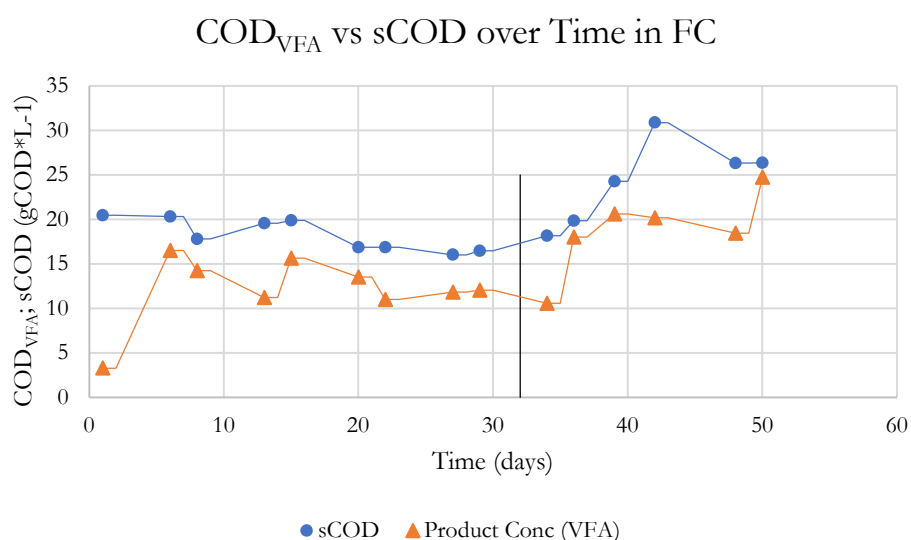
(Linea verticale di demarcazione fine alimentazione a substrato pretrattato a favore di substrato non idrolizzato.)

A differenza della FA, la FB (Figura 23) denota una maggior congruità dei valori nel tempo ed una minor variabilità. L'andamento della concentrazione di VFA così come di COD_{sol} è decisamente stabile in presenza di matrice pretrattata. Tale stabilità è un fattore sicuramente importante in ottica scale-up, e fa supporre come tale pretrattamento potrebbe essere un requisito fondamentale per una migliore conduzione e un miglior controllo del processo fermentativo (processo preferibile in quanto meno suscettibile a shock di carico a seguito di variazioni nella matrice iniziale). L'HRT 5 dimostra una maggior costanza nell'efficienza di acidificazione rispetto all'HRT inferiore in entrambe le fasi. Ciò lo rende il miglior candidato per l'attuazione del processo ad una maggiore scala. La crescita di VFA e COD_{sol} nel secondo periodo fa supporre una predominanza della variazione della matrice: il processo ha subito un incremento del carico organico (a seguito dell'incremento dei TS e VS della FORSU). Tuttavia, la condizione HRT 5 consente di gestire in maniera più efficiente l'acclimatamento rispetto a quanto visto in precedenza (HRT 4). Il progressivo incremento dei VFA potrebbe tuttavia far supporre una certa instabilità di processo, o quantomeno il

non raggiungimento della stazionarietà (come del resto discusso in precedenza). Emerge tuttavia una migliore prestazione in HRT 5 rispetto alla precedente, sicuramente non idonea per la produzione di VFA da matrice non pretrattata (almeno nelle fasi di acclimatamento della biomassa fermentante).

Infine, per quanto concerne la *run* FC, il grafico (Figura 24) permette di collocarlo tra le due precedenti repliche in ordine di preferibilità, infatti, anche raggiungendo concentrazioni di prodotto superiori durante la seconda fase, la variabilità dei valori durante l'intero periodo di sperimentazione è tale da renderla meno preferibile rispetto alla *run* precedente (HRT 5).

Figura 24: Grafico a dispersione relativo all'andamento temporale della concentrazione di VFA (come COD_{VFA}) e il COD solubile totale nella *run* FC.



(Linea verticale di demarcazione fine alimentazione a substrato pretrattato a favore di substrato non idrolizzato.)

Il processo risulta meno stabile rispetto a quello ad HRT inferiore in termini di efficienza di acidificazione su tutto il periodo, inoltre una volta inserita la nuova alimentazione i valori di concentrazione di VFA e COD_{SOL} assumono un *trend* positivo, come osservato con la *run* FB (quindi attribuibile alla variabilità della FORSU e delle sue caratteristiche chimico-fisiche), ma decisamente meno stabili e più differenziati. Infatti, spesso il COD_{SOL} era di gran lunga maggiore rispetto ai VFA, segno inequivocabile di una instabilità e di poca efficienza di acidificazione.

Analizzando le *runs* di processo con i parametri di rendimento, velocità, concentrazione di prodotto (VFA) e rapporto COD_{VFA}/COD_{SOL} si può affermare con confidenza che il miglior processo in ottica di scalabilità sia FB con alimentazione a base di fanghi di depurazione e FORSU pretrattati. Per quanto riguarda la *run* FA, nonostante spesso dimostri avere valori superiori in termini di velocità alle altre *runs* (caratteristica per altro attesa dato il più basso

valore di HRT testato) non si può considerare affidabile in termini temporali in quanto ha spesso riportato andamenti decrescenti più ripidi rispetto alle altre sperimentazioni (sia in termini di rendimento che di velocità stessa) e, al netto della concentrazione di prodotto dove i valori erano inferiori alle concorrenti, la sua variabilità si è sempre rivelata motivo di orientamento della scelta verso un'altra condizione operativa.

L'unico caso di preferibilità della condizione operativa ad HRT 6 (FC) è nell'ottica di ricerca di una maggior concentrazione di prodotto (VFA) all'interno della seconda fase (miscela non pretrattata). Dato tuttavia fortemente influenzato dal cambiamento stesso delle caratteristiche della FORSU, molto più ricca in TS e VS nella seconda fase (dal 32° giorno in poi) rispetto alla prima. Purtroppo, il valore di massimo e minimo così distanti rispettivamente dal valor di primo e terzo quartile e la mancanza di dati a medio termine abbassano, al momento, la confidenza nella scelta di questa condizione operativa per una maggiore scala di processo. Bisogna tuttavia considerare, come del resto per le altre *runs*, che la durata stessa della sperimentazione in questa fase potrebbe essere stata non sufficiente per la determinazione di dati stabili ed effettivamente rappresentativi, e sarà oggetto di seguenti sperimentazioni.

3.3 Composizione del mix di acidi prodotti

In tutte e 3 le *runs*, nella totalità di acidi quantificati, acido acetico (C2), propionico (C3) e butirrico (C4) rappresentano l'80% del quantitativo prodotto. Pertanto, da un punto di vista sia analitico che sperimentale, la discussione che segue è stata esclusivamente incentrata sui tre acidi sopra menzionati, essendo i più abbondanti in tutte le 3 *runs*, indipendentemente dal fatto di utilizzare matrici pretrattate e no. In Figura 25 si riporta la composizione percentuale del mix prodotto durante l'intero periodo di sperimentazione per la *run* FA (HRT 4 d). Ci si riferisce in questa parte della discussione, alle percentuali (%) dei vari acidi, calcolate su base COD ($\text{COD}_{\text{acid}} \cdot \text{COD}_{\text{VFA}}^{-1}$). Ad eccezione del periodo iniziale prossimo all'inoculo, la prima parte di sperimentazione (matrici pretrattate) mostra una predominanza di C4, attestata ad un valore medio del $47 \pm 2\%$ ($\text{COD}_{\text{but}} \cdot \text{COD}_{\text{VFA}}^{-1}$), seguito da C2 (valor medio $24 \pm 2\%$ $\text{COD}_{\text{prop}} \cdot \text{COD}_{\text{VFA}}^{-1}$) e C3 ($12 \pm 1\%$ $\text{COD}_{\text{ac}} \cdot \text{COD}_{\text{VFA}}^{-1}$). A seguito del cambio di alimentazione (giorno 32) costituito da matrici non pretrattate, la composizione media del mix di acidi prodotto riportava un incremento di C4, mediamente pari al $55 \pm 4\%$, con punte del 70% in corrispondenza delle fasi finali della *run*. Anche la quota relativa al C3 è aumentata attestandosi al $19 \pm 3\%$; mentre l'acido acetico mostrava una progressiva diminuzione,

avendo un valor medio pari al $15 \pm 2\%$, ed appena pari al 9% in corrispondenza delle fasi finali della *run*, esibendo quindi un *trend* in diminuzione.

Tali evidenze sperimentali mettono in evidenza gli effetti del pretrattamento sulla composizione della miscela VFA. Del resto, una fase di pretrattamento o idrolisi termica, incentivando la solubilizzazione della matrice organica, potrebbe facilitare il processo fermentativo “spingendolo” verso le vie metaboliche finali, caratterizzate da una prevalente produzione di acido acetico. Il fatto che quest’ultimo sia progressivamente carente nella seconda parte della *run* potrebbe far pensare che l’assenza di pretrattamento non favorisca le vie metaboliche fermentative finali, e di conseguenza causi un sostanziale accumulo di acido butirrico. Anche in questo caso, l’aumento del C4 è progressivo, raggiungendo un massimo di concentrazione proprio in corrispondenza dell’ultimo giorno di campionamento. E’ plausibile pensare che la biomassa era ancora in fase di acclimatazione alla nuova matrice, a conferma di quanto precedentemente detto in relazione alle performance di processo.

Gli acidi da C5 a C7 (incluso IC4) hanno rappresentato, singolarmente, contributi alla composizione del mix per valori uguali o inferiori al 5% pertanto le condizioni operative applicate non sono da considerarsi idonee alla produzione di questi acidi.

Figura 25: composizione percentuale del mix di acidi prodotto nel tempo per FA.

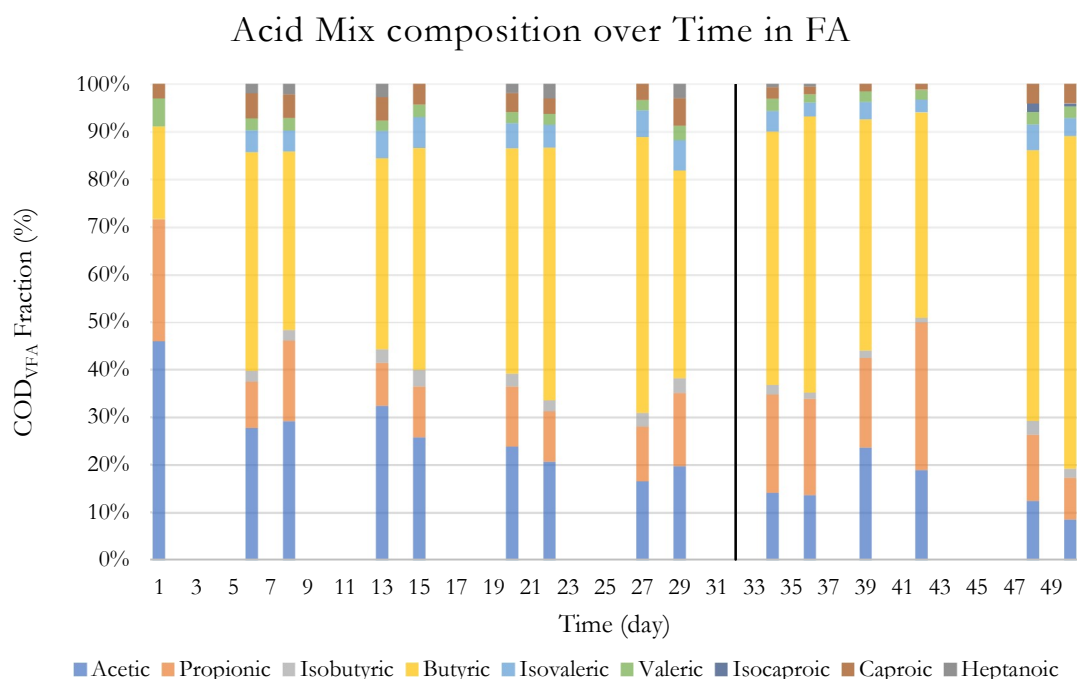
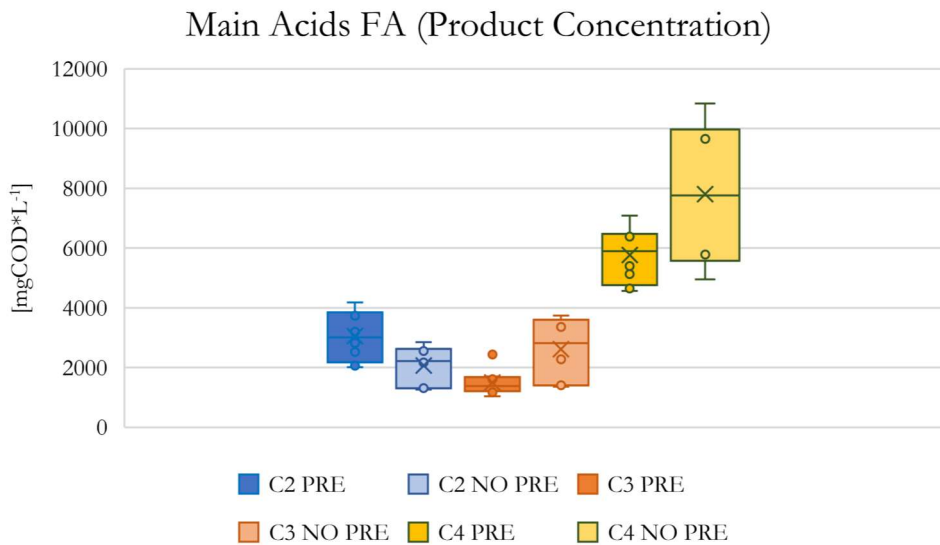
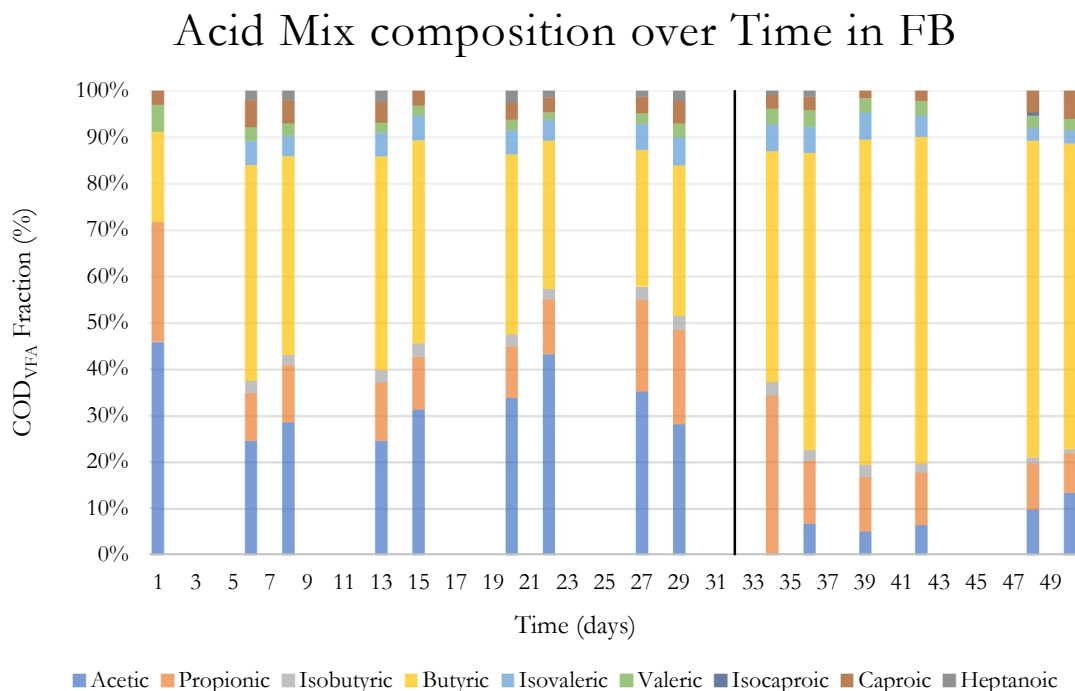


Figura 26: Boxplot relativi al quantitativo di acidi principalmente prodotti divisi per tipologia di alimento nella run FA.



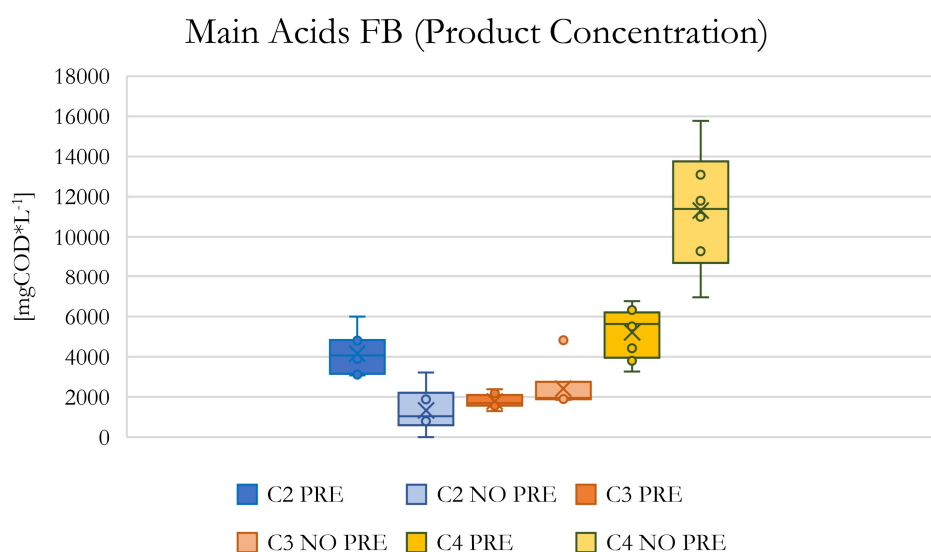
L'analisi dei *boxplot* in Figura 26 va a supporto del grafico precedente dimostrando come sia prima, che in via ancora più evidente dopo il pretrattamento, l'acido butirrico sia il *main product* del processo fermentativo e come sia più soggetto a variabilità rispetto agli altri acidi maggiormente prodotti. Gli ultimi due giorni rivelano il maggior contributo del C4 dell'intera *run* di processo, questo potrebbe supporre il turnover della precedente biomassa batterica con capacità metaboliche orientate principalmente alla produzione di acido butirrico; le analisi microbiologiche in corso potranno ulteriormente chiarire questo aspetto della ricerca sperimentazione, a conferma o meno delle ipotesi precedentemente discusse.

Figura 27: composizione percentuale del mix prodotto nel tempo per FB



Nella *run* FB (HRT 5, Figura 27) il comportamento osservato è simile alla condizione precedentemente illustrata, ma gli effetti del cambio di substrato si manifestano in maniera più evidente e precoce. Il contributo medio di C4 nella prima fase si attesta al $39\% \pm 2\%$ seguito da C2 ($31\% \pm 2\%$) e C3 ($14\% \pm 1\%$). Nei giorni 20 e 22 si nota un aumento del contributo del C2 ($> 40\%$), per poi abbassarsi al di sotto del 30% , in linea con il valor medio esibito. Con il cambio di alimentazione l'acido butirrico diventa predominante su tutti gli altri già dal giorno 39 con un valore medio di $65\% \pm 3\%$ mentre C2 e C3 scendono rispettivamente al $7\% \pm 2\%$ e $15\% \pm 4\%$.

Figura 28: Boxplot relativi al quantitativo di acidi principalmente prodotti divisi per tipologia di alimento nella *run* FB.



L'acido acetico in particolare viene drasticamente ridotto, come del resto osservato nella precedente *run* FA. Il singolo contributo degli altri acidi target è, come nella *run* FA, uguale o inferiore al 5% . Come nella *run* precedentemente commentata (FA), il contenuto di butirrico *pre* e *post* cambio di substrato è sempre superiore sia in termini di mediana che di variabilità rispetto agli altri acidi maggiormente prodotti, ma la variazione del quantitativo di acido butirrico tra prima e seconda fase è più radicale rispetto al caso precedente. Tale evidenza porterebbe a pensare che un valore di HRT pari a 5 giorni, potrebbe essere utilizzato per la produzione selettiva di acido butirrico, in condizioni di fermentazione termofila, e senza alcun pretrattamento idrolitico (o termico) della matrice di partenza.

La *run* FC (Figura 29) conferma, seppur con evidenti differenze, il comportamento precedentemente osservato nelle altre due corse (FA e FB). Il C4 si conferma il *main product* della prima fase con un valore medio del $38\% \pm 1\%$ seguito da C2 ($31\% \pm 2\%$) e C3 ($14\% \pm 1\%$). Il contributo di C2 della prima fase viene ampiamente ridotto dopo il cambio di

alimento. Infatti, il valore medio scende a $6\% \pm 0.4\%$ a favore di un considerevole aumento del C4 ($66\% \pm 3\%$) mentre il C3 ha mantenuto invariata la sua percentuale.

L'analisi dei *boxplot* (Figura 30) rivela una condizione simile quella delle precedenti due *run*, ma più accentuata. Un HRT più alto sembra favorire la produzione di acido butirrico soprattutto in presenza di alimentazione con substrato non pretrattato, d'altro canto considerando l'aumento del tempo di ritenzione ha un effetto inverso in caso di pretrattamento dell'alimentazione dando alla produzione di C4 una minor variabilità con valori però inferiori. Come nelle *run* precedenti il singolo contributo degli altri acidi target è inferiore al 5%, la causa della scarsa produzione degli acidi da C5 a C7 non è quindi da ricercarsi nel tempo di ritenzione idraulica (almeno nelle condizioni investigate in questa tesi sperimentale), ma nelle altre condizioni operative a contorno sulle quali saranno necessarie ulteriori investigazioni.

Figura 29: composizione percentuale del mix prodotto nel tempo per FC.

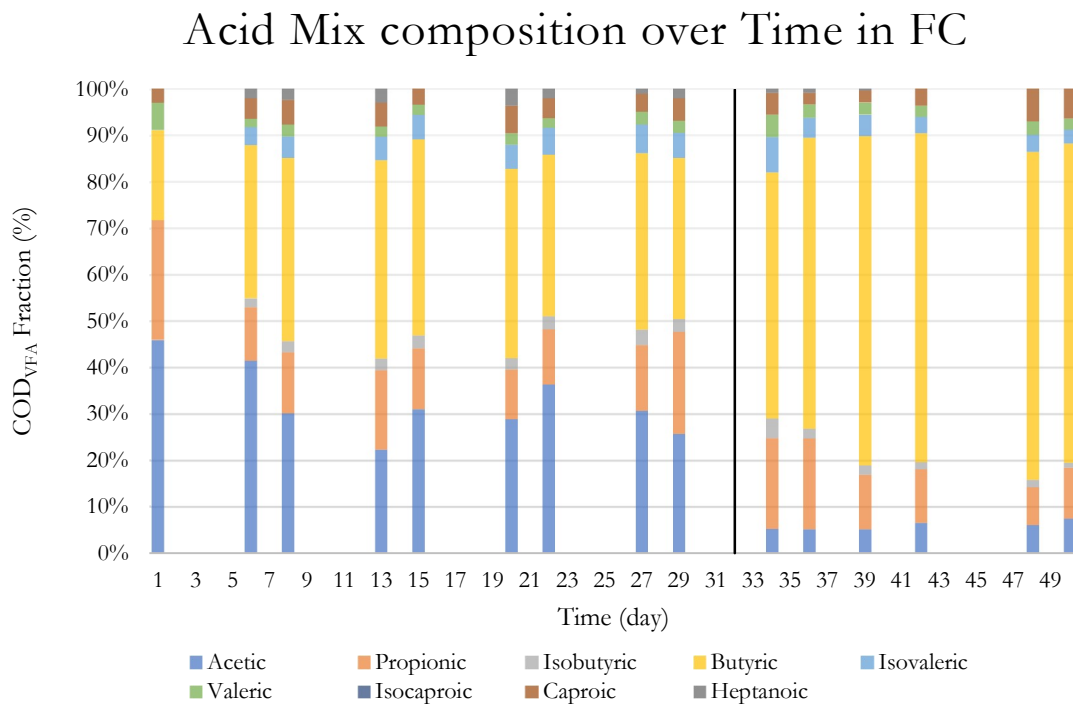
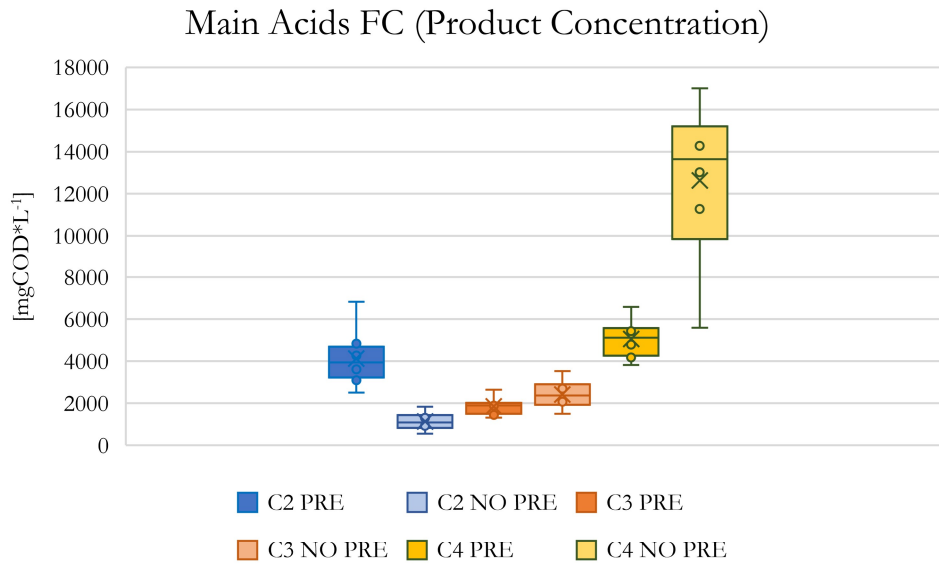


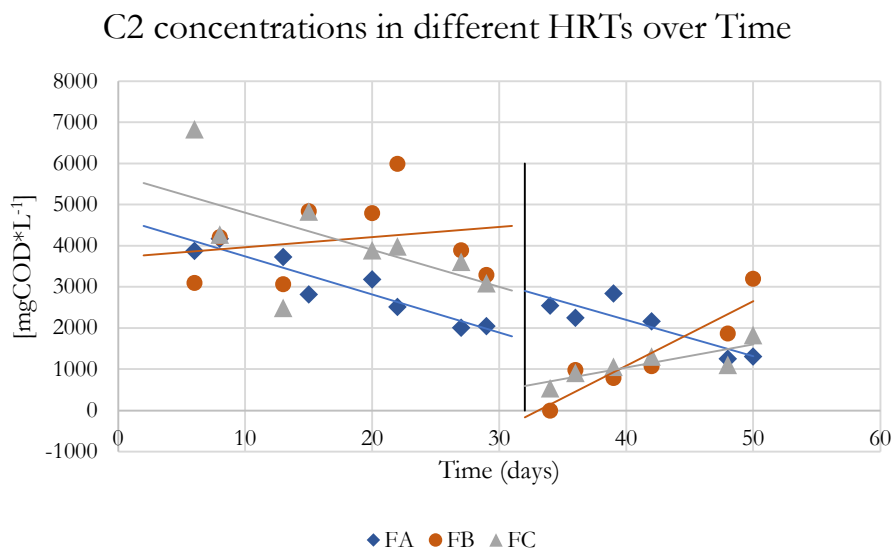
Figura 30: Boxplot relativi al quantitativo di acidi principalmente prodotti divisi per tipologia di alimento nella run FC.



3.2.1 Trend temporale dei principali acidi prodotti

La Figura 31 mostra l'andamento dell'acido acetico (C2) nelle tre *run* sulla base dei *trend* lineari ipotizzati. Prendendo maggiormente in considerazione la *run* FB (HRT 5 d), pur avendo una variabilità sostanziale in termini di concentrazione, l'acido acetico ha mostrato nella prima fase una tendenza piuttosto stabile se non addirittura positiva, in controtendenza con gli andamenti delle altre due *run*, registrando il più alto valor medio ($4.2 \pm 0.4 \text{ mgCOD} \cdot \text{L}^{-1}$). Tale valore era simile a quello rilevato nella *run* FC (HRT 6 d; $4.1 \pm 0.5 \text{ mgCOD} \cdot \text{L}^{-1}$) che però, come la *run* FA, ha mostrato *trend* negativo. Un HRT maggiore favorisce maggiormente le vie metaboliche finali dell'attività fermentativa. Pur non potendo parlare di completamento

Figura 31: Grafico a dispersione della concentrazione di acido acetico misurata nelle 3 diverse *run* divise per alimento utilizzato.

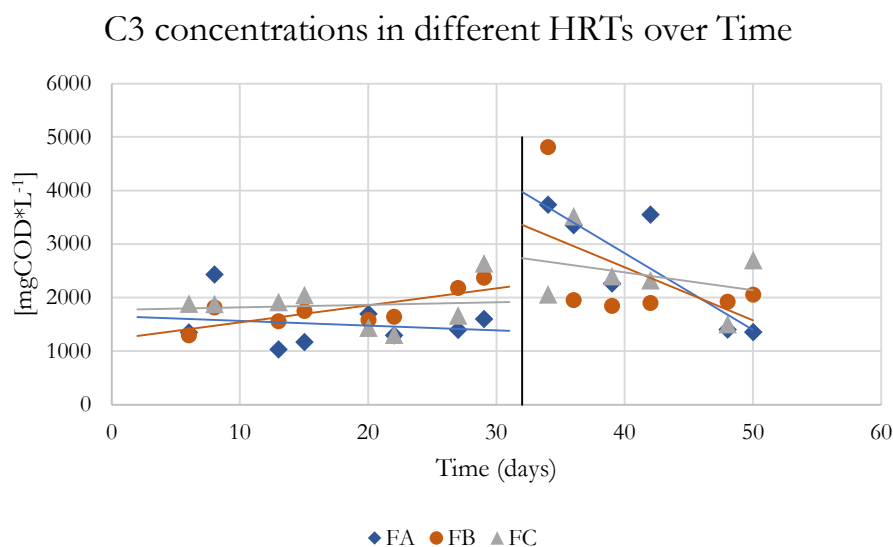


del processo di fermentazione (data l'abbondante presenza di altri VFA diversi dall'acido acetico), sono comunque state raggiunte concentrazioni maggiori nei livelli di acetato durante la prima fase.

Con il cambio di alimentazione il valore di produzione di C2 si è praticamente azzerato per poi crescere progressivamente fino al valore massimo raggiunto in corrispondenza dell'ultimo giorno di sperimentazione ($3.2 \text{ mgCOD}\cdot\text{L}^{-1}$), anche in confronto alle altre corse. Tale dato, deve tuttavia essere letto insieme alla distribuzione stessa dei VFA e alle loro percentuali. Infatti, l'acido acetico, pur nella sua concentrazione più elevata ($3.2 \text{ mgCOD}\cdot\text{L}^{-1}$), rappresentava poco più del 13% (base COD) di tutti i VFA presenti. Simile comportamento si è riscontrato nella *run* FC (HRT 6 d), seppur con valori inferiori in termini di concentrazione, rispetto alla *run* FB (HRT 5 d). La *run* FA (HRT 4 d) ha invece esibito lo stesso andamento decrescente, ad eccezione del lieve incremento a seguito dell'inserimento del nuovo substrato.

Differente è il comportamento dell'acido propionico che nella prima fase ha avuto un andamento lievemente crescente per gli HRT maggiori e decrescente per la *run* FA, ma con valori medi congrui ($1.5 \pm 0.2 \text{ mgCOD}\cdot\text{L}^{-1}$ in FA, $1.8 \pm 0.1 \text{ mgCOD}\cdot\text{L}^{-1}$ in FB, e $1.9 \pm 0.2 \text{ mgCOD}\cdot\text{L}^{-1}$ in FC).

Figura 32: Grafico a dispersione della concentrazione di acido propionico misurata nelle 3 diverse run divise per alimento utilizzato.

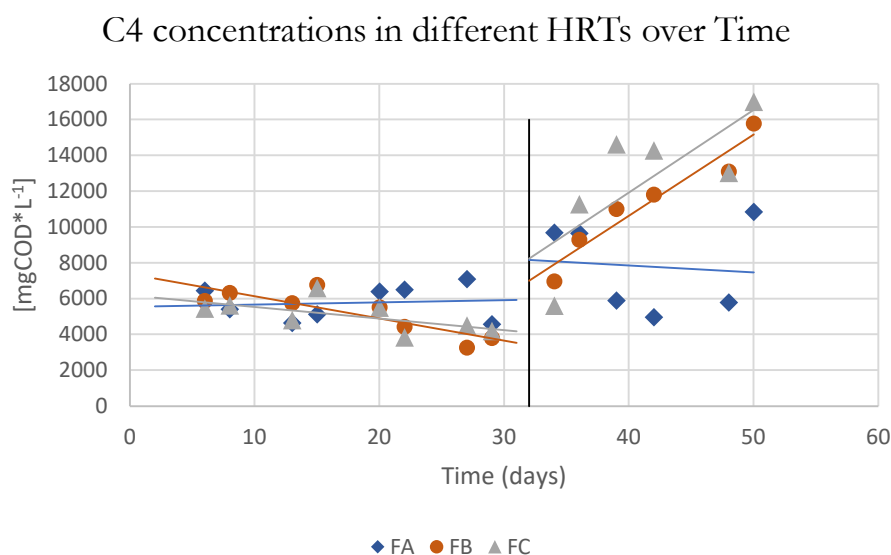


Subito dopo il cambio di alimentazione tutte e 3 le corse hanno mostrato un aumento improvviso dei valori di C3, ma in corrispondenza di tale shift del *feedstock*. Col proseguire della sperimentazione, l'acido propionico aveva un andamento di diminuzione progressiva della concentrazione, mentre era piuttosto costante nelle altre *runs*. I valori medi sono rimasti

comunque coerenti tra di loro ($2.6 \pm 0.4 \text{ mgCOD} \cdot \text{L}^{-1}$ in FA, $2.5 \pm 0.5 \text{ mgCOD} \cdot \text{L}^{-1}$ in FB e $2,4 \pm 0.3 \text{ mgCOD} \cdot \text{L}^{-1}$ in FC). Si può dunque supporre che un substrato precedentemente idrolizzato non sia favorevole alla produzione di acido propionico, indipendentemente dal valore di HRT imposto. Non è stata riscontrata alcuna correlazione tra la concentrazione di acido propionico e HRT applicato neanche a partire da un substrato non pretrattato, anche se la concentrazione di C3 sembrava essere più elevata per bassi HRT (4 giorni); dato comunque non abbastanza robusto visto l'andamento delle performance di fermentazione nella seconda parte della sperimentazione.

L'acido butirrico nella prima fase della sperimentazione si è attestato a valori inferiori rispetto alla seconda fase, solo con un HRT pari a 4 giorni è stato osservato un trend lievemente crescente; in sostanza, il pretrattamento ha comunque favorito la stabilità nella produzione di tale acido, principalmente a bassi HRT. I valori medi registrati sono coerenti ($5.8 \pm 0.3 \text{ mgCOD} \cdot \text{L}^{-1}$ in FA; $5.2 \pm 0.4 \text{ mgCOD} \cdot \text{L}^{-1}$ in FB; $5.1 \pm 0.3 \text{ mgCOD} \cdot \text{L}^{-1}$ in FC).

Figura 33: Grafico a dispersione della concentrazione di acido butirrico misurata nelle 3 diverse run divise per alimento utilizzato.



Dopo il cambio di substrato i valori medi di tutte le *run* sono nettamente incrementati ($7.8 \pm 1.0 \text{ mgCOD} \cdot \text{L}^{-1}$ in FA; $11.3 \pm 1.2 \text{ mgCOD} \cdot \text{L}^{-1}$ in FB; $12.6 \pm 1.6 \text{ mgCOD} \cdot \text{L}^{-1}$ in FC). Come già discusso in precedenza, i valori di HRT maggiori (5 e 6 giorni) hanno mostrato un repentino cambio di tendenza e una netta prevalenza di produzione di tale acido C4 rispetto agli altri, con punte del 70% come frazione di COD rispetto alla sommatoria dei VFA. I dati ottenuti in FB e FC giorni rivelano che tali condizioni possono favorire la produzione di acido butirrico, in modo sostanziale rispetto agli altri VFA, utilizzando una matrice costituita

da fanghi e FORSU non pretrattata termicamente; tale considerazione deve essere tuttavia valutata come dato di input per future sperimentazioni volte a chiarire questo aspetto.

Le successive tabelle riassumono tutti i dati ottenuti nel corso di questa sperimentazione, sono differenziate per HRT (Tabella 10: HRT 4 d; Tabella 11: HRT 5 d; Tabella 12: HRT 6 d) e differenziano i risultati ottenuti in relazione alla tipologia di substrato utilizzato, pretrattato e non, fornendo valore medio e deviazione da esso, minimo, massimo e mediana.

Tabella 10: Valore medio, deviazione dal valore medio, minimo, mediana e massimo per tipologia di substrato in FA.

(FA) HRT 4	Pretreated					Non pretreated				
	Average	Dev. From Mean (±)	Minimum	Median	Maximum	Average	Dev. From Mean (±)	Minimum	Median	Maximum
OLR (KgO ₂ *(m ³ *d) ⁻¹)	5.00	0.00	5.00	5.00	5.00	4.48	0.40	2.92	4.94	5.45
VS (gVS*L ⁻¹)	17.27	0.00	17.27	17.27	17.27	17.86	1.79	10.87	19.91	22.19
pH	7.54	0.20	6.38	7.69	8.73	5.78	0.38	4.81	5.99	7.25
sCOD	17.10	1.23	12.49	16.68	22.94	19.93	1.61	13.12	21.43	23.02
Acetic (mgCOD*L ⁻¹)	3048.94	294.13	2016.00	3006.85	4179.67	2066.27	265.70	1257.60	2213.60	2848.00
Propionic (mgCOD*L ⁻¹)	1500.78	153.29	1036.00	1379.94	2434.30	2616.41	441.63	1362.00	2815.40	3740.80
Isobutyric (mgCOD*L ⁻¹)	332.65	10.78	280.94	326.47	381.37	250.84	34.07	138.38	254.65	369.49
Butyric (mgCOD*L ⁻¹)	5766.01	336.81	4566.40	5890.12	7088.00	7797.87	1033.84	4953.60	7765.20	10840.80
Isovaleric (mgCOD*L ⁻¹)	661.17	13.89	589.49	663.80	709.83	523.67	64.55	307.67	514.25	779.02
Valeric (mgCOD*L ⁻¹)	304.23	15.60	248.00	297.50	375.60	314.33	35.89	235.07	275.88	467.17
Isocaproic (mgCOD*L ⁻¹)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	48.02	31.98	0.00	0.00	182.93
Caproic (mgCOD*L ⁻¹)	557.14	44.62	394.02	554.83	733.43	352.92	74.61	148.72	345.46	638.77
Heptanoic (mgCOD*L ⁻¹)	234.05	52.53	0.00	296.38	378.40	37.84	24.28	0.00	0.00	129.47
VFATOT (gCOD*L ⁻¹)	12.40	0.50	10.45	12.23	14.37	14.01	1.30	10.16	13.80	18.16
VFA*COD ⁻¹ (g*g ⁻¹)	0.75	0.05	0.46	0.80	0.88	0.71	0.05	0.53	0.75	0.88
Yield (gVFA*gVS ⁻¹)	0.47	0.02	0.38	0.45	0.56	0.48	0.02	0.42	0.49	0.54
Rate (mgVFA*gVS ⁻¹ *d ⁻¹)	116.30	5.34	95.13	111.95	139.40	120.97	4.66	104.67	121.56	135.77
VFATOT (mg*L ⁻¹)	8033.91	369.01	6571.52	7733.77	9629.70	8704.94	771.97	6126.44	8503.01	11266.06
VFA Productivity (g*L ⁻¹ d ⁻¹)	2.01	0.09	1.64	1.93	2.41	2.18	0.19	1.53	2.13	2.82

Tabella 11: Valore medio, deviazione dal valore medio, minimo, mediana e massimo per tipologia di substrato in FB.

(FB) HRT 5	Pretreated					Non pretreated				
	Average	Dev. From Mean (±)	Minimum	Median	Maximum	Average	Dev. From Mean (±)	Minimum	Median	Maximum
OLR (KgO ₂ *(m ³ *d) ⁻¹)	3.97	0.00	3.97	3.97	3.97	4.54	0.07	4.36	4.70	4.70
VS (gVS*L ⁻¹)	17.14	0.00	17.14	17.14	17.14	23.17	0.40	22.17	24.05	24.05
pH	7.59	0.16	6.80	7.61	8.45	6.47	0.21	5.58	6.52	7.40
sCOD	17.25	0.29	16.16	17.23	18.22	20.80	1.75	16.54	20.13	25.86
Acetic (mgCOD*L ⁻¹)	4152.29	362.80	3070.00	4053.95	5995.00	1323.24	449.34	0.00	1032.13	3208.00
Propionic (mgCOD*L ⁻¹)	1778.71	123.56	1298.58	1699.60	2374.80	2418.00	480.52	1847.20	1942.80	4816.40
Isobutyric (mgCOD*L ⁻¹)	346.78	16.08	303.60	333.84	445.17	324.70	36.56	206.69	332.64	429.11
Butyric (mgCOD*L ⁻¹)	5207.41	440.15	3256.00	5621.65	6756.00	11321.63	1244.81	6960.00	11402.80	15780.00
Isovaleric (mgCOD*L ⁻¹)	681.59	24.97	618.31	646.84	821.92	753.43	55.39	529.76	785.07	929.94
Valeric (mgCOD*L ⁻¹)	314.99	21.57	237.38	329.78	394.92	516.89	19.19	464.09	512.71	601.15
Isocaproic (mgCOD*L ⁻¹)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	21.38	21.38	0.00	0.00	128.26
Caproic (mgCOD*L ⁻¹)	559.86	44.48	400.40	536.35	743.97	650.23	186.18	282.92	422.51	1464.54
Heptanoic (mgCOD*L ⁻¹)	235.28	41.68	0.00	262.67	382.20	53.35	35.22	0.00	0.00	199.21
VFATOT (gCOD*L ⁻¹)	13.28	0.54	11.07	13.24	15.47	17.38	1.52	14.03	16.27	24.00
VFA*COD ⁻¹ (g*g ⁻¹)	0.77	0.04	0.67	0.73	0.90	0.84	0.03	0.74	0.85	0.93
Yield (gVFA*gVS ⁻¹)	0.52	0.02	0.45	0.52	0.61	0.44	0.04	0.37	0.41	0.60
Rate (mgVFA*gVS ⁻¹ *d ⁻¹)	104.64	4.63	90.25	104.02	122.07	87.82	7.11	73.30	81.43	120.20
VFATOT (mg*L ⁻¹)	8970.08	396.80	7736.38	8917.21	10464.09	10197.60	970.64	8124.32	9407.08	14454.04
VFA Productivity (g*L ⁻¹ d ⁻¹)	1.79	0.08	1.55	1.78	2.09	2.04	0.19	1.62	1.88	2.89

Tabella 12: Valore medio, deviazione dal valore medio, minimo, mediana e massimo per tipologia di substrato in FC.

(FC) HRT_6	Pretreated					Non pretreated				
	Average	Dev. From Mean (±)	Minimum	Median	Maximum	Average	Dev. From Mean (±)	Minimum	Median	Maximum
OLR (KgO ₂ *(m ³ *d) ⁻¹)	3.41	0.00	3.41	3.41	3.41	4.26	0.22	3.75	3.92	5.10
VS (gVS*L ⁻¹)	17.65	0.00	17.65	17.65	17.65	26.39	1.44	22.92	24.05	31.96
pH	7.41	0.14	6.75	7.46	8.35	6.48	0.24	5.63	6.50	7.44
sCOD	17.97	0.60	16.03	17.34	20.31	24.29	1.91	18.15	25.29	30.87
Acetic (mgCOD*L ⁻¹)	4130.90	461.08	2500.00	3942.85	6834.63	1131.72	175.46	548.13	1086.20	1839.00
Propionic (mgCOD*L ⁻¹)	1852.85	144.53	1312.20	1889.51	2646.80	2422.53	274.96	1506.40	2367.40	3523.20
Isobutyric (mgCOD*L ⁻¹)	339.50	17.62	279.00	326.10	436.81	345.66	30.32	256.41	337.04	442.53
Butyric (mgCOD*L ⁻¹)	5052.92	318.04	3825.80	5113.49	6590.10	12628.00	1604.30	5592.80	13644.70	17000.00
Isovaleric (mgCOD*L ⁻¹)	677.39	27.33	569.00	654.30	828.96	771.83	40.11	673.86	748.39	951.72
Valeric (mgCOD*L ⁻¹)	305.02	17.34	225.94	317.79	368.32	532.42	15.66	486.53	526.41	599.94
Isocaproic (mgCOD*L ⁻¹)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Caproic (mgCOD*L ⁻¹)	616.16	45.94	460.90	576.86	803.22	853.23	198.92	444.62	632.01	1601.93
Heptanoic (mgCOD*L ⁻¹)	270.52	53.98	0.00	300.98	496.10	59.69	28.66	0.00	46.64	165.88
VFATOT (gCOD*L ⁻¹)	13.25	0.73	11.01	12.78	16.50	18.75	1.91	10.55	19.29	24.73
VFA*COD ⁻¹ (g*g ⁻¹)	0.74	0.03	0.57	0.76	0.81	0.77	0.06	0.58	0.77	0.94
Yield (gVFA*gVS ⁻¹)	0.51	0.03	0.41	0.48	0.67	0.42	0.05	0.25	0.40	0.60
Rate (mgVFA*gVS ⁻¹ *d ⁻¹)	84.47	5.30	68.11	79.72	111.15	70.17	8.31	42.37	67.45	99.67
VFATOT (mg*L ⁻¹)	8943.96	561.06	7211.64	8440.71	11768.98	10852.49	1108.92	6113.91	11123.86	14382.94
VFA Productivity (g*L ⁻¹ *d ⁻¹)	1.49	0.09	1.20	1.41	1.96	1.81	0.18	1.02	1.85	2.40

4 Conclusioni

La sperimentazione svolta voleva investigare l'influenza dell'HRT in un processo di fermentazione acidogenica anaerobica, per la produzione di acidi grassi volatili (VFA), prodotti di interesse commerciale ricavabili da matrici rifiuto. La sopraggiunta necessità di cambiare tipologia di alimento durante la sperimentazione ha consentito di investigare anche il ruolo del pretrattamento in relazione al tempo di ritenzione idraulico ampliando la panoramica fornita da questo lavoro. L'investigazione dei 3 HRT scelti (4, 5 e 6 giorni) ha permesso di identificare quale sia il migliore per uno scale-up del processo: la *run* FB (HRT pari a 5 giorni) con substrato pretrattato rappresenta la condizione più idonea a tale scopo sia in termini di rendimento ($0.52 \pm 0.02 \text{ gVFA} \cdot \text{gVS}^{-1}$) che di velocità specifica di produzione ($105 \pm 5 \text{ mgVFA} \cdot \text{gVS}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), parametro che, come ci si aspettava, è risultato inversamente proporzionale al tempo di ritenzione. L'assenza di pretrattamento della matrice ha evidenziato come il valore di HRT pari a 5 giorni sia preferibile rispetto agli altri investigati, in quanto ha permesso di ottenere più elevate concentrazioni di prodotto ($17 \pm 2 \text{ gCOD} \cdot \text{L}^{-1}$) e rapporto $\text{COD}_{\text{VFA}}/\text{COD}_{\text{SOL}}$ (0.84 ± 0.03), in considerazione, tuttavia, della maggior variabilità o minor stabilità di processo rispetto all'utilizzo di una matrice pretrattata (idrolisi termica). I dati ottenuti in corrispondenza di un HRT pari a 5 giorni confermano anche come la miglior condizione in termini di efficienza di acidificazione. L'HRT a 6 giorni si è rivelato valido per uno scale-up di processo, con valori medi vicini e talvolta superiori a quelli ad HRT inferiori, ma la velocità specifica di produzione ($84 \pm 5 \text{ mgVFA} \cdot \text{gVS}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ nella prima fase e $70 \pm 8 \text{ mgVFA} \cdot \text{gVS}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ nella seconda) notevolmente più bassa rispetto a quella registrata dall'HRT immediatamente inferiore lo designa come il secondo candidato. L'HRT a 4 giorni rappresenta la peggior condizione tra quelle investigate, a causa della bassa concentrazione di prodotto ottenuto ed una scarsa efficienza di acidificazione. L'analisi del mix di acidi ha dimostrato come l'acido butirrico sia il prodotto principale della fermentazione in tutte e tre le *runs* di processo seguito da acido acetico e propionico, e come l'aumento dell'HRT si traduca, in un aumento delle concentrazioni di VFA prodotti, evidenza più facilmente riscontrabile in caso di substrato non pretrattato. Per la comprensione dei processi biochimici che hanno governato questo orientamento del processo alla produzione di acido butirrico sono in corso analisi microbiologiche che permetteranno di capire quali microorganismi governino i processi di fermentazione sviluppati. L'impossibilità, per logiche di processo di protrarre la seconda fase della sperimentazione lascia la strada a successive investigazioni per la ricerca di una stabilità di processo che consenta di mantenere gli elevati valori raggiunti con un substrato non pretrattato.

5 Bibliografia

Antonopoulos A.A. Wene E.G., *Bioconversion of municipal solid waste and recovery of short-chain organic acids for liquid fuels production*, 1988.

Appels L., Baeyens J., Degrève J., Dewil R., *Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge.*, 2008, Prog. Energy Combust. Sci. 34, 755–781

Atasoy M., Owusu-Agyeman I., Plaza E., Cetecioglu Z., *Bio-based volatile fatty acid production and recovery from waste streams: current status and future challenges*, 2018, Bioresour. Technol. 268 773–786.

Audrey P., Julien L., Christophe D., Patrick L., *Sludge disintegration during heat treatment at low temperature: A better understanding of involved mechanisms with a multiparametric approach*, 2011, Biochem. Eng. J. 54 (3), 178–184.

[6] Banerjee A., Elefsiniotis P., and Tuhtar D., *Effect of HRT and temperature on the acidogenesis of municipal primary sludge and industrial wastewater*, 1998, Water Sci. Technol., vol. 38, no. 8–9, pp. 417–423.

Banerjee A., Elefsiniotis P., Tuhtar D., *The effect of addition of potato-processing wastewater on the acidogenesis of primary sludge under varied hydraulic retention time and temperature*, 1999, J. Biotechnol. 72 (3), 203–212.

Baumann I. and Westermann P., *Microbial Production of Short Chain Fatty Acids from Lignocellulosic Biomass: Current Processes and Market*, 2016, BioMed Research International., doi: 0.1155/2016/8469357.

U.S. Energy Information Administration (EIA), *Biofuels production drives growth in overall biomass energy use over past decade*, Today in Energy, (accessed Apr. 14, 2020). <https://www.eia.gov/todayinenergy/detail.php?id=15451>

Biswas B.K., Inoue K., Harada H., Ohto K., Kawakita H., *Leaching of phosphorus from incinerated sewage sludge ash by means of acid extraction followed by adsorption on orange waste gel*, 2009, J. Environ. Sci. 21 (12), 1753–1760.

Bolzonella D., Fatone F., Pavan P., Cecchi F., *Anaerobic Fermentation of Organic Municipal Solid Wastes for the Production of Soluble Organic Compounds*, 2005, Ind. Eng. Chem. Res., vol. 44, no. 10, pp. 3412–3418, doi: 10.1021/ie048937m.

Bougrier C., Delgenes J.P., Carrere H., *Effects of thermal treatments on five different waste activated sludge samples solubilisation, physical properties and anaerobic digestion*, 2008, Chem. Eng. J. 139 (2), 236–244.

Bouzas A., Gabaldon C., Marzal P., Peña-Roja J., Seco A., *Fermentation of municipal primary sludge: effect of SRT and solids concentration on volatile fatty acid production*, 2002, Environ. Technol. 23 (8), 863–875.

Braguglia C.M., Gallipoli A., Gianico A., Pagliaccia P., *Anaerobic bioconversion of food waste into energy: a critical review*, 2018, Bioresour. Technol. 248 37–56.

- Cecchi F., Bolzonella D., Pavan P., Macé S., Mata-Alvarez J., *Anaerobic Digestion of the Organic Fraction of Municipal Solid Waste for Methane Production: Research and Industrial Application*, 2011, *Comprehensive Biotechnology*, pp. 463–472.
- Chakraborty S., *Exploring volatile fatty acids (VFAs) as a novel substrate for microbial oil production.*, 2015, Dr. thesis.
- Chang H. N., Kim N. J., Kang J., Jeong C. M., *Biomass-derived volatile fatty acid platform for fuels and chemicals*, 2010, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, doi: 10.1007/s12257-009-3070-8.
- Chen Y., Jiang S., Yuan H., Zhou Q., Gu G., *Hydrolysis and acidification of waste activated sludge at different pHs*, 2006, *Water Res.* 41 (3), 683–689.
- Chen H., Rao Y., Cao L., Shi Y., Hao S., Luo G., et al., *Hydrothermal conversion of sewage sludge: focusing on the characterization of liquid products and their methane yields*, 2019, *Chem. Eng. J.* 357, 367–375.
- Choi J., Han S., Lee C., *Enhancement of methane production in anaerobic digestion of sewage sludge by thermal hydrolysis pretreatment*, 2018, *Bioresource Technol.* 259, 207–213.
- CITEC, *Guidelines for the design, production and running of high technology plants for the disposal of urban waste*, 2004, Geva Editions, Italy.
- Cokgor E.U., Oktay S., Tas D.O., Zengin G.E., Orhon D., *Influence of pH and temperature on soluble substrate generation with primary sludge fermentation*, 2009, *Bioresource Technol.* 100 (1), 380–386.
- D'Addario E., Pappa R., Pietrangeli B., Valdiserri M., *The acidogenic digestion of the organic fraction of municipal solid waste for the production of liquid fuels*, 1993, in *Water Science and Technology*, vol. 27, no. 2, pp. 183–192, doi: 10.2166/wst.1993.0101.
- Dijkstra J., *Production and absorption of volatile fatty acids in the rumen*, 1994, *Livest. Prod. Sci.* 39 (1), 61–69.
- Dionisi D., Silva I.M.O., *Production of ethanol, organic acids and hydrogen: an opportunity for mixed culture biotechnology?*, 2016, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 15, 213–242.
- [7] Dong B., Gao P., Zhang D., Chen Y., Dai L., Dai X., *A new process to improve short-chain fatty acids and bio-methane generation from waste activated sludge*, 2016, *J. Environ. Sci.*, vol. 43, pp. 159–168.
- FAO, *Global Food Losses and Food Waste: Extent, Causes and Prevention*, Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO), 2011, Rome.
- Feng L., Chen Y., Zheng X., *Enhancement of waste activated sludge protein conversion and volatile fatty acids accumulation during waste activated sludge anaerobic fermentation by carbohydrate substrate addition: the effect of pH*, 2009a, *Environ. Sci. Technol.* 43 (12), 4373–4380.
- Feng Q., Song Y., Kim D., Kim M., Kim D., *Influence of the temperature and hydraulic retention time in bioelectrochemical anaerobic digestion of sewage sludge*, 2019, *Int. J. Hydrogen Energ.* 44, 2170–2179.

- Ferreiro N., Soto M., *Anaerobic hydrolysis of primary sludge: influence of sludge concentration and temperature*, 2003, *Water Sci. Technol.* 47 (12), 239–246.
- Ferrer I., Vázquez F., Font X., *Long term operation of a thermophilic anaerobic reactor: process stability and efficiency at decreasing sludge retention time*, 2010, *Bioresource Technol.* 101 (9), 2972–2980.
- Gao A., Tian Z., Wang Z., Wennersten R., Sun Q., *Comparison between the technologies for food waste treatment*, 2017, *Energy Procedia* 105, 3915–3921.
- Ghosh S., Pohland F.G., *Kinetics of substrate assimilation and product formation in anaerobic digestion*, 1974, *J. Water Pollut. Contr. Fed.* 46 (4), 748–759.
- Haug R.T., Stuckey D.C., Gossett J.M., McCarty P.L., *Effect of thermal pretreatment on digestibility and dewaterability of organic sludges*, 1978, *J. Water Pollut. Contr. Fed.* 50 (1), 73–85.
- Horiuchi J.I., Shimizu T., Tada K., Kanno T., Kobayashi M., *Selective production of organic acids in anaerobic acid reactor by pH control*, 2002, *Bioresource Technol.* 82 (3), 209–213.
- Jankowska E., Duber A., Chwialkowska J., Stodolny M., Oleskowicz-Popiel P., *Conversion of organic waste into volatile fatty acids – the influence of process operating parameters*, 2018, *Chem. Eng. J.* 345, 395–403.
- Jiang S., Chen Y., Zhou Q., Gu G., *Biological short-chain fatty acids (SCFAs) production from waste-activated sludge affected by surfactant*, 2007, *Water Res.* 41 (14), 3112–3120.
- [3] Jiang S., Chen Y., Zhou Q., *Effect of sodium dodecyl sulfate on waste activated sludge hydrolysis and acidification*, 2007, *Chem. Eng. J.*, vol. 132, no. 1–3, pp. 311–317.
- [4] Ji Z., Chen G., Chen Y., *Effects of waste activated sludge and surfactant addition on primary sludge hydrolysis and short-chain fatty acids accumulation*, 2010, *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 10, pp. 3457–3462.
- Jouany J.P., *Optimizing rumen functions in the close-up transition period and early lactation to drive dry matter intake and energy balance in cows*, 2006, *Anim. Reprod. Sci.* 96 (3–4), 250–264.
- Kashyap D., Dadhich K., Sharma S., *Biomethanation under psychrophilic conditions: a review*, 2003, *Bioresource Technol.* 87 (2), 147–153.
- Kim J.K., Oh B.R., Chun Y.N., Kim S.W., *Effects of temperature and hydraulic retention time on anaerobic digestion of food waste*, 2006, *J. Biosci. Bioeng.* 102 (4), 328–332.
- Lata K., Rajeshwari K.V., Pant D. C., Kishore V. V. N., *Volatile fatty acid production during anaerobic mesophilic digestion of tea and vegetable market wastes*, 2002, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, doi: 10.1023/A:1016314903817.
- Lauri R., Nguemna Tayou L., Pavan P., Majone M., Pietrangeli B., Valentino F., *Acidogenic fermentation of urban organic waste: effect of operating parameters on process performance and safety*, 2021, *Chem. Eng. Trans.* 86 55–60.
- Lee W. S., Chua A.S.M., Yeoh H.K., Ngoh G.C., *A review of the production and applications of waste-derived volatile fatty acids*, 2014, *Chemical Engineering Journal.*, doi: 10.1016/j.cej.2013.09.002.
- Lehtomaki A., Bjornsson L., *Two-stage anaerobic digestion of energy crops: methane production, nitrogen mineralisation and heavy metal mobilisation*, 2006, *Environ. Technol.* 27 (2) 209–218.

Li X., Zhang W., Ma L., Lai S., Zhao S., Chen Y., et al., *Improved production of propionic acid driven by hydrolyzed liquid containing high concentration of l-lactic acid from cofermentation of food waste and sludge*, 2016, *Bioresource Technol.* 220, 523–529.

Lim S., Choi D.W., Lee W.G., Kwon S., Chang H.N., *Volatile fatty acids production from food wastes and its application to biological nutrient removal*, 2000, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 22 (6) 543–545.

Lim S.J., Kim B.J., C.M. Jeong, Dal Rae Choi J., Ahn Y.H., Chang H.N., *Anaerobic organic acid production of food waste in once-a-day feeding and drawing off bioreactor*, 2008, *Bioresour. Technol.*, doi: 10.1016/j.biortech.2007.06.028.

Lin L., Li X., *Effects of pH adjustment on the hydrolysis of Al-enhanced primary sedimentation sludge for volatile fatty acid production*, 2018, *Chem. Eng. J.* 346, 50–56.

Lin H., et al., *Effects of individual volatile fatty acids (VFAs) on phosphorus recovery by magnesium ammonium phosphate*, 2020, *Environ. Pollut.*, doi: 10.1016/j.envpol.2020.114212.

Liu H., Wang L., Zhang X., Fu B., Liu H., Li Y., et al., *A viable approach for commercial VFAs production from sludge: liquid fermentation in anaerobic dynamic membrane reactor*, 2019, *J. Hazard. Mater.* 365, 912–920.

[5] Longo S., Katsou E., Malamis S., Frison N., Renzi D., Fatone F., *Recovery of volatile fatty acids from fermentation of sewage sludge in municipal wastewater treatment plants*, 2015, *Bioresour. Technol.*, doi: 10.1016/j.biortech.2014.09.107.

Ma H., Chen X., Liu H., Liu H., Fu B., *Improved volatile fatty acids anaerobic production from waste activated sludge by pH regulation: alkaline or neutral pH?*, 2016, *Waste Manag.* 48, 397–403.

Maccaferri A. (2021), *Spreco alimentare, “solo” 27 chili a testa per effetto del lockdown*, 03/02/2021, *Il Sole 24 Ore*-

[1] Mengmeng C., Hong C., Qingliang Z., Shirley S.N., Jie R., *Optimal production of polyhydroxyalkanoates (PHA) in activated sludge fed by volatile fatty acids (VFAs) generated from alkaline excess sludge fermentation*, 2009, *Bioresour. Technol.*, vol. 100, no. 3, pp. 1399–1405.

Micolucci F., Gottardo M., Pavan P., Cavinato C., Bolzonella D., *Pilot scale comparison of single and double-stage thermophilic anaerobic digestion of food waste*, 2018, *J. Clean. Prod.* 171 1376–1385.

Sakar S., Yetilmezsoy K., Kocak E., *Anaerobic digestion technology in poultry and livestock waste treatment — a literature review*, 2009, *Waste Manag. Res.* 27 (1) 3–18.

Min K., Khan A., Kwon M., Jung Y., Yun Z., Kiso Y., *Acidogenic fermentation of blended food-waste in combination with primary sludge for the production of volatile fatty acids*, 2005, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80 (8), 909–915.

Miron Y., Zeeman G., Van Lier J.B., Lettinga G., *The role of sludge retention time in the hydrolysis and acidification of lipids, carbohydrates and proteins during digestion of primary sludge in CSTR systems*, 2000, *Water Res.* 34 (5), 1705–1713

Moser-Engeler R., Udert K., Wild D., Siegrist H., *Products from primary sludge fermentation and their suitability for nutrient removal*, 1998, *Water Sci. Technol.* 38 (1), 265–273.

- Mottet, A., Steyer J.P., Deleris S., Vedrenne F., Chauzy J., Carrere H., *Kinetics of thermophilic batch anaerobic digestion of thermal hydrolysed waste activated sludge*, 2009, *Biochem. Eng. J.* 46 (2), 169–175.
- Nazari L., Yuan Z.S., Santoro D., Sarathy S., Ho D., Batstone D., et al., *Low-temperature thermal pre-treatment of municipal wastewater sludge: process optimization and effects on solubilization and anaerobic degradation*, 2017, *Water Res.* 113, 111–123.
- Neyens E., Baeyens J., *A review of thermal sludge pretreatment processes to improve dewaterability*, 2003, *J. Hazard. Mater.* 98 (1), 51–67.
- Papargyropoulou E., Lozano R., Steinberger J.K., Wright N., Ujang Zb, *The food waste hierarchy as a framework for the management of food surplus and food waste*, 2014, *J. Clean. Prod.* 76 106–115.
- Parawira W., Murto M., Read J. S., Mattiasson B., *Volatile fatty acid production during anaerobic mesophilic digestion of solid potato waste*, 2004, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, doi: 10.1002/jctb.1012.
- Park G.W. et al., *Volatile fatty acids derived from waste organics provide an economical carbon source for microbial lipids/ biodiesel production*, 2014, *Biotechnol. J.*, vol. 9, no. 12, pp. 1536–1546.
- Parlamento e Consiglio Europeo, Direttiva 2008/98/CE del 19 novembre relativa ai rifiuti, Capo 1, Articolo 2, Comma 4.
- Pilli S., Yan S., Tyagi R.D., Surampalli R.Y., *Thermal pretreatment of sewage sludge to enhance anaerobic digestion: A review*, 2015, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. doi: 10.1080/10643389.2013.876527.
- Ren N.Q., Wang B.Z., Huang J.C., *Ethanol-type fermentation from carbohydrate in high rate acidogenic reactor*, 1997, *Biotechnol. Bioeng.* 54 (5), 428–433.
- Rodríguez J., Kleerebezem R., Lema J.M., van Loosdrecht M., *Modeling product formation in anaerobic mixed culture fermentations*, 2006, *Biotechnol. Bioeng.* 93 (3), 592–606.
- Siedlecka E.M. et al., *Determination of volatile fatty acids in environmental aqueous samples*, *Polish J. Environ. Stud.*, 2008.
- Simonetti S., Saptorio A., Fernandez Martín C., Dionisi D., *Product concentration, yield and productivity in anaerobic digestion to produce short chain organic acids: a critical analysis of literature data*, 2020, *Processes* 8 1538.
- Skalsky D.S., Daigger G.T., *Wastewater solids fermentation for volatile acid production and enhanced biological phosphorus removal*, 1995, *Water Environ. Res.* 67 (2), 230–237.
- Slezak R., Grzelak J., Krzystek L., Ledakowicz S., *The effect of initial organic load of the kitchen waste on the production of VFA and H₂ in dark fermentation*, 2017, *Waste Manag.* 68 610–617.
- Temudo M.F., Kleerebezem R., Van Loosdrecht M., *Influence of the pH on (open) mixed culture fermentation of glucose: a chemostat study*, 2007, *Biotechnol. Bioeng.* 98 (1), 69–79.
- Tilman D. et al., *Beneficial biofuels - The food, energy, and environment trilemma*, 2009, *Science*, doi: 10.1126/science.1177970.
- Tyagi R.D., Surampalli R.Y., Yan S., Zhang T.C., Kao C.M., B.N. Lohani, *Sustainable sludge management: Production of value added products*, 2009.

- Vavilin V.A., Fernandez B., Palatsi J., Flotats X., *Hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic material: an overview*, 2008, *Waste Manag.* 28 (6), 939–951.
- Xiong H., Chen J., Wang H., Shi H., *Influences of volatile solid concentration, temperature and solid retention time for the hydrolysis of waste activated sludge to recover volatile fatty acids*, 2012, *Bioresource Technol.* 119, 285–292.
- [10] Yang X., Wen L., Liu X., Chen S., Wang Y., Wan C., *Bio-augmentative volatile fatty acid production from waste activated sludge hydrolyzed at pH 12*, 2015, *RSC Adv.*, doi: 10.1039/c5ra04651c.
- Yuan Q., Sparling R., Oleszkiewicz J., *Waste activated sludge fermentation: effect of solids retention time and biomass concentration*, 2009, *Water Res.* 43 (20), 5180–5186.
- Yuan Y., Liu Y., Li B.K., Wang B., Wang S.Y., Peng Y.Z., *Short-chain fatty acids production and microbial community in sludge alkaline fermentation: Long-term effect of temperature*, 2016, *Bioresource Technol.* 211, 685–690.
- Wijekoon K.C., Visvanathan C., Abeynayaka A., *Effect of organic loading rate on VFA production, organic matter removal and microbial activity of a two-stage thermophilic anaerobic membrane bioreactor*, 2011, *Bioresource Technol.* 102 (9), 5353–5360.
- Zacharof M.P., Lovitt R.W., *Complex effluent streams as a potential source of volatile fatty acids*, *Waste and biomass valorization*, 2013, vol. 4, no. 3, pp. 557–581,
- Zacharof M.P., Lovitt R.W., *Recovery of volatile fatty acids (VFA) from complex waste effluents using membranes*, 2014, *Water Sci. Technol.*, doi: 10.2166/wst.2013.717.
- [2] Zhang P., Chen Y., Zhou Q., *Waste activated sludge hydrolysis and short-chain fatty acids accumulation under mesophilic and thermophilic conditions: effect of pH*, 2009, *Water Res.*, vol. 43, no. 15, pp. 3735–3742.
- [8] Zhang P., Shi X., Zhang T., Jin P., *Bioproduction of Short Chain Fatty Acids in Primary and Excess Sludge Fermentation: Performance and Microbial Community Structures Comparison*, 2016, *J. Water Sustain.*, vol. 6, no. 3, p. 99.
- [9] Zhou A., et al., *Improving the short-chain fatty acids production of waste activated sludge stimulated by a bi-frequency ultrasonic pretreatment*, 2013, *J. Environ. Biol.*, vol. 34, no. 2 suppl, p. 381.
- Zhou M., Yan B., Wong J.W.C., Zhang Y., *Enhanced volatile fatty acids production from anaerobic fermentation of food waste: A mini-review focusing on acidogenic metabolic pathways*, 2018, *Bioresource Technology*, doi: 10.1016/j.biortech.2017.06.121.
- Zhuo G., Yan Y., Tan X., Dai X., Zhou Q., *Ultrasonic pretreated waste activated sludge hydrolysis and volatile fatty acid accumulation under alkaline conditions: effect of temperature*, 2012, *J. Biotechnol.* 159 (1-2), 27–31.