

POLITECNICO DI MILANO

SCUOLA DI INGEGNERIA CIVILE, AMBIENTALE E TERRITORIALE

Corso di laurea in Ingegneria per l'Ambiente e il Territorio



POLITECNICO
MILANO 1863

Produzione integrata di VFA nei processi di
trattamento delle acque reflue:

Prove di fermentazione acidogenica di fanghi e
biomassa microalgale.

Relatore: Prof.ssa Elena Ficara

Tesi di Laurea Magistrale di:

Damaride Argenio

Matricola 883734

ANNO ACCADEMICO 2018-2019

ABSTRACT

This research is aimed at assessing the feasibility of using mixed sludge together with microalgae biomass for short chain fatty acids (VFA) production. Batch and continuous anaerobic tests were conducted to evaluate the performance of two different mixed sludges without pH control. Batch and continuous mesophilic fermentation tests revealed how the substrate with higher primary sludges fraction returned the higher degree of acidification. Production efficiency was equal to $0,47 \text{g}_{\text{COD-VFA}}/\text{g}_{\text{VS,in}}$ for batch tests and $0,18 \pm 0,4 \text{g}_{\text{COD-VFA}}/\text{g}_{\text{VS,in}}$ for the continuous mode, with operating conditions as follows: HRT of 2 days, pH not controlled and a temperature of $37 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. A mean VFA concentration of $5 \pm 0,32 \text{ g}_{\text{VFA-COD}}/\text{L}$ was achieved in the continuous tests. The VFA rich effluent was then used as carbon source for the removal of nitrate-nitrogen in a manometric denitrification tests resulting in a mean specific denitrification rate of $2,32 \pm 0,30 \text{ mgN-NO}_3/\text{gSSV}\cdot\text{h}$.

Focusing on the sludge and microalgae co-fermentation, batch tests and continuous tests were conducted at different percentage of organic content. No negative neither positive synergies were detected, but the co-fermentation represents an interesting way to treat this specific biomass since microalgae from wastewater treatment plant has the potential to be further converted into a valuable product.

SOMMARIO

Il presente studio ha come obiettivo la valutazione di produzione di acidi grassi volatili (VFA) a partire da fango misto e biomassa microalgale. A questo scopo sono state condotte prove di fermentazione in batch ed in continuo per valutare il potenziale di produzione di VFA da due differenti fanghi misti senza controllo del pH. I risultati delle prove hanno evidenziato la migliore resa di acidificazione del fango misto che ha presentato una maggiore percentuale di fanghi primari. L'efficienza di produzione è stata di $0,47 \text{ g}_{\text{COD-VFA}}/\text{g}_{\text{VS,in}}$ per le prove in batch e di $0,18 \pm 0,4 \text{ g}_{\text{COD-VFA}}/\text{g}_{\text{VS,in}}$ per la modalità in continuo. Il reattore di fermentazione in continuo ha operato con un HRT pari a 2 giorni, pH non controllato e una temperatura pari a $37 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. La concentrazione media di VFA nella prova in continuo è stata di $5 \pm 0,32 \text{ g}_{\text{VFA-COD}}/\text{L}$.

Il surnatante ricco di VFA è stato poi utilizzato quale fonte di carbonio per la rimozione di nitrato in prove di denitrificazione in manometria, evidenziando un tasso di denitrificazione di $2,32 \pm 0,30 \text{ mgN-NO}_3/\text{gSSV}\cdot\text{h}$.

Per quanto riguarda la co-fermentazione di substrati carboniosi e microalghe, sono state condotte prove di fermentazione in batch ed in continuo con percentuali alghe-fanghi differenti rispetto al carico organico imposto. I risultati non hanno mostrato effetti sinergici importanti dei due substrati. In ogni caso la co-fermentazione rappresenta un'alternativa attraente per trattare questa biomassa.

INDICE DEI CONTENUTI

1.	Introduzione.....	1
1.1	Obiettivo della tesi	3
2.	Stato dell'arte.....	4
2.1	Gli acidi grassi volatili: principali caratteristiche ed utilizzi	4
2.2	La digestione anaerobica nelle acque di rifiuto ed il processo di fermentazione acidogenica.....	6
2.3	Tipologie di rifiuti ottimali per l'accumulo di acidi grassi volatili.....	8
2.4	Condizioni ottimali per l'estrazione e di acidi grassi volatili.	12
2.4.1	pH	12
2.4.2	Temperatura.....	13
2.4.3	Tempo di ritenzione	13
2.4.4	Carico organico.....	14
2.5	Problematiche legate all'accumulo di acidi grassi volatili.....	15
2.6	Possibili utilizzi di surnatanti arricchiti di acidi grassi volatili.....	16
2.6.1	Bioenergia	16
2.6.2	Bioplastica	18
2.6.3	Rimozione biologica dei nutrienti	21
2.7	Le microalghe nel campo delle acque di rifiuto.	25
2.7.1	Coltivazione di microalghe.	25
2.7.2	Integrazione della biomassa microalgale con processi di digestione anaerobica: la co-fermentazione	29
3.	Materiali e metodi.....	35
3.1	Caratteristiche e origine dei materiali.....	35
3.1.1	Fango misto (primario e biologico)	35
3.1.2	Inoculi batterici anaerobici.....	36
3.1.3	Fanghi attivi.....	36
3.1.4	Biomassa microalgale.....	37
3.2	Attività sperimentale: allestimento e conduzione	38
3.2.1	Prove di Fermentazione in Batch	38
3.2.2	Prove di BMP	41
3.2.3	Prova di Fermentazione in continuo	45
3.2.4	Prove di Denitrificazione in manometria	48
3.2.5	Metodi analitici	52
4.	Risultati e discussione	54
4.1	Prove di fermentazione in batch.....	54

4.1.1	Prova F-1.....	54
4.1.2	Prova F-2.....	56
4.1.3	Discussione risultati prove F-1 F-2	57
4.1.4	Prova F-3.....	60
4.1.5	Discussione risultati prova F-3	63
4.2	Prove di BMP	66
4.2.1	Discussione dei risultati di BMP	68
4.3	Prova di fermentazione in continuo.....	72
4.3.1	Discussione della prova di fermentazione in continuo	79
4.4	Prove di Denitrificazione in manometria	87
4.4.1	Discussione dei risultati prove di denitrificazione in manometria.....	89
5.	Valutazioni a scala di impianto.....	92
6.	Conclusioni e sviluppi futuri	95
	APPENDICE	97
	Bibliografia	100

INDICE DELLE FIGURE

Figura 2.1- Schema semplificato della digestione anaerobica (gerardi, 2003).....	6
Figura 2.2- Generazione di energia elettrica attraverso l'uso di VFA in MFC (Lee et al., 2014). 16	
Figura 2.3-Struttura chimica di un poliidrossialcanoato (pha); n, numero di atomi di carbonio nella struttura lineare del poliestere; r1 e r2, catene laterali idrocarburiche variabili (Reis et al., 2011).	19
Figura 2.4 - Rappresentazione schematica del tipico processo a 3 fasi utilizzato per la produzione di PHA tramite MMC (adattata da Reis et al. 2011). Le linee continue rappresentano flussi liquidi, quelle tratteggiate i flussi di biomassa.....	20
Figura 2.5 - Schema dell'intera filiera tradizionale di coltivazione, separazione, stoccaggio e valorizzazione della biomassa algale (jankowska et al., 2017).	26
Figura 2.6 - Possibile layout impiantistico di un processo integrato di depurazione acque reflue coltivazione algale e produzione di VFA.....	34
Figura 3.1 - Sistema ampts.....	43
Figura 3.2 -Sistema sperimentale utilizzato per le prove di fermentazione in continuo.....	47
Figura 3.3 - Schema del reattore di fermentazione in continuo.....	47
Figura 3.4 - Schema del sistema oxytop.....	49
Figura 4.1 – Composizione in percentuale dei VFA prova F-1.....	54
Figura 4.2 - Andamento del valore di pH prova F-1.....	55
Figura 4.3 - Volumi di Biogas prodotti durante la prova F-1.....	55
Figura 4.4 - Composizione percentuale VFA prova F-2 Fanghi misti Sesto San Giovanni.....	56
Figura 4.5 - Andamento del valore di pH prova F-2.....	56
Figura 4.6 - Volumi di biogas prodotti durante la prova F-2.....	57
Figura 4.7 - Andamento nel tempo del valore di pH.....	60
Figura 4.8 – Composizione percentuale dei VFA prova F-3 giorno 3.....	62
Figura 4.9 - Composizione percentuale dei VFA prova f-3 giorno 7.....	62
Figura 4.10 - Volumi di Biogas netti prodotti durante la prova F-3.....	63
Figura 4.11 - Andamento delle produzioni nette cumulate di biogas registrate durante la prova bmp-1 e curve interpolanti (linee tratteggiate) per ciascun substrato.....	66
Figura 4.12 -Andamento delle produzioni nette cumulate di biogas registrate durante la prova BMP-1 e BMP-3 e curve interpolanti (linee tratteggiate) per i substrati di Bresso e di Sesto San Giovanni.....	67
Figura 4.13 - Andamento delle produzioni lorde e nette cumulate di biogas della comunità algale <i>scenedesmus</i> (raccolta#6) e curva interpolante (linea continua) del substrato (adattato da Guidani, 2019).....	67
Figura 4.14 - andamento delle produzioni nette cumulate di biogas registrate durante la prova BMP-3 e curva interpolante (linea tratteggiata) per il substrato della comunità algale della raccolta#7.....	68
Figura 4.15 - Andamento nel tempo del carico organico e del tempo di residenza della prova di fermentazione in continuo.....	72
Figura 4.16-Andamento nel tempo del valore di pH e del carico organico.....	73
Figura 4.17-Andamento nel tempo dei valori di Solidi Totali e Volatili.....	73
Figura 4.18 -Andamento nel tempo dei valori di cod solubile e vfa espressi come cod.....	74
Figura 4.19-Andamento nel tempo dei valori di azoto ammoniacale e dei fosfati.....	74
Figura 4.20-Andamento nel tempo del valore di resa di fermentazione.....	75
Figura 4.21-Andamento nel tempo della produzione giornaliera di acidi grassi volatili.....	75
Figura 4.22 – Composizione percentuale di VFA fase FC-1 (comprese FC1_1 e FC-1_2).....	76

Figura 4.23 - Composizione percentuale di VFA fase FC-2 (giorni 70-100 FC-2_1, giorni 116-130 FC-2_2).	76
Figura 4.24 – Composizione percentuale di VFA fase CC-1.....	77
Figura 4.25 - Composizione percentuale di VFA fase CC-2.	77
Figura 4.26 - Andamento temporale delle concentrazioni dei singoli acidi volatili.	78
Figura 4.27 - Andamento nel tempo della produzione di azoto gassoso prova D-1 singoli acidi.	87
Figura 4.28 -Andamento nel tempo delle produzioni di azoto gassoso prova D-1 mix sintetico VFA.	88
Figura 4.29 -Andamento nel tempo delle produzioni di azoto gassoso prova D-2 effluente prova FC-2.	88
Figura 0.1 - Filiera di trattamento dell'impianto di depurazione di Bresso-Niguarda.	97
Figura 0.2 - Filiera di trattamento dell'impianto di depurazione di Sesto San Giovanni.	98

INDICE DELLE TABELLE

Tabella 2.1 – Principali acidi grassi volatili e loro proprietà (Bhatia and Yang, 2017).	4
Tabella 2.2 - Produzione di VFA da substrati differenti e rese di acidificazione di esperienze a scala di laboratorio (adattato da Lee et al., 2014).	11
Tabella 2.3 - Tassi di Denitrificazione per diverse fonti di carbonio organico (adattato da Elefsiniotis et al., 2004)	24
Tabella 2.4 - Composizione della parete cellulare e percentuale in peso rispetto alla cellula. Adattata da (Torres, et al., 2016)	31
Tabella 2.5 - Condizioni operative e relative produzioni di VFA da biomassa microalgale.	33
Tabella 3.1 - Caratterizzazione dei campioni di fango misto prelevati dal depuratore niguarda – bresso e di sesto san giovanni].	35
Tabella 3.2 - Caratterizzazione inoculi batterici.	36
Tabella 3.3 - Caratterizzazione fanghi attivi.	37
Tabella 3.4-Caratteristiche medie del substrato di crescita in alimento al raceway e della sospensione algale presente al suo interno relative al periodo compreso tra giugno e luglio 2019.....	38
Tabella 3.5 - Caratteristiche medie delle comunità algali.	38
Tabella 3.6 - Condizioni iniziali bottiglie prova F-1 F-2 F-3.....	40
Tabella 3.7 - Allestimento prove di BMP.....	42
Tabella 3.8 - Principali parametri operativi delle fasi della prova di fermentazione in continuo	48
Tabella 3.9 - Concentrazioni acidi grassi volatili come fonte di carbonio per la prova di denitrificazione D-1.	50
Tabella 3.10 - COD solubile dei surnatanti e concentrazioni previste in soluzione per la prova di denitrificazione D-2.	51
Tabella 4.1-Risultati prova F-1 nei giorni 3, 8 e 14.	55
Tabella 4.2 - Composizione Gas finale giorno 24 prova F-1.	56
Tabella 4.3 - Risultati prova F-2 nei giorni 3, 8, 11, 14, 18.	57
Tabella 4.4-Composizione gas giorno 22 prova F-2.	57
Tabella 4.5- Risultati prova F-3 giorno 3, 7 e 10.....	61
Tabella 4.6 - Concentrazioni di VFA teoriche e misurate nei giorni 3 e 7.	61
Tabella 4.7 - Composizione gas e resa metano nei giorni 7 e 10.	63
Tabella 4.8 - Risultati delle prove di BMP.	68

Tabella 4.9- Risultati delle diverse fasi della prova di fermentazione in continuo.	78
Tabella 4.10 - Composizione del gas delle fasi della prova di fermentazione in continuo.	79
Tabella 4.11 - Concentrazioni iniziali e finali del substrato organico e del nitrato.	89
Tabella 4.12 –Risultati modellistici prove di denitrificazione.	89
Tabella 5.1 - principali parametri assunti per la valutazione del bilancio di massa.	94

1. INTRODUZIONE.

La crescita demografica e il rapido sviluppo economico a cui si è assistito negli ultimi decenni hanno portato ad un incremento smisurato della produzione di rifiuti di ogni tipologia. La sostenibilità ambientale è l'obiettivo principale del XXI secolo e per raggiungerlo è necessaria la transizione verso un tipo di economia cosiddetta circolare, al centro della quale sono presenti concetti come il recupero, il riuso ed il riciclo (Atasoy et al., 2018). L'aumento dei consumi idrici a scopi agricoli, industriali e domestici ha determinato serie problematiche di carattere ambientale come conseguenza dei grandi volumi di acque reflue generate. Tra i rifiuti più complessi da gestire, le acque reflue sono quelle che necessitano maggiormente di essere trattate prima di poter essere reimmesse in ambiente (Lee et al., 2014). Difatti, la depurazione delle acque di rifiuto è di fondamentale importanza per la protezione ambientale dei corpi idrici. La presenza di nutrienti e macronutrienti all'interno delle acque reflue altera gli ecosistemi dei corpi idrici ricettori, portando con sé squilibri in termini di biodiversità, di contenuto di sostanze tossiche e di livello di torbidità. L'apporto di carichi di nutrienti causa l'eutrofizzazione degli ecosistemi acquatici, un processo irreversibile che si ripercuote anche sulla salute umana. Gli effluenti secondari degli impianti di trattamento di acque reflue sono stati identificati quale principale causa di questo fenomeno (Ruiz-Marin et al., 2010). Le acque reflue contengono un alto carico inquinante, ma allo stesso modo rappresentano una fonte di energia e di materia prima (Van Der Hoek et al., 2016).

Tenuto conto di queste premesse, le acque reflue possono rappresentare una valida alternativa per la produzione di materie prime come ad esempio gli acidi grassi volatili (VFA). Questi acidi sono uno dei pilastri fondamentali dell'industria chimica, farmaceutica, cosmetica, tessile e alimentare, ad oggi vengono prodotti attraverso risorse petrolifere non rinnovabili. Basti pensare che l'emissione in termini di $\text{CO}_{2,\text{eq}}$ per la produzione del solo acido acetico è pari a 3,3 t $\text{CO}_{2,\text{eq}}/\text{y}$ (Atasoy et al., 2018). Gli acidi grassi volatili possono essere prodotti attraverso processi biologici come la fermentazione microbica e successivamente utilizzati come materia prima in numerosi ambiti come ad esempio nella produzione di bioplastica e di bioenergia. Il processo di fermentazione acidogenica è una delle fasi della digestione anaerobica, che rappresenta uno dei processi più importanti nella filiera della depurazione delle acque, ovvero quella di stabilizzazione dei fanghi. La digestione anaerobica è mirata principalmente al rispetto di limiti ambientali su diversi inquinanti (Wee Shen, et al., 2014), ma nella ormai obbligatoria transizione verso una società più sostenibile,

è sempre più grande l'interesse verso lo sviluppo di processi alternativi, che prevedano prodotti finali di maggiore valore commerciale rispetto al biogas. Un approccio più innovativo è, nella maggior parte dei casi, in grado di rispettare i limiti normativi, in alcuni casi riesce addirittura ad essere più efficiente (Wee Shen, et al., 2014).

I VFA prodotti tramite fermentazione possono essere utilizzati anche nei processi biologici mirati alla rimozione dei nutrienti, dove nella maggior parte dei casi è necessario introdurre una fonte di carbonio esterna facilmente degradabile che possa rispettare i rapporti di COD rispetto ai nutrienti richiesta (Elefsiniotis et al., 2004).

Nel contesto del recupero di energia e del riuso negli impianti di depurazione anche l'utilizzo di microalghe è stato proposto come trattamento biologico alternativo (Mallick, 2002). La coltivazione di microalghe si configura come un trattamento attrattivo nel contesto dell'economia circolare poiché produce una biomassa ulteriormente valorizzabile. Nonostante la ricerca relativa ai sistemi di coltivazione microalgali a scopo di rimozione di nutrienti (azoto e fosforo) sia particolarmente approfondita, gli studi che affrontano l'utilizzo della biomassa generata sono ancora limitati. Uno tra i numerosi e possibili riusi della biomassa è la fermentazione congiunta di biomassa microalgale e fanghi primari o misti, per aumentare le efficienze di processo e per riutilizzare una biomassa che altrimenti necessiterebbe comunque un trattamento di smaltimento.

Il seguente elaborato ha quindi come obiettivo l'approfondimento del processo di fermentazione acidogenica dei soli fanghi misti e dei fanghi misti insieme con la biomassa microalgale nell'ottica di produzione di un surnatante dal valore economico appetibile.

1.1 OBIETTIVO DELLA TESI

Le attività realizzate nell'ambito del presente elaborato sono finalizzate a valutare il potenziale di produzione di acidi grassi volatili (VFA) da fanghi di depurazione misti e da fanghi misti e biomassa microalgale. A tal fine sono state condotte prove di fermentazione acidogenica in batch ed in continuo utilizzando campioni di fango misto, ovvero fango primario e fango biologico, proveniente da due impianti di trattamento delle acque reflue situati nell'area nord del comune di Milano: il depuratore di Bresso-Niguarda e quello di Sesto San Giovanni. A partire dai risultati ottenuti, si è valutata la potenzialità denitrificante del surnatante ricco di VFA attraverso prove di denitrificazione in manometria.

Le prove di co-fermentazione si inseriscono nell'individuazione delle potenzialità legate all'utilizzo combinato di fanghi e biomassa microalgale. L'integrazione della coltivazione di microalghe con impianti di trattamento di acque reflue è emersa recentemente quale efficace soluzione per ridurre gli oneri associati alla depurazione dei reflui e produrre contemporaneamente una biomassa dall'appetibile valore economico. La valorizzazione della biomassa microalgale quindi si configura come un aspetto chiave per migliorare la sostenibilità ambientale e la competitività economica di questi processi.

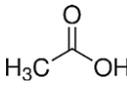
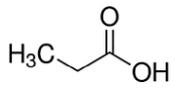
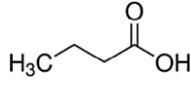
In quest'ottica, la valutazione della sinergia tra substrati differenti nella produzione di acidi grassi volatili ha previsto uno studio per individuare la miscela ottimale per l'accumulo di VFA sia attraverso prove in batch che in continuo.

2. STATO DELL'ARTE.

2.1 GLI ACIDI GRASSI VOLATILI: PRINCIPALI CARATTERISTICHE ED UTILIZZI

Gli acidi grassi volatili (VFA) sono acidi a catena corta, costituiti da cinque o al massimo sei atomi di carbonio. Esistono differenti tipi di acidi grassi volatili con molteplici proprietà che li rendono funzionali in ambiti differenti. I principali acidi grassi volatili sono l'acido formico, acetico, propionico, butirrico, valerico e caproico. Una sintesi delle proprietà dei principali acidi presenti sul mercato è esposta in Tabella 2.1

TABELLA 2.1 – PRINCIPALI ACIDI GRASSI VOLATILI E LORO PROPRIETÀ (Bhatia and Yang, 2017).

VFA	Formula chimica	Produzione annua kt/anno	Prezzo di mercato €/t	Utilizzo	Metodo di produzione	Riferimento
Acido Acetico		14000-17000	400-800	Acetato di vinile monomero (polimeri, collanti, coloranti) additivo alimentare, solvente, aceto)	Sintesi chimica (carbossilazione del metanolo) e fermentazione microbica (ossidativa e anaerobica)	(Bhatia and Yang, 2017)
Acido Propionico		350-470	2000-2500	Estere utilizzato come agente aromatizzante, additivo per cibo. Supplemento farmaceutico, additivo per esche da pesca.	Sintesi chimica (idroformilazione o carbossilazione dell'etilene, ossidazione diretta di idrocarburi), sottoprodotto della produzione di acido acetico, fermentazione microbica	(Cheryan, 2009)
Acido Butirrico		90-105	1500-1650	Additivo per cibo animale ed umano, agente aromatizzante, solvente.	Sintesi chimica (ossidazione del butiraldeide) estrazione da burro, fermentazione microbica	(Ling Jiang, et. al., 2018)

L'acido acetico è uno degli elementi fondamentali per la produzione di vernici, gomme, plastiche, fibre sintetiche, finissaggi tessili, pesticidi, emulsioni di polimeri, patinature della carta. Inoltre, è un composto importante nella regolazione dell'acidità in cibi e bevande (Bhatia & Yang, 2017). L'acido propionico è invece utilizzato come sale di calcio e sodio, è presente nelle fragranze, emulsioni, fibre di cellulosa artificiali e negli aromi alimentari artificiali. Può essere un conservante per cibi (come ad esempio il pane o in generale cibi cotti) ed anche per il grano, in quanto inibisce la formazione di muffe. Ma più di tutto l'acido propionico è un elemento chiave nella produzione della vitamina E. L'acido butirrico viene utilizzato nel settore alimentare sia come supplemento sia come antibiotico, grazie alle sue proprietà anti-patogene. Rappresenta quindi una delle più efficienti fonti di energia per animali, soprattutto suini e pollame (Bhatia & Yang, 2017). Oltre ai principali acidi volatili si contano, seppur di minore rilevanza, anche l'acido formico, valerico e caproico.

In generale, gli acidi volatili sono prodotti sia da fonti petrolchimiche che da processi biologici. La grande domanda di VFA è coperta per il 90% da processi che utilizzano fonti non rinnovabili (Bhatia & Yang, 2017). Nonostante i processi di produzione siano simili tra loro, ogni tipo di acido ha una specifica metodologia. Per esempio, l'acido acetico è largamente prodotto utilizzando fonti fossili attraverso la carbossilazione del metanolo (Quian, et al., 2016). La produzione di acido butirrico avviene principalmente per sintesi chimica attraverso l'ossidazione del butilraldeide, grazie al propilene derivato dal petrolio greggio. L'acido propionico è prodotto utilizzando fonti fossili in tre differenti modi: ossidazione dell'etilene, carbossilazione dell'etilene con CO e acqua oppure ossidazione diretta di idrocarburi. Ancora, l'acido propionico può essere presente, seppure in minori quantità, come sottoprodotto dell'acido acetico (Atastoy, et al., 2018).

Tutti questi acidi possono essere prodotti anche per via biologica. Per quanto riguarda la produzione via fermentazione, i batteri che sintetizzano l'acido acetico sono classificati in dieci generi nella famiglia *Acetobacteriaceae*. Sebbene sia presente una grande varietà di batteri che si occupa di produrre acido acetico, i batteri che vengono usati principalmente sono i *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* e *Gluconobacter*. Le ricerche sono indirizzate verso il miglioramento della produttività di acido acetico, attraverso lo sviluppo di ceppi batterici con condizioni di operatività più efficienti (Atastoy, et al., 2018).

A causa dell'esaurimento delle fonti fossili e soprattutto delle serie e certe conseguenze ambientali legate all'utilizzo di fonti non rinnovabili, la produzione di acidi volatili per via biologica ha suscitato grande interesse negli ultimi anni. È altresì importante tenere in considerazione l'importante dispendio economico richiesto per incrementare i processi di produzione sostenibili. In generale, le produzioni per via biologica non sono competitive da un punto di vista economico con quelle che utilizzano fonti fossili a causa di due principali ragioni; una è il costo di produzione più basso per metodi petrolchimici, l'altro è la bassa efficienza dei metodi biologici. Da un punto di vista ambientale è però importante tenere conto delle emissioni di gas serra, dell'alta richiesta di energia derivante dalla produzione di questi acidi, così come la grande produzione di rifiuti, sia di tipo solido che liquido durante e dopo il processo di produzione (Besselink, et al., 2017) (Mansouri, et al., 2017). I recenti sviluppi e gli ultimi studi suggeriscono come sia quindi necessaria una transizione verso metodi che abbiano un approccio cosiddetto "cradle to cradle" ossia un approccio che preveda che i prodotti, al termine del loro utilizzo, debbano riavere nuova vita all'interno di

un nuovo ciclo di produzione, minimizzando in questo modo la quantità di rifiuti. La produzione di acidi grassi volatili si inserisce in questa visione e sta iniziando ad accumulare importanti risultati in termini di efficienza e di ottimizzazione delle condizioni operative.

2.2 LA DIGESTIONE ANAEROBICA NELLE ACQUE DI RIFIUTO ED IL PROCESSO DI FERMENTAZIONE ACIDOGENICA.

Nell'ambito degli approcci per la gestione delle acque di rifiuto, il processo di digestione anaerobica permette principalmente l'abbattimento biologico del carico inquinante e la stabilizzazione di substrati organici con contestuale produzione di biogas, una miscela gassosa composta principalmente da metano (55-75%), anidride carbonica (25-45%) e altri gas in traccia. È un processo che avviene in assenza di ossigeno (libero e legato) e che interessa almeno tre gruppi metabolici distinti di microrganismi. Il processo si sviluppa attraverso diverse reazioni in serie ed in parallelo ad opera di un consorzio di batteri anaerobici (Montingelli et al., 2015). La digestione anaerobica può dividersi in 4 fasi principali: l'idrolisi, l'acidogenesi, l'acetogenesi e la metanogenesi (Figura 2.1).

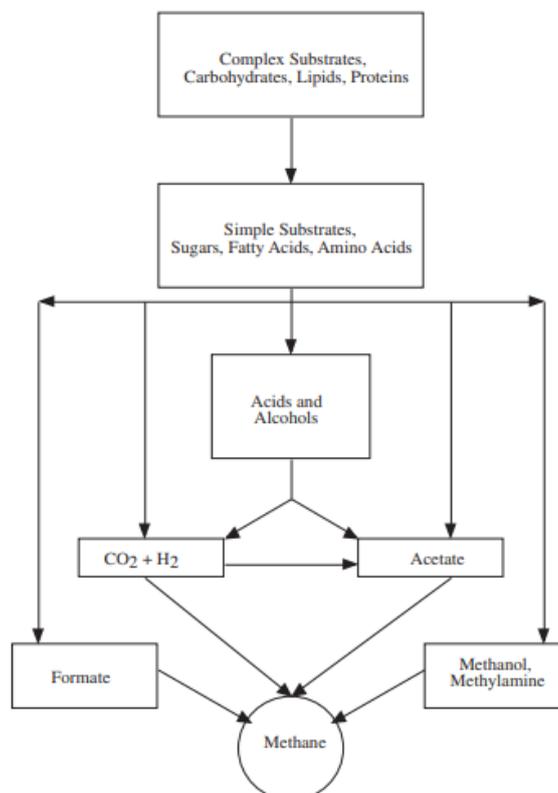


FIGURA 2.1- SCHEMA SEMPLIFICATO DELLA DIGESTIONE ANAEROBICA (GERARDI, 2003).

L'idrolisi è il processo attraverso il quale il materiale particolato (substrati organici complessi particolati o solubili, quali proteine, grassi e carboidrati) viene trasformato in composti

solubili (acidi grassi volatili, chetoni ed alcoli). L'idrolisi delle sostanze organiche complesse è realizzata prevalentemente ad opera di enzimi extracellulari escreti da batteri idrolitici anaerobi facoltativi. Le molecole idrolizzate risultanti includono amminoacidi, zuccheri, acidi grassi a catena lunga (LCFA, *Long Chain Fatty Acids*) e alcoli.

Nelle fasi seguenti di acidogenesi ed acetogenesi, tali molecole sono convertite in acidi grassi volatili a catena corta (SCFA, *Short Chain Fatty Acids*), idrogeno e anidride carbonica. Gli acidi più comunemente prodotti durante la fase di fermentazione sono l'acido acetico, propionico e butirrico, ma possono essere presenti anche acido valerico ed isovalerico. I composti vengono successivamente sottoposti ad ulteriore fermentazione, così da dare origine ad acetato, anidride carbonica e idrogeno. La degradazione di acidi grassi in acido acetico ed idrogeno è realizzata da batteri acetogeni idrogeno-produttori obbligati. La fase finale del processo di digestione è la metanogenesi, fase di produzione di biogas grazie al contributo degli archei (archeobatteri) metanigeni.

Nella digestione anaerobica la fase limitante dipende dalla natura del substrato, dalla configurazione del processo, dalla temperatura e dal carico organico applicato. Quando il substrato da digerire si trova in forma particolata e presenta componenti particolarmente resistenti rispetto all'attacco enzimatico, la fase limitante risulta essere sempre quella di idrolisi. Nell'applicazione dei processi anaerobici alla depurazione di reflui concentrati invece la fase limitante l'intera sequenza degradativa è quella metanigena, a causa dalla lenta crescita dei batteri operanti la metanogenesi (Bonomo, 2008).

Le alternative alla produzione di biogas che permettono di convertire acque reflue o altri substrati dal ridotto valore economico in prodotti finali dall'elevato valore commerciale si esplicano attraverso la produzione intermedia di acidi organici o alcoli, i VFA (Kleerebezem et al., 2015), composti che, come già descritto in precedenza, giocano un ruolo centrale anche nel processo di digestione anaerobica. La produzione anaerobica di VFA si basa sulla fermentazione di carboidrati ed amminoacidi e, mentre la produzione di metano è un processo che avviene naturalmente in condizioni anossiche, l'ottimizzazione della fase di acidogenesi, richiede la valutazione e la scelta di parametri specifici, lontani dai tipici parametri ottimali della digestione anaerobica. Infatti, le fasi successive all'acidogenesi, ovvero l'acetogenesi e la metanogenesi devono essere inibite per aumentare il tasso di accumulo di acidi volatili.

Idrolisi e acidogenesi sono generalmente realizzate simultaneamente in un unico reattore anaerobico (Lee et al., 2014). I batteri hanno un ruolo importante nel definire la

composizione della miscela di VFA, insieme al substrato e alle condizioni operative imposte (temperatura, tempo di residenza, pH, carico organico) (Lee et al., 2014).

La fase di acidogenesi della digestione anaerobica comprende numerosi processi fermentativi che producono principalmente acidi organici (VFA), ma anche composti come la CO₂ e H₂, che vengono convertiti quasi direttamente in acetato o metano; in questa fase si ritrovano anche alcoli, composti organici dell'azoto e dello zolfo, che provengono dalla degradazione di amminoacidi e proteine (Gerardi, 2003). L'acido più importante è sicuramente l'acido acetico, perché rappresenta il substrato utilizzato dai batteri durante l'ultima fase del processo di digestione: la metanogenesi. In generale comunque la fermentazione acidogenica può rappresentare un metodo efficace per trattare fanghi, perché non solo riduce la quantità di fanghi da trattare, ma produce anche una risorsa che presenta numerose possibilità di utilizzo.

Negli ultimi decenni sono stati realizzati grandi sforzi per massimizzare la produzione di VFA, esplorando l'utilizzo di diversi substrati e regolando le condizioni operative del reattore anaerobico. La quantità, la concentrazione e soprattutto l'efficienza del processo di fermentazione sono strettamente legate alle condizioni operative e al substrato utilizzato. È quindi importante riuscire a stabilire delle relazioni che siano preventivabili tra le condizioni di processo applicate alla fermentazione acidogenica di specifici substrati (Bhatia and Yang, 2017).

2.3 TIPOLOGIE DI RIFIUTI OTTIMALI PER L'ACCUMULO DI ACIDI GRASSI VOLATILI.

La produzione di VFA è influenzata dal tipo di substrato che viene utilizzato. Una grande varietà di matrici solide e liquide è stata indagata per il loro potenziale di conversione a VFA. Tra di esse, la frazione organica dei rifiuti solidi urbani (FORSU) è la matrice solida più studiata, mentre le acque reflue generate dalle industrie agricole, zootecniche e cartarie sono i reflui più frequentemente utilizzati per produrre VFA per i loro substrati facilmente biodegradabili. I fanghi di depurazione (primari, secondari o misti), sono ricchi di sostanza organica, con un carico di COD totale che oscilla tra i 14 ed i 23 g/L (Lee et al., 2014), che rende i fanghi di depurazione degli ottimi candidati per la produzione di VFA. Va altresì detto che la frazione solubile del COD ha una concentrazione che di solito è 10 fino a 100 volte inferiore rispetto al COD totale (Ji et al., 2010) rendendo la produzione di VFA non sempre la scelta più efficiente. Anche la tipologia del fango è importante nella scelta del substrato

per la produzione di VFA: in uno studio di confronto di produttività di fanghi primari e fanghi secondari è stata valutata una produzione specifica rispettivamente di VFA pari a 255 $\text{mg}_{\text{COD}}/\text{g}_{\text{SSV}}$ e di 11 $\text{mg}_{\text{COD}}/\text{g}_{\text{SSV}}$ a parità di condizioni iniziali (Ucisik and Henze, 2008). Queste produzioni così differenti tra loro sono da riferirsi alla natura del fango: i fanghi primari sono molto più putrescibili e degradabili dei fanghi secondari, che contengono al loro interno principalmente materiale inerte, polimeri e consorzi di batteri che rendono la digestione più complessa (Khan et al., 2016).

I rifiuti solidi organici sono in generale le matrici a cui si dedica più approfondimento nello studio di produzione di acidi grassi volatili principalmente per due ragioni: i rifiuti organici rappresentano la percentuale maggiore (22-54%) del volume dei rifiuti solidi ed inoltre presentano un contenuto di carbonio organico che oscilla tra 90 e 170 $\text{g}_{\text{COD}}/\text{L}$ (Elbeshbishy et al., 2012; Zhou et al., 2018).

In generale non è tuttora chiaro quale sia la matrice più adatta per la produzione di VFA, stante le differenti condizioni operative adottate nell'ambito dei vari studi e diversi criteri prestazionali utilizzati per valutare la produzione di VFA. I substrati utilizzati sono generalmente ricchi di sostanza organica con concentrazioni di COD superiori a 4000 mg/L (Lee et al., 2014). Tali indicazioni dovrebbero servire come guida preliminare per la selezione del substrato da fermentare. In un'ottica di implementazione dei processi a scala commerciale, oltre alle caratteristiche del substrato fermentabile, deve essere presa in considerazione anche la sua disponibilità in quantità tali da garantire un approvvigionamento stabile e continuo per la produzione di VFA. Oltre ad impattare la quantità di VFA prodotti, il tipo di substrato influenza anche la distribuzione degli acidi volatili. La composizione di VFA riflette i percorsi metabolici del processo fermentativo. L'acido acetico è quasi sempre il prodotto che occupa la percentuale maggiore in termini di concentrazione (30-80%), seguito dall'acido propionico, butirrico ed infine valerico. Le ragioni delle differenze nella composizione sono da ritrovarsi sia nelle scelte operative che nella composizione del fango stesso in termini di carboidrati, proteine e lipidi (Bhatia and Yang, 2017).

La quantità di acidi grassi volatili che potenzialmente possono essere prodotti a partire da un substrato, dipende anche dal grado di acidificazione di quel particolare substrato (Xiong et al., 2012). Il grado di acidificazione è il fattore chiave del processo di fermentazione ed è definito come la percentuale di carbonio organico totale (particolato e solubile) che viene convertito in acidi volatili. Sono diversi gli studi che hanno ricercato gli effetti di condizioni

operative quali pH, temperatura, carico organico, tempo di ritenzione idraulica e dei solidi. Di seguito viene esposta la Tabella 2.2 dove sono evidenziati i diversi studi di fermentazione acidogenica a partire da substrati differenti, al fine di comprendere come l'efficienza del processo di fermentazione sia strettamente legata alla tipologia di substrato e ai parametri operativi imposti.

TABELLA 2.2 - PRODUZIONE DI VFA DA SUBSTRATI DIFFERENTI E RESE DI ACIDIFICAZIONE DI ESPERIENZE A SCALA DI LABORATORIO (ADATTATO DA LEE ET AL., 2014).

Type of wastes	Organic content (mg COD/L)	Reactor type and operating conditions	VFA production performance	References
<i>Solid waste</i>				
Waste activated sludge	5470 ^a	Batch reactor, pH 11, 60 °C, 7 d, 0.02 g SDBS ^b /g VSS	2561 mg TOC/L	(Mengmeng et al., 2009)
	18657	Batch reactor, pH 9, 35 °C, 5 d	298 mg COD/g VSS	
	18657	Batch reactor, pH 8, 55 °C, 9 d	368 mg COD/g VSS	(Zhang et al., 2009)
	14878	Batch reactor, 21 °C, 6 d	339 mg COD/L	(Jiang et al., 2007)
	14890	Batch reactor, 21 °C, 6 d	191 mg COD/L	(Luo et al., 2011)
Primary sludge	22838	Batch reactor, 21 °C, 6 d	85 mg COD/g VSS	(Ji et al., 2010)
	20631	Batch reactor, pH 10, room temp., 5 d	60 mg COD/g VSS/d	(Wu et al., 2009)
	343 ^c	Continuous-flow completely mixed reactor, 25 °C, HRT 1.25 d, SRT 10 d	31 mg/g VSS/d	(Maharaj and Elefsiniotis, 2001)
Food waste	Not available	Semi-continuous reactor (once-a-day feeding and draw-off), pH 6, 35 °C, HRT 8 d, OLR 9 g/L/d	25,000 mg/L	(Lim et al., 2008)
	91,900	Batch reactor, 37 °C, initial pH 5.5	8950 mg COD/L	(Elbeshbishy et al., 2012)
Organic fraction of	347000 ^e	Batch reactor, pH 4–5, 14–22 °C, HRT 4–4.5 d	40 mg/g VS fed	(Bolzonella et al., 2005)
Municipal solid waste	196700 ^e	Plug flow reactor, pH 5.7–6.1, 37 °C, HRT = SRT 6 d, OLR 38.5 gSV/L/d	23,110 mg/L	(Sans et al., 1995)
	150600 ^e	Plug flow reactor, pH 6.6–7.2, 55 °C, HRT 6 d, OLR 22.4 gSV/L/d	19,581 mg/L	(Sans et al., 1995)
<i>Liquid waste</i>				
Palm oil mill effluent	88000	Semi-continuous reactor (three times feeding per day), pH 6.5, 30 °C, HRT 4 d	15,300 mg/L	(S.K. Hong, Y. Shirai, 2009)
	30600	Upflow anaerobic sludge blanket reactor, pH 5.2–5.8, 35 °C, HRT 0.9 d, OLR 16.6 g COD/L/d	4100 mg/L/d (as acetic acid)	(Borja et al., 1996)
Olive oil mill effluent	70400	Batch reactor, initial pH 6.5, 25 °C, 45 d	15,600 mg COD/L	(Dionisi et al., 2005)
	37000	Packed bed biofilm reactor, pH 5.2–5.5, 25 °C, HRT 1.4 d, OLR 6.5 g COD/L/d	10,700 mg COD/L	(Beccari et al., 2009)
Paper mill effluent	7740	Continuous stirred-tank reactor, pH 6, 37 °C, HRT 1 d	0.75 ^e	(Bengtsson et al., 2008a)
	26300	Batch reactor, 15–25 °C, pH 6, 12 d	60% ⁱ	(Jiang et al., 2012)
	8750 ^b	Continuous-flow completely mixed reactor, 30 °C, pH 6, HRT 0.67 d	74% ⁱ	(Bengtsson et al., 2008b)
Cheese whey	4590	Continuous stirred-tank reactor, pH 6, 37 °C, HRT 2.1 d	0.84 ^e	(Bengtsson et al., 2008a)
Dairy wastewater	4420	Continuous flow-completely mixed reactor, pH 6.8–7.2, 35 °C, HRT 0.5 d	3100 mg/L/d	(Demirel and Yenigun, 2004)
	4000	Upflow anaerobic sludge blanket reactor, pH 5.5, 55 °C, OLR 6 g COD/L/d	1032 mg/L	(Yu and Fang, 2002)
	12000	Upflow anaerobic sludge blanket reactor, pH 5.5, 37 °C, HRT 0.5 d, SRT 15 d	2071 mg/L	(Yu and Fang, 2001)
<i>Wastewater</i>				
Pharmaceutical wastewater	40000–60000	HRT 0.5 d Continuous-flow completely mixed reactor, pH 5.5, 35 °C, HRT 0.5 d, OLR 13 g COD/L/d	44% ^d	(Oktem et al., 2006)
<i>Mixture of two types of wastes</i>				
Primary sludge + waste activated sludge	22256	Batch reactor, 21 °C, 6 d, mixing ratio 1:1 (on VSS basis)	118 mg COD/g VSS	(Ji et al., 2010)
	15480	Semi-continuous reactor, 37 °C, HRT = SRT 5 d	114 mg COD/g VSS	(Ucisik and Henze, 2008)
Primary sludge + starch-rich wastewater	545 ^c	Continuous-flow completely mixed reactor, 22 °C, HRT 0.75 d, SRT 7 d, mixing ratio 1:1 (on volume basis)	57 mg/g VSS/d	(Banerjee et al., 1999)
	392 ^c	Continuous-flow completely mixed reactor, 25 °C, HRT 1.25 d, SRT 10 d, mixing ratio 1:1	45 mg/g VSS/d	(Maharaj and Elefsiniotis, 2001)
Food waste + sludge	Not available	Semi-continuous reactor (once-a-day draw off and feeding) pH 6.99, 35 °C, HRT=SRT 8.92 d, OLR 8.31 gVSS/L/d 88% food waste + 12% dewatered sludge (on VSS basis)	29,100 mg COD/L	(Hong and Haiyun, 2010)
	22,125	Batch reactor, pH 8, 20 °C, 4 d	8237 mg COD/L	(Feng et al., 2009)
	29,050	Continuous upflow reactor, pH 5.5–5.9, 18 °C, HRT 1 d, 25%	3610 mg/L	(Min et al., 2005)
Sugar industry	6621 (wastewater), 1220 ^f	food waste + 75% primary sludge (on weight basis) Semi-continuous reactor (daily feeding), pH 5.6–6.2, 35 °C,	3635 mg/L	(Alkaya and Demirel, 2011)

a mg TOC/L; b Sodium dodecylbenzene sulfonate; c sCOD after dilution. d (mg VFA-COD in the effluent/mg COD in the influent) 100%; e (VFA-COD/wastewater influent sCOD); f mg COD/g dry weight; g mg COD/kg; h sCOD; i (mg VFA-COD/mg sCOD) × 100%.

2.4 CONDIZIONI OTTIMALI PER L'ESTRAZIONE E DI ACIDI GRASSI VOLATILI.

La produzione di acidi grassi volatili avviene in reattori cosiddetti fermentatori. Sono reattori del tutto simili a quelli utilizzati per la digestione anaerobica in quanto la fermentazione coincide con la fase di acidogenesi. Il pH, la temperatura, il tempo di ritenzione ed il carico organico sono i parametri principali che governano l'efficienza di accumulo di acidi grassi volatili. Essi influenzano la concentrazione e la composizione dei VFA prodotti dalle matrici di scarto.

2.4.1 pH

Il pH rappresenta il principale parametro che definisce la buona riuscita del processo di fermentazione. Esso influisce non solo sull'efficienza di acidificazione, ma anche sulla fase preliminare alla fermentazione, ovvero l'idrolisi (Zhao et al., 2018).

In generale i batteri acidificanti non sono in grado di sopravvivere per pH estremamente acidi (pH 3) o pH molto alcalini (pH 12). L'intervallo ottimale per la produzione di VFA è compreso tra 5 e 11, con valori fortemente dipendenti dal tipo di substrato in esame.

Zhao et al., (2018) hanno studiato le differenti risposte di efficienza di produzione di acidi volatili per pH crescenti (da valori pari a 9 a valori pari a 11), concludendo che per valori alcalini, non soltanto aumenta la quantità di batteri acidificanti (pH 9), ma l'attività dei batteri metanigeni viene inibita (pH 11). Lo stesso approccio è stato definito da Chen et al., 2007, che variando il pH verso valori alcalini, hanno notato un cambiamento non solo in termini di produzione, ma anche come comunità microbica. Huang et al., (2018), studiando la produzione di acidi volatili variando il pH da valori acidi a valori alcalini (3,5,7,9,10), hanno notato come la produzione ottima di VFA è da ritrovarsi per pH alcalini. La condizione alcalina infatti promuove l'idrolisi del fango attraverso la ionizzazione di gruppi carichi (gruppi carbossilici ad esempio) di sostanze polimeriche extracellulari. Questo meccanismo fa sì che carboidrati e proteine vengano rilasciate, rendendo il substrato più solubile. Le stesse valutazioni valgono per pH acidi (tra 5,2 e 6) (Lee et al., 2014), che rappresentano valori ottimali di accumulo quando si sceglie di non intervenire nel controllo del pH. Questo parametro influisce anche sul tipo di VFA che vengono prodotti e sulla loro concentrazione: per valori alcalini (a partire da valori neutri sino ad arrivare a 10) la percentuale più alta è quella dell'acido acetico, con valori tra il 60 ed il 70% in concentrazione, per pH acidi

(compresi tra 5 e 6) la percentuale è del 50% (Cheah et al., 2019), lasciando spazio all'acido butirrico e propionico (Zhou et al., 2018).

2.4.2 TEMPERATURA

La temperatura è un parametro operativo importante per la produzione di VFA, perché influenza fortemente la crescita dei microorganismi, l'attività enzimatica e quindi il tasso di idrolisi (Zhou et al., 2018). Hao e Wang, (2015) hanno notato come la condizione termofila ($T > 50^{\circ}\text{C}$) porti ad una produzione di VFA 10 volte maggiore rispetto alla condizione mesofila, senza intervento nella regolazione del pH. L'incremento di produzione è dovuto alla maggiore efficienza di idrolisi per temperature elevate, che promuove la solubilizzazione di maggiore materiale degradabile (carboidrati e proteine) (Lee et al., 2014). Temperature elevate (termofilia) portano anche ad un ambiente più produttivo per la comunità batterica se confrontato con quello di un ambiente mesofilo, dove si può comunque notare una buona produzione di acidi volatili. Va altresì detto che, anche se la produzione di acidi volatili viene incrementata nelle condizioni termofile, bisogna considerare anche il grande dispendio energetico che necessita mantenere una temperatura così alta (Yu and Fang, 2002).

A differenza del pH, la temperatura non influenza particolarmente la composizione dei VFA, che varia più significativamente tenendo in considerazione la tipologia substrato o il pH (Cheah et al., 2019; Yu and Fang, 2002).

2.4.3 TEMPO DI RITENZIONE

Nella fermentazione acidogenica dei rifiuti (sia solidi che liquidi), il tempo di ritenzione costituisce, insieme al pH, il parametro operativo cruciale nella quantità di VFA ottenibile. Il tempo di ritenzione definisce il volume del reattore di fermentazione e la specie microbica prevalente al suo interno. Nel caso di utilizzo di fanghi per la produzione di VFA, il tempo di ritenzione dei solidi (SRT), cioè quello riferito all'attività batterica è di solito uguale al tempo di ritenzione idraulico (HRT) poiché sia il substrato carbonioso che la comunità microbica si trovano nella stessa fase (Lee et al., 2014). La maggior parte degli studi definisce un tempo di ritenzione dell'ordine delle ore (Tabella 2.1). Questo tempo è spesso non sufficiente per l'idrolisi: la diretta conseguenza è la produzione di ingenti quantità di materiale non degradato. In generale comunque, esso risulta essere abbastanza elevato da permettere il contatto tra microorganismi e substrato fermentabile (Atasoy et al., 2018; Bengtsson et al.,

2008a; Shen et al., 2017). I tempi di ritenzione ottimali hanno una forte variabilità, oscillando tra le 10 h e i 10 giorni. Per quanto riguarda le acque reflue, le migliori prestazioni si hanno per HRT al di sotto di 5 giorni (Atasoy et al., 2018; Ferrer et al., 2010; Yu and Fang, 2002), mentre per i rifiuti di tipo solido richiedono un tempo maggiore a causa della più lenta fase di idrolisi (Dinsdale et al., 2000; Lim et al., 2008).

Come per il pH, il tempo di ritenzione può essere variato al fine di controllare la composizione degli acidi volatili, come nello studio di Bengtsson et al., (2008a) dove, utilizzando il siero di latte e variando il tempo di residenza da 20 a 95 h, si è notato il cambiamento della distribuzione dei VFA: a 95 h è stata favorita la produzione di acido propionico a scapito del butirrico. Lo stesso risultato è stato riscontrato per le acque di rifiuto da industrie cartarie, incrementando l'HRT da 11 a 24 h (Bengtsson et al., 2008a). Tenuto conto che il tempo di residenza è un parametro fondamentale nella gestione volumetrica ed economica nel bilancio di un impianto, è importante trovare un valore caratteristico, fortemente dipendente dal tipo di substrato in esame, che possa incontrare tutte le esigenze operative ed economiche.

2.4.4 CARICO ORGANICO

Il carico organico rappresenta la quantità di materiale organico, espresso come COD, solidi volatili (SV) o solidi sospesi volatili (SSV), introdotto nel reattore di fermentazione per unità di volume e di tempo (Bhatia and Yang, 2017). In letteratura, l'influenza del carico organico sulla produzione di VFA non è del tutto chiara, ovvero non è ancora chiaro entro quale limite il carico organico beneficia sulla quantità di acidi volatili. Ad esempio, per acque reflue ricche di amido, la concentrazione di VFA cresce linearmente con il carico organico che varia da 1 a 32 $g_{COD}/L \cdot d$ (Yu, 2001), mentre per acque reflue di origine farmaceutica la concentrazione di VFA aumenta aumentando il carico organico da 7 a 13 $g_{COD}/L \cdot d$, subendo un drastico cambiamento per un carico di 14 $g_{COD}/L \cdot d$ (Oktem et al., 2006). Per quanto riguarda l'accumulo di VFA da rifiuti solidi di tipo alimentare, in uno studio condotto da Lim et al., (2008) la concentrazione è aumentata per carichi organici da 5 a 13 $g_{COD}/L \cdot d$, ma a 13 $g_{COD}/L \cdot d$ il processo nel reattore di fermentazione ha presentato forti problematiche operative a causa della viscosità troppo elevata, conseguenza del carico di solidi molto alto. Gli studi indicano come ci sia sempre stata una crescita lineare della concentrazione di acidi volatili con il carico organico fino al raggiungimento di un ottimo, che resta fortemente

dipendente sia dalla tipologia di substrato che dalle scelte operative (Lee et al., 2014). Anche la frequenza di alimento di materiale organico influisce sulla produzione di acidi volatili. Il carico organico, inoltre, influenza la distribuzione percentuale di VFA. Nello studio di Yu (2001), per un carico organico medio ($10 \text{ g}_{\text{COD}}/\text{L}\cdot\text{d}$), l'acido principale è stato l'acetico, seguito dal propionico e dal butirrico, che ha sostituito il propionico per un carico organico pari a $26 \text{ g}_{\text{COD}}/\text{L}\cdot\text{d}$. In generale comunque è quasi sempre l'acido acetico ad essere presente in percentuale maggiore (Lee et al., 2014).

2.5 PROBLEMATICHE LEGATE ALL'ACCUMULO DI ACIDI GRASSI VOLATILI.

La fermentazione acidogenica è un processo teoricamente semplice che però porta con sé problematiche operative con cui confrontarsi. Il tempo di ritenzione che di solito si preferisce basso, deve ben accordarsi con la necessità di avere un tempo sufficiente per promuovere l'idrolisi, che dipende fortemente dalla composizione del substrato. Il pH è un parametro estremamente variabile perché fortemente legato alle variazioni di attività microbica. Di solito nel processo di fermentazione il pH si controlla verso valori alcalini (fino ad un massimo di 12) o acidi (fino a un massimo di 5). Il controllo del pH risulta in un grande dispendio economico che alcune volte rende non conveniente l'intero processo di fermentazione. Anche il carico organico molto spesso causa problemi legati all'accumulo di solidi non degradati che possono ostruire le pompe o il sistema di miscelazione. Tutti questi fattori devono essere presi in considerazione nel bilancio complessivo di scelta dei parametri.

In generale, lo studio delle efficienze di produzione di acidi grassi volatili è fortemente incentrato sulla scelta ottimale di parametri quali pH, tempo di ritenzione, temperatura e carico organico. Gli acidi grassi volatili sono però il risultato di una combinazione studiata di tutti questi parametri che non possono prescindere l'uno dall'altro (Lee et al., 2014). In letteratura non sono presenti linee guida né per la scelta, né per la combinazione dei parametri operativi: ogni studio trova la combinazione ottimale per il particolare substrato in esame. Non sono tanti gli studi che approfondiscono la combinazione di due o più parametri. Ad esempio, Jankowska et al. (2015), hanno studiato l'effetto dei cambiamenti sulla produzione di VFA variando in modo congiunto pH e tempo di residenza, con un HRT pari a 5, 10 e 15 giorni ed un intervallo di pH tra 4 e 12. Successivamente (Jankowska et al., 2017) sono state studiate le risposte di 4 differenti substrati (insilato di mais, siero di latte, biomassa microalgale e glucosio) con un intervallo di pH compreso tra 5 e 11 e con un tempo

di ritenzione fisso, per capire l'effetto del substrato sulla produzione di acidi. Questo studio ha concluso che l'ambiente alcalino favorisce l'idrolisi di molecole organiche complesse mentre il pH neutro beneficia la quantità di VFA. Questi studi dimostrano come sia fondamentale ricercare l'effetto sinergico dei diversi parametri operativi.

2.6 POSSIBILI UTILIZZI DI SURNATANTI ARRICCHITI DI ACIDI GRASSI VOLATILI.

2.6.1 BIOENERGIA

L'aumento della richiesta energetica e la necessità di ridurre le emissioni di gas ad effetto serra giustificano il crescente interesse e il significativo aumento degli studi condotti nel campo delle nuove forme di energia rinnovabile che possono essere prodotte e consumate senza causare un incremento nella concentrazione atmosferica di CO₂ (Costa, 2013). L'utilizzo di rifiuti come substrato per la produzione di biocombustibile ha ricevuto dunque un'attenzione particolare. I VFA rappresentano una risorsa energetica senza costo.

A partire da questi acidi si può generare elettricità in modo diretto attraverso l'utilizzo di celle a combustibile microbiche (MFC – Microbial Fuel Cell), un sistema bio-elettrochimico in cui i microorganismi sfruttano il substrato come fonte di energia.

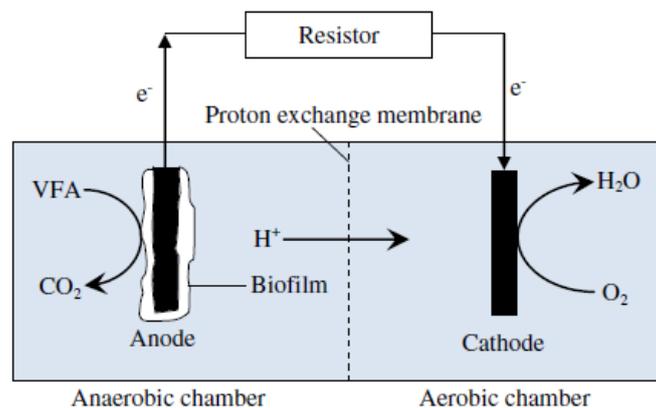


FIGURA 2.2- GENERAZIONE DI ENERGIA ELETTRICA ATTRAVERSO L'USO DI VFA IN MFC (Lee et al., 2014).

Come è rappresentato in Figura 2.2, una cella a combustibile microbica consiste in un anodo che lavora in condizione anaerobiche e un catodo che lavora in condizioni aerobiche, separati da una membrana a scambio protonico. All'anodo è presente un biofilm sul quale i microorganismi ossidano il substrato ricco VFA per generare elettroni, protoni e CO₂. I protoni attraversano la membrana protonica, mentre gli elettroni raggiungono il catodo

attraverso un circuito esterno. Al catodo, gli elettroni si combinano con i protoni e l'ossigeno per produrre acqua. Nella maggior parte delle MFC i surnatanti ricchi di VFA possono essere utilizzati direttamente senza alcun bisogno di trattamenti preliminari (Du et al., 2007).

Un'altra forma di energia che può essere prodotta a partire da acidi grassi volatili è il biogas. Questo gas è naturalmente prodotto durante la fase di metanogenesi della digestione anaerobica. Essendo il processo di fermentazione una delle fasi di quest'ultima, il biogas può essere prodotto in un reattore mono-stadio, tenendo in considerazione che le condizioni di crescita e di attività dei ceppi batterici della fermentazione e della metanogenesi sono estremamente differenti (Lv et al., 2010). Questa problematica può essere risolta dividendo il processo di digestione in due differenti fasi (reattore bi-stadio) in cui vengono imposti parametri operativi differenti. Il risultato è la possibilità di trattare un carico di fango più elevato e il simultaneo recupero di idrogeno dal primo stadio e di metano dal secondo (Cavinato et al., 2011).

Un'altra forma di energia ricavabile a partire dai VFA è l'idrogeno, che viene prodotto sia durante il processo di digestione anaerobica a due fasi, sia attraverso la foto-fermentazione (Zong et al., 2009) e l'elettrolisi (Tuna et al., 2009). La foto-fermentazione è di solito la fase successiva alla dark fermentation (fermentazione in assenza di luce), poiché durante quest'ultima non viene prodotto solo idrogeno, ma anche VFA (Chen et al., 2008). L'elettrolisi di VFA è un'altra opzione per la produzione di idrogeno: attraverso l'applicazione di un voltaggio in corrente, gli elettroni, rilasciati da un elettrodo in metallo, reagiscono con i protoni generati dall'elettrolisi dei VFA al fine di produrre idrogeno.

L'elettrolisi è interessante perché può essere applicata all'interno del reattore di digestione anaerobica, permettendo la produzione di idrogeno *in situ* (Vijayaraghavan and Sagar, 2010).

Anche l'uso di VFA per la produzione di biocombustibili è diventato di particolare interesse negli ultimi studi scientifici. Di solito i biocombustibili sono una fonte di energia ottenuta in modo indiretto dalle biomasse. Sebbene questi combustibili presentino ovvi benefici dal punto di vista ambientale rispetto ai combustibili di origine fossile, esiste ad oggi un dibattito ancora aperto riguardante la competitività economica e l'impatto che determina l'utilizzo di biocombustibili derivanti da colture alimentari sulla disponibilità di cibo a livello mondiale (Demirbas, 2009; Hill et al., 2006). Il biodiesel è costituito da una miscela di esteri alchilici e acidi grassi derivanti dal processo di transesterificazione applicato a oli vegetali o grassi

animali (Demirbas 2007), composti per il 90-98% in peso da trigliceridi. Questi ultimi reagiscono con metanolo a formare esteri. La reazione avviene grazie alla presenza di un catalizzatore alcalino, solitamente idrossido di potassio o di sodio (Demirbas, 2007), e comporta la formazione di glicerolo quale unico sottoprodotto. Alla temperatura di 60°C, la reazione può essere considerata completa in 90 minuti (Campbell, 2008). Si tratta di una reazione molto efficiente poiché è possibile in linea teorica ottenere un chilogrammo di biocombustibile a partire da un chilogrammo di olio (Mata et al., 2010).

Il biodiesel può essere potenzialmente prodotto a partire da qualsiasi sorgente oleaginosa (Campbell, 2008). I maggiori produttori a scala commerciale utilizzano oli di semi quali soia, colza, palma e mais e, solo su scala inferiore, residui alimentari o grassi animali. I lipidi sintetizzati da microorganismi oleaginosi offrono un'interessante alternativa. Sono ancora pochi gli studi che si sono incentrati sulla produzione di lipidi da substrati ricchi di VFA e quelli che l'hanno fatto, per la maggior parte hanno utilizzato substrati sintetici (Fei et al., 2011b, 2011a). Il contenuto di lipidi ottenuto nelle cellule *Cryptococcus curvatus*, in presenza di un substrato ricco di VFA derivanti da fermentazione di rifiuti organici è stato di 13,8% (Chi et al., 2011). La ragione del contenuto così basso di lipidi è stata attribuita al basso rapporto tra carbonio e azoto che non ha favorito la produzione di lipidi, suggerendo una preventiva rimozione dell'azoto. Un altro approccio per aumentare la produzione di lipidi è il controllo della composizione di VFA alimentata: un rapporto tra acido acetico, propionico e butirrico pari a 8:1:1 alimentati ai *Cryptococcus curvatus* hanno portato ad un contenuto di lipidi nelle cellule più elevato (27,8%) rispetto ad un rapporto di 4:3:3 (19,8%), 6:1:3 (27,3%) e 7:2:1 (26,1%) (Fei et al., 2011a).

2.6.2 BIOPLASTICA

La produzione e l'utilizzo di polimeri sintetici di origine petrolchimica dipendono dalla limitata disponibilità di fonti fossili e causano un considerevole impatto ambientale per via della loro scarsa degradabilità biologica. In risposta a questi problemi si è manifestato un crescente interesse verso lo sviluppo di plastiche biodegradabili e di origine rinnovabile (Salehizadeh and Van Loosdrecht, 2004). In questo contesto, i poliidrossialcanoati (*polyhydroxy-alkanoates*, PHA) si sono affermati come uno dei gruppi più promettenti di bioplastiche ecocompatibili. I PHA sono infatti poliesteri (Figura 2.3) (Reis et al., 2011) completamente biodegradabili che possono essere prodotti biologicamente da risorse

rinnovabili e soddisfano dunque i criteri del ciclo di vita chiuso. Sono inoltre l'unica tipologia di bioplastica sintetizzata completamente da microrganismi (Figura 2.3).

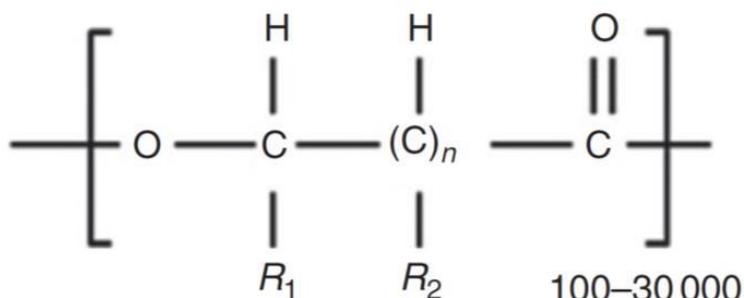


FIGURA 2.3-STRUTTURA CHIMICA DI UN POLIIDROSSIALCANOATO (PHA); N, NUMERO DI ATOMI DI CARBONIO NELLA STRUTTURA LINEARE DEL POLIESTERE; R1 E R2, CATENE LATERALI IDROCARBURICHE VARIABILI (Reis et al., 2011).

Oltre al convenzionale utilizzo come materiale da imballaggio, i PHA possono trovare applicazione anche nel settore medico e farmaceutico. I monomeri che compongono i PHA possono inoltre essere utilizzati per la produzione di biocombustibili o come fonte di nutrienti nell'industria mangimistica e nutraceutica (Chen, 2015). La loro sintesi può essere sia chimica che attraverso processi biologici. La biosintesi di PHA permette di ottenere pesi molecolari significativamente maggiori rispetto a quelli conseguibili con metodi chimici, ma non consente di controllare in modo agevole la struttura dei monomeri che compongono il polimero (Chen, 2015). L'idea di produrre PHA utilizzando colture microbiche miste emerse dal riconoscimento del ruolo dei PHA quali intermedi metabolici nei processi di trattamento delle acque reflue (Salehizadeh and Van Loosdrecht, 2004). I PHA rientrano infatti tra i principali prodotti di trasformazione del carbonio che si verificano durante il trattamento biologico a fanghi attivi. Data la naturale presenza di microrganismi PHA-accumulanti nei processi a fanghi attivi e l'ampia diffusione di tali processi nei servizi di gestione della qualità dell'acqua, gran parte della ricerca relativa alla produzione di PHA per via biologica ha gravitato intorno al trattamento delle acque reflue, offrendo per altro la possibilità di utilizzare e valorizzare residui di processo, rifiuti e reflui (Valentino et al., 2017).

La principale voce dei costi di produzione di PHA è quella relativa al substrato alimentato alle colture batteriche, che contribuisce fino al 40% del costo complessivo. I substrati utilizzati nei processi industriali consolidati sono nella maggioranza dei casi zuccheri puri (ad esempio glucosio, saccarosio) o altri composti a base di carboidrati (ad esempio grano, mais), contraddistinti da elevati prezzi di mercato (Serafim et al., 2008).

Negli ultimi anni, si è assistito ad un crescente interesse della comunità scientifica nell'indagare potenziali processi alternativi per ridurre il costo di produzione dei polimeri. L'alternativa che ha ricevuto maggiore attenzione è l'utilizzo di colture microbiche miste (*Mixed Microbial Culture*, MMC) e di substrati dal ridotto valore commerciale, quali materie prime di recupero che non competano direttamente con colture alimentari, e che hanno dato risposte anche migliori rispetto a colture pure (Serafim et al., 2008).

Nel processo di produzione di PHA i gruppi microbici sono sottoposti ad un ciclo di *Feast and Famine*, che prevede l'alternarsi di periodi caratterizzati da eccesso e carenza del substrato organico alimentato dall'esterno. In condizioni anaerobiche, i microrganismi assimilano il substrato carbonioso e lo immagazzinano attraverso la sintesi di PHA, accompagnata dal consumo simultaneo di glicogeno. I PHA accumulati sono utilizzati nella successiva fase aerobica per la crescita e il mantenimento cellulare, e per il reintegro della riserva di glicogeno.



FIGURA 2.4 - RAPPRESENTAZIONE SCHEMATICA DEL TIPICO PROCESSO A 3 FASI UTILIZZATO PER LA PRODUZIONE DI PHA TRAMITE MMC (ADATTATA DA REIS ET AL. 2011). LE LINEE CONTINUE RAPPRESENTANO FLUSSI LIQUIDI, QUELLE TRATTEGGIATE I FLUSSI DI BIOMASSA.

Le fasi di selezione della biomassa e di accumulo del polimero non possono prescindere dalla disponibilità di un substrato organico rapidamente assimilabile. Uno dei vantaggi generalmente menzionati relativamente all'utilizzo di MMC è la possibilità di superare la

dipendenza dall'utilizzo di substrati costosi, sfruttando materie prime di recupero. A differenza delle colture microbiche pure, le MMC hanno dimostrato di preferire i VFA quale substrato per la produzione di PHA. La produzione di VFA tramite fermentazione acidogenica è quindi necessaria per convertire sostanze organiche complesse (carboidrati, lipidi e proteine) in un influente chimicamente più uniforme, che possa essere utilizzato per le successive fasi di selezione e accumulo (Serafim et al., 2008; Valentino et al., 2017). La composizione della miscela di VFA resa disponibile per i microrganismi PHA-accumulanti influenza la composizione del polimero che a sua volta si ripercuote sulle sue proprietà fisiche e meccaniche.

Prima che un surnatante ricco di acidi grassi volatili possa essere utilizzato quale fonte, è importante regolare la quantità di ammonio e fosforo al suo interno, poiché un eccessivo contenuto può favorire la crescita dei microorganismi accumulanti a scapito della produzione di PHA. Un approccio interessante è quello della rimozione simultanea di azoto e fosforo tramite precipitazione di struvite, che in alcuni studi non ha determinato perdite rilevanti di acidi volatili (Mengmeng et al., 2009). Oltre al contenuto di nutrienti, il substrato ricco di VFA necessita di essere filtrato per eliminare la frazione particolata che può influire sulla bassa efficienza di produzione di PHA.

Relativamente ai contenuti di PHA della biomassa (riscontrati a seguito della fase di accumulo), si riportano in letteratura valori compresi tra 0,20 e 0,75 g_{PHA}/g_{SST} . Tali valori sono ricavati a partire da biomasse di diversa origine e da un ampio spettro di soluzioni di VFA. In generale, contenuti di PHA compresi tra 0,45 e 0,55 g_{PHA}/g_{SST} sembrano essere conseguibili stabilmente utilizzando flussi di VFA derivanti da rifiuti o sottoprodotti residui in combinazione con colture microbiche miste all'aperto (Valentino et al. 2017).

2.6.3 RIMOZIONE BIOLOGICA DEI NUTRIENTI

I VFA rappresentano un importante substrato carbonioso utile nei processi interni alla filiera di impianto come quelli biologici di rimozione di azoto e di fosforo. L'azoto convenzionalmente viene rimosso dalle acque reflue tramite la nitrificazione aerobica seguita dalla denitrificazione anossica, il fosforo invece viene rimosso in sistemi di rimozione biologica (EBPR), processi che vengono condotti alternando condizioni aerobiche ed anaerobiche. Per entrambi i processi è spesso necessario utilizzare una fonte di carbonio esterna, in quanto quella presente nelle acque reflue non è abbastanza per garantire il necessario rapporto di carbonio e nutrienti. I surnatanti ricchi di VFA possono quindi essere

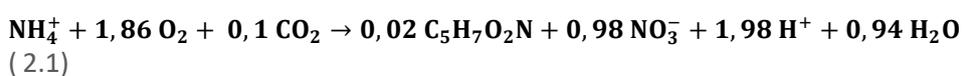
utilizzati come fonte di carbonio prontamente degradabile. Di seguito si approfondisce la sola rimozione di azoto, ma in generale substrati provenienti da fermentazione acidogenica sono utilizzati anche nella rimozione biologica di fosforo.

2.6.3.1 PROCESSO DI DENITRIFICAZIONE

Nell'ambito dei trattamenti per la rimozione specifica dell'azoto organico e ammoniacale negli impianti di trattamento di reflui civili, si opera prevalentemente un processo di tipo biologico di nitrificazione/denitrificazione. Sono inoltre possibili anche trattamenti chimici quali la precipitazione chimica e lo strippaggio dell'ammoniaca.

In particolare, il processo biologico di rimozione dell'azoto ammoniacale opera le trasformazioni presenti nei cicli naturali: una fase ossidativa di nitrificazione con formazione di nitriti e quindi nitrati, seguita da una fase riduttiva di denitrificazione ad azoto molecolare. La nitrificazione avviene ad opera di due diverse specie di batteri autotrofi aerobici obbligati, i primi appartenenti ai generi Nitrosomonas per l'ossidazione dell'ammoniaca a nitriti, i secondi appartenenti ai generi Nitrobacter che ossidano i nitriti a nitrati.

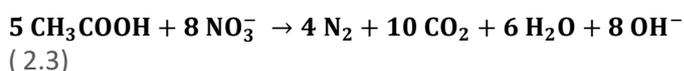
E complessivamente tenendo conto anche della sintesi batterica la reazione è la seguente:



Il passo successivo per la rimozione biologica dell'azoto è la denitrificazione operata generalmente da batteri eterotrofi dei generi Pseudomonas che utilizzano i nitriti ed i nitrati come accettori di elettroni nell'ossidazione biologica dei composti organici biodegradabili. La rimozione avviene per stadi, a partire dagli ioni nitrato passando per gli ioni nitrito, all'ossido nitrico, all'ossido nitroso, arrivando infine all'azoto gassoso.



La reazione di denitrificazione è di solito condotta utilizzando una fonte di carbonio esterna, ad esempio il metanolo ma anche acido acetico. La reazione con acido acetico è la seguente:



Contrariamente al processo di nitrificazione, che consuma alcalinità, il processo di denitrificazione eterotrofa produce 3,57 g CaCO₃ di alcalinità per ogni grammo di ridotto, reintegrandone così circa la metà di quello consumato in nitrificazione.

Per la denitrificazione quindi è necessario un apporto di carbonio organico che può essere:

- carbonio esterno prontamente degradabile (metanolo, acido acetico, miscele idroalcoliche),

- carbonio endogeno costituito dalla componente organica biodegradabile risultante da fenomeni di lisi cellulare, mantenuto in condizioni endogene.

L'efficienza di rimozione è quindi governata dalla presenza di carbonio prontamente biodegradabile, il cui rapporto con l'azoto richiesto è variabile rispetto al tipo di carbonio utilizzato.

Come già precedentemente sottolineato, di solito nel processo di denitrificazione il carbonio presente nelle acque reflue non è abbastanza per garantire un rapporto COD/N adeguato. L'effetto del rapporto C/N (carbonio/azoto) su risultati di denitrificazione è stato ampiamente studiato: ad esempio un rapporto di 2:1 è sufficiente per la completa denitrificazione usando acido acetico e propionico come fonti di carbonio (Elefsiniotis et al., 2004). Da un punto di vista stechiometrico, sono necessari 2,86 g_{COD} per la rimozione completa di 1 g di N-NO₃, ma a causa della sintesi batterica, nella pratica è necessario più carbonio (Dangcong et al., 2004) . Ad esempio Carrera et al. (2004) hanno trovato che il rapporto tra il COD e l'azoto influenza fortemente la buona riuscita della denitrificazione: nel loro studio è stato necessario un rapporto COD/N pari a 7,1 g_{COD}/g_N per denitrificare tutto il carico di azoto.

Tenuto conto di ciò, esistono criteri differenti nella scelta della fonte di carbonio esterna. La Tabella 2.3 riassume i principali tassi di denitrificazione con fonti di carbonio sintetiche e ricche di VFA provenienti da fermentazione acidogenica.

TABELLA 2.3 - TASSI DI DENITRIFICAZIONE PER DIVERSE FONTI DI CARBONIO ORGANICO (adattato da Elefsiniotis et al., 2004)

Fonte di C organico	Tasso di Denitrificazione	Riferimento
Metanolo	0,289 g NO ₃ -N/g SSV per d	(Yatong, 1996)
Metanolo	2,0 g NO ₃ -N/m ² per d	(Aspegren et al., 1998)
Metanolo	1,9 kg NO ₃ -N/m ³ per d	(Rajapakse and Scutt, 1999)
Acetato	2,1 kg NO ₂ -N/m ³ per d	(Rahmani et al., 1995)
Acetato	0,603 g NO ₃ -N/g SSV per d	(Yatong, 1996)
Acetato	0,091 g NO ₃ -N/g COD _{tot} per d	(Moser-Engeler et al., 1998)
Propionato	0,041 g NO ₃ -N/g COD _{tot} per d	(Moser-Engeler et al., 1998)
Propionato	0,362 g NO ₃ -N/g SSV per d	(Yatong, 1996)
Acetato e propionato	0,014 g NO _x -N/g SSV per d	(Li, 2001)
Butirato	0,519 g NO ₃ -N/g SSV per d	(Yatong, 1996)
Valerato	0,487 g NO ₃ -N/g SSV per d	(Yatong, 1996)
Mix VFA	0,36 g NO ₃ -N/g SS per d	(Fass et al., 1994)
Mix VFA	0,754 g NO ₃ -N/g SSV per d	(Yatong, 1996)
Effluente VFA	0,57 g NO ₃ -N/g VS per d	(Æsøy, A., Ødegaard, 1994)
Effluente VFA	0,22 g NO _x -N/g MLSS per d	(Hatziconstantinou et al., 1996)
Effluente VFA	0,144 g NO ₃ -N/g COD _{tot} per d	(Moser-Engeler et al., 1998)
Effluente VFA	0,28 g NO ₃ -N/g SSV per d	(Pavan et al., 1998)
Effluente VFA	0,054 g NO ₃ -N/L g SSV per d	(Llabres et al., 1999)

I tassi di denitrificazione della tabella sovrastante sono diversi tra loro anche per lo stesso substrato carbonioso a causa delle diverse unità di misura utilizzate, le diverse configurazioni impiantistiche per gli studi di laboratorio (modalità continua, batch o SBR), le diverse temperature e origini dei substrati carboniosi (rifiuti organici, acque reflue etc.). Anche la distribuzione degli acidi volatili influenza l'efficienza di denitrificazione. Li et al. (2015) hanno studiato come il tasso migliore di denitrificazione si è ottenuto con acido acetico e propionico. Zheng et al. (2010) hanno confrontato le efficienze di rimozione di azoto e fosforo utilizzando surnatanti ricchi di VFA provenienti da fermentazione di fanghi e surnatante sintetico di acetato. Il primo ha definito il tasso di rimozione più alto di quello che ha utilizzato acetato sintetico (82% di rimozione di azoto e 95% per il fosforo). Anche a scala reale le esperienze hanno sottolineato come l'uso di surnatanti ricchi di VFA risultano in efficienze simili se non uguali a quelle ottenute con acido acetico sintetico (Liu et al., 2018).

2.7 LE MICROALGHE NEL CAMPO DELLE ACQUE DI RIFIUTO.

Le microalghe sono un insieme di organismi estremamente eterogeneo, appartenenti a diversi gruppi tassonomici non correlati e sono pertanto descritte come una forma di vita (Borowitzka, 2018). Sono definite come microrganismi unicellulari fotoautotrofi, contenenti clorofilla 'a' quale pigmento fotosintetico principale, capaci di utilizzare l'energia solare per fissare l'anidride carbonica e produrre composti organici (Borowitzka, 2018).

Di tutte le specie microalgali conosciute, solo una frazione limitata (alcune migliaia) può essere mantenuta vitale in colture controllate; un numero ancor più limitato di specie è stato coltivato con successo a scala industriale (Becker E., 2004).

La composizione chimica delle cellule algali può variare in intervalli piuttosto ampi. La frazione relativa dei diversi costituenti dipende fortemente da come si è sviluppata la crescita algale, influenzata a sua volta da svariati fattori ambientali. Tra i più importanti si annoverano la temperatura, l'illuminazione, il pH, la presenza di nutrienti minerali e l'approvvigionamento di CO₂ (Becker E., 1994). I componenti maggiormente analizzati dai diversi studi sono i carboidrati, le proteine e i lipidi. La grande variabilità sia in termini di specie analizzate che di condizioni di crescita rende il confronto particolarmente arduo. In questa sede si è preferito dedicare maggiore attenzione ai sistemi di coltivazione microalgale e soprattutto all'integrazione della coltivazione di microalghe con impianti di trattamento di acque reflue, che si è rivelata essere un'efficace soluzione per ridurre gli oneri associati alla depurazione dei reflui e produrre contemporaneamente biomassa algale dal valore commerciale appetibile.

2.7.1 COLTIVAZIONE DI MICROALGHE.

Un sistema di coltivazione delle microalghe prevede una fase di coltivazione seguita dalla separazione, trattamento, accumulo, trasporto ed infine valorizzazione della biomassa (Jankowska et al., 2017). In

Figura 2.5 è riassunto il metodo di coltivazione, trattamento e valorizzazione della biomassa microalgale.

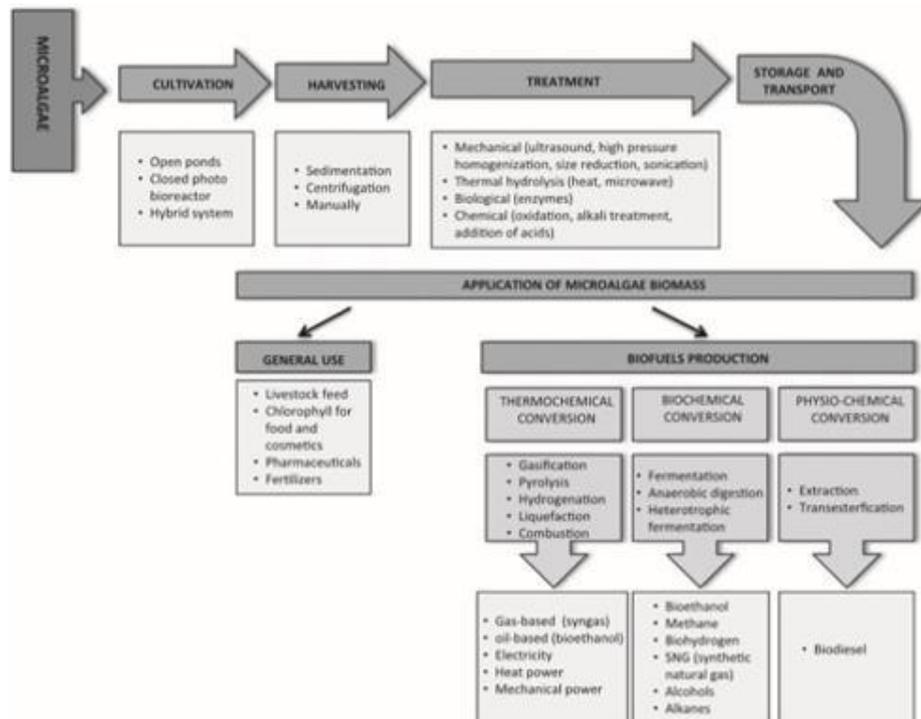


FIGURA 2.5 - SCHEMA DELL'INTERA FILIERA TRADIZIONALE DI COLTIVAZIONE, SEPARAZIONE, STOCCAGGIO E VALORIZZAZIONE DELLA BIOMASSA ALGALE (JANKOWSKA ET AL., 2017).

Fase di coltivazione

I sistemi di coltivazione usati più di frequente a scala industriale e di laboratorio sono i seguenti:

- reattori aperti: raceway ponds (vasche a circuito chiuso), HRAP (vasche ad alto carico);
- reattori chiusi: PBR (fotobioreattori);
- sistemi ibridi.

I reattori aperti vengono in genere utilizzati per il trattamento delle acque reflue. Sono caratterizzati da un basso costo di costruzione, installazione e manutenzione ma non possono essere utilizzati se si vogliono ottenere coltivazioni pure. Oltre ai rischi di contaminazione, tra le controindicazioni nell'uso di reattori aperti c'è l'impossibilità di gestire i parametri operativi, di prevenire il rischio di predazione delle microalghe, l'evaporazione del medium e i fattori limitanti la crescita quali la presenza di macro e micronutrienti, temperatura, luce, composti tossici. La produzione massima ottenibile è di circa 10-25 g_{ST}/m²·d (Marazzi, F., 2017).

I sistemi di coltivazione chiusi, comunemente chiamati fotobioreattori (PBR) si classificano ulteriormente a seconda della loro forma. I sistemi esistenti possono essere tubolari, essere costituiti da pannelli o da una colonna con gorgogliamento. Il principale vantaggio offerto dai PBR è costituito dalla possibilità di controllare efficacemente i parametri operativi e di crescita, potendo raggiungere in questo modo produzioni di biomassa comprese tra i 20 e i 100 g_{ST}/m²·d (Jankowska et al., 2017). Tra le maggiori controindicazioni nell'uso di reattori chiusi ci sono i costi operativi e di manutenzione, che rendono questi sistemi applicabili solo nel caso di coltivazione a scopi alimentari o per l'estrazione di molecole di alto valore.

Infine esistono sistemi di coltivazione ibridi, in cui il ruolo del reattore chiuso è quello di far sviluppare in modo controllato la specie algale desiderata che viene poi inoculata nel reattore aperto, questa scelta tecnologica offre la possibilità di poter selezionare nella colonna la comunità algale desiderata e di poter in parte regolare i parametri operativi, ma è meno onerosa rispetto ai PBR per quanto concerne l'area totale occupata e i costi operativi (Jankowska et al., 2017).

Per quanto riguarda la modalità di coltivazione, nella produzione su larga scala la condizione impiantistica preferenziale è costituita dalla produzione in continuo in quanto non è necessario ripristinare le condizioni iniziali di partenza del bioreattore al termine di ogni ciclo.

Per quanto riguarda invece la coltivazione microalgale all'interno di impianti di depurazione acque, essa si inserisce come un promettente modello di economia circolare (Nizami et al., 2017): viene sfruttata la capacità di biorisanamento delle microalghe per effettuare una parte del processo depurativo delle acque reflue e si ottiene biomassa che può essere valorizzata per la produzione di biocombustibili, VFA e fertilizzanti, rendendo la produzione di questi prodotti economicamente competitiva rispetto ai prodotti derivati dal petrolio (Montingelli et al., 2015).

Per via della loro composizione biochimica e del loro alto rateo di crescita, le microalghe sono in grado di rimuovere i composti dell'azoto e del fosforo con grandi efficienze. Questi nutrienti vengono assimilati per la crescita algale riducendo al contempo il rischio di eutrofizzazione dei corpi idrici ricettori e di inquinamento delle falde acquifere. Hena et al. (2015) hanno misurato percentuali di rimozione di NH₄⁺, NO₃⁻ e PO₃⁻ su refluo chiarificato rispettivamente di 100%, 99,4% e 98,8%. In acque municipali le efficienze di rimozione

di N_{TOT} e PO_4^{3-} sono sempre molto alte, superiori al 70% (Delgadillo-Mirquez et al., 2016; Kim et al., 2014).

In condizioni di crescita autotrofe la CO_2 può essere fornita attraverso lo scambio con l'atmosfera oppure in presenza di attività industriali tramite insufflazione di un gas di scarico. Anche per quanto riguarda le efficienze di rimozione del COD, in presenza di alghe eterotrofe o consorzi alghe-batteri, queste si attestano sempre al di sopra del 90% (Hena et al., 2015; Kim et al., 2014).

All'interno degli impianti di depurazione le microalghe vengono coltivate in reattori aperti di tipo HRAP (High Rate Algal Pond) o reattori raceway convenzionali. I primi sono dimensionati per ottimizzare la crescita delle alghe, sono profondi dai 30 ai 100 cm, hanno un HRT compreso tra i 4- 10 giorni e la velocità dell'acqua al loro interno va dai 10-30 cm/s. I reattori raceway tradizionali sono analoghi ma più profondi e hanno un grado di turbolenza minore per ridurre i costi di esercizio e la superficie totale a parità di volume del reattore, nonostante le concentrazioni della biomassa si attestino solitamente tra 0.5-1 g_{ST}/L rappresentano la soluzione ad oggi più comunemente utilizzata (Rawat et al., 2011).

I fattori che determinano la crescita algale e di conseguenza l'efficienza di rimozione degli inquinanti dalle acque sono l'intensità luminosa, la temperatura, la biodisponibilità dei nutrienti la quale dipende sia dalla concentrazione a cui si trovano che dalla loro forma (Gonçalves et al., 2017) e il pH, che ha effetto non solo sull'attività metabolica delle alghe ma anche sulla biodisponibilità di alcuni elementi.

In realtà le condizioni di crescita sopra descritte non permettono mai lo sviluppo delle sole alghe all'interno dei raceway, si parla infatti più correttamente di biorisanamento ad opera di popolazioni miste costituite da alghe e batteri. Tra questi microrganismi si instaura una relazione simbiotica in cui le microalghe producono tramite la fotosintesi l'ossigeno necessario ai batteri per la degradazione della materia organica, riducendo i costi di insufflazione dell' O_2 all'interno del reattore, mentre la CO_2 prodotta dalla degradazione aerobica della materia organica da parte dei batteri costituisce il substrato per il metabolismo delle alghe (Gonçalves et al., 2017). Le popolazioni formate da consorzi alghe-batteri si sono dimostrate essere più efficienti rispetto a popolazioni singole nella rimozione di nutrienti, nella resilienza rispetto alle perturbazioni delle condizioni ambientali o a periodi di carenza di nutrienti, risultando inoltre meno vulnerabili rispetto all'invasione di

altre specie e di predatori. Inoltre la loro tendenza a flocculare rende la loro separazione dal medium di crescita più economico ed efficace (Pires et al., 2013).

Fase di separazione della biomassa coltivata

A valle del processo di separazione, la biomassa concentrata raggiunge indicativamente concentrazioni che variano tra i 20 ai 700 g_{ST}/L per le applicazioni a scala di laboratorio (Saharan et al., 2013). I costi di separazione della biomassa solitamente costituiscono il 20-30% dei costi di produzione e la scelta delle modalità e della tecnologia appropriata dipende dalla specie algale, dalla densità della coltura, dall'uso successivo della biomassa e dalle condizioni di coltivazione (Jankowska et al., 2017). Per prodotti dal basso valore commerciale la decantazione per gravità è la scelta più comunemente utilizzata per via dei bassi costi, nonostante le basse concentrazioni raggiungibili; l'efficienza di separazione può essere aumentata attraverso flocculazione tramite dosaggio di addensanti organici e inorganici. Per la produzione di prodotti ad alto valore commerciale, come prodotti alimentari o per l'acquacoltura, vengono utilizzate di solito centrifughe operanti in continuo (Pahl et. al, 2012).

Oltre ai costi operativi e alle efficienze di separazione conseguibili, bisogna tenere in considerazione le caratteristiche della specie da separare, come ad esempio lo stato di integrità dell'alga a seguito del processo di separazione, che a seconda degli usi può essere considerato prioritario e portare all'esclusione di metodi particolarmente aggressivi come la centrifugazione (Jankowska et al., 2017).

2.7.2 INTEGRAZIONE DELLA BIOMASSA MICROALGALE CON PROCESSI DI DIGESTIONE ANAEROBICA: LA CO-FERMENTAZIONE

Tra i processi di valorizzazione della biomassa microalgale, la digestione anaerobica è quella che rappresenta il modo più diretto per ottenere un biocombustibile a partire da biomassa algale (Montingelli et al., 2015). Il processo di digestione anaerobica è stato spiegato in precedenza al paragrafo 2.2.

Sebbene studi teorici (Sialve et al., 2009) e sperimentali (Mussgnug et al., 2010) ne hanno evidenziato il grande potenziale, la produzione di biogas da biomassa algale è ancora lontana dalla commercializzazione (Murphy et al., 2015). Nel settore delle microalghie, la ricerca si è concentrata principalmente sulla produzione di biocombustibili liquidi (in particolare biodiesel) cosicché, fino al decennio scorso, la letteratura disponibile

relativamente alla produzione di biogas risultava particolarmente povera (Montingelli et al., 2015; Murphy et al., 2015; Sialve et al., 2009). Ciò nonostante si assiste attualmente ad un crescente interesse nei confronti della digestione anaerobica, motivato da alcuni vantaggi che questa tecnologia di conversione offre.

L'integrazione della digestione anaerobica in sistemi di coltivazione microalgali offre l'opportunità di migliorare il bilancio economico ed energetico della filiera produttiva (Murphy et al., 2015). Contestualmente alla produzione di biogas si verifica infatti la mineralizzazione dei nutrienti (azoto e fosforo) che, con la degradazione delle cellule algali, vengono rilasciati nella fase liquida del digestato e possono essere riciclati insieme ad esso all'unità di coltivazione. Alcántara et al. (2013) hanno dimostrato come, implementando un sistema combinato di coltivazione e digestione anaerobica, si possano recuperare sotto forma di $N - NH_4^+$ $P - PO_4^{3-}$ rispettivamente il 65% e l'83% dell'azoto e del fosforo presenti nella biomassa.

Un altro grande vantaggio associato alla produzione di biogas da microalghe è che non sono strettamente necessarie colture pure, né è necessario che le specie microalgali coltivate siano in grado di accumulare specifici composti. Al contrario, i sistemi finalizzati alla produzione di biodiesel richiedono la coltivazione di specie in grado di accumulare elevate quantità di lipidi (Murphy et al., 2015). Questa tecnologia può quindi essere molto efficace in situazioni quali trattamenti integrati di acque reflue, in cui le alghe sono coltivate in condizioni scarsamente controllate o difficilmente controllabili, utilizzando ceppi microalgali non ottimizzati per la produzione di lipidi (Gouveia, 2011).

Il potenziale associato alla digestione anaerobica delle microalghe può essere compreso determinandone la composizione e dando particolare attenzione ai limiti associati ad una biomassa che molte volte presenta problematiche circa l'idrolisi della parete cellulare (Marques, et al., 2011).

La parete cellulare delle alghe ha una struttura complessa, estremamente variabile e tuttavia poco studiata. I maggiori componenti della parete delle specie algali studiate risultano essere i carboidrati, tra cui principalmente cellulosa, emicellulosa e zuccheri neutri (Torres, et al., 2016); la distribuzione di questi ultimi risulta specie-specifica e la percentuale di proteine può variare tra l'1% per alcune specie di *Chlorella* fino a superare il 30% w/w per alcune specie del genere *Pleurastrum* (Blumreisinger et al., 1983)

TABELLA 2.4 - COMPOSIZIONE DELLA PARETE CELLULARE E PERCENTUALE IN PESO RISPETTO ALLA CELLULA. ADATTATA DA (Torres, et al., 2016)

Specie algale	Parete cellulare	Composizione parete cellulare		
	% w/w	% Carboidrati	% Proteine	% ND ¹
<i>Chlorella vulgaris</i> (acqua dolce)	20,00	30,00	2,46	67,54
<i>Chlorella vulgaris</i> (acqua salata)	26,00	35,00	1,73	63,27
<i>Chlorella</i> <i>saccharophila</i>	-	54,00	1,70	44,30
<i>Chlorella fusca</i>	-	68,00	11,00	20,00
<i>Chlorella fusca</i>	-	80,00	7,00	13,00
<i>Scenedesmus obliquus</i>	-	39,00	15,00	46,00
<i>Kirchneriella lunaris</i>	23,00	75,00	3,96	21,04
<i>Klebsormidium</i> <i>flaccidum</i>	36,70	38,00	22,60	39,40
<i>Ulothrix belkæ</i>	25,00	39,00	24,00	37,00
<i>Pleurastrum terrestre</i>	41,00	31,50	37,30	31,20
<i>Pseudendoclonium</i> <i>basiliense</i>	12,80	30,00	20,00	50,00
<i>Monoraphidium</i> <i>braunii</i>	-	47,00	16,00	37,00

¹ ND comprende l'insieme di acidi uronici, glucosammine e composti non determinati.

Le alghe più facilmente idrolizzabili risultano essere quelle senza parete o con parete proteica; al contrario esistono alghe particolarmente refrattarie all'idrolisi a causa della presenza di biopolimeri particolarmente resistenti che oggi vengono indicati con il nome di "algaenan biopolymers" (Torres, et al., 2016).

Nonostante le proprietà intrinsecamente attraenti che caratterizzano il processo di digestione anaerobica, il valore economico aggiunto associato al biogas prodotto può essere limitato. Ciò giustifica l'interesse verso lo sviluppo di processi alternativi che consentano di ottenere prodotti finali dal maggiore valore commerciale, come possono essere i processi di produzione di VFA.

In generale, la produzione di VFA da substrati organici complessi è un processo anaerobico che coinvolge le fasi iniziali della degradazione anaerobica, ovvero idrolisi e acidogenesi (Figura 2.1). Come già discusso, durante l'idrolisi i polimeri organici complessi presenti nel substrato fermentabile vengono scomposti in monomeri dagli enzimi extracellulari escreti

dai microrganismi idrolitici. Successivamente, i monomeri sono fermentati dai batteri acidogeni a formare principalmente acidi organici volatili. Idrolisi e acidogenesi sono generalmente realizzate simultaneamente in un unico reattore anaerobico. Come già esposto in precedenza, non è tuttora chiaro quale sia la matrice più adatta per la produzione di VFA, stante le differenti condizioni operative adottate nell'ambito dei vari studi e diversi criteri prestazionali utilizzati per valutare la produzione di VFA (Lee et al., 2014).

La biomassa microalgale coltivata su acque reflue a scopi di biorisanamento è disponibile con continuità durante gran parte dell'anno, a seconda delle condizioni climatiche, e le sue caratteristiche soddisfano tendenzialmente i criteri di selezione di substrati per la fermentazione acidogenica. Ciò nonostante, non si è manifestato in passato un particolare interesse verso l'utilizzo delle microalghe per la produzione di VFA cosicché, come già anticipato, la letteratura scientifica al riguardo è piuttosto povera (Gruhn et al., 2016). Un aspetto interessante connesso alla fermentazione di biomassa microalgale è la produzione relativamente alta di acido propionico e butirrico, che caratterizza i substrati ricchi di proteine quali le microalghe (Gonzalez-Fernandez et al., 2015). La presenza all'interno della miscela fermentata di acidi grassi volatili caratterizzati da un numero dispari di atomi di carbonio (quale l'acido propionico) è di fondamentale importanza poiché determina la presenza di idrossivalerato nella catena polimerica e quindi risulta ottimale nel processo di produzione dei PHA (paragrafo 2.6.2). In riferimento alla produzione di VFA dalla fermentazione di biomassa microalgale non esiste una letteratura sufficientemente robusta, cosicché un'analisi dettagliata degli effetti derivanti da specifiche condizioni di processo potrebbe risultare fuorviante. In ogni caso, in Tabella 2.5 si riportano i principali risultati dei rari studi disponibili in letteratura relativamente alla fermentazione acidogenica di biomassa microalgale.

TABELLA 2.5 - CONDIZIONI OPERATIVE E RELATIVE PRODUZIONI DI VFA DA BIOMASSA MICROALGALE.

Specie	Modalità di digestione	T (°C)	Pretrattamento	pH	Resa di acidificazione	Referenza
Biomassa algale mista	Batch	35	Nessuno	6,9	0,10	(Cho et al., 2015)
<i>Desmodesmus sp.</i> , <i>Scenedesmus sp.</i>	Batch	45	Nessuno	6,9	0,12 g _{VFA} /g _{VS}	(Cho et al., 2015)
<i>Chlamydomonas sp.</i>	Batch	35	Nessuno	6,5	0,34 g _{VFA} /g _{VS}	(Cho et al., 2015)
	Batch	35	Nessuno	6,5	0,47 g _{VFA} /g _{VS}	(Cho et al., 2015)
<i>Mycrocystis sp.</i>	Batch	35	Alcalino (pH 11)	6,5	0,54 g _{VFA} /g _{VS}	(Cho et al., 2015)
	Batch	35	Termo-alcalino (pH 12, 60°C)	6,5	0,47 g _{VFA} /g _{VS}	(Cho et al., 2015)
	Batch	35	Nessuno	5	0,22 g _{VFA} /g _{VS}	(Gruhn et al., 2016)
<i>Scenedesmus sp.</i>	Continua	35	Nessuno	4,4	0,171 g _{COD-VFA} /g _{VS}	(Gruhn et al., 2016)
	Continua	55	Nessuno	4,4	0,088 g _{COD-VFA} /g _{VS}	(Gruhn et al., 2016)
<i>Chlorella sp.</i>	Batch	25	Estrazione lipidi	8	0,6 g _{VFA} /g _{VS}	(Li et al., 2013)

Tenuto conto di tutte le premesse esposte in questo capitolo, in Figura 2.6 si riporta un esempio possibile di layout impiantistico di un processo integrato di trattamento acque reflue, coltivazione alghe e valorizzazione della biomassa. I fanghi misti (primari e biologici) vengono introdotti in parte al digestore anaerobico ed in parte al fermentatore. Terminato il processo di digestione, il surnatante, ricco di nutrienti, viene alimentato al sistema di coltivazione delle microalghe.

La biomassa algale cresciuta all'interno del raceway, dopo aver subito una separazione solido/liquido, viene introdotta nel fermentatore, dove, insieme ai fanghi misti, produce un substrato ricco di VFA. Il separato liquido del fermentato viene quindi introdotto nella vasca di denitrificazione come fonte di carbonio necessaria al processo di rimozione dell'azoto.

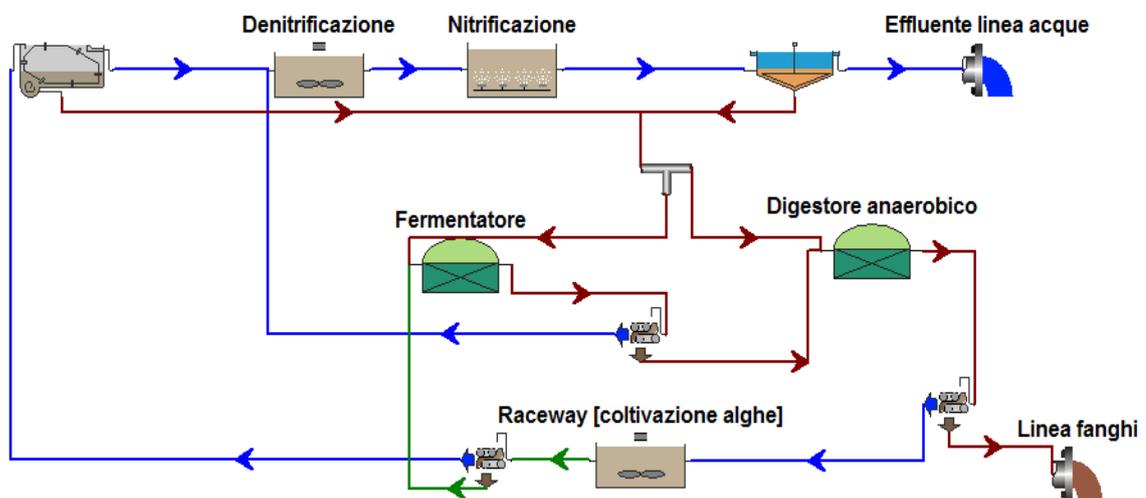


FIGURA 2.6 - POSSIBILE LAYOUT IMPIANTISTICO DI UN PROCESSO INTEGRATO DI DEPURAZIONE ACQUE REFLUE COLTIVAZIONE ALGHE E PRODUZIONE DI VFA.

3. MATERIALI E METODI

3.1 CARATTERISTICHE E ORIGINE DEI MATERIALI

La sperimentazione è stata svolta interamente presso il laboratorio “A.Rozzi” del Politecnico di Milano, Polo di Cremona (Cr). L’origine dei campioni di fango è descritta a seguire.

3.1.1 FANGO MISTO (PRIMARIO E BIOLOGICO)

Il fango misto (ovvero il fango prelevato da un sedimentatore che riceve anche il fango secondario ed è dunque costituito da una miscela di fango primario e di fango biologico) utilizzato nelle prove di fermentazione e nelle prove di BMP proviene da due impianti situati nell’area nord del comune di Milano: l’impianto di trattamento delle acque reflue di Bresso-Niguarda e quello di Sesto San Giovanni, entrambi gestiti dalla società GRUPPO CAP HOLDING – Amiacque (Appendice). Il fango è stato trasportato e conservato in taniche di plastica e conservato in frigorifero alla temperatura di 4 °C fino al momento dell’utilizzo. In tutte le prove svolte, i fanghi sono stati pretrattati per evitare l’intasamento delle pompe attraverso setacciamento (setaccio 2 mm) e successivamente ispessiti staticamente per aumentare il contenuto dei solidi sospesi in base all’esigenza delle prove sperimentali. Le analisi di caratterizzazione esposte di seguito sono quindi riferite al fango pretrattato. Nella Tabella 3.1 sono indicati i principali parametri di caratterizzazione in corrispondenza delle raccolte agli impianti in esame.

TABELLA 3.1 - CARATTERIZZAZIONE DEI CAMPIONI DI FANGO MISTO PRELEVATI DAL DEPURATORE NIGUARDA – BRESSO E DI SESTO SAN GIOVANNI].

	UM	Bresso- Niguarda 7/01/2019 raccolta#1	Bresso- Niguarda 1/03/2019 raccolta#2	Sesto San Giovanni 24/04/2019 raccolta#3	Sesto San Giovanni 27/05/2019 raccolta#4	Sesto San Giovanni 2/07/2019 raccolta#5
pH	-	5,99	6,7	5,5	5,52	5,74
Alcalinità	mg _{CACO3} /L	2377	2703	1139	1200	1334
VFA	mg _{COD} /L	1035	1055	2290	1590	1200
FOS/TAC	mg _{CH3COOH} /mg _{CACO3}	0,5	0,4	2	1,3	0,9
ST	g/kg	38,1	34,8	34	39	41
SV	g/kg	26	24	28	30	30
CODtot	g/kg	nd	nd	37	40	43
CODsol	mg/L	2150	2240	4100	2600	2300
N-NH ₄ ⁺	mg/L	210	147	122	109	120
P-PO ₄ ³⁻	mg/L	2,33	7,5		10,74	21,18

3.1.2 INOCULI BATTERICI ANAEROBICI

Come inoculo batterico per le prove di digestione e di fermentazione in continuo si è utilizzato fango proveniente dal digestore anaerobico mesofilo dell'impianto di trattamento delle acque reflue municipali della provincia di Cremona e quello proveniente dall'impianto di Bresso-Niguarda (MI). Gli inoculi sono stati trasportati e conservati in taniche di plastica e tenuti in frigorifero alla temperatura di 4°C. Precedentemente all'allestimento delle prove, il fango digerito è stato caratterizzato in termini di pH, solidi totali e volatili.

Pretrattamento inoculo

Nelle prove di BMP, allo scopo di diminuire il contributo della produzione endogena di biogas, l'inoculo batterico anaerobico viene degasato tramite trattamento termico, per una durata di 2 giorni ad una temperatura di 35°C.

Per le sole prove di fermentazione in batch, allo scopo di limitare l'attività di metanogenesi, l'inoculo batterico anaerobico è stato trattato termicamente in stufa sottoponendolo ad una temperatura di 90°C per 1 ora. Si riporta in Tabella 3.2 la caratterizzazione degli inoculi pretrattati utilizzati per le prove di BMP e di fermentazione.

TABELLA 3.2 - CARATTERIZZAZIONE INOCULI BATTERICI.

	UM	Bresso-Niguarda 1/03/2019	Cremona 3/05/2019
pH	-	7,01	7,2
ST	g/kg	26	35
SV	g/kg	16	16

3.1.3 FANGHI ATTIVI

Per le prove di potenzialità denitrificante sono stati utilizzati campioni prelevati dalle condotte di ricircolo dalla vasca di denitrificazione del processo a fanghi attivi. Per le prove di validazione del metodo sono stati utilizzati i fanghi attivi provenienti dall'impianto di depurazione di Bresso-Niguarda, mentre per le prove di potenzialità denitrificante sono stati utilizzati i fanghi provenienti dall'impianto di trattamento delle acque reflue di Sesto San Giovanni. Si riporta la caratterizzazione delle matrici coinvolte in Tabella 3.3.

TABELLA 3.3 - CARATTERIZZAZIONE FANGHI ATTIVI.

	UM	Bresso-Niguarda 24/04/2019	Sesto San Giovanni 2/07/2019
pH	-	7,01	7,2
SST	g/kg	12	11,4
SSV	g/kg	8	8
N-NO ₂ ⁻	mg/L	<0,01	/
N-NO ₃ ⁻	mg/L	<0,2	1,07
N-NH ₄ ⁺	mg/L	8,9	4
CODsol	mg/L	70,5	40

3.1.4 BIOMASSA MICROALGALE

La biomassa microalgale utilizzata per le prove di co-fermentazione proviene da una coltivazione axenica fornita dall'Istituto Sperimentale italiano Lazzaro Spallanzani. Si tratta di microalghe del genere *Scenedesmus* prevalentemente appartenenti alla specie *S. obliquus*. Il campione è stato coltivato su Bold Basal Medium (BBM) (Bold, 1949). Il campione è stato successivamente centrifugato presso il laboratorio A. Rozzi (Centurion Scientific, G2 series) a 2800 rpm per 10 minuti.

Un secondo campione proviene dall'impianto di coltivazione a scala pilota situato nel depuratore di Bresso-Niguarda ed è costituito da una popolazione algale mista con prevalenza di alghe appartenenti ai generi *Chlorella* e *Scenedesmus*. Il sistema di coltura dell'impianto di depurazione di Bresso-Niguarda si compone di una vasca a circuito (raceway pond) ed è stato progettato con l'obiettivo di valutare l'applicabilità di trattamenti microalgali nella riduzione del carico di azoto ammoniacale di reflui civili. Il raceway viene alimentato con separato liquido ottenuto dalla centrifugazione dei fanghi in uscita dal digestore anaerobico. L'impianto, che opera in continuo, ha una superficie complessiva di 6 m² e un battente idrico di 20 cm. La miscelazione è garantita da un mulino a pale che ruota ad una velocità di 4 rpm. Il reattore è idraulicamente connesso ad una colonna nella quale viene insufflata aria tramite compressore.

In Tabella 3.4 sono riportate le caratteristiche del chiarificato in ingresso al raceway e le caratteristiche della sospensione algale riferita ai due momenti di campionamento (19/06/2019, 12/07/2019).

TABELLA 3.4-CARATTERISTICHE MEDIE DEL SUBSTRATO DI CRESCITA IN ALIMENTO AL RACEWAY E DELLA SOSPENSIONE ALGALE PRESENTE AL SUO INTERNO RELATIVE AL PERIODO COMPRESO TRA GIUGNO E LUGLIO 2019.

	UM	Alimento	Sospensione algale
pH	-	8	6
SSV	g/L	0,05±0,02	0,85±0,05
CODsol	mg/L	153±69	238±40
N-NH ₄ ⁺	mg/L	250±53	43,5±1,5
N-NO ₂ ⁻	mg/L	0	0
N-NO ₃ ⁻	mg/L	0	308±21
P-PO ₄ ³⁻	mg/L	5,86±1,8	2,81±0,53

I campioni provenienti dall'impianto di Bresso-Niguarda sono stati centrifugati con una centrifuga da campo (chiarificatore a dischi Elecrem tipy con capacità 125 L) direttamente presso l'impianto di Bresso-Niguarda. In Tabella 3.5 sono riportate le caratteristiche medie dei campioni dopo il processo di centrifugazione.

TABELLA 3.5 - CARATTERISTICHE MEDIE DELLE COMUNITÀ ALGALI.

	UM	Alge Scenedesmus (Istituto Spallanzani) raccolta#6	Comunità mista (raceway Bresso-Niguarda) raccolta#7
pH	-	6,58	6,93
ST	g/kg	17	50
SV	g/kg	15,5	40
CODsol	mg/L	1370	980
N-NH ₄ ⁺	mg/L	16	25
P-PO ₄ ³⁻	mg/L	48	6

3.2 ATTIVITÀ SPERIMENTALE: ALLESTIMENTO E CONDUZIONE

3.2.1 PROVE DI FERMENTAZIONE IN BATCH

Le prove di fermentazione sono state realizzate allo scopo di valutare il potenziale di produzione di VFA di fanghi misti (primari e secondari) e individuare gli elementi utili a definire le condizioni di prova ottimali relativamente al processo di co-fermentazione acidogenica di fanghi e biomassa microalgale.

Pianificazione dell'attività sperimentale

Le prove di fermentazione in batch sono state eseguite utilizzando i campioni di fango misto provenienti dagli impianti di Bresso-Niguarda e Sesto San Giovanni ed infine le microalghe del raceway dell'impianto di Bresso-Niguarda.

- Le prove F-1 ed F-2 hanno avuto come obiettivo quello di valutare la potenzialità acidogenica dei fanghi misti provenienti dai due differenti impianti. I campioni utilizzati sono riferiti alla raccolta#2 e alla raccolta#4 (Tabella 3.1).
- La prova F-3 ha previsto la fermentazione di una miscela fanghi (raccolta#4) e microalghe (raccolta#6, Tabella 3.5) in presenza di inoculo proveniente dal depuratore del comune di Cremona (Tabella 3.2). In particolare, sono state preparate 3 miscele differenti variando la percentuale in volume di biomassa sul carico organico (fissato a 30 gSV/L):
 - o 10% di microalghe e 90% fanghi misti;
 - o 25% microalghe e 75% fanghi misti;
 - o 50% microalghe e 50% fanghi misti.

Allestimento e modalità di esecuzione

La strumentazione utilizzata per le prove di fermentazione anaerobica consiste in bottiglie in vetro con tappo in gomma perforabile assicurato da una ghiera metallica dal volume complessivo di 500 mL per le prove F1 ed F2 e di 310 mL per la prova F-3. Tutte le prove sono state eseguite in doppio. Per quanto riguarda le prove F-1 ed F-2 sono state previste due bottiglie per la valutazione di produzione di biogas, rimaste quindi indisturbate per tutta la durata della prova, mentre per i giorni di analisi sono state aperte due bottiglie alla volta per la valutazione dei principali parametri di interesse. Le prove F-1 ed F-2 hanno previsto l'immissione di soli 50 mL di fango misto tal quale, mentre per la prova F-3 i volumi delle diverse matrici coinvolte sono stati valutati in ragione delle diverse concentrazioni di solidi. Il rapporto substrato/inoculo è stato definito in base a precedenti studi di fermentazione in batch (Carminati et al., 2018), dove era stato valutato un rapporto ottimo pari a $3 \text{ gSV}_{\text{substrato}}/\text{gSV}_{\text{inoculo}}$. Ogni bottiglia è stata preparata utilizzando 50 mL di campione ad una concentrazione di solidi volatili di 30 g_{sv}/L (sia di fango misto che di microalghe), 30 mL di fango di inoculo ad una concentrazione di solidi volatili pari a 16 g_{sv}/L e 120 mL di acqua per raggiungere un volume complessivo pari a 200 mL. Per la prova F3 si è previsto l'allestimento di bottiglie contenenti unicamente inoculo batterico e acqua quali bianchi di riferimento. Al

termine dell'allestimento, così come per le prove di BMP, lo spazio di testa delle bottiglie è stato flussato con N₂ per consentire l'instaurarsi di condizioni anaerobiche e le bottiglie sono state chiuse a tenuta con il tappo con setto perforabile. Per l'intera durata della prova le bottiglie sono state mantenute all'interno di un agitatore termostato che ha fornito un'agitazione orbitale costante (120 rpm) alla temperatura di 35 °C.

Tutte le prove sono state condotte a pH non controllato. Si riportano nelle tabelle a seguire i valori iniziali per i parametri di interesse relativi alle bottiglie allestite.

TABELLA 3.6 - CONDIZIONI INIZIALI BOTTIGLIE PROVA F-1 F-2 F-3.

		F-1	F-2			F-3			
				1A	2A	3°	4A	5A	6A
pH	-	6,3	5,5	7,9	6,5	7	6,9	6,5	6,7
SV	gSV/L	30	30	30	30	30	30	30	30
miscela									
Fango	%*	100	100	nd	100	/	90	75	50
Alghe	%*	/	/	nd	/	100	10	25	50
Inoculo	gSV/L	/	/	16	16	16	16	16	16
F/M	gSV _{substrato} /gSV _{inoculo}	/	/	nd	3	3	3	3	3

*Percentuale in volume di campione di carico organico fissato pari a 30 gSV/L per ogni bottiglia.

Le prove F-1 ed F-2 hanno avuto una durata totale rispettivamente di 24 e 22 giorni, mentre la prova F-3 di 10 giorni.

Durante i giorni di analisi sono stati misurati il pH, il COD solubile e la composizione dei VFA. Il piano di monitoraggio per le prove F-1 e F-2 svolte in doppio ha previsto l'apertura di due bottiglie alla volta in corrispondenza dei giorni di analisi previsti. Due delle dieci bottiglie allestite sono rimaste indisturbate per tutta la durata della prova per garantire una affidabile valutazione della produzione di biogas tramite la misura delle pressioni nello spazio di testa.

Per la prova F-3, invece, le analisi sono state eseguite su campioni liquidi di 3 mL prelevati dalle bottiglie di prova perforandone il tappo in gomma tramite una siringa. Anche per questa prova sono stati misurati pH e composizione di VFA e, nel giorno 7 e 10, anche il COD solubile. Le sei bottiglie B, a pari condizioni iniziali delle A, sono rimaste invece indisturbate.

La produzione di gas nel tempo è stata valutata con il metodo manometrico. La misura della pressione del gas nello spazio di testa è stata eseguita manualmente tramite l'utilizzo di un manometro digitale (Keller LEO 2), inserendo l'ago ad esso connesso nel tappo della bottiglia

di interesse. Il volume di biogas prodotto è stato calcolato a partire dalla sovrappressione misurata applicando la legge dei gas perfetti. Tutti i volumi dei gas in gioco sono stati normalizzati alla temperatura e alla pressione di riferimento ($T = 273,15$ K e $p_{atm} = 1$ atm):

$$V_{\text{BIOGAS}} = V_{\text{HS}} \cdot \left(\frac{\Delta p[\text{bar}]}{p_{\text{atm}}[\text{bar}]} \cdot \frac{T_0[\text{K}]}{T[\text{K}]} \right) \quad (3.1)$$

Dove

- V_{BIOGAS} è il volume di biogas prodotto,
- V_{HS} è il volume dello spazio di testa della bottiglia,
- Δp è la sovrappressione misurata rispetto al giorno 0,
- T la temperatura di fermentazione (308,15 K).

Per determinare la quantità di metano prodotta a partire dal volume di biogas è stato necessario effettuare analisi composizionali del gas presente nello spazio di testa. Il volume di metano prodotto si calcola di conseguenza come:

$$V_{\text{CH}_4} = V_{\text{BIOGAS}} \cdot \% \text{CH}_4 \quad (3.2)$$

Dove

- V_{CH_4} è il volume di solo metano per ogni bottiglia
- $\% \text{CH}_4$ rappresenta la percentuale di metano risultante dalla composizione del gas

3.2.2 PROVE DI BMP

Le prove di BMP realizzate durante il corso della sperimentazione, hanno avuto come obiettivo quello di determinare il potenziale di produzione di metano dei fanghi utilizzati come substrato organico nelle prove di fermentazione e della biomassa microalgale.

Pianificazione dell'attività sperimentale

- Durante prova BMP-1 si è valutato il comportamento del solo fango misto proveniente dall'impianto di depurazione di Bresso-Niguarda utilizzando la raccolta#1 (Tabella 3.1) in presenza ed in assenza di inoculo;
- La prova BMP-2 ha avuto come scopo quello di confrontare i due fanghi provenienti dai due differenti impianti (Bresso-Niguarda e Sesto San Giovanni) per valutare la

loro potenzialità metanigena utilizzando campioni provenienti dalla raccolta#2 e dalla raccolta#3 (Tabella 3.1) e la valutazione del BMP delle biomasse microalgali dei campioni le cui caratteristiche sono evidenziate in Tabella 3.5;

- La prova BMP-3 ha previsto il confronto dei BMP dei due fanghi misti provenienti dall'impianto di Bresso-Niguarda e dall'impianto di Sesto San Giovanni in condizioni favorevoli alla fase di acidogenesi, impostando quindi un rapporto substrato/inoculo alto (pari a $2 \text{ gSV}_{\text{substrato}}/\text{gSV}_{\text{inoculo}}$).

TABELLA 3.7 - ALLESTIMENTO PROVE DI BMP.

Prova		Fango misto	Inoculo	Biomassa algale	S/I
BMP-1	Solo fango	Bresso-Niguarda raccolta#1 (Tabella 3.1)	/	/	/
	Fango+inoculo		Bresso-Niguarda (Tabella 3.2)	/	0,5
BMP-2	Bresso	raccolta#2 (Tabella 3.1)	Bresso-Niguarda (Tabella 3.2)	/	0,5
	Sesto	raccolta#3 (Tabella 3.1)	Sesto San Giovanni (Tabella 3.2)	/	0,5
	Alghe	/	Bresso-Niguarda (Tabella 3.2)	<i>Scenedesmus</i> raccolta#6 (Tabella 3.5)	0,5
	Alghe	/	Bresso-Niguarda (Tabella 3.2)	Popolazione mista raccolta#7 (Tabella 3.5)	0,5
BMP-3	Bresso	raccolta#2 (Tabella 3.1)	Bresso-Niguarda (Tabella 3.2)	/	2
	Sesto	raccolta#4 (Tabella 3.1)	Sesto San Giovanni (Tabella 3.2)	/	2

Allestimento e modalità di esecuzione

Le prove di BMP sono state effettuate utilizzando il sistema AMPTS (Automated Methane Potential Test System), uno strumento che determina in modo automatico la misura di BMP. Il sistema è commercializzato dall'azienda Bioprocess Control e sviluppato dall'università di Lund, Svezia.



FIGURA 3.1 - SISTEMA AMPTS.

Il Sistema AMPTS si compone di diverse unità (Figura 3.1): una è un bagno termostatico tenuto alla desiderata temperatura dove sono contenute le bottiglie. In questo studio le bottiglie sono state tenute ad una temperatura pari a 37 °C. Queste ultime sono dimensionate in modo tale da raggiungere un volume totale di campione pari a 480 mL. Il contenuto di ogni bottiglia viene mescolato tramite un agitatore meccanico. Lo spazio di testa di ciascuna bottiglia è collegato ad un'altra bottiglia, detta di cattura, che elimina i gas acidi (CO₂ e l'H₂S) grazie alla presenza di una soluzione di idrossido di sodio. In questo modo, solo il gas residuo (principalmente metano) raggiunge la cella di misura che quantifica il volume prodotto. I dati vengono registrati attraverso un sistema di acquisizione.

La sospensione di prova è stata ottenuta miscelando la biomassa algale o i substrati fangosi, l'inoculo pre-degasato e una soluzione di oligoelementi in accordo allo standard OECD 311. È stato inoltre aggiunto bicarbonato di sodio in tutte le bottiglie per fornire potere tampone alla soluzione. Infine, è stato aggiunto un volume di acqua in modo tale da ottenere la concentrazione desiderata di solidi in sospensione. Per le prove BMP-1 e BMP-2 è stato adottato un rapporto substrato/inoculo (S/I) pari a 0,5 gSV_{substrato}/gSV_{inoculo}, mentre per la prova BMP-3 si è adottato un rapporto substrato/inoculo più elevato (2 gSV_{substrato}/gSV_{inoculo}). Il volume totale della miscela finale inoculo-substrato-nutrienti è pari a 480 mL. Le bottiglie sono state successivamente flussate con azoto per garantire le condizioni anaerobiche per un tempo di circa dieci minuti.

Il BMP, espresso in NmL_{CH₄}/gSV, viene calcolato a fine prova come il rapporto tra il volume cumulato di metano prodotto dalla prova, a cui viene sottratto il contributo di metano

prodotto dal bianco di prova, e il quantitativo di SV di substrato immesso nella bottiglia di prova:

$$\text{BMP} \left[\frac{\text{NmL}_{\text{CH}_4}}{\text{gSV}} \right] = \frac{V_{\text{bottiglia}} \left[\frac{\text{NmL}_{\text{CH}_4}}{\text{bottiglia}} \right] - V_{\text{bianco}} \left[\frac{\text{NmL}_{\text{CH}_4}}{\text{bottiglia}} \right]}{\text{gSV}_{\text{substrato}}} \quad (3.3)$$

Dove

- $V_{\text{bottiglia}}$ è il volume di metano prodotto da ogni bottiglia
- V_{bianco} è il volume di metano prodotto da ogni bottiglia contenente solo fango di inoculo

A fine prova è stata inoltre valutata la biodegradabilità (B%) di tutti i substrati mediante l'Eq. 3.4:

$$\text{B}(\%) = \frac{\text{COD}_{\text{CH}_4}}{\text{COD}_{\text{in}}} \times 100 \quad (3.4)$$

Dove

- $\text{COD}_{\text{in}} = C_s \cdot V_s \cdot F$ in cui C_s rappresenta la concentrazione del substrato [gSV/L], V_s il volume di substrato [L] ed F rappresenta il rapporto tra COD medio del substrato considerato ed i solidi volatili, pari a $1.51 \text{ g}_{\text{COD}}/\text{g}_{\text{SSV}}$ per la biomassa microalgale (rapporto ricavabile a partire dalla formula stechiometrica (Larsdotter and Microbiology, 2006) e misurato in passato dagli operatori del Laboratorio Rozzi) e pari a $1,45 \text{ g}_{\text{COD}}/\text{g}_{\text{SV}}$ come media dei rapporti del fango primario e secondario (Nielfa et al., 2015).
- $\text{COD}_{\text{CH}_4} = \frac{V_{m,\text{sub}} \cdot C_s \cdot V_s}{0,350 \frac{\text{L}_{\text{CH}_4}}{\text{g}_{\text{COD}}}}$, con $V_{m,\text{sub}}$ volume di metano del substrato in esame.

Modelli per la stima di produzione di Biogas

Sono stati valutati due differenti modelli per interpretare i dati sperimentali ottenuti dalle prove di BMP. Ogni set è stato interpolato con un unico modello al fine di permettere un confronto adeguato tra i campioni. La stima di V_{∞} e dei principali parametri della funzione è stata eseguita applicando il metodo dei minimi quadrati, massimizzando dunque il coefficiente di determinazione R^2 tra i dati sperimentali ed il modello variando iterativamente il valore di k e di V_{∞} .

La scelta del modello più adeguato è stata eseguita valutando per ogni funzione interpolante i coefficienti di determinazione R^2 di ogni campione e scegliendo la funzione la cui media degli R^2 è risultata essere più alta.

Quando l'intero processo di digestione anaerobica viene descritto da una cinetica di pseudo-primo ordine, la funzione interpolante i dati sperimentali della produzione di biogas assume la seguente forma

$$V(t) = V_{\infty} \cdot (1 - e^{-k \cdot t}) \quad (3.5)$$

in cui V_{∞} [mL/gVSS] rappresenta la resa di biogas asintotica e k [d^{-1}] il rateo di produzione del primo ordine.

L'equazione di Gompertz modificata (3.6) ed il modello curva ad esse (3.7) (Tjørve and Tjørve, 2017) sono stati utilizzati per interpolare i dati sperimentali in cui era evidente la presenza di un flesso nella cinetica di produzione del biogas. Le equazioni che descrivono i due modelli sono le seguenti:

$$V(t) = V_{\infty} \cdot \exp \left[-\exp \left(\frac{k \cdot e}{V_{\infty}} \cdot (\lambda - t) + 1 \right) \right] \quad (3.6)$$

$$V(t) = V_{\infty} \cdot \left[1 - \left(\frac{1}{1 + \frac{t^b}{a}} \right) \right] \quad (3.7)$$

Dove

- t è il tempo di prova [d],
- V_{∞} è la massima produzione di metano potenziale specifica [NmI_{CH4}/gSV],
- k massimo tasso specifico di produzione di metano [NmI_{CH4}/gSV·d],
- e : $\exp(1) = 2.7183$,
- λ : fase di latenza [d],
- dove a [d^{-1}] e b [-] rappresentano i parametri di forma della funzione.

3.2.3 PROVA DI FERMENTAZIONE IN CONTINUO

Le prove hanno avuto come obiettivo quello di valutare l'efficienza di produzione di VFA nella fermentazione acidogenica dei fanghi misti e nella co-fermentazione di fanghi misti e microalghe.

Allestimento

Per condurre le prove di digestione in semi-continuo è stato messo a punto un sistema sperimentale, costituito da tre principali unità (Figura 3.2):

- Unità A: pompa di alimento di tipo peristaltico (dosatore SEKO 361156 con intervallo di portata 0,6-4 L/h) e contenitore dell'alimento. La pompa è azionata una volta al giorno per un periodo di 30-60 min a seconda delle condizioni di prova. Il contenitore dell'alimento è tenuto ad una temperatura compresa tra i 5°C ed i 10°C grazie all'utilizzo di un termostato e miscelato mediante agitatore magnetico operante in discontinuo (10 min ON e 5 min OFF).
- Unità B: reattore di fermentazione. Il reattore è in vetro ed ha una capacità 2 L; è tenuto in miscelazione mediante agitatore meccanico ad asse verticale azionato in discontinuo (10 min ON e 5 min OFF). Il reattore è chiuso ermeticamente per garantire condizioni anaerobiche, ma è connesso ad un tubo di sfiato per consentire la fuoriuscita di biogas; è tenuto in un bagno termostatico ad una temperatura di $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- Unità C: pompa di scarico di tipo peristaltico (dosatore SEKO 361156 con intervallo di portata 0,6-4 L/h) e tanica di raccolta del fermentato. La pompa è azionata una volta al giorno per un periodo di 30-60 min. (secondo le condizioni di prova) prima del ciclo di lavoro della pompa di carico.

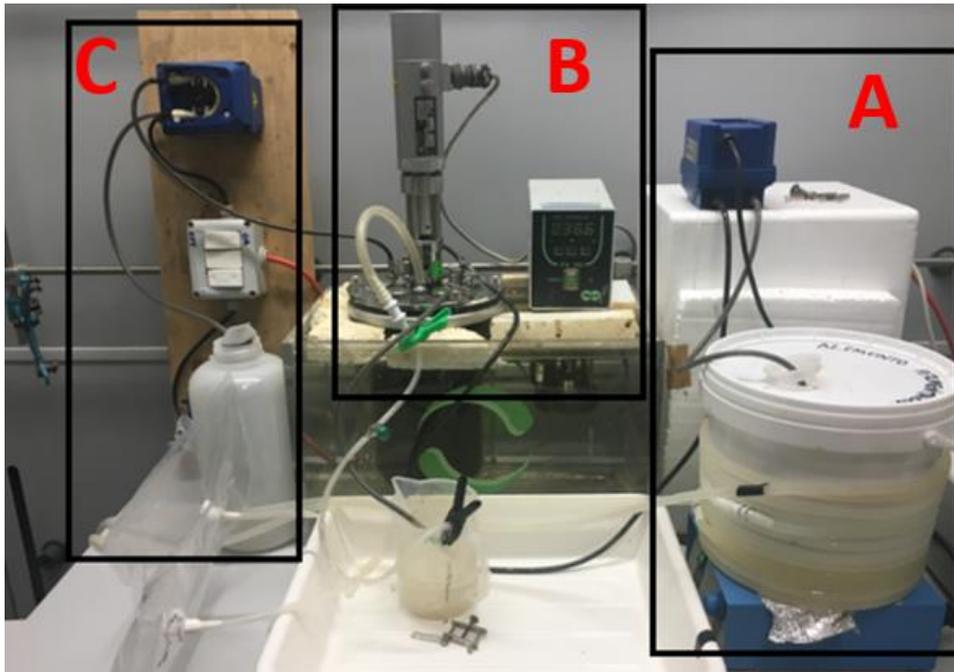


FIGURA 3.2 -SISTEMA SPERIMENTALE UTILIZZATO PER LE PROVE DI FERMENTAZIONE IN CONTINUO.

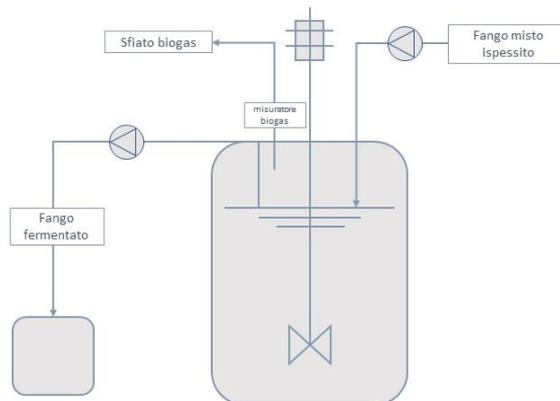


FIGURA 3.3 - SCHEMA DEL REATTORE DI FERMENTAZIONE IN CONTINUO.

La fase di scarico del fermentato coincide con il prelievo del campione per compiere le opportune analisi. I primi 40/50 mL di fermentato in uscita vengono scartati, trattandosi di materiale stagnante all'interno del tubo di scarico posizionato sotto battente e quindi poco rappresentativo delle reali caratteristiche della sospensione.

Pianificazione e gestione dell'attività sperimentale

All'avvio della prova, il reattore è stato riempito per 1,6 L di fango di inoculo e per 400 mL di fango misto proveniente dall'impianto di Bresso-Niguarda (raccolta#1). Il reattore non è

mai stato fermato durante l'intero periodo di prova (120 giorni), tuttavia la modalità di alimentazione è variata nel tempo:

- Le fasi di fermentazione FC-1 ed FC-2 hanno previsto l'utilizzo rispettivamente di fango misto proveniente dall'impianto di Bresso-Niguarda e di Sesto San Giovanni, in particolare campioni riferiti alla Tabella 3.1;
- La fase di co-fermentazione CC-1 ha valutato l'efficienza di produzione di acidi grassi volatili da una miscela con una concentrazione di acidi volatili pari a 30 g_{sv}/L costituita dal 94% in volume di fanghi misti della raccolta#3 (Tabella 3.1) e al 6% in volume di microalghe di tipo Scenedesmus (Tabella 3.5);
- La fase di co-fermentazione CC-2 ha avuto come obiettivo lo stesso della prova CC-1 ma con utilizzo di biomassa costituita al 90% di fanghi misti della raccolta#3 (Tabella 3.1) e al 10% di microalghe proveniente dal raceway dell'impianto di Bresso-Niguarda (Tabella 3.5).

I principali parametri di prova sono riportati nella Tabella 3.8.

TABELLA 3.8 - PRINCIPALI PARAMETRI OPERATIVI DELLE FASI DELLA PROVA DI FERMENTAZIONE IN CONTINUO

	UM	FC-1_1	FC-1_2	FC-2_1	FC-2_2	CC-1	CC-2
Giorni		0-29	29-70	70-106	112-133	106-112	133-140
pH	-	6,45±0,3	6	5,50	5,74	6,05	6,20
alimento		NC	C*	NC*	NC*	NC*	NC*
OLR	gSV/L·d	7,5±1	15±1	15±1	15±1	15±1	15±1
HRT	d	4±1	2±1	2±1	2±1	2±1	2±1

*NC non controllato C controllato

Sul fermentato sono state condotte per due volte a settimana le analisi di pH, alcalinità, COD solubile, solidi totali e volatili, azoto ammoniacale, fosforo ed il profilo dei VFA. Una volta a settimana è stato valutato il COD totale e analisi di composizione del biogas prodotto grazie ad un punto di presa costituito da un dispositivo in vetro con setto poroso. Ad ogni alimento sono stati invece misurati pH e solidi totali e volatili.

3.2.4 PROVE DI DENITRIFICAZIONE IN MANOMETRIA

Le prove di denitrificazione in manometria hanno valutato la potenzialità denitrificante del surnatante ricco di acidi grassi volatili prodotto nelle prove di fermentazione in continuo.

Principio di misura ed allestimento

I metodi manometrici consistono appunto nella valutazione della variazione di pressione, dovuta allo sviluppo di composti gassosi come l'azoto molecolare, a seguito di processi biologici. Le prove manometriche sono state eseguite con lo strumento Oxitop® Measuring Head, un dispositivo manometrico caratterizzato da una testa di misura che consente di registrare i dati di pressione durante l'esecuzione della prova (Figura 3.4). La bottiglia di misura è provvista di due aperture laterali, dotate di tappi ermetici con setto poroso. Quest'ultimo è costituito da una membrana perforabile, che risulta utile per l'iniezione di reagenti come substrato organico, nitriti e/o nitrati (in questo studio vengono utilizzati nitrati).

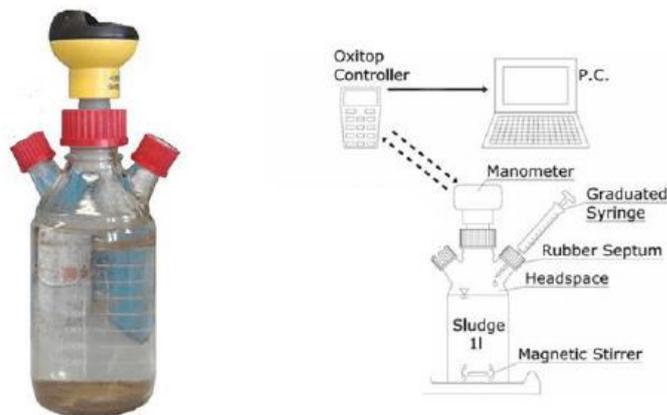


FIGURA 3.4 - SCHEMA DEL SISTEMA OXYTOP.

Il tappo ermetico principale comprende anche un "porta soda" per l'alloggiamento delle pastiglie di soda (NaOH) per l'assorbimento della CO₂, così che la misura di sovrappressione è dovuta al solo sviluppo di N₂. La bottiglia viene tenuta chiusa ermeticamente ad una temperatura costante di 20°C in continua miscelazione, garantita da un'ancoretta magnetica. La relazione tra la sovrappressione generata dal processo P(t) e ed il tasso di denitrificazione (mgN/L-h), può essere ottenuta assumendo che l'azoto gassoso non rimane in soluzione in quanto gas poco solubile. Sulla base della legge dei gas perfetti si ricava l'andamento temporale dell'N₂ prodotto dal processo.

$$P(t) = n_{N_2}(t) \cdot \frac{R \cdot T}{V_{HS}} \quad (3.8)$$

- V_{HS} è il volume dello spazio di testa della bottiglia,
- n_{N₂} sono le moli di azoto gassoso rilasciate nello spazio di testa.

Lo sviluppo nel tempo dell'azoto gassoso rappresenta dunque il risultato principale, dal quale si ricavano informazioni importanti riguardanti il processo di denitrificazione.

Pianificazione dell'attività sperimentale

Per la prova di validazione è stata utilizzata una soluzione sintetica di acidi volatili (composta da acido acetico, propionico ed isovalerico), mentre per la prova di potenzialità denitrificante sono stati utilizzati tre separati liquidi del fermentato prodotto dalle prove di fermentazione in continuo (paragrafo 4.3.1). Di seguito sono riportate le concentrazioni previste in soluzione degli acidi grassi volatili e la caratterizzazione dei tre differenti surnatanti. Il valore di CODsol è la concentrazione prevista di substrato organico nelle prove di denitrificazione.

- La prova D-1 ha previsto la validazione della procedura utilizzando i fanghi attivi provenienti dall'impianto di Bresso-Niguarda (Tabella 3.3) insieme con una unica soluzione sintetica di tre differenti acidi grassi volatili una volta ed un'altra volta con tre differenti soluzioni sintetiche a singoli acidi ed una bottiglia per valutare la produzione di azoto gassoso a causa di processi endogeni. I tre acidi grassi volatili utilizzati nella prova sono: l'acido acetico, l'acido propionico e l'acido isovalerico.

TABELLA 3.9 - CONCENTRAZIONI ACIDI GRASSI VOLATILI COME FONTE DI CARBONIO PER LA PROVA DI DENITRIFICAZIONE D-1.

	UM	Soluzione a singoli acidi	Mix sintetico VFA
Acido acetico CH ₃ COOH	mg/L	200	600
Acido propionico C ₃ H ₆ O ₂	mg/L	200	400
Acido isovalerico C ₅ H ₁₀ O ₂	mg/L	200	200
CODsol/bottiglia	mg/L	200	400

- Durante la prova D-2 sono stati utilizzati i fanghi attivi provenienti dal depuratore di Sesto San Giovanni (Tabella 3.3). La soluzione di acidi volatili proveniva dal separato

liquido del fermentato della prova FC-2 (paragrafo 4.3.1) campionato in 3 giorni differenti (Tabella 3.10).

TABELLA 3.10 - COD SOLUBILE DEI SURNATANTI E CONCENTRAZIONI PREVISTE IN SOLUZIONE PER LA PROVA DI DENITRIFICAZIONE D-2.

	UM	Surnatante Fermentato A	Surnatante Fermentato B	Surnatante Fermentato C
CODsol	mg/L	4400	4700	4300
CODsol/bottiglia	mg/L	400	400	400

Ogni bottiglia è stata preparata in accordo alla procedura definita dallo studio di Ficara et al. (2007). Il campione di fanghi attivi, così come il campione di substrato organico, viene diluito nella bottiglia di prova alla concentrazione desiderata utilizzando acqua di rete. Tutte le prove sono state condotte mantenendo una concentrazione di SSV nei fanghi attivi pari a 1,5 g/L come indicato da letteratura (concentrazioni comprese tra 1 e 3 gSSV/L (Sánchez et al., 2000)). Successivamente viene insufflato N₂ gassoso per circa 10 minuti in modo da garantire l'assenza di ossigeno, dopodiché la bottiglia viene posizionata nel termostato (mantenuto ad una temperatura di 20°C) sull'agitatore magnetico. Dopo circa 30 min viene avviata la prova e viene dosato il nitrato attraverso uno dei due setti perforabili iniettando una soluzione concentrata. Questa soluzione concentrata ha garantito un rapporto COD/N pari a 7 (circa l'80% del rapporto ricavato dal bilancio stechiometrico su modello ASM1): si tratta quindi di una prova limitata dalla disponibilità della sostanza organica, così che l'intero apporto di COD solubile venga impiegato durante il corso della prova e, esaurito questo, il tasso di denitrificazione si assesti su valori endogeni. Al termine della prova, che ha avuto una durata di circa 48 h per la prova D-1 e di 28 h per la prova D-2, si sono elaborati i dati di pressione per valutare la quantità di N₂ rilasciato e quindi il tasso di denitrificazione e la sua velocità. In particolare:

- rappresentando l'andamento del tasso di produzione di N₂ durante la fase esponenziale, in un grafico semilogaritmico ($\ln(N/N_0)$ vs. tempo) la pendenza della retta interpolante consente di stimare il tasso di crescita netto,
- valutando la quantità di azoto denitrificato nota la quantità di COD aggiunto ad inizio prova ($\text{mg}_{\text{N-NO}_3}/\text{mg}_{\text{COD}}$) si valuta il coefficiente di resa cellulare viene stimato.

Modelli per la stima di produzione di azoto gassoso N₂

Il modello utilizzato per descrivere l'andamento della produzione di azoto gassoso nel tempo è il modello di Gompertz modificato ed il modello a esse (descritto nel paragrafo 3.2.2).

3.2.5 METODI ANALITICI

Di seguito si riportano sinteticamente le metodiche analitiche utilizzate per la valutazione dei diversi parametri chimico-fisici e, ove pertinente, la metodica standard di riferimento.

Solidi: i contenuti di ST, SV, SST e SSV sono stati determinati in doppio in accordo al Metodo Standard 2540 (APHA et al., 2005).

pH: misurato per via potenziometrica direttamente sui campioni liquidi utilizzando una sonda portatile (Hach-Lange HQ40d).

Alcalinità e FOS/TAC: le analisi di alcalinità sono state condotte per titolazione in accordo al metodo di Nordmann, utilizzando un titolatore automatico (Hach Lange Biogas Titrator). Il valore di FOS/TAC è stato poi ricavato come rapporto tra il valore di VFA (calcolato come descritto di seguito) e il valore di alcalinità.

CODsol, NH₄⁺, NO₃⁻, NO₂⁻, PO₄³⁻ Misure effettuate tramite metodo colorimetrico in kit Hach Lange previa filtrazione dei campioni su filtri di porosità 0.45 µm, secondo le istruzioni fornite dal produttore. L'assorbanza dei kit è stata letta tramite Spettrofotometro UV-VIS Hach Lange ed i kit eventualmente trattati termicamente tramite Termostato Hach Lange LT200.

COD totale: è stato determinato in accordo al metodo 5130 (APAT/IRSA-CNR) tramite l'ossidazione della sostanza organica con K₂Cr₂O₇ in presenza di H₂SO₄ 95-96% e Ag₂SO₄ e successiva titolazione con solfato ferroso ammonico (Ferrous ammonium sulfate, FAS). Standard Method n.5220 (APHA 2005).

VFA: Il contenuto di acidi grassi volatili (acetico, propionico, iso-butirrico, butirrico, iso-valerico e valerico) è stato determinato in accordo al Metodo Standard 5560 (APHA 2005), utilizzando un gas cromatografo (DANI Master GC) con rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID 86/10).

Analisi gas: le analisi composizionali del biogas prodotto sono state effettuate per mezzo del gascromatografo (DANI Master GC) con rivelatore a conducibilità termica (TCD 86/40).

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 PROVE DI FERMENTAZIONE IN BATCH

Lo scopo delle prove di fermentazione in batch è stato quello di valutare le condizioni ottimali per l'accumulo di VFA nell'ottica di fermentazione acidogenica di substrati di natura differente. Sulla base del piano di monitoraggio descritto al paragrafo 3.2.1, si presenta di seguito una sintetica analisi dei dati sperimentali ottenuti durante le diverse prove. Le prove F-1 ed F-2 verranno discusse congiuntamente poiché sono state condotte quali confronti tra efficienze di due diversi substrati: il fango misto dell'impianto di Bresso-Niguarda e quello dell'impianto di Sesto San Giovanni. Tra i parametri di principale interesse per quanto riguarda la produzione di VFA si annoverano la resa di acidificazione ($g_{VFA_COD}/g_{SV,in}$), che rappresenta l'efficienza con cui il substrato fermentabile è convertito a VFA, e la concentrazione di acidi volatili nella misura di acido acetico, propionico, isobutirrico, butirrico, isovalerico e valerico.

4.1.1 PROVA F-1

Nella prova F-1 sono stati utilizzati i fanghi provenienti dall'impianto di Bresso-Niguarda (Mi). La metodica è esposta al paragrafo 3.2.1. Di seguito vengono esposti i risultati.

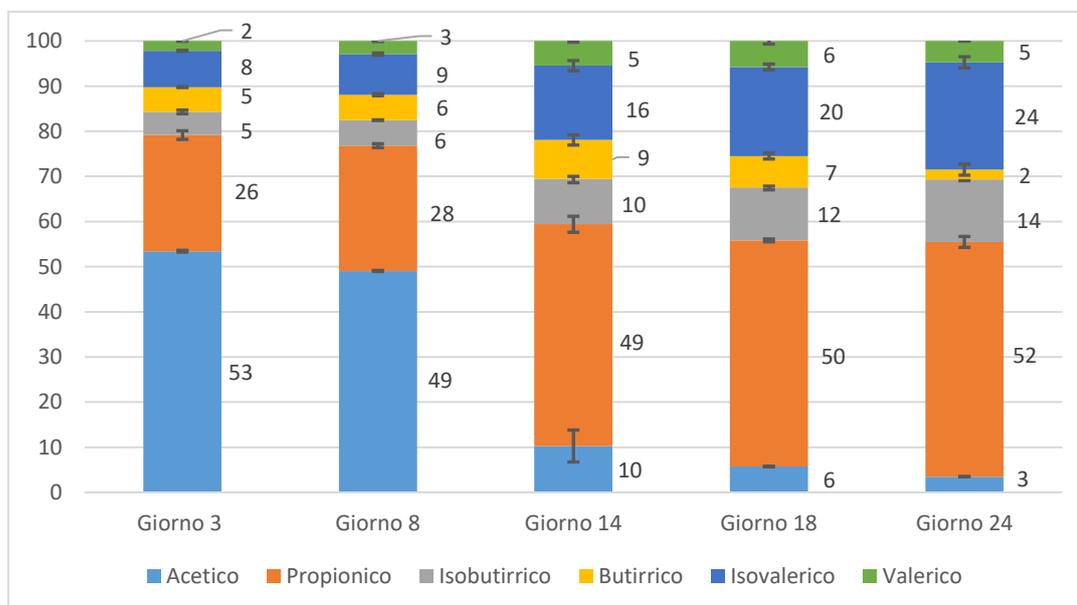


FIGURA 4.1 – COMPOSIZIONE IN PERCENTUALE DEI VFA PROVA F-1.

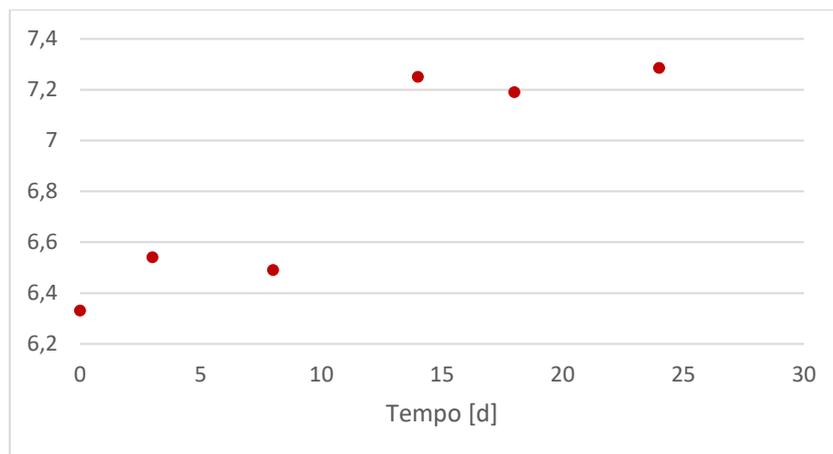


FIGURA 4.2 - ANDAMENTO DEL VALORE DI PH PROVA F-1.

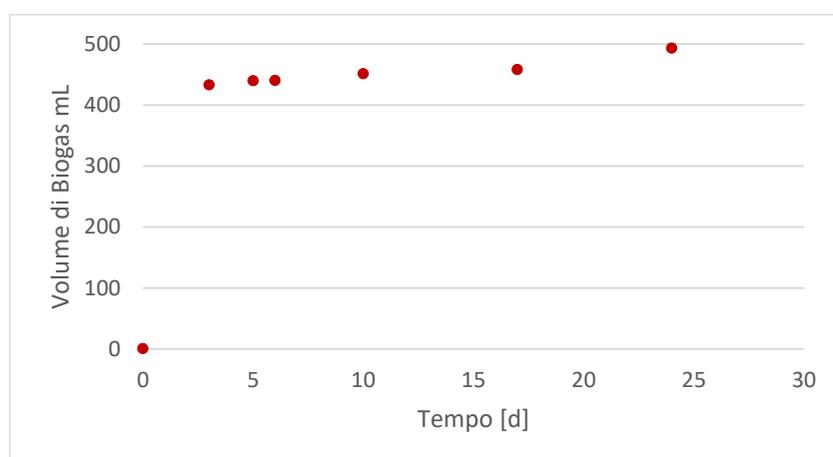


FIGURA 4.3 - VOLUMI DI BIOGAS PRODOTTI DURANTE LA PROVA F-1.

Nella Tabella 4.2 sono evidenziate le percentuali di composizione del gas misurate il giorno 24. A partire da questa composizione è stato possibile calcolare quanto COD iniziale è stato convertito a metano. Nel calcolo della resa di fermentazione finale è stata quindi considerata la somma della concentrazione di metano espressa in COD e di acidi volatili espressi come COD.

TABELLA 4.1-RISULTATI PROVA F-1 NEI GIORNI 3, 8 E 14.

		Giorno 0	Giorno 3	Giorno 8	Giorno 14	Giorno 24
VFA	g_{VFA_COD}/L	1,2	3,5	3,6	2	0,83
COD_{CH_4}	g_{COD}/L	nd	nd	nd	nd	6,7
VFA/COD_{sol}	$g_{VFA_COD}/g_{COD_{sol}}$	0,50	0,70	0,70	0,50	nd
Resa di fermentazione	$g_{COD,acid}/g_{SV,in}$	0,032	0,10	0,12	0,070	0,25

TABELLA 4.2 - COMPOSIZIONE GAS FINALE GIORNO 24 PROVA F-1.

O ₂ %	CO ₂ %	N ₂ %	CH ₄ %
0,100	15,4	60,7	23,8

4.1.2 PROVA F-2

Nella prova F-2 sono stati utilizzati i fanghi provenienti dall'impianto di Sesto San Giovanni (Mi). La metodica è esposta al paragrafo 3.2.1. Di seguito vengono esposti i risultati.

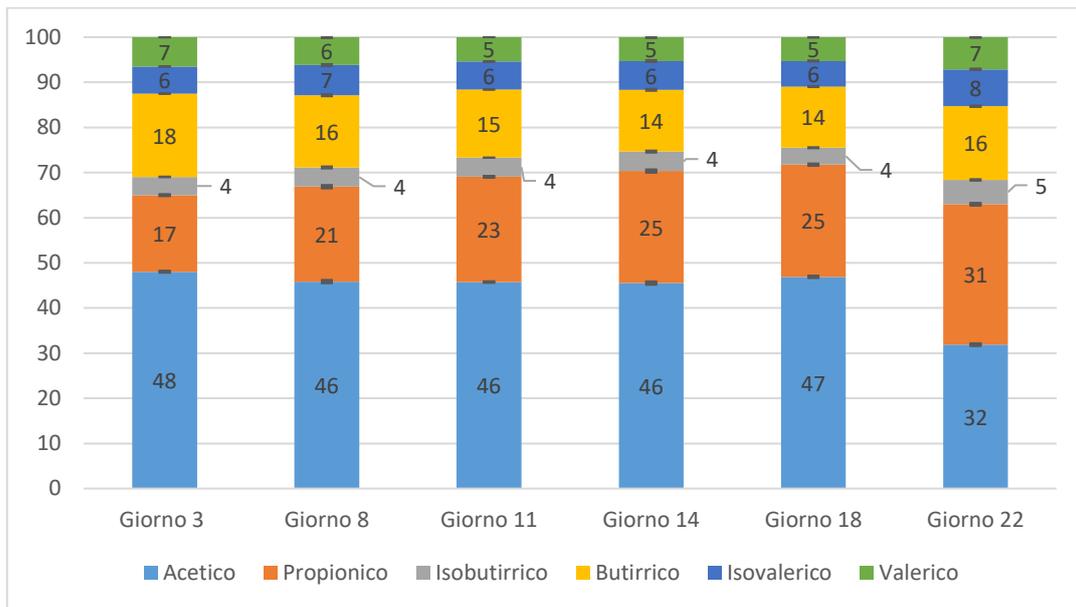


FIGURA 4.4 - COMPOSIZIONE PERCENTUALE VFA PROVA F-2 FANGHI MISTI SESTO SAN GIOVANNI.

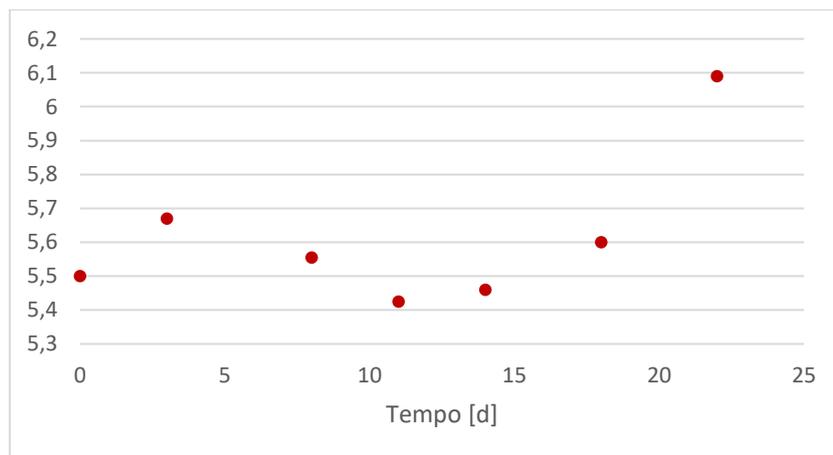


FIGURA 4.5 - ANDAMENTO DEL VALORE DI PH PROVA F-2.

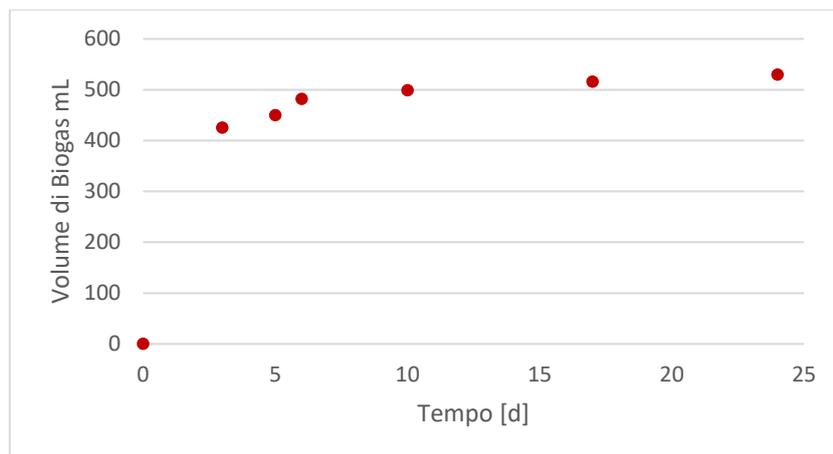


FIGURA 4.6 - VOLUMI DI BIOGAS PRODOTTI DURANTE LA PROVA F-2.

Nella Tabella 4.4 sono evidenziate le percentuali di composizione del gas misurato il giorno 22. A partire da questa composizione, così come per la prova F-1, è stato possibile calcolare quanto COD iniziale è stato convertito a metano. Nel calcolo della resa di fermentazione finale è stata quindi considerata la concentrazione di metano espressa come COD sommata alla concentrazione di acidi volatili espressa come COD.

TABELLA 4.3 - RISULTATI PROVA F-2 NEI GIORNI 3, 8, 11, 14, 18.

		Giorno 0	Giorno 3	Giorno 8	Giorno 11	Giorno 18	Giorno 22
VFA	g_{VFA_COD}/L	2,3	6,0	7,4	9,3	9,6	7,0
COD_{CH_4}	g_{COD}/L	nd	nd	Nd	nd	6,7	7,0
VFA/COD_{sol}	g_{VFA_COD}/g_{CODsol}	0,50	0,86	0,84	0,98	0,90	nd
Resa fermentazione	di $g_{COD,acid}/g_{SV,in}$	0,080	0,20	0,23	0,30	0,32	0,47

TABELLA 4.4-COMPOSIZIONE GAS GIORNO 22 PROVA F-2.

O_2 %	CO_2 %	N_2 %	CH_4 %
0,70	18	59	22

4.1.3 DISCUSSIONE RISULTATI PROVE F-1 F-2

Le due prove in esame sono riferite a due fanghi provenienti da due impianti che presentano caratteristiche differenti. Come evidenziato nella Tabella 3.1, a partire dai valori di pH e alcalinità, si può ipotizzare che il fango misto proveniente dall'impianto di Bresso-Niguarda presenti caratteristiche che lo rendono un fango poco fermentabile. Il suo pH è pari a una media di 6,3 contro 5,6 del fango di Sesto San Giovanni; la sua alcalinità è pari a 2500

$\text{mg}_{\text{CaCO}_3}/\text{L}$ contro i $1250 \text{ mg}_{\text{CaCO}_3}/\text{L}$ di Sesto San Giovanni. Alcalinità e pH sono indici correlati della stabilità del fango che definiscono il potere tampone della miscela e quindi la tendenza a variare verso pH alcalini o acidi. Di conseguenza, nell'ambito della digestione anaerobica, indicano la tendenza all'accumulo di acidi grassi volatili.

La resa di acidificazione [$\text{g}_{\text{COD,acid}}/\text{g}_{\text{SV,in}}$] (Tabella 4.1) risultante dalla prova F-1 è pari a 0,25 $\text{g}_{\text{COD,acid}}/\text{g}_{\text{SV,in}}$, valore che tiene conto anche della conversione di COD a metano. La resa riferita ai soli acidi volatili nel giorno di massima produzione è pari a 0,10 $\text{g}_{\text{VFA_COD}}/\text{g}_{\text{SV,in}}$, valore significativamente inferiore rispetto alla media riscontrata in letteratura (tra 0,20 e 0,40 (Lee et al., 2014), (Atasoy, Owusu-Agyeman, Plaza, & Cetecioglu, 2018)) e anche rispetto ai valori calcolati per la prova F-2 (compresi tra 0,30 e 0,50).

Nella Figura 4.1 e nella Figura 4.4 sono rappresentate le distribuzioni degli acidi grassi volatili riferite ad entrambe le prove. La distribuzione dei prodotti della fermentazione risulta di particolare importanza anche in un'ottica di riutilizzo del separato liquido come fonte di carbonio in processi biologici (denitrificazione e rimozione biologica del fosforo).

Per quanto riguarda la composizione degli acidi grassi volatili della prova F-1 (Figura 4.1), il prodotto di fermentazione dominante fino all'esaurirsi del processo di acidogenesi è l'acetato, presente nella percentuale di circa il 50%, seguito dall'acido propionico che, a partire dal giorno 8, risulta essere l'acido prevalente, segno dell'avanzamento del processo di metanogenesi. Dopo il giorno 8, anche il pH inizia ad assumere valori più elevati della media (Figura 4.2): dopo il suo picco di produzione di acidi volatili, il processo evolve lentamente verso l'ultima fase della digestione anaerobica. Essendo l'acetato il primo acido a essere consumato dai batteri metanigeni, il processo arriva al termine della prova a una concentrazione bassa di acidi volatili, che raggiungono a fine prova circa $1 \text{ g}_{\text{VFA_COD}}/\text{L}$, con la prevalenza (50%) di acido propionico. La prova F-2 raggiunge invece il picco con un pH pari a 5,6 (Figura 4.5) ed una concentrazione di acidi volatili pari a $9,5 \text{ g}_{\text{VFA_COD}}/\text{L}$ solo al giorno 18, all'incirca il doppio del tempo della prova F-1, già registrando concentrazioni pari a $6 \text{ g}_{\text{VFA_COD}}/\text{L}$ il giorno 3 (Tabella 4.3). Nel calcolo della resa di fermentazione finale della prova F-2, il fango di Sesto San Giovanni raggiunge valori prossimi al 50% ($\text{g}_{\text{COD,acid}}/\text{g}_{\text{SV,in}}$), il doppio della resa finale dei fanghi di Bresso-Niguarda.

Per quanto riguarda la composizione dei VFA, la prova F-2 (Figura 4.4) ha come acido principale l'acido acetico per tutta la durata della prova, ad esclusione dell'ultimo giorno in cui comunque la concentrazione di acidi risulta essere elevata ($7 \text{ g}_{\text{VFA_COD}}/\text{L}$). La

composizione degli acidi è confrontabile tra i due fanghi, a esclusione dell'acido butirrico e isovalerico. Nei fanghi provenienti dall'impianto di Bresso infatti il terzo acido prevalente è l'isovalerico.

In generale i cambiamenti nella composizione dei VFA sono imputabili alla natura biologica del processo, i batteri infatti utilizzano diversi meccanismi e riescono a fermentare i prodotti idrolizzati attraverso numerosi percorsi differenti. Anche le condizioni operative ed il tipo di substrato influenzano fortemente la composizione, infatti a seconda dell'obiettivo ultimo di utilizzo del fermentato, si preferiscono substrati organici differenti (paragrafo 2.3) (Atasoy et al., 2018).

Il principale obiettivo e fattore limitante della fermentazione acidogenica è l'idrolisi della sostanza organica. Il grado di idrolisi può essere espresso come il rapporto tra il COD solubile nel campione in esame ed il COD totale. Nella prova F-1 questa percentuale si è tenuta tra valori compresi tra l'12% ed il 18%, in linea con valori di letteratura (Demirel and Yenigun, 2004; Ucisik and Henze, 2008) , nella prova F-2, invece, ha raggiunto valori fino al 24%. Questi valori sottolineano ancora quanto il fango della prova F-2 (Sesto San Giovanni) fosse più fermentabile di quello di Bresso-Niguarda.

La buona riuscita della fermentazione è quindi per la gran parte imputabile al tipo e alla composizione del fango. Il campione di prova è stato prelevato per entrambi gli impianti a valle del sedimentatore primario, laddove sono presenti fanghi primari e la frazione di ricircolo dei fanghi provenienti dal sedimentatore secondario. In base al momento di campionamento i fanghi possono presentare maggiore o minore frazione secondaria rispetto alla primaria.

I fanghi primari, molto putrescibili e con un contenuto elevato di frazione organica, sono più digeribili rispetto ai fanghi secondari, che sono costituiti principalmente da polimeri e consorzi batterici. I fanghi primari sono quindi più facilmente idrolizzabili rispetto ai secondari, in cui è presente una quantità di biomassa viva (comunità batteriche) maggiore, che rende il fango meno putrescibile e di conseguenza più recalcitrante alla fermentazione. Nonostante la resa di fermentazione dei fanghi della prova F-1 non sia particolarmente elevata, il rapporto COD_{VFA}/COD_{sol} si mantiene su valori alti (60 - 70%), rendendo il fermentato comunque un ottimo candidato per essere utilizzato come fonte di carbonio per processi biologici. Bisogna altresì sottolineare che la misura in gas cromatografo non conteggia tutti gli acidi volatili presenti nella miscela del fango: queste differenze rispetto al

COD solubile sono probabilmente da riferirsi ad altri acidi volatili come ad esempio l'acido formico. Tenuto conto di ciò, se si volesse riferire la resa di acidificazione dei fanghi misti di Bresso Niguarda al COD solubile misurata, essa sarebbe pari ad una media di $0,18 \pm 0,05$ $g_{COD}/g_{SV,in}$, valore più in linea con i risultati di letteratura.

Per quanto riguarda la produzione di biogas (Figura 4.3, Figura 4.6), entrambe le prove hanno registrato una resa di metano ($g_{CH_4}/g_{COD,in}$) pari a 15%, da considerarsi rilevante anche tenendo in considerazione l'assenza di inoculo in entrambe le prove. Il valore è da ricondursi ancora alla natura dei fanghi misti, che hanno una percentuale di fanghi secondari variabile e di conseguenza una quantità più o meno elevata di batteri metanigeni in grado di trasformare il carico organico in metano.

4.1.4 PROVA F-3

La prova F-3 ha avuto come obiettivo quello di valutare l'efficacia di co-fermentazione di due differenti substrati: biomassa microalgale e i fanghi misti provenienti dall'impianto di Sesto San Giovanni. La prova ha avuto una durata totale inferiore alle precedenti di 10 giorni, a causa della chiusura estiva del laboratorio A.Rozzi. In ogni caso, si è potuto osservare il picco di produzione degli acidi in tutte le bottiglie allestite. I dettagli inerenti all'allestimento e al piano di monitoraggio sono esposti nel paragrafo 3.2.1.

I risultati esposti in questo paragrafo sono da riferirsi alla sola produzione di acidi del substrato in esame, quindi già sottratta del contributo dell'inoculo batterico.

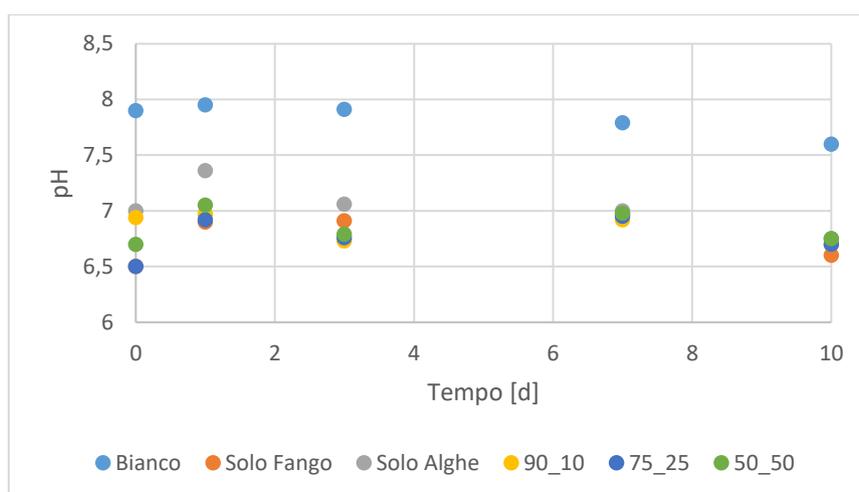


FIGURA 4.7 - ANDAMENTO NEL TEMPO DEI VALORE DI PH.

TABELLA 4.5- RISULTATI PROVA F-3 GIORNO 3, 7 E 10.

	2A	3°	4°	5A	6A
	solo_fango	solo_alghe	90F_10°	75F_25A	50F_50A
Giorno 3					
pH	6,91	7,06	6,73	6,76	6,79
g _{VFA_COD} /L	3,12	1,18	3,10	2,62	2,37
g _{VFA_COD} /gSV,in	0,100	0,030	0,100	0,08	0,076
Giorno 7					
pH	6,97	7,10	6,92	6,95	6,98
g _{VFA_COD} /L	3,75	2,23	3,42	2,25	2,20
g _{COD_CH4} /L	0,980	0,600	2,10	1,50	1,29
g _{VFA_COD} /g _{CODsol}	0,750	0,500	0,63	0,40	0,57
g _{COD,acid} /gSV,in	0,150	0,0931	0,180	0,142	0,120
Giorno 10					
pH	6,60	6,75	6,70	6,70	6,75
g _{VFA_COD} /L	2,22	0,510	2,10	1,74	1,20
g _{COD_CH4} /L	1,25	1,76	2,60	2,70	2,90
g _{VFA_COD} /g _{CODsol}	0,810	0,350	0,800	0,600	0,700
g _{COD,acid} /gSV,in	0,115	0,0750	0,170	0,150	0,140

A partire dai risultati ottenuti per le bottiglie 2A e 3A, preparate con il solo substrato rispettivamente di fango misto e di biomassa algale, si può calcolare la concentrazione di VFA attesa nelle bottiglie di co-digestione ipotizzando un contributo additivo dei substrati co-digeriti, in proporzione alle percentuali di ciascuno. In Tabella 4.6 viene riportato il confronto tra i valori così calcolati con quelli effettivamente misurati nei giorni di interesse.

TABELLA 4.6 - CONCENTRAZIONI DI VFA TEORICHE E MISURATE NEI GIORNI 3 E 7.

		2°	3A	4A	5°	6A
		solo_fango	solo_alghe	90F_10°	75F_25A	50F_50A
Giorno 3	teorico	/	/	2,92	2,67	2,15
g _{VFA_COD} /L	misurato	3,10	1	3,12	2,64	2,42
Giorno 7	teorico	/	/	4,51	4,22	3,75
g _{VFA_COD} /L	misurato	4,70	2,82	5,52	3,75	3,50

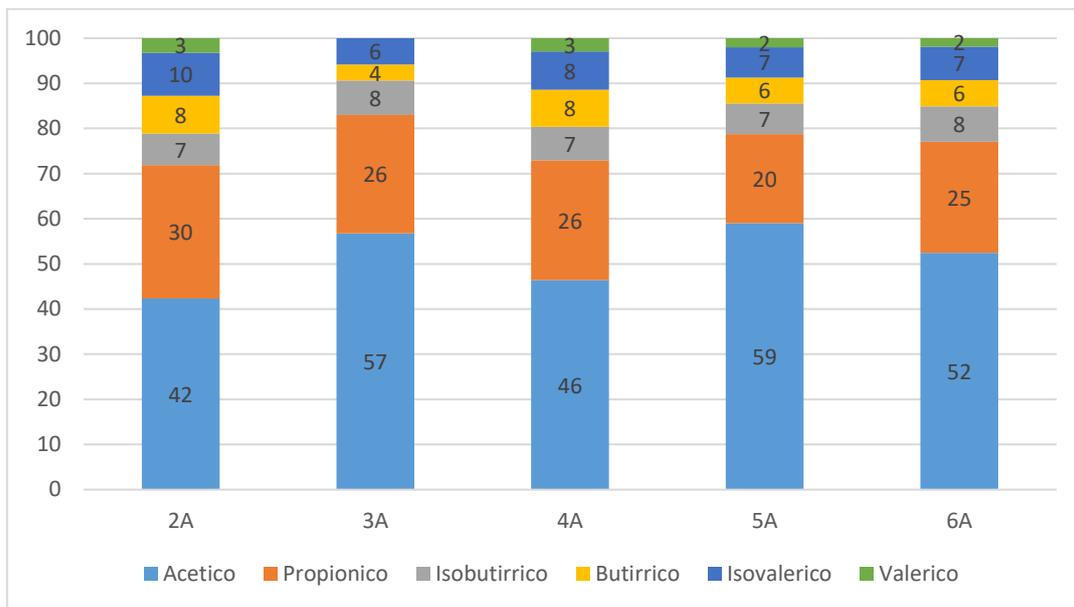


FIGURA 4.8 – COMPOSIZIONE PERCENTUALE DEI VFA PROVA F-3 GIORNO 3.

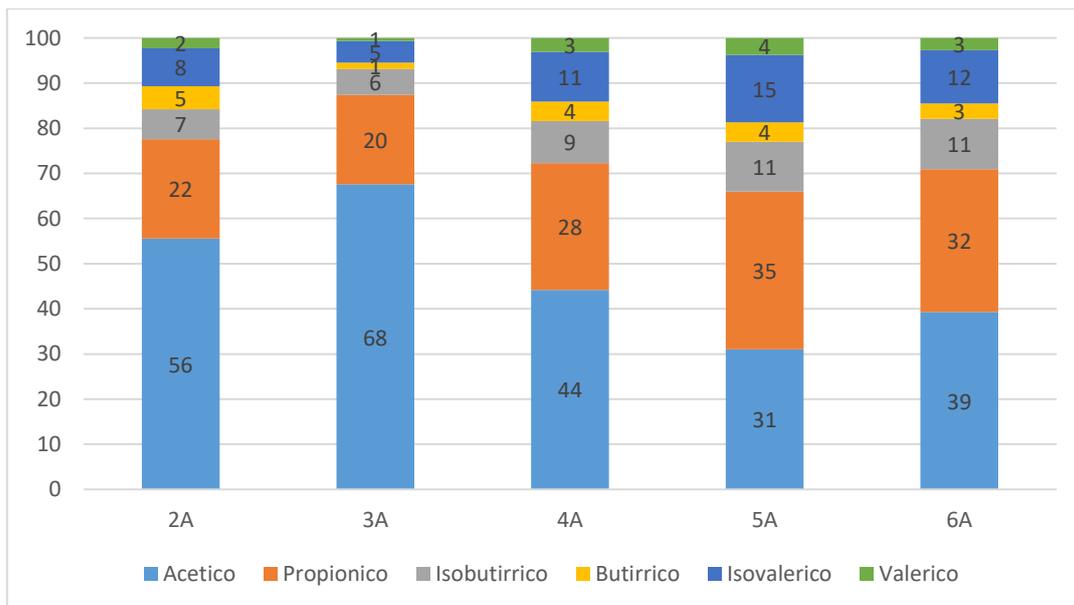


FIGURA 4.9 - COMPOSIZIONE PERCENTUALE DEI VFA PROVA F-3 GIORNO 7.

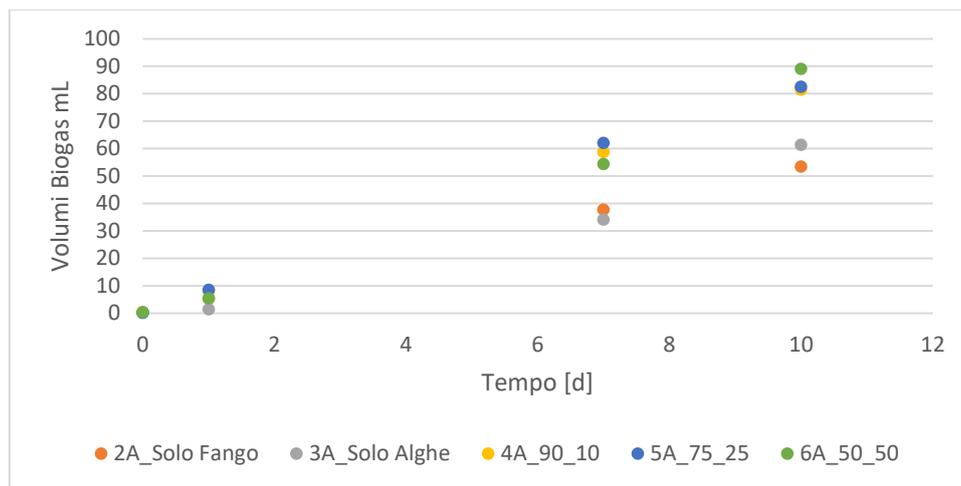


FIGURA 4.10 - VOLUMI DI BIOGAS NETTI PRODOTTI DURANTE LA PROVA F-3.

TABELLA 4.7 - COMPOSIZIONE GAS E RESA METANO NEI GIORNI 7 E 10.

	2B	3B	4B	5B	6B
	solo_fango	solo_alghe	90F_10A	75F_25°	50A_50A
Giorno 7					
O ₂ %	0,100	0,100	0,100	0	0
CO ₂ %	18,6	15,6	17,1	16,1	15,5
N ₂ %	51,1	53,6	41,5	41,8	42,8
CH ₄ %	30,3	30,7	41,3	42,0	41,6
g _{COD_CH4} /g _{COD,IN} %	2,30	2,20	5,10	5,20	4,10
Giorno 10					
O ₂ %	0,100	0	0	0,20	0
CO ₂ %	19,7	17,1	21,0	20,1	19,0
N ₂ %	42,6	38,8	23,2	22,7	24,0
CH ₄ %	37,6	44,1	55,8	57,0	57,0
g _{COD_CH4} /g _{COD,IN} %	4,00	5,20	9,10	9,30	10,3

4.1.5 DISCUSSIONE RISULTATI PROVA F-3

Lo scopo principale della prova F-3 è stato quello di valutare la sinergia nella fermentazione acidogenica di due differenti substrati, i fanghi misti e la biomassa microalgale. La bottiglia 4A (90% fanghi e 10% alghe) rispecchia una possibile soluzione applicabile a scala reale, considerando che l'esigenza di spazio per la coltivazione delle alghe in impianti esistenti

difficilmente può consentire di ottenere maggiori quantità biomassa microalgale (Marazzi et al., 2019). Le restanti due miscele nelle bottiglie 5A e 6A sono state studiate per capire se la co-digestione tra i due differenti substrati portasse a risultati positivi (sinergici) o negativi (competitivi) variando tra loro le frazioni di fango e microalghe.

Il fango di Sesto San Giovanni (bottiglia 2A) raggiunge il suo picco di produzione il giorno 7, come previsto, ma con una concentrazione di circa $5 \text{ g}_{\text{VFA_COD}}/\text{L}$ poco più della metà rispetto alla prova F-2 dove, utilizzando solo fango tal quale, si è raggiunta una concentrazione massima di $9,5 \text{ g}_{\text{VFA_COD}}/\text{L}$ nel giorno di picco (Tabella 4.5). Oltre al fatto che la misura degli acidi, come già descritto in precedenza, non tiene conto dell'acido formico, questa concentrazione bassa è imputabile alla presenza dell'inoculo batterico, che probabilmente ha subito un pretrattamento termico non sufficiente (Paragrafo 3.1.2), come anche indicano le due composizioni del gas (Tabella 4.7), dove le percentuali di metano per tutte le bottiglie sono comprese tra il 30 ed il 40% nel giorno di massima produzione (giorno 7). In ogni caso, la produzione di metano (Figura 4.10) e le rese di metano espresse come $\text{g}_{\text{COD_CH}_4}/\text{g}_{\text{COD_IN}}$ non risultano essere alte il giorno 7 (così come il giorno 10), segno della scarsa produzione di metano di entrambi i substrati in questo primo periodo. Anche il carico organico del substrato troppo elevato potrebbe essere stato la causa della bassa efficienza. È infatti ancora poco chiaro quali siano le correlazioni tra il carico organico e le efficienze di acidificazione, in particolare non è ancora chiaro a quale concentrazione bisogna arrestarsi affinché il substrato non diventi inibitorio alla crescita batterica. Diversi studi hanno trovato un intervallo ottimale tra 5 e $15 \text{ g}_{\text{COD}}/\text{L}$ (Atasoy et al., 2018; Ucisik and Henze, 2008) dopo il quale sia la produzione di acidi volatili che la composizione subivano forti cambiamenti non positivi (paragrafo 2.4.4) (Lee et al., 2014).

In Tabella 4.6 è evidenziata l'additività attesa a partire dalle concentrazioni misurate nella bottiglia 2A e 3A. Nel giorno 3 le concentrazioni misurate di soli acidi volatili registrano un valore più alto rispetto a quelle attese nelle bottiglie 4A e 6A del 6% e del 12% rispettivamente. Nel giorno 7, in cui si è potuta analizzare anche la composizione del gas e quindi la concentrazione di COD trasformato poi in metano, nelle bottiglie 4A e 5A si sono registrate concentrazioni più alte di quelle attese di rispettivamente di 22 e 12%, mentre per la bottiglia 6A la concentrazione è stata registrata più bassa del solo 7%, quindi una percentuale da considerare minima. Questo sta a sottolineare quanto la combinazione dei due substrati sia risultata positiva se nelle elaborazioni viene presa in considerazione la

concentrazione di metano espressa in COD, che è riferita alla quota parte di carbonio organico dapprima convertito in acidi e poi ulteriormente digerito dai batteri metanigeni. È comunque chiaro che queste elaborazioni sono da riferirsi ad una prova dove si studia il potenziale massimo di acidificazione di un particolare substrato, i risultati più in linea con le situazioni a scala reale sono quelli che vengono restituiti da reattori operanti in continuo. Le composizioni degli acidi grassi volatili (Figura 4.8, Figura 4.9) per i due giorni di interesse: le bottiglie 2A, 3A e 4A presentano maggiori percentuali di acetato sino al giorno 7, mentre le bottiglie 5A e 6A hanno la produzione massima di acido acetico il giorno 3 con percentuali rispetto agli altri acidi tra il 50 ed il 60%. Il giorno 7 le bottiglie 5A e 6A presentano una concentrazione di acido acetico minore di 1 g/L per essere poi prossima allo 0 il giorno 10. Il giorno 10 si registrano composizioni dei VFA che lasciano grande spazio all'acido propionico e butirrico, segno dell'inizio della fase di metanogenesi: le percentuali di gas metano, infatti, aumentano di 10 e quasi 20 punti percentuale in tutte le bottiglie. Le rese di metano restano comunque piuttosto basse, il processo di fermentazione infatti non si ritiene del tutto concluso al giorno 10, ma in evoluzione sebbene con velocità inferiori.

4.2 PROVE DI BMP

Di seguito vengono esposti i risultati relativi alle prove di potenziale biochimico di metanizzazione. Le modalità di allestimento e realizzazione delle prove BMP-1 e BMP-2 e BMP-3, le matrici analizzate e le elaborazioni dei dati necessarie per valutare la produzione di gas sono state discusse al capitolo 3, paragrafi 3.1 e 3.2.2. Le curve interpolanti i risultati sperimentali sono cinetiche di pseudo primo ordine (parametro k) e andamenti sigmoidali derivanti da modifiche dell'equazione di Gompertz (parametri a e b).

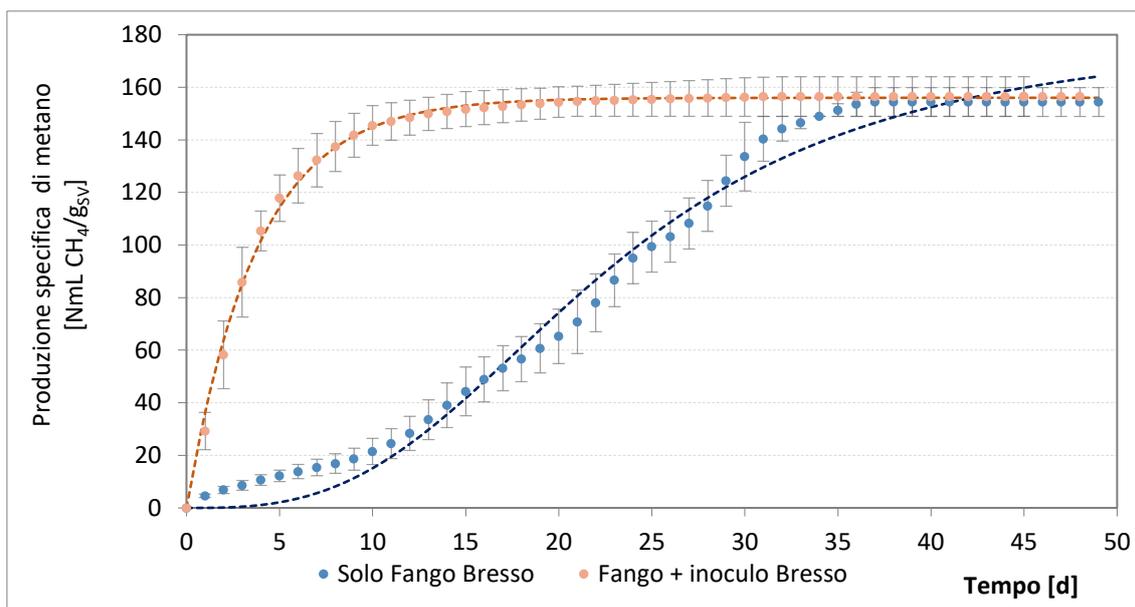


FIGURA 4.11 - ANDAMENTO DELLE PRODUZIONI NETTE CUMULATE DI BIOGAS REGISTRATE DURANTE LA PROVA BMP-1 E CURVE INTERPOLANTI (LINEE TRATTEGGIATE) PER CIASCUN SUBSTRATO.

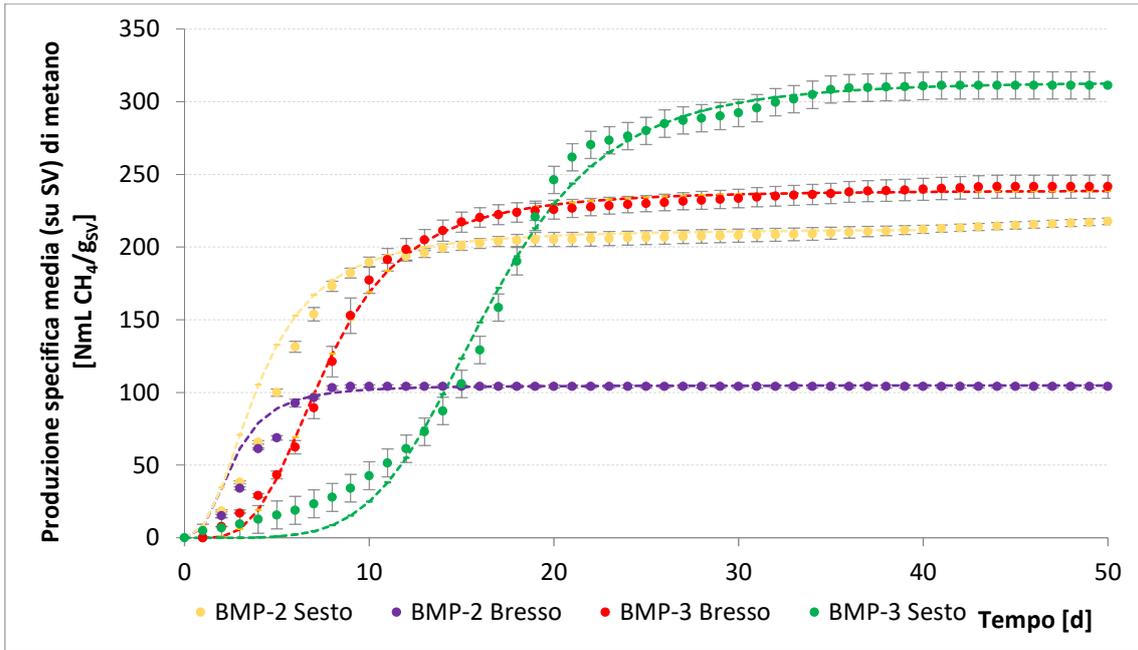


FIGURA 4.12 -ANDAMENTO DELLE PRODUZIONI NETTE CUMULATE DI BIOGAS REGISTRATE DURANTE LA PROVA BMP-1 E BMP-3 E CURVE INTERPOLANTI (LINEE TRATTEGGIATE) PER I SUBSTRATI DI BRESSO E DI SESTO SAN GIOVANNI.

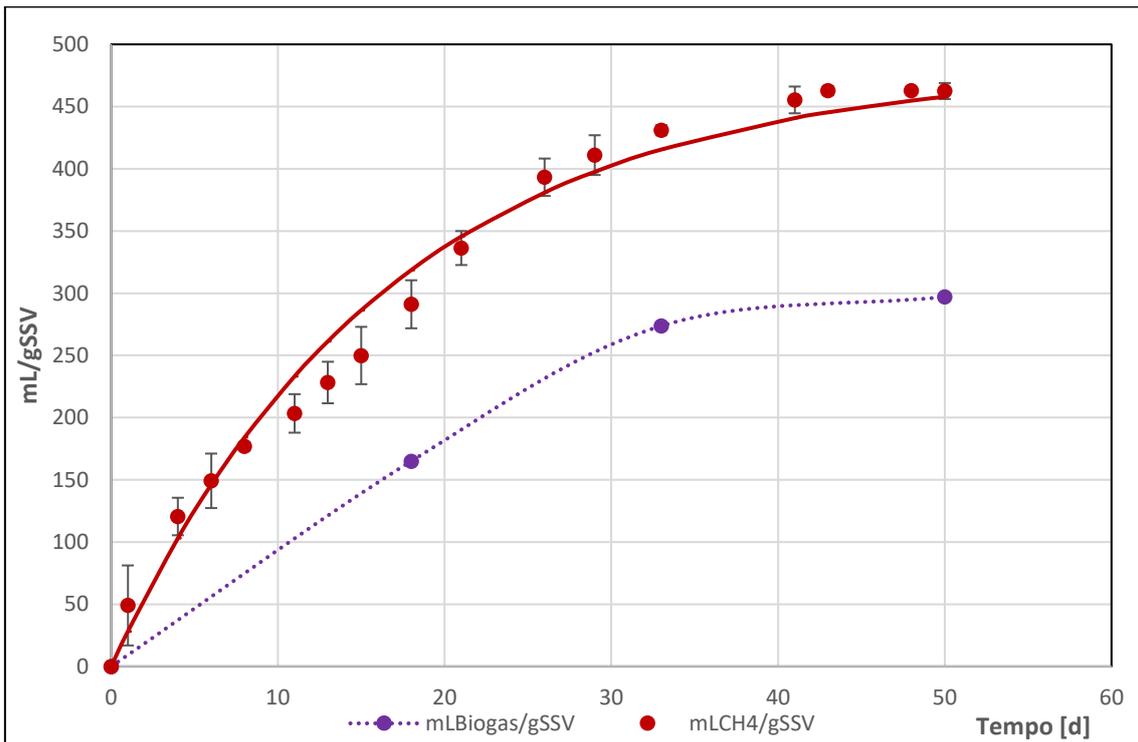


FIGURA 4.13 - ANDAMENTO DELLE PRODUZIONI LORDE E NETTE CUMULATE DI BIOGAS DELLA COMUNITÀ ALGALE *SCENEDESMUS* (RACCOLTA#6) E CURVA INTERPOLANTE (LINEA CONTINUA) DEL SUBSTRATO (ADATTATO DA Guidani, 2019).

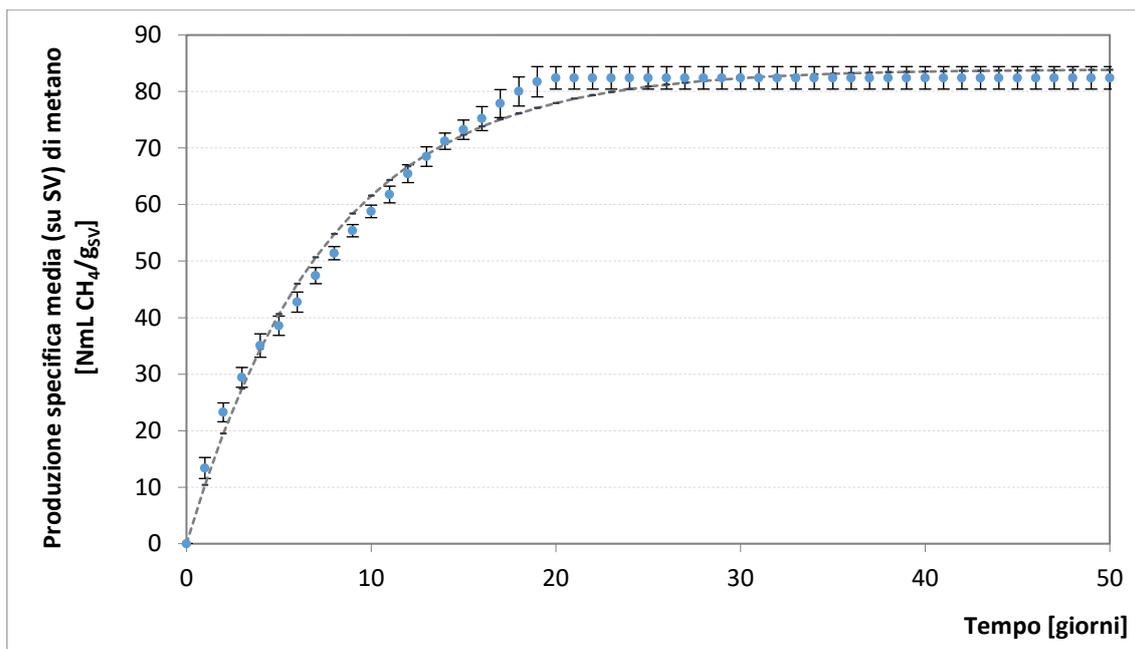


FIGURA 4.14 - ANDAMENTO DELLE PRODUZIONI NETTE CUMULATE DI BIOGAS REGISTRATE DURANTE LA PROVA BMP-3 E CURVA INTERPOLANTE (LINEA TRATTEGGIATA) PER IL SUBSTRATO DELLA COMUNITÀ ALGALE DELLA RACCOLTA#7.

TABELLA 4.8 - RISULTATI DELLE PROVE DI BMP.

Prova		CH ₄ biogas %	Resa CH ₄ NmL _{CH₄} /g _{SV,S}	Biodegradabilità (B) %	a d	b -	k d ⁻¹	Coefficiente di determinazione R ²
BMP-1	Solo fango	55	154±5,5	30	22,67	2,65		0,99
Bresso	Fango+inoculo	55	156±4,2	31	/	/	0,22	0,99
BMP-2	Bresso	55	104±2,1	25	2,63	2,66	/	0,99
S/I=0,5	Sesto	55	214±3,4	45	3,03	2,32		0,99
	Alge	64	297±3	56			0,065	0,98
	Scenedesmus (raccolta#6)							
	Alge miste (raccolta#7)	55	82,4±3,2	20	/	/	0,13	0,99
BMP-3	Bresso	55	241±11,5	47	6,72	3		0,99
S/I=2	Sesto	55	311±12	60	16,33	5		0,99

4.2.1 DISCUSSIONE DEI RISULTATI DI BMP

La valutazione del potenziale biochimico di metanizzazione è di particolare importanza nell'ambito dei processi di digestione anaerobica. Restituisce la massima produzione di metano conseguibile in condizioni ottimali e permette di stimare la biodegradabilità del substrato di interesse e la velocità con cui questa degradazione si esplica.

Nelle grafici degli andamenti di produzione delle diverse prove (Figura 4.11, Figura 4.12, Figura 4.13, Figura 4.14) si riportano le produzioni cumulate di metano riferite all'unità di massa di solidi volatili del substrato. I valori riportati rappresentano i contributi netti, ovvero le produzioni di gas riscontrate nelle bottiglie di interesse al netto di quelle verificatesi nei bianchi. La prova BMP-1 ha avuto come obiettivo quello di valutare la biodegradabilità dei fanghi misti provenienti dall'impianto di Bresso-Niguarda in presenza ed in assenza di inoculo. Il valore ultimo di BMP si attesta per entrambe le miscele su un valore di $155 \text{ NmL}_{\text{CH}_4}/\text{g}_{\text{SV,S}}$ raggiunto già nei primi 15 giorni nella prova con inoculo, solo al giorno 30 per la prova di solo fango. Questo valore ultimo, che dà indicazioni circa la biodegradabilità e la composizione del fango, è in linea con i risultati ottenuti per fanghi di supero, ovvero fanghi di origine biologica ($165 \text{ NmL}_{\text{CH}_4}/\text{g}_{\text{SV,S}}$, valore riportato da Nielfa et al., 2015; $186 \text{ NmL}_{\text{CH}_4}/\text{g}_{\text{SV,S}}$, riportato da Gavala et al., 2003). Questa informazione, insieme con le percentuali di biodegradabilità per entrambe le prove (30% rispetto al COD in ingresso come espresso in Tabella 4.8) indicano come il fango misto del depuratore di Bresso-Niguarda abbia una frazione di fanghi secondari maggiore rispetto a quella dei primari. La prova di digestione di fango in assenza di inoculo è stata impostata al fine di valutare quanto il fango misto in esame, senza l'apporto del consorzio batterico dell'inoculo, fosse in grado di produrre metano, ovvero se nel fango tal quale ci fosse già la presenza di batteri metanigeni. Nonostante la curva interpolante non sia del tutto fedele ai dati sperimentali, essa ha indicato quanto il fango sia stato capace di produrre la stessa quantità di metano della prova con presenza di inoculo, con uno scarto di soli dieci giorni. Già a partire dai primi giorni di prova, i dati hanno indicato una produzione di metano, seppur modesta. Questo risultato è interessante per aiutare la comprensione delle rese di fermentazione della prova FC-1_1 (paragrafo 4.3.1), valori risultati bassi ma coerenti con i dati restituiti dalle prove di BMP.

Le prove BMP-2 e BMP-3 hanno confrontato le rese di produzione di metano dei fanghi misti di Sesto San Giovanni e di Bresso-Niguarda. Una prova è stata impostata con un rapporto Substrato/Inoculo pari a 0,5, valore tipico delle prove di BMP; l'altra prova è stata caratterizzata da un rapporto pari a 2, al fine di riprodurre le condizioni ottime di fermentazione. I risultati hanno nuovamente sottolineato le migliori prestazioni in termini di fermentazione acidogenica del fango misto di Sesto San Giovanni che, anche nelle prove ad alto rapporto S/I, è caratterizzato da un tempo maggiore di latenza prima dell'inizio della fase di metanogenesi (Tabella 4.8, Figura 4.12). Le rese di metano del fango misto di Bresso-Niguarda sono pari a $104 \text{ NmL}_{\text{CH}_4}/\text{g}_{\text{SV,S}}$ e $241 \text{ NmL}_{\text{CH}_4}/\text{g}_{\text{SV,S}}$ per le prove con S/I pari a 0,5 e con

S/I pari a 2 rispettivamente. Per gli stessi rapporti, le rese di metano riferite al fango di Sesto San Giovanni sono state invece pari a $214 \text{ NmL}_{\text{CH}_4}/\text{g}_{\text{SV,S}}$ e $311 \text{ NmL}_{\text{CH}_4}/\text{g}_{\text{SV,S}}$. Queste differenze nei valori ultimi per la stessa tipologia di fango sono da riferirsi ai due valori di S/I: difatti le rese incrementano proporzionalmente per il rapporto S/I maggiore per entrambi i fanghi. In generale, comunque, i valori ultimi del fango di Sesto San Giovanni sono comparabili con quelli di digestione di fanghi primari ($221\text{-}283 \text{ NmL}_{\text{CH}_4}/\text{g}_{\text{SV,S}}$, intervallo riportato da Elbeshbishy et al., 2012; $315\text{-}360 \text{ NmL}_{\text{CH}_4}/\text{g}_{\text{SV,S}}$, intervallo riportato da Da Silva et al., 2018). Questi risultati ben si accordano con i risultati di fermentazione in batch ed in continuo. La differenza delle rese finali tra le prove con inoculo (BMP-1) e rapporto S/I pari a 0,5 (BMP-2) dei fanghi di Bresso (155 e $104 \text{ NmL}_{\text{CH}_4}/\text{g}_{\text{SV,S}}$ rispettivamente) è da attribuirsi alla variabilità intrinseca della composizione di questi fanghi misti con significativa presenza di fanghi secondari. Questa variabilità è dovuta sia alle caratteristiche del refluo, ma ancor di più alle differenze nel trattamento della fase biologica, in particolare al tempo di ritenzione dei solidi che viene applicato, che determina la vitalità e la quantità di batteri e materiale scarsamente degradabile (Da Silva et al., 2018). Il fango biologico è infatti costituito da carboidrati complessi, proteine e molecole organiche a catena lunga: batteri morti e i loro prodotti organici refrattari costituiscono una frazione non degradabile di substrato. Nonostante la filiera di impianto del depuratore di Sesto San Giovanni sia la stessa di quella di Bresso-Niguarda (ovvero ricircolo dei fanghi di supero nella vasca di sedimentazione primaria), il fango misto di Sesto San Giovanni presenta una frazione di fanghi primari maggiore di quella dei secondari: questo è chiaro sia dai risultati dei BMP che dai risultati di fermentazione in batch ed in continuo (paragrafi 4.1 e 4.3.1).

Per quanto riguarda le rese di metano dei campioni di alghe, esse risultano molto distanti tra loro. Il campione di *Scenedesmus obliquus* coltivato su medium sintetico, presenta un valore finale pari a $297 \text{ NmL}_{\text{CH}_4}/\text{g}_{\text{SV,S}}$ molto alto se paragonato a quelli riportati in letteratura (Figura 4.13). Sebbene il campione di *Scenedesmus obliquus* allevato su medium sintetico raggiunge valori di resa alti, lo fa in un tempo pari a circa 50 giorni, quindi abbastanza elevato. Il campione di popolazione mista (prevalentemente composte da *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus*) presenta invece un valore finale pari a $82 \text{ NmL}_{\text{CH}_4}/\text{g}_{\text{SV,S}}$ quasi la metà dei valori riscontrati in letteratura (Figura 4.13). Roberts et al., 2016 ottengono un BMP finale di un campione misto composto da specie appartenenti al genere *Scenedesmus* e *Chlorella* pari a $161 \text{ NmL}_{\text{CH}_4}/\text{g}_{\text{SV,S}}$, contro i 261 e 307 $\text{NmL}_{\text{CH}_4}/\text{g}_{\text{SV,S}}$ ottenuti digerendo *Scenedesmus* e *Chlorella vulgaris* allevate su medium BBM. Passos et al., (2016) ottengono un BMP finale

da biomassa coltivata su refluo pari a $188 \text{ NmL}_{\text{CH}_4}/\text{g}_{\text{SV},\text{S}}$. La minor degradabilità delle popolazioni coltivate su acque reflue è da ricercarsi nelle modifiche che avvengono nella struttura della parete cellulare indotta da fattori di stress ambientali e presenza di predatori, che possono indurre un ispessimento della parete.

4.3 PROVA DI FERMENTAZIONE IN CONTINUO

Di seguito vengono riportati i risultati relativi alla prova di fermentazione in continuo. Tutte le tabelle ed i grafici sono organizzati sulla durata totale di funzionamento dell'apparato sperimentale, ovvero 140 giorni. Nei grafici e nelle tabelle vengono riportate le fasi della prova in continuo FC-1, FC-2, CC-1 e CC-2 organizzate secondo la metodologia esposta al paragrafo 3.2.3.

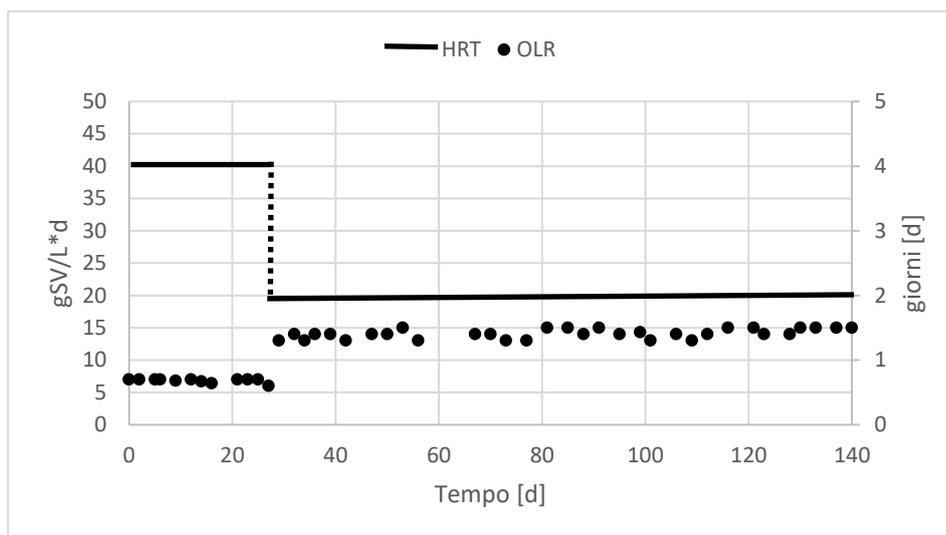


FIGURA 4.15 - ANDAMENTO NEL TEMPO DEL CARICO ORGANICO E DEL TEMPO DI RESIDENZA DELLA PROVA DI FERMENTAZIONE IN CONTINUO.

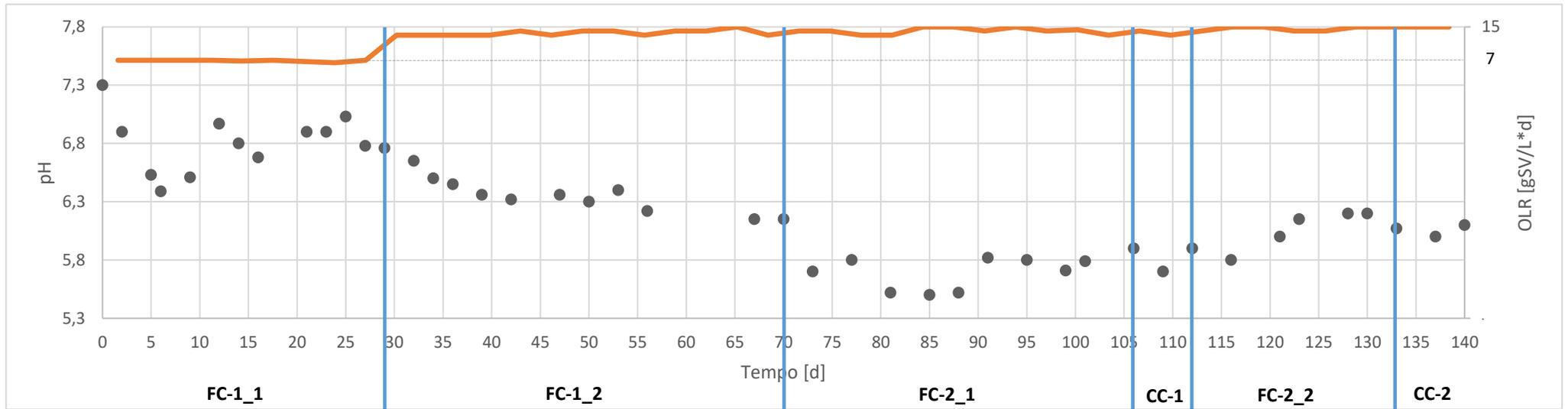


FIGURA 4.16-ANDAMENTO NEL TEMPO DEL VALORE DI PH E DEL CARICO ORGANICO.

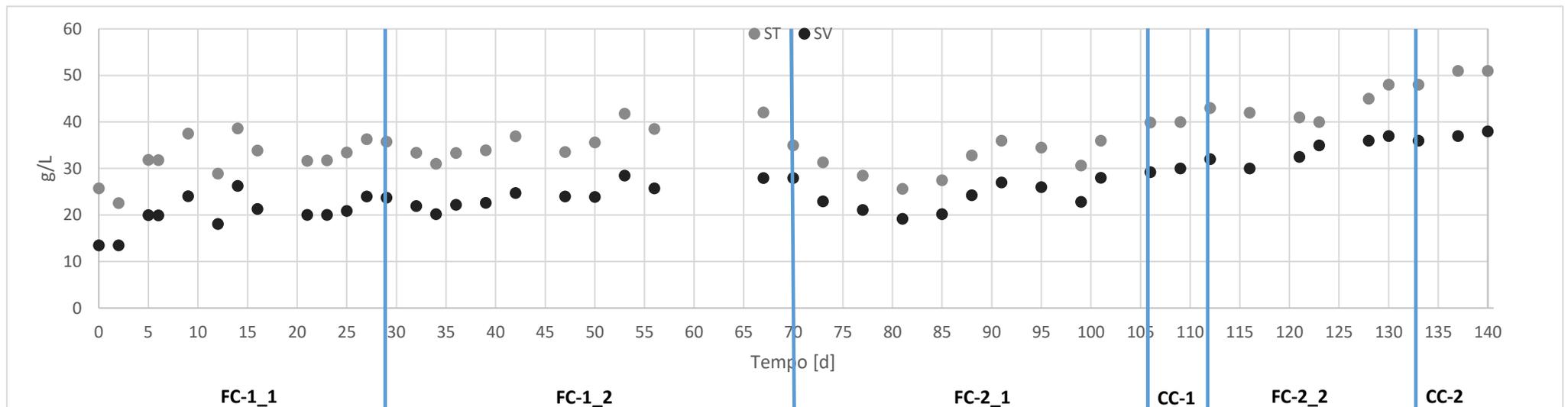


FIGURA 4.17-ANDAMENTO NEL TEMPO DEI VALORI DI SOLIDI TOTALI E VOLATILI.

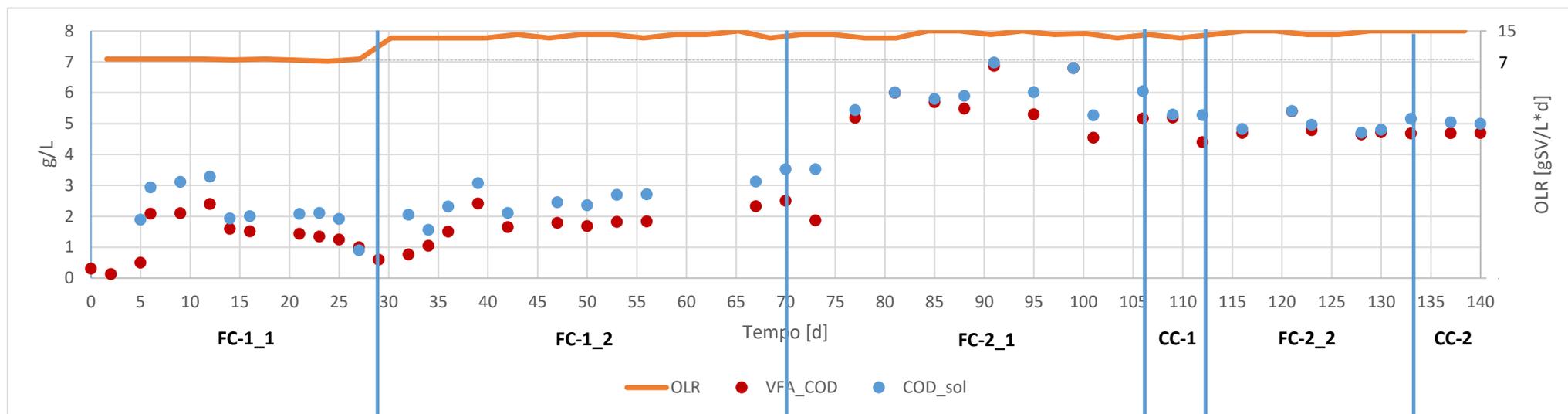


FIGURA 4.18 -ANDAMENTO NEL TEMPO DEI VALORI DI COD SOLUBILE E VFA ESPRESSI COME COD.

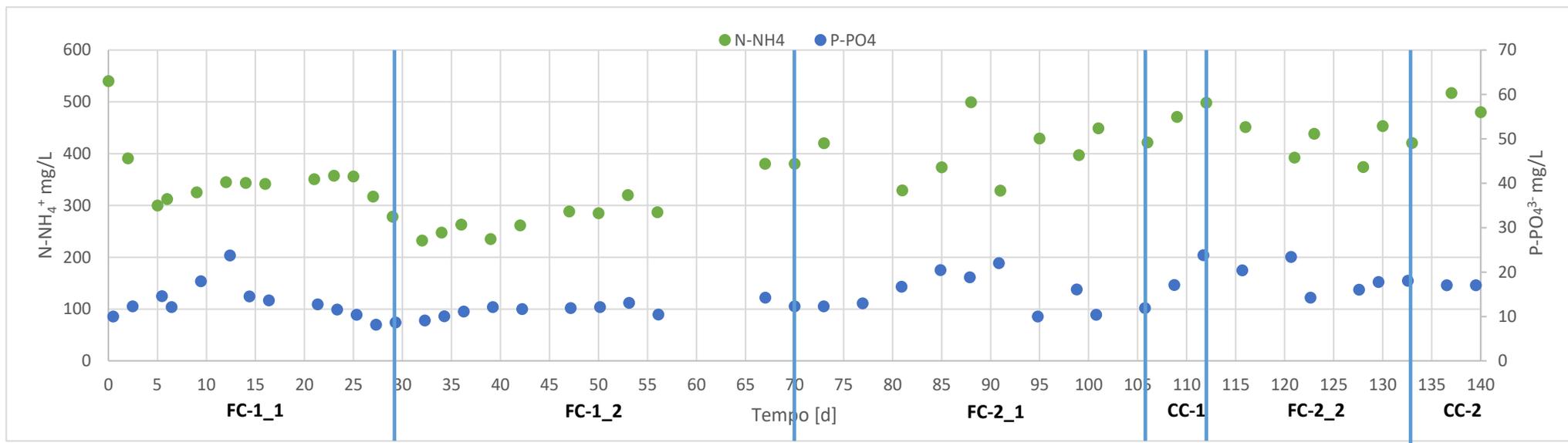


FIGURA 4.19-ANDAMENTO NEL TEMPO DEI VALORI DI AZOTO AMMONIACALE E DEI FOSFATI.

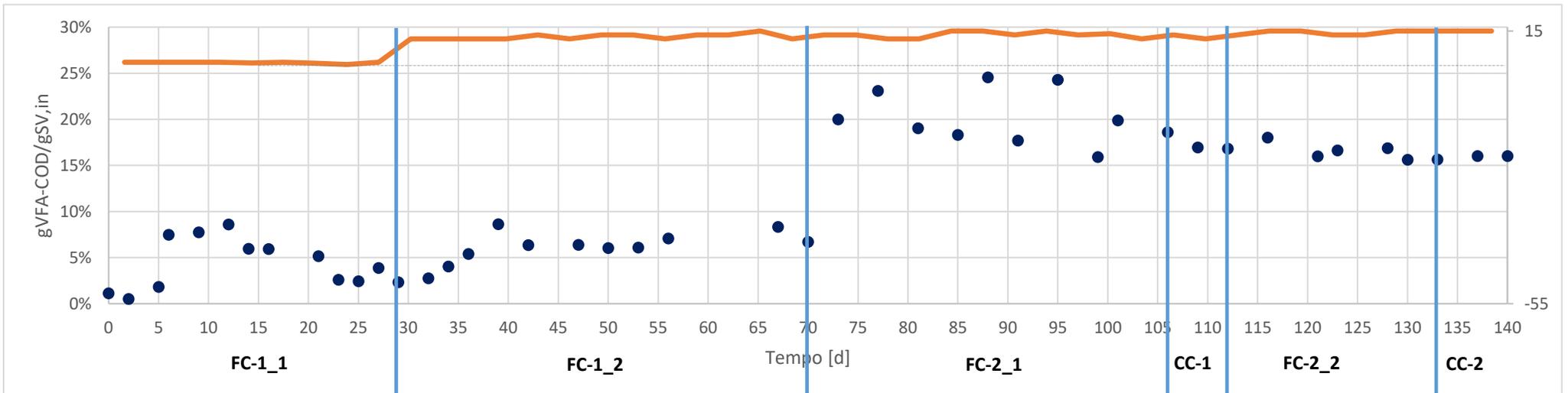


FIGURA 4.20-ANDAMENTO NEL TEMPO DEL VALORE DI RESA DI FERMENTAZIONE.

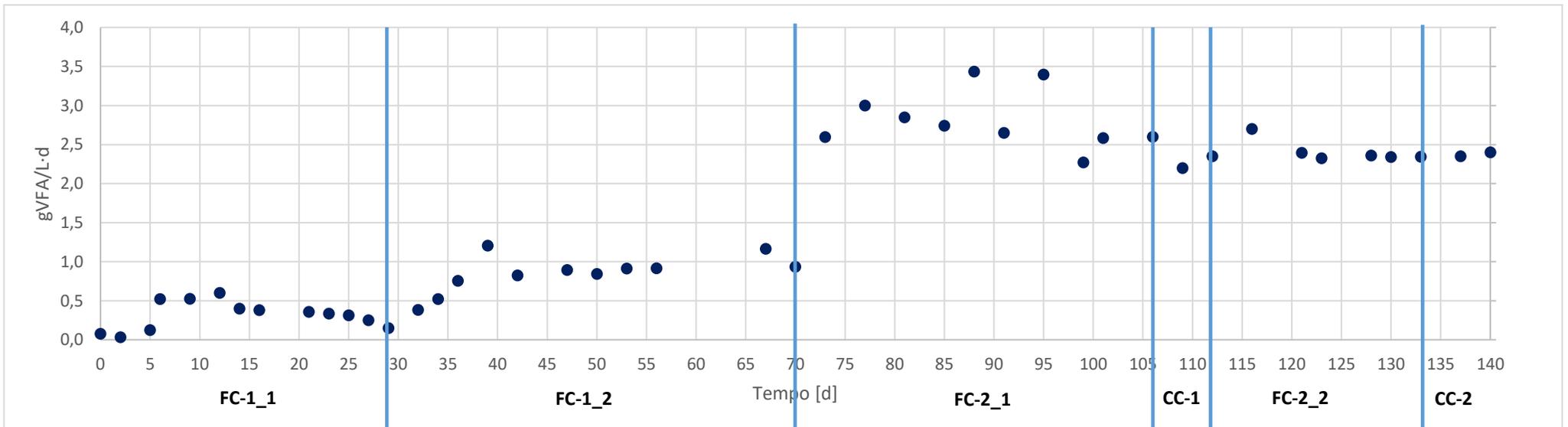


FIGURA 4.21-ANDAMENTO NEL TEMPO DELLA PRODUZIONE GIORNALIERA DI ACIDI GRASSI VOLATILI.

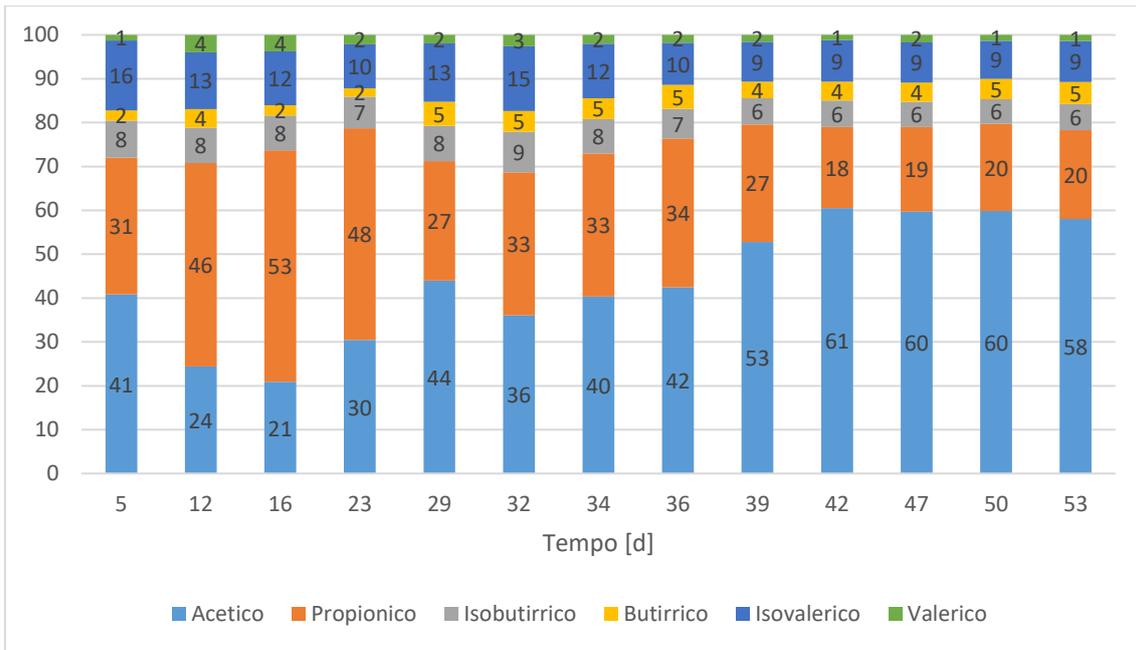


FIGURA 4.22 – COMPOSIZIONE PERCENTUALE DI VFA FASE FC-1 (COMPRESSE FC1_1 E FC-1_2).

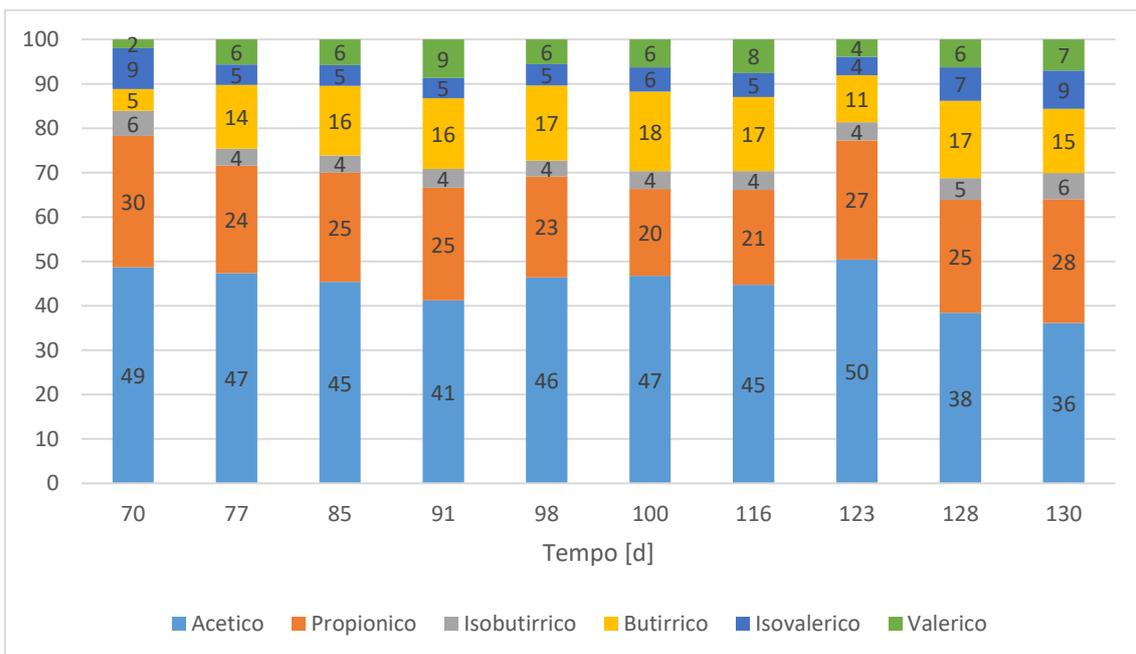


FIGURA 4.23 - COMPOSIZIONE PERCENTUALE DI VFA FASE FC-2 (GIORNI 70-100 FC-2_1, GIORNI 116-130 FC-2_2).

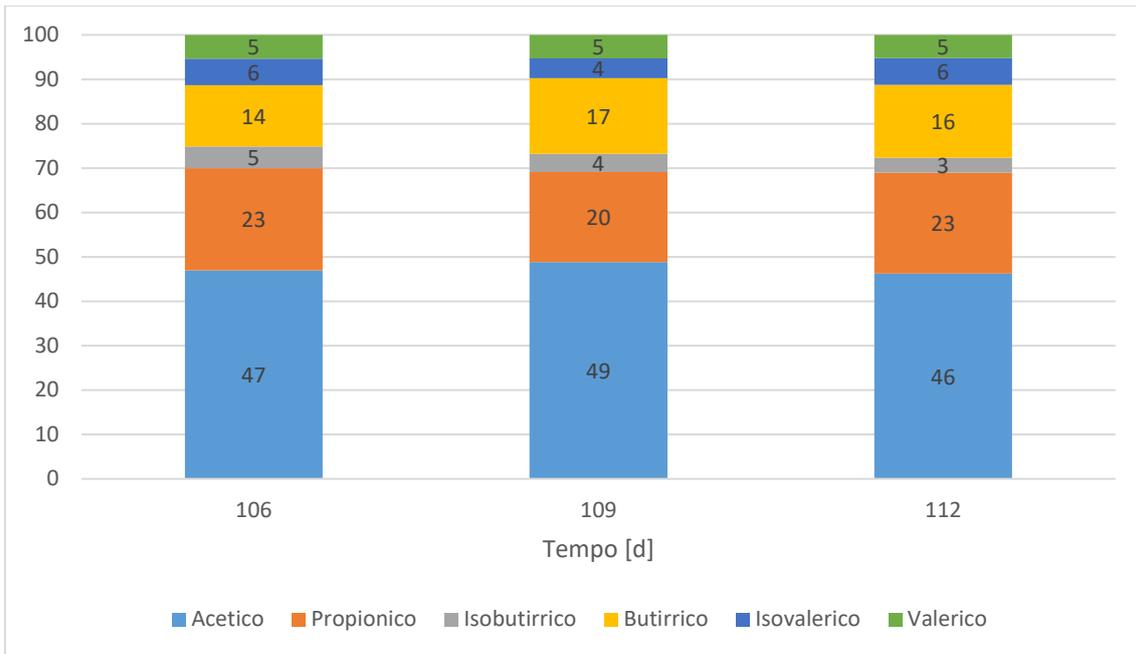


FIGURA 4.24 – COMPOSIZIONE PERCENTUALE DI VFA FASE CC-1.

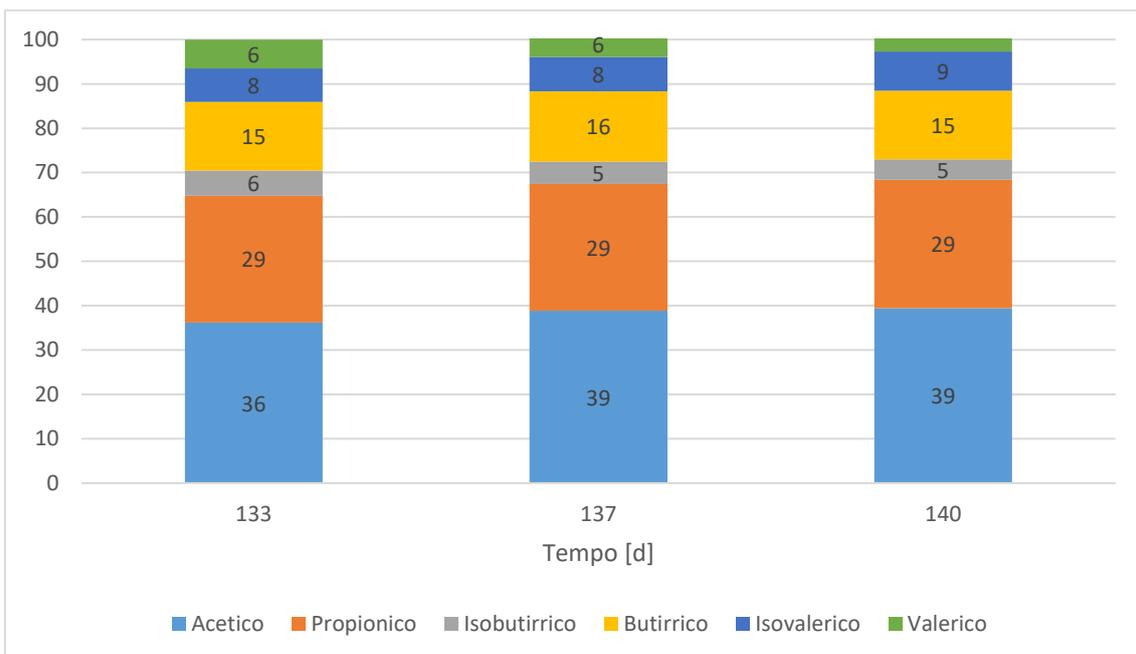


FIGURA 4.25 - COMPOSIZIONE PERCENTUALE DI VFA FASE CC-2.

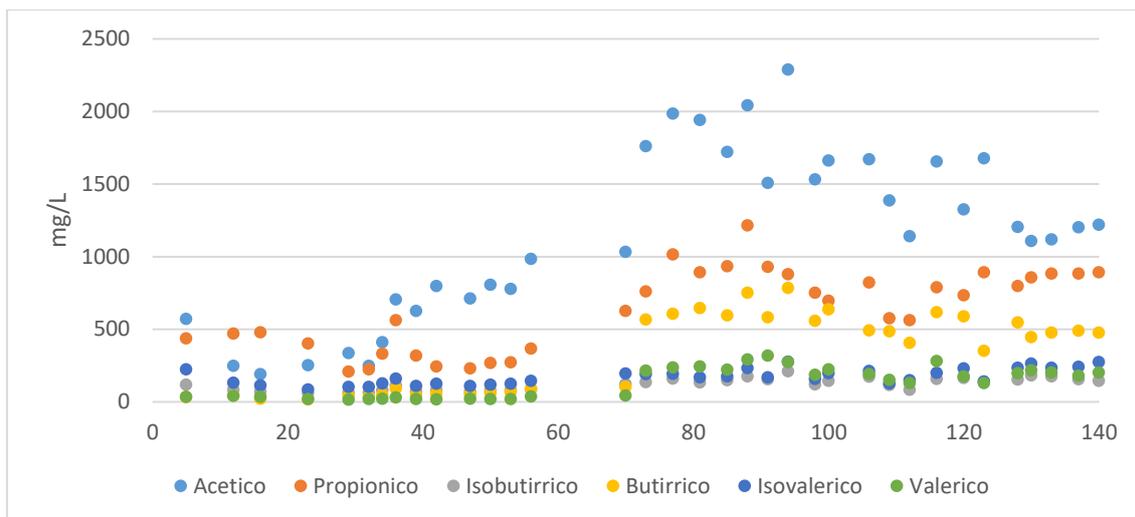


FIGURA 4.26 - ANDAMENTO TEMPORALE DELLE CONCENTRAZIONI DEI SINGOLI ACIDI VOLATILI.

TABELLA 4.9- RISULTATI DELLE DIVERSE FASI DELLA PROVA DI FERMENTAZIONE IN CONTINUO.

		FC-1		FC-2		CC-1	CC-2
		FC-1_1	FC-1_2	FC-2_1	FC-2_2		
pH	-	6,80±0,30	6,43±0,20	5,75±0,18	5,98±0,15	5,80 ± 0,10	6,00±0,052
VFA	g _{VFA_COD} /L	1,22±0,43	2,00±0,40	5,30±1,3	4,82±0,20	5,00 ± 0,32	4,70±0,053
VFA/COD _{tot} , influyente	g _{VFA_COD} /g _{CODtot,in} %	4,20 ± 2,3	5,22±1,2	13,3 ± 2,3	14,5±1,2	10,00	10,00
VFA/COD _{tot} , reattore	g _{VFA_COD} /g _{CODtot} %	4,23	4,33±2,2	16,3±2,4	14,2±2,3	10,00	10,00
Resa di metano	g _{COD_CH4} /g _{CODtot,in} %	24,0±0,082	10,3±0,034	15,3±0,033	10,2±0,025	8,00	13,0
VFA/COD _{solubile}	g _{VFA_COD} /g _{CODsol} %	64,2±10	73,4±10	95,3±5,0	90,4 ± 5,0	98,3±0,053	94,4±0,052
Resa di acidificazione	g _{VFA_COD} /g _{SV,in} %	4,03±2,1	6,45±2,3	18,4±4,4	16,3±0,010	17,40±1,2	16,2

TABELLA 4.10 - COMPOSIZIONE DEL GAS DELLE FASI DELLA PROVA DI FERMENTAZIONE IN CONTINUO.

	Giorno prova	O ₂ %	CO ₂ %	N ₂ %	CH ₄ %
FC-1_1	10	6,00	12,6	16,4	65,1
	14	2,60	20,0	9,30	68,0
	23	1,40	23,7	3,80	71,1
	29	2,10	24,5	9,2	64,2
FC-1_2	36	6,10	22,7	28,0	43,2
	39	4,70	15,0	20,0	60,0
	43	5,40	18,1	20,0	56,6
	49	6,60	11,3	27,3	54,8
FC-2	53	6,10	12,8	33,9	47,1
	88	4,00	13,5	35,0	47,5
	101	5,00	14,8	29,7	50,5
CC-1	112	6,50	15,0	60,0	18,0
	113	6,00	20,4	54,4	19,2
	120	5,40	7,10	71,3	16,2
	128	4,30	15,5	24,5	55,7
CC-2	133	6,10	12,5	28,5	52,9
	137	1,90	25,6	14,6	57,9

4.3.1 DISCUSSIONE DELLA PROVA DI FERMENTAZIONE IN CONTINUO

Lo scopo della prova di fermentazione in continuo è stato quello di valutare la produzione di acidi grassi volatili da fanghi di depurazione misti e quella ottenibile dalla co-fermentazione di fanghi misti e biomassa microalgale. Nella prova in continuo sono state valutate le potenzialità di due fanghi di depurazione di origine civile, provenienti dalla stessa area del Comune di Milano, per capire quale fosse più idoneo al recupero di VFA. Sebbene le condizioni operative delle fasi di acetogenesi e metanogenesi siano ampiamente studiate, la ricerca delle condizioni ottimali per il processo di acidogenesi è tuttora in corso. Esse risultano essere estremamente differenti a seconda del substrato utilizzato (paragrafo 2.3). Gli acidi grassi volatili e la loro composizione sono largamente influenzati dalla fase di idrolisi e da parametri quali il pH, il tempo di ritenzione idraulica e quello dei solidi e la temperatura di processo (Bhatia and Yang, 2017; Lee et al., 2014). Nel presente studio, i parametri su cui si è intervenuti, sono stati il tempo di ritenzione idraulica (HRT) e di conseguenza il carico organico, tentando di non intervenire sul valore di pH. La modalità di fermentazione in continuo offre la possibilità di svolgere analisi sul fermentato in uscita dal reattore permettendo di valutare la stabilità del processo ed il verificarsi di eventuali fenomeni di inibizione di lungo periodo. Al contrario delle prove in batch, le prove in continuo permettono di monitorare la stabilità del processo in condizioni operative più simili a quelle

dei reattori alla scala reale. Di seguito vengono discusse separatamente le 4 fasi di fermentazione in continuo.

Fase di fermentazione in continuo FC-1

La fase FC-1 è stata avviata dopo un lungo periodo di messa a punto dell'apparato sperimentale. Difatti, prima dei risultati qui esposti, sono intercorsi circa 60 giorni di prova della funzionalità del reattore di fermentazione, al fine di garantire la solidità dell'apparato. Le problematiche principali riscontrate durante questi 60 giorni sono state di natura operativa: intasamento delle pompe a causa dell'elevato carico organico e accumulo di solidi all'interno del reattore che ha causato problematiche legate alla miscelazione del fango.

La fase FC-1 ha utilizzato i fanghi misti del depuratore di Bresso Niguarda: la durata totale è stata di 67 giorni, distinti in due sotto fasi a seconda dell'intervento nel controllo del pH e dell'HRT (Figura 4.15, Tabella 3.8).

La fase 1 ha avuto una durata di 29 giorni, momento in cui si è deciso di intervenire per provare ad incrementare l'efficienza del processo: la concentrazione media di acidi volatili infatti si era attestata su $1,2 \text{ g}_{\text{VFA_COD}}/\text{L}$, circa il 40% del valore misurato durante le prove di fermentazione in batch per lo stesso fango. A partire dal giorno 29, si è dunque deciso di modificare il tempo di residenza, cambiando di conseguenza i volumi di alimento di fango, e il valore di pH, correggendo il fango in alimento utilizzando soluzioni pure di H_2SO_4 e HCl . L'utilizzo di acido solforico non è preferito nell'ambito della digestione anaerobica, in quanto i solfati vengono ridotti a spese del carbonio organico. Nonostante questa premessa, l'aggiunta di acido solforico è stata minima ed ha influito sul consumo della COD influente per valori al di sotto dell'1%. Si è ritenuto necessario questo intervento, non soltanto perché rispetto alla prova in batch la percentuale di produzione era significativamente inferiore, ma anche perché in generale per un carico organico così elevato ($10 \text{ g}_{\text{COD}}/\text{L}$), la produzione di VFA osservata è risultata molto inferiore rispetto ai dati di letteratura (Atasoy et al., 2018; Bhatia and Yang, 2017; Lee et al., 2014). Oltretutto, già a partire dal giorno 12, la composizione degli acidi volatili (Figura 4.22, Figura 4.26, Figura 4.26), così come la resa di metano (calcolata come $(\text{COD}_{\text{tot, in}} - \text{COD}_{\text{tot, reattore}})/\text{COD}_{\text{tot, in}}$) pari a circa $0,24 \text{ g}_{\text{COD, CH}_4}/\text{g}_{\text{COD, tot}}$ indicava come il processo stesse evolvendo verso la metanogenesi: nonostante la concentrazione ancora alta della totalità degli acidi, la percentuale maggiore era infatti quella dell'acido propionico. Tra il giorno 23 e 29 le percentuali di acido acetico e propionico risultavano essere confrontabili, ma la concentrazione della totalità dei VFA

registrava valori anche al di sotto di $1 \text{ g}_{\text{VFA_COD}}/\text{L}$. Come già esposto nel paragrafo 4.1.3, la scarsa efficienza del fango misto proveniente da Bresso-Niguarda è da imputare alla tipologia e alla composizione del fango stesso, che con molta probabilità e come anche evidenziano le prove di BMP esposte in precedenza (paragrafo 4.2.1), presenta percentuali di fango secondario maggiori del primario. A partire dal giorno 29, quindi, si è intervenuto per provare a migliorare l'efficienza del sistema: il pH del fango in alimento è stato corretto ad un valore pari a 6 (il suo valore originario era di 6,7) ed il tempo di residenza abbassato da 4 a 2 giorni. In questa seconda fase si mostrano risultati sicuramente più promettenti rispetto alla prima fase (Figura 4.16, Figura 4.18), seppur ancora con scarse rese di fermentazione. La massima concentrazione di acidi volatili è stata di $2,5 \text{ g}_{\text{VFA_COD}}/\text{L}$, circa il 70% del valore misurato nelle prove di fermentazione in batch (prova F-1 paragrafo 4.1.1). Anche la composizione degli acidi volatili ha fortemente risentito del cambio dei parametri, assestando la percentuale maggiore all'acido acetico, che insieme con il propionico, hanno coperto circa l'80% dell'intera composizione, come era stato evidenziato già dalle prove in batch per lo stesso fango (Figura 4.1). Questo, insieme con i valori dei principali parametri, che a partire dal giorno 40 hanno assunto valori più o meno stabili (variazioni entro il 20%), ha evidenziato la stabilità ormai raggiunta del processo. La produzione di acidi grassi volatili in termini di concentrazione di COD si è però sempre tenuta molto vicina alle misure del COD solubile in uscita dal reattore (valori compresi tra il 60 ed il 70%), ciò è indice del fatto che la produzione era nel suo massimo ottimale. Il rapporto $\text{g}_{\text{VFA_COD}}/\text{g}_{\text{SV,in}}$ è passato dal 4% (FC-1_1) al 6% (FC-1_2), dal 16 al 25% rispetto al rapporto per lo stesso fango registrato nelle prove in batch. Questi sono valori piuttosto bassi se confrontati con quelli di letteratura (Demirel and Yenigun, 2004; Oktem et al., 2006). Le basse percentuali si riflettono anche sulla composizione del gas in uscita dallo sfiato del reattore, svolta periodicamente come indicato nel paragrafo 3.2.3. La composizione ha indicato sin dai primi giorni una percentuale piuttosto elevata del metano, segno della concorrente presenza del processo di metanogenesi nonostante l'HRT decisamente basso. Questa produzione di metano è da riferirsi alla presenza di batteri metanigeni nella miscela di fango in esame, come è stato indicato dalla prova di BMP dello stesso fango in assenza di inoculo (BMP-1 paragrafo 4.2.1). Anche quando i parametri operativi sono stati modificati, la composizione del gas ha indicato una percentuale di metano elevata (circa il 47%), ma comunque più contenuta dei valori della fase 1 registrando una resa di metano pari a $0,1 \text{ g}_{\text{COD,CH}_4}/\text{g}_{\text{COD,tot}}$ contro lo $0,24 \text{ g}_{\text{COD,CH}_4}/\text{g}_{\text{COD,tot}}$ della fase FC-1_1.

Sono state anche monitorate le concentrazioni di azoto ammoniacale e fosforo, per osservare il rilascio di nutrienti durante il processo (Figura 4.19). Questi rilasci dipendono dall'efficienza del processo di idrolisi e quindi dai parametri che lo influenzano (pH e tempo di residenza) e seguono dunque l'andamento delle concentrazioni di COD solubile, indice della quantità di materiale organico idrolizzato (Banister et al., 1998). In generale è utile il controllo dei nutrienti nell'ottica di riutilizzo del fermentato quale fonte di carbonio nei processi biologici: il rapporto tra COD e nutrienti deve essere significativamente maggiore rispetto allo stechiometrico al fine di non inibire la loro rimozione per via biologica (Ucisik and Henze, 2008). Le considerazioni fatte per quanto riguarda la prova di fermentazione in batch dei fanghi di Bresso-Niguarda, è la stessa da farsi per la prova in continuo. I fanghi di natura biologica, a seconda del tempo di ritenzione dei solidi a cui sono sottoposti è più o meno degradabile e quindi fermentabile (Bolzonella et al., 2005). Infatti, i residui cellulari e il materiale inerte sospeso che non vengono degradati (Ucisik and Henze, 2008) si accumulano all'interno del reattore proporzionalmente all'età del fango (come si può stesso notare dall'andamento dei solidi totali e volatili in Figura 4.17).

Fase di fermentazione in continuo FC-2

A partire dal giorno 70, il reattore di fermentazione è stato alimentato con i fanghi misti provenienti dall'impianto di Sesto San Giovanni. La fase ha avuto una durata totale di 70 giorni, che hanno incluso anche le due fasi di co-fermentazione, CC-1 e CC-2, tra le quali il reattore ha continuato ad essere alimentato dai fanghi di Sesto San Giovanni (FC-2_2). I parametri operativi scelti sono stati gli stessi della fase FC-1_2, ovvero HRT pari a 2 giorni, che ha determinato un carico organico OLR pari a 15 ± 1 gSV/L·d o $21,5$ g_{COD}/L·d, valori abbastanza alti rispetto alle esperienze di letteratura (Bhatia and Yang, 2017; Lee et al., 2014). Il pH del fango in alimento, al contrario della fase FC-1_2, non è stato modificato verso valori più acidi. La fase FC-2 ha determinato una resa di fermentazione alta, il 110% più alta della fase FC-1_2 a parità di condizioni iniziali, per la stessa tipologia di fanghi utilizzati. Già a partire dai primi giorni di prova, il pH si è attestato su valori compresi tra 5,5 e 5,8, valori influenzati alle caratteristiche del fango in alimento che presentava valori di pH pari a 5,5. Già nei primi 10 giorni le concentrazioni di VFA erano pari a 6 g_{VFA_COD}/L, raggiungendo il picco il giorno 88 con $6,8$ g_{VFA_COD} /L di acidi grassi volatili. Questa concentrazione ha oscillato tra valori di 5 e 7 g_{VFA_COD} /L nei successivi 10 giorni, momento in cui si è reso necessario un nuovo campionamento (raccolta #4 Tabella 3.1). A partire da

questo nuovo campionamento sia i valori di pH che le concentrazioni di acidi volatili hanno subito un lieve cambiamento: il pH nel reattore è leggermente aumentato, comunque tenendosi su valori medi nell'intervallo compreso tra 5,8 e 6 e la concentrazione di acidi volatili, invece, si è mantenuta nell'intorno di $5 \text{ g}_{\text{VFA_COD}}/\text{L}$.

La composizione degli acidi ha avuto la percentuale di acetato compresa tra il 40 ed il 50% seguita dall'acido propionico con valori compresi tra il 20 e il 30% (Figura 4.23). Queste percentuali sono da riferirsi alla composizione del fango costituito principalmente da carboidrati, proteine e lipidi la cui quantità dipende dalle porzioni di fango primario e secondario. Fanghi ricchi di carboidrati promuovono percentuali maggiori di acido propionico e butirrico, l'acido acetico è il principale acido se i fanghi sono ricchi di proteine, lasciando spazio anche all'acido valerico ed isovalerico (Shen et al., 2017). Oltre alla composizione del fango, anche la scelta dei parametri di processo influenza la distribuzione degli acidi. Il pH gioca un ruolo fondamentale sulla quantità e sulla composizione degli acidi grassi volatili: questo parametro, insieme con l'HRT e il carico organico, infatti, controllano l'idrolisi, fase fondamentale di tutto il processo di acidogenesi (Atasoy et al., 2018b Zhao et al., 2018). Il pH può governare le vie metaboliche che risultano nelle diverse composizioni degli acidi volatili (Zhou et al., 2018): per valori alcalini (a partire da valori neutri sino ad arrivare a 10) la percentuale più alta è quella dell'acido acetico, con valori tra il 60 ed il 70%, per pH acidi (compresi tra 5 e 6) la percentuale è del 50% (Cheah et al., 2019), lasciando spazio all'acido butirrico e propionico (Zhou et al., 2018). Queste considerazioni ben spiegano perché le composizioni degli acidi delle fasi FC-1 e FC-2 si discostano tra loro nelle percentuali, anche quando il tempo di residenza ed il carico organico sono risultati essere uguali. Nonostante siano diverse tra loro, sono invece risultate in linea con i dati registrati delle prove in batch di entrambi i fanghi. Anche in questa fase le percentuali di metano sono alte (Tabella 4.10), nonostante ciò le rese di metano (Tabella 4.9) si sono mantenute su valori compresi tra l'8 e il 15%, percentuali non estremamente elevate, ma che comunque sottolineano la necessità di rendere il processo più efficace.

I rapporti degli acidi grassi volatili rispetto al COD totale del fango e rispetto ai grammi di solidi volatili ($0,18 \text{ g}_{\text{VFA_COD}}/\text{g}_{\text{CODtot}}$ e $0,22 \text{ g}_{\text{VFA_COD}}/\text{gSV,in}$) sono in linea con risultati di letteratura (Lee et al., 2014, Ucisik and Henze, 2008) così come le percentuali di acidi grassi volatili rispetto al COD solubile, che durante la prova FC-2 hanno raggiunto anche

valori prossimi al 100%, sottolineando ancora una volta la risposta migliore dei fanghi misti del depuratore di Sesto San Giovanni.

Fase di co-fermentazione in continuo CC-1

La fase CC-1 ha avuto inizio il giorno 106 e termine il giorno 112, la biomassa microalgale era quella proveniente dall'Istituto L. Spallanzani. Il problema principale riscontrato nel trattamento delle microalghe è stato il raggiungimento della concentrazione desiderata di solidi sospesi in alimento, a causa della scarsa efficienza ottenibile in termini di separazione solido/liquido con la centrifuga disponibile al laboratorio A. Rozzi. La concentrazione finale ottenuta (18 gSV/L) ha impedito di operare secondo il piano sperimentale inizialmente impostato che prevedeva che la biomassa microalgale dovesse coprire il 10% del carico organico della prova. Si è dunque abbassato, seppur di poco, il carico organico a 13 ± 1 gSV/L-d. Di conseguenza la percentuale di biomassa microalgale rispetto al carico organico è stata del 6%. A questo scopo si fa riferimento all'andamento dei g_{VFA_COD}/g_{SV} (Figura 4.20) che meglio spiega la produttività della fase di co-fermentazione. I risultati non evidenziano particolari cambiamenti rispetto alla prova FC-2_1 per quanto riguarda la concentrazione di acidi volatili, che varia, ma in intervalli ristretti e dovuti con molta probabilità alle oscillazioni del carico organico. Il rilascio di nutrienti risente dell'aggiunta di biomassa microalgale risultando in un aumento, seppur non considerevole, delle concentrazioni sia di azoto ammoniacale che di fosforo. L'azoto aumenta di circa 100 mg/L, mentre più evidente è l'aumento di fosforo che passa da 17 mg/L a quasi 24 mg/L, valori imputabili al tipo di microalga introdotta che, con riferimento alla sua caratterizzazione in Tabella 3.5, presenta valori di fosforo particolarmente alti, proprio perché coltivata su medium sintetico. Questi valori poi tornano sulla media della prova FC-2_1 poco dopo il termine della prova CC-1. Per quanto riguarda la composizione degli acidi (Figura 4.24), non si notano particolari differenze con la distribuzione precedente alla fase CC-1, con la percentuale maggiore affidata all'acido acetico, seguito dal propionico. Come già l'esperienza delle prove in batch aveva indicato (paragrafo 4.1.4), i risultati di una digestione con due biomasse differenti a queste percentuali, non presenta particolari differenze se non il vantaggio di utilizzare una biomassa che altrimenti dovrebbe essere smaltita in altro modo e di aumentare la quantità di acidi volatili complessivamente ottenibili nel bilancio di un impianto. L'unico problema, come già evidenziato in precedenza, è legato ai metodi di separazione della biomassa per il raggiungimento di concentrazioni idonee ai processi di fermentazione e alle esigenze di

spazio per la coltivazione della biomassa algale. A questo scopo, nella prova CC-2 si è utilizzata una biomassa differente e separata con una centrifuga di solito utilizzata come scrematrice di prodotti caseari (chiarificatore a dischi Elecrem tipy con capacità 125 L).

Fase di co-fermentazione in continuo CC-2

La prova CC-2 ha avuto inizio il giorno 133 e si è conclusa il giorno 140, termine ultimo dello studio sperimentale. Ha previsto l'utilizzo di biomassa microalgale proveniente dall'impianto pilota all'interno del depuratore di Bresso-Niguarda (Mi). La biomassa è stata pretrattata con l'utilizzo del chiarificatore a dischi descritto in precedenza, al fine di raggiungere il volume e la concentrazione di solidi desiderata. La caratterizzazione, disponibile in Tabella 3.5, non si discosta molto dalla caratterizzazione delle alghe di tipo *Scenedesmus* (raccolta#6) ad esclusione dei nutrienti e dei solidi che sono in concentrazione maggiore. Il metodo di separazione solido/liquido ha permesso di raggiungere concentrazioni di solidi totali molto alte e volumi adatti a ricoprire i giorni necessari alla fase di co-fermentazione. Così come per la prova CC-1, la prova CC-2 non ha evidenziato particolari cambiamenti nelle concentrazioni, nelle rese di fermentazione e nella composizione degli acidi, come da aspettative (Figura 4.18, Figura 4.20, Figura 4.25). Anche i nutrienti, sia azoto che fosforo, non subiscono forti variazioni, da evidenziare un aumento del solo azoto ammoniacale, seppur marginale (Figura 4.19).

In letteratura non si trovano esperienze legate alla co-fermentazione di substrati quali fanghi e alghe, molto più spazio è dedicato a studi sulla co-digestione dei suddetti substrati, che comunque non producono risultati migliori e in alcuni casi presentano forti problematiche circa l'accumulo di solidi, legati alla biomassa algale non degradata, o alla poca disponibilità di nutrienti per la crescita batterica; concentrazioni di azoto ammoniacale comprese tra di 50-200 mg/L (McCarty, 1964) sono necessarie per sostenere la crescita dei microrganismi anaerobici (Carminati et al., 2018; Yen and Brune, 2007). In questo studio non sono stati riscontrati gli stessi problemi se non un accumulo, che già era in evoluzione (Figura 4.17), di solidi. La biomassa algale è stata introdotta nel caso della prova CC-1 dopo aver subito un trattamento di centrifugazione non aggressivo ma le microalghe del genere *Scenedesmus* sono note per la recalcitranza nei confronti della degradazione anaerobica dovuta alla resistenza della parete cellulare all'idrolisi (Mussnug et al., 2010; Ramos-Suárez and Carreras, 2014). Per la fase CC-2 la biomassa algale non ha contribuito né all'aumento né al decremento della produttività del processo di acidogenesi, come si è osservato anche

durante la prova in batch con le stesse condizioni e con le stesse tipologie di fanghi e alghe (Prova F-3). Va altresì detto che la biomassa algale della fase CC-2 proviene da un impianto di coltivazione a scala pilota all'interno di un depuratore, quindi si avvicina di più alla biomassa che verrebbe alimentata in co-fermentazione in reattori alla scala reale.

In generale nelle prove di fermentazione sono tante le motivazioni che rendono il processo non sempre efficiente. Ad esempio, è ancora poco chiaro quale sia la combinazione più efficace tra carico organico e tempo di residenza. È sicuramente importante che il tempo di residenza sia basso per prevenire lo sviluppo dei batteri metanigeni; allo stesso tempo però è fondamentale che sia lungo abbastanza da promuovere l'idrolisi della sostanza organica (Ferrer et al., 2010) Ad ogni modo, la letteratura suggerisce come i valori ottimali siano da studiare per ogni tipologia di substrato e come, anche tra substrati di simile natura, sia differente la risposta in termini di resa del processo (Feng et al., 2009; Ucisik and Henze, 2008). Difatti, cambiando origine del substrato organico, senza variare però né il punto di campionamento né i trattamenti a cui viene sottoposto il campione, i risultati risultano essere nettamente differenti.

4.4 PROVE DI DENITRIFICAZIONE IN MANOMETRIA

Di seguito vengono esposti i risultati relativi alle prove di denitrificazione in manometria. Le modalità di realizzazione delle prove di denitrificazione, così come le matrici analizzate e le elaborazioni dei dati necessarie per valutare la produzione di gas sono state discusse al capitolo 3, paragrafo 3.2.4. I risultati sono rappresentati tramite grafici (Figura 4.27, Figura 4.28, Figura 4.29) dove si evidenzia l'andamento delle moli di azoto gassoso in funzione del tempo. Nella Tabella 4.12 sono evidenziate le rese di denitrificazione calcolate a partire dal modello di Gompertz modificato (Tjørve and Tjørve, 2017) che meglio ha descritto gli andamenti di produzione di azoto gassoso. Le matrici coinvolte in queste prove sono state i fanghi attivi degli impianti di Bresso-Niguarda (prova D-1) e di Sesto San Giovanni (prova D-2) e come fonti di carbonio una soluzione sintetica di acidi grassi volatili e tre soluzioni differenti con la presenza di un solo acido per la prova D-1 e l'effluente della prova FC-2 per D-2. Nella Tabella 4.11 sono inoltre richiamate le concentrazioni iniziali e finali di nitrato e di VFA.

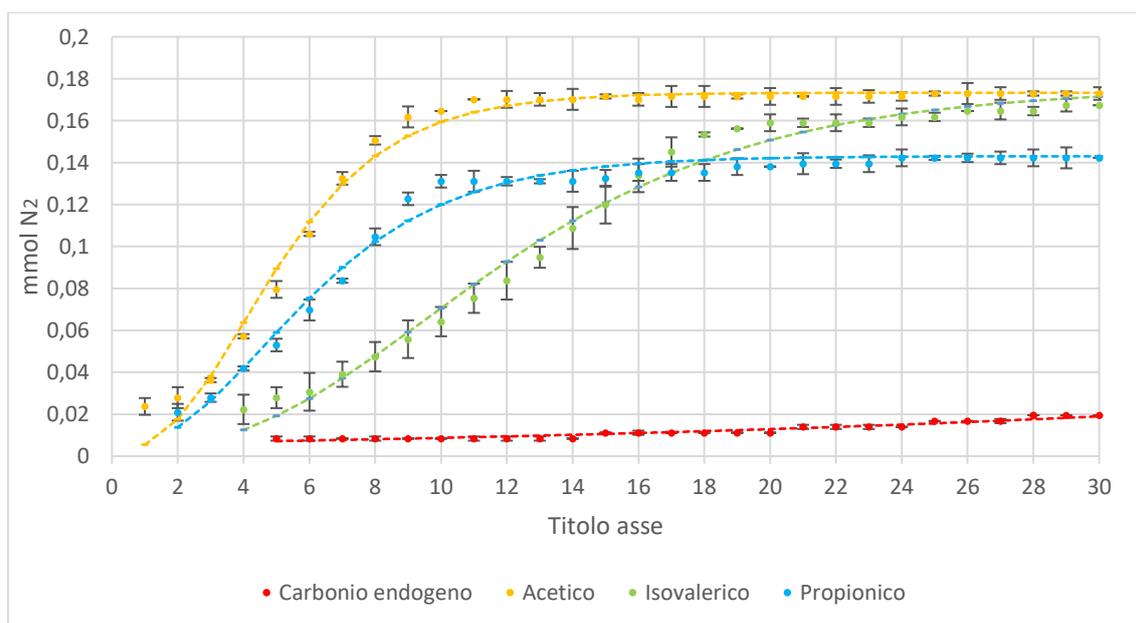


FIGURA 4.27 - ANDAMENTO NEL TEMPO DELLA PRODUZIONE DI AZOTO GASSOSO PROVA D-1 SINGOLI ACIDI.

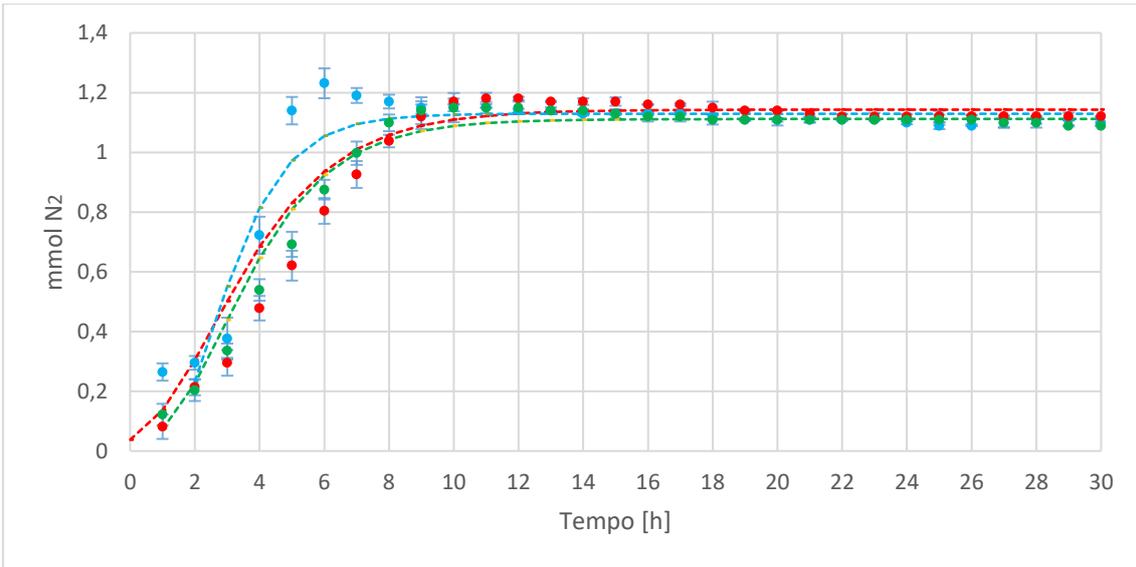


FIGURA 4.28 -ANDAMENTO NEL TEMPO DELLE PRODUZIONI DI AZOTO GASSOSO PROVA D-1 MIX SINTETICO VFA.

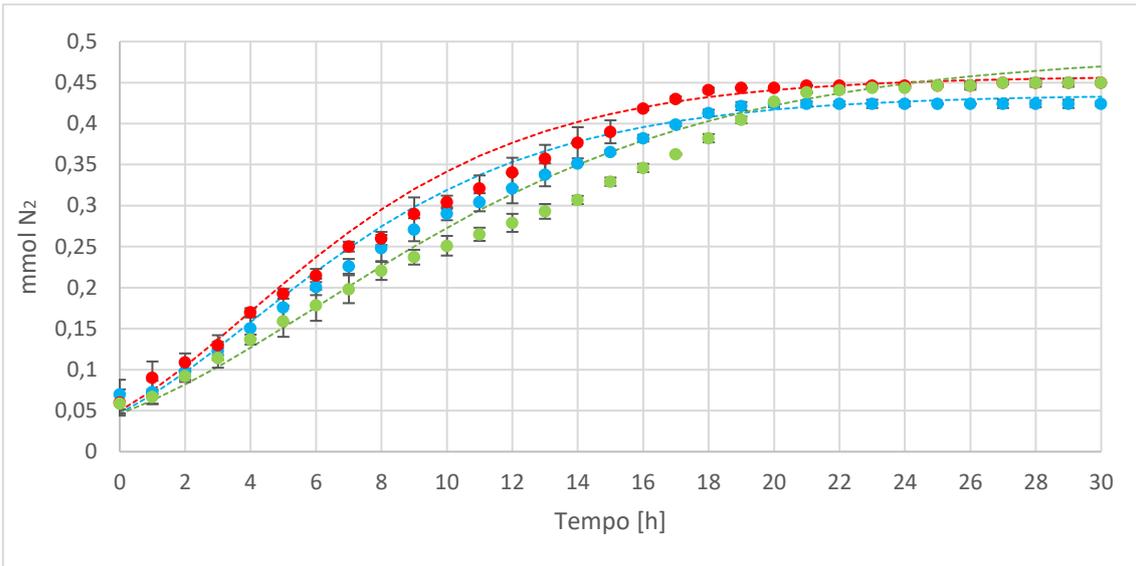


FIGURA 4.29 -ANDAMENTO NEL TEMPO DELLE PRODUZIONI DI AZOTO GASSOSO PROVA D-2 EFFLUENTE PROVA FC-2.

TABELLA 4.11 - CONCENTRAZIONI INIZIALI E FINALI DEL SUBSTRATO ORGANICO E DEL NITRATO.

	UM	Acetato	Propionato	Isovalerato	Substrato endogeno	Mix sintetico	Effluente prova FC-2
		D-1	D-1	D-1	D-1	VFA D-1	D-2
N-NO ₃ , in	mg/L	28,5	28,5	28,5	28,5	57,5	57
VFA _{COD} , in	mg _{COD} /L	200	200	200	200	400	400
N-NO ₃ out	mg/L	0,25	0,33	0,21	nd	0,45±0,10	nd
COD _{sol} out	mg _{COD} /L	nd	nd	Nd	nd	0	44±8

TABELLA 4.12 –RISULTATI MODELLISTICI PROVE DI DENITRIFICAZIONE IN MANOMETRIA.

	UM	Acetato	Propionato	Isovalerato	Substrato endogeno	Mix sintetico	Effluente prova FC-2
		D-1	D-1	D-1	D-1	VFA D-1	D-2
Coefficiente di determinazione		0,98	0,98	0,98	0,99	0,90	0,97
R ²							
-							
k _h		2,05	1,33	0,90	0,30	5,81±1,30	2,32 ± 0,30
mgN-NO ₃ /gSSV·h							
k _d		0,05	0,03	0,02	0,007	0,14±0,03	0,05±0,001
gN-NO ₃ /gSSV·d							
k _n		0,10	0,08	0,10	0,0042	0,10	0,13±0,001
mgN-NO ₃ /mgCOD _{sol}							

4.4.1 DISCUSSIONE DEI RISULTATI PROVE DI DENITRIFICAZIONE IN MANOMETRIA

Il successo del processo di denitrificazione è fortemente dipendente dalla fonte di carbonio esterna. Come evidenziato dalla Tabella 2.3, sono numerosi gli studi che hanno cercato valide alternative al classico utilizzo di metanolo come fonte di carbonio, trovando quella degli effluenti ricchi di acidi grassi volatili una promettente soluzione.

Quello che gioca un ruolo fondamentale nel processo di denitrificazione è il rapporto COD/N. In questo studio il rapporto tra COD e nitrato è stato fissato pari a 7, valore sotto stechiometrico definito a partire dal modello ASM1 (rapporto teorico è pari a 9), come anche suggerito da Carrera et al., 2004. Come è visibile dagli andamenti nel tempo delle moli di azoto gassoso, la metodologia proposta da Ficara et al., 2007 è solida e riproducibile: in tutti le bottiglie di denitrificazione è stata evidenziata una produzione di azoto gassoso confrontabile con i dati di letteratura, le analisi finali su ogni campione hanno indicato come

tutto il carbonio disponibile sia stato utilizzato durante il processo di denitrificazione- risultato atteso per le condizioni di prova iniziali imposte (COD limitante)- e di come il nitrato introdotto in ogni bottiglia sia stato denitrificato almeno per il 90% del suo valore iniziale.

Tutte le prove hanno avuto un periodo cosiddetto di lag che ha oscillato tra 1 ora, arrivando ad un massimo di 5 ore nella prova con utilizzo di solo substrato endogeno. Questa fase (come anche indicato da Ficara et al., 2007) potrebbe essere attribuita a:

- Il tempo necessario alla biomassa ad acclimatarsi al nuovo substrato e a convertire il proprio metabolismo da aerobico ad anaerobico;
- La presenza di ossigeno residuo nel volume di testa della bottiglia a causa di una imperfetta deossigenazione iniziale: questo ossigeno residuo verrebbe utilizzato come accettore di elettroni preferenziale rispetto al nitrato, causando ad inizio prova una riduzione della pressione letta.

Tutti i tassi di denitrificazione calcolati risultano essere inferiori a quelli evidenziati dai dati di letteratura per condizioni iniziali simili: i valori di questo studio presentano un tasso massimo pari a 0,14 g NO₃-N/gVSS·d nella prova con mix di acidi sintetici, mentre i risultati di letteratura arrivano anche a valori pari a 0,75 g NO_x-N/gVSS·d (k_d Tabella 2.3). I risultati di questo studio nella prova con effluente dal processo di fermentazione acidogenica in continuo FC-2 (D-2) sono pari a 0,05±0,001 g NO_x-N/gVSS·d, valori più vicini a quelli trovati da Elefsiniotis et al., 2004 e He, 2006 che riportano risultati nell'intorno di 0,024 ± 0,003 g NO_x-N/gVSS·d a parità di condizioni iniziali. La prova D-1 con mix sintetico di VFA presenta un tasso k_h più alto delle prove a singoli acidi in media di 0,1 g NO_x-N/gVSS·d, con un valore di 0,14 g NO₃-N/gVSS·d, a causa probabilmente della maggiore concentrazione iniziale di COD.

In generale si può concludere che quella che non è stata ottimizzata è la velocità con cui avviene il processo di denitrificazione nella prova con effluente da processo di fermentazione. La differenza nei tassi di denitrificazione rispetto a quelli riscontrati in letteratura è da riferirsi alle modalità operative: il processo di denitrificazione in continuo presenta rese più alte rispetto a quelle ritrovate nello stesso processo in batch, a causa dell'assenza di memoria della biomassa attiva in reattori operanti in continuo, che una volta acclimatata, permette di raggiungere condizioni stazionarie con un tasso di denitrificazione alto (Elefsiniotis et al., 2004).

Le prove D-1 sono state condotte mentre il reattore di fermentazione in continuo lavorava con i fanghi di Bresso-Niguarda (fase FC1 paragrafo 4.3). A partire dalla composizione degli acidi volatili della fase FC-1 (Figura 4.22) è stata scelta la distribuzione degli acidi volatili sia nel mix sintetico che nelle soluzioni a singoli acidi. Da qui il motivo della presenza dell'acido isovalerico: durante la prova FC-1, infatti, l'acido isovalerico era in percentuale maggiore, insieme con il propionico e l'acetico. Le curve di produzione di azoto gassoso per le prove D-1 con substrato sintetico di VFA presentano, come atteso, pendenze più elevate rispetto alla prova D-2 che ha utilizzato l'effluente della prova di fermentazione FC-2 (Figura 4.28 Figura 4.29). Questo effluente aveva una concentrazione media di acidi volatili pari a $4 \text{ g}_{\text{VFA_COD}}/\text{L}$, con circa $1,8 \text{ gHAC}/\text{L}$, $0,6 \text{ gHPr}/\text{L}$ e $0,5 \text{ gIso-HVa}/\text{L}$. Nella miscela di prova la sua concentrazione è stata fissata a $400 \text{ mg}/\text{L}$ e ha garantito un tasso di rimozione di nitrato pari a $0,05 \text{ gN-NO}_3/\text{gSSV}\cdot\text{d}$. La concentrazione del mix sintetico nella miscela di prova era pari a $400 \text{ mg}_{\text{COD}}/\text{L}$ con un rapporto acido acetico, propionico, isovalerico pari a 3:2:1.

La Figura 4.27 mostra gli andamenti di produzione di azoto gassoso per la prova D-1 a singoli acidi (acetico, propionico ed isovalerico), che indica anche in quale ordine i batteri preferiscono degradare gli acidi per il processo di denitrificazione. L'acido acetico è quello che viene utilizzato per primo e che quindi presenta anche il tempo di latenza più basso (circa 1 ora), risultato in linea con gli andamenti riscontrati da Elefsiniotis et al., 2004. Oltre ad essere il primo ad essere utilizzato come accettore di elettroni, è quello che presenta anche il tasso di denitrificazione più alto, come viene indicato dal parametro k_n . È seguito poi dall'acido propionico che, nonostante sia più veloce nella denitrificazione dell'acido isovalerico, si assesta su valori di azoto gassoso più bassi degli altri due acidi. In questa prova è stato valutato anche il tasso di denitrificazione del carbonio endogeno, per comprendere se fosse rilevante o meno sul bilancio di rimozione di nitrato. A giudicare dai valori di concentrazione di nitrato calcolati a fine prova, prossimi allo 0, è plausibile pensare che la denitrificazione, terminato il contenuto di COD solubile introdotto, proceda lentamente utilizzando carbonio endogeno. Ragionando in termini di milligrammi di N-NO_3 , l'apporto della denitrificazione con carbonio endogeno è stato una rimozione di circa $0,8 \text{ mgN-NO}_3$ che, rispetto ai grammi introdotti (7 gN-NO_3) risulta essere una frazione limitata.

5. VALUTAZIONI A SCALA DI IMPIANTO

In accordo ai risultati delle diverse prove condotte è stato possibile elaborare un bilancio di massa che preveda il processo di fermentazione acidogenica accompagnato al possibile utilizzo di fermentato ricco di acidi grassi volatili come fonte di substrato biodegradabile per la rimozione di azoto. Nella Tabella 5.1 sono evidenziati i parametri utilizzati in questo bilancio, l'impianto a cui si fa riferimento è quello di Sesto San Giovanni (la filiera di trattamento è visionabile in Appendice).

La Tabella 5.1 riassume le principali assunzioni e ipotesi del bilancio di massa semplificato.

I solidi totali e volatili della biomassa algale possono essere stimati come:

$$M_{A,ST} = A \cdot PS \cdot \eta_{RACCOLTA-A} = 3,5 \text{ g}_{TS}/AE \cdot d$$

$$M_{A,SV} = M_{A,ST} \cdot SV/ST_A = 3,15 \text{ g}_{SV}/AE \cdot d$$

La quantità di solidi totali e volatili del fango misto sono assunte pari a:

$$M_{FM,ST} = 60 \text{ g}_{TS}/AE \cdot d$$

$$M_{FM,SV} = M_{FM,ST} \cdot SV/ST_{FM} = 42 \text{ g}_{SV}/AE \cdot d$$

Questi valori di biomasse corrispondono ad un rapporto [Alghe/Fanghi] misti pari a circa 0,1. Definendo le stesse ipotesi di lavoro di questo studio sperimentale, ovvero tempo di residenza del fermentatore pari a 2 d e concentrazione di solidi volatili della miscela fanghi/alghe in entrata al fermentatore di 30 g/L (quindi una concentrazione di solidi totali pari a 42 g/L, considerando i differenti rapporti SV/ST di fanghi ed alghe) e tenuto conto dell'efficienza di cattura della fase di ispessimento, la portata di fanghi in uscita dal pre-ispessitore sarà pari a

$$Q_{id} = (M_{A,ST} + M_{FM,ST}) \cdot c_i \cdot \frac{AE}{42 \text{ g}_{ST}/L} = 225 \text{ m}^3/d$$

A valle del processo di fermentazione è presente la separazione solido/liquido. Si ottengono quindi due flussi distinti: un flusso di fanghi e uno di surnatante ricco di VFA. La portata di fanghi uscente dal processo di centrifuga considerando la resa di cattura (c_i) e una concentrazione di solidi totali nel flusso dei fanghi pari a 150 g_{ST}/kg è pari a:

$$Q_S = \frac{Q_{id} \cdot (42 \text{ g}_{ST}/L) \cdot \eta_{S/L}}{150} = 55 \frac{\text{m}^3}{d}$$

La frazione separata liquida del fermentato, ricca di acidi grassi volatili, rappresenta circa 170 m³/d come di seguito stimato:

$$Q_C = Q_{id} - Q_S = 170 \frac{m^3}{d}$$

Considerando questa portata e l'efficienza di produzione di acidi grassi volatili, la produzione giornaliera di acidi grassi volatili riferita al flusso di surnatante uscente dalla centrifuga è pari a:

$$Q_F = Q_C \cdot 30 \frac{g_{SV}}{L} \cdot \eta_{FERM} = 1030 \text{ kg}_{COD-VFA}/d$$

Attualmente, nell'impianto di Sesto San Giovanni, viene dosata una soluzione carboniosa (a base glicole) con concentrazione media di COD (C_c) di 500 g_{cod}/L. La pompa dosatrice lavora con una portata massima q di 130 L/h (Appendice). La portata giornaliera massica della soluzione carboniosa è quindi pari a:

$$q_d = q \cdot C_c = 1560 \text{ kg}_{COD-VFA}/d$$

Tenuto conto di questa portata, gli acidi grassi volatili prodotti nel comparto di fermentazione sarebbero in grado di coprire il 66% del carico di carbonio organico necessario nei processi biologici.

TABELLA 5.1 - PRINCIPALI PARAMETRI ASSUNTI PER LA VALUTAZIONE DEL BILANCIO DI MASSA.

Dati riferiti a impianto di depurazione Sesto San Giovanni				
Popolazione servita	P	150.000	AE	CAP Holding
Dotazione idrica	d_i	300	L/AE/d	(Metcalf, 2014)
Coefficiente α	α	0,8	-	(Metcalf, 2014)
SV/ST fanghi misti	SV/ST_{FM}	0,7	g/g	Questo studio
Produzione di fango misto	M_{FM}	60	$g_{TS}/(AE \cdot d)$	(Metcalf, 2014)
Soluzione carboniosa	C_C	500	g_{COD}/L	CAP Holding
Pompa dosaggio soluzione carboniosa	q	130	L/h	CAP Holding
Produzione di VFA tramite Fermentazione e resa di Denitrificazione				
Efficienza di cattura ispessimento	c_i	0,95	g/g	(Metcalf, 2014)
Efficienza di fermentazione	η_{FERM}	0,2	$g_{VFA-COD}/g_{SV}$	Questo studio
Efficienza separazione S/L fermentato	$\eta_{S/L}$	0,85	g/g	Questo studio
Efficienza di rimozione nitrati	η_{DENIT}	0,13	g_{N-NO_3}/g_{CODsol}	Questo studio
Coltura di microalghe				
Area disponibile per la coltivazione	A	0,5	m^2/AE	Ipotesi di lavoro
Produzione specifica	PS	10	$g_{TS}/(m^2 \cdot d)$	(Marazzi, F. et al. 2017)
SV/ST microalghe	SV/ST_A	0,9	g/g	Questo studio
COD/SV alghe	COD/SV_A	1,51	g/g	(Larsdotter and Microbiology, 2006)
Efficienza di separazione S/L	$\eta_{raccolta-A}$	0,7	g/g	Questo studio

6. CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

Le acque reflue rappresentano una grande risorsa nella produzione di energia e la fase di digestione anaerobica è il processo su cui è maggiore l'interesse verso lo sviluppo di alternative che possano presentare un valore commerciale maggiore della sola produzione di biogas. La produzione di acidi grassi volatili si inserisce in questa ottica e le sue potenzialità sono state largamente approfondite.

Questo studio ha avuto come obiettivo quello di valutare la produzione di VFA da fanghi misti, ovvero fanghi primari e fanghi biologici, provenienti da due depuratori differenti: l'impianto di trattamento di Bresso-Niguarda e quello di Sesto San Giovanni, entrambi situati nell'area nord del comune di Milano. Le risposte di prove in modalità batch ed in modalità continua senza controllo di pH hanno sottolineato le migliori prestazioni del fango misto proveniente da Sesto San Giovanni, con rese di acidificazione che, in modalità batch, hanno raggiunto anche il 50% ($g_{\text{COD-VFA}}/g_{\text{SV,in}}$). Il reattore di fermentazione operante in continuo ha lavorato per una totalità di 140 giorni con un carico organico che ha oscillato tra i 7 ed i 15 $g_{\text{SV}}/L \cdot d$ a seconda del tempo di residenza imposto (4d e 2d). Anche in modalità continua, le migliori efficienze sono state raggiunte utilizzando il fango proveniente da Sesto San Giovanni. Questi risultati sono imputabili alla composizione del fango, ovvero alla frazione di carboidrati, proteine e lipidi, strettamente legata alla percentuale di fango primario e fango secondario presente nel fango misto. Infatti, il fango secondario è normalmente meno degradabile anaerobicamente del fango primario, essendo composto per lo più da biomassa e materia cellulare non ancora scomposta e quindi da carboidrati complessi, proteine e molecole organiche a catena lunga; diversamente un fango primario è composto da lipidi, proteine e carboidrati in forma particolata o solubile, ma comunque già separati e quindi più facilmente accessibili e degradabili dalla biomassa anaerobica. Queste assunzioni sono state poi confermate da prove di BMP dei due fanghi in esame, che hanno sottolineato come il fango misto proveniente dal depuratore di Bresso-Niguarda presenti una frazione di fanghi secondari maggiore di quella dei primari. La resa di metano infatti è stata di circa $100 \text{ NmL}_{\text{CH}_4}/g_{\text{SV,S}}$, valore prossimo a rese di fanghi biologici, contro una resa di circa $200 \text{ NmL}_{\text{CH}_4}/g_{\text{SV,S}}$ di Sesto San Giovanni.

L'effluente della prova di fermentazione in continuo dei fanghi misti di Sesto San Giovanni ha presentato una concentrazione di VFA pari a $5 \pm 0,32 \text{ g}_{\text{VFA-COD}}/L$. Il surnatante di questa prova, ricco di acidi grassi volatili, è stato utilizzato in prove batch di denitrificazione in

manometria, al fine di valutare il tasso di denitrificazione utilizzando una fonte di carbonio direttamente prodotta dai fanghi stessi. I risultati evidenziano come il surnatante sia stato in grado di denitrificare tutto il nitrato introdotto con un tasso di $2,32 \pm 0,30$ mgN-NO₃/gSSV·h. Questo risultato è incoraggiante ma necessita di uno studio più approfondito circa la velocità di denitrificazione.

I fanghi misti di Sesto San Giovanni sono poi stati sottoposti a prove di co-fermentazione in batch ed in continuo con biomassa microalgale, al fine di valutare gli effetti sinergici o competitivi di fermentazione di substrati differenti. Le risposte per le prove in batch non hanno sottolineato sostanziali incrementi nella produttività. Le prove in continuo non hanno evidenziato cambiamenti né nella concentrazione di acidi volatili né nella loro distribuzione. Le alghe rappresentavano solo il 10% del carico organico applicato nel processo in continuo, per tenere conto di una possibile soluzione applicabile a scala reale, considerando che l'esigenza di spazio per la coltivazione delle alghe in impianti esistenti difficilmente può consentire di ottenere maggiori quantità biomassa microalgale.

In generale, la fermentazione per la produzione di acidi grassi volatili risulta essere una soluzione appetibile per la valorizzazione della biomassa microalgale, che dovrebbe comunque essere trattata in altro modo.

In prospettiva di sviluppi futuri potrebbe essere interessante variare le percentuali di carico organico alghe-fanghi in modalità continua per comprendere se gli effetti riscontrati nelle prove batch possano essere confermati o meno. Inoltre, uno studio più approfondito sulla composizione dei fanghi misti potrebbe aiutare a comprendere come riuscire ad utilizzare un fango misto con una percentuale maggiore di fango primario rispetto al secondario, al fine di ottimizzare le rese di acidificazione ottenibili.

APPENDICE

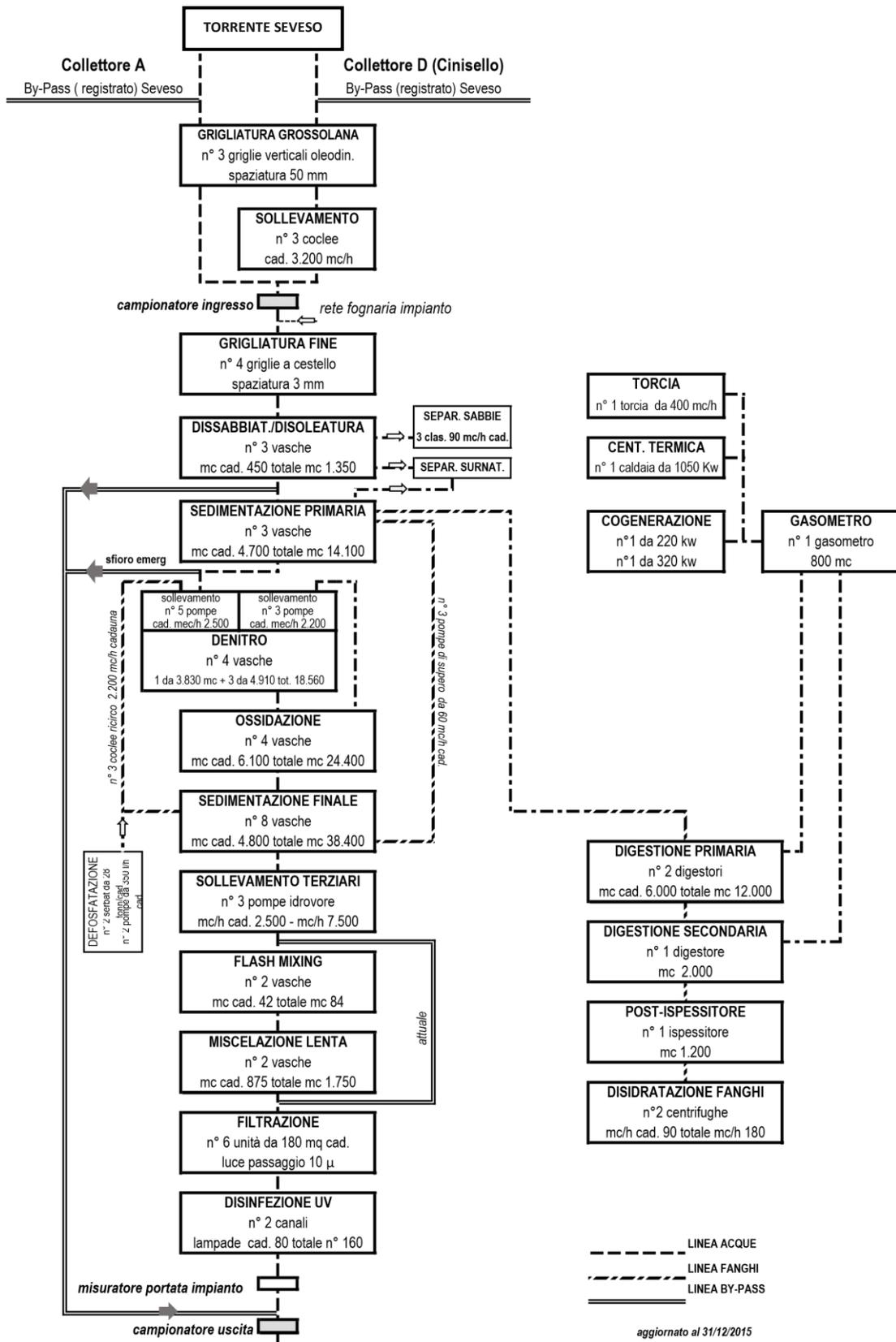


FIGURA 0.1 - FILIERA DI TRATTAMENTO DELL'IMPIANTO DI DEPURAZIONE DI BRESSO-NIGUARDA (FORNITO DA CAP HOLDING).

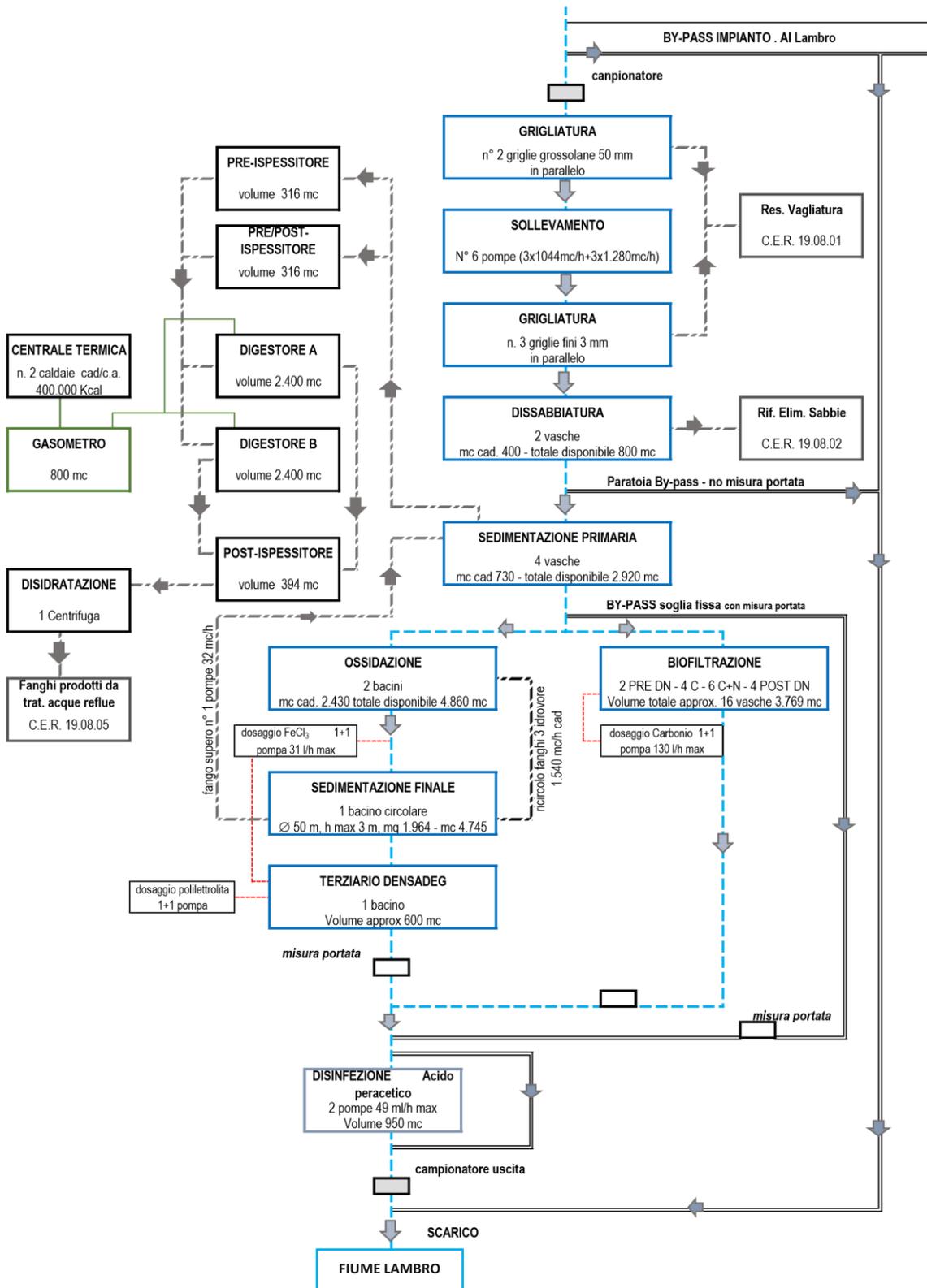


FIGURA 0.2 - FILIERA DI TRATTAMENTO DELL'IMPIANTO DI DEPURAZIONE DI SESTO SAN GIOVANNI (FORNITO DA CAP HOLDING).

Nelle figure 0.1 e 0.2 sono schematizzate le filiere di trattamento rispettivamente dell'impianto di depurazione di Bresso-Niguarda e di Sesto San Giovanni. Con riferimento al capitolo 3, i fanghi misti vengono prelevati per entrambi i depuratori,

Per entrambi i depuratori il fango primario e biologico viene prelevato a valle del sedimentatore primario, laddove vengono convogliati i fanghi riciccolati del sedimentatore secondario.

Le raccolte all'impianto di Bresso-Niguarda sono state due, mentre a Sesto San Giovanni sono state 3, l'ultima, quella del 2/07/2019 è caratterizzata dalla presenza di yogurt scaduti (scarti organici) all'interno del fango. I parametri sono indicati nella tabella sottostante (Tabella 3.1).

BIBLIOGRAFIA

- Æsøy, A., Ødegaard, H., 1994. Denitrification in biofilms with biologically hydrolysed sludge as carbon source. *Water Sci. Technol.* 29, 93–100.
- Alcántara, C., García-Encina, P.A., Muñoz, R., 2013. Evaluation of mass and energy balances in the integrated microalgae growth-anaerobic digestion process. *Chem. Eng. J.* 221, 238–246.
- Alkaya, E., Demirer, G.N., 2011. Anaerobic acidification of sugar-beet processing wastes: Effect of operational parameters. *Biomass and Bioenergy* 35, 32–39.
- Aspegren, H., Nyberg, U., Andersson, B., Gotthardsson, S., Jansen, J.L.C., 1998. Post denitrification in a moving bed biofilm reactor process. *Water Sci. Technol.* 38, 31–38.
- Atasoy, M., Owusu-Agyeman, I., Plaza, E., Cetecioglu, Z., 2018. Bio-based volatile fatty acid production and recovery from waste streams: Current status and future challenges. *Bioresour. Technol.* 268, 773–786.
- Banerjee, A., Elefsiniotis, P., Tuhtar, D., 1999. The effect of addition of potato-processing wastewater on the acidogenesis of primary sludge under varied hydraulic retention time and temperature. *J. Biotechnol.* 72, 203–212.
- Banister, S.S., Pitman, A.R., Pretorius, W.A., 1998. Quantification of N and P release in different sludges 24, 337–342.
- Beccari, M., Bertin, L., Dionisi, D., Fava, F., Lampis, S., Majone, M., Valentino, F., Vallini, G., Villano, M., 2009. Exploiting olive oil mill effluents as a renewable resource for production of biodegradable polymers through a combined anaerobic-aerobic process. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84, 901–908.
- Becker E., W., 1994. Microalgae — biotechnology and microbiology. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 183, 300–301.
- Becker E., W., 2004. Microalgae in human and animal nutrition. *Handb. microalgal Cult. Biotechnol. Appl. Phycol.* 312–351.
- Bengtsson, S., Hallquist, J., Werker, A., Welander, T., 2008a. Acidogenic fermentation of industrial wastewaters: Effects of chemostat retention time and pH on volatile fatty acids production. *Biochem. Eng. J.* 40, 492–499.
- Bengtsson, S., Werker, A., Christensson, M., Welander, T., 2008b. Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater. *Bioresour. Technol.* 99, 509–516.
- Bhatia, S.K., Yang, Y.H., 2017. Microbial production of volatile fatty acids: current status and

- future perspectives. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 16, 327–345.
- Blumreisinger, M., Meindl, D., Loos, E., 1983. Cell wall composition of chlorococcal algae. *Phytochemistry* 22, 1603–1604.
- Bolzonella, D., Pavan, P., Battistoni, P., Cecchi, F., 2005. Mesophilic anaerobic digestion of waste activated sludge: Influence of the solid retention time in the wastewater treatment process. *Process Biochem.* 40, 1453–1460.
- Bonomo, L., 2008. Trattamenti delle acque reflue.
- Borja, R., Banks, C.J., Sánchez, E., 1996. Anaerobic treatment of palm oil mill effluent in a two-stage up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) system. *J. Biotechnol.* 45, 125–135.
- Borowitzka, M.A., 2018. *Biology of Microalgae, Microalgae in Health and Disease Prevention.* Elsevier Inc.
- Campbell, M.N., 2008. Biodiesel : Algae as a Renewable Source for Liquid Fuel. *Guelph Eng. J.* 2–7.
- Carminati, P., Gusmini, D., Pizzera, A., Catenacci, A., Parati, K., Ficara, E., 2018. Biogas from mono- and co-digestion of microalgal biomass grown on piggery wastewater. *Water Sci. Technol.* 78, 103–113.
- Carrera, J., Vicent, T., Lafuente, J., 2004. Effect of influent COD/N ratio on biological nitrogen removal (BNR) from high-strength ammonium industrial wastewater. *Process Biochem.* 39, 2035–2041.
- Cavinato, C., Bolzonella, D., Fatone, F., Cecchi, F., Pavan, P., 2011. Optimization of two-phase thermophilic anaerobic digestion of biowaste for hydrogen and methane production through reject water recirculation. *Bioresour. Technol.* 102, 8605–8611.
- Cheah, Y.K., Vidal-Antich, C., Dosta, J., Mata-Álvarez, J., 2019. Volatile fatty acid production from mesophilic acidogenic fermentation of organic fraction of municipal solid waste and food waste under acidic and alkaline pH. *Environ. Sci. Pollut. Res.*
- Chen, C.Y., Yang, M.H., Yeh, K.L., Liu, C.H., Chang, J.S., 2008. Biohydrogen production using sequential two-stage dark and photo fermentation processes. *Int. J. Hydrogen Energy* 33, 4755–4762.
- Chen, G., 2015. Industrial production of PHA *Industrial Production of PHA* 14, 17–37.
- Chen, Y., Jiang, S., Yuan, H., Zhou, Q., Gu, G., 2007. Hydrolysis and acidification of waste activated sludge at different pHs. *Water Res.* 41, 683–689.
- Cheryan, M., 2009. Acetic Acid Production. In: Moselio Schaechter (Ed.), *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*. pp. 144–149.
- Chi, Z., Zheng, Y., Ma, J., Chen, S., 2011. Oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* culture with dark fermentation hydrogen production effluent as feedstock for microbial lipid

- production. *Int. J. Hydrogen Energy* 36, 9542–9550.
- Cho, H.U., Kim, Y.M., Choi, Y.N., Kim, H.G., Park, J.M., 2015. Influence of temperature on volatile fatty acid production and microbial community structure during anaerobic fermentation of microalgae. *Bioresour. Technol.* 191, 475–480.
- Costa J. A. V., Andrade M. da R., & G. de M.M., 2013. Microalgal Engineering: The Metabolic Products and the bioprocess. *Microalgae Biotechnol. Microbiol. Energy* 53, 1689–1699.
- Da Silva, C., Astals, S., Peces, M., Campos, J.L., Guerrero, L., 2018. Biochemical methane potential (BMP) tests: Reducing test time by early parameter estimation. *Waste Manag.* 71, 19–24.
- Dangcong, P., Yi, W., Hao, W., Xiaochang, W., 2004. Biological denitrification in a sequencing batch reactor. *Water Sci. Technol.* 50, 67–72.
- Delgadillo-Mirquez, L., Lopes, F., Taidi, B., Pareau, D., 2016. Nitrogen and phosphate removal from wastewater with a mixed microalgae and bacteria culture. *Biotechnol. Reports* 11, 18–26.
- Demirbas, A., 2007. Importance of biodiesel as transportation fuel. *Energy Policy* 35, 4661–4670.
- Demirbas, A., 2009. Biofuels securing the planet's future energy needs. *Energy Convers. Manag.* 50, 2239–2249.
- Demirel, B., Yenigun, O., 2004. Anaerobic acidogenesis of dairy wastewater: The effects of variations in hydraulic retention time with no pH control. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 79, 755–760.
- Dinsdale, R.M., Premier, G.C., Hawkes, F.R., Hawkes, D.L., 2000. Two-stage anaerobic co-digestion of waste activated sludge and fruit/vegetable waste using inclined tubular digesters. *Bioresour. Technol.* 72, 159–168.
- Dionisi, D., Carucci, G., Petrangeli Papini, M., Riccardi, C., Majone, M., Carrasco, F., 2005. Olive oil mill effluents as a feedstock for production of biodegradable polymers. *Water Res.* 39, 2076–2084.
- Du, Z., Li, H., Gu, T., 2007. A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnol. Adv.* 25, 464–482.
- Elbeshbishy, E., Nakhla, G., Hafez, H., 2012. Biochemical methane potential (BMP) of food waste and primary sludge: Influence of inoculum pre-incubation and inoculum source. *Bioresour. Technol.* 110, 18–25.
- Elefsiniotis, P., Wareham, D.G., Smith, M.O., 2004. Use of volatile fatty acids from an acid-phase digester for denitrification. *J. Biotechnol.* 114, 289–297.
- Fass, S., Ganaye, V., Urbain, V., Manem, J., Block, J.C., 1994. Volatile fatty acids as organic

- carbon sources in denitrification. *Environ. Technol. (United Kingdom)* 15, 459–467.
- Fei, Q., Chang, H.N., Shang, L., Choi, J. dal rae, Kim, N.J., Kang, J.W., 2011a. The effect of volatile fatty acids as a sole carbon source on lipid accumulation by *Cryptococcus albidus* for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 102, 2695–2701.
- Fei, Q., Chang, H.N., Shang, L., Choi, J.D.R., 2011b. Exploring low-cost carbon sources for microbial lipids production by fed-batch cultivation of *Cryptococcus albidus*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 16, 482–487.
- Feng, L., Wang, H., Chen, Y., Wang, Q., 2009. Effect of solids retention time and temperature on waste activated sludge hydrolysis and short-chain fatty acids accumulation under alkaline conditions in continuous-flow reactors. *Bioresour. Technol.* 100, 44–49.
- Ferrer, I., Vázquez, F., Font, X., 2010. Long term operation of a thermophilic anaerobic reactor: Process stability and efficiency at decreasing sludge retention time. *Bioresour. Technol.* 101, 2972–2980.
- Ficara, E., Sambusiti, C., Canziani, R., 2007. Manometric monitoring of biological denitrification.
- Gavala, H.N., Yenal, U., Skiadas, I. V., Westermann, P., Ahring, B.K., 2003. Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of primary and secondary sludge. Effect of pre-treatment at elevated temperature. *Water Res.* 37, 4561–4572.
- Gerardi, M.H., 2003. The microbiology of anaerobic digesters, *The British Journal of Psychiatry*.
- Gonçalves, A.L., Pires, J.C.M., Simões, M., 2017. A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. *Algal Res.* 24, 403–415.
- Gonzalez-Fernandez, C., Sialve, B., Molinuevo-Salces, B., 2015. Anaerobic digestion of microalgal biomass: Challenges, opportunities and research needs. *Bioresour. Technol.* 198, 896–906.
- Gouveia, L., 2011. Micoralgae as a feedstock for biofuels.
- Gruhn, M., Frigon, J.C., Guiot, S.R., 2016. Acidogenic fermentation of *Scenedesmus* sp.-AMDD: Comparison of volatile fatty acids yields between mesophilic and thermophilic conditions. *Bioresour. Technol.* 200, 624–630.
- Guidani, O., 2019. Integrazione di microalghe nei processi di trattamento delle acque reflue : Prove di pretrattamento e prove di crescita della biomassa algale . Politecnico di Milano.
- Hao, J., Wang, H., 2015. Volatile fatty acids productions by mesophilic and thermophilic sludge fermentation: Biological responses to fermentation temperature. *Bioresour. Technol.* 175, 367–373.
- Hatziconstantinou, G.J., Yannakopoulos, P., Andreadakis, A., 1996. Primary sludge hydrolysis for biological nutrient removal. *Water Sci. Technol.* 34, 417–423.
- He, X., 2006. the Use of Naturally Generated Volatile Fatty Acids for Pesticide Removal During the Denitrification Process a Thesis Submitted in Fulfilment Degree of Doctor of

Philosophy in Civil Engineering.

- Hena, S., Fatimah, S., Tabassum, S., 2015. Cultivation of algae consortium in a dairy farm wastewater for biodiesel production. *Water Resour. Ind.* 10, 1–14.
- Hill, J., Nelson, E., Tilman, D., Polasky, S., Tiffany, D., 2006. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. 103.
- Hong, C., Haiyun, W., 2010. Optimization of volatile fatty acid production with co-substrate of food wastes and dewatered excess sludge using response surface methodology. *Bioresour. Technol.* 101, 5487–5493.
- Huang, X. feng, Shen, Y., Luo, H. juan, Liu, J. nan, Liu, J., 2018. Enhancement of extracellular lipid production by oleaginous yeast through preculture and sequencing batch culture strategy with acetic acid. *Bioresour. Technol.* 247, 395–401.
- Jankowska, E., Chwiałkowska, J., Stodolny, M., Oleskiewicz-Popiel, P., 2017. Volatile fatty acids production during mixed culture fermentation – The impact of substrate complexity and pH. *Chem. Eng. J.* 326, 901–910.
- Jankowska, E., Chwiałkowska, J., Stodolny, M., Oleskiewicz-Popiel, P., 2015. Effect of pH and retention time on volatile fatty acids production during mixed culture fermentation. *Bioresour. Technol.* 190, 274–280.
- Ji, Z., Chen, G., Chen, Y., 2010. Effects of waste activated sludge and surfactant addition on primary sludge hydrolysis and short-chain fatty acids accumulation. *Bioresour. Technol.* 101, 3457–3462.
- Jiang, S., Chen, Y., Zhou, Q., Gu, G., 2007. Biological short-chain fatty acids (SCFAs) production from waste-activated sludge affected by surfactant. *Water Res.* 41, 3112–3120.
- Jiang, Y., Marang, L., Tamis, J., van Loosdrecht, M.C.M., Dijkman, H., Kleerebezem, R., 2012. Waste to resource: Converting paper mill wastewater to bioplastic. *Water Res.* 46, 5517–5530.
- Khan, M.A., Ngo, H.H., Guo, W.S., Liu, Y., Nghiem, L.D., Hai, F.I., Deng, L.J., Wang, J., Wu, Y., 2016. Optimization of process parameters for production of volatile fatty acid, biohydrogen and methane from anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.* 219, 738–748.
- Kim, B.H., Kang, Z., Ramanan, R., Choi, J.E., Cho, D.H., Oh, H.M., Kim, H.S., 2014. Nutrient removal and biofuel production in high rate algal pond using real municipal wastewater. *J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 1123–1132.
- Kleerebezem, R., Joosse, B., Rozendal, R., Van Loosdrecht, M.C.M., 2015. Anaerobic digestion without biogas? *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 14, 787–801.
- Larsdotter, K., *Microbiology, E.*, 2006. 48_Article_2125.Pdf 31–38.
- Lee, W.S., Chua, A.S.M., Yeoh, H.K., Nghoh, G.C., 2014. A review of the production and

- applications of waste-derived volatile fatty acids. *Chem. Eng. J.* 235, 83–99.
- Li, C., Cao, J., Ren, H., Li, Y., Tang, S., 2015. Comparison on kinetics and microbial community among denitrification process fed by different kinds of volatile fatty acids. *Process Biochem.* 50, 447–455.
- Li, X., Swan, J.E., Nair, G.R., Langdon, A.G., 2015. Preparation of volatile fatty acid (VFA) calcium salts by anaerobic digestion of glucose. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 62, 476–482.
- Li, Y., Hua, D., Zhang, J., Zhao, Y., Xu, H., Liang, X., Zhang, X., 2013. Volatile fatty acids distribution during acidogenesis of algal residues with pH control. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29, 1067–1073.
- Lim, S.J., Kim, B.J., Jeong, C.M., Choi, J. dal rae, Ahn, Y.H., Chang, H.N., 2008. Anaerobic organic acid production of food waste in once-a-day feeding and drawing-off bioreactor. *Bioresour. Technol.* 99, 7866–7874.
- Ling Jiang, Hongxin Fu, Hopen K. Yang, Wei Xu, Jufang Wang, S.-T.Y., 2018. Butyric acid: Applications and recent advances in its bioproduction. *Biotechnol. Adv.* 36, 2101–2117.
- Liu, He, Han, P., Liu, Hongbo, Zhou, G., Fu, B., Zheng, Z., 2018. Full-scale production of VFAs from sewage sludge by anaerobic alkaline fermentation to improve biological nutrients removal in domestic wastewater. *Bioresour. Technol.* 260, 105–114.
- Llabres, P., Pavan, P., Battistioni, P., Cecchi, F., Mata-Alvarez, J., 1999. The use of organic fraction of municipal solid waste hydrolysis products for biological nutrient removal in wastewater treatment plants. *Water Res.* 33, 214–222.
- Luo, K., Yang, Q., Yu, J., Li, X. ming, Yang, G. jing, Xie, B. xin, Yang, F., Zheng, W., Zeng, G. ming, 2011. Combined effect of sodium dodecyl sulfate and enzyme on waste activated sludge hydrolysis and acidification. *Bioresour. Technol.* 102, 7103–7110.
- Lv, W., Schanbacher, F.L., Yu, Z., 2010. Putting microbes to work in sequence: Recent advances in temperature-phased anaerobic digestion processes. *Bioresour. Technol.* 101, 9409–9414.
- Maharaj, I., Elefsiniotis, P., 2001. The role of HRT and low temperature on the acid-phase anaerobic digestion of municipal and industrial wastewaters. *Bioresour. Technol.* 76, 191–197.
- Marazzi, F., et al., 2017. Integration of microalgae culturing as a side stream process into a municipal wastewater treatment plant. In: *AlgaEurope 2017*.
- Marazzi, F., Bellucci, M., Rossi, S., Fornaroli, R., Ficara, E., Mezzanotte, V., 2019. Outdoor pilot trial integrating a sidestream microalgae process for the treatment of centrate under non optimal climate conditions. *Algal Res.* 39, 101430.
- Marques, A. E. Miranda, J. R. Batista, A. P. and Gouveia, L., 2011. MICROALGAE

- BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS: Nutrition, Health and Environment. *Microalgae Biotechnol. Microbiol. Energy*.
- Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S., 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14, 217–232.
- McCarty, P.L., 1964. *Anaerobic Waste Treatment Fundamentals*. Public Work. 95, 91–94.
- Mengmeng, C., Hong, C., Qingliang, Z., Shirley, S.N., Jie, R., 2009. Optimal production of polyhydroxyalkanoates (PHA) in activated sludge fed by volatile fatty acids (VFAs) generated from alkaline excess sludge fermentation. *Bioresour. Technol.* 100, 1399–1405.
- Metcalf, 2014. *Metcalf and Eddy, AECOM - Wastewater Engineering_ Treatment and Resource Recovery-McGraw-Hill (2014).pdf*.
- Min, K.S., Khan, A.R., Kwon, M.K., Jung, Y.J., Yun, Z., Kiso, Y., 2005. Acidogenic fermentation of blended food-waste in combination with primary sludge for the production of volatile fatty acids. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80, 909–915.
- Montingelli, M.E., Tedesco, S., Olabi, A.G., 2015. Biogas production from algal biomass: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 43, 961–972.
- Moser-Engeler, R., Udert, K.M., Wild, D., Siegrist, H., 1998. Products from primary sludge fermentation and their suitability for nutrient removal. *Water Sci. Technol.* 38, 265–273.
- Murphy, J.D., Drosig, B., Allen, E., Jerney, J., Xia, A., Herrmann, C., 2015. A perspective on algal biogas. *IEA Bioenergy*.
- Mussnug, J.H., Klassen, V., Schlüter, A., Kruse, O., 2010. Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *J. Biotechnol.* 150, 51–56.
- Nielfa, A., Cano, R., Fdz-Polanco, M., 2015. Theoretical methane production generated by the co-digestion of organic fraction municipal solid waste and biological sludge. *Biotechnol. Reports*.
- Nizami, A.S., Rehan, M., Waqas, M., Naqvi, M., Ouda, O.K.M., Shahzad, K., Miandad, R., Khan, M.Z., Syamsiro, M., Ismail, I.M.I., Pant, D., 2017. Waste biorefineries: Enabling circular economies in developing countries. *Bioresour. Technol.* 241, 1101–1117.
- Of, F., Of, C., By, A., Fang, H.H.P., 2000. *Hrt m a d w* 1145–1148.
- Oktem, Y.A., Ince, O., Donnelly, T., Sallis, P., Ince, B.K., 2006. Determination of optimum operating conditions of an acidification reactor treating a chemical synthesis-based pharmaceutical wastewater. *Process Biochem.* 41, 2258–2263.
- Passos, F., Hom-Diaz, A., Blanquez, P., Vicent, T., Ferrer, I., 2016. Improving biogas production from microalgae by enzymatic pretreatment. *Bioresour. Technol.* 199, 347–351.
- Pavan, P., Battistoni, P., Traverso, P., Musacco, A., Cecchi, F., 1998. Effect of addition of

- anaerobic fermented OFMSW (organic fraction of municipal solid waste) on biological nutrient removal (BNR) process: Preliminary results. *Water Sci. Technol.* 38, 327–334.
- Pires, J.C.M., Alvim-Ferraz, M.C.M., Martins, F.G., Simões, M., 2013. Wastewater treatment to enhance the economic viability of microalgae culture. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 5096–5105.
- Rahmani, H., Rols, J.L., Capdeville, B., Cornier, J.C., Deguin, A., 1995. Nitrite removal by a fixed culture in a submerged granular biofilter. *Water Res.* 29, 1745–1753.
- Rajapakse, J.P., Scutt, J.E., 1999. Denitrification with natural gas and various new growth media. *Water Res.* 33, 3723–3734.
- Ramos-Suárez, J.L., Carreras, N., 2014. Use of microalgae residues for biogas production. *Chem. Eng. J.* 242, 86–95.
- Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., Bux, F., 2011. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Appl. Energy* 88, 3411–3424.
- Reis, M., Albuquerque, M., Villano, M., Majone, M., 2011. Mixed Culture Processes for Polyhydroxyalkanoate Production from Agro-Industrial Surplus/Wastes as Feedstocks, Second Edition, ed, *Comprehensive Biotechnology, Second Edition*. Elsevier B.V.
- Roberts, K.P., Heaven, S., Banks, C.J., 2016. Comparative testing of energy yields from microalgal biomass cultures processed via anaerobic digestion. *Renew. Energy* 87, 744–753.
- Ruiz-Marin, A., Mendoza-Espinosa, L.G., Stephenson, T., 2010. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresour. Technol.* 101, 58–64.
- S.K. Hong, Y. Shirai, A.R.N.A. and M.A.H., 2009. Semi-Continuous and Continuous Anaerobic Treatment of Palm Oil Mill Effluent for the Production of Organic Acids and Polyhydroxyalkanoates. *Res. J. Environ. Sci.* 3, 552–559.
- Saharan, B.S., Sharma, D., Sahu, R., Sahin, O., 2013. Towards Algal Biofuel Production : A Concept of Green Bio Energy Development. *Innov. Rom. Food Biotechnol.* 12, 1–21.
- Salehizadeh, H., Van Loosdrecht, M.C.M., 2004. Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: Recent trends and biotechnological importance. *Biotechnol. Adv.* 22, 261–279.
- Sánchez, M., Mosquera-Corral, A., Méndez, R., Lema, J.M., 2000. Simple methods for the determination of the denitrifying activity of sludges. *Bioresour. Technol.* 75, 1–6.
- Sans, C., Mata-Alvarez, J., Cecchi, F., Pavan, P., Bassetti, A., 1995. Acidogenic fermentation of organic urban wastes in a plug-flow reactor under thermophilic conditions. *Bioresour. Technol.* 54, 105–110.
- Serafim, L.S., Lemos, P.C., Albuquerque, M.G.E., Reis, M.A.M., 2008. Strategies for PHA

- production by mixed cultures and renewable waste materials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81, 615–628.
- Shen, D., Yin, J., Yu, X., Wang, M., Long, Y., Shentu, J., Chen, T., 2017. Acidogenic fermentation characteristics of different types of protein-rich substrates in food waste to produce volatile fatty acids. *Bioresour. Technol.* 227, 125–132.
- Sialve, B., Bernet, N., Bernard, O., 2009. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnol. Adv.* 27, 409–416.
- Stephen L. Pahl , Andrew K. Lee, T.K., Peter J. Ashman , Suraj Sathe, and D.M.L., 2012. Harvesting, Thickening and Dewatering Microalgae Biomass. *Algae for Biofuels and Energy* 165–185.
- Tjørve, K.M.C., Tjørve, E., 2017. The use of Gompertz models in growth analyses, and new Gompertz-model approach: An addition to the Unified-Richards family. *PLoS One* 12, 1–17.
- Torres, Álvaro, Famoso, Fernando G. , Rincón, Bárbara Bartacek, Jan Borja, Rafael and Jeison, D., 2016. Challenges for Cost-Effective Microalgae Anaerobic Digestion. *Biodegrad. - Eng. Technol.*
- Tuna, E., Kargi, F., Argun, H., 2009. Hydrogen gas production by electrohydrolysis of volatile fatty acid (VFA) containing dark fermentation effluent. *Int. J. Hydrogen Energy* 34, 262–269.
- Ucisik, A.S., Henze, M., 2008. Biological hydrolysis and acidification of sludge under anaerobic conditions: The effect of sludge type and origin on the production and composition of volatile fatty acids. *Water Res.* 42, 3729–3738.
- Valentino, F., Morgan-Sagastume, F., Campanari, S., Villano, M., Werker, A., Majone, M., 2017. Carbon recovery from wastewater through bioconversion into biodegradable polymers. *N. Biotechnol.* 37, 9–23.
- Van Der Hoek, J.P., De Fooij, H., Strucker, A., 2016. Wastewater as a resource: Strategies to recover resources from Amsterdam’s wastewater. *Resour. Conserv. Recycl.* 113, 53–64.
- Vijayaraghavan, K., Sagar, G.K., 2010. Anaerobic digestion and in situ electrohydrolysis of dairy bio-sludge. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 15, 520–526.
- Wu, H., Yang, D., Zhou, Q., Song, Z., 2009. The effect of pH on anaerobic fermentation of primary sludge at room temperature. *J. Hazard. Mater.* 172, 196–201.
- Xiong, H., Chen, J., Wang, H., Shi, H., 2012. Influences of volatile solid concentration, temperature and solid retention time for the hydrolysis of waste activated sludge to recover volatile fatty acids. *Bioresour. Technol.* 119, 285–292.
- Yatong, X., 1996. Volatile fatty acids carbon source for biological denitrification. *J. Environ. Sci.*
- Yen, H.W., Brune, D.E., 2007. Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce

- methane. *Bioresour. Technol.* 98, 130–134.
- Yu, H.G., Fang, H.H., 2002. Acidogenesis of dairy wastewater at various pH levels. *Water Sci. Technol.* 45, 201–206.
- Yu, H.Q., Fang, H.H.P., 2001. Acidification of mid- and high-strength dairy wastewaters. *Water Res.* 35, 3697–3705.
- Yu, J., 2001. Production of PHA from starchy wastewater via organic acids 86, 1–8.
- Zhang, P., Chen, Y., Zhou, Q., 2009. Waste activated sludge hydrolysis and short-chain fatty acids accumulation under mesophilic and thermophilic conditions: Effect of pH. *Water Res.* 43, 3735–3742.
- Zhao, J., Wang, D., Liu, Y., Ngo, H.H., Guo, W., Yang, Q., Li, X., 2018. Novel stepwise pH control strategy to improve short chain fatty acid production from sludge anaerobic fermentation. *Bioresour. Technol.* 249, 431–438.
- Zheng, X., Chen, Y., Liu, C., 2010. Waste activated sludge alkaline fermentation liquid as carbon source for biological nutrients removal in anaerobic followed by alternating aerobic-anoxic sequencing batch reactors. *Chinese J. Chem. Eng.* 18, 478–485.
- Zhou, M., Yan, B., Wong, J.W.C., Zhang, Y., 2018. Enhanced volatile fatty acids production from anaerobic fermentation of food waste: A mini-review focusing on acidogenic metabolic pathways. *Bioresour. Technol.* 248, 68–78.
- Zong, W., Yu, R., Zhang, P., Fan, M., Zhou, Z., 2009. Efficient hydrogen gas production from cassava and food waste by a two-step process of dark fermentation and photo-fermentation. *Biomass and Bioenergy* 33, 1458–1463.