



Università  
Ca' Foscari  
Venezia

Corso di Laurea Magistrale

in Biotecnologie per l'Ambiente e lo Sviluppo  
Sostenibile

Tesi di Laurea

# Processi di Fermentazione Acidogenica e Chain Elongation su Fanghi di Conceria

**Relatore:**

Ch. Prof. Francesco Valentino

**Correlatrice:** Ch. Giulia Adele Tuci

**Laureando:**

Alessandro  
Lorenzin

**Matricola:**

864681

**Anno Accademico:** 2022/2023



# Sommario

1. Introduzione .....	6
1.1. Digestione Anaerobica (DA) .....	10
1.2. VFA .....	14
1.3. Chain Elongation (CE).....	17
1.4. Fanghi da Conceria .....	18
2. Obiettivo Tesi.....	20
3. Materiali e Metodi.....	22
3.1. Substrato.....	22
3.2. Processi fermentativi su fango da conceria e                      condizioni di fermentazione mesofila.....	23
3.3. Processo di Chain Elongation (CE).....	26
3.4. Principali prestazioni di processo investigate.....	29
3.5. Metodologie Analitiche .....	31
3.5.1. Determinazione VFA tramite Gascromatografo.....	31
3.5.2. Determinazione soluble Chemical Oxygen Demand (sCOD) .....	32
.....	33
3.5.3. Determinazione Azoto Ammoniacale (N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ).....	34
3.5.4. Determinazione pH.....	35
4. Risultati e Discussione.....	37

4.1. Caratteristiche Matrice di partenza .....	37
4.2. Produzione di ScVFA in processi di fermentazione anaerobica in Batch.....	38
4.2.1. Yield ( $Y_{VFA}$ ): Fermentazione acidogenica in Batch .....	48
4.2.2. % $NH_4^+$ rilasciato: Fermentazione acidogenica in Batch .....	50
4.2.3. VFA/sCOD: Fermentazione acidogenica in Batch.....	50
4.3. Processi di Chain Elongation in reattori CSTR.....	51
5. Conclusione .....	61
6. Bibliografia e Ringraziamenti .....	64



# 1. Introduzione

Tecnologia, risorse naturali, energia ed ambiente sono strettamente correlati tra loro, tanto che la variazione di una di queste componenti si ripercuote naturalmente su una delle altre. La sfida che sta impegnando attualmente la società moderna, basata appunto sulla tecnologia, è quella di mantenere una qualità della vita elevata, senza compromettere il sistema Terra che sostiene la società.

Un esempio di ciò è fornito dal concetto di “Sviluppo Sostenibile”, che descrive uno sviluppo in grado di soddisfare le necessità del presente senza compromettere quelle delle generazioni future (Bruntland, 1987); oppure ancora dal termine “Economia Circolare”, descrizione di un’economia volta al riutilizzo delle materie prime, cercando di minimizzare gli sprechi. (Reday-Mulvey, 1976)

Appare quindi cruciale la necessità di avere una consapevolezza volta alla gestione dei processi civili e industriali che governano le attività quotidiane; una gestione in particolare, ovvero quella dei Rifiuti, ha subito un importante passo avanti dal punto di vista “Green”.

I Rifiuti ad alto contenuto organico presentano delle caratteristiche adeguate a processi intensivi volti al recupero “circolare” delle materie prime da cui sono composti (Roghair et al., 2018).

Questo studio si concentrerà prevalentemente su uno dei rifiuti prodotti dall’industria conciaria, definita come una delle industrie a maggior impatto ambientale (Zhai et al., 2020), a causa dell’uso di sostanze e prodotti tossici persistenti, in grado di causare danni elevati ad ambiente e biodiversità. I cosiddetti fanghi da conciaria, utilizzati in questo studio, provengono dall’azione di bio-trattamento di effluenti dell’industria conciaria; quindi, sono di fatto legati alle

attività di produzione e commercializzazione dei prodotti della pelle e simili, pur provenendo di fatto dai cicli di trattamento reflui in impianti centralizzati.

Dal punto di vista nazionale, la produzione conciaria in Italia copre circa il 16% della produzione mondiale (THE EUROPEAN LEATHER INDUSTRY, 2020), confermandosi un mercato molto attivo, seppur, con molte criticità dal punto di vista ambientale; basti pensare che per ogni metro quadro di prodotto finito vengono consumati più di 100 litri di acqua e 2 kg di prodotti chimici. Le principali industrie conciarie sono essenzialmente localizzate in tre grandi cluster, localizzati in Toscana, Campania e Veneto (Alibardi & Cossu, 2016).

Proprio perché legate ai trattamenti chimico/fisici e biologici in impianti di trattamento centralizzati (simili per configurazione processistica alla tradizionale linea acque negli impianti di trattamento acque municipali), risulta quindi naturale che le attività legate alle concerie producano molti rifiuti e scarti, che, in linea con le politiche economiche e ambientali, possono essere sfruttati in processi di recupero con l'obiettivo di ottenere prodotti ad alto valore aggiunto. Una classe di prodotti di grande interesse sono, ad esempio, gli Acidi Grassi Volatili (VFA), utilizzati in molti settori della chimica di sintesi, cosmetica e farmaceutica (Roghair et al., 2018). Si tratta di composti tipicamente prodotti in processi fermentativi, ad opera di microrganismi anaerobi, in specifiche condizioni di processo.

Dal punto di vista dell'applicazione dei processi biologici su rifiuti organici ad alto tenore di solidi, il processo più utilizzato e ormai diffuso su scala industriale è noto come Digestione Anaerobica (DA), nel quale avviene la degradazione di sostanze organiche da parte di microrganismi in condizioni di anaerobiosi, portando alla produzione di biogas (miscela di metano e anidride carbonica), e digestato (che

al netto delle sue caratteristiche chimiche e di compatibilità con molti settori ambientali, potrebbe essere anche utilizzato come ammendante) (Liang et al., 2024).

La produzione di VFA deriva da una specifica fase all'interno della Digestione Anaerobica, spesso vista come un problema in ottica di produzione di metano. Tale fase, nota come fase fermentativa, si ripartisce tra fenomeni legati a processi di Acidogenesi e Acetogenesi, in cui i microrganismi coinvolti, sono in grado di fermentare i monomeri prodotti in fasi precedenti (idrolisi) producendo VFA (Valentino et al., 2021).

Oltre alla produzione e quantificazione dei prodotti della fermentazione, ovvero i VFA, tale approccio è stato recentemente investigato in ottica di una produzione maggiormente mirata alla sintesi di VFA a catena più lunga tramite processo di Chain Elongation (CE), grazie al quale si facilita la conversione di acidi a catena corta in acidi grassi a catena media (McVFA), grazie alla presenza di donatori esterni di elettroni (Spirito et al., 2014).

Questo lavoro di tesi, pertanto, è stato sviluppato in ottica di valorizzare tramite vie metaboliche anaerobiche il substrato organico prodotto da un impianto centralizzato di trattamento reflui conciarci, convertendolo in VFA nei tradizionali processi di fermentazione anaerobica. Successivamente, i processi di CE sono stati investigati in differenti condizioni per analizzare quali tipologie di acidi organici potevano essere selettivamente prodotti, a partire dal brodo di fermentazione precedentemente ottenuto. Durante questi processi, alcuni parametri sono stati monitorati per valutare l'efficienza di conversione del fango di conceria nei prodotti finali di interesse:

l'analisi dei VFA è cruciale, in quanto i trend di concentrazione risultano il principale indicatore, molto utile per comprendere la stabilità del processo di fermentazione acidogenica (FA);

il pH risulta un parametro fondamentale, poiché influenza la produzione di VFA durante la fermentazione (Garcia-Aguirre et al., 2017), condizionando le attività metaboliche dei vari microrganismi presenti (Maspolim et al., 2015). Solitamente, per ottenere un processo dalle stabili performances e senza rischio di inibizioni, è preferibile avere pH non inferiori a 5.0; d'altra parte, è stato dimostrato come pH alcalini (fino a 11.0) possono essere ottimali per la produzione di VFA a catena dispari (propionico, valerico) (Jankowska et al., 2017);

la Temperatura ( $T^{\circ}$ ), influenza le attività enzimatiche oltre che la crescita dei microrganismi (Fonseca et al., 2021); le condizioni operative più utilizzate nei processi fermentativi sono quelle di mesofile ( $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) e termofile ( $55^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ); solitamente si opera in condizione mesofila, poiché il processo risulta favorevole da un punto di vista energetico; ma operare in termofilia può garantire una produzione superiore di VFA, previo controllo sulla stabilità del processo stesso (Tiwari & Sahu, 2017);

il Tempo di Ritenzione Idraulico (HRT), rappresenta un ulteriore parametro da tenere in considerazione, poiché influenza le cinetiche legate ai microrganismi sia dal punto di vista della crescita microbica che di utilizzo del substrato (Leite et al., 2017);

il contenuto di solidi (TS), in ultimo, risulta fondamentale poiché consente di quantificare la materia organica presente all'interno del substrato, oltre a fornire indicazioni sui possibili carichi organici (OLR) da adottare.

## 1.1. Digestione Anaerobica (DA)

Il processo di Digestione Anaerobica (DA) rappresenta una metodologia, ormai consolidata, di trattamento di reflui e rifiuti, al fine di ridurre putrescibilità e contenuto di solidi all'interno di una filiera di trattamento di acque e fanghi o rifiuti ad alto tenore di solidi all'interno delle filiere produttive (Shrestha et al., 2023). In generale, un impianto di trattamento acque risulta composto da due Linee (Figura 1), ovvero due processi multi-step differenti per tipologia e condizioni operative volti al trattamento del refluo influente che si intende trattare (Mpofu et al., 2020). Lo schema riportato in figura fa riferimento al tipico processo di trattamento acque reflue urbane e trattamento dei fanghi di depurazione dell'apposita Linea Fanghi.

La Digestione Anaerobica fa parte della seconda Linea, ovvero la cosiddetta Linea Fanghi; questa Linea gestisce i flussi di rifiuto, ovvero fanghi primari e secondari, tramite una serie di operazioni unitarie, il cui scopo è la loro stabilizzazione con eventuale recupero energetico.

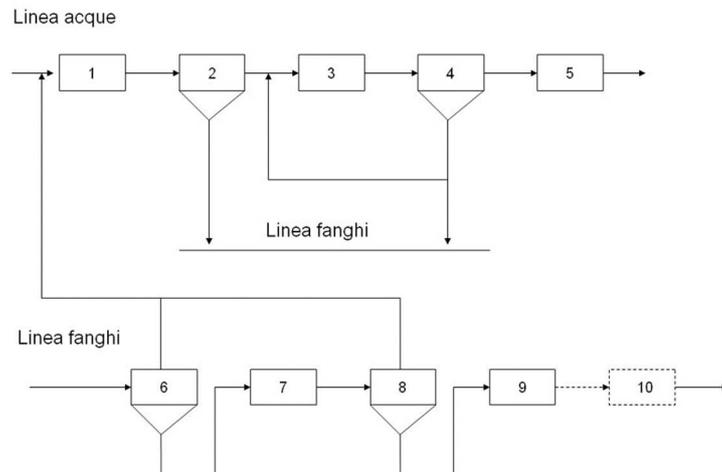


Figura 1: Impianto di Trattamento Acque e Reflui

Dal punto di vista metabolico, la caratteristica principale del processo di digestione anaerobica è la sintrofia tra le specie microbiche coinvolte che cooperano per degradare uno stesso substrato fino ai prodotti finali. La particolarità è che i prodotti utilizzati da una specie sono utilizzati come substrato negli step metabolici successivi. La sostanza organica viene quindi sottoposta ad una serie di step continui fino alla sua completa degradazione, che coincide con la produzione finale di digestato anaerobico e biogas; quest'ultimo è tipicamente costituito da una percentuale elevata di Metano ( $\text{CH}_4$ ) (55-70%) e una percentuale minore di Anidride Carbonica ( $\text{CO}_2$ ) (30-45%) in funzione delle caratteristiche chimico-fisiche del substrato di partenza.

Più in dettaglio, la Digestione Anaerobica avviene in 4 fasi (Figura 2): una prima fase detta Idrolitica (o Idrolisi), in cui il materiale organico complesso composto da macromolecole viene scomposto da batteri fermentanti e ridotto in molecole più semplici (e. g. da carboidrati a zuccheri; da proteine a amminoacidi; da lipidi ad acidi grassi).

La seconda fase è detta Acidogenesi, nella quale avviene un'azione fermentativa che ossida anaerobicamente i monomeri citati in precedenza, in Acidi Grassi (VFA) e Alcoli.

La terza fase, detta Acetogenesi, converte il substrato precedente, VFA e alcoli, in due prodotti: uno in fase gassosa, formato da anidride carbonica e idrogeno e uno in fase liquida, composto principalmente da Acido Acetico ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ). Questa fase avviene grazie alla presenza di un gruppo di microrganismi detti Acetogeni.

L'ultima fase, detta Metanogenesi, produce metano, da due vie metaboliche: una detta Acetoclastica, con substrato di partenza acido acetico e l'altra detta Idrogenofila, con substrato di partenza

idrogeno e anidride carbonica; da entrambe le vie si arriverà al prodotto finale del processo di metanogenesi, ovvero CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>.

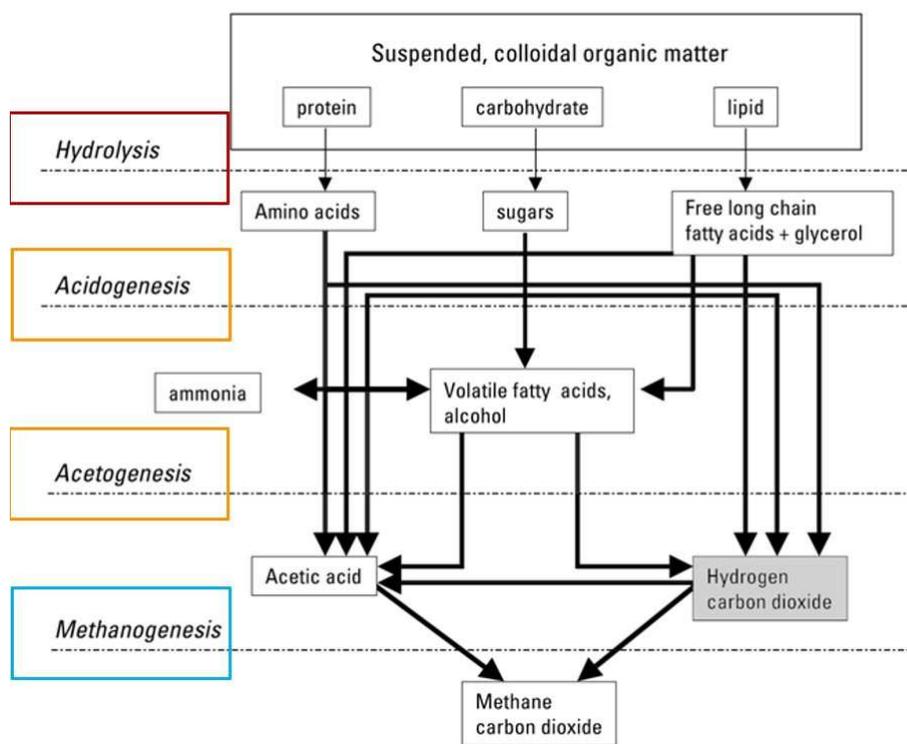


Figura 2: Processo di Digestione Anaerobica su substrati organici

Per ottenere una riuscita del processo ottimale, è possibile agire su vari parametri, in particolare vanno considerati pH, Alcalinità (Alk), Temperatura (T°) e Tempo di Ritenzione Idraulica (HRT), oltre che carico organico (OLR). C'è da tener presente che la simbiosi microbica auspicata per la riuscita del processo, deve essere raggiunta gradualmente con una adeguata gestione della fase di start-up, e quindi con un incremento progressivo (ma contenuto) dell'OLR fino al raggiungimento della stabilità.

Tale approccio è adottato per evitare la formazione di VFA in eccesso, che causerebbe l'abbassamento incontrollato del pH e l'inibizione dei metanigeni, con conseguente perdita della stabilità e della cooperazione sintrofica tra microrganismi fermentativi e metanigeni.

Grazie a questo processo si è in grado di ottenere quindi un biogas arricchito in metano, perfezionando così il recupero energetico dal rifiuto, oltre che la riduzione sostanziale del rifiuto stesso, talvolta destinato allo smaltimento in discarica, qualora non possa essere definito compatibile con applicazioni meno impattanti (ammendante o compost di qualità) (Mpofu et al., 2021).

## 1.2. VFA

I VFA o Acidi Grassi Volatili sono acidi monocarbossilici alifatici (F. Liu et al., 2023); tipicamente possiedono da 4 a 30 atomi di Carbonio, in numero pari e senza ramificazioni. Essi possono essere Saturi, caratterizzati da legami singoli, o Insaturi, caratterizzati dalla presenza di doppi legami (Ramos-Suarez et al., 2021).

In questo studio si tratteranno le caratteristiche degli Acidi Grassi Saturi a Catena Corta (ScVFA), da C<sub>2</sub> a C<sub>5</sub> (Figura 3): essi rappresentano un'eccezione all'interno del gruppo dei lipidi (Scotto di Perta et al., 2022) poiché sono solubili in acqua, e perciò risultano di notevole interesse industriale.

Di fatto, gli ScVFA sono intermedi metabolici con svariate applicazioni (previa purificazione), ad oggi ottenuti da fonti fossili nei tradizionali processi di raffinazione. Le applicazioni possono interessare il mondo dell'industria chimica per la produzione di composti a più alto peso molecolare, industria cosmetica, farmaceutica ed alimentare. Ricavare tali sostanze a partire da rifiuti potrebbe quindi avere un impatto considerevole sullo scenario economico di queste sostanze, oltre che sulla gestione virtuosa dei rifiuti organici prodotti in ambito urbano e non.

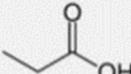
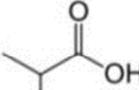
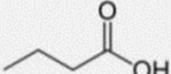
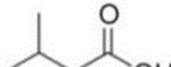
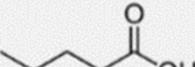
Struttura	Nome comune	Numero atomi di carbonio	Peso molecolare	Punto di ebollizione
	Acetico	2	60	117-118°C
	Propionico	3	74	141°C
	Isobutirrico	4	88	153-154°C
	Butirrico	4	88	162°C
	Isovalerico	5	102	175-177°C
	Valerico	5	102	185°C

Figura 3: Acidi Grassi a Catena Corta (ScVFA) e relative caratteristiche

Dal punto di vista commerciale, i VFA risultano essere molto richiesti, date le molteplici applicazioni che possono di ricoprire; di seguito vengono elencate alcune caratteristiche degli acidi di interesse ([pubchem.ncbi.nlm.nih.gov](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)).

- *Acido Acetico (CH<sub>3</sub>COOH)*: risulta essere il prodotto di maggior interesse dal punto di vista commerciale e industriale; viene utilizzato nella produzione di vernici, come reagente, indicatore, nella fabbricazione di colle, come componente di

battericidi/pesticidi e nella produzione del settore tessile e delle plastiche.

- *Acido Propionico* ( $CH_3CH_2COOH$ ): utilizzato principalmente nel settore alimentare come additivo antibatterico, nella produzione industriale di lattice, plastiche ed emulsionanti o come principio attivo di battericidi/funghicidi.
- *Acido Butirrico* ( $CH_3CH_2CH_2COOH$ ): utilizzato nella produzione di prodotti per le pulizie, candele, fragranze o come additivo.
- *Acido Isobutirrico* ( $(CH_3)_2CHCOOH$ ): utilizzato prevalentemente come sottoprodotto di pesticidi ed erbicidi; utilizzato per la produzione di fragranze e profumi oltre che come disinfettante.
- *Acido Valerico* ( $CH_3(CH_2)_3COOH$ ): utilizzato per la preparazione di solventi e come fungicida.
- *Acido Isovalerico* ( $C_5H_{10}O_2$ ): utilizzato per svariati usi industriali; sottoprodotto nel processo di produzione di profumi, fungicidi e solventi.

È importante sottolineare che gli acidi grassi sono molto richiesti al giorno d'oggi anche per “nuovi” mercati in forte ascesa, come la produzione industriale di Bioplastiche, Biogas e Biofuels (Zhai et al., 2020).

È anche noto come la maggior parte della produzione di questi acidi derivi da combustibili fossili, quindi da Risorse Non Rinnovabili (Grootscholten et al., 2013a).

I VFA, infine, risultano fondamentali anche all'interno di processi biologici di trattamento acque, qualora venga richiesta la rimozione dell'azoto. Essi di fatto costituiscono una componente del COD (Chemical Oxygen Demand), nota come la frazione solubile rapidamente biodegradabile (rbCOD), di grande importanza nei processi di rimozione di azoto, in particolare nello stadio di denitrificazione (Fang et al., 2020). Possono essere infatti utilizzati

come rbCOD in vasche anossiche di denitrificazione, senza necessità di purificazione del brodo di fermentazione, in quanto assicurano cinetiche elevate di processo e limitate volumetrie delle vasche stesse all'interno negli impianti di trattamento acque centralizzati.

### 1.3. Chain Elongation (CE)

Il processo di Chain Elongation (CE) rappresenta una metodologia biotecnologica emergente che utilizza i VFA provenienti dalla fermentazione acidogenica per produrre acidi grassi a catena più lunga rispetto a quelli di partenza (Angenent et al., 2016).

L'obiettivo consiste nel produrre acidi a catena media o lunga solitamente a partire dall'acido acetico, ovvero un acido "corto", in quanto costituito da 2 atomi di carbonio, verso acidi di media catena composti da un numero di atomi di carbonio compreso tra 6-8 (Grootscholten et al., 2013b).

In generale, questo processo si svolge in condizioni anaerobiche ed è facilitato dalla presenza di un donatore di elettroni, con l'obiettivo di convertire ScVFA in McVFA (Angenent et al., 2016); solitamente come donatore di elettroni si utilizza un alcool come Etanolo (EtOH) o Metanolo (MeOH), necessario ai microrganismi protagonisti del processo, ad esempio *Clostridium kluyveri* (Seedorf et al., 2007).

I prodotti di questo processo vengono utilizzati per svariate applicazioni: come prodotti puri, solventi, lubrificanti o additivi (Candry & Ganigué, 2021).

Risulta importante specificare che questo processo può essere compiuto in condizioni non sterili (Roghair et al., 2018).

Chain Elongation può essere svolto a singolo o doppio stadio; in questo studio CE è stata svolta a singolo stadio, in cui l'allungamento della catena avviene direttamente sui VFA. Solitamente un processo a doppio stadio risulta vantaggioso in quanto consente di monitorare separatamente le differenti condizioni operative; tuttavia, il processo a singolo stadio è più semplice da progettare, ottimizzare e controllare.

## 1.4. Fanghi da Conceria

Tutti i tipi di fanghi, sottoprodotti del processo di trattamento acque, risultano un problema ambientale pressante. Trovare luoghi sicuri dove smaltirli o un modo per utilizzarli risulta critico (Saira & Shanthakumar, 2023) a causa del crescente numero di impianti di trattamento acque. Comunemente, il fango è soggetto a digestione anaerobica al fine di ridurre massa e volume, per ottenere un prodotto stabilizzato, oltre a VFA e Biogas (H. Liu et al., 2019).

In generale, i fanghi biologici (stabilizzati o non stabilizzati), possono uscire dall'impianto in cui vengono trattati come veri e propri rifiuti (e.g. CER 19 08 05), con un costo di smaltimento che varia dai 100 ai 300 euro per tonnellata (D. Lgs. 152/2006).

I fanghi da conceria costituiscono il substrato di partenza di questo studio; essi risultano uno dei sottoprodotti del processo di concia (Sawalha et al., 2020) nel quale la maggior criticità risulta la presenza di additivi chimici come coloranti e tensioattivi, con un'elevata presenza di Cromo (Cr), comunemente sotto forma di Solfato di Cromo o Sali di Cromo (Alibardi & Cossu, 2016).

L'analisi dei fanghi risulta cruciale non solo per verificare il contenuto di sostanze pericolose, ma anche per evitare un eventuale

smaltimento scorretto tramite discariche controllate, inceneritori o produttori di biogas (Wang et al., 2019).

Il fatto che questo tipo di rifiuto sia stato utilizzato come substrato di partenza per uno studio risulta innovativo perché all'inizio degli anni '90, si pensava, a causa della grande presenza di sostanze chimiche caratteristiche del processo di concia come il Cromo, che questo rifiuto non potesse avere alcun utilizzo (Araujo et al., 2022).

## 2. Obiettivo Tesi

Lo scopo del presente lavoro di tesi è quello di verificare un allungamento della catena di carboni di acidi grassi a catena corta tramite il processo di Chain Elongation (CE), utilizzando fanghi da conceria. Quest'ultimi sono utilizzati come substrato di partenza per la fermentazione acidogenica (FA) tipica della digestione anaerobica, nella quale avviene la produzione di acidi grassi volatili.

Per verificare le performance dei fanghi, si è deciso di compiere differenti pretrattamenti sulle fermentazioni acidogeniche in batch, con lo scopo di capire come un pretrattamento (termico, ossidativo o combinato) possa incrementare la produzione di VFA.

Una volta compiute le fermentazioni acidogeniche in batch, si intende procedere con il processo di CE, diviso in 2 parti, in cui si noterà come la presenza di un donatore di elettroni esterno (Etanolo), aumenti di molto l'efficienza dell'allungamento della catena di carboni.

I principali vantaggi di questa procedura risultano il recupero di prodotti chimici ad alto valore aggiunto (VFA), il trattamento di un rifiuto (Tanney Sludge) molto impattante da smaltire e l'impiego di un processo biotecnologico emergente (CE) in grado di contribuire ad un'economia più sostenibile ed efficiente, offrendo soluzioni innovative per affrontare future sfide ambientali, energetiche ed economiche.



## 3. Materiali e Metodi

### 3.1. Substrato

Per questo studio è stato utilizzato come substrato di partenza un Fango da conceria proveniente da Montebelluno Vicentino (Vicenza, Italia). Il materiale iniziale risulta una combinazione di fanghi primari e secondari, caratterizzato da un contenuto di TS pari a 84% g TS/kg e un contenuto di VS pari a 59% g VS/kg.

Il fango, quindi, risulta essere il sottoprodotto finale del processo di trattamento acque, dopo aver subito sedimentazione e un trattamento secondario biologico.

Il fatto che si utilizzi un fango da conceria come substrato di partenza risulta innovativo poiché si pensava non fosse idoneo ad alcun tipo di processo biochimico, in quanto rifiuto contenente sostanze tossiche come il cromo, spesso sotto forma di sali di cromo (H. Liu et al., 2019).

### 3.2. Processi fermentativi su fango da conceria e condizioni di fermentazione mesofila

Per la fase iniziale di questo studio, è stato utilizzato un fermentatore Batch, modello Nautilus (Anaero Technology Ltd.); questo bioreattore è composto da 15 bottiglie da 1 Litro ciascuna, nelle quali viene inserita la matrice di partenza con cui compiere il processo fermentativo (Figura 4).



Figura 4: Fermentatore Batch, Nautilus

Ogni bottiglia è composta in HDPE, biologicamente inerte e capace di resistere a temperature fino a 100°C; esse inoltre possiedono una chiusura ergonomica sulla parte superiore, in grado di garantire le condizioni di anaerobiosi richieste dal processo. Oltre a ciò, il fermentatore è composto da un motore centrale utilizzato per miscelare ciascun reattore, in modo da garantire una miscelazione

omogenea e un bagno termostatico in cui la temperatura viene mantenuta costante.

I test di fermentazione anaerobica in Batch sono stati condotti in condizioni di mesofilia ( $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), in un volume di lavoro pari a 800 ml.

Per prima cosa, si è deciso di utilizzare differenti tipi di pretrattamenti in grado di influenzare le performance fermentative in Batch. In totale sono state investigate 5 condizioni operative, riassunte in Tabella 1.

<b>Parametro</b>	<b>Pretrattamento (overnight)</b>				
	<i>PR 1</i>	<i>PR 2</i>	<i>PR 3</i>	<i>PR 4</i>	<i>PR 5</i>
<i>Temperatura (°C)</i>	20°C*	20°C*	70°C	70°C	70°C
<i>Contenuto di Solidi (g TS/L)</i>	20	20	20	20	20
<i>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (g H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ g TS)</i>	-	0.2 g H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.2 g H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	0.4 g H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

Tabella 1: Pretrattamenti applicati su fango di conceria (\*temperatura ambiente)

I pretrattamenti su un substrato organico influenzano il processo fermentativo perché facilitano l'accesso dei microrganismi al substrato, inibiscono eventuali enzimi contenuti nei fanghi e uccidono i patogeni presenti, garantendo un processo più efficace e sicuro.

Il pretrattamento termico è stato svolto immergendo i reattori in HDPE in bagno idrostatico a 70°C mantenendo la temperatura

costante, mentre il pretrattamento ossidativo, tramite perossido di idrogeno, è stato compiuto aggiungendo  $H_2O_2$  in differenti quantità, seguendo il metodo descritto da Liu et al., (2017).

L'andamento della fermentazione è stato monitorato tramite un campionamento svolto per tre volte alla settimana, per misurare la produzione di VFA, pH, sCOD e concentrazione di  $N-NH_4^+$ . I campioni prelevati avevano un volume di 5 mL, raccolti manualmente da ciascun bioreattore tramite una siringa in plastica caratterizzata da un anello di gomma, in grado di mantenere le condizioni anaerobiche del processo. Successivamente i campioni venivano filtrati tramite filtri di porosità pari a  $0.2 \mu m$ , prima di compiere le procedure analitiche riportate nel paragrafo 3.5.

La fermentazione in presenza del primo pretrattamento (PR1), caratterizzato da un contenuto di solidi del 2%, è stata svolta per un totale di 15 giorni; in questa prima fermentazione anaerobica in batch si son volute verificare le performance del substrato in assenza di pretrattamenti termici o ossidativi. La fermentazione in presenza del secondo pretrattamento (PR2), avvenuto tramite perossido di idrogeno, forte ossidante, è stata compiuta per 8 giorni mentre l'ultima fermentazione in batch, caratterizzata da un pretrattamento termico e ossidativo combinato (PR3, PR4 e PR5), ha avuto la durata di 12 giorni. Una volta terminati i cicli fermentativi, i campioni raccolti e soggetti alle analisi sono stati congelati a  $-30^\circ C$  qualora risultasse necessario procedere con ulteriori analisi per definire meglio i risultati.

È importante sottolineare la fermentazione acidogenica in batch si è conclusa quando si è osservato un plateau riguardo la concentrazione di VFA.

### 3.3. Processo di Chain Elongation (CE)

Dopo la fase fermentativa in Batch, lo studio procede con il processo di Chain Elongation, compiuto tramite semplice approccio di carico scarico giornaliero, tale da simulare un reattore CSTR in modalità semicontinua, di volumetria pari a 1 litro ciascuno.



Figura 5: Reattori semicontinui utilizzati nel processo di Chain Elongation

In questo studio, si è voluto compiere il processo in due parti, per controllare come HRT diversi e l'aggiunta di un donatore esterno di elettroni influenzassero il processo stesso, in termini di efficienza di elongazione sui VFA precedentemente prodotti.

I reattori sono stati nominati Reattore 1 (R1) e Reattore 2 (R2), per la prima parte e Reattore 3 (R3) e Reattore 4 (R4) per la seconda; essi differiscono per i parametri riportati in Tabella 2 e 3; essenzialmente, la differenza più importante è rappresentata dal parametro Tempo di Ritenzione Idraulico (HRT), che esprime il tempo medio che un substrato, come l'acqua reflua, trascorre all'interno di un bioreattore, e il dosaggio di un donatore esterno di elettroni, in questo caso Etanolo.

I due reattori, caratterizzati da un sistema di sola entrata tramite una valvola, in primo luogo sono stati riempiti con 800 ml di acqua e un contenuto di Solidi pari a 20 TS/L. Successivamente, sono stati posizionati su un agitatore, in grado di garantire un miscelamento pari a 260 giri/minuto, ad una temperatura di 40°C. (Figura 6).

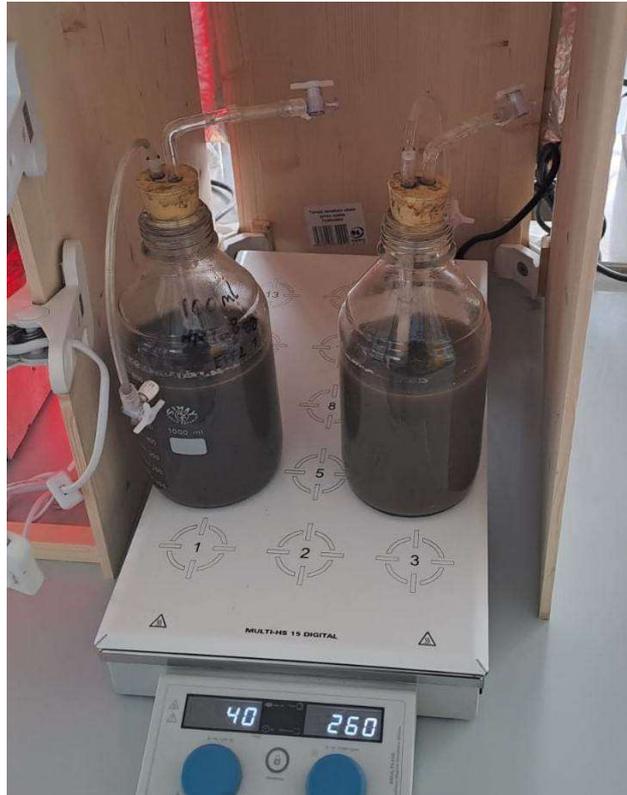


Figura 6: Reattori in sistema di riscaldamento-agitazione

A questo punto è possibile avviare manualmente il processo in modalità semicontinua, che consisteva nel prelevare direttamente dai reattori due aliquote (rispettivamente 100 ml e 200 ml) pari esattamente al volume di alimentazione da reinserire in coltura. Essendo reattori adibiti esclusivamente al processo di CE, il brodo di fermentazione ottenuto dalle precedenti fermentazioni in batch è stato prima centrifugato (rpm 4500; 20 min) per l'eliminazione dei solidi sospesi, sfruttando di fatto la coltura presente in fase liquida e

gli stessi VFA per il processo di elongazione. Le condizioni operative dei reattori di CE sono riportate rispettivamente in tabella 2 e 3.

Parametro	Reattore 1 ( <b>R1</b> )	Reattore 2 ( <b>R2</b> )
<b>HRT</b>	8 d	4 d
<b>Volume giornaliero scambiato (ml)</b>	100 ml	200 ml
<b>Solidi iniziali (g TS/L)</b>	9 g TS/L	9 g TS/L
<b>VFA iniziali (g COD/L)</b>	10 g COD/L	10 g COD/L
<b>Etanolo aggiunto (g COD/L)</b>	0	0

Tabella 2: Condizioni iniziali Chain Elongation pt.1

Questa parte ha avuto la durata di 34 giorni. La seconda parte, caratterizzata dalla presenza dei Reattori 3 e 4, è stata svolta tre mesi dopo il termine del primo; ha avuto una durata di 38 giorni, nei quali sono state svolte le medesime analisi compiute per lo stadio precedente, ad eccezione di alcuni cambiamenti riportati in Tabella 3:

Parametro	Reattore 3 ( <b>R3</b> )	Reattore 4 ( <b>R4</b> )
<b>HRT</b>	8 d	4 d
<b>Volume giornaliero scambiato (ml)</b>	100 ml	200 ml
<b>Solidi iniziali (g TS/L)</b>	9 g TS/L	9 g TS/L
<b>VFA iniziali (g COD/L)</b>	10 g COD/L	10 g COD/L
<b>Etanolo aggiunto (g COD/L)</b>	20 g COD/L	20 g COD/L

Tabella 3: Condizioni iniziali Chain Elongation pt.2

Seppur i tempi di ritenzione idraulica (HRT) siano identici rispetto alla fase precedente, come si nota dalla Tabella 3, la differenza maggiore sta nell'aggiunta del donatore di elettroni (Etanolo, Sigma Aldrich), ad una concentrazione doppia rispetto ai VFA presenti nel brodo di fermentazione. Ciò viene fatto perché, rispetto al ciclo precedente, si è voluto verificare come la presenza di un donatore esterno, contribuisca ad implementare il processo di Chain Elongation (Spirito et al., 2014) a parità di HRT investigati rispetto all'assenza di donatori.

Ognuno dei due effluenti è stato oggetto delle analisi analitiche (Paragrafo 3.5) citate in precedenza, mantenendo inoltre le medesime condizioni di riscaldamento-agitazione, presenti nel primo stadio (Figura 6).

### 3.4. Principali prestazioni di processo investigate

Di seguito verranno riportati tre parametri fondamentali per comprendere il trend di crescita dei VFA, discussi nei paragrafi 4.3.1-4.3.3.

1. **Yield** ( $Y_{VFA}$ ): Lo Yield risulta un parametro fondamentale per qualunque tipo di processo biochimico e biotecnologico; esso esprime l'efficienza del processo considerato in base alla conversione di substrato nel prodotto di interesse. Il parametro si esprime in  $g\ COD_{VFA}/g_{VS(0)}$ .

2. **Ammonia** (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>): Il contenuto di ammonio all'interno di un fango risulta cruciale poiché permette di valutare gli impatti ambientali riconducibili al fango, oltre ad essere un ottimo misuratore ambientale legato alle normative e alla gestione del processo di DA. Si misura in mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/mg TKN o si esprime tramite un valore percentuale.
  
3. **VFA/sCOD**: Il rapporto VFA prodotti e COD solubile indica l'efficienza di conversione di questa frazione di COD in acidi; esso risulta interessante perché fornisce un valore riguardo l'efficienza del processo. Misurato in gO<sub>2</sub>/gO<sub>2</sub> (espresso solitamente in %).

## 3.5. Metodologie Analitiche

In questo capitolo verrà fornito un breve quadro riguardo strumentazioni e procedure analitiche utilizzate per svolgere le varie analisi.

### 3.5.1. Determinazione VFA tramite Gascromatografo

L'analisi della concentrazione degli acidi grassi volatili (VFA) avviene tramite cromatografia, impiegando un gascromatografo (GC) Agilent 6890N, fornito di una colonna Agilent J&W DB-FFAP (Figura 7).



Figura 7: Gascromatografo Agilent 6890N

L'analisi compiuta risulta di tipo quantitativo, svolta tramite uno standard, acido-2-etilbutirrico, a concentrazione nota pari a 100  $\mu$ L. Il valore dei VFA cercati (Capitolo 1.2.), viene fornito confrontando il picco dello standard interno con quello del cromatogramma. Dal punto di vista sperimentale, la procedura si compie inizialmente

filtrando i campioni del fermentatore Nautilus tramite filtri NY per siringa 0.2  $\mu\text{m}$ ; successivamente si inseriscono in un'epENDORF 900  $\mu\text{L}$  di campione, 100  $\mu\text{L}$  di acido fosforico e 100  $\mu\text{L}$  di Acido 2-etil butirrico.

A questo punto, si inietta 1  $\mu\text{L}$  di soluzione all'interno del GC, che fornirà le concentrazioni dei VFA contenuti all'interno del campione. È necessario specificare che sono presenti dei limiti di rilevabilità per ogni VFA cercato, in modo da assicurarsi che lo strumento lavori in modo corretto, basandosi sullo standard iniettato inizialmente.

### 3.5.2. Determinazione Soluble Chemical Oxygen Demand (sCOD)

sCOD, definito come componente Solubile della domanda chimica di ossigeno, fornisce un valore riguardo la componente organica, solubile, presente nel campione da analizzare.

Dal punto di vista analitico, il campione viene filtrato tramite filtri NY 0.2  $\mu\text{m}$ , successivamente, tramite una diluizione 1:50, inoculo e campioni in quantità pari a 2.5 mL, vengono posti in una provetta di vetro. Oltre a ciò, viene preparato un bianco da 2.5 mL. A questo punto, vengono aggiunti alle provette due acidi (1,5 mL di soluzione ossidante,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  e 3,5 mL di soluzione catalizzante,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), prima porre il tutto in un termoreattore (Figura 8) a 150°C per 2 ore, al fine di completare la digestione dei campioni.

L'analisi colorimetrica, a questo punto, viene svolta tramite uno spettrofotometro Analytikjena Spekol 1500 (Figura 9), operante ad una lunghezza d'onda di 600 nm, in grado di fornire le concentrazioni di sCOD in mg  $\text{O}_2/\text{L}$ . I valori numerici sono forniti dalla seguente equazione:

$$sCOD = sCOD_{\text{miss}} * D. F.$$

nella quale:

-  $sCOD_{miss}$ : valore di sCOD fornito dallo strumento.

-  $D.F.$ : Fattore di Diluizione.



Figura 8: Termoreattore Eco 16 VELP SCIENTIFICA



Figura 9: Spettrofotometro Analytikjena Spekol 1500

### 3.5.3. Determinazione Azoto Ammoniacale (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)

L'azoto ammoniacale rappresenta la forma disciolta di azoto all'interno di un refluo sia in forma ammoniacale (NH<sub>3</sub>) che in forma protonata (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>).

La procedura sperimentale utilizzata prevede un'iniziale filtrazione dei campioni ed in seguito l'utilizzo di una tecnica di distillazione al fine di evitare la volatilizzazione della componente ammoniacale presente nel fango. Ciò avviene tramite un distillatore VELP SCIENTIFICA UDK 129 (Figura 10).



Figura 10: Distillatore VELP SCIENTIFICA UDK 129

Il metodo di distillazione tramite questo strumento prevede un'iniziale diluizione dei campioni ed una serie alternata di lavaggi/distillazioni tramite NaOH, per garantire l'ambiente basico necessario all'analisi della componente azotata. Una volta conclusi i cicli, si ottiene una

soluzione contenente Acido borico, aggiunto prima del processo di distillazione, alla quale si aggiunge ulteriore NaOH (1mL), per ottenere un'ambiente di reazione ottimale. Oltre a ciò, si addiziona 1mL di Reattivo di Nessler, in grado di formare una soluzione gialla, necessario per la procedura colorimetrica vista in precedenza.

Una volta ottenute le soluzioni, si utilizza lo Spettrofotometro (Figura 8), che grazie ad una lettura a 420 nm, fornisce un valore di azoto ammoniacale.

Per i calcoli, si determina la concentrazione mediante la retta di calibrazione:

$$\underline{[N-NH_4^+] = m * ABS * F.D.}$$

dove:

- ABS: valore di assorbanza del campione determinato dallo spettrofotometro.
- F.D.: fattore di diluizione del campione prima di inserire il reattivo di Nessler (si riferisce ovviamente alla diluizione finale che è il prodotto delle diluizioni intermedie)
- m: è il coefficiente angolare dalla retta di calibrazione per l'analisi del N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

L'unità di misura è:  $[N-NH_4^+] = \text{mg (N-NH}_4^+) * \text{L}^{-1}$ .

#### 3.5.4. Determinazione pH

La misurazione del pH svolge un ruolo cruciale in quanto permette di capire le corrette condizioni di crescita dei VFA, favoriti da un ambiente leggermente alcalino (Baffoe et al., 2024).

Dal punto di vista strumentale, si è utilizzato un pHmetro portatile Tecnafood modello 607, con il quale sono stati monitorati tutti i campioni.

Lo strumento, inoltre, è servito per monitorare il ph dei vari substrati prodotti dai cicli del fermentatore Nautilus e gli effluenti durante il processo di CE.

## 4. Risultati e Discussione

### 4.1. Caratteristiche Matrice di partenza

Di seguito sono riportati i dati riguardo la caratterizzazione chimica del materiale secco:

<b>CARATTERIZZAZIONE CHIMICA "SECCO"</b>		
<b>PARAMETRO</b>	<b>VALORE</b>	<b>UNITA' DI MISURA</b>
<b>COD</b>	791	g O <sub>2</sub> /kg TS
<b>P organico</b>	6,8	g P/Kg TS
<b>TS</b>	844	g TS/kg
<b>VS</b>	594	g VS/kg
<b>VS/TS</b>	0,70	w/w
<b>TKN</b>	32,8	g N/kg TS

Tabella 4: Caratterizzazione chimica matrice Secco

Essendo un fango da conceria, il materiale di partenza è caratterizzato da una certa variabilità nella composizione a causa dei processi di concia. Parametri come TS e VS risultano leggermente inferiori rispetto a studi di riferimento come Alibardi & Cossu, 2016, mentre è possibile notare dei valori elevati riguardo COD e TKN.

## 4.2. Produzione di ScVFA in processi di fermentazione anaerobica in Batch

La produzione di acidi grassi a catena corta è, come precedentemente detto, il primo step di questo studio di tesi; le successive figure illustrano l'andamento dei VFA prodotti in varie prove di fermentazione acidogena in batch e le principali differenze che sono state quantificate in funzione dei diversi pretrattamenti applicati.

La figura 11 illustra l'andamento dei vari VFA nel tempo a partire da un fango di conceria non soggetto a pretrattamento. La concentrazione iniziale di tale fango era pari a 20 g TS/L, come in tutti gli altri test. Pur non essendoci alcun inoculo, la produzione di VFA è stata osservata sin dall'inizio, almeno per quanto riguarda l'identificazione dell'acido acetico (pari a circa 100 mg COD/L in corrispondenza del secondo giorno di test). Dopo una lag-phase abbastanza ridotta, la concentrazione di acido acetico diventava piuttosto predominante rispetto agli altri. In particolare, si osservava una concentrazione di acido acetico nettamente superiore a partire dal terzo giorno di reazione fino a fine prova, in cui il contributo di tale acido era pari al 56% COD/COD rispetto al totale dei VFA. Tale fattore è essenzialmente legato alla natura stessa della matrice: i fanghi di conceria hanno una composizione chimica piuttosto ricca in proteine (soprattutto l'apporto di fanghi primari); questo crea una prevalenza di acido acetico nei processi fermentativi (Tuci et al., 2022).

L'acido propionico, butirrico e isovalerico mostravano un simile trend. La loro produzione era piuttosto consistente a partire dal terzo giorno; tuttavia, nettamente inferiore rispetto all'acido acetico. Alla

fine della prova, tali VFA esibivano concentrazioni nel range 550-700 mg COD/L, circa la metà rispetto ai valori riscontrati di acido acetico.

L'acido isobutirrico e valerico erano quelli caratterizzati da livelli di concentrazione decisamente inferiori (200-300 mg COD/L come valori finali) per tutta la durata del test fermentativo.

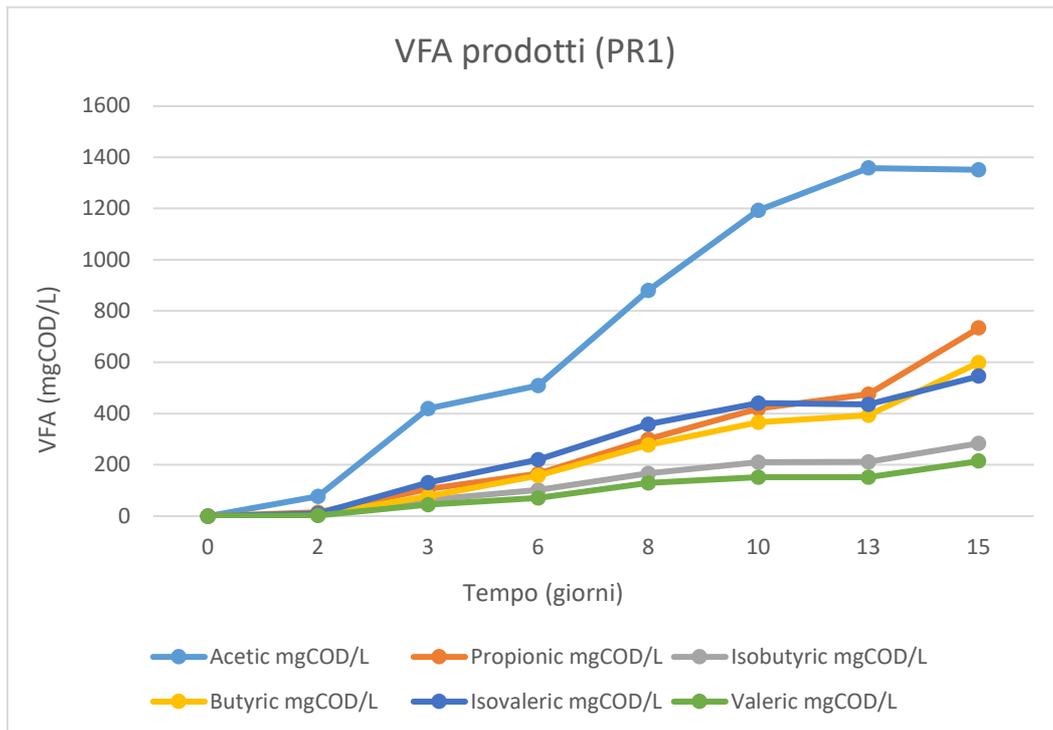


Figura 11: VFA prodotti (PR1)

Il secondo pretrattamento (PR2) è illustrato tramite la figura 12, ed è caratterizzato dalla presenza di un'ossidazione tramite perossido di idrogeno pari a 0.2 g H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La concentrazione di fango, come per tutti i test, risultava pari a 20 g TS/L. Come accaduto nel test fermentativo precedente, la produzione di VFA è stata osservata da subito, con l'acido acetico che il primo giorno di test presentava un valore pari a 500 mgCOD/L. Anche in questo caso, a partire già dal secondo giorno di fermentazione, l'acido acetico costituisce il prodotto predominante; non a caso esso costituirà il 45% COD/COD rispetto al totale dei VFA prodotti, con un valore a plateau pari 3495 mg COD<sub>VFA</sub>/L, raggiunto il sesto giorno di test. Oltre all'acido acetico, al secondo giorno di test risultano in crescita anche le concentrazioni di acido butirrico, propionico e isovalerico; questi tre acidi mostrano un trend simile, con valori di circa 500 mgCOD/L per propionico e isovalerico e un valore di 750mg COD/L per l'acido butirrico. Dal terzo giorno la produzione di propionico e butirrico si intensifica; anche se nettamente inferiori rispetto all'acido acetico, questi due acidi riportano concentrazioni nel range 1200-1500 mgCOD/L, quasi triplicate rispetto alla fermentazione precedente. Acido valerico e isobutirrico, invece, pur avendo valori finali pari a 500 mgCOD/L, doppi rispetto a PR1, risultano gli acidi la cui concentrazione non ha subito grandi variazioni. Il fatto di aver raggiunto valori molto alti di acetico, propionico e butirrico rispetto alla fermentazione precedente è sicuramente da ricondurre al pretrattamento ossidativo, responsabile di un aumento della biodegradabilità, rendendo il substrato più disponibile ai microrganismi, come riportato da (Presti et al., 2021).

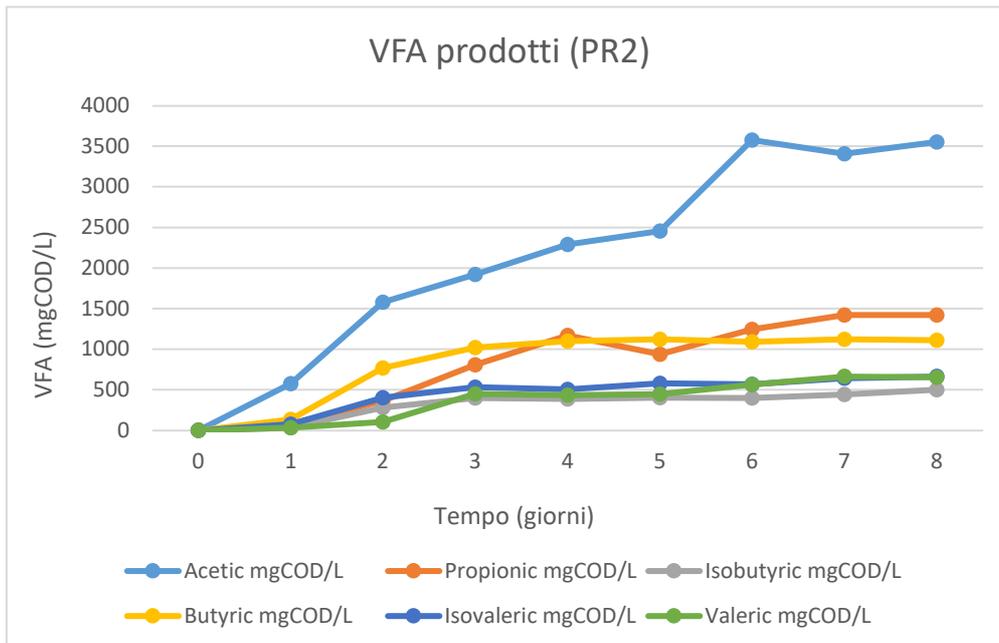


Figura 12: VFA prodotti (PR2)

La figura 13 illustra l'andamento dei VFA per quanto riguarda la terza fermentazione acidogenica (PR3), caratterizzata da un pretrattamento termico (overnight) a 70°C, combinato ad un'ossidazione tramite perossido di idrogeno pari a 0.2 g H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In questo test fermentativo si comincia a notare l'influenza dei pretrattamenti; l'acido acetico, a partire dal secondo giorno di test, raggiunge un valore pari a 850 mgCOD/L, confermandosi il protagonista delle fermentazioni acidogeniche. Esso arriverà a plateau l'ultimo giorno con un valore di vicino ai 6000 mg COD<sub>VFA</sub>/L, costituendo il 59% COD/COD del contributo totale rispetto a tutti i VFA, con la percentuale maggiore tra i 5 pretrattamenti analizzati.

Come avvenuto in precedenza, propionico e butirrico, mostrano un trend simile alle fermentazioni precedenti, la cui produzione comincia ad essere consistente dal quinto giorno di test, con valori nel range di 1000 mgCOD/L per entrambi. Essi arriveranno a plateau rispettivamente al nono e al decimo giorno, con valori nel range

1850-2000 mgCOD/L, comunque superiori rispetto ai pretrattamenti PR1 e PR2. In ultimo, acido valerico, isobutirrico e isovalerico presentano delle concentrazioni molto valori degli altri acidi (per tutti e tre non si arriva a 1000 mgCOD/L a plateau, costituendo rispettivamente il 4%, 5% e 7% COD/COD rispetto agli altri VFA. Tramite questo trattamento combinato, quindi, si cominciano a notare delle concentrazioni a plateau interessanti degli acidi più corti.

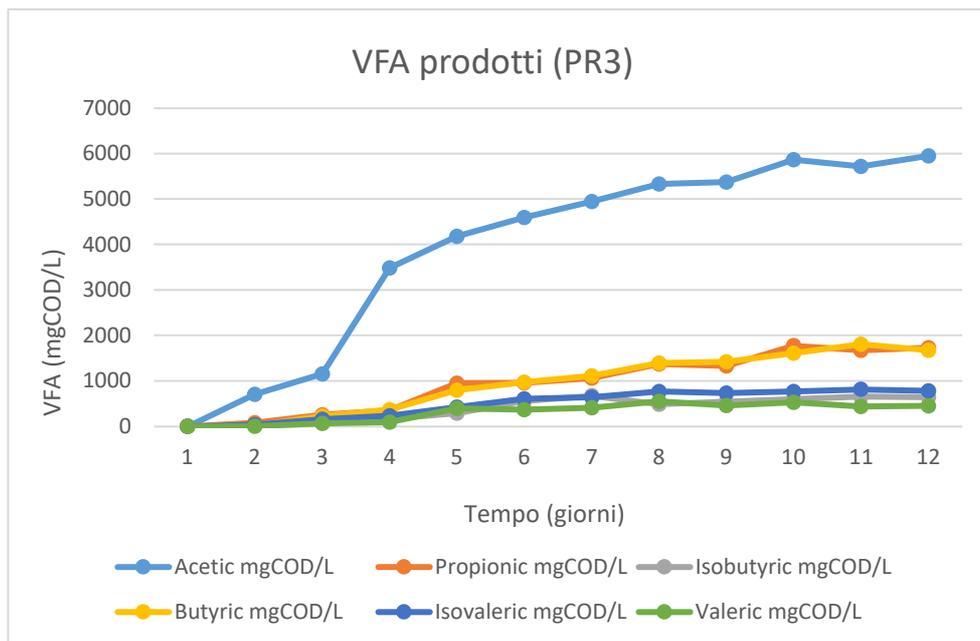


Figura 13: VFA prodotti (PR3)

Il quarto pretrattamento utilizzato (PR4), è costituito da un pretrattamento termico a 70°C e un contenuto di 20 g TS/L, senza un'ossidazione iniziale. La Figura 14 illustra l'andamento dei VFA per questa fermentazione acidogenica in Batch, nella quale l'acido acetico domina dal punto di vista produttivo, come in tutti gli altri cicli fermentativi.

Anche in PR4, l'acido acetico s'impenna nel primo giorno di test, per arrivare a plateau il decimo giorno, con un valore vicino ai 5000 mgCOD/L. A differenza degli altri pretrattamenti, la formazione di tutti e cinque gli altri acidi comincia in maniera blanda il secondo giorno, per poi subire un'impennata al sesto giorno di test. Per la prima volta, il secondo acido dal punto di vista produttivo risulta l'acido isovalerico (15% COD/COD), a plateau il nono giorno con un valore vicino ai 2000 mg COD/L. Propionico, butirrico e isobutirrico presentano andamenti simili tra loro, con valori nel range di 1100-1250 mgCOD/L registrati alla fine della prova. L'acido Valerico, infine, risultava quello caratterizzato da livelli di concentrazione decisamente inferiori (a plateau nemmeno 1000 mgCOD/L) registrati alla fine della fermentazione. La produzione diversificata di VFA appena commentata permette di affermare che questo pretrattamento sia il migliore dal punto di vista delle performance produttive.

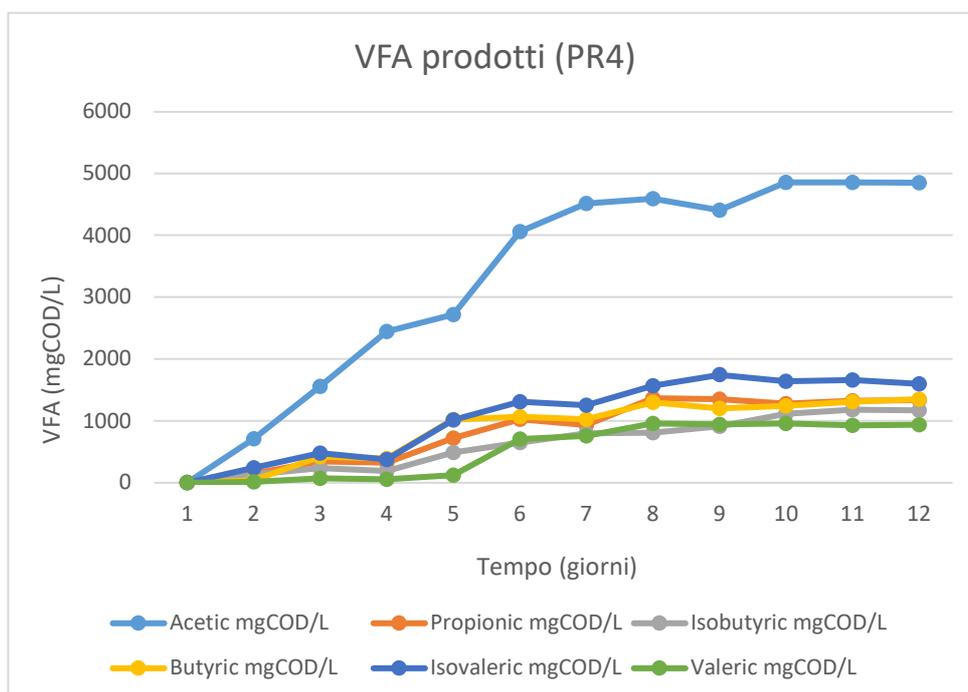


Figura 14: VFA prodotti (PR4)

L'ultimo pretrattamento investigato (PR5), in Figura 15, illustra l'andamento dei VFA nel tempo a partire da un fango da conceria soggetto a pretrattamento termico a 70°C combinato ad un'ossidazione tramite perossido di idrogeno pari a 0.2 g H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 20 g TS/L. Pur essendo PR5, tra tutte le condizioni, quella in cui è avvenuto il pretrattamento più impattante, non costituisce la miglior fermentazione acidogenica dal punto di vista produttivo. A partire dal secondo giorno, l'acido acetico costituisce il punto di partenza della FA, con un valore vicino a 500 mgCOD/L. In questo test, l'acido acetico ha sviluppato lo stesso trend che aveva percorso in PR3, in cui arriva a plateau il decimo giorno con un valore vicino ai 6000 mgCOD/L, costituendo il prodotto predominante del test fermentativo. Come osservato in PR4, anche in questo test acido isovalerico (13% COD/COD), propionico (13% COD/COD) e butirrico (11% COD/COD), presentano trend simili, con valori in un range di 1250-1500 mgCOD/L a fine test. Oltre a questi tre acidi, anche la produzione di valerico e isobutirrico inizia ad essere consistente il 5 giorno, senza però raggiungere concentrazioni degne di nota per tutta la durata del test fermentativo. Pur non essendo la condizione migliore, PR5 si dimostra una buona alternativa, confermando come il pretrattamento combinato termico ossidativo sia un buon punto di partenza per migliorare la produzione di VFA.

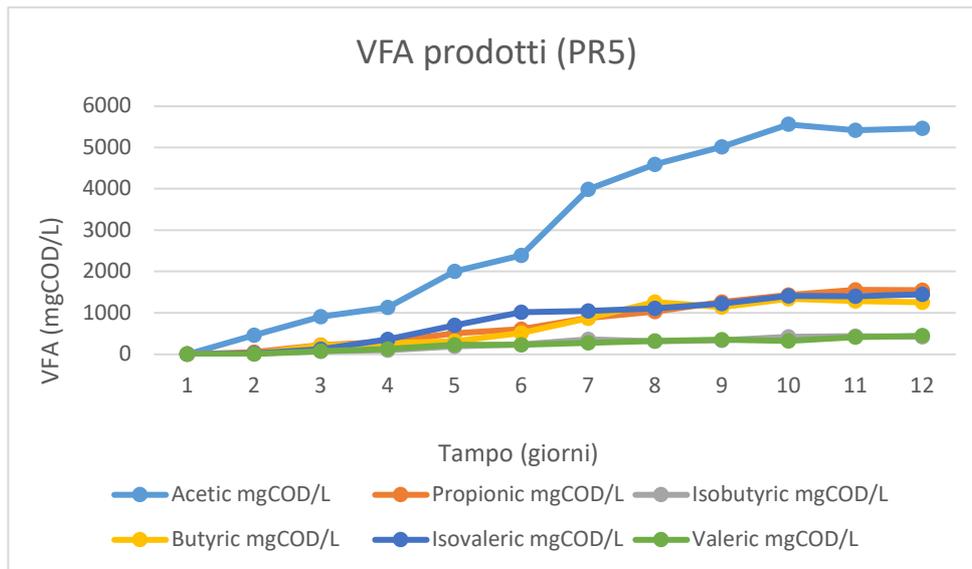


Figura 15: VFA prodotti (PR5)

È possibile quindi affermare che il miglior pretrattamento eseguito tra i cinque sia quello Termico rappresentato da PR4, seguito dal pretrattamento combinato termico ossidativo PR3. All'interno di queste due fermentazioni, infatti, non solo si sono registrati i migliori valori riguardo la produzione totale netta di VFA, rispettivamente 11243 mgCOD/L per PR3 e 11227 mgCOD/L per PR4, ma si è anche registrato il miglior Yield (pari a 0.42 per entrambi), che esprime l'efficienza del processo considerato in base alla conversione di substrato nel prodotto di interesse. Per quanto riguarda gli altri pretrattamenti indagati, come previsto, PR1, nel quale non si è compiuto un vero e proprio pretrattamento, presenta valori molto bassi riguardo la produzione di VFA, nel quale è favorita la produzione di acido acetico rispetto a tutti gli altri acidi. PR2, in cui è presente solo la componente ossidativa di pretrattamento, non ha riportato risultati degni di nota tranne che una concentrazione spiccata di acido butirrico (a plateau 1123 mgCOD/L).

L'ultima condizione di pretrattamento, PR5, era attesa come la migliore a causa della combinazione tra trattamento termico e ossidativo, in realtà ha riportato un valore di Yield pari a 0.40 e una produzione di VFA<sub>tot</sub> pari a 10575 (mg COD/L), leggermente inferiori alle condizioni viste in precedenza.

In generale, i cinque pretrattamenti hanno contribuito ad incrementare sostanzialmente la produzione di VFA nei confronti del fango non pretrattato. Tutti i pretrattamenti mostrano una produzione iniziale di VFA piuttosto simile nei primi tre giorni di fermentazione, tempo presumibilmente necessario ai microrganismi per superare la lag-phase di adattamento. Le produzioni di VFA più significative si sono ottenute a partire dal terzo (per PR1 e PR2) o quinto giorno (per PR3, PR4 e PR5) di test batch, con un aumento nella concentrazione dei vari VFA, permettendo di affermare che i pretrattamenti incidono in modo significativo sulla fase acidogenica di fermentazione.

Contrariamente alla produzione, è necessario specificare che i pretrattamenti condotti hanno inciso poco sulla percentuale di distribuzione riguardo agli acidi. Come illustrato dalle figure, solo il Pretrattamento 3 (PR3) ha causato un aumento consistente di acido acetico al 59% COD/COD; non si sono registrati altri aumenti significativi. In generale, tutte le condizioni mostrano una netta prevalenza di acido acetico (45-59%), seguita da acido propionico (11-18%) e butirrico (5-17%). Anche l'acido isovalerico ha mostrato un range di distribuzione accettabile (7-15%), mentre acido isobutirrico (4-9%) e valerico (3-7%) registrano valori decisamente inferiori, inferiori al 10% della distribuzione.

Di seguito è riportata la Figura 16, nella quale si presentano le % medie prodotte per ogni pretrattamento analizzato, oltre alla Tabella 5, nella quale si riporta un riassunto sui parametri delle varie FA.

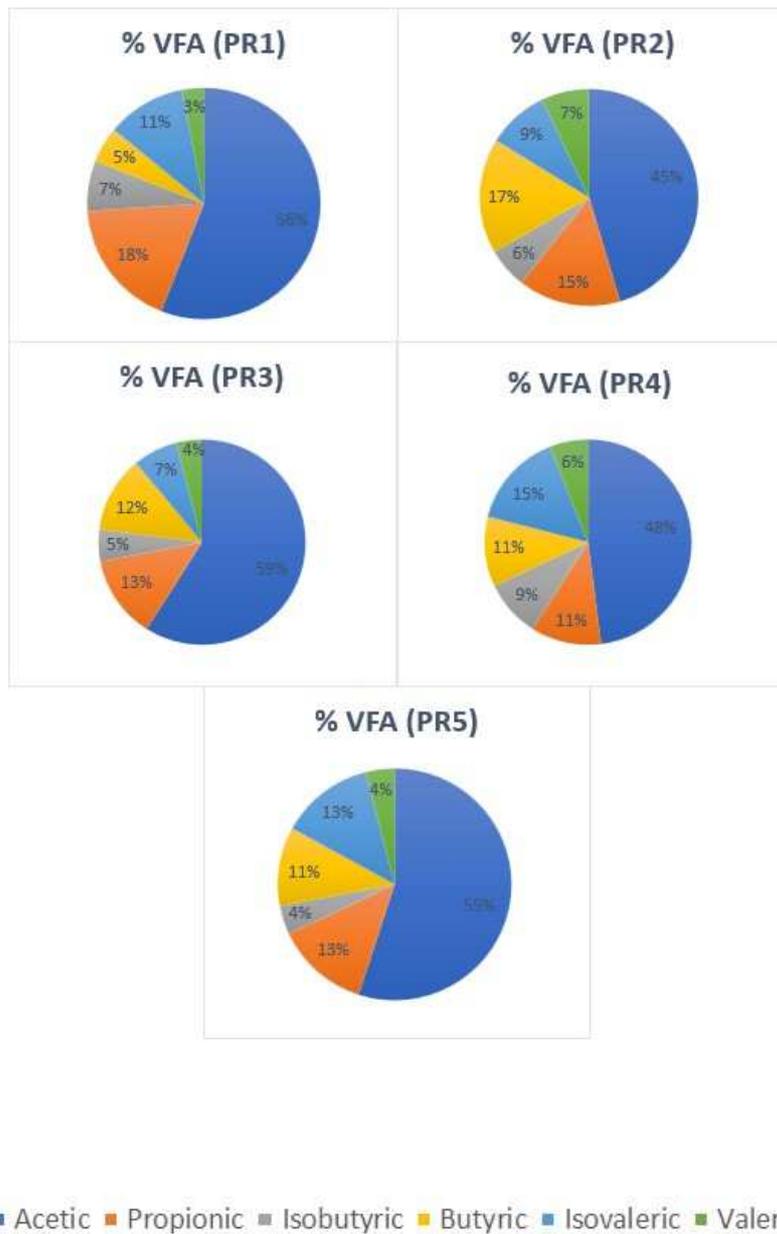


Figura 16: Contenuto percentuale dei VFA nei test fermentativi (PR1-PR5)

Tabella 5: Riassunto dei principali pretrattamenti monitorati nel corso dei differenti processi di Fermentazione Acidogenica (FA)

Parametro	Unità di misura	Reattore di Fermentazione Batch				
		PR1	PR2	PR3	PR4	PR5
<b>VFA totali</b>	mg COD/L	1053 ± 210	7900 ± 121	11243 ± 311	11227 ± 104	10575 ± 88
<b>Yield</b>	gCOD <sub>VFA</sub> /gVS <sub>0</sub>	0,10 ± 0,02	0,30 ± 0,03	0,42 ± 0,03	0,42 ± 0,03	0,40 ± 0,02
<b>VFA/sCOD</b>	gO <sub>2</sub> /gO <sub>2</sub>	0,77 ± 0,02	0,75 ± 0,02	0,68 ± 0,03	0,81 ± 0,01	0,65 ± 0,02
<b>Rilascio Ammoniaca</b>	mgN-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /mg TKN	1,5% ± 0,3	9,2% ± 0,4	21,9% ± 0,5	22,6% ± 0,4	24,6% ± 0,1

#### 4.2.1. Yield ( $Y_{VFA}$ ): Fermentazione acidogenica in Batch

PR1, ovvero la condizione senza pretrattamento, ha registrato un valore di 0.10 confermandosi la peggiore dal punto di vista produttivo; ciò risulta naturale vista l'assenza di pretrattamenti volti al

miglioramento del substrato protagonista delle fermentazioni acidogeniche.

PR2, caratterizzato da contenuto di TS pari a 20g TS/L e un'ossidazione iniziale 0.2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, presenta un valore di 0.30; è possibile affermare che per una fermentazione acidogenica "classica", il pretrattamento ha presentato una condizione accettabile come espresso da studi di riferimento come Valentino et al., (2019), nel quale il valore legato allo yield risultava leggermente superiore (0.44), ma comunque in linea con le condizioni rappresentative dell'esperimento.

PR3 e PR4 forniscono andamenti legati allo Yield soddisfacenti in cui si riporta un valore di 0.42 per entrambi; come evidenziato da Ambrose et al., (2020), ciò risulta interessante perché rafforza ulteriormente la tesi secondo la quale un pretrattamento iniziale sul substrato fornisce dei risultati migliori riguardo la produzione di acidi grassi a catena corta e, di conseguenza, risultati migliori sul processo di CE applicato a questi. I valori dello Yield indicano quindi una conversione di substrato a prodotti soddisfacente. È possibile affermare che il pretrattamento termico a 70°C sia il migliore, nonché la chiave per incrementare le performance di FA.

PR5, in ultimo, ha registrato un valore di 0.40: ciò risulta in linea con le condizioni sopracitate, anche se qui si presenta un valore leggermente inferiore. Come analizzato nel paragrafo 4.2, nonostante la combinazione tra il pretrattamento termico e ossidativo in quantità maggiore, questo pretrattamento non è risultato il migliore tra i 5 indagati, seppur fornendo un buon risultato.

#### 4.2.2. % $\text{NH}_4^+$ rilasciato: Fermentazione acidogenica in Batch

La quantità maggiore di  $\text{NH}_4^+$  rilasciato durante le fermentazioni acidogeniche in Batch si è registrata in presenza di un pretrattamento termico e combinato termico-ossidativo; PR3, PR4 e PR5 hanno registrato dei picchi di valori rispettivamente del 21.9%, 22.6% e 24.6%; come espresso da Martines et al., (2010), il fatto di utilizzare fanghi da conceria come substrato porta ad una mineralizzazione dell'azoto organico presente inizialmente nel rifiuto; nello studio di riferimento si registrava un valore di rilascio leggermente inferiore (20.5%).

Per quanto riguarda PR1 e PR2, si sono registrati dei valori legati al rilascio di Ammonia molto inferiori (minori del 10%).

#### 4.2.3. VFA/sCOD: Fermentazione acidogenica in Batch

All'interno dei vari cicli di fermentazione compiuti, il valore maggiore del rapporto (a plateau) è stato raggiunto dal pretrattamento PR4, pari a 0.81. Questo dato risulta interessante poiché suggerisce che una significativa quantità di materia organica nel sistema è stata utilizzata efficacemente per la produzione di acidi grassi volatili, confermando ancora una volta come il pretrattamento termico a 70°C garantisca delle condizioni operative migliori rispetto agli altri indagati in questo studio.

Il valore massimo del rapporto VFA/sCOD raggiunto dalle altre fermentazioni risulta leggermente minore, pari a 0.77 per PR1 e 0.75 per PR2; valori simili illustrano una buona efficienza per un processo fermentativo come espresso dallo studio di Fonseca et al., (2021).

### 4.3. Processi di Chain Elongation in reattori CSTR

Come illustrato nel paragrafo precedente, è evidente come l'acido acetico risulti il prodotto principale nei tradizionali processi fermentativi mesofili applicati su fanghi di conceria, indipendentemente dal tipo di pretrattamento adottato; da un punto di vista di ulteriore valorizzazione, la presenza di così elevate percentuali (>45% COD/COD) dell'acido più corto tra i VFA (2 atomi di carbonio) può favorire i processi di CE verso acidi grassi a media catena (C6-C8).

In questo paragrafo si andranno ad analizzare i risultati della seconda fase di questo studio, ovvero il processo di Chain Elongation (CE) condotto sul brodo di fermentazione ottenuto nei processi di fermentazione acidogenica batch.

- **Chain Elongation senza donatore esterno di elettroni**

Lo scopo del processo di Chain Elongation risulta verificare se è presente un allungamento nella catena di carboni, correlata ad un aumento nella concentrazione di VFA verificatosi nelle FA.

I parametri su cui discutere riguardo l'allungamento della catena sono principalmente HRT e quantità di prodotti puri ottenuta (acidi grassi a catena media; Roghair et al., 2018). Per diversificare CE, si è deciso di utilizzare un donatore di elettroni (Etanolo) solo nella seconda parte del processo. Un donatore di elettroni come Etanolo o Acido Lattico è in grado di fornire carbonio aggiuntivo, ridurre la competizione per i substrati e promuovere la crescita di specie microbiche specifiche (Battista et al., 2024).

Il primo Reattore (R1), caratterizzato da un HRT di 8 giorni, ha fornito risultati del tutto contrari agli scopi principali di un processo CE, mostrando un'alta produzione di acido acetico, ben superiore rispetto

al valore di partenza (brodo di fermentazione): si giunge a plateau il 23° giorno, con un valore di 14843 mg COD/L. È possibile affermare che questa prima condizione sia servita a selezionare esclusivamente delle vie metaboliche descrittive degli stadi più avanzati della fermentazione acidogenica, ovvero l'acetogenesi, in quanto l'88% della produzione di VFA (COD/COD) era rappresentata da acido acetico; i restanti VFA rappresentavano percentuali del tutto minori (non al di sopra del 5% COD/COD), e quindi un contenuto marginale dei prodotti finali. Nonostante l'adozione di un HRT relativamente elevato (8 d) rispetto ai processi fermentativi (generalmente caratterizzati da HRT più contenuti), non si sono osservati fenomeni riconducibili all'allungamento di catena e di conseguenza, tale condizione risulta favorevole solo se si volesse ottenere una produzione quasi selettiva di acido acetico. La presenza quindi di un donatore esterno di elettroni risultava pertanto necessaria ai fini della CE.

Nel secondo Reattore (R2), caratterizzato da un HRT di 4 giorni, si è giunti a risultati differenti; tuttavia, l'acido acetico risultava ancora predominante, anche se in misura minore rispetto a R1, essendo pari al 68% COD/COD, seguito dall'acido propionico (16%) e butirrico (7%). È possibile notare come, anche in questo caso, non sia avvenuto alcun fenomeno riconducibile alla CE, poiché la composizione dell'effluente rispecchiava quella tipica del brodo di fermentazione precedentemente ottenuto, con un leggero incremento di acido acetico. Pertanto, un valore di HRT pari a 4 giorni non si era rivelato sufficiente per l'instaurarsi dei fenomeni riconducibili alla CE, né alla prevalenza delle reazioni metaboliche caratteristiche dell'acetogenesi, che invece erano piuttosto spiccate ad HRT più elevati. A plateau l'acido propionico ha registrato un valore di 2433 mg COD/L, l'acido butirrico vicino ai 2000 mg COD/L. Come espresso da Grootscholten et al., (2014), pur avendo un HRT

minore, è possibile che una diversificazione nella produzione dei VFA sia dovuta alla mancanza di un pretrattamento (termico o ossidativo).

I risultati ottenuti dalla prima parte del processo biotecnologico di Chain Elongation non risultano del tutto soddisfacenti, poiché, seppur lavorando in due condizioni differenti per controllare meglio i parametri operativi, non si è ottenuto un allungamento della catena. Molto probabilmente ciò è dovuto al fatto che non si è aggiunto un donatore di elettroni in grado di implementare quantitativamente il processo di CE.

Oltre a ciò, il parametro HRT avrebbe dovuto essere aumentato per entrambi i Reattori, soprattutto in R1 dove, pur essendo pari a 8 giorni, non è risultato sufficiente. Un HRT più lungo, quindi un maggior tempo di permanenza del substrato all'interno del reattore, potrebbe garantire l'instaurarsi di fenomeni riconducibili alla CE, con conseguente produzione di acidi grassi a catena media, e.g. Battista et al., (2024).

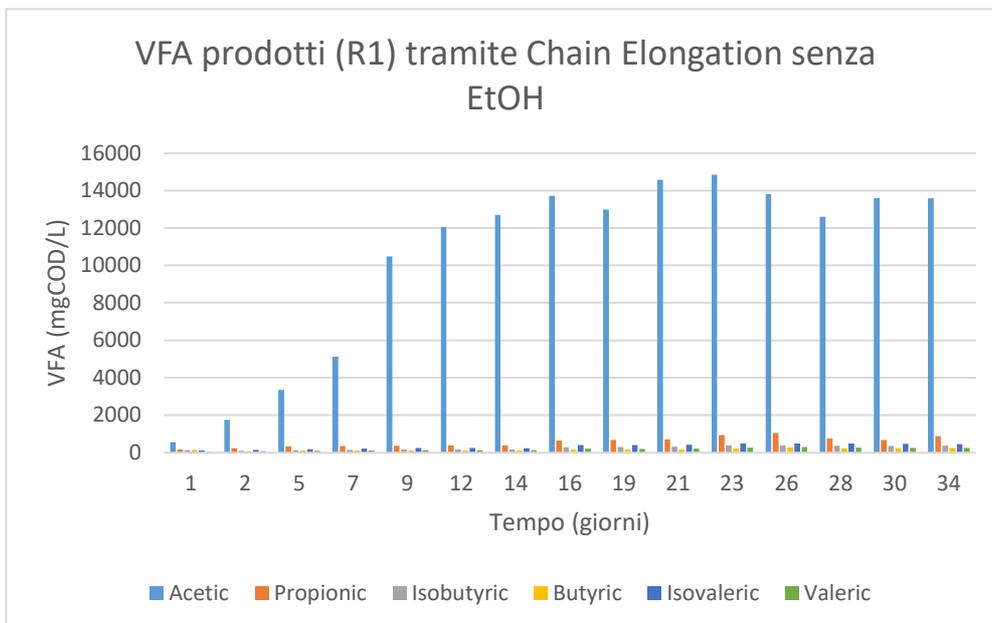


Figura 17: VFA prodotti (R1) tramite CE senza donatore di e<sup>-</sup>

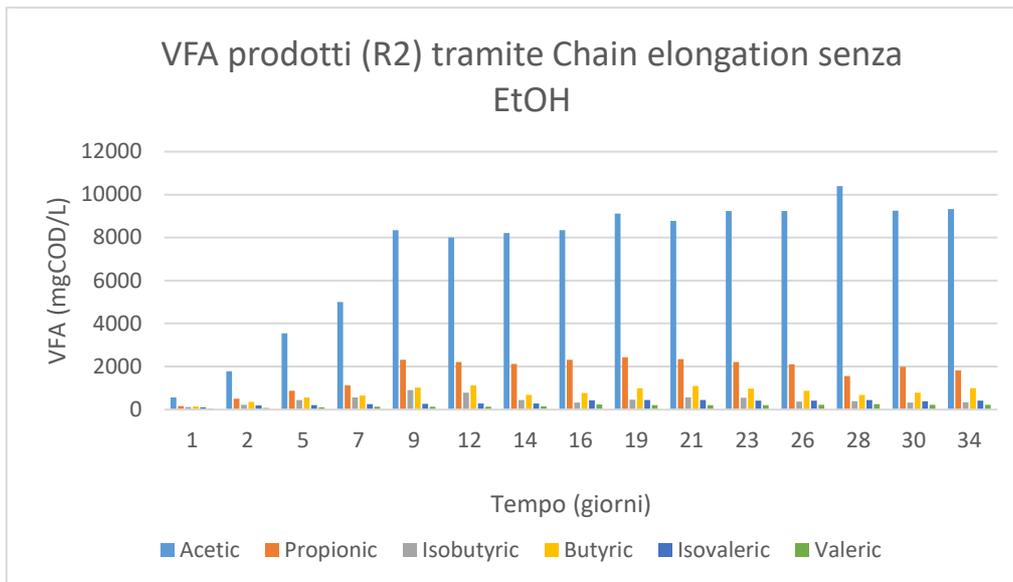


Figura 18: VFA prodotti (R2) tramite CE senza donatore di e<sup>-</sup>

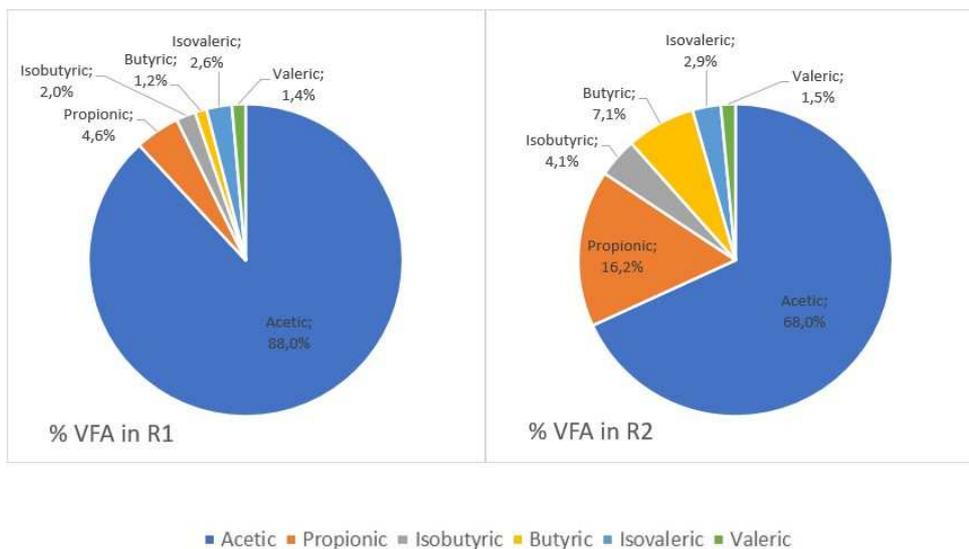


Figura 19: contenuto % di VFA in processi CE senza donatore di e<sup>-</sup>

- **Chain Elongation in presenza di un donatore di elettroni esterno (EtOH)**

Si ricorda che questa seconda parte di processo di CE è caratterizzata dall'aggiunta di etanolo come donatore di elettroni all'interno del brodo di fermentazione di partenza.

Il terzo Reattore (R3) presentava una sostanziale differenza rispetto a R1 (assenza di etanolo): come si nota dalla Figura 20, in questo caso il prodotto principale risulta l'acido butirrico (66%) seguito da acetico (19%). È possibile affermare che il processo di Chain Elongation sia avvenuto, anche se solo parzialmente, in quanto non è stato osservato alcun acido di media catena ma una prevalenza sostanziale di acido butirrico. La presenza di un donatore di elettroni, utilizzato solo per questa seconda parte, aumentava di molto le possibilità di allungamento della catena, perché forniva carbonio aggiuntivo, riducendo la competizione tra i substrati.

Delle quattro condizioni investigate, questa risulta essere la migliore, con una produzione massima di acido butirrico pari a 20000 mg COD/L e una produzione di acido acetico di 7000 mg COD/L, dimezzata rispetto al reattore R1, in linea con gli studi di De Groof et al., (2021), Roghair et al., (2018) e Wu et al., (2020). Il quarto Reattore (R4), forniva risultati peggiori rispetto a R3, come del resto atteso, sulla base del minor HRT adottati (i processi di CE solitamente richiedono HRT piuttosto elevati se comparati con processi di FA); è infatti possibile notare come la produzione di acidi sia molto diversificata ma non specifica verso un unico prodotto come nel reattore precedente. Come si nota dalle Figure 21 e 22, l'acido acetico risulta in quantità maggiore rispetto agli altri acidi, con una percentuale di produzione del 52%, arrivando a plateau con un valore di 10000 mg COD/L. La diversificazione nella produzione era rappresentata dalla produzione di acido butirrico (17%) e acido

propionico (10.9%), seguito da acido isovalerico (10.5%). Il fatto che quest'ultimo acido fosse presente era indice di fenomeni di CE quantomeno allo stato embrionale, non a pieno sviluppati a causa del basso HRT (4 d) adottato. I risultati ottenuti, quindi, indicano come la prima parte di sperimentazione dedicata alla CE senza donatore di elettroni sia stata sicuramente non adeguata agli scopi, anche se è stata identificata una condizione altamente favorevole per una produzione altamente selettiva di acido acetico (R1). La presenza di un donatore di elettroni aveva decisamente modificato lo scenario dei risultati; tuttavia, nessuna delle condizioni operative si sono rivelate idonee per la produzione di acidi a media catena (C6-C8). Risultava però degno di nota che in una condizione (R3), poteva essere prodotto un brodo di fermentazione largamente ricco in acido butirrico (66% COD/COD; uno dei VFA a più alto valore di mercato). L'adozione di HRT maggiori rispetto a quelli adoperati avrebbe potuto condurre verso la produzione dei C6-C8, a fronte però di volumetrie reattoristiche maggiormente impattanti, nel caso di scale-up del processo proposto.

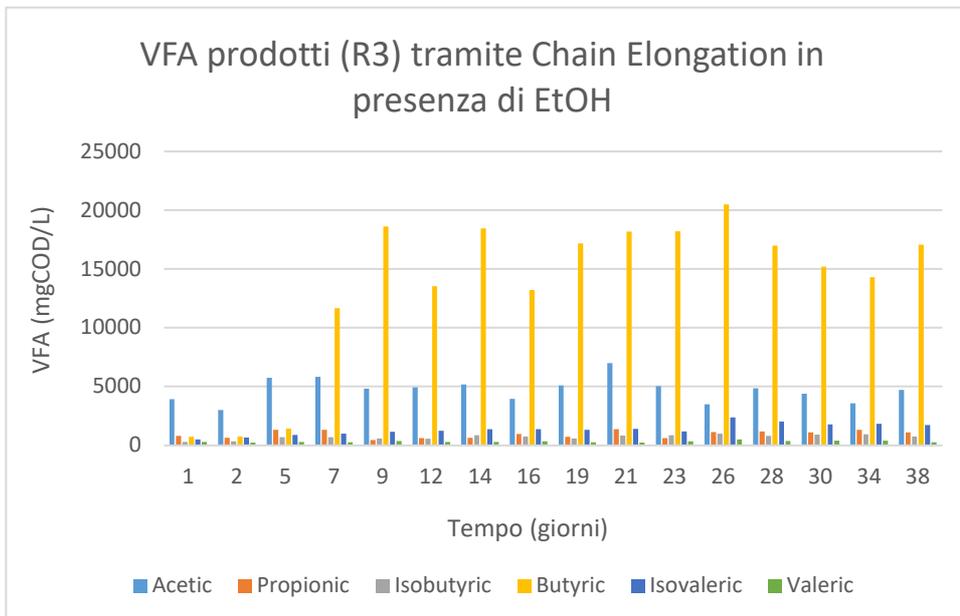


Figura 20: Produzione VFA (R3) tramite CE in presenza di un donatore di e<sup>-</sup> esterno (etanolo)

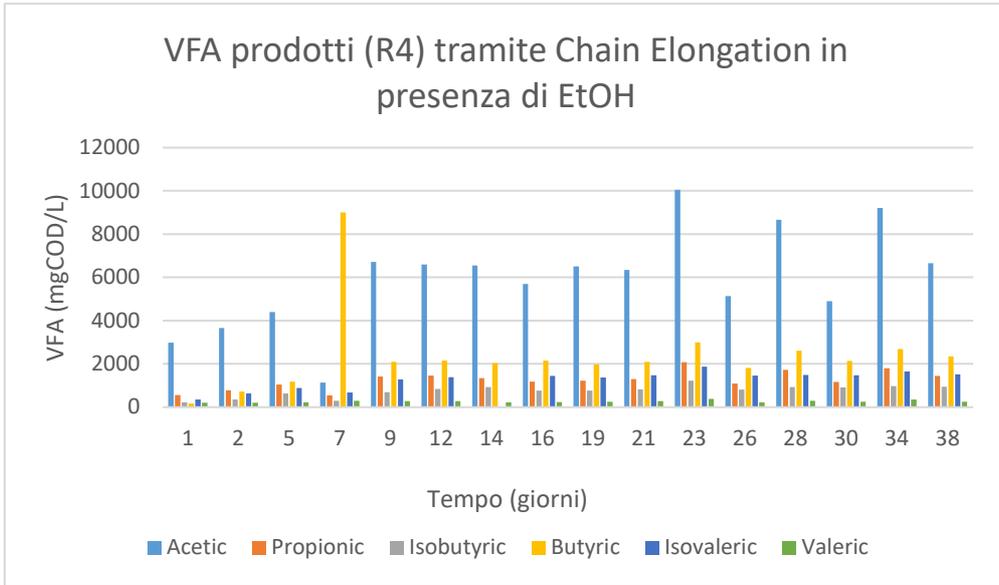


Figura 21: Produzione VFA (R4) tramite CE in presenza di un donatore di e<sup>-</sup> esterno (etanolo)

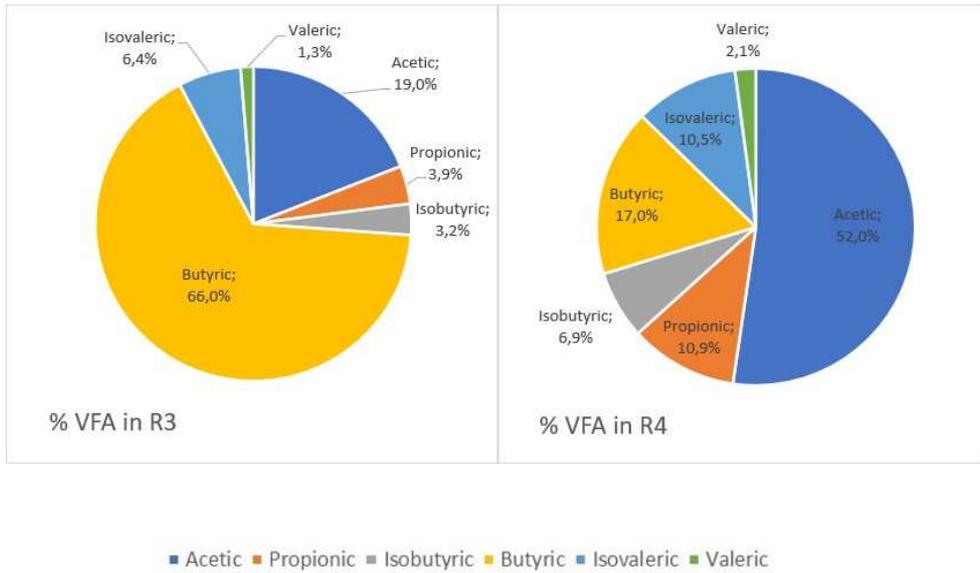


Figura 22: contenuto % di VFA in processi CE in presenza di donatore di e<sup>-</sup> (etanolo)

Per completezza, sia allega in Figura 23 il valore in mg COD/L di Metanolo ed Etanolo ottenuto tramite analisi cromatografica. Ciò è stato fatto poiché la presenza di metanolo ed etanolo nei processi di CE (Bao et al., 2019) specialmente in contesti come fermentazione o digestione anaerobica, è importante per monitorare la dinamica del processo e ottimizzare le condizioni operative (Sarkar et al., 2021).

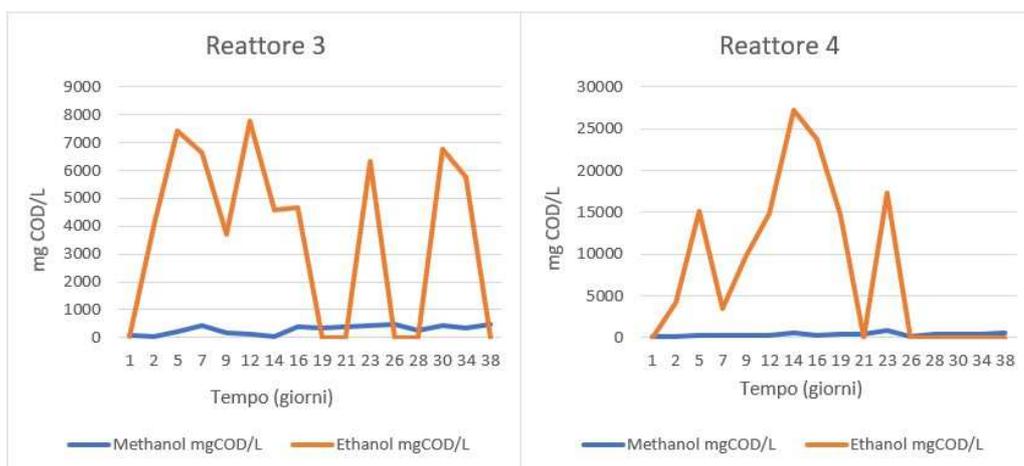


Figura 23: andamento di metanolo e etanolo in R3 e R4 (CE pt.2)

È importante precisare che monitorare la presenza di questi alcoli risulta cruciale per comprendere se il processo risulta in equilibrio sia dal punto di vista del substrato sia per controllare eventuali accumuli indesiderati (Arhin et al., 2023). Come si nota, è presente un elevato contenuto di etanolo rispetto al metanolo, in grado di influenzare positivamente il processo di CE.

Confrontando Figura 21 e 23, per esempio, è facile notare come al diminuire dell'etanolo compaia un picco di acido butirrico, dovuto alla nuova disponibilità di carbonio fornita appunto dal donatore di elettroni. Questo avviene perché la presenza di Etanolo aumenta le possibilità di allungamento della catena.

I grafici riportati, quindi, sono in grado di spiegare la criticità avvenuta nella prima parte del processo biotecnologico di Chain Elongation, nella quale non è stato aggiunto un donatore di elettroni.

Tabella 6: principali parametri di processo e risultati ottenuti nei reattori di CE in presenza ed assenza di un donatore esterno di elettroni

<b>Parte 1</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>Parte 2</b>	<b>R3</b>	<b>R4</b>
<b>HRT (giorni)</b>	8d	4d	<b>HRT (giorni)</b>	8d	4d
<b>Presenza donatore di e-</b>	No	No	<b>Presenza donatore di e-</b>	Si	Si
<b>Acetico (mgCOD<sub>VFA</sub>/L)</b>	14843	10393	<b>Acetico (mgCOD<sub>VFA</sub>/L)</b>	6991	10051
<b>Propionico (mg COD<sub>VFA</sub>/L)</b>	1043	2435	<b>Propionico (mgCOD<sub>VFA</sub>/L)</b>	1370	2075
<b>Butirrico (mg COD<sub>VFA</sub>/L)</b>	269	1122	<b>Butirrico (mgCOD<sub>VFA</sub>/L)</b>	20486	9006
<b>Isobutirrico (mg COD<sub>VFA</sub>/L)</b>	383	900	<b>Isobutirrico (mgCOD<sub>VFA</sub>/L)</b>	998	1229
<b>Valerico (mg COD<sub>VFA</sub>/L)</b>	288	250	<b>Valerico (mgCOD<sub>VFA</sub>/L)</b>	500	385
<b>Isovalerico (mg COD<sub>VFA</sub>/L)</b>	482	445	<b>Isovalerico (mgCOD<sub>VFA</sub>/L)</b>	2369	1864

## 5. Conclusione

I fanghi di conceria sono stati utilizzati in questo studio come fonte di carbonio rinnovabile per la produzione di intermedi metabolici di interesse industriale, gli acidi grassi volatili. Per consentire un miglior utilizzo di tali fanghi da parte dei tipici microorganismi impiegati nei processi fermentativi, tale matrice è stata prima sottoposta a differenti pretrattamenti, per quantificare il loro effetto sulle performances fermentative analizzate.

Tra i 5 pretrattamenti investigati, il pretrattamento termico a 70°C (PR4) si è rivelato il migliore per incrementare le performance legate alla produzione di VFA, nonostante l'assenza di chemicals esterni ( $H_2O_2$ ) che coadiuvassero l'idrolisi della matrice stessa. La fermentazione acidogenica compiuta tramite PR4 ha infatti evidenziato il valore maggiore di VFA totali prodotti, pari a 11243 mgCOD/L, corrispondente ad un rendimento di fermentazione (yield) pari a 0.42 gCOD<sub>VFA</sub>/gVS<sub>0</sub>. Contrariamente alla produzione osservata, i diversi pretrattamenti condotti non hanno inciso sulla percentuale di distribuzione dei singoli VFA; in linea generale, tutti i brodi di fermentazione ottenuti mostravano un'elevata percentuale di acido acetico rispetto agli altri VFA, con un massimo contenuto pari al 59% COD/COD.

Un livello elevato di acido acetico faceva presupporre una certa propensione a valorizzare ulteriormente il brodo di fermentazione tramite processi di Chain Elongation (CE), responsabili della produzione di acidi grassi a media catena, dal valore economico decisamente superiore rispetto ai VFA. Tra le condizioni investigate in questa tesi, è emerso che la presenza di un donatore esterno di elettroni (etanolo) è condizione necessaria per innescare i

meccanismi tipici della CE. Tuttavia, gli HRT investigati (4-8 d) non si sono rivelati sufficientemente alti da favorire la formazione di acidi a catena media. Tuttavia, seppur con un allungamento parziale, è stato possibile ottenere con un HRT di 8 giorni un refluo finale caratterizzato da un contenuto elevato di acido butirrico (pari a circa 20000 mg COD/L; uno dei VFA a più alto valore di mercato), vicino al 70% su base COD rispetto a tutti i VFA presenti. Probabilmente, la scelta di HRT maggiori di 8 giorni potrebbero essere indicati per la produzione di acidi grassi di media catena, a partire dall'acido caproico

D'altra parte, in assenza di un donatore esterno di elettroni, il processo di CE non è risultato tecnicamente fattibile; tuttavia, in condizioni particolarmente idonee (HRT 8 d) è stata ottenuta una produzione quasi selettiva di acido acetico (pari al 90% COD/COD); tale condizione potrebbe di gran lunga semplificare i processi di downstream (ed i relativi costi) necessari alla separazione e purificazione di molecole di interesse dai brodi di fermentazione.

Per concludere, lo studio ha evidenziato il potenziale di un approccio doppio stadio FA+CE nell'ambito del trattamento dei fanghi da conceria, mostrando la possibilità di ottenere prodotti intermedi di interesse per diverse applicazioni. Tali prodotti possono differenziarsi sulla base delle condizioni operative adottate, e quindi sul tipo di adattamento fisiologico della coltura adoperata. Diverse condizioni (HRT maggiori di 8 d) dovranno essere esplorati per consentire un processo di CE idoneo alla formazione di acidi grassi di media catena; inoltre, l'analisi microbiologica potrebbe rappresentare uno strumento utile a comprendere eventuali fenomeni di selezione del consorzio misto fermentante ed eventualmente isolare i ceppi responsabili delle linee metaboliche congeniali all'ottenimento del prodotto ottenuto.



## 6. Bibliografia e Ringraziamenti

- Alibardi, L., & Cossu, R. (2016). Pre-treatment of tannery sludge for sustainable landfilling. *Waste Management*, *52*, 202–211. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.04.008>
- Ambrose, H. W., Chin, C. T. L., Hong, E., Philip, L., Suraishkumar, G. K., Sen, T. K., & Khiadani, M. (2020). Effect of hybrid (microwave-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) feed sludge pretreatment on single and two-stage anaerobic digestion efficiency of real mixed sewage sludge. *Process Safety and Environmental Protection*, *136*, 194–202. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2020.01.032>
- Angenent, L. T., Richter, H., Buckel, W., Spirito, C. M., Steinbusch, K. J. J., Plugge, C. M., Strik, D. P. B. T. B., Grootscholten, T. I. M., Buisman, C. J. N., & Hamelers, H. V. M. (2016). Chain Elongation with Reactor Microbiomes: Open-Culture Biotechnology to Produce Biochemicals. In *Environmental Science and Technology* (Vol. 50, Issue 6, pp. 2796–2810). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b04847>
- Araujo, A. S. F., de Araujo Pereira, A. P., & Mendes, L. W. (2022). Applications of Cr-rich composted tannery sludge in the soil decrease microbial biomass and select specific bacterial groups. In *Environmental Science and Pollution Research* (Vol. 29, Issue 50, pp. 75113–75118). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-22933-w>
- Arhin, S. G., Cesaro, A., Di Capua, F., & Esposito, G. (2023). Acidogenic fermentation of food waste to generate electron acceptors and donors towards medium-chain carboxylic acids

production. *Journal of Environmental Management*, 348, 119379. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2023.119379>

Baffoe, E. E., Otoo, S. L., Kareem, S., & Dankwah, J. R. (2024). Evaluation of initial pH and urea hydrogen peroxide (UHP) co-pretreatment on waste-activated sludge. *Environmental Research*, 246. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2024.118155>

Bao, S., Wang, Q., Zhang, P., Zhang, Q., Wu, Y., Li, F., Tao, X., Wang, S., Nabi, M., & Zhou, Y. (2019). Effect of acid/ethanol ratio on medium chain carboxylate production with different VFAs as the electron acceptor: Insight into carbon balance and microbial community. *Energies*, 12(19). <https://doi.org/10.3390/EN12193720>

Battista, F., Zeni, A., Andreolli, M., Salvetti, E., Rizzioli, F., Lampis, S., & Bolzonella, D. (2024). Treatment of food processing wastes for the production of medium chain fatty acids via chain elongation. *Environmental Technology and Innovation*, 33. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2023.103453>

Candry, P., & Ganigué, R. (2021). Chain elongators, friends, and foes. *Current Opinion in Biotechnology*, 67, 99–110. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2021.01.005>

De Groof, V., Coma, M., Arnot, T., Leak, D. J., & Lanham, A. B. (2021). Selecting fermentation products for food waste valorisation with HRT and OLR as the key operational parameters. *Waste Management*, 127, 80–89. <https://doi.org/10.1016/J.WASMAN.2021.04.023>

Fang, W., Zhang, X., Zhang, P., Wan, J., Guo, H., Ghasimi, D. S. M., Morera, X. C., & Zhang, T. (2020). Overview of key operation factors and strategies for improving fermentative volatile fatty

acid production and product regulation from sewage sludge. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 87, 93–111. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2019.05.027>

Fonseca, Y. A. Da, Silva, N. C. S., De Camargos, A. B., Silva, S. D. Q., Wandurraga, H. J. L., Gurgel, L. V. A., & Baêta, B. E. L. (2021). Influence of hydrothermal pretreatment conditions, typology of anaerobic digestion system, and microbial profile in the production of volatile fatty acids from olive mill solid waste. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(2), 105055. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2021.105055>

Garcia-Aguirre, J., Aymerich, E., González-Mtnez. de Goñi, J., & Esteban-Gutiérrez, M. (2017). Selective VFA production potential from organic waste streams: Assessing temperature and pH influence. *Bioresource Technology*, 244, 1081–1088. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2017.07.187>

Grootscholten, T. I. M., Steinbusch, K. J. J., Hamelers, H. V. M., & Buisman, C. J. N. (2013a). Chain elongation of acetate and ethanol in an upflow anaerobic filter for high rate MCFA production. *Bioresource Technology*, 135, 440–445. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2012.10.165>

Grootscholten, T. I. M., Steinbusch, K. J. J., Hamelers, H. V. M., & Buisman, C. J. N. (2013b). Improving medium chain fatty acid productivity using chain elongation by reducing the hydraulic retention time in an upflow anaerobic filter. *Bioresource Technology*, 136, 735–738. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2013.02.114>

Grootscholten, T. I. M., Strik, D. P. B. T. B., Steinbusch, K. J. J., Buisman, C. J. N., & Hamelers, H. V. M. (2014). Two-stage medium chain fatty acid (MCFA) production from municipal solid

waste and ethanol. *Applied Energy*, 116, 223–229.  
<https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.11.061>

Jankowska, E., Chwialkowska, J., Stodolny, M., & Oleskiewicz-Popiel, P. (2017). Volatile fatty acids production during mixed culture fermentation – The impact of substrate complexity and pH. *Chemical Engineering Journal*, 326, 901–910.  
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.06.021>

Leite, W., Magnus, B. S., Guimarães, L. B., Gottardo, M., & Belli Filho, P. (2017). Feasibility of thermophilic anaerobic processes for treating waste activated sludge under low HRT and intermittent mixing. *Journal of Environmental Management*, 201, 335–344. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2017.06.069>

Leite, W. R. M., Scandola Magnus, B., Moraes, B. A. B. de, Kato, M. T., Florencio, L., Costa, R. H. R. da, & Belli Filho, P. (2023). Mesophilic anaerobic digestion of waste activated sludge in an intermittent mixing reactor: Effect of hydraulic retention time and organic loading rate. *Journal of Environmental Management*, 338. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.117839>

Liang, J., Zhang, P., Zhang, R., Chang, J., Chen, L., Zhang, G., & Wang, A. (2024). Bioconversion of volatile fatty acids from organic wastes to produce high-value products by photosynthetic bacteria: A review. *Environmental Research*, 242. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.117796>

Liu, F., Cheng, W., Xu, J., Wang, M., Wan, T., Ren, J., Li, D., & Xie, Q. (2023). Promoting short-chain fatty acids production from sewage sludge via acidogenic fermentation: Optimized operation factors and iron-based persulfate activation system. *Chemosphere*, 342. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.140148>

- Liu, H., Wang, Y., Zhang, H., Huang, G., Yang, Q., & Wang, Y. (2019). Synchronous detoxification and reduction treatment of tannery sludge using Cr (VI) resistant bacterial strains. *Science of the Total Environment*, *687*, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.093>
- Liu, J., Jia, R., Wang, Y., Wei, Y., Zhang, J., Wang, R., & Cai, X. (2017). Does residual H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> result in inhibitory effect on enhanced anaerobic digestion of sludge pretreated by microwave-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pretreatment process? *Environmental Science and Pollution Research*, *24*(10), 9016–9025. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5704-z>
- Martines, A. M., Nogueira, M. A., Santos, C. A., Nakatani, A. S., Andrade, C. A., Coscione, A. R., Cantarella, H., Sousa, J. P., & Cardoso, E. J. B. N. (2010). Ammonia volatilization in soil treated with tannery sludge. *Bioresource Technology*, *101*(12), 4690–4696. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.104>
- Maspolim, Y., Zhou, Y., Guo, C., Xiao, K., & Ng, W. J. (2015). The effect of pH on solubilization of organic matter and microbial community structures in sludge fermentation. *Bioresource Technology*, *190*, 289–298. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.087>
- Mpofu, A. B., Kibangou, V. A., Kaira, W. M., Oyekola, O. O., & Welz, P. J. (2021). Anaerobic co-digestion of tannery and slaughterhouse wastewater for solids reduction and resource recovery: Effect of sulfate concentration and inoculum to substrate ratio. *Energies*, *14*(9). <https://doi.org/10.3390/en14092491>
- Mpofu, A. B., Welz, P. J., & Oyekola, O. O. (2020). Anaerobic Digestion of Secondary Tannery Sludge: Optimisation of Initial

pH and Temperature and Evaluation of Kinetics. *Waste and Biomass Valorization*, 11(3), 873–885. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-00564-y>

Presti, D., Cosenza, A., Capri, F. C., Gallo, G., Alduina, R., & Mannina, G. (2021). Influence of volatile solids and pH for the production of volatile fatty acids: Batch fermentation tests using sewage sludge. *Bioresource Technology*, 342, 125853. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2021.125853>

Ramos-Suarez, M., Zhang, Y., & Outram, V. (2021). Current perspectives on acidogenic fermentation to produce volatile fatty acids from waste. In *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* (Vol. 20, Issue 2, pp. 439–478). Springer Science and Business Media B.V. <https://doi.org/10.1007/s11157-021-09566-0>

Roghair, M., Liu, Y., Strik, D. P. B. T. B., Weusthuis, R. A., Bruins, M. E., & Buisman, C. J. N. (2018). Development of an effective chain elongation process from acidified food waste and ethanol into n-Caproate. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6(APR). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00050>

Saira, G. C., & Shanthakumar, S. (2023). Zero waste discharge in tannery industries – An achievable reality? A recent review. *Journal of Environmental Management*, 335, 117508. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2023.117508>

Sarkar, O., Rova, U., Christakopoulos, P., & Matsakas, L. (2021). Ethanol addition promotes elongation of short-chain fatty acids to medium-chain fatty acids using brewery spent grains as substrate. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(5), 105990. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2021.105990>

- Sawalha, H., Al-Jabari, M., Elhamouz, A., Abusafa, A., & Rene, E. R. (2020). Tannery wastewater treatment and resource recovery options. *Waste Biorefinery: Integrating Biorefineries for Waste Valorisation*, 679–705. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818228-4.00025-3>
- Scotto di Perta, E., Cesaro, A., Pindozi, S., Frunzo, L., Esposito, G., & Papirio, S. (2022). Assessment of Hydrogen and Volatile Fatty Acid Production from Fruit and Vegetable Waste: A Case Study of Mediterranean Markets. *Energies*, 15(14). <https://doi.org/10.3390/EN15145032>
- Seedorf, H., Fricke, W. F., Veith, B., Brü Ggemann †, H., Liesegang, H., Strittmatter, A., Miethke, M., Buckel, W., Hinderberger, J., Li, F., Hagemeier, C., Thauer, R. K., & Gottschalk, G. (2007). *The genome of Clostridium kluyveri, a strict anaerobe with unique metabolic features*. [www.pnas.org/cgi/content/full/](http://www.pnas.org/cgi/content/full/)
- Shrestha, S., Pandey, R., Aryal, N., & Lohani, S. P. (2023). Recent advances in co-digestion conjugates for anaerobic digestion of food waste. *Journal of Environmental Management*, 345, 118785. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2023.118785>
- Spirito, C. M., Richter, H., Rabaey, K., Stams, A. J. M., & Angenent, L. T. (2014). Chain elongation in anaerobic reactor microbiomes to recover resources from waste. *Current Opinion in Biotechnology*, 27, 115–122. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2014.01.003>
- THE EUROPEAN LEATHER INDUSTRY*. (n.d.).
- Tiwari, A., & Sahu, O. (2017). Treatment of food-agro (sugar) industry wastewater with copper metal and salt: Chemical oxidation and electro-oxidation combined study in batch mode.

*Water Resources and Industry*, 17, 19–25.  
<https://doi.org/10.1016/j.wri.2016.12.001>

Valentino, F., Moretto, G., Gottardo, M., Pavan, P., Bolzonella, D., & Majone, M. (2019). Novel routes for urban bio-waste management: A combined acidic fermentation and anaerobic digestion process for platform chemicals and biogas production. *Journal of Cleaner Production*, 220, 368–375.  
<https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2019.02.102>

Valentino, F., Munarin, G., Biasiolo, M., Cavinato, C., Bolzonella, D., & Pavan, P. (2021). Enhancing volatile fatty acids (VFA) production from food waste in a two-phases pilot-scale anaerobic digestion process. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(5), 106062.  
<https://doi.org/10.1016/J.JECE.2021.106062>

Wang, M., Zhao, Z., & Zhang, Y. (2019). Disposal of Fenton sludge with anaerobic digestion and the roles of humic acids involved in Fenton sludge. *Water Research*, 163, 114900.  
<https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2019.114900>

Wu, Q., Feng, X., Guo, W., Bao, X., & Ren, N. (2020). Long-term medium chain carboxylic acids production from liquor-making wastewater: Parameters optimization and toxicity mitigation. *Chemical Engineering Journal*, 388.  
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.124218>

Zhai, S., Li, M., Xiong, Y., Wang, D., & Fu, S. (2020). Dual resource utilization for tannery sludge: Effects of sludge biochars (BCs) on volatile fatty acids (VFAs) production from sludge anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 316.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123903>

## Ringraziamenti

Ringrazio i miei genitori, i miei amici e tutti coloro che mi son stati vicini in questi anni; devo ammettere che è stato un percorso ricco di alti e bassi, che mi ha permesso di crescere e capire meglio cosa voglia dire vivere, molto semplicemente. Pur essendo una tappa di vita intermedia, l'università mi ha insegnato a non mollare, anche se spesso sembra la cosa più semplice da fare. Guarda sempre avanti!

Grazie a tutti!

