



Università
Ca' Foscari
Venezia

Corso di Laurea Magistrale
in Scienze Ambientali

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 e della composizione della
matrice.

Relatore

Ch.mo Prof. Francesco Valentino

Correlatore

Ch.mo Prof. Paolo Pavan

Laureando

Alessandro Bonaccorso

Matricola 865860

Anno Accademico

2022 / 2023

Indice

1	Introduzione	3
1.1	La fermentazione anaerobica	6
1.2	Funzione della fermentazione	7
1.3	Processo di fermentazione	8
1.4	Acidi grassi volatili (VFA)	9
1.5	Parametri operativi in fermentazione anaerobica	11
1.5.1	pH	11
1.5.2	Temperatura	11
1.5.3	Tempo di residenza idraulico (HRT)	12
1.5.4	Tasso di carico organico (OLR)	12
1.6	Obiettivi della tesi	13
2	Materiali e Metodi	14
2.1	Substrati	14
2.2	Metodi analitici e calcoli	15
2.2.1	Solidi totali e solidi volatili	16
2.2.2	Richiesta chimica di ossigeno (COD)	18
2.2.3	Richiesta chimica di ossigeno solubile (sCOD)	18
2.2.4	Acidi grassi volatili (VFA)	20
2.2.5	Azoto ammoniacale	21
2.2.6	Azoto totale con metodo TKN	22
2.2.7	Ortofosfato (PO_4^{3-})	23
2.2.8	Fosforo totale	23
2.3	Test di fermentazione acidogenica al buio (dark fermentation)	24
2.4	Reattori e condizioni di reazione	24
2.5	Cinetiche e rendimenti di processo	27
2.6	Analisi microbiologiche	27
2.7	Analisi della comunità microbica	28
3	Schema di Processo	29
3.1	Procedure di pretrattamento	30
3.1.1	Pretrattamento combinato	30

3.1.2	Pretrattamento termico	31
4	Risultati.....	32
4.1	Caratterizzazione	32
4.1.1	Substrati	32
4.1.2	Alimentazione	34
4.2	Andamento dei parametri di processo (sCOD, VFA, pH e rendimento) nelle tre condizioni operative.....	35
4.2.1	Run 1.....	35
4.2.2	Run 2.....	38
4.2.3	Run 3.....	42
4.3	Parametri di processo a confronto.....	45
4.4	Struttura della comunità microbica	50
5	Conclusioni.....	53
6	Bibliografia.....	55

1 Introduzione

La Commissione Europea ha approvato l'European Green Deal con l'obiettivo di "trasformare l'UE in una società equa e prospera, con un'economia moderna, efficiente sotto il profilo delle risorse e competitiva, priva di emissioni nette di gas serra entro il 2050 e in cui la crescita economica sia disaccoppiata dall'uso di queste risorse" (European Commission, 2019). I fanghi di depurazione (28,0%), i rifiuti domestici e delle industrie alimentari (23,0%) e i rifiuti manifatturieri (21,0%) sono le tre principali tipologie di residui generati nell'UE, secondo l'Agenzia Europea per l'Ambiente (EEA, 2019).

Questi rifiuti rappresentano il 72% del totale dei rifiuti europei generati in contesti urbani, escludendo i principali rifiuti minerali. In particolare, nei paesi dell'UE-27, la loro quantità è aumentata del 7% (quasi 50,3 milioni di tonnellate) tra il 2010 e il 2018, aumento derivante dalla crescita economica, svincolata dall'aumento demografico europeo, contrariamente, registratosi stabile. Negli ultimi decenni questi substrati hanno iniziato a essere adottati per la produzione di bioenergia, essenzialmente biogas, bioetanolo e biodiesel. Ma, la recente Direttiva UE 2018/851, che contiene alcune modifiche alla Direttiva 2008/98/CE sui rifiuti, ha introdotto cambiamenti rilevanti per quanto riguarda la gestione dei rifiuti, e principalmente la loro raccolta e valorizzazione. La nuova Direttiva 2018/851, difatti, incoraggia la promozione della "gerarchia piramidale delle bioraffinerie a cascata", in cui la produzione di biomolecole ad alto valore aggiunto o di intermedi biologici è considerata prioritaria rispetto alla produzione di bioenergia (Battista et al., 2020). Diversi progetti marchiat "Horizon2020" sono stati portati a termine con successo negli ultimi anni (Smartplant, AgroCycle, Circular Biocarbon, Fit for Food e Decisive 2020), con l'obiettivo di valorizzare i flussi di rifiuti più abbondanti provenienti da contesti industriali, agricoli e urbani (Horizon2020 Smart Plant project, 2022). Un esempio di matrice eterogenea, come definito dal "Food Use for Social Innovation" di Optimizing Waste Prevention Strategies è rappresentato da "qualsiasi alimento, e parti non commestibili di esso, rimosso dalla catena di approvvigionamento alimentare per essere recuperato o smaltito", alla base tra l'altro dello spreco alimentare (Food Waste Definition, 2022). Di conseguenza, i rifiuti alimentari comprendono prodotti e sottoprodotti molto eterogenei, con caratteristiche chimico-fisiche e molecolari diverse.

Questa rassegna ha focalizzato l'attenzione sul progetto Horizon2020 RES URBIS, che aveva come obiettivo la valorizzazione degli scarti alimentari e dei fanghi di depurazione in prodotti biobased ad alto valore aggiunto, riducendo al minimo i rifiuti residui o conseguenti da smaltire. Un primo passo compiuto dal Work Package 2 (WP2) è stato quello di investigare la

fermentazione acidogenica dei rifiuti urbani per la produzione di molteplici prodotti innovativi a base biologica e biocarburanti (Strazzer, et al., 2021), e in particolare per la produzione di acidi grassi volatili (VFA). La produzione di VFA è un argomento di ricerca emergente, come si può verificare dal trend esponenziale di articoli scientifici pubblicati nell'ultimo decennio su <<Scopus>>. L'enorme interesse per i VFA è giustificato dal fatto che questi rappresentino i precursori biologici di diversi bioprodotto, tra cui i poliidrossialcanoati (PHA), vari prodotti chimici (ad esempio esteri, chetoni, alcani) e biocarburanti (ad esempio biogas e idrogeno) (Battista et al., 2020). Inoltre, lo sfruttamento dei rifiuti organici urbani per la produzione di VFA è supportato dall'esistenza di diversi impianti in scala reale per la produzione di bioenergia nell'UE. Questi si collocano essenzialmente in Germania e in Italia, dove sono già 1600 in funzione e circa 600 impianti di biogas su scala reale (Nghiem et al., 2017). Questo rappresenta una straordinaria opportunità in un contesto di bioraffineria, in quanto facilmente adattabili alla digestione anaerobica (AD) a due stadi per la produzione simultanea di VFA e metano. La fermentazione anaerobica acidogenica dei rifiuti alimentari e dei fanghi di depurazione presenta infatti diversi vantaggi: è un processo flessibile in quanto può essere eseguito in condizioni di coltura pura o mista, consente di ottenere diverse concentrazioni e profili dei VFA in funzione sia della composizione chimica iniziale dei substrati sia dei parametri operativi del processo, come pH, temperatura, tasso di carico organico (OLR) e tempo di ritenzione idraulica (HRT) (Strazzer et al., 2021).

Un'ulteriore precisazione si ritiene da farsi proprio in merito alla digestione anaerobica attraverso la quale vengono prodotti i VFA, e che si compone di 4 fasi principali: l'idrolisi, l'acidogenesi, l'acetogenesi e la metanogenesi (Figura 1).

Nella fase idrolitica, il materiale organico di origine mista viene degradato da batteri fermentanti e, grazie all'azione di enzimi extracellulari secreti da organismi saprofiti, viene convertito in unità più semplice, ottenendo così macromolecole biologiche (carboidrati, lipidi, proteine e acidi nucleici) (Satyanarayana et al., 2005). Questo permette di rendere idoneo il substrato, riducendolo di dimensioni, e permettendo così il trasporto attraverso la membrana cellulare di queste molecole.

Durante la fase acidogenica, avviene il metabolismo dei prodotti dell'idrolisi da parte di batteri fermentanti che porterà così alla produzione di acidi grassi volatili (VFA) (Cheah et al., 2018). Una volta prodotti i VFA, questi subiscono vengono ossidati, insieme a ulteriori acidi grassi a catena lunga (LCFA) nel processo di acetogenesi, ottenendo così diversi prodotti di reazione tra cui: acido acetico, anidride carbonica e idrogeno molecolare. L'ultima fase di questo

processo è rappresentata dalla metanogenesi, nella quale avviene infine la produzione di biogas (costituito da metano e anidride carbonica).

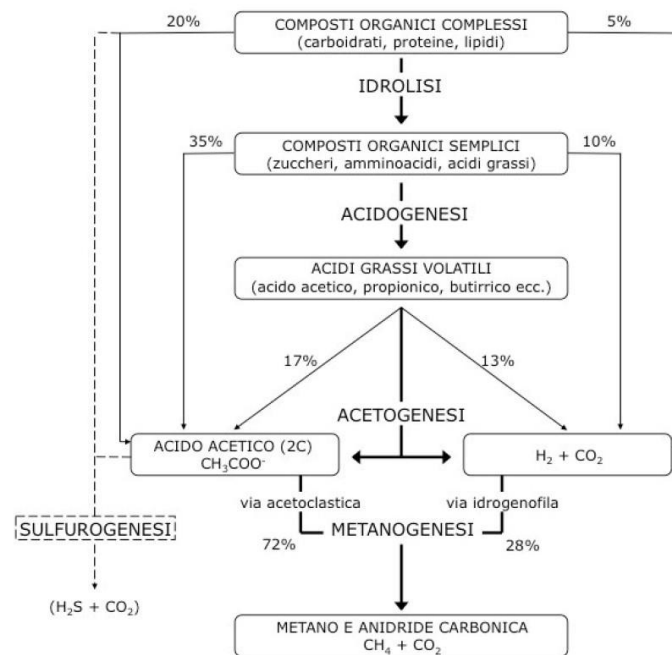


Figura 1 Schema riassuntivo delle fasi della digestione anaerobica, dal materiale in ingresso ai prodotti di reazione

1.1 La fermentazione anaerobica

La fermentazione è un processo anaerobico eseguito da una cellula per generare energia chimica (sotto forma di ATP) dal piruvato (prodotto durante la glicolisi), ma che a differenza della respirazione aerobica, non ricorre al ciclo dell'acido citrico o l'utilizzo della catena di trasporto degli elettroni. Oltre alla fermentazione, gli esseri viventi producono energia chimica degradando le molecole di zucchero (ad esempio il glucosio) attraverso la respirazione aerobica e la respirazione anaerobica. La respirazione aerobica utilizza l'ossigeno, da cui il termine "aerobica". Si articola in tre fasi principali. Innanzitutto, inizia con la glicolisi, in cui la molecola di zucchero a 6 carboidrati viene lissata in due molecole di piruvato a 3 carboidrati. Successivamente, ogni piruvato viene convertito in acetil-coenzima A per essere scomposto in CO₂ attraverso il ciclo dell'acido citrico. Inoltre, gli atomi di idrogeno e gli elettroni delle molecole di carbonio vengono trasferiti alle molecole portatrici di elettroni, NADH e FADH₂. Questi portatori di elettroni trasportano successivamente gli elettroni ad alta energia alla catena di trasporto, impiegando energia per sintetizzare ATP. L'accettore finale di elettroni nella catena è l'ossigeno. Per quanto riguarda la respirazione anaerobica, questa forma di respirazione non richiede ossigeno. Tuttavia, è simile alla respirazione aerobica in quanto gli elettroni passano lungo la catena di trasporto degli elettroni fino all'accettore finale di elettroni. Nella respirazione anaerobica, alla base della catena non c'è l'ossigeno ma altre molecole, ad esempio lo ione solfato (SO₄⁻²) o lo ione nitrato (NO₃⁻).

Data la similarità tra fermentazione e respirazione anaerobica sull'impiego di vari composti, ad esclusione dell'ossigeno, si tende a considerarle simili dal punto di vista metabolico. Tuttavia, la respirazione anaerobica e la fermentazione sono due processi diversi (Tabella 1), soprattutto perché la fermentazione non prevede il sistema di trasporto attraverso la catena di elettroni. Dopo la glicolisi, il piruvato (nella fermentazione dell'acido lattico) o l'acetaldeide (nella fermentazione dell'alcol) fungono da accettore finale di elettroni.

Tabella 1 Confronto tra Fermentazione, respirazione anaerobica e respirazione aerobica.

Fermentazione	Respirazione anaerobica	Respirazione aerobica
Assenza del sistema a catena di trasporto degli elettroni	Impiego della catena di trasporto degli elettroni per veicolarli all'accettore finale	Impiego della catena di trasporto degli elettroni per veicolarli all'accettore finale
Guadagno di 2 molecole di ATP per molecola di glucosio (attraverso fosforilazione a livello del substrato)	Guadagno di 2 molecole di ATP per molecola di glucosio, ma può variare	Guadagno di 38 molecole di ATP per molecola di glucosio (attraverso fosforilazione ossidativa a livello del substrato)
Accettore finale di elettroni è una molecola organica come il piruvato (fermentazione dell'acido lattico) o acetaldeide (fermentazione alcolica)	Accettore finale di elettroni sono composti inorganici come ioni solfato (SO_4^{2-}), nitrati (NO_3^-) e ioni ferro (Fe^{3+}) o composti organici come dimetilsolfossido (DMSO) o fumarato	Accettore finale di elettroni è costituito dall'ossigeno
Esempi: fermentazione dell'acido lattico, fermentazione alcolica, fermentazione con produzione di idrogeno, fermentazioni acide, fermentazione del butandiolo e del butirrato	Esempi: denitrificazione, respirazione del fumarato, respirazione del solfato, metanogenesi, acetogenesi, dealorespirazione (declorazione riduttiva)	Esempi: metabolismo basato su glicolisi e acetyl-CoA, catabolismo degli acigi grassi (β -ossidazione)
Prodotto finale: acido lattico, alcol, idrogeno elementare o CO_2	Prodotto finale: varia in relazione al processo; azoto, acido solfidrico, metano, acetato, composti dealogenati, ferro in forma ridotta	Prodotto finale: H_2O e CO_2

1.2 Funzione della fermentazione

La fermentazione consente alle cellule di produrre energia chimica dalla scomposizione dello zucchero, ad esempio il glucosio, senza l'aiuto dell'ossigeno. Questo dà agli organismi anaerobi (obbligati, facoltativi o aerotolleranti) il vantaggio di prosperare in ambienti anossici (privi di ossigeno) che sarebbero invece inaccessibili per gli organismi aerobi. Esempi di ambienti anossici sono il fango, il suolo, acque e bacini anossici. I batteri anaerobi che possono prosperare in questi ambienti sono essenziali per la loro nicchia ecologica. Fermentano molecole per ricavare energia e, in cambio, producono sottoprodotti rilasciati nell'ambiente che

possono essere utilizzati da altri organismi o restituiti all'ambiente come forma di ciclo dei nutrienti.

1.3 Processo di fermentazione

La reazione di fermentazione comporta due fasi principali: la glicolisi e il trasferimento di elettroni dal NADH al piruvato o ai suoi derivati. La prima fase, la glicolisi, è analogamente la prima fase della respirazione cellulare. Glicolisi significa "scissione dello zucchero", questo perché il glucosio, uno zucchero costituito da 6 atomi di carbonio, viene scisso in due molecole di piruvato dopo la glicolisi. Nella glicolisi, il glucosio viene ossidato in piruvato, producendo energia chimica. La prima fase viene di fatto definita come fase di investimento energetico perché il processo utilizza molecole di ATP. La fase successiva è una fase di recupero dell'energia in quanto l'ATP è ora prodotto attraverso la fosforilazione a livello del substrato. Oltre all'ATP, viene prodotto anche il NADH, un'altra molecola ad alta energia. Il NADH viene prodotto quando la gliceraldeide fosfato (prodotto della fase di investimento energetico) viene ossidata e quindi l' H^+ e gli elettroni vengono trasferiti al NAD^+ . Il prodotto finale della fase di accumulo di energia è il piruvato. Il piruvato viene quindi utilizzato nella fase successiva della fermentazione, che consiste nel trasferimento di elettroni dal NADH al piruvato o ai suoi derivati. Questo passaggio rigenera il NAD^+ , che è importante perché viene utilizzato nella glicolisi durante la fase di pagamento dell'energia. Poiché la fermentazione salta il ciclo dell'acido citrico dopo la glicolisi, il guadagno energetico è di due molecole di ATP per ogni molecola di glucosio, mentre il NADH viene consumato nella seconda fase, quando l'elettrone del NADH viene trasferito al piruvato o ai suoi derivati, ad esempio l'acetaldeide. Pertanto, non c'è produzione netta di NADH durante la fermentazione. Questo è anche il motivo per cui non c'è produzione di ATP attraverso la fosforilazione ossidativa, ma solo a livello di substrato. Nella respirazione cellulare, il NADH entra nella catena di trasporto degli elettroni per trasferire gli elettroni lungo la catena e produrre ATP attraverso la fosforilazione ossidativa.

1.4 Acidi grassi volatili (VFA)

Gli acidi grassi volatili (VFA) consistono in acidi grassi solubili in acqua, frequentemente osservati in natura, caratterizzati da catene la cui struttura può essere composta tra i 2 e i 6 atomi di carbonio, e che possono essere distillati a pressione atmosferica. Esempi di VFA sono l'acido acetico, l'acido propionico, l'acido butirrico, l'acido isobutirrico, acido valerico, acido isovalerico e acido caproico. Un'importante fonte di VFA deriva dal percolato prodotto durante la degradazione della frazione organica dei rifiuti solidi urbani (FORSU) dalle discariche, in cui la loro concentrazione può raggiungere i 5000 mg/L (Siedlecka et al., 2008). La presenza di VFA nei fanghi è attribuita ad altre attività antropiche, come l'allevamento e l'industria alimentare (Worwag e Kwarciak- Kozłowska, 2019). Queste classi di composti hanno trovato applicazione come composti piattaforma¹ in diversi processi e settori industriali², tra cui la produzione di prodotti chimici, farmaceutici, alimentari, ecc... (Ramos-Suarez et al., 2021); inoltre questi, possono essere convertiti chimicamente per formare esteri o subire polimerizzazione con il fine di produrre plastiche e polimeri come l'acetato di polivinile, o subire conversione biologica per generare acidi grassi a catena media, fertilizzanti o biopolimeri come i poliidrossialcanoati (PHA) (Khardenavis et al., 2005; Khardenavis et al., 2009). La produzione di elettricità tramite celle a combustibile e bioenergia come idrogeno e biogas derivanti dai VFA, ad esempio, è un'altra opzione da considerarsi possibile grazie alla conversione biologica (Kim et al., 2018; Ramos-Suarez et al., 2021). Inoltre, i VFA possono essere utilizzati come substrato per la rimozione biologica di azoto (Khardenavis et al., 2007; Pal et al., 2015; Xie et al., 2014) e fosforo (Jha et al., 2017) dalle acque reflue.

Eppure la crescente domanda di VFA è soddisfatta principalmente attraverso la sintesi chimica che si basa sul petrolio; tuttavia, a causa di problemi legati alla disponibilità e al costo delle risorse petrolifere, oltre che alla crescente preoccupazione per il loro impatto ecologico in termini di cambiamento climatico e di inquinamento, l'attenzione si è spostata verso strategie alternative per la generazione di VFA (Aghapour Aktij et al., 2020).

¹ I VFA possono fungere da molecole piattaforma per la produzione di biocarburanti, prodotti biochimici e biomateriali attraverso diversi percorsi di upgrading e conversione basati su reazioni catalitiche. Attualmente, i bio-base platform derivanti da carboidrati sono già da tempo oggetto di ricerca e commercializzazione per la produzione di biocarburanti attraverso fermentazione.

² Tra i suddetti VFA, si stima che le dimensioni del mercato dell'acido acetico è stimato essere il più grande con 350.000 tonnellate/anno, seguito dall'acido propionico con 180.000 tonnellate/anno. (Jankowska et al., 2017). Tuttavia, il prezzo medio di mercato più alto è quello dell'acido valerico, pari a 4,63 USD kg⁻¹, seguito dall'acido isobutirrico a 2,75 USD kg⁻¹ e dall'acido butirrico a 2,55 USD kg⁻¹ (Ramos-Suarez et al., 2021).

Una potenziale alternativa è la produzione attraverso processi metabolici condotti da microorganismi, la quale tuttavia, presenta anch'essa non poche perplessità come, ad esempio, le basse rese di processo e la sua natura costosa rispetto alla produzione chimica. Una possibile spiegazione potrebbe essere ascritta alla minore attenzione che la produzione microbica di VFA ha ricevuto dalla ricerca. Un'ulteriore strada percorribile consiste nell'applicazione su larga scala della fermentazione microbica dei VFA per l'efficace utilizzo del materiale organico (abbondantemente disponibile) che a sua volta può avere un impatto significativo sulla gestione dei rifiuti e sui bio-processi anaerobici.

Rispetto ai metodi di sintesi chimica, la fermentazione microbica è stata largamente accettata come approccio "green" potendo considerare l'impiego di scarti derivanti da cicli produttivi industriali o urbani come substrato (Figura 2).

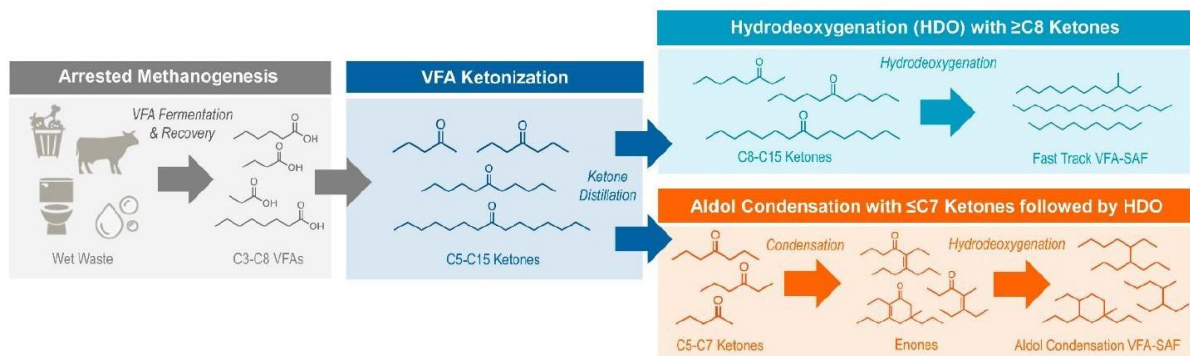


Figura 2 Fasi di processo attraverso cui i VFA vengono convertiti in bio-combustibili (SAF).

A favore di una maggiore economicità del processo, le ricerche si stanno tutt'ora concentrando sull'impiego di rifiuti organici per la sintesi di VFA, in modo particolare per quanto concerne i rifiuti agricoli (biomassa lignocellulosica). Tuttavia, rifiuti di questo tipo, risultano recalcitranti e inaccessibili (non metabolizzabili) per i microorganismi e per cui, necessitando di pretrattamento, questi potrebbero essere responsabili dell'aumento dei costi dell'intero processo con l'aggravante della purificazione dei VFA, resa altrettanto difficoltosa e dispendiosa dall'impiego dei flussi di rifiuti e determinando, definitivamente, un aumento complessivo del costo del prodotto.

Pertanto, per rendere la produzione di VFA commercialmente valida, fattori come produttività, rendimento, costi delle materie prime, prodotti secondari e purificazione, non possono non essere presi in considerazione.

1.5 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.

1.5.1 pH

Il pH è uno dei principali fattori determinante, in maniera significativa, l'efficienza dell'idrolisi, oltre che indicatore dell'acidificazione del sistema in esame (Horiuchi et al., 2002; Lin e Li, 2018). Nonostante la riscontrata adattabilità dei microrganismi anaerobi, la maggior parte di questi non è in grado di sopravvivere a condizioni limite di pH, sia queste di estrema acidità ($\text{pH} < 3$) che basicità ($\text{pH} > 12$) (Biswas et al., 2009), mentre condizioni di neutralità del sistema comportano scarsi rendimenti dal punto di vista delle cinetiche di reazione (Ma et al., 2016).

1.5.2 Temperatura

La fermentazione anaerobica finalizzata alla produzione di VFA può avvenire in un range di temperature in grado di coprire sia condizioni psicrofile ($< 20^\circ\text{C}$), mesofile ($25 - 40^\circ\text{C}$) che termofile ($45 - 60^\circ\text{C}$) (Ferreiro e Soto, 2003; Feng et al., 2019; Kashyap et al., 2003; Zhuo et al., 2012). La sua regolazione e controllo, quindi, permettono di poter selezionare e favorire la comunità microbica fermentante in relazione alle differenti esigenze e possibilità tecniche.

Inoltre, da quanto appurato da studi condotti su tale processo, una temperatura sufficientemente elevata delle condizioni fermentative induce un aumento della produzione di VFA, con stime tra il 20% e il 50% (Ferreiro e Soto, 2003; Feng et al., 2019; Kashyap et al., 2003; Zhuo et al., 2012). Questo effetto risulta correlato alla maggiore disponibilità di proteine e carboidrati le quali, ad elevate temperature, aumentano la loro disponibilità nel mezzo grazie alla maggiore attività enzimatica (soprattutto da parte di proteasi e α -glucosidasi) che si riscontra a determinate temperature (Moser-Engeler et al., 1998). Per quanto possa sembrare una condizione a vantaggio di alte rese di processo, le condizioni del sistema devono essere garantite da opportuni metodi di controllo in quanto le comunità termofile, proprio per il range di temperature alle quali possono sopravvivere, sono particolarmente suscettibili alle variazioni ambientali, soprattutto se correlate con la temperatura (Kim et al., 2006).

1.5.3 Tempo di residenza idraulico (HRT)

Con HRT viene indicato il tempo impiegato per effettuare un rinnovo completo del volume d'acqua presente in un serbatoio. Le condizioni di reazione nella fermentazione anaerobica per la produzione di VFA risultano influenzate da questo parametro (Jankowska et al., 2018), soprattutto nel caso in cui il substrato solido (con annessi organismi fermentatori) e la componente liquida sono completamente miscelati in applicazioni di processo in continuo. In queste condizioni sarà necessario scegliere accuratamente il tempo di residenza per evitare di eliminare, involontariamente dalla miscela fermentante nel reattore, la frazione di microorganismi responsabili della produzione di VFA; inoltre dovrà tenere in considerazione delle comunità target e delle loro cinetiche di crescita: microorganismi con tempi di crescita maggiori del tempo di residenza saranno scartati insieme al volume di liquido eliminato per ricambio del substrato (Ghosh e Pohland, 1974).

1.5.4 Tasso di carico organico (OLR)

Con OLR viene indicata la quantità di substrato organico introdotto, nell'unità di tempo, per unità di volume di reazione. La maggior parte degli OLR nella fermentazione anaerobica di fanghi di scarto non superano i $30 \text{ gTS} \cdot (\text{Ld})^{-1}$, sia in sistemi continui (CSTR) che in sistemi batch (Banerjee et al., 1999; Chen et al, 2006). Per garantire maggiore stabilità del sistema in esame, si è optato per valori inferiori, in quanto valori limite di OLR, se da una parte permettono una maggiore produzione di VFA diminuendo il tempo di residenza idraulico, potrebbero causare una parziale, se non totale, inibizione della comunità fermentante, con conseguente arresto della produzione di VFA. L'OLR risulta quindi influenzare la distribuzione dei VFA, soprattutto dal punto di vista della concentrazione dell'alimentazione in quanto valori esageratamente elevati di OLR condurrebbero ad un inevitabile blocco dei processi fermentativi e all'accumulo di acido lattico e acidificazione del sistema (Jouany, 2006).

1.6 Obiettivi della tesi

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di valutare l'influenza del tempo di residenza idraulico (HRT) sulla produzione attraverso fermentazione acidogenica di acidi grassi volatili (VFA), valutando i principali parametri di processo e il substrato impiegato come alimentazione. La sperimentazione è stata eseguita in tre bioreattori, in condizioni di termofilia (55 °C) e caratterizzati ognuno da un HRT differente (4, 5 e 6 giorni), basati sul modello di un reattore chimico CSTR (Continuous-flow Stirred-Tank Reaktor). Inoltre, il substrato alimentante è stato sottoposto a due tipi di pretrattamento (termico-alcantino o esclusivamente termico) incentivando in questo modo l'idrolisi della sostanza organica e la sua solubilizzazione, favorendo così la produzione di VFA durante la fermentazione.

I risultati dell'analisi sui diversi tempi di residenza considerati forniranno indicazioni circa la migliore condizione operativa tra quelle proposte in termini di concentrazione finale di VFA ottenibile, e rapporto VFA/sCOD. Maggiore risalto verrà posto a particolari VFA prodotti durante la fermentazione, principalmente acido acetico, propionico e butirrico (in quanto principali prodotti di fermentazione) e come il diverso HRT influenzi la distribuzione dei VFA, e dunque, in breve:

- L'individuazione delle migliori condizioni operative in grado di massimizzare i rendimenti di fermentazione.
- Valutazione della tipologia di pretrattamento in grado di fornire le migliori condizioni operative.
- Valutazione, tra quelli a disposizione, del substrato che si presti meglio per l'impiego nel processo di fermentazione.
- Valutazione dei principali acidi prodotti e la loro distribuzione relativa.
- Analisi della comunità microbica sulla base delle condizioni operative adottate.

2 Materiali e Metodi

2.1 Substrati

In questo studio è stata impiegata una miscela di substrati costituita, rispettivamente, da scarto verde, rifiuto solido urbano (FORSU) e fango secondario di depurazione.

La frazione vegetale raccolta nell'area limitrofa dell'impianto di depurazione di Treviso, a seguito delle operazioni di manutenzione delle aree verdi, vuole essere rappresentativa di ciò che viene definito "scarto verde": componente vegetale derivante dagli scarti delle opere di giardinaggio e soggetta a variazione stagionale e di distribuzione geografica, e del quale non è possibile garantirne una raccolta uniforme. L'esclusione di rami e, di conseguenza, della maggior parte della lignina presente nella pianta, deriva dalla scelta di limitare questi composti (costituente della frazione di COD lentamente biodegradabile, *sbCOD*) all'interno della frazione di alimentazione preservando, al contempo, la frazione facilmente biodegradabile definita come *rbCOD*. Il rifiuto solido urbano e il fango secondario sono stati prelevati dall'impianto di depurazione delle acque reflue di Treviso, all'interno del quale sono normalmente trattati mediante codigestione anaerobica; una volta prelevati, FORSU e fanghi sono stati poi conservati in cella frigorifera e acclimatati prima dell'utilizzo. D'altra parte, la FORSU essendo caratterizzata da una composizione omogenea, risente delle variazioni ambientali e interne in quanto materiale non stabilizzato. Il fango è stato prelevato dall'ispessitore statico a gravità dell'impianto e, con l'obiettivo di stabilizzarlo e renderlo idoneo come substrato ai fini della fermentazione, i fanghi di alimentazione hanno subito pretrattamento termico a 70°C per 48h e successivamente congelati per preservarne le caratteristiche. Scarto verde e la FORSU hanno subito due diverse tipologie di pretrattamento, chimico e fisico, prima di poter essere impiegate come substrato per il test fermentativo. Mentre per il fango secondario, essendo questo già materiale derivante da trattamenti chimico-fisici (all'interno della linea fanghi dell'impianto), è stato sottoposto al solo trattamento meccanico della matrice (centrifugazione) (Figura 3).



Figura 3 Fase solida estratta dal processo di centrifugazione).

Una frazione delle matrici è stata successivamente prelevata per la caratterizzazione per la quale è stato determinato il contenuto di solidi totali (TS), solidi totali volatili (TVS) e la richiesta chimica di ossigeno solubile (sCOD). Una seconda caratterizzazione ha interessato la fase liquida delle tre matrici (impiegata successivamente come alimentazione) e il fermentato ottenuto sui quali sono stati determinati (oltre ai parametri sopra elencati) anche il pH, il contenuto di acidi grassi volatili (VFA) e la concentrazione di azoto ammoniacale (N-NH_4^+).

2.2 Metodi analitici e calcoli

Parte delle analisi chimiche per la caratterizzazione iniziale delle matrici impiegate come substrato, sono state svolte su campione essiccato per 48 ore in stufa a 100 °C e successivamente polverizzato con mortaio.

Per quanto concerne la fase liquida (ottenuta attraverso centrifugazione, e filtrazione con filtro a fascia nera) è stata eseguita l'analisi dell'azoto ammoniacale e del contenuto di ortofosfati che ha richiesto poi un'ulteriore filtrazione a 0,2 μm .

2.2.1 Solidi totali e solidi volatili

Con solidi totali (TS) si fa riferimento al residuo che permane in un crogiolo successivamente all'evaporazione dell'acqua in un campione mediante essiccamento in stufa; mentre con la denominazione di solidi volatili (TVS o VS) ci si riferisce ai solidi volatilizzati sottoponendo il residuo secco a incenerimento in muffola a $T=500\text{ }^{\circ}\text{C}$ e che costituiscono un indice di valutazione delle sostanze organiche presenti in una matrice.

Per quanto concerne l'analisi del contenuto in solidi del substrato (Figura 4), è stata adottata la procedura standard per la determinazione dei solidi totali (TS) e dei solidi volatili (TVS): i primi vengono determinati procedendo in successione con una pesatura della tara, pesatura del campione (peso umido) posto poi in stufa per un totale di due giorni alla temperatura di $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, al termine dei quali ne viene determinato il peso secco. La determinazione dei TVS, rispetto alla procedura sopracitata, prevede un ulteriore passaggio (a conclusione dell'analisi sui solidi) consistente nell'incenerimento del campione in muffola per la durata di dodici ore ad una temperatura di $550\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Figura 4 Analisi dei solidi su fase liquida (in alto) e fase solida (in basso).

Il contenuto di TS espresso come $\text{gTS} \cdot \text{Kg}^{-1}$ è dato dalla seguente equazione:

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

Mentre, il contenuto in TVS del campione si ottiene dalla seguente equazione:

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

dove:

P0: peso del crogiolo vuoto (tara)

P1: peso umido del crogiolo con campione

P2: peso secco del crogiolo con campione

P3: peso del crogiolo con ceneri del campione (successivo all' incenerimento in muffola)

2.2.2 Richiesta chimica di ossigeno (COD)

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, solfato di argento (catalizzatore), solfato di mercurio.

Al fine di rendere i campioni idonei per l'analisi, questi sono stati sottoposti a digestione all'interno di vessel in Teflon® con un'aliquota di campione secco e di reagenti all'interno del mineralizzatore. Il processo suddiviso in due fasi, ha visto sottoporre in un primo momento il campione a 175°C e in un secondo a 50°C per la durata totale di un'ora; in questo arco temporale 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 mg*L⁻¹, viene così determinata:

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

2.2.3 Richiesta chimica di ossigeno solubile (sCOD)

Con l'acronimo sCOD si vuole indicare la quantità di ossigeno necessaria ad ossidare chimicamente la sostanza organica presente nella frazione liquida di un campione. Tale parametro è stato determinato mediante metodo colorimetrico, che prevede la digestione in ambiente acido e la determinazione dell'eccesso di bicromato.

Le analisi sono state svolte con tecnica colorimetrica mediante l'utilizzo di uno spettrofotometro Analytikjena Spekol 1500 (Figura 5); per quanto concerne la procedura di analisi, al fine di ottenere un campione privo della sua costituente solida, si è proceduto con filtrazione del fermentato con apparato filtrante (con grado di filtrazione a 0,2 micrometri).



Figura 5 Spettrofotometro Analytikjena Spekil 1500 impiegato per le analisi.

Nella provetta destinata all'analisi, è stata inserita un'aliquota del campione filtrato, 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 ($HgSO_4$). Le vial sono state poi posizionate in termoblocco per la digestione acida a $150\text{ }^\circ\text{C}$ per un tempo di due ore e al termine del quale, è stato misurato l'assorbimento a lunghezza d'onda di 600 nm per determinare il contenuto di sCOD in $gO_2 \cdot L^{-1}$ (rapportato al fattore di diluizione del campione, F.D.). Il quantitativo di sCOD è stato dunque determinato mediante la seguente equazione:

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

2.2.4 Acidi grassi volatili (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; la calibrazione è stata eseguita utilizzando una soluzione madre contenente gli acidi grassi volatili target e come standard interno per l'analisi quantitativa è stato utilizzato acido 2-etilbutirrico. Il metodo utilizzato, "VFA_METODO_FFAP" (che prevede una rampa di temperature che aumenta in successione da 80°C, a 130°C, a 145 °C, a 200 °C e, per terminare con una fase a 220 °C) (Figura 6), ha visto il campione preventivamente sottoposto a filtrazione a 0,2 μm per eliminare una parte della frazione solida. Gli acidi target dell'analisi sono stati: 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).

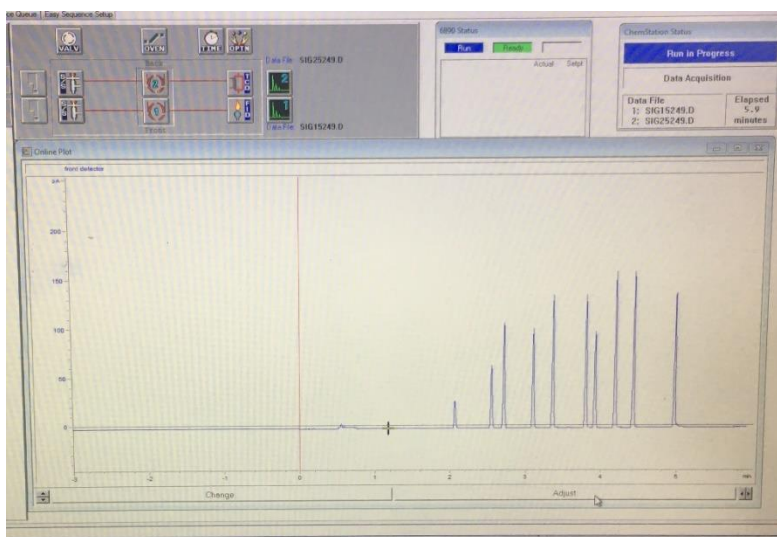


Figura 6 Software ChemStation per l'analisi con gascromatografo.

2.2.5 Azoto ammoniacale

Il metodo analitico per la determinazione dell'azoto ammoniacale si basa sulla reazione tra ammoniaca e una soluzione alcalina di tetraioduro di potassio, noto come reattivo di Nessler; il risultato è un composto che conferisce alla soluzione un colore giallo-arancione (l'intensità del colore aumenta all'aumentare della concentrazione). Per evitare eventuali interferenze durante il processo di analisi, nel caso specifico di acque reflue, l'aggiunta del reattivo di Nessler avviene dopo distillazione dell'ammoniaca in corrente di vapore attraverso distillatore VELP SCIENTIFICA UDK 129 (Figura 7). Mediante analisi spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 410 nm, l'assorbanza del campione e del bianco vengono così determinate. 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: valore di assorbanza del campione determinato dallo spettrofotometro.

F.D.: 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: coefficiente angolare della retta di calibrazione per l'analisi del N-NH₄⁺.

N-NH₄⁺ = mg(N-NH₄⁺)*L⁻¹ è l'unità di misura di questo parametro.



Figura 7 Distillatore Velp Scientifica UDK 129 impiegato per le analisi.

2.2.6 Azoto totale con metodo TKN

Il metodo del TKN impiegato per determinare la quantità totale di azoto presente nel campione prevede, inizialmente, la digestione acida con H₂SO₄ concentrato a cui sono aggiunti come catalizzatori perossidissolfato di potassio ed ossido di mercurio alla temperatura di 200 °C. Successivamente, il campione viene digerito in mineralizzatore (Figura 8) in due step per la durata di tre ore; il valore di TKN è infine così determinato:

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

dove:

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

ABS: assorbanza ricavata dall'analisi spettrofotometrica

F.D.: fattore di diluizione operato nel campione prima di inserire il reattivo di Nessler

V: volume del matraccio in cui è stato disciolto il digerito

P: peso del campione secco

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



Figura 8 Mineralizzatore Speedwave XPert impiegato per la digestione dei campioni.

2.2.7 Ortofosfato (PO_4^{-3})

Il metodo analitico per la determinazione degli ortofosfati si basa sulla reazione degli ioni ortofosfato con il molibdato di ammonio ed il potassio antimonil-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 dell'assorbanza del campione ad una lunghezza d'onda di 710 nm.

Si determina dunque la concentrazione mediante la retta di calibrazione:

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

dove:

ABS: valore di assorbanza del campione determinato allo spettrofotometro

F.D.: fattore di diluizione operato nel campione prima di inserire il reagente misto

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

L'unità di misura viene espressa in $mg(P-PO_4^{-3}) * L^{-1}$

2.2.8 Fosforo totale

Il fosforo totale si determina effettuando una digestione acida della componente solida del campione mediante persolfato di potassio in mineralizzatore (analogo a TKN) per liberare gli ortofosfati dai legami organici presenti nel campione. Segue quindi la determinazione spettrofotometrica (a 720 nm) del fosforo totale che sarà ora costituito dalle forme convertite di fosfato in ortofosfato. Il quantitativo di fosforo totale è dato dalla seguente equazione:

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

Dove:

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

ABS: assorbanza del campione determinata mediante analisi spettrofotometrica

F.D.: fattore di diluizione operato nel campione prima di inserire il reagente misto

V: volume del matraccio in cui è stato disciolto il digerito

P: peso del campione secco

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

2.3 Test di fermentazione acidogenica al buio (dark fermentation)

I test fermentativi condotti sulla miscela di fase liquide delle tre matrici hanno visto l'impiego di un set di fermentatori con l'intento di emulare le caratteristiche di un reattore CSTR (Continuous Stirred-Tank Reactor). Per garantire le opportune condizioni di miscelazione all'interno del volume operativo, ogni fermentatore veniva agitato tramite agitatore magnetico. Inoltre, a garanzia di un minor scambio di calore tra le bottiglie e l'ambiente esterno, il sistema è stato alloggiato all'interno di una stufa, permettendo un maggior controllo sulla temperatura di esercizio di 55 °C. Nessun inoculo si è ritenuto necessario in considerazione della sufficiente quantità di batteri fermentativi di cui gode naturalmente l'alimento e il cui sviluppo si suppone essere dovuto al temporaneo stoccaggio della FORSU prima del conferimento.

2.4 Reattori e condizioni di reazione

Il test fermentativo, di durata totale di 62 giorni, è stato condotto in tre reattori CSTR (Figura 9), caratterizzati da diversi tempi di ritenzione idraulica HRT (Hydraulic Retention Time), rispettivamente di 4, 5 e 6 giorni (denominate Run 1, Run 2 e Run 3). È da considerarsi un'ulteriore distinzione circa le due tipologie di alimentazione: la prima (*a*) conferita dal 1° al 31° giorno, la seconda (*b*) fino alla conclusione del test. La condizione *a* ha previsto un'alimentazione attraverso un substrato pretrattato sia chimicamente (impiego di idrossido di sodio al 30%) che termicamente (range di temperature tra i 50 e 60 °C) per un determinato intervallo temporale definito come "combinato". Terminato il periodo di trenta giorni, l'alimentazione è stata sostituita con un substrato per il quale è stato previsto esclusivamente un pretrattamento termico.



Figura 9 Disposizione delle tre Run su agitatore magnetico all'interno della stufa.

In tabella 2 vengono riassunte le condizioni operative per i test impiegati, ad ognuno è associato un determinato valore di HRT e intervallo temporale della durata del test.

Tabella 2 Denominazione delle Run sperimentali e rispettivo intervallo di tempo.

Run	HRT [d]	Intervallo di tempo [d]
1a	4	1 - 31
1b		32 - 62
2a	5	1 - 31
2b		32 - 62
3a	6	1 - 31
3b		32 - 62

Le condizioni operative adottate per il test fermentativo sono riportate in tabella 3. I test sono stati condotti impiegando bottiglie in vetro borosilicato Pyrex® da 1 L, del quale 900 ml impiegati come volume di reazione. Per limitare lo scambio di ossigeno con l'atmosfera, si è applicato del *Parafilm*® volendo garantire le condizioni più vicine ai tipici sistemi biologici

anaerobi. Il processo è stato condotto in condizioni termofile, mantenendo la temperatura tra i 50-60 °C, mentre dal punto di vista dell'alimentazione, questa è stata effettuata quotidianamente durante la settimana e non è stato necessario ricorrere ad un inoculo iniziale in quanto le matrici impiegate (soprattutto fango e FORSU) sono caratterizzati da una preesistente comunità batterica fermentativa in grado di proliferare autonomamente.

Tabella 3 Valori di carico dell'alimentazione per i test fermentativi.

	Volume [L]	Q alimentazione [L*d ⁻¹]	Q scarto verde [L*d ⁻¹]	Q FORSU [L*d ⁻¹]	Q fango [L*d ⁻¹]	OLR [KgO ₂ *(m ³ *d) ⁻¹]
Run 1	0,9	0,225	0,056	0,084	0,084	5,14
Run 2	0,9	0,180	0,045	0,068	0,068	4,11
Run 3	0,9	0,150	0,038	0,056	0,056	3,43

Nelle tre condizioni operative il volume dei reattori è di 0,9 L, ciò che caratterizza ognuno dei test sono le portate di alimentazione e i rapporti tra le singole matrici adottate. L'andamento della fermentazione è stato monitorato analizzando quotidianamente il pH e la concentrazione dei VFA.

Dal punto di vista del tasso di carico organico (OLR), all'aumentare dei tempi di residenza, l'OLR diminuisce in quanto diminuiscono le portate di alimentazione. Pertanto, gli OLR applicati erano pari a 5,14 gCOD/(L d) (Run 1), 4,11 gCOD/(L d) (Run 2) e 3,43 gCOD/(L d) (Run 3).

2.5 Cinetiche e rendimenti di processo

La cinetica di produzione specifica di VFA (q_{VFA}) è stata calcolata in base al rapporto tra la concentrazione di VFA (in fase stazionaria) sottratta alla concentrazione di COD e VS moltiplicato il rispettivo tempo di residenza (HRT):

$$q_{VFA} = \frac{COD_{VFA} - COD_{VFAin}}{HRT \times VS_{in}}$$

Il rendimento di produzione di VFA (Y_{VFA}) è stato quantificato in relazione all'equazione;

$$Y_{VFA} = \frac{COD_{VFA} - COD_{VFAin}}{VS_{in}}$$

2.6 Analisi microbiologiche

I microrganismi termofili sono oggetto di grande interesse scientifico da diversi decenni, in particolare, per il loro potenziale biotecnologico e per gli enzimi termostabili che producono. Sono quindi necessarie tecniche di coltivazione ottimali per questi organismi, non solo per lo studio di base ma anche per la valutazione dei loro prodotti microbici. Il funzionamento di un fermentatore a temperature elevate può essere vantaggioso in termini di maggiore solubilità dei substrati, migliore trasferimento di massa dovuto alla diminuzione della viscosità e maggiore velocità di diffusione. Tuttavia, la coltivazione di termofili presenta anche alcune criticità. Una temperatura di coltura elevata, ad esempio, può comportare imprevisti inerenti la scelta del design del reattore e dei materiali da impiegare nella costruzione, nonché i processi di riscaldamento e raffreddamento del fermentatore. Altre problematiche possono riguardare la scarsa solubilità dei gas, l'instabilità dei substrati e degli ulteriori reagenti impiegati. Inoltre, un'elevata produttività richiede il raggiungimento di alte densità cellulari e in molti casi le termofile sono caratterizzate da bassi tassi di crescita, basse rese di crescita e suscettibilità all'inibizione di substrati e prodotti a basse concentrazioni. È noto di come i processi di fermentazione coinvolti, siano influenzati da diversi fattori quali: pressione parziale dell'idrogeno, effetti di turbolenza all'interno del volume, strippaggio dei gas prodotti, tasso di sviluppo delle comunità fermentanti, la presenza o meno di un inoculo, ma soprattutto pH, temperatura ed infine i contenuti di elementi quali azoto, zolfo, composti inorganici. Il

monitoraggio del processo verrà condotto proprio su questi ultimi elementi come parametri sentinella. Una frazione del fermentato è stata impiegata per le analisi microbiologiche con lo scopo di determinare la comunità batterica presente all'interno dei reattori in fase di fermentazione. Il campionamento è stato eseguito nei giorni 16, 44 e 49 in modo da investigare il fermentato ottenuto sia attraverso matrice con pretrattamento combinato che per alimentazione pretrattata solo termicamente.

2.7 Analisi della comunità microbica

Il seguente metodo analitico è stato effettuato presso i laboratori dell'Istituto di ricerca sulle acque del CNR (IRSA-CNR), presso la sede di Montelibretti (Roma).

Sono stati prelevati 10 mL del fermentato proveniente dalle tre diverse condizioni operative esplorate e successivamente sottoposti a due tipi di analisi: l'estrazione del DNA e la tecnica FISH (ibridazione in situ fluorescente). L'estrazione del DNA è stata effettuata utilizzando il kit Dneasy PowerSoil Pro (QIAGEN, Germantown, MD) e utilizzato come template per l'amplificazione della regione V1-V3 di 16S. regione V1-V3 del gene 16S rRNA dei batteri (27F 50-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'; 534R 50-ATT ACC GCG GCT GCTGG-30) seguendo la procedura per la preparazione della libreria e sequenziamento descritta in Crognale et al. Le analisi bioinformatiche sono state effettuate con QIIME2 v. 2018.2, seguendo la procedura precedentemente indicata. Il sequenziamento high-throughput ha prodotto un totale di 51,652 di 51,652 letture di sequenza dopo il controllo di qualità e l'elaborazione bioinformatica. che si sono risolte in 275 ASV. I set di dati sono disponibili attraverso l'Archivio delle letture di sequenza (SRA) con l'adesione PRJNA830363.

3 Schema di Processo

Nella figura 10 vengono illustrate le diverse fasi di processo a cui vengono sottoposte le matrici impiegate, infine, come alimentazione per i test di fermentazione. La prima fase che ha interessato le tre matrici consiste nel pretrattamento (combinato o esclusivamente termico) delle singole, seguito da una separazione solido-liquida attraverso centrifugazione per terminare, infine, con l'estrazione della fase liquida. Ottenuta così la frazione liquida dalle tre matrici, questa verrà convogliata come unico flusso di alimentazione per il sostentamento della fermentazione all'interno dei reattori.

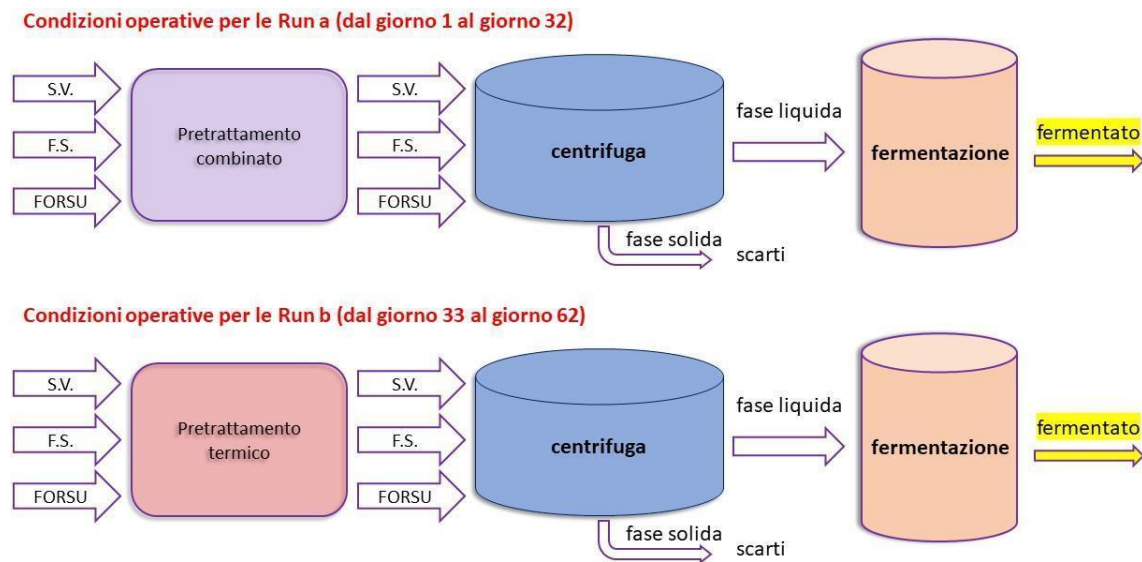


Figura 10 Schema di processo.

3.1 Procedure di pretrattamento

3.1.1 Pretrattamento combinato

Questa tipologia di pretrattamento prevede l'impiego di idrossido di sodio al 30% per la correzione del pH delle miscele iniziali di scarto verde, FORSU e fango secondario per il controllo dell'acidità di queste matrici. Per quanto riguarda l'idrossido di sodio, questo svolge un'importante azione nei confronti della lignina presente nello scarto verde; da quanto emerso da diversi studi, infatti, l'idrossido di sodio è in grado di rompere i legami della lignina. Gli anioni OH^- agiscono a livello della struttura della lignina, mentre gli ioni sodio (Na^+) formano un legame con la lignina per formare il sodio fenolato, sale solubile. La dissoluzione della lignina è accompagnata da un cambiamento di colorazione della soluzione tendente al marrone scuro/nero (black liquor) (Figura 11).



Figura 11 Confronto tra un campione prima dell'aggiunta dell'idrossido di sodio (sinistra) e il black liquor ottenuto post-trattamento (destra).

3.1.2 Pretrattamento termico

Prevede l'aumento di temperatura della matrice, mantenendola costante per 24 h, ad una temperatura compresa tra i 50-60 °C. Questo permette di instaurare delle condizioni termofile fondamentale, sia dal punto di vista fisico (maggiore degradazione fisica della matrice), sia un effetto selettivo sulle comunità batteriche, con l'obiettivo di creare condizioni ottimali per lo sviluppo di batteri del phylum *Thermotogae*, in grado di svilupparsi in questi ambienti, producendo come scarto metabolico molecole quali acetato, lattato e L-alanina.

4 Risultati

4.1 Caratterizzazione

4.1.1 Substrati

Nelle tabelle 4, 5 e 6 sono riportati i parametri di caratterizzazione delle tre matrici adottate. La caratterizzazione è stata effettuata sulle diverse frazioni delle matrici; in particolare, la frazione riportata come “fase liquida pretrattata” è stata utilizzata per i test di fermentazione anaerobica. Il “tal quale” rappresenta il rifiuto dopo campionamento. Le fasi liquide e solide sono state ricavate a seguito di uno step di separazione solido/liquido. La fase solida verrà destinata a test anaerobici di produzione di biogas (non previsti in questa tesi). La fase di maggiore interesse è quella liquida in quanto vera e propria alimentazione del processo di fermentazione e per questa ragione, caratterizzata in modo completo.

Tabella 4 Caratterizzazione Scarto verde.

campione	Scarto Verde			
	sCOD [gO ₂ /L]	TS [g _{TS} /L]	TVS [g _{TVS} /L]	N-NH ₄ ⁺ [mgN- NH ₄ ⁺ /L]
tal quale (pre-idrolisi)	12,5	56,3	50	-
fase liquida pretrattata (post-idrolisi)	18,3	31,8	19,3	52
fase solida pretrattata (post-idrolisi)	-	121,1	108,5	-

Tabella 5 Caratterizzazione FORSU.

campione	FORSU			
	sCOD [gO ₂ /L]	TS [grs/L]	TVS [grvs/L]	N-NH ₄ ⁺ [mgN- NH ₄ ⁺ /L]
tal quale (pre-idrolisi)	22,6	53,6	44,7	-
fase liquida pretrattata (post-idrolisi)	34,4	42,8	29,7	281
fase solida pretrattata (post-idrolisi)	-	133,6	103,5	-

Tabella 6 Caratterizzazione Fango Secondario.

campione	Fango Secondario			
	sCOD [gO ₂ /L]	TS [grs/L]	TVS [grvs/L]	N-NH ₄ ⁺ [mgN- NH ₄ ⁺ /L]
tal quale (pre-idrolisi)	1,9	25,3	19,7	-
fase liquida pretrattata (post-idrolisi)	8,3	8	7,1	408
fase solida pretrattata (post-idrolisi)	-	131,3	86,8	-

Inoltre, ogni fase è stata monitorata dal punto di vista del pH, come mostra la tabella 7, per la valutazione di eventuali variazioni anomale. Il fango secondario, proveniente dalla linea fanghi dell'impianto di depurazione di Treviso, presenta caratterizzazione già nota a priori in quanto risultato del monitoraggio dei parametri operativi dell'impianto stesso; i processi che subisce durante la permanenza all'interno dell'impianto (e per necessità operativa per la corretta operatività) il pH viene monitorato e all'occorrenza modificato. Durante questo studio il fango secondario non è stato ulteriormente alterato sotto questo aspetto per cui il pH risulta inalterato nelle fasi delle matrici.

Tabella 7 Tabella riassuntiva pH matrici durante i pretrattamenti.

pH			
Matrici	Tal quale	pretrattamento chimico	pretrattamento termico
Scarto verde	5,23	11,4	8,18
FORSU	4,5	11,5	9,30
Fango secondario	6,5	6,5	6,5

4.1.2 Alimentazione

Al termine della fase di pretrattamento, la fase liquida di ogni matrice è stata caratterizzata secondo le stesse metodologie impiegate in fase di caratterizzazione dei substrati. Nella tabella 8 sono riportati i risultati dell'analisi.

Tabella 8 Caratterizzazione fase liquida.

campione	Fase liquida				N-NH₄⁺ [mgN-NH₄⁺/L]	pH
	sCOD [gO₂/L]	TS [g_{TS}/L]	TVS [g_{TVS}/L]	TVS/TS [%]		
Scarto verde	18,3	31,8	19,3	60,7	52	11,5
FORSU	34,4	42,8	29,7	69,4	281	11,5
Fango secondario	8,3	8	7,1	88,7	408	7

4.2 Andamento dei parametri di processo (sCOD, VFA, pH e rendimento) nelle tre condizioni operative

4.2.1 Run 1

I grafici mostrano l'andamento della concentrazione di COD solubile (sCOD), VFA e pH durante i tre test in semi-continuo condotti con HRT diversi, rispettivamente di 4, 5 e 6 giorni per la durata di 62 giorni. Il substrato utilizzato proveniva da un processo di trattamento combinato termico alcalino per la prima parte dei test in semicontinuo (vedere la sezione "Materiali e Metodi" per i dettagli), fino al giorno 31 del test (Run 1a, Run 2a, Run 3a). Differentemente, dal giorno 32, è stata impiegata un'alimentazione caratterizzata da solo pretrattamento termico fino alla conclusione dei test (Run 1b, Run 2b, Run 3b).

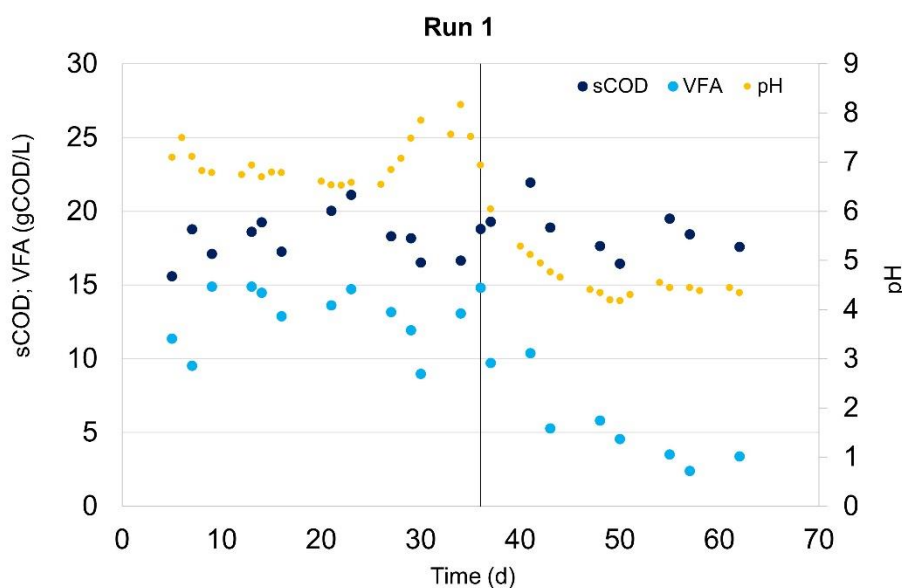


Figura 12 Andamento dei valori di sCOD, VFA e pH durante la Run 1.

Il primo test di fermentazione acidogenica (figura 12) ha previsto un tempo di residenza di 4 giorni; durante la prima fase, i valori di sCOD presentano un valore medio di $18,5 \pm 1,5$ gO₂/L, caratterizzato da un trend positivo nei primi giorni, culminando il giorno 22 con un picco di valore 21,1 gO₂/L ma seguito da una successiva diminuzione fino a 16,5 gO₂/L. Tale variabilità è da attribuire presumibilmente alle incontrollabili variazioni delle proprietà chimico-fisiche dell'alimentazione, principalmente della FORSU e degli scarti verdi, entrambi caratterizzati da una fluttuazione stagionale e giornaliera (in funzione dei conferimenti) delle loro principali caratteristiche.

Con il cambio di alimentazione, la variazione del valore medio risulta minima (19 ± 2 gO₂/L) nella fase di solo pretrattamento termico; si è osservato in pochi giorni un repentino incremento del valore di sCOD fino a 22 gO₂/L, seguito da un secondo picco il giorno 55 di 19,5 gO₂/L ma terminando con un valore di 17,6 gO₂/L. Per quanto riguarda il pH, durante la prima fase, si è osservato un andamento tendenzialmente costante, terminando con un picco di 7,85, dovuto sostanzialmente al processo termo-alcalino precedente. Il passaggio alla seconda fase ha visto un trend negativo, conducendo il pH da un picco iniziale di 8,17 a un valore finale di 4,35; un abbassamento progressivo che sta ad indicare lo stesso processo di acidificazione voluto ma una scarsa capacità di tamponamento e di autosostentamento del sistema. Di fatto, tra le tre componenti utilizzate nel processo fermentativo, soltanto i fanghi di depurazione presentano un loro tenore di alcalinità, e quindi di capacità tampone tale da limitare l'abbassamento del pH in processi di fermentazione sprovvisti di controllo su questo parametro. Presumibilmente, il quantitativo di fanghi secondari nella miscela non era sufficiente come potere tampone, in corrispondenza dello specifico valore di HRT utilizzato (4 giorni). Un HRT di 4 giorni prevede che un quarto del volume di reattore sia scambiato giornalmente; probabilmente il valore di portata volumetrica che ne consegue era troppo alto ed aveva causato il wash-out del potere tampone conferito dai fanghi di depurazione. Osservando l'andamento dei VFA, il valore medio registrato è stato di 13 ± 2 gCOD/L durante il pretrattamento combinato. Alla luce della precedente trattazione, e quindi del wash-out dell'alcalinità dal sistema, il valore di concentrazione VFA è decisamente diminuito attestandosi intorno ad una media pari a 7 ± 3 g COD/L, nel corso della seconda fase del processo fermentativo (Run 1b). Nel corso della prima fase (Run 1a), si è osservato un andamento altalenante dei valori, caratterizzato da due selle in corrispondenza del giorno 13 con valore di 14,9 g COD/L e il giorno 23 con 14,7 g COD/L. Introducendo l'alimentazione pretrattata solo termicamente (Run 1b), si è assistito a un crollo della produzione dei VFA, con un valore iniziale di 14,8 gCOD/L fino ad un valore finale di 3,4 g COD/L. In pratica, la progressiva diminuzione di alcalinità del sistema ha portato all'inibizione della comunità microbica fermentante, fino a raggiungere valori di VFA prossimi a quelli caratterizzanti la miscela iniziale.

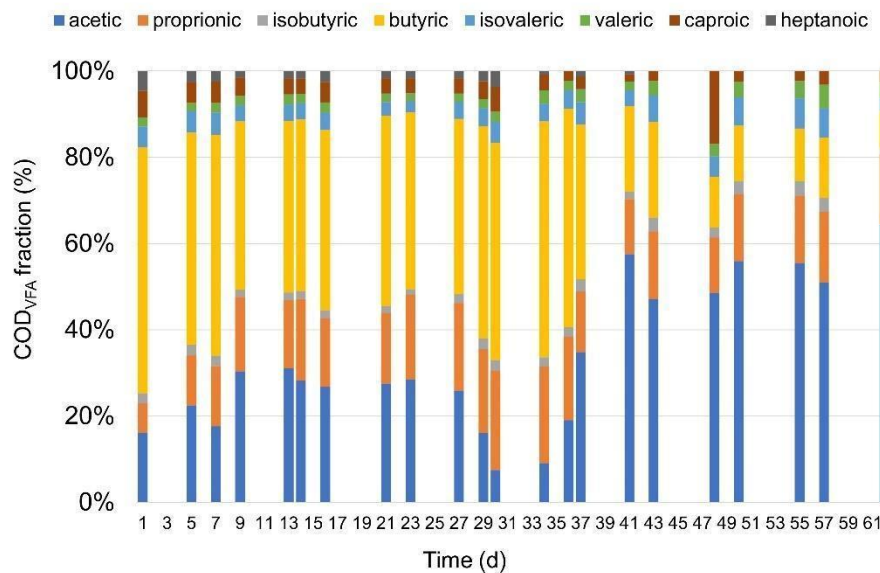


Figura 13 Andamento del profilo dei VFA durante la Run 1.

Come mostrato nella figura 13, il profilo dei VFA ad HRT 4 è rimasto stabile, seppur con leggere variazioni, durante la Run 1a, con una produzione media di VFA_{tot} pari a 8,8 g/L. Il contributo medio più rilevante viene fornito dagli acidi acetico (25%), propionico (19%) e butirrico (43%); questi rappresentano l'87% del totale dei VFA durante la Run 1a. Considerando gli altri acidi, questi contribuiscono al totale tra il 2-4%. Nel complesso l'andamento risulta stabile durante questo intervallo temporale, probabilmente grazie al contributo fornito dal pretrattamento alcalino che ha permesso di mantenere delle condizioni chimico-fisiche idonee per la proliferazione delle comunità fermentanti. Nonostante questo, dal giorno 27 al giorno 30 della Run 1a hanno visto un crollo della produzione di VFA, soprattutto l'acido acetico, da un contributo del 26% al 7% del totale. Considerando invece il contributo degli altri principali acidi, si osserva una composizione finale maggiore per l'acido propionico (23%) e per l'acido butirrico (50%). Nel corso della Run 1b è stata osservata una progressiva diminuzione della produzione dei VFA, con un valore medio di VFA_{tot} pari a 4,2g/L. Il cambio di matrice ha condizionato i parametri chimico-fisici, con ripercussioni sulla comunità fermentante. Dopo i primi giorni di acclimatazione, la composizione di VFA è risultata stabile durante la Run 1b, con leggere oscillazioni dei principali acidi costituenti; in riferimento ai contributi maggiori vi sono gli acidi acetico (59%), propionico (15%) e butirrico (17%).

In tabella 9 vengono riportati i valori medi del test

Tabella 9 Valori medi per le Run 1a e Run 1b.

Parametro	Unità di misura	Run 1a		Run 1b	
		Media	Dev. Std.	Media	Dev. Std.
OLR	KgO ₂ /L*d	5,1	-	5,36	0,5
sCOD	gO ₂ /L	18,5	1,5	19	2
VFA_{tot}	gCOD/L	13	2	7	3
VFA_{tot}	g/L	8,8	1,6	4,2	2,1
VFA/COD	g/g	0,7	0,1	0,4	0,2
Yield	gCOD _{VFA} /gVS	0,5	0,1	0,25	0,1
Rate	mgCOD _{VFA} /gVS*d	118	21	64	26

4.2.2 Run 2

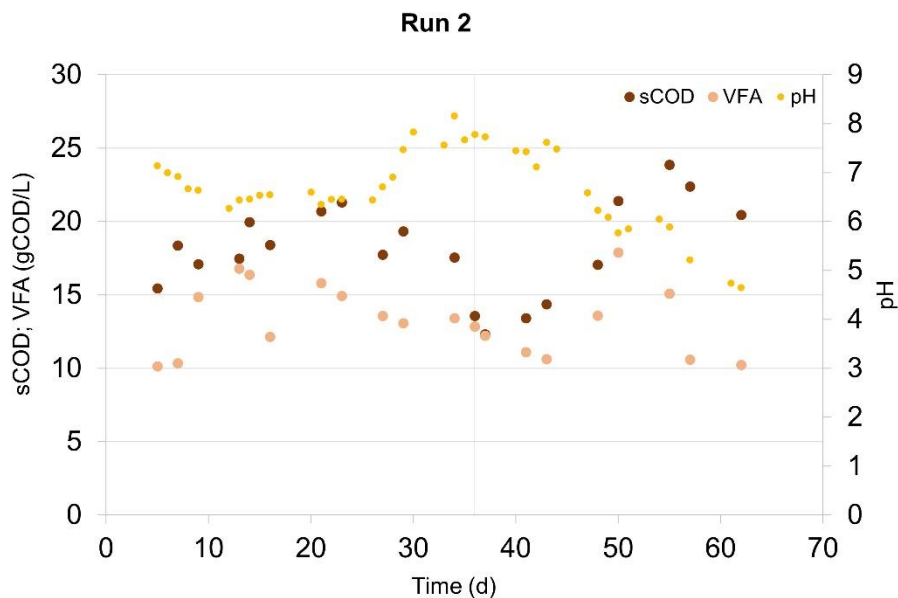


Figura 14 Andamento dei valori di sCOD, VFA e pH durante la Run 2.

Il secondo test fermentativo ha visto il tempo di residenza aumentato a 5 giorni (Figura 14). Per quanto riguarda il parametro sCOD, il valore medio nel corso della prima fase (Run 2a) è stato

di 18 ± 2 gO₂/L, mostrando un andamento ascendente fino al giorno 23, raggiungendo un picco di 21,3 gO₂/L, e per poi diminuire fino a 13,6 gO₂/L; introducendo il secondo tipo di alimentazione (Run 2*b*), il valore medio non ha subito importanti variazioni (18 ± 4 gO₂/L). Anche l'andamento, seppur più marcato, rispecchia quello rilevato durante la prima fase, solo in modo più accentuato, con un picco di 23,9 gO₂/L raggiunto al giorno 55, e seguito da un decremento dei valori nei giorni successivi. Di fatto, il cambiamento dell'HRT sembra non incidere in modo sostanziale sulla solubilizzazione della matrice organica e, di conseguenza, sulla concentrazione di sCOD in soluzione. Tale evidenza sperimentale è senza dubbio dovuta sia alla fase idrolitica iniziale che al regime termofilo imposto, entrambi incentivanti la solubilizzazione della materia organica indipendentemente dal valore di HRT operativo (almeno nel range di valori esplorati).

Per quanto riguarda il valore del pH, parametro fondamentale per la stabilità del processo fermentativo, durante la prima fase (Run 2*a*), ha mostrato un andamento tendenzialmente costante, come del resto atteso sulla base del controllo in fase idrolitica (valori compresi tra 6,27 - 7,14); superate le prime settimane, si è osservato un generale aumento fino a 8,16. Il solo pretrattamento termico, durante la seconda fase (Run 2*b*), ha visto un trend dei valori intorno a 7,47, ma dal giorno 47 è stato possibile registrare un progressivo decremento del pH, terminando con un valore di 4,65. Anche in questo caso, la progressiva diminuzione del pH (seppur più contenuta rispetto a quanto visto nella Run 1*b*), era presumibilmente causata da una diminuzione dell'alcalinità del sistema. Tuttavia, il valore di HRT imposto (5 giorni) non si è rivelato eccessivamente basso tale da causare il wash-out dell'alcalinità, e di conseguenza della comunità microbica fermentante. Questa osservazione è tuttavia da considerarsi parziale, visto l'andamento progressivo di diminuzione del pH stesso. L'incremento del valore di HRT rispetto alla Run 1*b* ha probabilmente posticipato il fenomeno di inibizione della comunità microbica fermentante, rendendo di fatto questa condizione operativa poco appetibile in termini di fattibilità tecnica del processo (al netto di un controllo adeguato di pH).

Il monitoraggio dei VFA ha visto, durante la prima fase (Run 2*a*), registrare un valore medio di 14 ± 2 gCOD/L; questa fase è stata caratterizzata da un andamento discontinuo, caratterizzato da un picco massimo il giorno 13 con un valore di 16,8 gCOD/L, seguito da un trend in leggera flessione fino alla seconda fase, dovuto probabilmente ad una variabilità intrinseca del sistema piuttosto che ad una perdita dell'attività fermentativa. Il cambio di pretrattamento della matrice ha comportato un decremento del valore medio fino a 13 ± 3 gCOD/L, e ha visto un andamento generale negativo dei valori fino a 10,2 gCO₂/L, registrando un picco massimo il giorno 50 di

17,9 g COD/L. Sembra tuttavia evidente la necessità di dover operare con un controllo di pH in questa condizione operativa (Run 2b) per poter permettere un'attività fermentativa stabile e duratura. Resta sempre una valida opzione quella di poter modificare la composizione del feedstock di partenza, favorendo substrati più ricchi in alcalinità, specialmente in processi termofili, dove l'attività fermentativa è largamente incentivata e spesso le sue elevate cinetiche non sono compatibili con i naturali sistemi di tamponamento del pH.

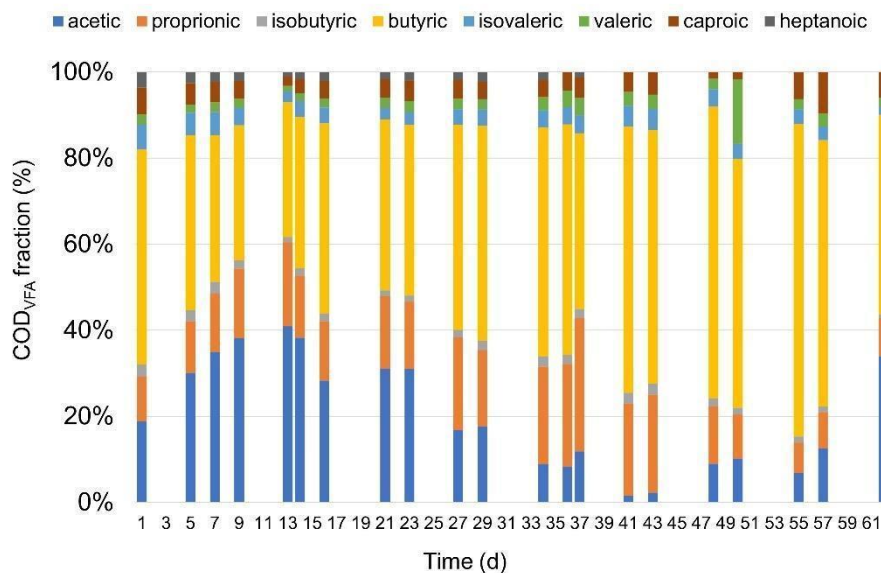


Figura 15 Andamento del profilo dei VFA durante la Run 2.

Con HRT 5, la produzione media di VFA_{tot} durante la Run 2a è stata di 9,6 g/L (figura 15). Il maggior contributo medio deriva dagli acidi acetico (26%), propionico (18%) e butirrico (43%). Le percentuali di questi acidi sono risultate meno stabili durante questa prima fase dove si è assistito ad un incremento dell'acetico e del butirrico a discapito del propionico, mentre gli altri VFA hanno contribuito in modo meno significativo (2-4%) rispetto i VFA_{tot} . Dal giorno 14 fino al termine della Run 2a si è assistito ad un incremento della produzione di acido propionico (24%) e butirrico (53%), insieme ad acidi minori, solo l'acido acetico ha visto un decremento considerevole, fino all' 8% sul totale. Durante la Run 2b invece, si è osservato un decremento della produzione di VFA_{tot} , con un valore pari a 7,6 g/L osservando una redistribuzione delle frazioni degli acidi, con un decremento di acetico (11%) e propionico (15%) mentre il butirrico ricopre un'importante porzione (59%). La mancanza del pretrattamento alcalino sembra non aver inficiato drasticamente la produzione di VFA, rispetto alle Run 1a e 1b, ma è possibile osservare

una variazione della composizione degli acidi prodotti, indicando possibili modificazioni a livello della comunità fermentante. In conclusione i risultati espressi come andamento medio dei parametri sono riportati in tabella 10.

Tabella 10 Valori medi per le Run 2a e Run 2b.

Parametro	Unità di misura	Run 2a		Run 2b	
		Media	Dev. Std.	Media	Dev. Std.
OLR	KgO ₂ /L*d	4,17	0,1	4,42	0,6
sCOD	gO ₂ /L	18	2	18	4
VFA_{tot}	gCOD/L	14,4	1,6	12,7	2,7
VFA_{tot}	g/L	9,6	1,6	7,6	1,5
VFA/COD	g/g	0,79	0,11	0,72	0,2
Yield	gCOD _{VFA} /gVS	0,51	0,1	0,41	0,1
Rate	mgCOD _{VFA} /gVS*d	102	18	81	16

4.2.3 Run 3

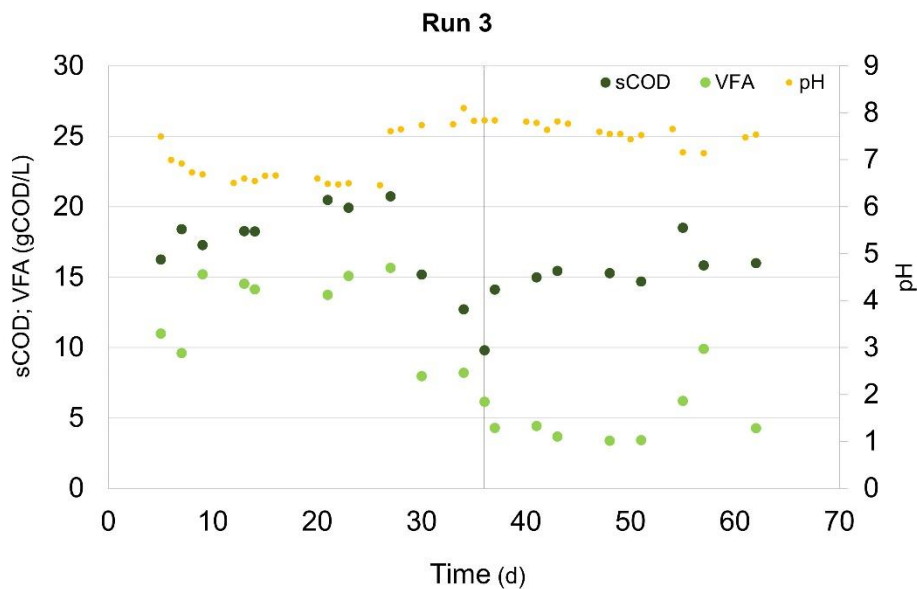


Figura 16 Andamento dei valori di sCOD, VFA e pH durante la Run 3.

Il terzo test fermentativo è stato effettuato applicando un tempo di residenza più elevato, e pari a 6 giorni (Figura 16). Durante la prima fase con pretrattamento combinato (Run 3a), il valore medio per il parametro sCOD è stato di 17 ± 4 gO₂/L, mostrando un andamento crescente fino a 20,8 gO₂/L il giorno 27, per poi diminuire a 9,8 gO₂/L in concomitanza del cambio di pretrattamento. Durante la seconda fase (Run 3b), il valore medio è stato di 16 ± 1 gO₂/L con un andamento pressoché costante intorno alla media, con un picco massimo il giorno 55 di 18,5 gO₂/L.

Durante il pretrattamento combinato (Run 3a), il pH è stato caratterizzato da andamento costante, con leggere oscillazioni tra una settimana e l'altra, e terminando la prima fase con un valore di 7,8, andamento del tutto prevedibile visto l'utilizzo di un feedstock basificato. A variazione del pretrattamento (Run 3b), non si sono osservati rilevanti cambiamenti di trend rispetto alla prima fase e questo è un elemento di novità rispetto alle due Run precedentemente discusse. La Run 3b ha esibito quindi valori di pH stabili, con valore medio pari a $7,58 \pm 0,21$. È evidente come la scelta di un HRT maggiore (6 giorni) abbia favorito la stabilità di un sistema come questo, caratterizzato dalla fermentazione termofila (e quindi cineticamente veloce) di una matrice miste caratterizzata da limitata alcalinità (in quanto composta fino al 60-70% v/v da FORSU e scarto verde, matrici evidentemente povere di un'ideale capacità tampone).

Se da un lato è stato osservato un andamento di pH stabile, però, dall'altro non si è notata una

produzione di VFA sufficiente ed in linea con la Run 3a precedente. Infatti, in relazione all'andamento dei VFA, durante la prima fase (Run 3a), il valore medio è stato di 12 ± 4 gCOD/L, con un andamento costante intorno al valore 14,7 gCOD/L dei primi giorni, interrompendosi poi, bruscamente, il giorno 30 con valori di 8 gCOD/L. Durante la seconda fase, il valore medio è stato di 5 ± 2 gCOD/L, con un andamento parabolico ascendente fino a 9,9 gCOD/L, per poi terminare con un crollo e, portando il valore finale a 4,3 gCOD/L.

Una possibile spiegazione può risiedere nel fatto che un valore di HRT pari a 6.0 giorni non sia compatibile con una comunità acidogenica termofila, e che quindi i benefits sul controllo del pH non sono pertanto sufficienti a sostenere un processo di acidificazione soddisfacente. Il rischio di operare con HRT elevati nel corso di processi fermentativi è quello di poter favorire colture che sono caratterizzate da altri percorsi metabolici, che non portano necessariamente a VFA. Questo è un aspetto che potrà essere indagato in future sperimentazioni. Possiamo tuttavia affermare, che un valore di HRT pari a 6,0 giorni sia ancora troppo basso per poter permettere la proliferazione di colture metanigene, anche alla luce del carico organico (OLR) relativamente alto applicato.

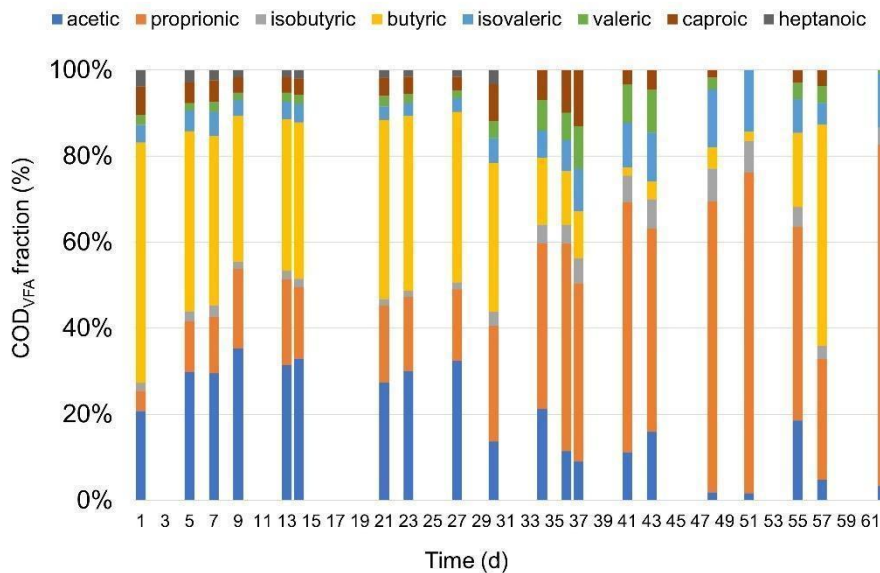


Figura 17 Andamento del profilo dei VFA durante la Run 3.

Il profilo della distribuzione dei VFA (Figura 17) relativa al test fermentativo con HRT di 6 giorni mostra delle analogie con le distribuzioni osservate in precedenza. Il valore medio totale dei VFA_{tot} durante la Run 3a è stato di 8,3 g/L, simile a quanto visto per la Run 1a; la distribuzione degli acidi vede la predominanza di acetico (26%), propionico (24%) e butirrico

(32%), in relazione agli altri acidi si osserva una presenza più marcata di isovalerico (4.5%) e caproico (5.3%). Nell'intervallo di tempo interessato dalla Run 3a si può osservare un andamento più stabile delle frazioni degli acidi, determinato sia dal tempo di residenza sufficientemente elevato che dal pretrattamento impiegato in questa fase. Nonostante le frazioni mantengono un andamento costante, la quantità di acidi che vengono prodotti subisce un crollo rilevante soprattutto per gli acidi acetico e butirrico, mentre il propionico costituisce il 48% del totale al termine della Run 3a. Durante la Run 3b si osserva un crollo dei VFA_{tot} medi prodotti, pari a 3,1 g/L. Durante questa fase le frazioni di VFA presentano delle fluttuazioni irregolari, ma che testimoniano la scomparsa di molte specie acide come acetico (8%) e butirrico (12%). Nonostante il decremento della produzione di VFA, per gli acidi propionico (55%), isobutirrico (5.7%), isovalerico (11%) e valerico (5%) si è osservato un aumento delle loro frazioni rispetto il totale.

L'andamento medio dei valori viene riportato in tabella 11.

Tabella 11 Valori medi per le Run 3a e Run 3b.

Parametro	Unità di misura	Run 3a		Run 3b	
		Media	Dev. Std.	Media	Dev. Std.
OLR	KgO ₂ /L*d	3,5	0,1	4,3	0,5
sCOD	gO ₂ /L	17	3,7	16	1
VFA_{tot}	gCOD/L	12,3	3,7	5	2,2
VFA_{tot}	g/L	8,3	2,7	3,1	1,3
VFA/COD	g/g	0,71	0,11	0,32	0,13
Yield	gCOD _{VFA} /gVS	0,45	0,1	0,17	0,1
Rate	mgCOD _{VFA} /gVS*d	74	24,5	28	12

4.3 Parametri di processo a confronto

Durante la Run 1, l'andamento del COD solubile viene descritto da una serie di valori ascendenti e discendenti durante tutta la durata del test, inoltre, il cambio di matrice (1*b*) sembra non influenzare particolarmente questo parametro, presumibilmente più legato al pretrattamento imposto. Considerando la Run 2, si osserva invece un trend tendenzialmente più conservativo (quindi migliore dal punto di vista della stabilità del processo), con la registrazione di due picchi di massimo e uno di minimo in corrispondenza del passaggio di condizione operativa tra 2*a* e 2*b*. La Run 3*a*, analogamente a quanto visto negli altri test, mostra un andamento costante del COD solubile, ma che dopo il giorno 27 mostra una brusca diminuzione (probabilmente dovuta ad una variazione delle caratteristiche della matrice). Nella Run 3*b* invece, ristabilito il parametro di sCOD, mantiene un andamento costante fino al termine del test, con un picco osservato il giorno 55 di 18,5 g. Dal punto di vista del pH, si possono evincere similitudini tra Run 1 e Run 2; durante la prima fase, il primo test ha visto un andamento costante, d'altra parte, il secondo test, ha visto, invece, un leggero andamento altalenante dei valori. In maniera differente, con il cambio di pretrattamento, è stato possibile osservare, per entrambi i test, un crollo di questo parametro, portando tale valore da 8,17 a 4,35 per il primo e da 7,73 a 4,65 per il secondo. Per quanto riguarda l'andamento del pH della Run 3, impiegando il pretrattamento combinato si è osservato un andamento molto simile a quanto visto per la Run 2, concludendo il test in assenza di impreviste variazioni, contrariamente a quanto osservato negli altri due. Questo aspetto può essere interpretato come indice di maggiore stabilità in queste condizioni. Considerando all'andamento dei rispettivi VFA prodotti nell'esecuzione dei tre test fermentativi, è stato possibile constatare un andamento discontinuo della produzione; inoltre, nel corso della prima fase di ogni test, si è verificato che, all'aumentare del tempo di residenza è corrisposta una diminuzione della variabilità di questo parametro, da considerare come fattore positivo in ottica di implementazione del processo in larga scala. Ponendo attenzione alla seconda fase, invece, ognuno dei tre test ha presentato delle peculiarità nonostante l'andamento totale risulti in un trend negativo; osservando la Run 1, il crollo dei VFA è associabile alla diminuzione di pH, risultando in un trend discendente su vari livelli. Considerando invece la Run 2, nei primi giorni della seconda fase, è stato persistente la tendenza osservata durante la prima; si è osservato un incremento della produzione di VFA dal giorno 48 al giorno 55 al quale è seguita poi un'ultima fase discendente.

In conclusione, la Run 3, si è rivelato dal punto di vista dell'andamento dei VFA, il più singolare: nel corso della seconda fase, infatti l'andamento del pH è risultato stabile e costante, facendo presupporre una possibile stabilità maggiore dell'andamento dei VFA prodotti e, più in generale, del processo stesso, per poi essere smentito; è stato osservato, infatti, un crollo drastico della produzione, con valori limite raggiunti simili a quelli registrati durante la Run 1.

Le figure 18, 19 e 20 mostrano rispettivamente i rendimenti di processo, la velocità specifica di produzione dei VFA ed infine la concentrazione totale di VFA nelle varie condizioni operative dei test di fermentazione.

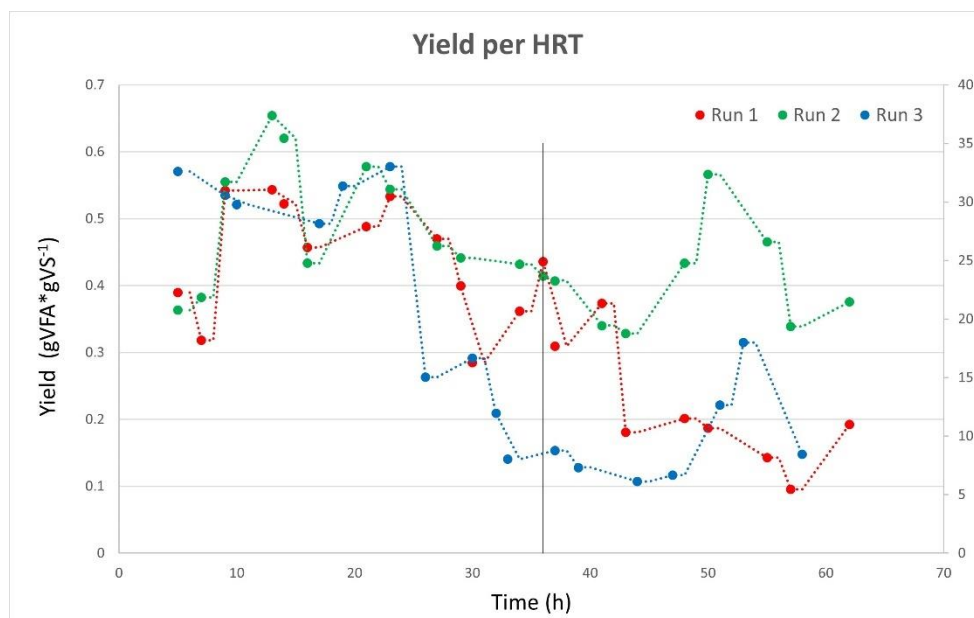


Figura 18 Rendimenti di reazione nelle diverse condizioni di esercizio.

In figura 18, rendimenti osservati nella Run 1a riportano un valore medio di $0,47 \pm 0,08$ gCOD_{VFA}/gVS. Durante questa fase, si osserva un primo incremento e stazionamento del rendimento, interrotto ancor prima del cambio matrice, osservando un progressivo decremento dei valori, raggiungendo il picco inferiore di questo intervallo pari a $0,29$ gCOD_{VFA}/gVS. Nonostante questo andamento, prima del cambio di alimentazione si può osservare un recupero del valore del rendimento, terminando questa prima fase con un valore di $0,44$ gCOD_{VFA}/gVS. Nonostante questo, il cambio di alimentazione sembra non aver avuto alcuna influenza sul miglioramento delle rese caratterizzanti la Run 1b. In questa fase, con un valor medio di $0,25 \pm 0,1$ gCOD_{VFA}/gVS, si osserva un costante decremento delle rese fino al termine del test. Confrontando la resa (Figura 18) con il pH (Figura 12) si può osservare l'influenza di quest'ultimo sul rendimento e di come la sua variazione si ripercuota sulle rese di reazione

(considerando che il carico organico è rimasto costante durante il test).

Per quanto riguarda il rendimento della Run 2a, questa registra un valor medio di $0,51 \pm 0,09$ gCOD_{VFA}/gVS. In questo intervallo, nei giorni 13 e 21, si osservano due valori massimi pari a $0,65$ gCOD_{VFA}/gVS e $0,58$ gCOD_{VFA}/gVS per poi diminuire progressivamente fino a $0,41$ gCOD_{VFA}/gVS prima del cambio di alimentazione. La Run 2b, con un valore medio di $0,41 \pm 0,1$ gCOD_{VFA}/gVS, mostra, al contrario della prima, un progressivo incremento fino al giorno 50 un rendimento pari a $0,57$ gCOD_{VFA}/gVS per poi subire un decremento fino a $0,38$ gCOD_{VFA}/gVS. Dal confronto con gli andamenti di sCOD e pH della figura 14, si osserva una correlazione tra questi due parametri e il rendimento. Nonostante, quindi, l'irregolarità riscontrata durante la Run 2, il test presenta una produzione di VFA tendenzialmente costante, rispetto alle fluttuazioni dei parametri di processo.

La Run 3a, con un valore medio di $0,45 \pm 0,1$ gCOD_{VFA}/gVS, mostra una tendenza più costante del rendimento di processo nell'intervallo di tempo tra il giorno 9 e 27, per poi procedere con una netta diminuzione in prossimità della Run 3b. Il cambio di alimentazione non ha migliorato la resa di processo, riportando un valore medio di $0,17 \pm 0,1$ gCOD_{VFA}/gVS durante la seconda fase della Run 3. Si osserva un andamento tendenzialmente negativo, terminando il test con un valore di resa pari a $0,15$ gCOD_{VFA}/gVS. Dal confronto con la figura 16, si osserva come dopo una prima condizione di stabilità, l'andamento della resa durante l'intera Run 3 è tendenzialmente negativo, nonostante i termini di pH e sCOD siano costanti durante questo test.

Confrontando i rendimenti di processo (Figura 18) si può osservare per le Run 1a e 3a un andamento molto simile nella prima fase del processo nonostante siano le due condizioni operative più dissimili (Run 1 e Run 3) con un valor medio di $0,44$ gCOD_{VFA}/gVS per il primo test e $0,40$ gCOD_{VFA}/gVS per la Run 3a. La Run 2a, con un valor medio di $0,48$ gCOD_{VFA}/gVS, si distingue in un primo momento dalle altre seguendo un andamento oscillatorio, un'osservazione simile si riscontra in concomitanza del crollo del rendimento, dove le Run 1a e 3a diminuiscono drasticamente mentre la Run 2a risulta la più resiliente.

Il cambio di alimentazione non ha contribuito positivamente al rendimento portando il valor medio dei test a $0,25$ gCOD_{VFA}/gVS per la Run 1b e $0,18$ gCOD_{VFA}/gVS per la Run 3b, che hanno quindi continuato a diminuire anche nella seconda fase del test. La Run 2b, con un valor medio di $0,41$ gCOD_{VFA}/gVS, invece mostra un aumento del rendimento e ad un recupero parziale delle condizioni osservate nella prima fase del test, nonostante in conclusione del test presenti valori inferiori.

Considerando i rendimenti delle Run si può osservare come la diminuzione delle rese avvenga prima del cambio di alimentazione e che per le Run 1 e Run 2 i valori di sCOD e pH seguono due

andamenti simili nonostante la Run 1 sia più simile, come rendimenti, alla Run 3 dove però i valori di sCOD e pH seguono un andamento diverso. Al contrario, dopo il cambio di alimentazione, si osserva un completo distacco tra i tre rendimenti, complice l'andamento proprio per ogni Run dei parametri di sCOD e pH.

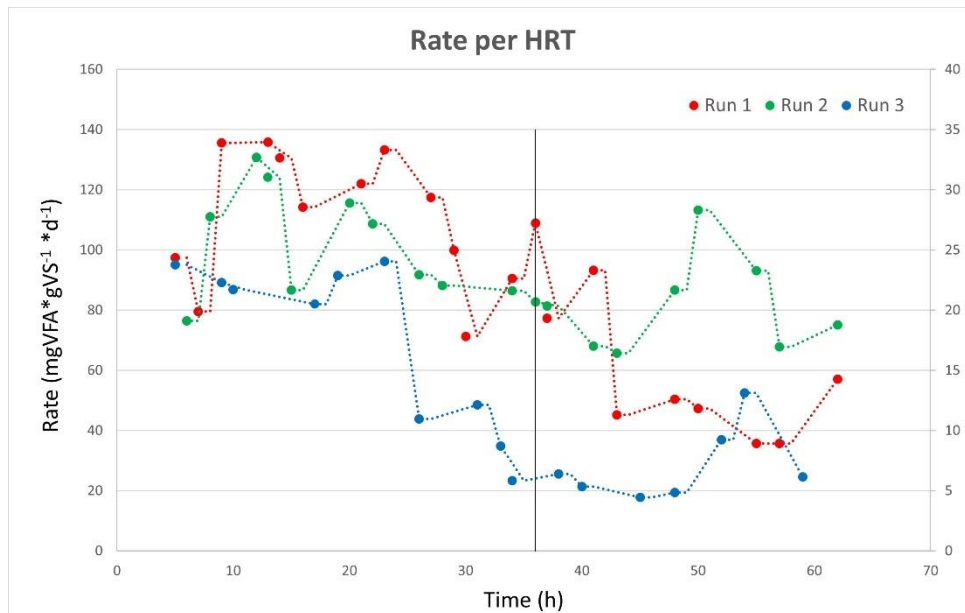


Figura 19 Tassi di produzione di VFA nelle diverse condizioni di esercizio.

Osservando l'andamento della velocità specifica di produzione degli acidi (Figura 19) si riscontra una distinzione più marcata tra i test. La Run 1a, con un valore medio di 118 mgCOD_{VFA}/(gVS d), è caratterizzata da valori di tasso di produzione maggiore rispetto alle altre. Seconda, con un valore medio di 96,7 mgCOD_{VFA}/(gVS d) la Run 2a, caratterizzata da un andamento simile alla Run 1a. Infine la Run 3a, con un andamento costante durante la prima fase, risulta, con valore medio di 58,5 mgCOD_{VFA}/(gVS d), il test con il minor tasso di produzione.

Dal giorno 26 si assiste ad una drastica diminuzione del tasso di produzione di acidi per tutti i test fermentativi, influenzando soprattutto le Run 1a e 3a.

Il cambio di alimentazione ha visto un effetto positivo sulla Run 2b, permettendo di riportare i valori nei range visti nella prima parte del test. Per quanto riguarda le Run 1b e 3b invece, si è assistito ad una diminuzione marcata del tasso di produzione, terminando con valori simili.

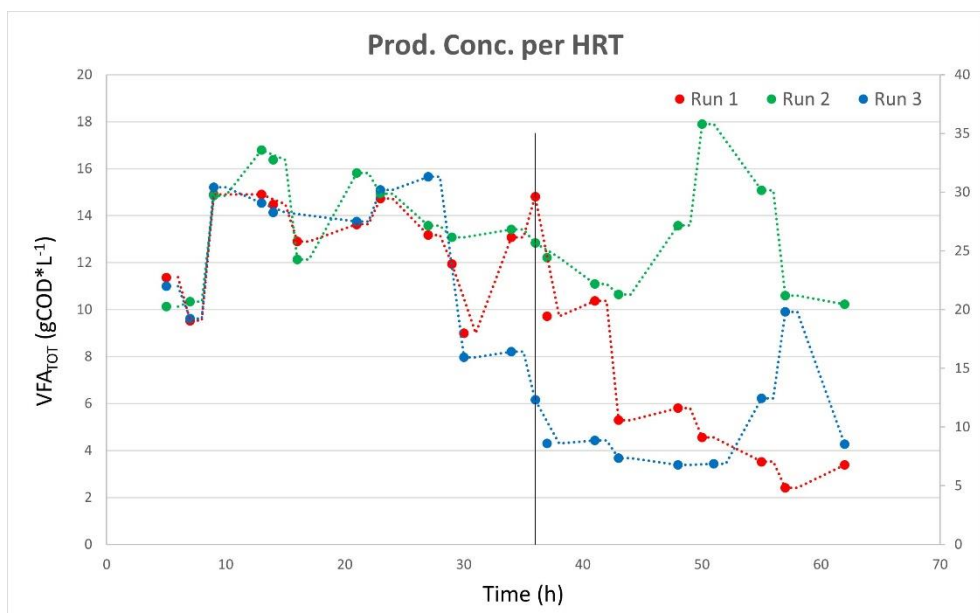


Figura 20 Andamento della concentrazione di VFAtot prodotti nei diversi test.

La figura 20 mostra la produzione totale di acidi nelle tre condizioni operative. Dal punto di vista dei valori registrati, le Run 1a e 3a mostrano un andamento molto simile, come nel caso del rendimento di processo, durante la prima fase con valori medi di 12,5 g_{COD}/L per entrambe le Run, anche se la Run 3a non è in grado di attenuare il drastico decremento in concomitanza del giorno 30. La Run 2a invece, con una media di 13,3 g_{COD}/L mantiene il suo andamento caratteristico con due picchi massimi tra i giorni 10 e 20 per poi mantenere il valore di VFAtot costante.

Come visto per gli altri andamenti (Figure 18 e 19) anche in questo caso il cambio di alimentazione ha determinato per le Run 1b e 3b un progressivo decremento del loro andamento, comportando una diminuzione del valore medio a 7,3 g_{COD}/L per la Run 1b e 5,3 g_{COD}/L per la Run 3b, mentre per la Run 2b, con una media di 12,7 g_{COD}/L si può osservare un picco di concentrazione di VFAtot in corrispondenza del giorno 50 per poi diminuire nuovamente nei giorni seguenti fino al termine del test.

4.4 Struttura della comunità microbica

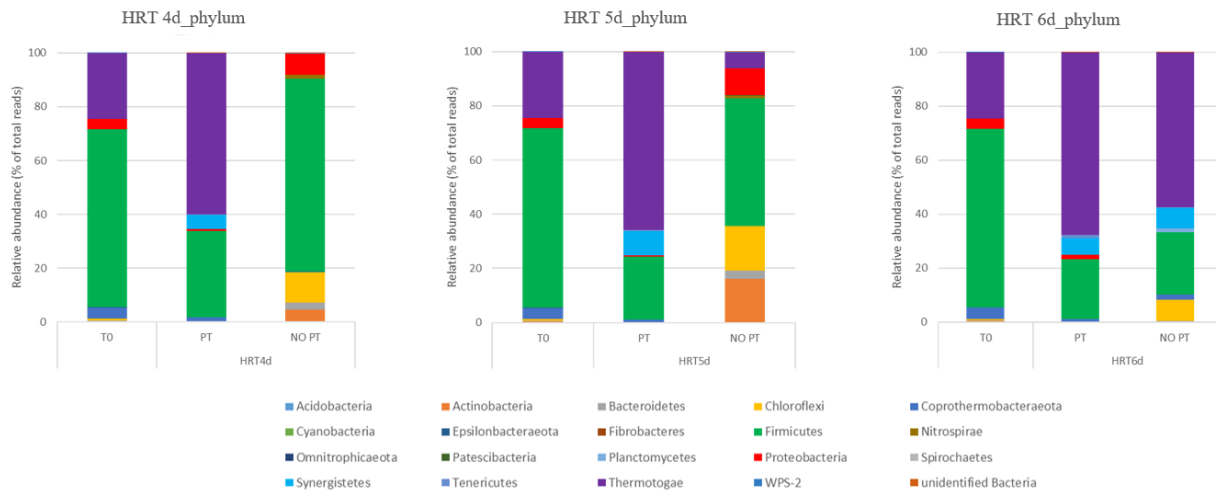


Figura 21 Distribuzione delle specie in relazione alle condizioni operative e al tipo di pretrattamento applicato.

Dal punto di vista della distribuzione delle specie (Figura 21), si può osservare nelle prime due condizioni (HRT 4 e HRT 5) come al variare del pretrattamento segue una variazione sostanziale delle comunità microbiche, indicando quindi una possibile dipendenza maggiore nei confronti della matrice piuttosto che dal parametro HRT. A differenza delle prime due, per la condizione ad HRT 6 d, si osserva come il cambio di alimentazione non sia risultato impattante a livello di abbondanze e speciazione, ipotizzabile per questa condizione una maggiore dipendenza nei confronti del tempo di residenza piuttosto che nel tipo di matrice alimentante il fattore selettivo dei microrganismi.

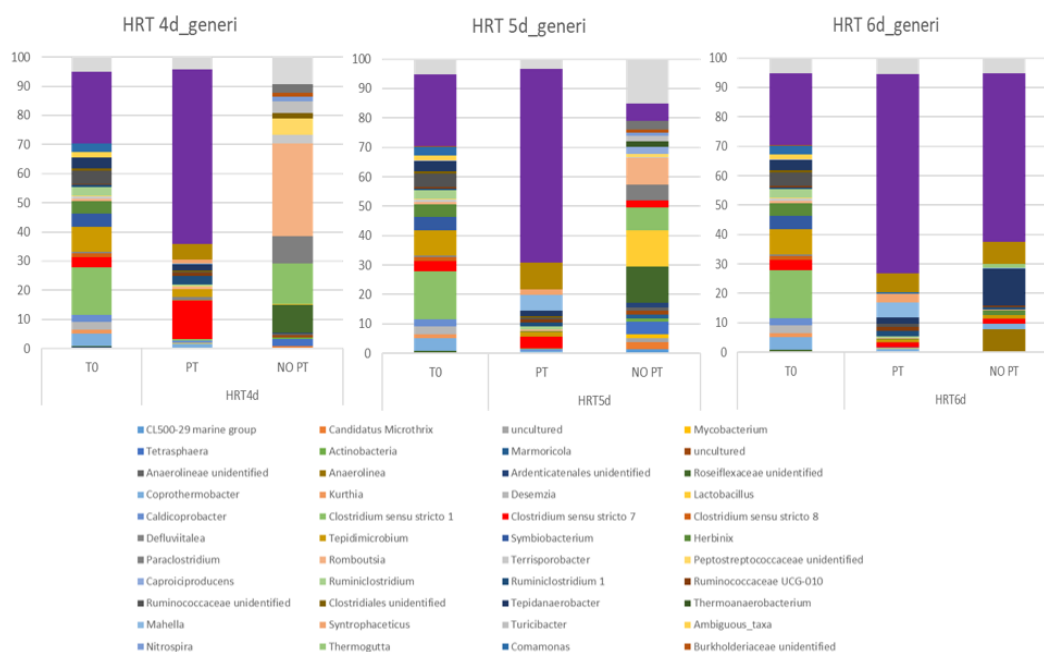


Figura 22 Distribuzione dei generi caratterizzanti il fermentato nelle diverse condizioni operative.

Dal punto di vista dei generi (Figura 22), si può osservare un cambiamento totale per l'HRT 4 dove il passaggio tra pretrattamento combinato a solo termico ha modificato completamente la distribuzione delle specie, testimoniato dalla perdita dei *Clostridium sensu stricto*, indicatori di buone condizioni fermentative. Al contrario, per l'HRT 6 non si osserva alcuna variazione tra le due alimentazioni, a testimonianza del fatto che per questa condizione è il tempo di residenza a governare la distribuzione delle specie. La distribuzione dei generi più frammentata la si può osservare nella condizione caratterizzata da HRT 5 d. La presenza di generi associati alla produzione di VFA è in questo caso accompagnata da una elevata diversità dei microorganismi selezionati. Tale situazione potrebbe essere vista anche come un fattore positivo che può ripercuotersi sulle performance di processo. Una elevata diversità e frammentazione può infatti essere un fattore di maggior robustezza e stabilità di processo in quanto la copresenza di diversi microorganismi, in processi basati su colture miste, può assicurare una produzione stabile e costante di prodotti.

Nel complesso, per quanto riguarda l'alimentazione con pretrattamento combinato, si può osservare una maggiore abbondanza *Defluviitalea* (65%), seguita da *Clostridium sensu stricto 7*, coinvolti nella produzione di etanolo, acetato, butirato, idrogeno e anidride carbonica. Il pretrattamento solo termico vede una maggiore abbondanza di *Clostridium sensu stricto 1*, *Paraclostridium*, *Romboutsia*, tutti riconducibili ad attività fermentante.

Dai risultati osservati e dal confronto con la produzione di VFA, è possibile ipotizzare che l'impiego dello scarto verde, substrato troppo resistente ad una fermentazione di questo tipo e che richiede tecnologie di pretrattamento più sofisticate, tali da rendere la frazione organica più recalcitrante (presumibilmente quella ligno-cellulosica residua) maggiormente suscettibile all'azione microbica fermentativa.

5 Conclusioni

Il presente elaborato ha avuto l'obiettivo di valutare l'influenza del tempo di ritenzione idraulico (HRT) e dell'impiego di pretrattamenti differenti su diverse matrici organiche innovabili, impiegate come alimentazione, nel processo di fermentazione acidogenica, avente come fine ultimo la produzione di acidi grassi volati (VFA). Nel contesto di valorizzare flussi organici convenzionalmente riconosciuti come rifiuto, proveniente dagli impianti di depurazione acque civili, dalla raccolta differenziata a livello urbano (frazione organica) e della raccolta di scarti provenienti dalla manutenzione aree verdi urbane, la produzione di VFA tramite fermentazione acidogenica è una delle possibili strade che permette una realistica valorizzazione di tali matrici, da considerare non più come rifiuto ma come una preziosa risorsa.

Le condizioni operative applicate in processi in continuo tramite bio-reattori CSTR sono state confrontate tra loro sulla base di: rendimento di processo, velocità specifica di produzione degli acidi e concentrazione totale di VFA, oltre che sulla speciazione delle comunità microbiche selezionate. Valutando il processo nella condizione *a* (pretrattamento combinato), la differenza di HRT sembra non comportare notevoli differenze tra le condizioni operative dal punto di vista del rendimento (*1a*: $0,5 \pm 0,1$ gCOD_{VFA}/gVS, *2b*: $0,51 \pm 0,1$ gCOD_{VFA}/gVS e *3a*: $0,45 \pm 0,1$ gCOD_{VFA}/gVS) e della produzione totale di acidi (*1a*: 12,5 gCOD/L, *2b*: 13,3 gCOD/L e *3a*: 12,5 gCOD/L), mentre in relazione alla velocità specifica di produzione, quest'ultima diminuisce all'aumentare dell'HRT (*1a*: 118 ± 21 mgCOD_{VFA}/(gVS d), *2b*: 102 ± 18 mgCOD_{VFA}/(gVS d) e *3a*: $74 \pm 24,5$ mgCOD_{VFA}/(gVS d)). Nelle condizioni *b* (esclusivo pretrattamento termico) si assiste ad una graduale perdita di controllo sui sistemi fermentativi 1 e 3, con conseguente diminuzione del rendimento (*1b*: $0,25 \pm 0,1$ gCOD_{VFA}/gVS e *3b*: $0,17 \pm 0,1$ gCOD_{VFA}/gVS), velocità specifica di produzione (*1b*: 64 ± 26 gCOD_{VFA}/gVS e *3b*: 28 ± 12 gCOD_{VFA}/gVS) e produzione totale (*1b*: $7,3$ gCOD/L \pm e *3b*: $5,3 \pm$ gCOD/L). Al contrario, la Run *2b* è riuscita a contrastare la variazione apportata dal cambio di substrato, riuscendo in parte a contrastare il declino della fermentazione con un valori medi di rendimento ($0,41 \pm 0,1$ gCOD_{VFA}/gVS), velocità specifica (81 ± 16 mgCOD_{VFA}/(gVS d) e produzione totale ($12,7$ gCOD/L) maggiori rispetto agli altri test fermentativi. Il pretrattamento combinato quindi rende disponibile un substrato più stabile rispetto ad un pretrattamento esclusivamente termico, soprattutto applicando un tempo di residenza (HRT) pari a 5 giorni, dove si osserva una maggiore stabilità del processo nell'ottica di alimentazione con substrato soggetto a pretrattamenti differenti unito ad un tempo di residenza idraulico sufficiente che permette lo sviluppo di una comunità microbica fermentante e buone capacità produttive rispetto i VFA.

Infine, in relazione alle migliori condizioni operative osservate (HRT a 5 d) e quindi la scelta di determinati parametri di progettazione, si è osservata una conseguente selezione diversità microbica, in grado di sopravvivere e crescere all'interno del sistema fermentativo in questione. L'analisi della comunità microbica ha visto, dal punto di vista dei phylum, i *Firmicutes*, *Thermotogae* e *Synergistetes* dominanti nella prima fase (Run 5a), ai quali sono associati processi fermentativi. Il solo pretrattamento termico invece, durante la Run 5b ha imposto delle condizioni di crescita più permissive, soprattutto per quei phylum che, presenti nel substrato alimentante, non hanno trovato nel pretrattamento combinato (a) la possibilità di crescita; tra questi si riportano *Chloroflexi*, *Actinobacteria* e *Proteobacteria*. In conclusione, la condizione ad HRT di 5 giorni, ha evidenziato una dipendenza della diversità microbica in relazione al tipo di pretrattamento applicato al substrato alimentante, la produzione di VFA associata infatti mostra come condizioni selettive delle comunità microbiche risultino in un andamento più stabile rispetto a quanto può essere osservato con un solo pretrattamento termico.

6 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.
- 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.
- Battista F., Barampouti E.M., Mai S., Bolzonella D., Malamis D., Moustakas K., Loizidou M., *Added-value molecules recovery and biofuels production from spent coffee grounds*, Renew. Sustain. Energy Rev. 131 (2020), 110007, <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2020.110007>
- 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.
- Battista F., Frison N., Pavan P., Cavinato C., Gottardo M., Fatone F., Eusebi A.L., Majone M., Zeppilli M., Valentino F., Fino D., Tommasi T., Bolzonella D., *Food wastes and sewage sludge as feedstock for an urban biorefinery producing biofuels and added-value bioproducts*, J. Chem. Technol. Biotechnol. 95 (2020) 328–338, <https://doi.org/10.1002/JCTB.6096>.
- 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.
- Cheah Y.K. Vidal-Antich C. Dosta J. Mata-Álvarez J., *Advances & prospect in the field of waste management*, 2018, Environmental Science and Pollution Research, 1-14.
- 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.
- 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.
- EEA, *The European environment-state and outlook 2020.*, 2019. <https://doi.org/10.15196/TS600305>.
- European Commission, 2019., https://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:b828d165-1c22-11ea-8c1f-01aa75ed71a1.0002.02/DOC_1&format=PD. (Accessed 7 February 2022).
- 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 Energy.* 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.
- Food Waste Definition, (n.d.). <https://www.eu-fusions.org/index.php/about-food-waste/280-food-waste-definition>. (Accessed 7 February 2022).
- 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.
- Giduthuri, A.T.; Ahring, B.K. *Current Status and Prospects of Valorizing Organic Waste via Arrested Anaerobic Digestion: Production and Separation of Volatile; Fatty Acids*. Fermentation 2023, 9, 13. <https://doi.org/10.3390/fermentation9010013>.
- 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.
- Horizon2020 Smart Plant project, (n.d.). <https://www.smart-plant.eu/>. (Accessed 27 June 27 2022).
- Jankowska E., Duber A., Chwialkowska J., Stodolny M., Oleskiewicz-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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
 - Nghiem L.D., Koch K., Bolzonella D., Drewes J.E., *Full scale co-digestion of wastewater sludge and food waste: bottlenecks and possibilities*, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 72 (2017) 354–362, <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2017.01.062>.
 - 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.
 - Moretto, G., Valentino, F., Pavan, P., Majone, M. & Bolzonella, D. (2019). Optimization of urban waste fermentation for volatile fatty acids production. *Waste Management* 92:21–29. doi: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.05.010>
 - 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.
- Satyanarayana T. Johri B.N. *Microbial Diversity: Current perspective and potential application*, 2005 1st ed. New Delhi: IK International Pvt. Ltd. p. 166.
- 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.
- Strazzera G., Battista F., Tonanzi B., Rossetti S., Bolzonella D., *Optimization of short chain volatile fatty acids production from household food waste for biorefinery applications*, Environ. Technol. Innov. 23 (2021), [https://doi.org/ 10.1016/J.ETI.2021.101562](https://doi.org/10.1016/J.ETI.2021.101562).
- Strazzera G., Battista F., Andreolli M., Menini M., Bolzonella D., Lampis S., *Influence of different household food wastes fractions on volatile fatty acids production by anaerobic fermentation*, Bioresour. Technol. 335 (2021), 125289, <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2021.125289>.

- 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.
- Valentino, F., Moretto, G., Gottardo, M., Pavan, P., Bolzonella, D., & Majone, M. (2019a). *Novel routes for urban bio-waste management: A combined acidic fermentation and anaerobic digestion process for platform chemicals and biogas production*. *Journal of Cleaner Production*. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.02.102>.
- Valentino, F., Moretto, G., Lorini, L., Bolzonella, D., Pavan, P., & Majone, M. (2019b). *Pilot-scale polyhydroxyalkanoate production from combined treatment of organic fraction of municipal solid waste and sewage sludge*. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 58(27), 12149-12158.
- Varghese Vijay K., Bhagyashri J. Poddara,b, Maulin P. Shahc, Hemant J. Purohit a, Anshuman A. Khardenavis, *A comprehensive review on current status and future perspectives of microbial volatile fatty acids production as platform chemicals*, *Science of The Total Environment*, Volume 815, 2022, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152500>.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

Ringraziamenti

Vorrei sentitamente ringraziare il Ch.mo Prof. Francesco Valentino per avermi dato la possibilità di realizzare questo studio, per il supporto e la sempre attenta presenza; ringrazio inoltre il Ch.mo Prof. Paolo Pavan che, con il proprio lavoro continua a rappresentare per noi studenti un'innegabile fonte di ispirazione.

Per ultima, ma non per importanza, vorrei ringraziare Claudia, la mia compagna in questo percorso e di vita: tu, sai già tutto.