

POLITECNICO DI TORINO

**Corso di Laurea Magistrale
in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili**



**Politecnico
di Torino**

Tesi di Laurea Magistrale

Conversione della paglia di grano in bioenergia

Relatrici

Prof.ssa Francesca Demichelis

Dott.ssa Melania Fiore

Prof.ssa Tonia Tommasi

Candidato

Valentina D'Orazi

Marzo 2026

Sommario

1.	Introduzione.....	8
2.	Digestione anaerobica	10
2.1	Stadi del processo	13
2.2	Ottimizzazione della digestione anaerobica	16
2.2.1	Pretrattamenti della biomassa.....	16
2.2.1.1	Trattamenti Fisici.....	16
2.2.1.2	Trattamenti chimici	17
2.2.1.3	Trattamenti termici	19
2.2.1.4	Trattamenti biologici	22
2.2.2	La co-digestione anaerobica	22
2.2.3	Aggiunta di biochar	23
2.3	Digestione della paglia di grano	24
3.	Materiali e metodi.....	27
3.1	Materiali e reagenti.....	27
3.2	Metodi.....	28
3.2.1	Pretrattamenti della paglia.....	28
3.2.2	Misura del COD	29
3.2.3	Design of experiments.....	30
3.2.4	Set-up digestione anaerobica.....	30
3.2.5	Condizioni generali	32
3.2.6	Prima campagna sperimentale: scelta del rapporto ottimale paglia:letame (WS:CM). 34	
3.2.7	Seconda campagna sperimentale: effetto dei pretrattamenti chimici sulla paglia.....	36
3.2.7.1	Effetto pretrattamenti chimici sul rapporto 100:0	37
3.2.7.2	Effetto pretrattamenti chimici sul rapporto 90:10	38
3.2.8	Terza campagna sperimentale: effetto del biochar sulla digestione.....	40
3.2.8.1	Effetto aggiunta biochar sul rapporto 100:0.....	41
3.2.8.2	Effetto aggiunta BC sul rapporto 90:10.....	43
3.3	Tecniche analitiche per la caratterizzazione del biogas	45
3.3.1	Gascromatografia	45
3.3.2	Produzione di biogas	47
3.4	Caratterizzazione dei substrati iniziali e digestati finali.....	48
3.4.1	pH.....	48
3.4.2	Analisi elementare CHNS(O).....	49
3.4.3	Solidi totali, volatili e ceneri	49
3.5	Caratterizzazione dei digestati per applicazioni agronomiche	52
3.6	Test di germinazione	53
4.	Risultati e discussione	54
4.1	Composizione delle matrici iniziali.....	54
4.2	Pretrattamenti della paglia.....	58
4.3	Prima Digestione Anaerobica.....	61
4.3.1	Produzione e composizione del biogas.....	61
4.3.2	Proprietà digestato	66

4.4	Seconda Digestione Anaerobica.....	69
4.4.1	Produzione e composizione del biogas.....	69
4.4.1.1	Effetto trattamenti chimici sulla digestione anaerobica della paglia.....	69
4.4.1.2	Effetto trattamenti chimici sulla co-digestione di paglia e letame in rapporto 90:10 ..	74
4.4.2	Proprietà del digestato	77
4.4.2.1	Effetto trattamenti chimici sulla digestione anaerobica della paglia.....	77
4.4.2.2	Effetto trattamenti chimici sulla co-digestione di paglia e letame in rapporto 90:10 ..	80
4.5	Terza Digestione Anaerobica	83
4.5.1	Produzione e composizione del biogas.....	83
4.5.1.1	Effetto dell'aggiunta di biochar sulla digestione della paglia	83
4.5.1.2	Effetto dell'aggiunta di biochar sulla co-digestione di paglia e letame in rapporto 90:10.....	86
4.5.2	Proprietà del digestato	89
4.5.2.1	Effetto dell'aggiunta di biochar sulla digestione della paglia	89
4.5.2.2	Effetto dell'aggiunta di biochar sulla co-digestione di paglia e letame in rapporto 90:10.....	92
4.6	Caratterizzazione dei digestati migliori per applicazioni agronomiche	95
4.7	Test di germinazione	97
5.	Conclusioni.....	99
6.	Bibliografia.....	101
	Ringraziamenti	108

Indice delle tabelle

Tabella 1 - Valori operativi dei sistemi di trattamento del rifiuto organico nel processo di DA [5]	11
Tabella 2 - Classificazione digestori anaerobici.....	12
Tabella 3 - Pretrattamenti chimici effettuati sulla WS.....	29
Tabella 4 - Schema delle tre campagne sperimentali	31
Tabella 5 – Configurazioni della DA1	34
Tabella 6 - Quantitativi teorici DA1.....	34
Tabella 7 - VS teorici DA1.....	35
Tabella 8 - Quantitativi effettivi DA1	35
Tabella 9 - VS effettivi DA1	36
Tabella 10 - Configurazioni della DA2.....	37
Tabella 11 - Quantitativi teorici DA2 (100:0).....	37
Tabella 12 - VS teorici DA2 (100:0).....	37
Tabella 13 - Quantitativi effettivi DA2 (100:0)	38
Tabella 14 - VS effettivi DA2 (100:0)	38
Tabella 15 - Quantitativi teorici DA2 (90:10).....	38
Tabella 16 - VS teorici DA2 (90:10).....	39
Tabella 17 - Quantitativi effettivi DA2 (90:10)	39
Tabella 18 - VS effettivi DA2 (90:10)	39
Tabella 19 - Configurazioni della DA3	40
Tabella 20 - Quantitativi teorici DA3 (100:0).....	41
Tabella 21 - VS teorici DA3 (100:0).....	41
Tabella 22 – Quantitativi effettivi DA3 (100:0).....	42
Tabella 23 - VS effettivi DA3 (100:0)	42
Tabella 24 - Quantitativi teorici DA3 (90:10).....	43
Tabella 25 - VS teorici DA3 (90:10).....	43
Tabella 26 - Quantitativi effettivi DA3 (90:10)	44
Tabella 27 - VS effettivi DA3 (90:10)	44
Tabella 28 - Configurazioni per la caratterizzazione dei digestati.....	52
Tabella 29 - kit chimici Hach Company per il chiarificato dei digestati migliori.....	52
Tabella 30 - Composizione matrici della DA1	54
Tabella 31 - Analisi elementare sulle matrici della DA1	55
Tabella 32 - Composizione matrici delle DA2 e DA3	55
Tabella 33 - Analisi elementare matrici delle DA2 e DA3	56
Tabella 34 - Specifiche del BC commerciale (UK Biochar Research Centre [63]).....	57
Tabella 35 - Specifiche di tossicità del BC commerciale (<i>UK Biochar Research Centre [63]</i>)	57
Tabella 36 -Valori di COD, Disintegration Rate (DR_{COD}) e pH per ciascun pretrattamento. 58	
Tabella 37 – Analisi elementare dei substrati alimentati nella DA1	62
Tabella 38 – Rese di biogas e metano della DA1.....	63
Tabella 39 - Solidi Totali e Volatili dei substrati iniziali costituenti la DA1	64
Tabella 40 - pH iniziali, intermedi e finali dei digestori della DA1	66

Tabella 41 - TS e VS/TS digestati DA1	68
Tabella 42 - Analisi elementare digestato finale (DA1).....	69
Tabella 43 - Rese di biogas e metano della DA2 (100:0)	71
Tabella 44 - Rese di biogas e metano della co-DA2 (90:10)	75
Tabella 45 - TS e VS/TS dei substrati alimentati ad inizio co-DA2 (90:10)	76
Tabella 46 - Analisi elementare dei substrati di inizio co-DA2 (90:10).....	76
Tabella 47 - pH iniziali, intermedi (pre e post-acidificazione) e finali dei digestati della DA2 100:0.....	78
Tabella 48 - Acidificazione pH DA2 (100:0) con aggiunta di HCl 5M.....	78
Tabella 49 - TS e VS/TS digestati DA2 (100:0)	79
Tabella 50 - Analisi elementare digestati finali della DA2 (100:0).....	80
Tabella 51 - pH iniziali, intermedi e finali dei digestati della co-DA2 90:10.....	80
Tabella 52 - Acidificazione pH co-DA2 (90:10) con aggiunta di HCl 5M.....	80
Tabella 53 - TS e VS/TS digestati di fine co-DA2 (90:10).....	82
Tabella 54 - Analisi elementare digestati finali della co-DA2 (90:10).....	82
Tabella 55 - Rese di biogas e metano della DA3 (100:0)	85
Tabella 56 - Rese di biogas e metano della co-DA3 (90:10)	88
Tabella 57 - pH iniziali, intermedi (pre e post-acidificazione) e finali dei digestati della DA3 100:0.....	89
Tabella 58 - Acidificazione pH DA3 (100:0) con aggiunta di HCl 5M.....	90
Tabella 59 - TS e VS/TS digestati DA3 (100:0)	91
Tabella 60 - Analisi elementare digestati finali della DA3 (100:0)	92
Tabella 61 - pH iniziali, intermedi e finali dei digestati della co-DA3 90:10.....	92
Tabella 62 - Acidificazione pH co-DA3 (90:10) con aggiunta di HCl 5M.....	93
Tabella 63 - TS e VS/TS digestati co-DA3 (90:10)	94
Tabella 64 - Analisi elementare digestati finali della co-DA3 (90:10).....	94
Tabella 65 - Analisi chimica eseguita sui digestati delle migliori configurazioni	95
Tabella 66 - Test di germinazione sui digestati selezionati	97
Tabella 67 - Indice di germinazione dei digestati ottimali	98

Indice delle figure

Figura 1 - Abstract grafico	9
Figura 2 - Schema generale della DA [9].....	13
Figura 3 - Pretrattamenti della biomassa.....	16
Figura 4 – Vantaggi e svantaggi della co-digestione, tratto da [39]	23
Figura 5 -Impiego di biochar nel processo di co-DA di paglia di mais e letame bovino [41] 24	
Figura 6 - Struttura lignocellulosica della WS [21]	25
Figura 7 - Schema di processo della DA di WS [21].....	26
Figura 8 - Configurazione reattoristica di laboratorio.....	32
Figura 9 - Vasca d'incubazione mesofila	33
Figura 10 - Schema generico funzionamento di un GC [52]	46
Figura 11 - INFICON micro-GC Fusion®.....	46
Figura 12 - Chiarificato liquido di WS_H2O2_4 per test di germinazione	53
Figura 13 - Capsule Petri per il test di germinazione.....	53
Figura 14 - COD misurato a seguito dei pretrattamenti sulla WS	59
Figura 15 – D.o.E. con due parametri di input (tempo, solvente).....	60
Figura 16 – D.o.E. con tre parametri di input (tempo, solvente e concentrazione)	60
Figura 17 - Produzione cumulata di biogas della DA1	61
Figura 18 - Produzione cumulata di metano della DA1.....	62
Figura 19 - Composizione del biogas di inizio, metà e fine prova (DA1).....	66
Figura 20 – pH digestati DA1	67
Figura 21 - Produzione cumulata di biogas della DA2 (100:0)	70
Figura 22 - Produzione cumulata di metano della DA2 (100:0).....	70
Figura 23 - Composizione del biogas di inizio, metà e fine prova (DA2 100:0).....	73
Figura 24 - Produzione cumulata di biogas della co-DA2 (90:10)	74
Figura 25 - Produzione cumulata di metano della co-DA2 (90:10).....	74
Figura 26 - Composizione del biogas di inizio, metà e fine prova (co-DA2 90:10).....	77
Figura 27 - pH DA2 100:0	79
Figura 28 - pH co-DA2 90:10	81
Figura 29 - Produzione cumulata di biogas della DA3 (100:0)	83
Figura 30 - Produzione cumulata di biogas della DA3 (100:0)	84
Figura 31 Composizione del biogas di inizio, metà e fine prova (DA3 100:0)	85
Figura 32 - Produzione cumulata di biogas della co-DA3 (90:10).....	86
Figura 33 - Produzione cumulata di metano della co-DA3 (90:10).....	86
Figura 34 - Composizione del biogas di inizio, metà e fine prova (co-DA3 90:10).....	89
Figura 35 - pH DA3 100:0	91
Figura 36 - pH co-DA3 90:10	93

1. Introduzione

Nell'ultimo secolo, dalla Rivoluzione industriale in poi, l'avvento della produzione di massa ha favorito la diffusione di un modello economico lineare, basato sulla concezione secondo cui la crescita economica e l'utilizzo di risorse fossero strettamente collegate tra loro. Data la sua semplicità l'economia del "Take-Make-Dispose" si è affermata in breve tempo a livello globale, consentendo un aumento del benessere materiale e sostenendo l'evoluzione tecnologica.

A seguito dell'aumento demografico, dei livelli di consumo e dell'intensificazione dei processi produttivi, le criticità di tale modello sono parse sempre più evidenti.

L'utilizzo smodato di risorse non rinnovabili ne comporta il depauperamento ambientale, data l'asincronia tra il tempo di rigenerazione naturale e quello di estrazione. Si tratta di un fenomeno insostenibile, che compromette il capitale naturale del pianeta con fenomeni di deforestazione, erosione del suolo e perdita di biodiversità. Se si dovesse continuare all'attuale ritmo, ci troveremmo ad aver bisogno di due pianeti Terra entro il 2050.

Per far fronte a questo sviluppo insostenibile nel 1966 Kenneth E. Boulding presentò un articolo intitolato "*The Economics of the Coming Spaceship Earth*", che contribuì all'adozione di un nuovo modello economico, basato sul disaccoppiamento (o *decoupling*) tra la crescita economica e l'estrazione di risorse. Nasce così il modello di economia circolare, pensato per ridurre al minimo gli sprechi, massimizzando il riutilizzo di risorse ed estendendo il ciclo vita dei prodotti. Si passa dall'approccio lineare del cosiddetto "Take-Make-Dispose", dove i prodotti erano progettati per avere una durata limitata, ad uno chiuso e rigenerativo, volto a recuperare, riciclare e riutilizzare gli scarti. Soprattutto negli ultimi anni si sta cercando di sviluppare delle normative in grado di indirizzare le aziende e i paesi verso uno sviluppo sostenibile. A marzo 2020, il Parlamento europeo ha adottato il piano d'azione per l'economia circolare (CEAP) contenente le linee guida da adottare per una crescita sostenibile. Il raggiungimento della *Circular Economy* comporta numerosi vantaggi: riduzione della pressione sull'ambiente, maggior disponibilità di materie prime, aumento della competitività per le aziende, crescita economica ed incremento dell'occupazione. In merito a quest'ultima, è stato stimato che solo nell'Unione Europea entro il 2030 si aggiungerebbero fino a 700.000 posti di lavoro [1].

I principi di economia circolare sono stati pensati per essere applicati a qualunque settore, dall'ambito tecnologico industriale a quello alimentare. Quest'ultimo rappresenta uno dei comparti produttivi responsabili di ingenti quantitativi di rifiuti: secondo l'Eurostat nel 2022 sono state generate nell'UE più di 59.2 milioni di tonnellate di scarti alimentari. Di questi il 46% è stato prodotto dalla filiera agroalimentare, mentre la restante parte è di origine domestica [2]. I cambiamenti climatici e l'aumento demografico rendono estremamente difficile l'approvvigionamento alimentare e ciò fa emergere sempre più il bisogno di adottare strategie anti-spreco.

Il grano è una delle colture più abbondanti a livello globale, oltre 220 milioni di ettari sono dedicati a questo alimento [3]. Il sottoprodotto che ne deriva è la paglia di grano, una materia prima composta prevalentemente da cellulosa, emicellulosa e lignina [4]. È un'importante riserva di carbonio, il cui impiego può spaziare in diversi settori. In agricoltura viene utilizzata come materiale da pacciamatura o miscelata con altre sostanze quali letame e rifiuti organici

per generare compost. In ambito zootecnico funge da lettiera per animali o foraggio per bovini e ruminanti. Nell'ottica edile e della bioedilizia viene impiegata tal quale come isolante termico, acustico o miscelata con argilla per creare intonaci sostenibili. Può essere infine valorizzata energeticamente attraverso combustione diretta, pirolisi o digestione anaerobica.

L'obiettivo di questa tesi è stato quello di valorizzare la paglia di grano mediante processo di digestione anaerobica. Il lavoro si colloca all'interno di un contesto di ricerca, volto a promuovere i principi di economia circolare. Attraverso il riutilizzo di questo scarto lignocellulosico sono state indagate le condizioni ottimali di digestione, che ne massimizzassero le rese di biogas e biometano. Questa ricerca è suddivisa in tre diverse campagne sperimentali (Figura 1), denominate all'interno della trattazione come DA1, DA2 e DA3. Ciascuna di esse alimenta paglia di grano (WS) mista a letame bovino (CM) in reattori batch mesofili. Nel primo test è stato indagato il rapporto ottimale WS:CM che massimizzasse la produzione di CH₄. Una volta trovata la suddetta proporzione, attraverso la seconda e la terza digestione sono stati indagati separatamente l'effetto dei pretrattamenti chimici sulla WS e l'aggiunta di biochar sul substrato di partenza.

In tutte le prove il biogas è stato analizzato qualitativamente e quantitativamente, mentre il digestato è stato caratterizzato attraverso analisi fisico-chimiche, che nel migliore dei casi ne valutassero la fitotossicità.

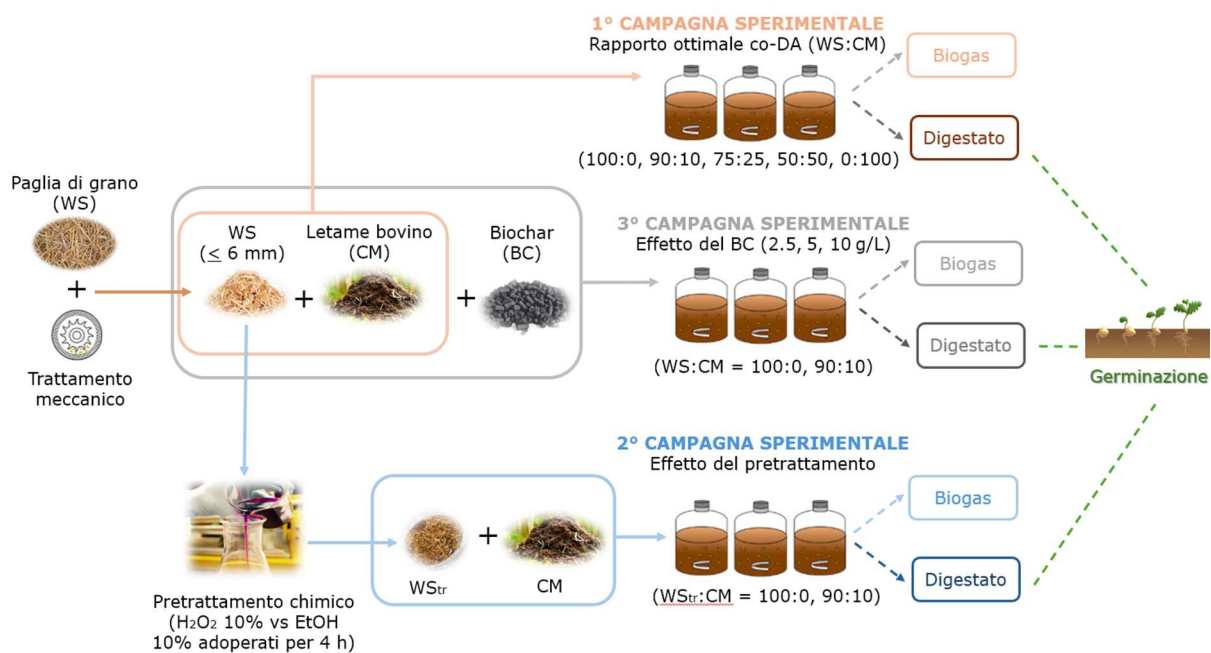


Figura 1 - Abstract grafico

2. Digestione anaerobica

La digestione anaerobica (DA) è un processo bio-chimico esotermico di degradazione della sostanza organica, effettuato in assenza di ossigeno molecolare (anaerobiosi).

A seguito della degradazione si ottengono due prodotti distinti: il biogas e il digestato.

Il biogas è una miscela costituita prevalentemente da anidride carbonica (CO_2) e metano (CH_4), che rappresenta il recupero energetico di processo. In base al tipo di sostanza digerita e alle condizioni operative, le percentuali di CH_4 possono variare tra 50% e 80% circa [5].

Dal punto di vista materico, il rifiuto di partenza viene stabilizzato e convertito in digestato: un residuo organico ricco di nutrienti (quali azoto, fosforo e potassio) che viene spesso impiegato come fertilizzante agricolo.

A seconda dell'intervallo di temperatura microbica, la DA può essere effettuata in condizioni psicrofile ($< 20\text{ }^\circ\text{C}$, meno utilizzata), mesofile ($25\text{-}45\text{ }^\circ\text{C}$ con *range* ottimali di $30\text{-}35\text{ }^\circ\text{C}$) e termofile ($45\text{-}70\text{ }^\circ\text{C}$, comunemente tra 49 e $57\text{ }^\circ\text{C}$) [6]. Al variare della temperatura si modificano parametri come cinetica di reazione, velocità di degradazione organica, tempo di permanenza e quantitativi di biogas prodotto. I regimi più caldi offrono generalmente prestazioni superiori, con tempi di permanenza minori e rese di biogas più elevate, dovute ad un'efficace riduzione della materia organica e dei Solidi Sospesi Volatili (VSS). Nonostante tali vantaggi, i costi energetici maggiori e lo sviluppo di gradienti termici indesiderati, rendono i digestori mesofili la scelta più conveniente a livello industriale. In uno studio di *Kasinath et al.* è stato stimato che oltre il 90% dei biodigestori in tutto il mondo, opera in condizioni mesofile [6].

Assieme alla temperatura, i parametri chiave di cui tener conto sono molteplici: pH, rapporto carbonio:azoto del substrato (C/N), contenuto di solidi, carico organico, tempo di ritenzione idraulica, miscelazione e sostanze inibitrici.

La regolazione del pH è fondamentale per ottimizzare l'attività delle comunità microbiche operanti nelle diverse fasi di processo. Idrolisi e acidogenesi, ad esempio, necessitano di un ambiente leggermente acido, compreso tra 5.5 e 6.5, che permetta alla materia organica di scomporsi in molecole più semplici. Le ultime due fasi, acetogenesi e metanogenesi, richiedono invece un pH neutro, compreso tra 7-7.5, che consenta ai batteri metanogeni di convertire gli acidi grassi volatili (VFA, *Volatile Fatty Acids*) in metano [7].

Il rapporto C/N misura la quantità di nutrienti biodisponibili ai microrganismi. Dalla degradazione del substrato i batteri assimilano il carbonio e lo convertono in energia, mentre l'azoto accelera i processi metabolici favorendo la crescita di popolazione.

La velocità di assimilazione dei due elementi è sbilanciata verso il carbonio, consumato circa 25-30 volte più velocemente, per tale ragione, il valore ottimale del rapporto C/N necessario per un'elevata resa di processo, rientra in un intervallo intorno a 20-30 [8]. Un rapporto che esula dal *range* per difetto, dovuto ad un'eccessivo quantitativo di azoto, può instaurare un ambiente alcalino ed inibire i processi batterici e la produzione di biometano. Al contrario, se C/N è troppo elevato, la crescita microbica rallenta e di conseguenza diminuiscono le rese di biogas. A seconda delle sostanze organiche alimentate e del contenuto di solidi immessi, il processo è classificato in tre categorie: umido (DA *wet*, caratterizzata da una frazione solida minore del 10%), semi-secco (*semi-dry*, 10-20%) e secco (*dry*, superiore al 20%) [9].

Quanto più è bassa la percentuale di solidi (es. reflui zootecnici, fluidi e fanghi di depurazione), tanto più frequentemente bisognerà miscelare il digestore. In genere per matrici molto liquide si adoperano miscelatori in continuo che facilitano la risalita di biogas. Quando la DA è a secco, è possibile movimentare il processo meno frequentemente, dal momento che la ritenzione di biogas del substrato è minore. In entrambi i casi è importante miscelare periodicamente il digestore, al fine di equilibrare i nutrienti ed evitare zone di stagnazione che possano alterare l'ambiente microbico e la distribuzione di nutrienti. È importante sottolineare che la distribuzione omogenea di sostanze nel reattore è indice di un *mass transfer* più efficace.

I criteri di dimensionamento dei digestori devono tener conto di due parametri ulteriori: carico organico (OLR) e tempo di residenza idraulico (HRT). Il primo, dall'acronimo inglese "*Organic Loading Rate*", è definito come la quantità di sostanza organica secca giornaliera, immessa nel reattore per unità di volume ($\text{kg}_{\text{vs}}/\text{m}^3 \text{ d}$). Per gli impianti operanti con scarti agricoli e zootecnici, tale valore oscilla tra i 3.5 e 4.5 kg di sostanza secca per m^3 di fermentazione, a seconda che si lavori in mesofilia o termofilia [10]. Il tempo di ritenzione idraulica ("*Hydraulic Retention Time*", HRT) invece, è un parametro di *scale-up* per processi in continuo o di grandi dimensioni e definisce il periodo in cui il materiale rimane nel digestore, favorendo la crescita della popolazione e la conversione dei substrati in biogas. HRT è fortemente condizionato dalla tipologia di substrato e dalle condizioni operative, in particolare frazione di solidi e temperatura. Nei reattori mesofili, ad esempio, HRT rientra in un intervallo di 14-40 giorni mentre per i digestori termofili è di 14-20 giorni [11].

In Tabella 1, si riportano i parametri operativi tipici degli impianti di trattamento dei rifiuti organici derivanti da raccolta differenziata.

Tabella 1 - Valori operativi dei sistemi di trattamento del rifiuto organico nel processo di DA [5]

Parametri di processo	Unità di misura	DA wet	DA semi-dry	DA dry
Solidi nel rifiuto trattato	[% TS]	<10	10-20	20-40
Carico organico (OLR)	[$\text{kg}_{\text{vs}}/\text{m}^3 \text{ d}$]	2-6	8-12 (mesofilia) 8-18 (termofilia)	8-10
Tempo di ritenzione idraulica (HRT)	[d]	10-30	10-15	25-30

I digestori anaerobici vengono in genere classificati in base al tipo di processo, alla temperatura operativa ed alle caratteristiche del substrato da degradare. Sono in genere utilizzati per il trattamento dei fanghi di depurazione, scarti agricoli, reflui zootecnici e FORSU (acronimo di "*Frazione Organica dei Rifiuti Solidi Urbani*").

Prendendo a modello il lavoro svolto da *Yan & Salman* [12] si riassumono in Tabella 2 i vantaggi e gli svantaggi dei suddetti impianti.

Tabella 2 - Classificazione digestori anaerobici

Classificazione	Tipo	Condizioni operative	Pros	Cons
Temperatura	Psicrofili	< 20 °C	Minori costi energetici	Scarsa velocità di produzione del biogas Alte concentrazioni di patogeni
	Mesofili	25-45 °C	Funzionamento stabile	Velocità di produzione del biogas minore
			Minori costi di manutenzione	Alte concentrazioni di patogeni
	Termofili	45-70 °C	Produzione di biogas veloce	Costi energetici elevati
			Minor concentrazione di patogeni	Minor controllo termico Manutenzione costante
	Materia prima	Wet	<10% TS	Costi d'investimento e manutenzione minori
Flessibilità elevata				Mixing intensivo in continuo con costi maggiori
Semi-dry		10-20% TS	Massima flessibilità	Alti costi di gestione
			Alti rendimenti di biogas	Possibile presenza di odori sgradevoli
			Possibilità di automazione completa	
Dry		>20% TS	Velocità di produzione del biogas elevata	Rese di metano inferiori
	Minori costi di manutenzione		Impiego di reattori batch	
	Maggior tolleranza di sostanze contaminanti			
Processo	Continuo	Alimentazione costante e scarico periodico	Facilità di costruzione	Minore velocità di produzione del biogas
			Volumi maggiori di biomassa trattata	
Processo	Batch	Alimentazione e scarico a ciclo chiuso	Costi minori	Condizioni wet
			Velocità di produzione del biogas maggiore e costante	

2.1 Stadi del processo

La DA della materia organica è un processo complesso che coinvolge ceppi batterici differenti in associazione sintropica. Attraverso una serie di reazioni simultanee, catalizzate da microrganismi, i composti modificano il loro stato di ossidazione fino ad essere convertiti prevalentemente in biometano (CH_4) e anidride carbonica (CO_2).

La degradazione avviene in quattro fasi, governate da condizioni di pH differenti (Figura 2).

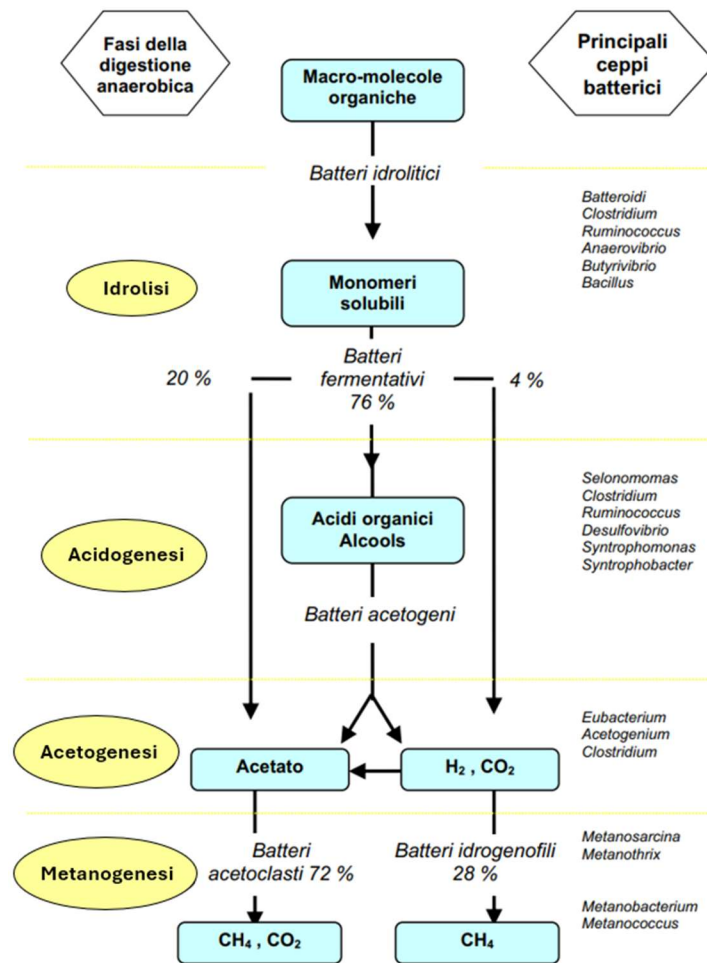
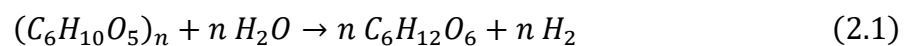
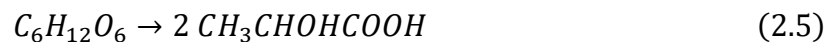
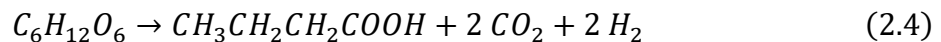
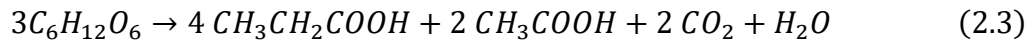
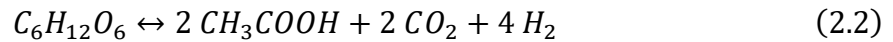


Figura 2 - Schema generale della DA [9]

Il primo *step* del processo è chiamato idrolisi. La maggior parte dei residui organici è costituita da molecole complesse (polimeri) che devono essere degradate in strutture più semplici, per poter essere assimilate dai microrganismi. L'idrolisi è generalmente la fase limitante dell'intero processo, svolta da enzimi extracellulari (cellulasi, proteasi, lipasi, etc.), secreti dai batteri idrolitici. In questo stadio i composti organici insolubili vengono scissi in sostanze organiche solubili: le proteine sono idrolizzate in amminoacidi e peptidi, i carboidrati in monosaccaridi, mentre i lipidi in glicerolo e acidi grassi a lunga catena [5], [13].

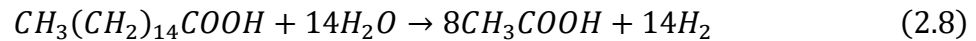
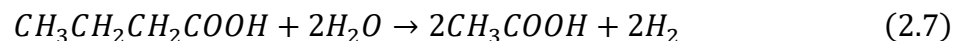
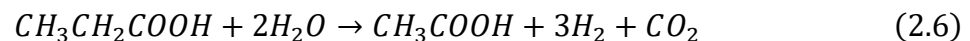


L'acidogenesi, conosciuta anche come fermentazione dei monomeri organici, è il secondo *step* di processo, operato dai batteri acidogeni. Essi degradano i carboidrati e le proteine in acidi grassi e acido acetico. Uno stesso composto può andare incontro a quattro reazioni differenti:



In generale, dai prodotti solubili dell'idrolisi vengono generati alcoli e (VFA), la cui formazione comporta un abbassamento del pH e condizioni di leggera acidità (pH tra 5 e 5.5) [5].

Il terzo *step* è l'acetogenesi, la fase in cui gli acidi volatili (sia VFA che acidi grassi a lunga catena) vengono degradati ad acetato, grazie ai batteri acetogeni ed omoacetogeni.



Come si evince dalle reazioni soprastanti, coinvolte in questa fase, oltre all'acetato vengono prodotti idrogeno molecolare (H_2) e CO_2 [13].

L'ultimo stadio della DA è la metanogenesi operata da diversi ceppi batterici (*Methanococcus*, *Methanosarcina*, *Methanobacterium*, *Methanobacillus*, *Methanospirillum*, *Metanoseta*) con lo scopo di generare metano e CO_2 .

La produzione di CH_4 avviene seguendo due reazioni differenti:

➤ Metanogenesi idrogenotrofa

Svolta dai batteri idrogenotrofi, che impiegano la CO_2 come accettore di elettroni e l'idrogeno come donatore, secondo la reazione seguente:



➤ Metanogenesi acetoclastica

Compiuta dai batteri acetoclasti, i quali consumano acido acetico generando CH_4 e CO_2 :



Con questa seconda reazione si produce il quantitativo maggiore di metano (circa 70%), che rappresenta il guadagno del processo.

Poiché nella metanogenesi vengono consumati H_2 e acido acetico, il pH di questa fase aumenta fino a valori compresi tra 7-8 [5].

Essendo un processo complesso, è importante studiare le cause che possono influenzarne positivamente o negativamente le rese globali.

I microrganismi maggiormente sensibili alle variazioni ambientali sono i batteri metanogeni, caratterizzati da una velocità di crescita minore rispetto agli altri.

Le sostanze che possono in qualche modo alterare il normale decorso della DA sono molteplici: acido solfidrico (H_2S), azoto ammoniacale (NH_4^+), composti clorurati, disinfettanti (es. formaldeide e fenoli), sostanze metalliche. Questi sono solo alcuni esempi che, assieme a temperatura, pH e salinità, possono rallentare o inibire le rese di processo [9].

Per molte sostanze non esistono limiti di concentrazione generalmente riconosciuti come tossici, essendo spesso correlati alle condizioni operative (pH e temperatura). Alcuni materiali, per esempio i metalli, accrescono il metabolismo batterico a basse concentrazioni (micronutrienti), mentre superata una certa soglia diventano inibenti.

I metalli pesanti più importanti da monitorare sono rame (Cu), zinco (Zn) cadmio (Cd), ferro (Fe) e nichel (Ni). Questi ultimi due svolgono un ruolo critico per i batteri, grazie alle proprietà redox e alla partecipazione al catabolismo del trasporto degli elettroni [14]. I quantitativi elevati di Zn e Cu, invece, sono correlati soprattutto al contenuto di mangimi utilizzati nell'industria avicola e zootecnica [15]. In generale la regione di tossicità degli ioni metallici è legata alla disattivazione enzimatica (a seguito dell'interazione con i gruppi sulfidrilici) che comporta un abbassamento dell'attività microbica con conseguente diminuzione del quantitativo di biogas prodotto [9]. Nel caso della DA di reflui zootecnici, oltre ai metalli pesanti, un effetto inibente può essere dovuto alla presenza di antibiotici nel substrato. Tali sostanze, utilizzate negli allevamenti per prevenire le infezioni batteriche, possono comportare il rallentamento o addirittura l'inibizione metabolica [5].

La formazione di solfuri (es. H_2S) nei digestori deriva dalla riduzione dei composti a base di zolfo (es. cisteina) da parte dei batteri solfato-riduttori. Questi, competendo con i metanogeni per degradare il substrato, possono provocare uno sbilanciamento del sistema e inibire il processo. I metanogeni sono in grado di tollerare concentrazioni di acido solfidrico fino a 1000 mg/kg_{TS} anche se la loro capacità di produzione è compromessa già con valori intorno ai 200 mg/kg_{TS} [9].

Per quanto riguarda l'azoto ammoniacale totale (TAN), esprimibile come combinazione di ammoniaca (NH_3) e ione ammonio (NH_4^+), numerosi studi hanno dimostrato che è fortemente influenzato dai valori di pH [9], [16], [17]. In alcuni esperimenti di *Mlinar et al.* è stato dimostrato come la metanogenesi è condizionata negativamente dall'accumulo di ammoniaca (correlato all'innalzamento del pH), mentre non risente dei gradienti di NH_4^+ . Per quanto concerne l'idrolisi e l'acidogenesi, invece, entrambi i composti influiscono sulla stabilità delle membrane microbiche, portando ad una riduzione dell'attività batterica [16]. In uno studio, è stato osservato che concentrazioni di NH_4^+ comprese tra 1500 e 3000 mg/L sono inibenti a pH inferiori a 7.4, mentre superando i 3000 mg/L diventano tossiche a qualunque valore di pH [9].

2.2 Ottimizzazione della digestione anaerobica

La DA è un processo complesso, la cui riuscita dipende da molteplici fattori: qualità e quantità di substrato alimentato, acclimatazione microbica, condizioni operative e tipologia di processo. Esistono diverse soluzioni per aiutare la degradazione microbica e migliorare la qualità di digestato e biogas. Di seguito vengono citate tre migliorie di processo che possono essere attuate alimentando biomasse lignocellulosiche.

2.2.1 Pretrattamenti della biomassa

Tutte le tecniche di pretrattamento hanno come obiettivo quello di delignificare i materiali lignocellulosici, rendendo biodisponibili i carboidrati della cellulosa, aumentando le rese di biogas e biometano del processo. A seconda delle esigenze, i trattamenti possono essere effettuati singolarmente (es. pretrattamenti fisici, chimici, termici e biologici) o venir combinati tra loro. Nella Figura 3 sono mostrati i principali pretrattamenti della biomassa.

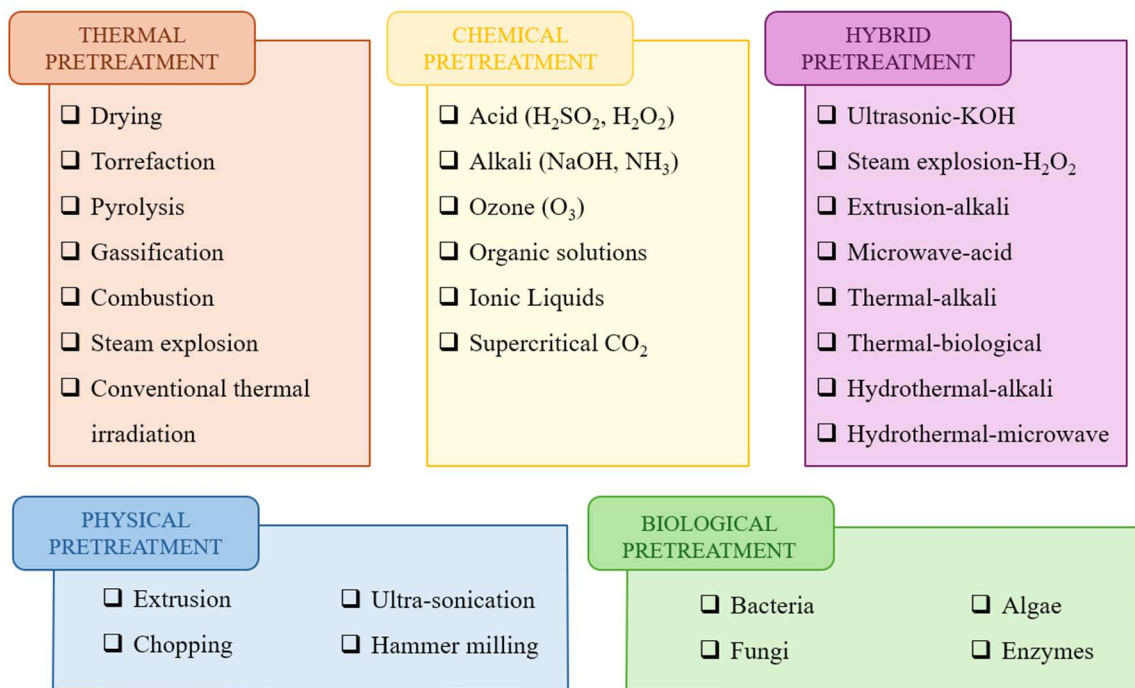


Figura 3 - Pretrattamenti della biomassa

2.2.1.1 Trattamenti Fisici

I trattamenti fisici della biomassa servono per alterarne la struttura lignocellulosica ed aumentare l'area di reazione tra substrato e batteri anaerobi. Tra le lavorazioni principali troviamo i trattamenti meccanici (come macinazione, fresatura ed estrusione), la radiazione e gli ultrasuoni.

Meccanici

La triturazione lignocellulosica viene effettuata mediante diversi tipi di macinatori (a lame, martelli o cilindri) classificati in base alla geometria. A prescindere dalla forma del macchinario, l'obiettivo è quello di applicare sforzi di taglio meccanici in grado di frantumare la struttura cristallina della biomassa. Il tipo di macinatore e la durata di utilizzo, determinano un miglioramento in termini di area superficiale, indice di cristallinità (IC) e grado di polimerizzazione (DP). In uno studio di *Gharpuray et al.*, basato sull'analisi dei pretrattamenti fisico-chimici e loro combinazione per migliorare l'idrolisi enzimatica, è stato dimostrato che la macinazione a cilindri può ridurre IC del 12%, con un raddoppio dell'area superficiale specifica accessibile ai microrganismi [18]. Tutto ciò si traduce in rese di biogas maggiori con conseguente aumento dei quantitativi di biometano. È stato provato che, con una riduzione della dimensione delle fibre a pochi mm, si ottengono i potenziali di CH₄ maggiori [19], [20].

Idrotermale

Il trattamento idrotermale, effettuato con acqua calda liquida (solitamente a 140-220 °C) in pressione (per circa 10-60 minuti), è un altro esempio di pretrattamento fisico efficace. Questa tecnica consente di solubilizzare l'emicellulosa, aumentare il DP e consentire l'accesso enzimatico della cellulosa. È importante evitare lo sviluppo di composti fenolici e furanici che inibiscano il successivo processo di DA, lavorando a temperature inferiori a 200 °C. L'efficienza del trattamento dipende da diversi fattori, tra cui composizione della biomassa, rapporto liquido/solido, acidità, granulometria e contenuto di umidità [21].

Sonicazione

La sonicazione è una tecnologia vantaggiosa in grado di consentire erosione superficiale e delignificazione della biomassa, sfruttando basse temperature, pressioni (T_{amb} e p_{amb}) e tempi di pretrattamento.

Il principio fisico di base è la cavitazione, con rapida formazione di bolle che attraverso accrescimento e successiva implosione generano forti stress localizzati. Si verifica generalmente a basse frequenze (inferiori a 40 kHz), con un'azione locale intensa all'interfaccia. L'implosione delle bolle dà luogo ad alti rilasci energetici, con temperature che raggiungono i 5000 °C e pressioni di circa 50 MPa. Queste condizioni estreme producono radicali liberi altamente reattivi (OH[•]) in grado di facilitare le reazioni chimiche dei composti organici nel liquido. La sonicazione della biomassa comporta quindi fenomeni di sono-erosione e sono-capillarità e contribuisce a ridurre IC e aumentare la solubilizzazione della lignina.

È importante considerare la degradazione eterogenea della matrice di partenza: gli effetti delle onde sonore aumentano quanto più è ridotta la distanza dal trasduttore [22].

2.2.1.2 Trattamenti chimici

Il pretrattamento chimico dissolve la biomassa lignocellulosica scomponendo i legami covalenti e favorendo la solubilizzazione di cellulosa, emicellulosa e lignina.

L'impiego di sostanze chimiche garantisce numerosi vantaggi: rapidità di reazione microbica, efficienza di processo maggiore, tempi di trattamento ridotti comparati con la degradazione

biologica e minori consumi energetici rispetto al trattamento fisico. È importante dosare bene le sostanze chimiche ed evitare azioni troppo prolungate. Si potrebbe incorrere in un'eccessiva perdita di sostanza fermentabile generando intermedi tossici per i batteri.

L'impiego di sostanze chimiche richiede costi d'impianto maggiori, sia per l'acquisto dei solventi, che per il recupero dei reagenti esausti, che non possono essere introdotti nell'ambiente senza ulteriori trattamenti (es. correzione del pH).

I pretrattamenti chimici impiegano diversi tipi di sostanze: alcaline, acide, solventi organici, liquidi ionici, ozono e ammoniaca.

Acidi

Le sostanze acide vengono spesso impiegate in ridotta concentrazione per dissolvere l'emicellulosa, accelerando la degradazione della biomassa di partenza. I trattamenti acidi sono facili da usare, raggiungono elevati gradi di solubilizzazione e consentono una migliore idrolisi del substrato. Prima di poterli adoperare è importante condurre analisi preliminari in grado di stabilire i tempi di pretrattamento e la diluizione ottimale. Essendo sostanze altamente corrosive dal forte potere degradante, vengono miscelate con acqua in ridotte concentrazioni [23].

Tra gli esempi tipici adoperati nell'industria di processo troviamo acido solforico (H_2SO_4), fosforico (H_3PO_4), cloridrico (HCl), acetico (CH_3COOH), perossido d'idrogeno (H_2O_2) e acidi organici (maleico, ossalico, succinico, formico) [21].

I maggiori svantaggi che riducono l'impiego di questi solventi a livello industriale comprendono costi di diluizione, quelli relativi al trattamento delle acque reflue e quelli di manutenzione dell'impianto. L'elevata acidità, inoltre, può causare eccessiva degradazione dei carboidrati con perdite nutrizionali rilevanti in termini di biogas.

Sostanze Alcaline

I trattamenti alcalini sfruttano basi deboli come idrossido di sodio (NaOH), idrossido di calcio ($Ca(OH)_2$) e di potassio (KOH), carbonato di sodio (Na_2CO_3), urea (CH_4N_2O) e soluzioni a base di ammoniaca [21]. I gruppi radicali (OH^-) contenuti nelle suddette sostanze, consentono la saponificazione e la scissione dei legami lignina-carboidrati. Anche in questo caso il risultato è un cambiamento strutturale con conseguente riduzione del IC e aumento di porosità.

Rispetto ad altri composti chimici, le sostanze alcaline formano meno inibitori, non necessitano di apparecchiature sofisticate e sono più semplici da utilizzare (comparate ai pretrattamenti meccanici). Nonostante tali vantaggi, richiedono tempi di permanenza maggiori e possono creare difficoltà nell'impiego di prodotti finali (quali il digestato).

L'unica eccezione riguarda il pretrattamento con KOH che, a seguito della DA, consente di ottenere un digestato arricchito di ioni potassio (K^+), che può essere adottato come biofertilizzante per le piante e per il suolo [21].

Il pretrattamento alcalino è spesso accoppiato ai pretrattamenti fisici e ciò consente di migliorare ulteriormente le rese di processo della DA. Alcuni studi hanno infatti dimostrato che l'unione termo-alcalina utilizzata sulla WS, produce un aumento di biometano del 43%, rispetto al solo trattamento termico [24]; mentre la combinazione ultrasuoni ed NaOH al 2% ha migliorato la produzione giornaliera di CH_4 della paglia di riso non trattata e trattata chimicamente [25].

Solventi Organici

I metodi Organosolv sono chiamati così proprio perché fanno uso di solventi organici, quali ad esempio alcoli bassobollenti (etanolo, metanolo e glicerolo), acetone, etilene ed *N-metil-morfolina-N-ossido* (NMMO).

Tali sostanze agiscono sui legami di tipo etere ed estere dell'emicellulosa e della lignina e sui legami idrogeno della cellulosa, scindendoli e provocando cambiamenti strutturali [21]. Per pretrattare la WS sono in genere utilizzate soluzioni a base di NMMO o etanolo. La prima ha il vantaggio di essere atossica, completamente biodegradabile e riciclabile quasi completamente (~ 98%), mentre l'etanolo può essere facilmente distillato e riutilizzato più volte. In entrambi i casi in uno studio di *Mancini et al.* è stato dimostrato che il trattamento di WS con queste due sostanze ha apportato un miglioramento della resa di biogas del 15% [26].

Liquidi Ionici

I liquidi ionici sono generalmente sali organici con temperatura di fusione inferiore a 100 °C. Sono caratterizzati da una grande varietà di proprietà chimico-fisiche: polarità elevata, ottima stabilità termica, elevata conduttività, volatilità trascurabile e non infiammabilità. Nonostante ciò, sono meno utilizzati di altri solventi a causa della loro tossicità, viscosità, non biodegradabilità e dei costi elevati [27]. Delle valide alternative, ancora in fase di studio, sono rappresentate dai solventi eutettici profondi (DES) che sembrerebbero essere promettenti per il pretrattamento della biomassa [28].

Ozonazione

Il trattamento con ozono (O₃) è una tecnica ecologica molto efficace per la delignificazione della biomassa, in grado di agire soprattutto sui gruppi aromatici della lignina. Tale fenomeno consente la rottura dei legami lignina-carboidrati esponendo la cellulosa ad attacchi enzimatici. Una delle maggiori criticità legate a questo trattamento, è la generazione di acidi idrosolubili responsabili dell'abbassamento del pH, con valori che possono raggiungere anche forti gradi di acidità (pH ~3) e provocare inibizione dell'attività metanogena [21].

2.2.1.3 Trattamenti termici

I pretrattamenti termici, conosciuti anche come processi termochimici, sfruttano l'azione combinata del calore per indurre reazioni chimiche e trasformare la biomassa. Ciò sottopone i substrati riscaldati ad una pressione specifica, per un certo lasso temporale, in modo da garantire la scissione macromolecolare riducendo la resistenza strutturale della biomassa lignocellulosica. La gran parte di tali materiali inizia a solubilizzare a temperature comprese tra 150 e 180 °C.

L'efficacia del trattamento termico dipende da diversi fattori: tempo di residenza, temperatura di esercizio, dimensione della matrice di partenza e contenuto di umidità [22]. Esistono diverse tipologie di pretrattamenti termici, suddivisi a seconda dell'intervallo di temperatura e della quantità di ossigeno impiegata.

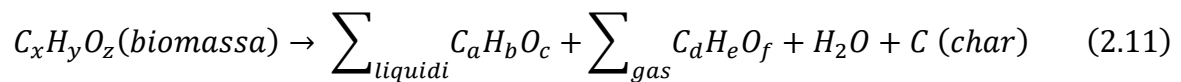
Torrefazione

La torrefazione è un processo termico di stabilizzazione della biomassa condotto a 200-300 °C in un ambiente povero di ossigeno. In questi range termici vengono rimossi i composti volatili leggeri. Per le matrici lignocellulosiche, l'innalzamento di temperatura comporta la scissione dei legami dell'emicellulosa e della lignina, con una variazione delle proprietà chimico-fisiche del materiale. Le durate di processo possono variare da 30 minuti a qualche ora. Dalla torrefazione si ottiene un solido carbonioso idrofobico, poroso e comprimibile di colore marrone scuro. Nonostante la perdita di massa (circa del 30%), dovuta prevalentemente all'evaporazione acquosa, il prodotto finito acquista una maggior densità energetica grazie all'aumento del suo potere calorifico inferiore [29].

Pirolisi

La pirolisi è un altro processo termico degradativo che avviene a temperature comprese tra 300-650 °C in atmosfera priva di ossigeno. I prodotti di pirolisi sono tre: gas, liquido (bio-olio) e un residuo solido chiamato char (o biochar, a seconda del tipo di substrato trattato) [30].

Tra i gas prodotti troviamo CO, CO₂, H₂O, CH₄ e idrocarburi leggeri come acetilene (C₂H₂), etilene (C₂H₄), etano (C₂H₆) e benzene (C₆H₆). Il prodotto liquido è invece una sostanza nera catramosa, nota come bio-olio, costituita per il 20% da acqua e per la restante parte da composti fenolici, acidi carbossilici, idrossialdeidi, idrossi-chetoni e zuccheri. Il residuo solido è composto principalmente da carbonio ed in misura minore da ossigeno, idrogeno e ceneri inorganiche. La generica reazione che governa il processo di pirolisi è riportata di seguito:



Durante la volatilizzazione delle sostanze, la porosità del char aumenta dal 20% all'80% con un aumento della superficie specifica che ne determina la reattività [31].

Esistono due tipi di pirolisi: lenta e veloce. La prima è caratterizzata da un tempo di riscaldamento del combustibile maggiore rispetto al periodo di reazione, il viceversa è peculiare del processo veloce.

La pirolisi lenta, eseguita con elevati tempi di permanenza e una bassa rampa di riscaldamento, consente di ottenere alte rese di biochar. Si raggiungono generalmente temperature intorno ai 400 °C (anche se la pirolisi lenta può arrivare anche a valori ben più alti). Nella pirolisi veloce l'obiettivo è invece quello di massimizzare la produzione liquida, riscaldando la biomassa talmente velocemente da raggiungere la temperatura di picco prima dell'inizio della sua decomposizione. La temperatura massima si attesta a valori inferiori a 650 °C nel caso di bio-olio, mentre sale se il prodotto d'interesse è gassoso. Con questa tecnologia si raggiungono rese di bio-olio del 40-60% rispetto al prodotto finale. Per incrementare tale risultato è necessario eseguire una pirolisi *flash* [30].

Quando la matrice iniziale è di origine lignocellulosica è importante tener conto dell'intervallo di degradazione di ciascun costituente: l'emicellulosa si consuma tra i 150-350 °C, la cellulosa tra 275-350 °C mentre la lignina a 250-500 °C.

Da un punto di vista termico, il processo di pirolisi può essere riassunto in quattro fasi. La prima di esse è l'essiccazione, la cui temperatura non supera i 100 °C. Durante tale periodo l'acqua

legata debolmente alla biomassa e l'umidità intrappolata nei pori evaporano. La fase iniziale, costituita da range 100-300 °C, permette la disidratazione esotermica della biomassa con rilascio di gas leggeri (quali CO e CO₂).

Quando la temperatura supera i 200 °C si entra nella fase intermedia, chiamata anche pirolisi primaria, con generazione di vapore, char primario e gas (condensabili e non). L'ultimo *step* è costituito dal *cracking* secondario a 300-900 °C con formazione prevalente di char [30].

È importante sottolineare che le rese di processo, la qualità e la composizione dei prodotti di pirolisi dipendono fortemente sia dai parametri operativi che dalle proprietà fisico-chimiche della biomassa di partenza [29].

Gassificazione

La gassificazione è una tecnica di conversione termica della biomassa che ne prevede l'ossidazione a temperature comprese tra 600 °C e 1200°C, in condizioni sub-stechiometriche di breve durata (10-20 secondi) [32]. Gli agenti ossidanti tipici del processo possono essere aria, vapore e ossigeno. Il prodotto primario è chiamato gas di sintesi: una miscela costituita da ossidi di carbonio (CO, CO₂), metano, idrogeno molecolare, acido solfidrico (H₂S), vapori organici, idrocarburi aromatici, vapore acqueo e residui solidi [33]. Se le condizioni di processo fossero ideali il gassificatore produrrebbe soltanto gas e ceneri. Nella realtà una quota parte di substrato viene convertito anche in biochar (generalmente meno del 10%). Questo biochar contiene solitamente un elevato numero di metalli alcalini e alcalino-terrosi (Ca, K, Mg, Si) e di idrocarburi policiclici aromatici rendendolo un prodotto non adatto come ammendante a causa della presenza di composti tossici per i microrganismi del suolo [32].

Processo termico convenzionale

Il pretrattamento termico convenzionale utilizza acqua con *range* di temperatura di 50-250 °C ad intervalli di tempo variabili. Il calore scinde i legami tra la cellulosa cristallina e altri composti permettendo la depolimerizzazione dell'emicellulosa e la sua degradazione in VFA e monosaccaridi. Tutto questo, unito all'aumento della superficie specifica accessibile ai microrganismi, comporta una produzione di biogas maggiore e più rapida. In uno studio di *Ferreira et al.*, il pretrattamento di WS a 200 °C per 5 minuti ha consentito un aumento delle rese di metano del 27% [34]. Il calore può essere fornito grazie ad una tecnologia a microonde, impostando come parametri di processo temperatura (tipicamente 150 °C), rampa di riscaldamento (in genere 5 °C/min) e tempo di permanenza. È importante evitare trattamenti a microonde troppo aggressivi che possano formare composti fenolici ed eterociclici (es. *furfurale* e *idrossi-metil-furfurale* HMF), in grado di inibire i batteri fermentativi compromettendo le rese di biometano [35], [36].

Steam explosion

Un altro pretrattamento vantaggioso è l'esplosione di vapore, caratterizzata da temperature comprese tra 190-220 °C e tempi di permanenza brevi (5-15 min), seguiti da un'improvvisa diminuzione di pressione. L'umidità penetra nella struttura fibrosa della WS, dove le alte temperature ne aumentano le porosità. Il calo di pressione fa evaporare l'acqua e restituisce una biomassa meno resistente agli attacchi enzimatici. Grazie a questa tecnica è possibile aumentare la biodegradabilità del substrato e favorire una produzione di CH₄ superiore del 15% [21].

2.2.1.4 Trattamenti biologici

Esistono diverse specie microbiche in grado di delignificare la biomassa facilitando i processi fermentativi della DA. I pretrattamenti biologici di maggior impiego sono quelli effettuati con specie fungine e batteri (generalmente *batteri lattici*). Nonostante i tempi di trattamento siano più lunghi rispetto a quelli chimico-fisici, l'alta efficienza di degradazione organica, l'aumento del tasso di produzione di biogas e il fatto di essere una tecnica ecologica, rendono i trattamenti biologici vantaggiosi.

Funghi

Il pretrattamento fungino è una tecnica in grado di ridurre il quantitativo di lignina ed emicellulosa anche del 12-20 % (w/w), diminuendo IC con l'aumentare del tempo di trattamento. Il substrato viene lavorato da microrganismi di diverse specie fungine per tempi che vanno da quattro settimane fino a pochi mesi. Oltre alle tempistiche lunghe, un'altra problematica è causata dall'accumulo di materiale miceliale (come le ife) nella biomassa di partenza, che può inibire l'accesso di enzimi idrolitici riducendo la produzione di CH₄.

Batteri

Se il pretrattamento fungino richiede tempistiche dell'ordine di mesi, l'uso di batteri nei processi degradativi necessita di qualche giorno di trattamento. Oltre alla degradazione della lignina, i batteri convertono i carboidrati in acidi grassi volatili (VFA) e glicerina, accelerando la produzione di biogas. Numerosi studi di letteratura suggeriscono di miscelare le specie batteriche e quelle fungine fra loro, al fine di ottenere una buona degradazione con tempi di permanenza relativamente brevi (3-15 giorni circa) [21], [37], [38].

2.2.2 La co-digestione anaerobica

La co-digestione anaerobica (co-DA) consiste nella digestione di due o più biomasse contemporaneamente nello stesso reattore, in specifici rapporti stechiometrici. È un processo che presenta numerosi vantaggi rispetto alla DA, in termini di *range* ottimali di lavoro (es. C/N, pH, quantitativo di solidi alimentati) e talvolta rese di biogas (Figura 4).

La digestione singola di alcuni substrati può causare in alcune circostanze problemi, che possono essere evitati miscelando differenti tipologie di rifiuto. Gli scarti avicoli, ad esempio, contengono eccessive quantità di ammoniaca, potenzialmente tossiche per la flora metanogena. I rifiuti solidi, invece, inglobano considerevoli quantità di inerti (sabbia, pietre e terra) e possono favorire accumuli di sedimenti nel reattore, riducendo il volume attivo di digestione e causando stress meccanici a tubazioni e valvole. L'unione della pollina con tali rifiuti consentirebbe una digestione microbica più efficace: sia per quanto riguarda la riduzione di composti inibitori a base di azoto, che per la maggior fluidizzazione del substrato con conseguente sgravio meccanico sulla struttura [5].

Scarti organici, fanghi di depurazione, effluenti zootecnici e residui agricoli (tipicamente lignocellulosici) sono in genere combinati fra loro attraverso la co-DA al fine di generare guadagni maggiori in termini di biogas e biometano.

La miscela delle diverse matrici consente inoltre di compensare fluttuazioni massicche dovute alla stagionalità dei rifiuti, evitando sovraccarichi o insufficienze di sistema e garantendo una digestione più stabile e costante. Un'ulteriore facilitazione dovuta alla co-digestione riguarda il bilancio di nutrienti (soprattutto C/N) che spesso deve rispettare *range* ottimali di lavoro.

Le biomasse lignocellulosiche con alti rapporti C/N possono essere combinate con reflui zootecnici (caratterizzati da bassi valori C/N) per riequilibrare il valore di questi elementi in un intervallo ideale per i batteri idrolitici.

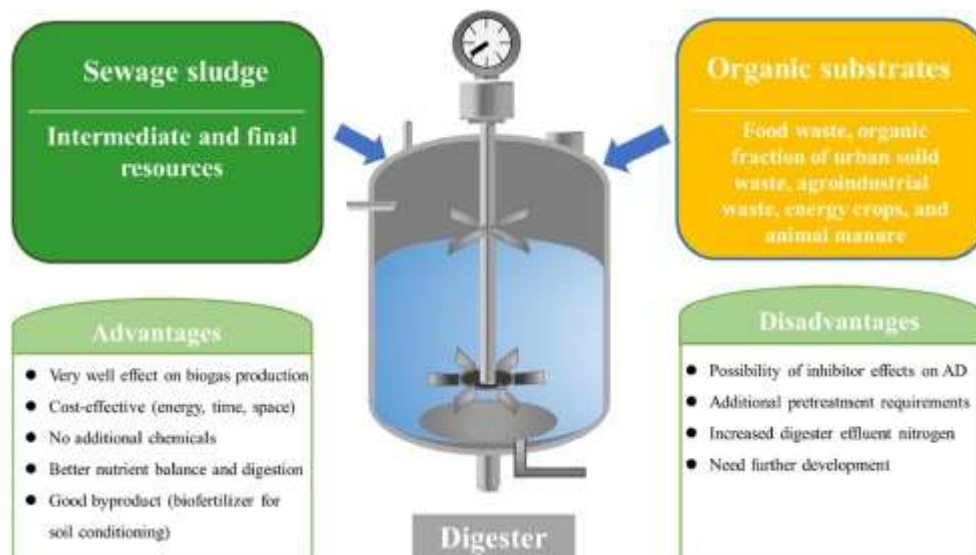


Figura 4 – Vantaggi e svantaggi della co-digestione, tratto da [39]

2.2.3 Aggiunta di biochar

Oltre alla co-DA e al pretrattamento della biomassa, un'ulteriore opzione per migliorare il processo prevede l'introduzione nel reattore di sostanze coadiuvanti l'attività microbica. A tal proposito, un promettente additivo per applicazioni ambientali è risultato essere il biochar da pirolisi. Come già anticipato precedentemente, il char è una sostanza ottenuta a seguito della degradazione termica in assenza di ossigeno (pirolisi). Quando la matrice di partenza ha origine vegetale o animale si ottiene una sostanza carboniosa che prende il nome di biochar (BC). Il BC è caratterizzato da una struttura porosa composta prevalentemente da carbonio (C), ossigeno (O), idrogeno (H) e azoto (N) in diverse percentuali.

La sua porosità, l'elevata area superficiale specifica e la presenza di gruppi funzionali superficiali, rendono il BC un interessante materiale reattivo in grado di migliorare la DA attraverso la mitigazione di fenomeni/agenti inibitori, promozione del metabolismo sintrofico, miglioramento della qualità del digestato, maggior purezza del biogas ed aumento della capacità tampone durante le fasi di digestione [40]. L'ampia superficie favorisce la crescita batterica, mentre i gruppi redox promuovono il trasferimento di elettroni a lunga distanza e la metanogenesi [41]. L'elevata porosità e l'alto rapporto superficie/volume, inoltre, conferiscono al BC proprietà assorbenti in grado di trattenere e rilasciare gradualmente acqua e nutrienti. Grazie a questo fenomeno è possibile ottenere una qualità di digestato migliore purificando il

biogas da eventuali composti indesiderati.

In Figura 5 è schematizzata la struttura del biochar derivante dal processo di pirolisi della paglia di mais condotto in un forno tubolare a 500 °C [41].

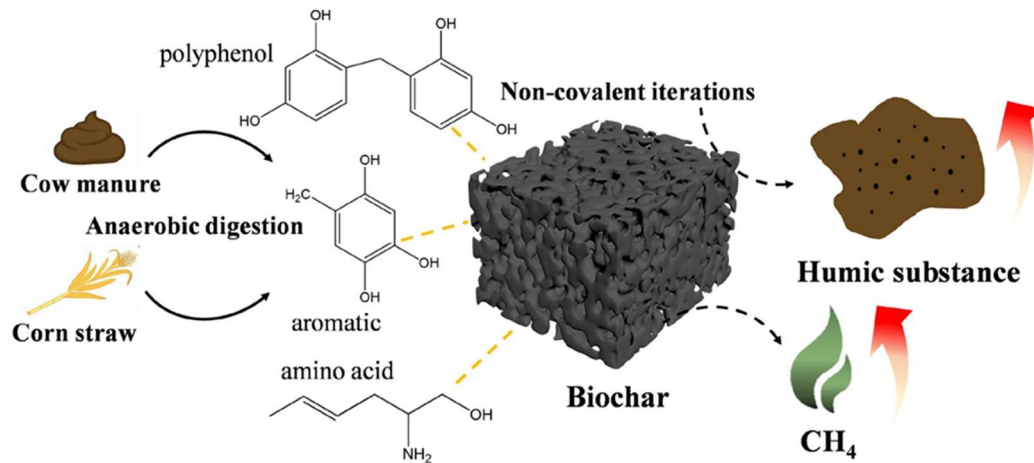


Figura 5 -Impiego di biochar nel processo di co-DA di paglia di mais e letame bovino [41]

È importante ricordare che le caratteristiche del biochar (quali pH, contenuto di ceneri, porosità e composizione) sono fortemente influenzate dalla matrice organica di partenza e dalle condizioni di pirolisi. Un biochar prodotto dalla pirolisi di materiali legnosi avrà caratteristiche completamente differenti, ad esempio, da uno prodotto da residui zootecnici: il primo, infatti, risulterà più stabile e povero di ceneri mentre il secondo sarà più alcalino e ricco di nutrienti. Il BC utilizzato come ausilio alla digestione effettuata in questa tesi è un biochar commerciale prodotto dalla pirolisi a 700 °C della paglia di grano. È stato inserito nei digestori con rapporto WS:CM pari a 100:0 e 90:10 in tre concentrazioni differenti (2.5, 5 e 10 g/L), stabilite prendendo a modello articoli scientifici di letteratura.

2.3 Digestione della paglia di grano

La paglia di grano (in inglese “*Wheat Straw*”, WS) è una biomassa lignocellulosica difficilmente degradabile tal quale. È costituita da 30-60% di cellulosa, 14-40% di emicellulosa e 7-25% di lignina (% w/w), che insieme formano un complesso polimerico resistente [21].

Come si evince dalla Figura 6, la WS è formata da un intreccio stratificato di composti differenti. L’emicellulosa è costituita da polisaccaridi eterogenei di glucosio, arabinosio, xilosio, galattosio e acidi dello zucchero (*4-O-metil-D-glucuronico* e *acido galatturonico*) ed è collegata chimicamente sia con la cellulosa (legame a idrogeno) che con la lignina della parete cellulare. La principale fonte di carbonio biodegradabile risiede nella cellulosa, sottoforma di *β-1.4-glucano*, mentre la lignina si trova sottoforma di polimero fenolico amorfo.

L’intreccio della matrice polimerica non degradabile (lignina ed emicellulosa) con quella cristallina cellulosa, forma una barriera fisica impermeabile agli attacchi microbici. L’accesso problematico degli enzimi degradativi non solo compromette le rese di biogas della DA, ma rallenta la fase di idrolisi al punto da renderla lo *step* limitante del processo.

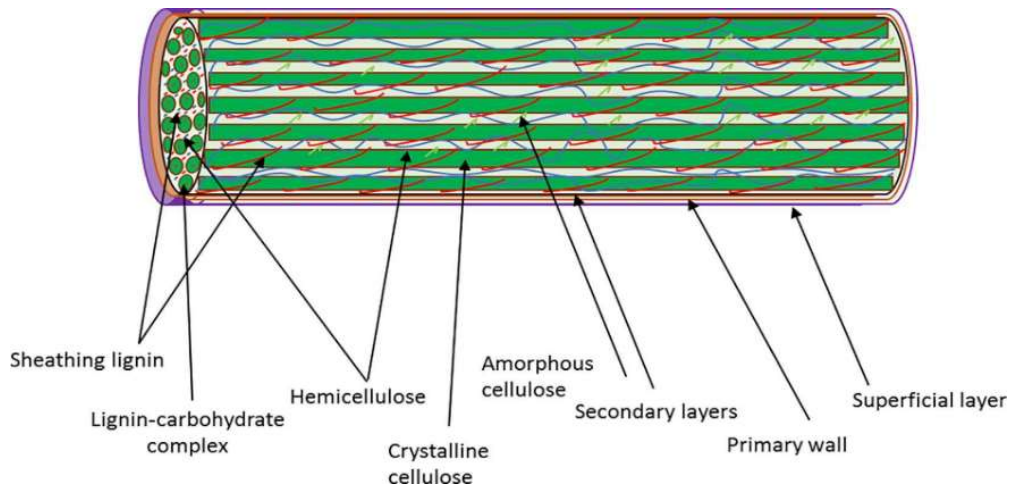


Figura 6 - Struttura lignocellulosica della WS [21]

Oltre alla struttura resistente della WS, gli ostacoli in cui ci si può imbattere durante la DA sono molteplici. Gli alti quantitativi di lignina non biodisponibili (~10-20% su base secca) non solo diminuiscono le rese di processo, ma si riflettono anche sul Potenziale Biochimico teorico di Metano (BMP). La bassa densità della paglia ne favorisce il galleggiamento in superficie, rendendo il substrato da digerire stratificato e quindi eterogeneo ai microrganismi. Il rapporto C/N (talvolta superiore del 90%) è un altro parametro problematico, che può comportare uno squilibrio di nutrienti, allontanandosi dal *range* ottimale di digestione (compreso tra 20-30). Sia l'indice di cristallinità della cellulosa (IC) che il grado di polimerizzazione (DP) sono, inoltre, delle restrizioni per un'efficace degradazione [21]. Per ovviare a tali problematiche, aumentando la solubilizzazione della biomassa e le rese di biometano, è possibile ricorrere ad alcune strategie: pretrattamenti fisici, chimici e biologici della biomassa di partenza, co-digestione con altri substrati, aggiunta di sostanze in grado di stabilizzare il processo e coadiuvare i microrganismi (biochar).

Nell'immagine seguente (Figura 7) è riassunto lo schema di processo della DA della paglia di grano.

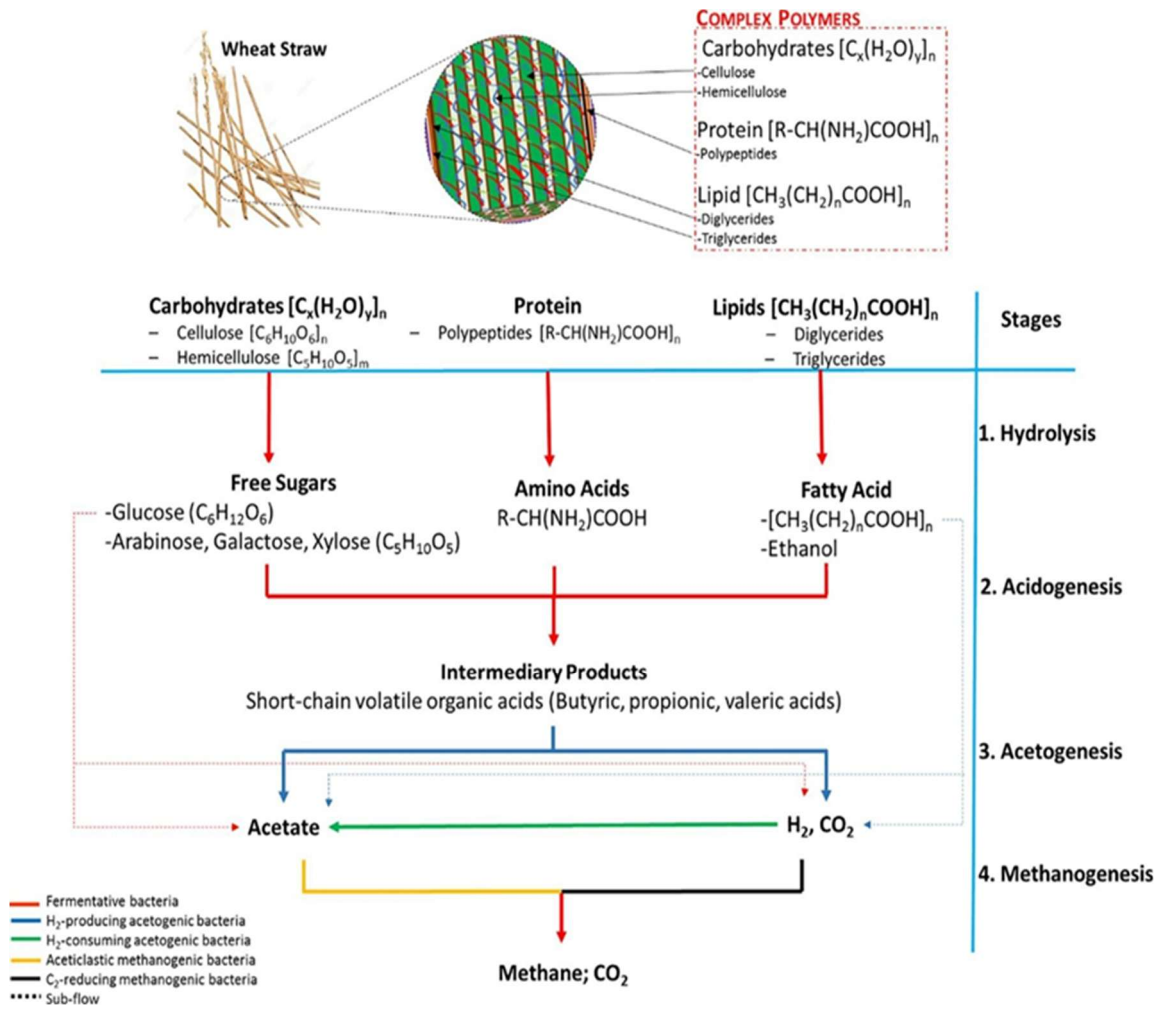


Figura 7 - Schema di processo della DA di WS [21]

A causa degli elevati tempi di pretrattamento richiesti per la degradazione lignocellulosica biologica, in questo lavoro di tesi si è scelto di pretrattare la WS soltanto fisicamente e chimicamente.

3. Materiali e metodi

3.1 Materiali e reagenti

Nei tre processi di digestione anaerobica è stato utilizzato un inoculo proveniente dal digestore della Cooperativa Agricola Speranza situato a Candiolo (TO, Italia), operante in condizioni mesofile per il trattamento di reflui zootecnici, letame, rifiuti agricoli e scarti del mais.

L'azienda nasce nel 1974 nel settore della vendita diretta di carne, prodotta senza aggiunta di sostanze chimiche. Nel 2008 si è ampliata con la costruzione di due impianti a biogas per generare energia rinnovabile. Dal 2020 è stato avviato un nuovo digestore anaerobico per la produzione di biometano liquido per autotrazione. I prodotti e servizi attualmente commercializzati sono i seguenti: digestato mesofilo di letame bovino e scarti agricoli, BioLNG, energia termica ed elettrica [42].

Il letame è stato fornito da Agricorni Comba, Rivoli (TO, Italia) fondata dai fratelli Comba ed il padre Giuseppe nel 1953.

La paglia di grano duro proviene da De Matteis S.p.A (Flumeri, AV, Italia), un'azienda italiana del settore agroalimentare. La società nasce nel 1993 da un'idea di due famiglie imprenditoriali che collaborano da più di 50 anni nel settore dell'edilizia. L'impegno e la dedizione degli imprenditori ha portato quello che inizialmente era un mulino per un piccolo pastificio a diventare uno dei principali produttori mondiali della pasta, con un tasso di crescita tutt'ora ineguagliato [43].

Nella terza digestione anaerobica è stato utilizzato biochar commerciale, prodotto dalla pirolisi di WS a 700 °C (UK Biochar Research Centre).

Per i test di germinazione, i semi di crescione (*Lepidium Sativum*,) sono stati acquistati da BLUMEN Group S.p.A).

La paglia è stata trattata chimicamente con tre soluzioni distinte, preparate con i seguenti reagenti: H₂O₂ al 30% w/w (Sigma Aldrich), Etanolo EMSURE® (purezza ACS, ISO, Merck) ed NaOH 98% sottoforma di pellets (Sigma Aldrich).

Per andare a valutare il tenore di sostanza organica presente all'interno delle soluzioni di pretrattamento, sono stati utilizzati kit chimici di laboratorio per la misura del COD con intervallo 0-1000 mg/L (Hach Company, Germany, cod. LCI 400).

La caratterizzazione del digestato è stata effettuata anch'essa tramite kit chimici: LATON *Total Nitrogen Test Kit* (Hach Company, Germany, cod. LCK 338) con range 20-100 mg/L, Lange *Phosphate Ortho/Total* per cuvette di test nell'intervallo 2-20 mg/L (Hach Company, Germany, cod. LCK 350), *Nitrate TNTplus Vial Test* 5-35 mg/L NO₃-N (Hach Company, Germany, cod. TNT 836), test in cuvetta per Potassio 5-50 mg/L (Hach Company, Germany, cod. LCK 228) e per Ammonio con range 2-47 mg/L NH₄-N (Hach Company, Germany, cod. LCK 303).

3.2 Metodi

3.2.1 Pretrattamenti della paglia

Come accennato nel paragrafo 2.1.1.2 *Pretrattamenti della biomassa*, per rendere la matrice lignocellulosica della paglia maggiormente biodisponibile sono stati effettuati alcuni pretrattamenti fisico-chimici sulla WS. Per omogeneizzare la biomassa di partenza e facilitarne la degradazione biologica si è scelto di ridurre la pezzatura attraverso un mulino a lame con maglie da 6 mm (SM200 cutting mill, Retsch, Germany). Oltre alla riduzione delle dimensioni, si è pensato di trattare chimicamente la WS con tre solventi diversi, selezionati da letteratura.

Prendendo a modello il lavoro svolto da *Mancini et al.* [26] sono state preparate soluzioni distinte di idrossido di sodio (NaOH) ed etanolo (EtOH) in rapporto w/V 1:10 con la paglia. Per un ulteriore confronto è stato utilizzato del perossido di idrogeno (H_2O_2) come terzo solvente chimico, basandosi sull'articolo pubblicato da *Song & Zhang* [44]. Dal momento che in questo secondo studio il rapporto w/V risultava essere 1:3, si è preferito testare entrambi i rapporti in differenti concentrazioni e tempi di pretrattamento per tutte le soluzioni utilizzate.

Per ciascun reagente sono state testate tre diverse concentrazioni: 2.5%, 5%, 10% fissate in base alla concentrazione ottimale ricavata da studi precedenti di letteratura [44] e raddoppiandola in due ulteriori valori di test. Unendo 15 g di WS a 150 mL di soluzione si è ottenuto il rapporto 1:10 e lo stesso quantitativo di paglia a 45 mL di soluzione nel caso del 1:3.

Nello studio di letteratura [26], il pretrattamento alcalino effettuato con NaOH per 24 h, è risultato essere quello ottimale tra i testati. Per tale ragione, la paglia è stata pretrattata allo stesso modo per tutti e tre i solventi scelti. A differenza di *Song & Zhang* [44], dove il trattamento con H_2O_2 richiedeva 7 giorni, sono state impiegate comunque 24 ore di incubazione, sia per motivi tempistici che per rendere confrontabili i solventi. Dal momento che il trattamento con etanolo richiedeva tempi molto minori (circa 60 min), si è scelto di pretrattare la WS anche per breve periodo: sono state scelte inizialmente 4 ed 8 ore. In caso ci fosse stato bisogno di un ulteriore tempo di pretrattamento, l'analisi del COD condotta sul liquido di fondo di queste prime prove avrebbe aiutato a dedurre l'eventuale tempo ottimale.

Complessivamente sono risultate 18 configurazioni diverse; è stato anche testato il pretrattamento con sola acqua nei due rapporti 1:3 e 1:10, per avere un bianco di confronto.

In Tabella 3 sono riassunti i pretrattamenti effettuati complessivamente sulla paglia, con le rispettive concentrazioni e i tempi di permanenza in soluzione:

Tabella 3 - Pretrattamenti chimici effettuati sulla WS

Solvente	Concentrazione [%]	Rapporto w/V [kgws/mL]	Tempo pretrattamento [h]
NaOH	2.5	1:3 1:10	4
	5		8
	10		24
EtOH	2.5	1:3 1:10	4
	5		8
	10		24
H ₂ O ₂	2.5	1:3 1:10	4
	5		8
	10		24
H ₂ O	-	1:3	4
		1:10	8
			24

Ogni configurazione è stata chiusa in un recipiente da 250 mL e messa ad incubare a 30 °C con un'agitazione di 100 rpm per 24 h (modello incubatore). Dalle bottiglie con rapporto 1:10 sono stati prelevati circa 2.5 mL di estratto dopo 4 e 8 h. Non è stato possibile fare lo stesso con quelle 1:3, dato che la paglia ha assorbito tutto il liquido di pretrattamento. Per questa ragione si è scelto di scartare a priori queste configurazioni, portando avanti solamente quelle in proporzione 1:10, anche perché col rapporto 1:3 la biomassa non risultava impregnata in modo omogeneo ed uniforme. Al termine delle 24 h di incubazione il liquido di fondo è stato separato dalla paglia. Quest'ultima, sciacquata diverse volte con acqua, in modo da riportare il pH intorno alla neutralità ed interrompere il pretrattamento chimico, è stata messa ad essiccare in stufa a 110 °C per 24 h (modello stufa) e conservata ermeticamente per analisi successive.

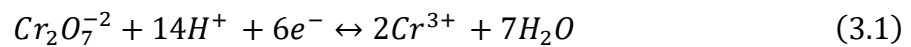
3.2.2 Misura del COD

La domanda chimica di ossigeno, espressa con l'acronimo inglese "*Chemical Oxygen Demand*" (COD), rappresenta la quantità di ossigeno necessaria alla completa ossidazione chimica dei composti organici ed inorganici presenti in un campione di acqua, misurata in milligrammi di ossigeno per litro (mgO₂/L).

Nel nostro caso, trattandosi di sostanza organica biodegradabile, è possibile affermare che ad alti valori di COD corrispondono altrettanti valori di materia organica ossidabile, potenzialmente disponibile nel processo di digestione anaerobica.

La misura del COD viene descritta dal metodo ufficiale IRSA-CNR numero 5135, basato sul fenomeno di retrotitolazione. Secondo la procedura per i test in cuvetta sono presenti due stadi: il primo di digestione in termostati a 148 °C (per un tempo di circa 2 h), il secondo di natura spettrofotometrica. All'interno delle cuvette si trovano solfato di argento (Ag₂SO₄), solfato di

mercurio (HgSO₄) e un eccesso di bicromato di potassio (K₂Cr₂O₇) in ambiente acido (H₂SO₄). Quest'ultimo composto in ambiente acido e alte temperature, ossida la sostanza organica secondo la seguente reazione:



Al termine della digestione si lascia raffreddare la cuvetta per poi leggerla mediante uno spettrofotometro (assorbanza) a lunghezze d'onda diverse in base al manuale d'istruzione. Per questo metodo, la concentrazione delle sostanze organiche ed inorganiche ossidabili è proporzionale al quantitativo consumato di dicromato di potassio [45].

Una volta misurato il COD effettivo è stato possibile calcolare il “*Disintegration Rate of total COD*” (DR_{CODt}), espresso mediante la formula seguente:

$$DR_{CODt} = \frac{COD_p - COD_{H_2O}}{COD_p} \cdot 100 \quad (3.2)$$

Al numeratore è raffigurata la differenza tra il COD effettivo del pretrattamento (misurato dopo un certo tempo di permanenza) e quello riferito alla soluzione acquosa applicata per la stessa durata. Questo valore percentuale è indice della velocità con cui la materia organica viene degradata in forma solubile più semplice. A percentuali maggiori corrispondono valori di solubilità più elevati, indice di una miglior efficacia di pretrattamento.

3.2.3 Design of experiments

Per riuscire a stabilire il pretrattamento più efficiente, che potesse aumentare le rese di metano della DA, si è scelto di eseguire una progettazione sperimentale che predicesse quali di questi solventi applicare e per quanto tempo. Sono stati eseguiti due *Design of Experiments* (D.o.E.) per andare ad individuare i parametri che massimizzassero il COD e la DR_{CODt}, inserendo come input tre variabili predittive (tipologia di reagente, concentrazione e durata di pretrattamento). Sulla base dei risultati ottenuti da questo studio preliminare, sono stati selezionati i due solventi migliori da testare sulla WS alimentata nei digestori della seconda campagna sperimentale.

3.2.4 Set-up digestione anaerobica

Sono state effettuate tre prove di digestione anaerobica differenti: la prima (DA1) volta a determinare il rapporto ottimale paglia:letame (WS:CM) che garantisse rese di biogas maggiori, la seconda (DA2) e la terza (DA3) allo scopo di stabilire se l'effetto dei pretrattamenti sulla WS o l'aggiunta di biochar alla paglia tal quale, potessero migliorarne ulteriormente le prestazioni. Nella prima campagna sperimentale è stato fatto variare il rapporto WS:CM del substrato in cinque proporzioni, scelte da letteratura: 0:100, 50:50, 75:25; 90:10; 100:0 [44], [46]. In questa prova è stata utilizzata WS macinata fino a 6 mm senza ulteriori trattamenti chimici.

La seconda campagna sperimentale è stata effettuata per valutare una possibile miglioria di processo mediante introduzione di pretrattamenti chimici sulla paglia macinata. Sulla base dello screening preliminare effettuato (descritto nei paragrafi 3.2.2 e 3.2.3) e dei risultati ottenuti

(paragrafo 4.2), si è deciso di testare la DA della WS esposta ad EtOH 10% e H₂O₂ 10%, entrambe impiegate per 4 h. Questi due solventi sono risultati quelli maggiormente efficaci nel degradare la sostanza organica in termini di COD e DR_{CODt}. Osservando risultati pressoché confrontabili tra etanolo, H₂O₂ e idrossido di sodio, per ragioni economiche ed ambientali, si è deciso di scartare il pretrattamento con NaOH, analizzando così solamente due solventi chimici su tre.

Per ciascuna soluzione è stata effettuata una prova con sola paglia trattata (WS_{tr}:CM 100:0) e una co-DA 90:10. Queste due proporzioni sono risultate quelle ottimali nella prima digestione in termini di biogas e metano. Sono stati testati rapporti analoghi della paglia non trattata, per poter valutare l'effetto del pretrattamento con le stesse condizioni operative.

L'ultimo test è servito a stabilire se la presenza di biochar avesse potuto migliorare il processo di digestione della paglia tal quale e di quella codigerita con letame. Sono stati impiegati sei reattori in duplicato contenenti il rapporto 100:0 e 90:10 WS:CM, con aggiunta di 2.5, 5 e 10 g/L di BC. In questa prova, sono stati utilizzati come bianchi di confronto i seguenti reattori: inoculo (I), substrati senza BC negli stessi rapporti WS:CM (100:0 e 90:10) ed inoculo misto a biochar nelle tre concentrazioni (2.5, 5 e 10 g/L).

Lo schema generale delle campagne sperimentali di questo lavoro è riportato in Tabella 4.

Tabella 4 - Schema delle tre campagne sperimentali

Campagna sperimentale	Obiettivo	Rapporto WS:CM	Alimentazione	Condizioni operative
I	Trovare il rapporto ottimale di co-digestione (WS:CM)	100:0 90:10 75:25 50:50 0:100	WS macinata Letame bovino 1 Inoculo 1	Reattori batch (250 mL) V _w = 80% S:I = 1:1 Cond. mesofile (35 °C) Miscelazione manuale TS _{alimentati} = 8%
II	Valutare l'effetto dei pretrattamenti chimici sulla WS	100:0 90:10	WS macinata e pretrattata con uno dei seguenti solventi: ▪ H ₂ O ₂ 10% (WS _{tr1}) ▪ EtOH 10% (WS _{tr2}) Letame bovino 2 Inoculo 2	
III	Valutare l'effetto del BC sulla DA	100:0 90:10	WS macinata Letame bovino 2 Inoculo 2 BC (2.5, 5, 10 g/L)	

3.2.5 Condizioni generali

Nelle tre prove di DA, per rendere quanto più confrontabili possibili i dati raccolti, si è scelto di mantenere costanti alcuni parametri di lavoro. In tutti i casi sono stati adoperati reattori batch da 250 mL miscelati manualmente, riempiti di materiale il cui rapporto Substrato:Inoculo, in termini di Solidi Volatili (VS) fosse unitario (S:I imposto 1:1).

Oltre al rapporto S:I, si è deciso di alimentare un quantitativo di Solidi Totali (TS) dell'8%.

Il volume di lavoro di ciascun reattore (V_W) è stato fissato all'80% del volume totale del reattore (V_R). Tale valore è stato scelto basandosi su prove di digestione precedentemente effettuate, che hanno dimostrato come uno spazio di testa del 20% fosse sufficiente a garantire un accumulo di biogas in condizioni di sicurezza [47], [48].

Di seguito è riportato il volume riempito per ciascuna reattore, espresso in mL:

$$V_W [mL] = \frac{V_W [\%] \cdot V_R}{100} \quad (3.3)$$

Tutte le prove di digestione sono state condotte in mesofilia: l'attività microbica dei reattori è stata garantita dall'incubazione costante a 35 °C in un bagno termostatico. Prima di riempire i reattori, si è lasciato l'inoculo a bagno per qualche giorno, all'interno della vasca termostatica, in modo da permettere una riattivazione microbica più veloce.

In Figura 8 è raffigurato il reattore all'interno del quale sono state condotte le DA. I reattori sono realizzati in vetro DURAN®, un materiale borosilicato trasparente, in grado di sopportare gli sbalzi termici grazie al basso coefficiente di dilatazione. Substrato ed inoculo sono stati miscelati all'interno del reattore nelle proporzioni stabilite, successivamente è stato avvitato un tappo a due vie: la prima lasciata aperta per insufflare azoto gassoso per circa 30 minuti, mentre la seconda, anch'essa aperta, ha permesso lo spurgo dell'aria man mano che il reattore acquisiva condizioni anaerobiche. Al termine del processo di inertizzazione, una delle due vie è stata collegata tramite un tubo ad una sacca Tedlar® da 1L, per la raccolta del biogas prodotto, mentre l'altra è stata chiusa.



Figura 8 - Configurazione reattoristica di laboratorio

Si è immerso ciascun reattore ad un livello d'acqua calda pari a quello di inizio dello spazio di testa nel digestore. Al fine di evitare un'eccessiva evaporazione di liquido, la vasca contenente il bagno termostatico è stata coperta con un telo di plastica (Figura 9).

I reattori sono stati miscelati manualmente due volte al giorno e ciò ha permesso di ridurre il fenomeno di stratificazione delle fasi, assicurando il più possibile un omogeneo *mass-transfer* di sostanze nutritive.



Figura 9 - Vasca d'incubazione mesofila

Per valutare le *performance* del processo, si è andati a monitorare e caratterizzare quotidianamente il biogas prodotto attraverso analisi qualitative e quantitative. Le prime, effettuate utilizzando un gascromatografo, hanno permesso di determinare le frazioni gassose costituenti la miscela. Per verificare il mantenimento delle condizioni anaerobiche ed il corretto svolgimento della prova, oltre a CH₄ e CO₂, sono stati monitorati anche H₂, O₂ e N₂.

Dal punto di vista quantitativo, il gas prodotto quotidianamente da ciascun reattore è stato misurato mediante spiazzo dell'intera sacca tramite una siringa graduata. Sommando le quantità prelevate giornalmente è stata ottenuta la cumulata di biogas, dall'analisi qualitativa invece si è potuta ricostruire la stessa curva in termini di biometano.

Come per altri studi di letteratura [49], anche in questa tesi si è andati a sottrarre ai quantitativi cumulati di biogas (prodotti per ciascuna configurazione) la quota di gas generata dal solo inoculo, riportando in seguito i valori alle condizioni normali (273.15 K, 1 atm).

Tutte le DA sono state interrotte quando la produzione di gas giornaliera è risultata inferiore all'1% di quella totale, per un periodo di almeno 5 giorni ($V_{\text{gas}} \leq 1\% V_{\text{tot}}$) [50]; che ha permesso di ottenere l'andamento asintotico orizzontale nelle due cumulate.

3.2.6 Prima campagna sperimentale: scelta del rapporto ottimale paglia:letame (WS:CM)

Come anticipato precedentemente, la prima digestione anaerobica (DA1) è stata effettuata per determinare il rapporto ottimale WS:CM in grado di produrre la cumulata di biometano maggiore. In questa prova ciascuna configurazione è stata riprodotta in triplicato.

Sono stati monitorati complessivamente 18 reattori riempiti con i quantitativi di substrato e inoculo calcolati teoricamente con le formule del paragrafo **Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.** dalla (3.17) a (3.21). In Tabella 5 sono riportate le configurazioni inerenti alla DA1, mentre in Tabella 6 e Tabella 7 le quantità teorizzate, in termini di peso e solidi volatili.

Tabella 5 – Configurazioni della DA1

Configurazione (WS:CM)	Acronimo
Inoculo	DA1_I
100:0	DA1_WS
0:100	DA1_CM
50:50	DA1_WS50-CM50
90:10	DA1_WS90-CM10
75:25	DA1_WS75-CM25

Tabella 6 - Quantitativi teorici DA1

Acronimo	WS [g]	CM [g]	I [g]	H ₂ O [g]
DA1_I	0	0	200	0
DA1_WS	7.62	0.00	174.61	17.77
DA1_CM	0	36.59	150.66	12.75
DA1_WS50-CM50	3.53	19.64	161.75	15.07
DA1_WS90-CM10	6.75	4.17	171.88	17.20
DA1_WS75-CM25	5.49	10.20	167.94	16.37

Tabella 7 - VS teorici DA1

Acronimo	VS_{WS} [g]	VS_{CM} [g]	VS_I [g]
DA1_I	0	0	7.54
DA1_WS	6.58	0	6.58
DA1_CM	0	5.68	5.68
DA1_WS50-CM50	3.05	3.05	6.10
DA1_WS90-CM10	5.83	0.65	6.48
DA1_WS75-CM25	4.75	1.58	6.33

Dalle quantità teoriche si è risaliti ai grammi di WS, CM, inoculo e acqua alimentati per ciascuna configurazione (Tabella 8) ed ai rispettivi solidi volatili (Tabella 9).

Tabella 8 - Quantitativi effettivi DA1

Acronimo	WS [g]	CM [g]	I [g]	H₂O [g]
DA1_I	200 200.7 200.4	0	0	0
DA1_WS	7.6 7.6 7.6	0	174.3 174.1 175.1	17.5 17.4 17.6
DA1_CM	0	37.1 37.3 36.7	150.3 150.3 149.9	12.5 13 13.3
DA1_WS50-CM50	3.5 3.5 3.5	20.8 19.7 19.4	162.2 161.2 159.8	15.2 15.4 14.8
DA1_WS90-CM10	6.7 6.7 6.7	4.7 4.2 4.1	171.6 171.1 170.8	17 17.6 17.1
DA1_WS75-CM25	5.5 5.5 5.5	10.4 10.3 10.8	167.9 167.9 168.3	16.8 16.4 16.1

Tabella 9 - VS effettivi DA1

Acronimo	VS _{ws} [g]	VS _{CM} [g]	VS _I [g]
DA1_I	0	0	7.54
			7.57
			7.56
DA1_WS	6.57	0	6.57
	6.57		6.56
	6.57		6.60
DA1_CM	0	5.76	5.67
		5.79	5.67
		5.70	5.65
DA1_WS50-CM50	3.02	3.23	6.12
	3.02	3.06	6.08
	3.02	3.01	6.02
DA1_WS90-CM10	5.79	0.73	6.47
	5.79	0.65	6.45
	5.79	0.64	6.44
DA1_WS75-CM25	4.75	1.61	6.33
	4.75	1.60	6.33
	4.75	1.68	6.35

3.2.7 Seconda campagna sperimentale: effetto dei pretrattamenti chimici sulla paglia

Dalla DA1 sono risultate ottimali le configurazioni contenenti rapporti WS:CM pari a 90:10 e 100:0. Per questa ragione è stata ripetuta una seconda prova di digestione (DA2) andando ad ottimizzare il processo attraverso due campagne sperimentali distinte che coinvolgessero paglia degradata chimicamente per 4 h (WS_{tr}). In alcuni reattori è stata testata la DA della WS_{tr} in assenza di letame, mentre in altri la co-DA 90:10 di paglia trattata e CM.

Complessivamente sono state studiate 7 configurazioni in duplicato: 4 per la WS_{tr} con le soluzioni risultate ottimali tra quelle testate (EtOH 10% per 4h e H₂O₂ 10% per lo stesso tempo), 4 per la co-digestione WS_{tr}:CM in rapporto 90:10, 2 contenenti solo inoculo, 4 con WS tal quale e in rapporto 90:10 con letame (WS:CM).

Visto che è stato utilizzato un inoculo diverso rispetto alla DA1 (proveniente dalla stessa azienda ma prelevato in un secondo momento) si è scelto di rifeffettuare i test sui substrati di partenza (WS tal quale, CM ed I). In Tabella 10 vengono riportati schematicamente tutti e 14 i reattori della seconda prova di digestione.

Tabella 10 - Configurazioni della DA2

Rapporto	Pretrattamento della WS	Configurazione	Acronimo
100:0	H ₂ O ₂ 10% 4h	WS _{tr1}	WS_H2O2_4
	EtOH 10% 4h	WS _{tr2}	WS_EtOH_4
90:10	H ₂ O ₂ 10% 4h	WS _{tr1} + CM	WS90-CM10_H2O2_4
	EtOH 10% 4h	WS _{tr2} + CM	WS90-CM10_EtOH_4
100:0	-	WS	DA2_WS
90:10	-	WS + CM	DA2_WS90-CM10
-	-	Inoculo	DA2_I

3.2.7.1 Effetto pretrattamenti chimici sul rapporto 100:0

Nei digestori con all'interno il rapporto WS_{tr}:CM 100:0 è stata inserita paglia pretrattata chimicamente con le soluzioni aventi la più alta biodisponibilità di nutrienti.

Come nel caso della DA1, si è proceduto calcolando i quantitativi teorici da alimentare nei reattori in termini di peso (Tabella 11) e solidi volatili (Tabella 12) e pesando quelli effettivamente inseriti (Tabella 13 e Tabella 14).

Tabella 11 - Quantitativi teorici DA2 (100:0)

Acronimo	WS [g]	CM [g]	I [g]	H₂O [g]
WS_H2O2_4	7.25	0	119.36	73.39
WS_EtOH_4	7.19	0	120.27	72.54
DA2_WS	7.53	0	119.22	73.25
DA2_I	0	0	200.00	0

Tabella 12 - VS teorici DA2 (100:0)

Acronimo	VS_{ws} [g]	VS_{cm} [g]	VS_i [g]
WS_H2O2_4	6.52	0	6.52
WS_EtOH_4	6.57	0	6.57
DA2_WS	6.51	0	6.51
DA2_I	0	0	10.92

Tabella 13 - Quantitativi effettivi DA2 (100:0)

Acronimo	WS [g]	CM [g]	I [g]	H ₂ O [g]
WS_H2O2_4	7.20	0	120.1	74.8
	7.20		120.0	
WS_EtOH_4	7.19	0	120.0	72.5
	7.20		121.2	
DA2_WS	7.53	0	119.0	73.8
	7.53		119.6	
DA2_I	0	0	200.4	0
			200.5	

Tabella 14 - VS effettivi DA2 (100:0)

Acronimo	VS _{ws} [g]	VS _{CM} [g]	VS _I [g]
WS_H2O2_4	6.47	0	6.56
	6.47		6.55
WS_EtOH_4	6.57	0	6.55
	6.57		6.62
DA2_WS	6.51	0	6.50
	6.51		6.53
DA2_I	0	0	10.94
			10.95

3.2.7.2 Effetto pretrattamenti chimici sul rapporto 90:10

Oltre alle configurazioni WS_{tr}:CM 100:0 sono state create tabelle analoghe con rapporto 90:10 della stessa paglia pretrattata (WS_{tr1} e WS_{tr2}) co-digerita con letame.

In questa seconda campagna sono stati utilizzati come bianchi di confronto WS:CM 90:10 ed inoculo (Tabella 15 e Tabella 16). In Tabella 17 e Tabella 18 sono riportate le quantità effettivamente inserite nei digestori.

Tabella 15 - Quantitativi teorici DA2 (90:10)

Acronimo	WS [g]	CM [g]	I [g]	H ₂ O [g]
WS90-CM10_H2O2_4	6.44	3.94	117.89	71.73
WS90-CM10_EtOH_4	6.39	3.97	118.68	70.96
DA2_WS90-CM10	6.70	4	117.76	71.60
DA2_I	0	0	200.00	0

Tabella 16 - VS teorici DA2 (90:10)

Acronimo	VS_{WS} [g]	VS_{CM} [g]	VS_I [g]
WS90-CM10_H2O2_4	5.79	0.64	6.44
WS90-CM10_EtOH_4	5.83	0.65	6.48
DA2_WS90-CM10	5.79	0.64	6.43
DA2_I	0	0	10.92

Tabella 17 - Quantitativi effettivi DA2 (90:10)

Acronimo	WS [g]	CM [g]	I [g]	H₂O [g]
WS90-CM10_H2O2_4	6.44	3.70	118.40	71.90
	6.45	4.20	119.00	72.90
WS90-CM10_EtOH_4	6.40	4.40	118.40	72.20
	6.39	4.10	118.60	73.80
DA2_WS90-CM10	6.70	4.30	117.10	74.00
	6.70	3.70	122.20	71.60
DA2_I	0	0	200.40 200.50	0

Tabella 18 - VS effettivi DA2 (90:10)

Acronimo	VS_{WS} [g]	VS_{CM} [g]	VS_I [g]
WS90-CM10_H2O2_4	5.79	0.60	6.46
	5.80	0.69	6.50
WS90-CM10_EtOH_4	5.84	0.72	6.46
	5.84	0.67	6.47
DA2_WS90-CM10	5.79	0.70	6.39
	5.79	0.60	6.67
DA2_I	0	0	10.94 10.95

3.2.8 Terza campagna sperimentale: effetto del biochar sulla digestione

È stata eseguita una terza ed ultima prova di digestione (DA3) al fine di valutare se l'aggiunta di biochar, nelle prove con WS non trattata, potesse avere un effetto benefico sulle rese di processo. Anche in questo caso sono state suddivise le configurazioni contenenti paglia non trattata in rapporto 100:0 e quelle con rapporto di co-digestione 90:10 (WS:CM).

Il biochar è stato testato in tre concentrazioni differenti: 2.5, 5 e 10 g/L (rispettivamente BC2.5, BC5, BC10), scelte basandosi su prove di letteratura. Nello studio di *U. A. Ofon et al.* [49] di cinque rapporti testati, il migliore in termini di resa di metano si è dimostrato essere quello al 2% w/V, mentre in quello di *Paritosh et al.* [51] la concentrazione ottimale di BC che garantisce le maggiori rese di biometano era stata ottenuta con 10 g/L. Per tale motivo, in questa tesi, si è preferito alimentare i reattori con un quantitativo pari a 2.5 e 10 g/L di BC più un valore intermedio (pari a 5 g/L). Sono state testate diverse concentrazioni di BC in modo da poter valutare sia un'eventuale azione inibente che quella promotrice del processo.

In Tabella 19 è riportata la conformazione reattoristica della DA3. I bianchi di confronto (DA3_WS, DA3_I e DA3_WS90-CM10) sono gli stessi della DA2 con l'aggiunta di 6 reattori contenenti I + BC nelle tre concentrazioni. Anche in questo caso le prove sono state svolte in duplicato utilizzando lo stesso inoculo della seconda digestione.

Tabella 19 - Configurazioni della DA3

Rapporto (WS:CM)	Concentrazione BC [g/L]	Configurazione	Acronimo
100:0	2.5	WS + BC2.5	WS_BC2.5
	5	WS + BC5	WS_BC5
	10	WS + BC10	WS_BC10
90:10	2.5	WS + CM + BC2.5	WS90-CM10_BC2.5
	5	WS + CM + BC5	WS90-CM10_BC5
	10	WS + CM + BC10	WS90-CM10_BC10
100:0	-	WS	DA3_WS
90:10	-	WS + CM	DA3_WS90-CM10
-	-	Inoculo	DA3_I
-	2.5	Inoculo + BC2.5	I_BC2.5
	5	Inoculo + BC5	I_BC5
	10	Inoculo + BC10	I_BC10

3.2.8.1 Effetto aggiunta biochar sul rapporto 100:0

Analogamente ai paragrafi precedenti si riportano, anche per la DA3, prima le configurazioni 100:0 e successivamente quelle 90:10 di WS:CM. Di seguito sono presenti i quantitativi, in peso e VS, calcolati teoricamente tramite formule (Tabella 20, Tabella 21) e quelli effettivamente immessi nei reattori (Tabella 22 e Tabella 23).

Tabella 20 - Quantitativi teorici DA3 (100:0)

Acronimo	WS [g]	CM [g]	I [g]	H ₂ O [g]	BC [g]
WS_BC2.5					0.5
WS_BC5	7.53	0	119.22	73.25	1
WS_BC10					2
DA3_WS	7.53	0	119.22	73.25	0
DA3_I	0	0	200	0	0
I_BC2.5					0.5
I_BC5	0	0	200	0	1
I_BC10					2

Tabella 21 - VS teorici DA3 (100:0)

Acronimo	VS _{WS} [g]	VS _{CM} [g]	VS _I [g]	VS _{BC} [g]
WS_BC2.5				0.004
WS_BC5	6.51	0	6.51	0.008
WS_BC10				0.016
DA3_WS	6.51	0	6.51	0
DA3_I	0	0	10.92	0
I_BC2.5				0.004
I_BC5	0	0	10.92	0.008
I_BC10				0.016

Tabella 22 – Quantitativi effettivi DA3 (100:0)

Acronimo	WS [g]	CM [g]	I [g]	H₂O [g]	BC [g]
WS_BC2.5	7.53	0	119.10	73.30	0.51
	7.54		119.00	74.00	0.52
WS_BC5	7.53	0	119.10	76.70	1.00
	7.54		119.70	75.50	1.01
WS_BC10	7.54	0	120.50	74.00	2.01
	7.53		119.10	73.60	2.01
DA3_WS	7.53	0	119.00	73.80	0
	7.53		119.60	73.00	
DA3_I	0	0	200.40	0	0
			200.50		
I_BC2.5	0	0	200.90	0	0.51
			204.00		0.52
I_BC5	0	0	200.40	0	1.04
			200.80		1.01
I_BC10	0	0	200.50	0	2.05
			200.60		2.01

Tabella 23 - VS effettivi DA3 (100:0)

Acronimo	VS_{ws} [g]	VS_{CM} [g]	VS_I [g]	VS_{BC} [g]
WS_BC2.5	6.512	0	6.502	0.417
	6.514		6.497	0.422
WS_BC5	6.511	0	6.502	0.814
	6.513		6.535	0.819
WS_BC10	6.512	0	6.579	1.630
	6.510		6.502	1.636
DA3_WS	6.511	0	6.497	0
	6.511		6.529	
DA3_I	0	0	10.94	0
			10.95	
I_BC2.5	0	0	10.968	0.004
			11.137	0.004
I_BC5	0	0	10.941	0.008
			10.962	0.008
I_BC10	0	0	10.946	0.017
			10.952	0.016

3.2.8.2 Effetto aggiunta BC sul rapporto 90:10

Le seconde configurazioni reattoristiche della DA3 hanno testato i tre rapporti w/V di BC in co-DA 90:10 con la paglia macinata mista a letame.

In Tabella 24 si riportano le quantità teorizzate in termini di peso, mentre nella Tabella 25 le stesse inerenti ai solidi volatili. I rispettivi reattori sono stati riempiti effettivamente come indicato nella Tabella 26 e Tabella 27.

Tabella 24 - Quantitativi teorici DA3 (90:10)

Acronimo	WS [g]	CM [g]	I [g]	H ₂ O [g]	BC [g]
WS90-CM10_BC2.5	6.70	3.94	117.76	71.60	0.5
WS90-CM10_BC5					1
WS90-CM10_BC10					2
DA3_WS90-CM10	6.70	3.94	117.76	71.60	0
DA3_I	0	0	200	0	0
I_BC2.5	0	0	200	0	0.5
I_BC5					1
I_BC10					2

Tabella 25 - VS teorici DA3 (90:10)

Acronimo	VS _{ws} [g]	VS _{cm} [g]	VS _i [g]	VS _{bc} [g]
WS90-CM10_BC2.5	5.79	0.64	6.43	0.004
WS90-CM10_BC5				0.008
WS90-CM10_BC10				0.016
DA3_WS90-CM10	5.79	0.64	6.43	0
DA3_I	0	0	10.92	0
I_BC2.5	0	0	10.92	0.004
I_BC5				0.008
I_BC10				0.016

Tabella 26 - Quantitativi effettivi DA3 (90:10)

Acronimo	WS [g]	CM [g]	I [g]	H₂O [g]	BC [g]
WS90-CM10_BC2.5	6.70	4.10	117.50	72.50	0.53
	6.70	4.50	117.60	71.80	0.54
WS90-CM10_BC5	6.70	3.90	117.70	72.10	1.08
	6.70	4.00	117.30	71.50	1.02
WS90-CM10_BC10	6.70	3.80	117.30	71.00	2.03
	6.70	3.50	117.20	71.80	2.06
DA3_WS90-CM10	6.70	4.30	117.10	74.00	0
	6.70	3.70	122.20	71.60	0
DA3_I	0	0	200.40	0	0
			200.50		
I_BC2.5	0	0	200.90	0	0.51
			204.00		0.52
I_BC5	0	0	200.40	0	1.04
			200.80		1.01
I_BC10	0	0	200.50	0	2.05
			200.60		2.01

Tabella 27 - VS effettivi DA3 (90:10)

Acronimo	VS_{WS} [g]	VS_{CM} [g]	VS_I [g]	VS_{BC} [g]
WS90-CM10_BC2.5	5.786	0.669	6.415	0.004
	5.789	0.734	6.420	0.004
WS90-CM10_BC5	5.787	0.636	6.426	0.009
	5.787	0.653	6.404	0.008
WS90-CM10_BC10	5.788	0.620	6.404	0.016
	5.790	0.571	6.398	0.017
DA3_WS90-CM10	5.788	0.702	6.393	0
	5.789	0.604	6.671	0
DA3_I	0	0	10.941	0
			10.946	
I_BC2.5	0	0	10.968	0.004
			11.137	0.004
I_BC5	0	0	10.941	0.008
			10.962	0.008
I_BC10	0	0	10.946	0.017
			10.952	0.016

3.3 Tecniche analitiche per la caratterizzazione del biogas

Per monitorare la produzione di biogas delle tre digestioni sono stati utilizzati due gascromatografi di laboratorio: Micro-GC SRA (per la DA1) ed INFICON Micro-GC Fusion® (per la DA2 e DA3). In entrambi gli strumenti, l'analisi è stata effettuata direttamente sulla sacca Tedlar® per quantitativi superiori a 20 mL, diversamente il gas è stato prelevato tramite siringa e spiazzato nel macchinario. Le tecniche analitiche per la caratterizzazione del biogas sono state due: una qualitativa (gascromatografia) allo scopo di stabilire le frazioni costituenti la miscela, l'altra quantitativa che ne stimasse l'ammontare di CH₄ per graficarne la curva cumulata.

3.3.1 Gascromatografia

La gascromatografia (GC) è una tecnica analitica volta principalmente alla separazione, identificazione e quantificazione dei composti organici volatili (VOC, dall'acronimo inglese "*Volatile Organic Compounds*") costituenti una miscela. Viene eseguita mediante un apposito macchinario, chiamato gascromatografo, formato da un forno termostatabile contenente un tubo capillare in vetro, generalmente avvolto a spirale, costituito da un sottile strato stazionario con una certa affinità con la miscela da analizzare. Tale apparato prende il nome di colonna cromatografica. Il campione viene introdotto nella colonna attraverso un iniettore riscaldato, assieme ad un flusso di gas inerte (solitamente costituito da He, N₂ o H₂). A seguito dell'interazione di ogni componente con la fase fissa, i differenti gas analizzati vengono separati fra loro. Quanto più è alta l'affinità con la fase stazionaria tanto più sarà ritardato il tempo di fuoriuscita dalla colonna; viceversa, i composti meno interagenti saranno quelli con il minor tempo di ritenzione. Confrontando i tempi di ritenzione sperimentali e quelli di riferimento (impostati durante la taratura del macchinario) è possibile identificare la composizione della miscela attraverso un rivelatore (*detector*). Quest'ultima misura la quantità di sostanza presente restituendo in output un cromatogramma con ascissa pari al tempo di ritenzione e ordinata contenente l'intensità del segnale. In particolare, i composti d'interesse, di cui si è andati a calcolare le quantità tramite picchi, sono stati CH₄, CO₂, N₂, H₂, O₂.

Nell'immagine seguente (Figura 10) è rappresentato schematicamente un gascromatografo.

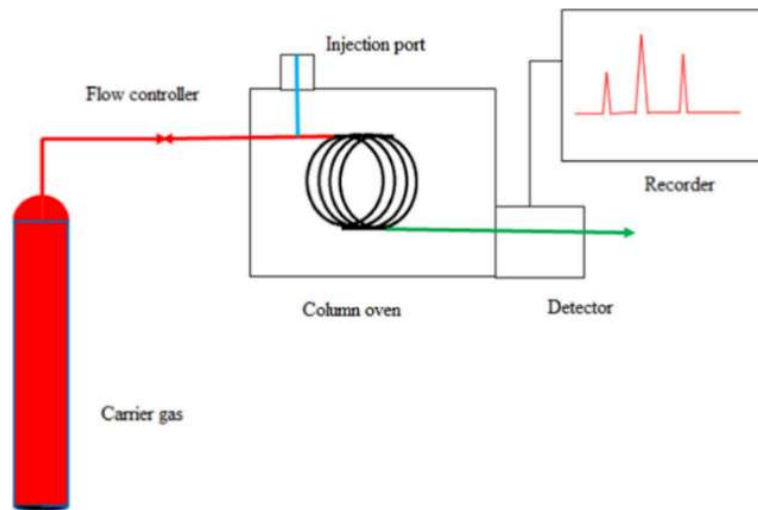


Figura 10 - Schema generico funzionamento di un GC [52]

Nella DA1 è stato utilizzato un gascromatografo dotato di colonna Molsieve 5A operante a 100 °C e 30 psi, con una temperatura di iniezione del gas di 90 °C ed utilizzante Ar come gas di trasporto (SRA Instruments, Italia, micro-GC). Per la DA2 e la DA3 è stato impiegato un GC differente (illustrato in Figura 11) equipaggiato con colonne Molsieve 5A e U-bond a 120 °C ed avente una temperatura di iniezione di 100 °C con Ar ed He come *carrier* gassosi (INFICON micro-GC Fusion®, Svizzera) [53].



Figura 11 - INFICON micro-GC Fusion®

Esistono diverse tipologie di rivelatori per GC, i più comuni sono i seguenti: *Thermal Conductivity Detector* (TCD) utilizzato per un'ampia gamma di sostanze (incluso il biogas di DA), *Flame Ionization Detector* (FID) impiegato nel caso di VOC, *Photoionization Detector* (PID) per composti aromatici ed olefinici e *Mass Spectrometer* (MS) adoperato per analisi complesse che richiedono un'identificazione molecolare più dettagliata.

Entrambi i GC di questo lavoro hanno rivelato i composti gassosi mediante tecnologia TCD.

3.3.2 Produzione di biogas

Un indicatore chiave per valutare il potenziale di un substrato (S) è esplicitato attraverso l'equazione (3.4), che formula la produzione netta di biogas generata da S, espressa in NL/kg_{VS,S}:

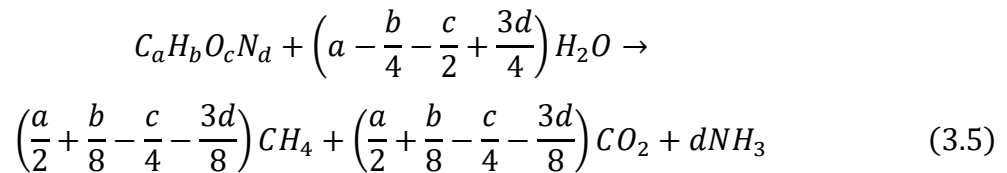
$$Net\ Biogas\ Production_{,S} \left[\frac{NL}{kg_{VS,S}} \right] = \frac{BP_{I+S}[NL] - BP_I \left[\frac{NL}{kg_{VS,I}} \right] \cdot VS_I}{VS_S[kg_{VS,S}]} \quad (3.4)$$

BP_{I+S} rappresenta la Produzione di Biogas dell'inoculo miscelato al substrato mentre BP_I quella riferita al solo inoculo. Il risultato di quest'equazione varia notevolmente a seconda del tipo di pretrattamento, substrato utilizzato e condizioni di DA [54].

Un altro importante parametro di valutazione è il Potenziale Teorico di Biometano (TBMP, *Theoretical Biochemical Methane Potential*) necessario per prevedere il massimo valore teorico di biometano ottenibile; senza tener conto di eventuali limitazioni dovute alla raccolta del S, all'efficienza di pretrattamento e alle condizioni di digestione.

Il TBMP è indice della resa di biometano per VS massima, ottenuta ipotizzando un completo trasferimento del carbonio organico della biomassa in CH₄ e CO₂ [55].

A tal proposito è stata utilizzata la formula proposta da *Buswell e Mueller* (3.5), già utilizzata in altri studi bibliografici [55] [56], [57] contenente la composizione della biomassa di partenza.



$$TBMP \left[\frac{Nm^3}{kg_{VS}} \right] = \frac{\left(\frac{a}{2} + \frac{b}{8} - \frac{c}{4} - \frac{3d}{8} \right) \cdot V_m}{12.011a + 1.008b + 15.999c + 14.007d} \quad (3.6)$$

V_m è il volume molare di CH₄ in condizioni standard (273.15 K e 1 atm).

Considerando le condizioni di DA reali non si avrà completa degradazione della biomassa da parte dei microrganismi. Per calcolare il *Practical Biochemical Methane Potential* (PBMP), ovvero il potenziale biochimico reale di metano, è importante tener conto della biodegradabilità (BD) del substrato. Secondo *Liu et al.* [55] esiste una relazione lineare tra il contenuto di lignina $C_{lignina}$ (espresso in % in peso di VS) e BD, nel caso di reflui zootecnici e matrici lignocellulosiche:

$$BD = 80.4 - 2.7 \cdot C_{lignina} \quad (3.7)$$

$$PBMP = TBMP \cdot BD \quad (3.8)$$

Conoscendo il TBMP è possibile inoltre ricavare il quantitativo specifico di biogas prodotto

(BPS, *Biogas Specific Production*) come segue:

$$BPS \left[\frac{Nm^3}{kg_{VS}} \right] = \frac{TBMP}{\left(\frac{1}{2} + \frac{b}{8a} - \frac{c}{4a} - \frac{3d}{8a} \right)} \quad (3.9)$$

3.4 Caratterizzazione dei substrati iniziali e digestati finali

Per valutare l'efficienza del processo di DA è stato essenziale effettuare alcune analisi sui substrati iniziali e sui digestati prelevati a metà e fine prova. Ciò ha permesso di valutare l'ammontare di sostanza organica degradata, la composizione chimica, la stabilità del digestato, il contenuto di nutrienti (in termini di azoto, fosforo, potassio) e la presenza di patogeni e metalli pesanti per un eventuale utilizzo sicuro in ambito agronomico.

Per le matrici solido-liquide di inizio e fine DA sono state eseguite tre caratterizzazioni distinte: misura del pH, analisi elementare CHNS(O), quantificazione di Solidi Totali (TS) e Solidi Volatili (VS/TS).

3.4.1 pH

Il pH (acronimo di “potenziale di idrogeno”) è indice del grado di acidità o basicità di una soluzione acquosa. Viene definito come logaritmo decimale negativo della concentrazione di ioni H⁺ in soluzione:

$$pH = -\log_{10}[H^+] \quad (3.10)$$

È uno dei parametri di maggiore interesse, dal momento che ciascuna delle fasi di digestione richiede requisiti specifici nei quali i microrganismi possano operare. Questo valore è influenzato dalla presenza di CO₂ nel mezzo liquido, dalla concentrazione di acidi grassi volatili (VFA) e di ammoniaca (NH₃). Il pH ottimale per l'intero processo è compreso tra 6 e 8, con un range di stabilità che varia idealmente tra 6.5 e 7.5 [9].

Nelle prove di DA al di fuori dell'intervallo di stabilità, si è andati a correggere l'alcalinità del sistema attraverso una soluzione di HCl 5M in quantitativi tali da riportare il pH ad un valore inferiore a 7.5. Tutte le misurazioni sono state effettuate con un pHmetro da laboratorio (Pc 80 + DHS, XS Instruments) sul digestato tal quale. Avendo a che fare con matrici eterogenee lo strumento è stato immerso a circa metà del volume di lavoro, dopo aver effettuato la miscelazione manuale dei singoli reattori batch.

Nella DA1 durante la misura del pH intermedio sono stati prelevati circa 5 mL di materiale per analisi successive, mentre per la DA2 e DA3 lo stesso quantitativo è stato prelevato pre e post-acidificazione (rispettivamente dopo 14 e 20 giorni). A seguito di questo intervento i reattori sono stati nuovamente incubati per circa due giorni senza effettuare analisi sul biogas, in modo da ripristinare quanto più velocemente possibile le condizioni anaerobiche dei microrganismi.

3.4.2 Analisi elementare CHNS(O)

L'analisi elementare, denominata anche CHNS(O), è una tecnica analitica utilizzata per determinare la composizione percentuale di un campione, solitamente organico, in termini di carbonio (C), idrogeno (H), azoto (N), zolfo (S) ed ossigeno (O).

Viene impiegata in diversi settori, tra cui quello alimentare, farmaceutico, dei biocarburanti o per svolgere controlli di qualità. Può essere inoltre utilizzata per identificare la formula chimica di composti sconosciuti, determinare la purezza di un materiale o effettuare analisi più approfondite in ambito ambientale (es. suoli, biomasse e rifiuti).

Il metodo più utilizzato prevede la combustione completa del campione a temperature elevate (~1000 °C) trasformandone gli elementi costitutivi in composti gassosi: il carbonio si ossida a CO₂, l'idrogeno origina H₂O mentre N e S rispettivamente NO_x ed SO₂.

I prodotti di combustione vengono successivamente separati all'interno di una colonna gascromatografica collegata ad un rivelatore TCD che ne determina la concentrazione.

Nell'ambito del presente studio, l'analisi elementare è stata effettuata sui substrati secchi (WS tal quale, WS_{tr} con le due soluzioni scelte, CM, BC, inoculi) e sui digestati finali dei tre processi anaerobici. Conoscendo le percentuali dei singoli elementi è stato possibile ricavare il rapporto carbonio:azoto (C/N) contenuto nei reattori all'inizio e alla fine delle tre campagne sperimentali. Ciò ha premesso non solo di comprendere l'equilibrio nutrizionale all'interno dei digestori, ma anche le percentuali di composti disponibili necessari per stimare la massima resa teorica di biometano (equazioni 3.5 e 3.6 del paragrafo 3.3.2).

Per calcolare il quantitativo C/N alimentato all'interno dei reattori di inizio digestione è stata usata la seguente formula:

$$\left(\frac{C}{N}\right)_S = \frac{C_{WS} [\%] \cdot TS_{WS} [g] + C_{CM} [\%] \cdot TS_{CM} [g]}{N_{WS} [\%] \cdot TS_{WS} [g] + N_{CM} [\%] \cdot TS_{CM} [g]} \quad (3.11)$$

Ciascun campione è stato preparato con circa 20 mg di materiale secco in rapporto 1:2 con ossido di tungsteno, chiuso in un foglietto di alluminio a formare le pastiglie da analizzare. Il macchinario di laboratorio (Elemental macro-cube system Vario, Germany) ha effettuato la combustione a circa 1150 °C in ambiente ricco di ossigeno, restituendo i risultati in termini di percentuale. Una volta calcolati i quantitativi di C, H, N, S è stata determinata la percentuale di O facendo il complemento a cento della somma dei singoli elementi e delle ceneri.

3.4.3 Solidi totali, volatili e ceneri

Nell'ambito dell'ingegneria chimica ed ambientale l'analisi dei solidi totali e volatili riveste un ruolo fondamentale per la caratterizzazione di matrici complesse quali biomasse, acque, fanghi e suoli. I Solidi Totali (TS) costituiscono l'insieme di tutta la frazione solida di un campione, misurata a seguito del processo di evaporazione, condotto a temperature elevate (105 °C). La frazione dei TS sottoposta a combustione a temperature di 550-600 °C che va incontro a gassificazione prende invece il nome di Solidi Volatili (VS/TS). Quest'ultima rappresenta approssimativamente la sostanza organica contenuta nel campione, differenziandosi dal residuo inerte che prende il nome di cenere.

In questo lavoro, il contenuto di TS e VS/TS è stato misurato secondo il metodo APHA del 2006. Il materiale da analizzare è stato posto in stufa a 105 °C per 24 h (U110, Memmert, Germany) in modo da poterne determinare il peso secco (W_D , dall'acronimo inglese "Dry Weight") e di conseguenza l'umidità iniziale, per differenza col peso iniziale (W).

$$\text{Solidi Totali [\%]} = TS [\%] = \frac{W_D}{W} \cdot 100 \quad (3.12)$$

$$\text{Umidità [\%]} = \frac{W - W_D}{W} \cdot 100 \quad (3.13)$$

Questi parametri sono stati calcolati per l'inoculo, la WS (trattata e non), il letame ed il biochar. I solidi totali associati ai singoli substrati verranno indicati nelle prossime formule rispettivamente come TS_I , TS_{WS} , TS_{CM} . Mettendo i campioni secchi in forno a 550 °C per 6 h, con una rampa di riscaldamento di 5 °C/min, sono stati determinati i solidi volatili riferiti alla frazione secca (VS/TS).

$$\text{Solidi Volatili [\%]} = \frac{VS}{TS} [\%] = \frac{W_D - W_A}{W} \cdot 100 \quad (3.14)$$

Nella formula soprastante (3.14), con W_A s'intende il peso delle ceneri ("Ashes Weight") ottenuto pesando il residuo post forno. Come per i TS, anche in questo caso sono stati calcolati i valori dell'inoculo $\left(\frac{VS}{TS}\right)_I$, della paglia $\left(\frac{VS}{TS}\right)_{WS}$, del letame $\left(\frac{VS}{TS}\right)_{CM}$ e del biochar $\left(\frac{VS}{TS}\right)_{BC}$. Con la formula seguente si ottengono le ceneri percentuali:

$$\text{Ceneri [\%]} = \frac{W_A}{W_D} \cdot 100 \quad (3.15)$$

I solidi alimentati nel reattore sono stati quantificati come segue:

$$TS_{alimentati} [g] = V_L [mL] \cdot TS [\%] \quad (3.16)$$

Per determinare i quantitativi di substrato tal quali, da inserire nei reattori, sono stati utilizzati due dati di progetto: $TS_{alimentati} = 8\%$ e rapporto S:I unitario ($VS_I = VS_S$). Conoscendo i TS alimentati è stato possibile ricavare quindi il contenuto di VS/TS alimentati. Trattandosi di co-digestione, avendo a che fare con un substrato composto da WS, CM aggiunto ad inoculo, si è prima dovuto calcolare il quantitativo di VS (su base secca) apportato da ciascuna sostanza, in relazione al rapporto WS:CM stabilito. Chiamando x_i la frazione di ciascun substrato (WS e CM) rispetto a quello totale co-digerito si ottiene:

$$VS_{alimentati} [g] = \frac{TS_{alimentati} [g]}{\sum_i \frac{x_i}{\left(\frac{VS}{TS}\right)_i [\%]} + \frac{1}{\left(\frac{VS}{TS}\right)_I [\%]}} = \frac{TS_{alimentati} [g]}{\left(\frac{x_{CM}}{\left(\frac{VS}{TS}\right)_{CM} [\%]} + \frac{x_{WS}}{\left(\frac{VS}{TS}\right)_{WS} [\%]}\right) + \frac{1}{\left(\frac{VS}{TS}\right)_I [\%]}} \quad (3.17)$$

$$VS_{CM} [g] = x_{CM} \cdot VS_{alimentati} [g] \quad (3.18)$$

$$VS_{WS} [g] = x_{WS} \cdot VS_{alimentati} [g] \quad (3.19)$$

$$VS_I [g] = VS_{CM} [g] + VS_{WS} [g] \quad (3.20)$$

$$VS_{BC} [g] = x_{i,BC} \cdot VS_{BC} [g] \quad (3.21)$$

dove $x_{i,BC}$ fa riferimento ai quantitativi pesati di BC da inserire (0.5, 1, 2 g).

$$TS_{CM} [g] = \frac{VS_{CM} [g]}{\left(\frac{VS}{TS}\right)_{CM} [\%]} \quad (3.22)$$

$$TS_{WS} [g] = \frac{VS_{WS} [g]}{\left(\frac{VS}{TS}\right)_{WS} [\%]} \quad (3.23)$$

$$TS_I [g] = \frac{VS_I [g]}{\left(\frac{VS}{TS}\right)_I [\%]} \quad (3.24)$$

Le quantità tal quali di letame, paglia ed inoculo da alimentare teoricamente in ciascun reattore sono espressi con le tre formule seguenti:

$$CM_{alimentato} = CM [g] = \frac{TS_{CM} [g]}{TS_{CM} [\%]} \quad (3.25)$$

$$WS_{alimentata} = WS [g] = \frac{TS_{WS} [g]}{TS_{WS} [\%]} \quad (3.26)$$

$$Inoculo = I [g] = \frac{TS_I [g]}{TS_I [\%]} \quad (3.27)$$

Noti questi parametri è possibile calcolare il quantitativo di acqua da aggiungere per raggiungere la percentuale di TS stabilita:

$$Acqua [g] = V_w - (CM [g] + WS [g] + I [g]) \quad (3.28)$$

3.5 Caratterizzazione dei digestati per applicazioni agronomiche

La caratterizzazione dei digestati per applicazioni agronomiche consiste in un insieme di analisi volte a determinare il contenuto di macronutrienti (azoto, fosforo e potassio), composti organici ed altre sostanze (metalli pesanti, patogeni, sali) al fine di valutare l' idoneità del digestato all'impiego agronomico: come fertilizzante, ammendante o biostimolante.

In questo lavoro le analisi sono state effettuate su quattro digestati, scelti tra le configurazioni più performanti in termini di biometano nelle tre prove di digestione. Nel riquadro di seguito (Tabella 28) sono riportate le configurazioni su cui si è scelto di attuare tale caratterizzazione.

Tabella 28 - Configurazioni per la caratterizzazione dei digestati

Configurazione	Acronimo	Campagna sperimentale
100:0	DA1_WS	DA1
90:10	DA1_WS90-CM10	
WS _{tr1}	WS_H2O2_4	DA2
WS + BC5	WS_BC5	DA3

È stato necessario separare la frazione solida (palabile) da quella liquida (chiarificato) attraverso una centrifugazione a 5000 rpm per 15 min a temperatura di 15 °C (centrifuga Thermo Scientific 16R). Il chiarificato è stato diluito opportunamente con $H_2O_{distillata}$, per poter rientrare nei range di calibrazione dei kit chimici. I principali macronutrienti presenti nel digestato sono stati determinati attraverso i seguenti kit di laboratorio (Tabella 29):

Tabella 29 - kit chimici Hach Company per il chiarificato dei digestati migliori

Composto	Formula chimica	Range [mg/L]	Hach Company code
Potassio	K	5-50	LCK 228
Fosforo	P	2-20	LCK 350
Azoto totale	N _{tot}	20-100	LCK 338
Ammonio	NH ₄ ⁺	2-47	LCK 303
Nitrati	NO ₃ ⁻	5-35	TNT 836

3.6 Test di germinazione

Per valutare la qualità del digestato in termini di fitotossicità (presenza di sostanze tossiche per le piante) è stato eseguito un test di germinazione con semi di crescione (*Lepidium Sativum*, BLUMEN Group S.p.A). L'impostazione della prova si è basata sul protocollo dell'Istituto di Ricerca sulle Acque – Consiglio Nazionale delle Ricerche (IRSA-CNR, 1985).

Prima di iniziare il test, i semi sono stati lasciati ad incubare in acqua distillata per 1 h, in modo tale da garantire una corretta idratazione e favorire la germinazione successiva.

Il chiarificato delle quattro configurazioni ottimali (riportate in Tabella 28 paragrafo 3.5) è stato ottenuto mediante centrifugazione del digestato a 15 °C e 4000 rpm (centrifuga Thermo Scientific 16R). Ciascun estratto liquido è stato poi diluito con acqua Milli-Q in sei concentrazioni: 1, 5, 10, 15, 25, 50 (% V/V).

Nella Figura 12 sono mostrate a scopo esemplificativo le sei concentrazioni ottenute a partire dal digestato della prova condotta con WS pretrattata con H₂O₂ 10% delle 4 h (WS_H2O2_4).



Figura 12 - Chiarificato liquido di WS_H2O2_4 per test di germinazione

Sono state impiegate capsule Petri di plastica sterile con al fondo un filtro di carta Whatman® n. 1 da 90 mm di diametro, imbevuto con 5 mL di soluzione test. In ciascun contenitore sono stati posti dieci semi di crescione distanziati sufficientemente, per favorire il corretto sviluppo dell'apparato radicale. Per ogni concentrazione è stato eseguito il quadruplicato per un totale di 96 capsule a cui si aggiunge quella contenente H₂O, come bianco di confronto (Figura 13).



Figura 13 - Capsule Petri per il test di germinazione

Le piastre Petri sono state sigillate con nastro adesivo (modelli a sistema chiuso) ed incubate al buio a 25 ± 1 °C per 72 h [58], [59]. Al termine del periodo d'incubazione è stato possibile calcolare l'indice di germinazione (*Germination Index*, GI) combinando la lunghezza radicale ed il numero dei semi germinati. Secondo il metodo UNI CHIM 1651:2003 si considerano germinati i semi la cui lunghezza della radice ha raggiunto un valor minimo di 0.5 mm.

$$GI [\%] = \frac{G_l \cdot L_l}{G_c \cdot L_c} \cdot 100 \quad (3.29)$$

G_l numero di semi germinati nel campione

L_l lunghezza radicale del campione [mm]

G_c numero di semi germinati nel controllo

L_c lunghezza radicale del controllo [mm]

4. Risultati e discussione

4.1 Composizione delle matrici iniziali

Per caratterizzare le matrici di partenza è stata effettuata l'analisi dei TS, VS/TS e il CHNS(O) per ciascuna delle tre campagne sperimentali. Nella Tabella 30 sono riportati i risultati relativi alle percentuali di TS e VS/TS inserite nei reattori della DA1.

Tabella 30 - Composizione matrici della DA1

Substrato	Acronimo	TS [%]	VS/TS [%]
Inoculo	II	5.15 ± 0.31	73.25 ± 0.77
Letame	CM1	22.53 ± 0.89	68.88 ± 0.66
Paglia macinata	WS	92.08 ± 0.17	93.86 ± 0.36

I valori inerenti alla WS ed inoculo sono comparabili con quelli di letteratura [26], [44], [60]. Per quanto concerne il letame invece, si ottengono risultati leggermente maggiori rispetto a *Song e Zhang* [44], che hanno ottenuto $13.7 \pm 1.4\%$ per i TS e $66.2 \pm 2.9\%$ per VS/TS. Possiamo spiegare tale discrepanza affermando che il CM utilizzato in questa tesi conteneva tracce di WS che, nonostante si sia cercato manualmente di rimuovere, ne hanno innalzato il tenore di solidi. Di seguito sono tabulate le analisi elementari delle tre sostanze (Tabella 31):

Tabella 31 - Analisi elementare sulle matrici della DA1

Acronimo	N [%]	C [%]	H [%]	S [%]	O [%]	C/N
I1	2.83 ± 0.22	36.33 ± 0.77	4.15 ± 0.02	0.57 ± 0.02	29.38 ± 0.80	12.91 ± 1.22
CM1	2.50 ± 0.06	30.16 ± 0.51	3.64 ± 0.11	0.58 ± 0.02	31.99 ± 0.53	12.06 ± 0.45
WS	0.56 ± 0.04	41.72 ± 0.06	5.88 ± 0.19	0.55 ± 0.21	45.15 ± 0.30	74.27 ± 5.37

Avendo eseguito il CHNS(O) sulle matrici secche, la percentuale di ossigeno è stata ricavata come complemento a cento della sommatoria delle singole percentuali elementari e del contributo percentuale delle ceneri. Nelle tre digestioni è stata usata la stessa WS macinata, mentre la DA2 e la DA3 condividono anche inoculo e letame. Nel lavoro di *Song et al.* [44] sono stati ottenuti rapporti C/N della paglia e del letame rispettivamente pari a 88.1 ± 4.5 e 16.6 ± 1.1 . Anche rispetto all'articolo di *Zhang et al.* [60] sono risultate percentuali elementari differenti nel caso specifico della paglia (2.02 ± 0.00 per N e 33.6 ± 0.01 per il carbonio). Dato che la WS utilizzata per la DA1 ha quantitativi di azoto maggiori, è plausibile aver ottenuto rapporti C/N inferiori rispetto a quelli dei due *paper* di confronto, sia per quanto riguarda la WS che per il CM. Numerosi studi di letteratura hanno inoltre dimostrato che la composizione elementare della paglia varia notevolmente in base alla posizione geografica e alle condizioni climatiche [61], [62] pertanto, dal momento che i due articoli precedentemente citati [44], [60] utilizzano paglia raccolta a Shaanxi (in Cina) è più che plausibile aver ottenuto percentuali elementari differenti. A differenza della DA1, l'inoculo alimentato nei reattori della seconda e terza digestione ha un quantitativo maggiore di TS e leggermente inferiore di VS/TS (Tabella 32). Si nota che i TS hanno valori confrontabili per quanto riguarda la paglia pretrattata, risultando leggermente superiori alla WS tal quale. Un discorso analogo può essere fatto per i VS/TS a prova del fatto che i pretrattamenti chimici sono responsabili di un degrado maggiore della struttura lignocellulosica della paglia. Trattandosi di un prodotto commerciale pirolizzato a 700 °C (UK Biochar Research Centre) è stato adoperato un BC sottoforma di pellets secchi. Per tale motivo il quantitativo di TS imposto è stato massimo, misurando solamente i VS/TS percentuali.

Tabella 32 - Composizione matrici delle DA2 e DA3

Substrato	Acronimo	TS [%]	VS/TS [%]
Inoculo	I2	7.60 ± 0.26	71.80 ± 0.50
	I3		
Letame	CM2	22.36 ± 0.89	73.00 ± 0.66
	CM3		
Paglia macinata	WS	92.08 ± 0.17	93.86 ± 0.36
Paglia trattata con H ₂ O ₂ 10% di 4 h	WS _{tr1}	95.54 ± 0.46	94.12 ± 2.74
Paglia trattata con EtOH 10% di 4 h	WS _{tr2}	95.29 ± 0.05	95.79 ± 0.05
Biochar	BC	100	81.26 ± 0.01

Nella Tabella 33 è mostrato il CHNS delle biomasse alimentate in DA2 e DA3. Si notano valori simili tra la WS tal quale e quella pretrattata con le due soluzioni, fatta eccezione per le percentuali di H (minori nella WS trattata chimicamente con entrambe le soluzioni) e per il rapporto C/N della WS_{tr1}, che registra un decremento percentuale di 22.3 rispetto alla WS tal quale. Anche in questo caso, le percentuali di ossigeno sono ricavabili conoscendo l'apporto elementare di C, H, N, S e delle ceneri.

Il letame prelevato per la DA2 e la DA3, nonostante fosse stato fornito dalla stessa azienda ha un tenore di carbonio/azoto superiore rispetto alla DA1 e ai valori trovati in letteratura [44].

Tabella 33 - Analisi elementare matrici delle DA2 e DA3

Acronimo	N [%]	C [%]	H [%]	S [%]	O [%]	C/N
I2 I3	2.97 ± 0.10	37.61 ± 1.84	3.35 ± 0.71	1.23 ± 0.56	26.64 ± 2.05	13.22 ± 0.22
CM2 CM3	2.55 ± 0.01	35.17 ± 0.51	2.76 ± 0.05	1.25 ± 0.05	31.28 ± 0.51	13.79 ± 0.13
WS	0.56 ± 0.04	41.72 ± 0.06	5.88 ± 0.19	0.55 ± 0.21	45.15 ± 0.30	74.27 ± 5.37
WS _{tr1}	0.85 ± 0.09	43.73 ± 0.42	3.35 ± 0.00	0.42 ± 0.09	45.77 ± 0.44	51.75 ± 5.34
WS _{tr2}	0.59 ± 0.08	43.30 ± 0.76	3.34 ± 0.00	0.26 ± 0.03	48.30 ± 0.76	74.02 ± 11.2
BC	1.01	67.89	1.52	0.29	29.29	67.01

Per quanto riguarda l'analisi elementare effettuata sul BC, come si evince dalla Tabella 33, sono stati confermati i valori forniti dal produttore (Tabella 34) [63]. L'unica eccezione riguarda il contenuto di ossigeno e la conduttività ionica, pari a 4.49 mS/cm (calcolata sull'estratto diluito in rapporto 1:10 g/mL). Il pH misurato in laboratorio risulta essere 9.96 ed è confrontabile con quello fornito dai produttori.

In questo lavoro sono stati presi a modello i valori ottenuti sperimentalmente in laboratorio, accreditati ulteriormente da studi di letteratura, sia per quanto riguarda le percentuali elementari [64] che per conducibilità elettrica e pH [65].

Oltre all'analisi chimica ed elementare, l'*UK Biochar Research Centre* [63] ha fornito anche le specifiche di tossicità del BC (Tabella 35).

Tabella 34 - Specifiche del BC commerciale (UK Biochar Research Centre [63])

Specifiche commerciali del biochar	
Umidità [% w/w]	2.17 ± 0.22
C _{tot} [%]	69.04 ± 1.32
H [%]	1.18 ± 0.04
O [%]	5.30 ± 1.06
H/C _{tot}	0.20 ± 0.01
O/C _{tot}	0.06 ± 0.01
Ceneri [%]	23.82 ± 2.33
pH	10.03 ± 0.19
Conducibilità elettrica [dS/m]	1.52 ± 0.42
Stabilità del carbonio	100.97 ± 0.21
P _{tot}	0.25 ± 0.10
K _{tot}	1.47 ± 0.77
Superficie totale	23.20 ± 0.01

Tabella 35 - Specifiche di tossicità del BC commerciale (UK Biochar Research Centre [63])

Report di tossicità	[mg/kg] su base secca
Idrocarburi policiclici aromatici (IPA)	< 0.11
Diossine/Furani	1.8
Bifenili policlorurati (PCB)	0.001
As	1.26
Cd	1.27
Cr	4.45
Co	1.58
Cu	4.68
Pb	sotto i limiti di rilevamento
Hg	sotto i limiti di rilevamento
Mo	3.26
Ni	2.5
Se	sotto i limiti di rilevamento
Zn	12.03

4.2 Pretrattamenti della paglia

Per scegliere le soluzioni ed il rispettivo tempo ottimale di pretrattamento sulla paglia, sono stati monitorati tre parametri: pH, COD e velocità di degradazione della sostanza organica (DR_{CODt} , dall'inglese *Disintegration Rate of total COD*) espressi di seguito in Tabella 36.

Tabella 36 -Valori di COD, *Disintegration Rate* (DR_{CODt}) e pH per ciascun pretrattamento

Pretrattamento	Concentrazione [% w/V]	Tempo [h]	COD effettivo [g/L]	DR_{CODt} [%]	pH
NaOH	2.5	4	36.60	92.69	13.79
		8	170.00	96.79	13.70
		24	40.60	55.67	13.68
	5	4	42.70	93.74	13.89
		8	182.60	97.02	13.87
		24	49.40	63.56	13.85
	10	4	54.20	95.06	13.93
		8	91.80	94.06	13.92
		24	51.00	64.71	13.90
EtOH	2.5	4	33.15	91.93	5.81
		8	142.40	96.17	5.50
		24	34.80	48.28	5.14
	5	4	49.65	94.61	5.74
		8	166.60	96.73	5.56
		24	41.80	56.94	5.51
	10	4	174.60	98.47	5.96
		8	227.00	97.60	5.85
		24	254.50	92.93	5.73
H ₂ O ₂	2.5	4	21.35	87.47	5.29
		8	43.00	87.33	5.17
		24	13.20	6.36	5.34
	5	4	39.60	93.24	5.20
		8	68.50	92.04	5.17
		24	19.40	7.22	5.02
	10	4	89.20	97.00	5.08
		8	74.80	92.71	5.06
		24	44.10	59.18	4.75

Come si evince dalla Tabella 36 e dalla Figura 14, i valori di COD, a parità di soluzione e tempo di trattamento, incrementano con l'aumentare della concentrazione del solvente in tutte e le configurazioni studiate. Lo stesso fenomeno si osserva per il DR_{COD_t} . È importante notare che un periodo di pretrattamento prolungato non è necessariamente indice di una maggior degradazione organica: nel caso dell'acqua ossigenata infatti, tutte e tre le concentrazioni applicate per 24 h, registrano i più bassi valori di DR_{COD_t} . Il perossido di idrogeno, infatti è un agente ossidante molto forte, la cui azione ha effetto sulle componenti strutturali della WS (lignina e cellulosa). Diversi studi hanno dimostrato che alte concentrazioni ed elevati tempi di permanenza, comportano un'eccessiva ossidazione della sostanza organica, che viene resa inaccessibile ai microrganismi operanti nei processi biologici successivi [66], [67].

Anche nel nostro caso i valori risultano concordi con il suddetto fenomeno, in particolare si evince come con ciascuna delle tre concentrazioni, un trattamento di 24 h con H_2O_2 riduca eccessivamente le sostanze organiche biodisponibili. L'effetto di decomposizione massimo culmina raggiungendo il pH minimo di 4.75 (H_2O_2 10% delle 24 h). Si può fare un discorso analogo per l'idrossido di sodio, di cui complessivamente risultano buoni valori di DR_{COD_t} per tempi di pretrattamento di 4 e 8 h in ciascuna delle tre concentrazioni.

L'etanolo è l'unico solvente che presenta un elevato valore di DR_{COD_t} alla massima concentrazione e tempo di pretrattamento, nonostante si abbassi di valore all'aumentare delle ore di trattamento.

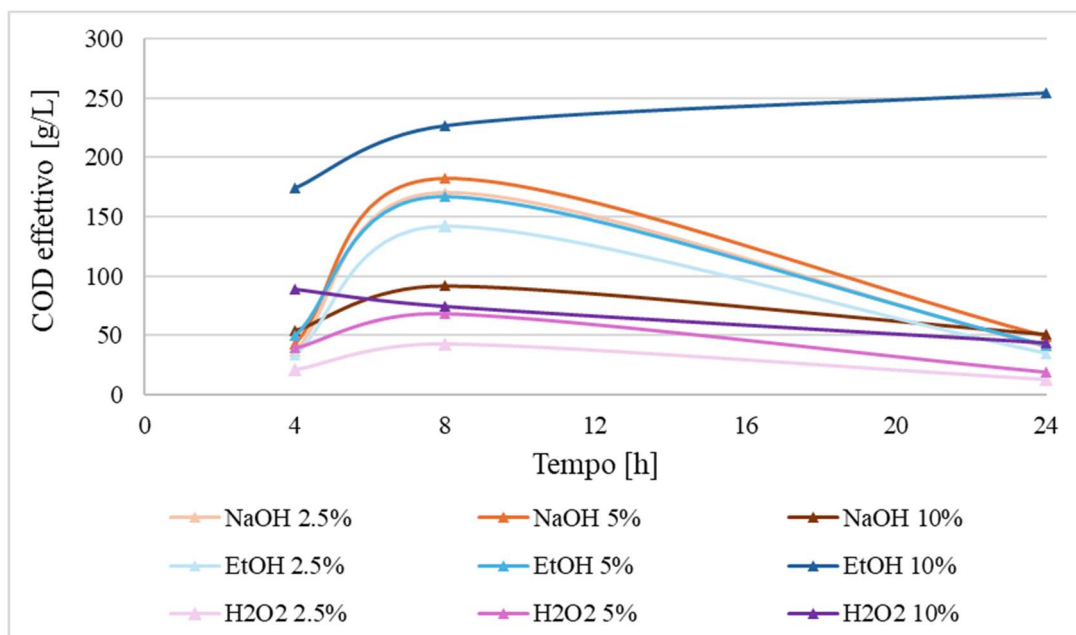


Figura 14 - COD misurato a seguito dei pretrattamenti sulla WS

Per individuare i parametri che massimizzassero il COD, in termini di concentrazione, solvente e tempo di pretrattamento, sono stati effettuati due Design of Experiments (D.o.E.) differenti:

✓ D.o.E. 1: prova con due parametri (Solvente e tempo)

I parametri di input inseriti sono stati il tempo di pretrattamento e il tipo di solvente. In questo primo caso il COD ottimale predetto, pari a 201.006, è stato ottenuto con EtOH 10% per 14 h (Figura 15).

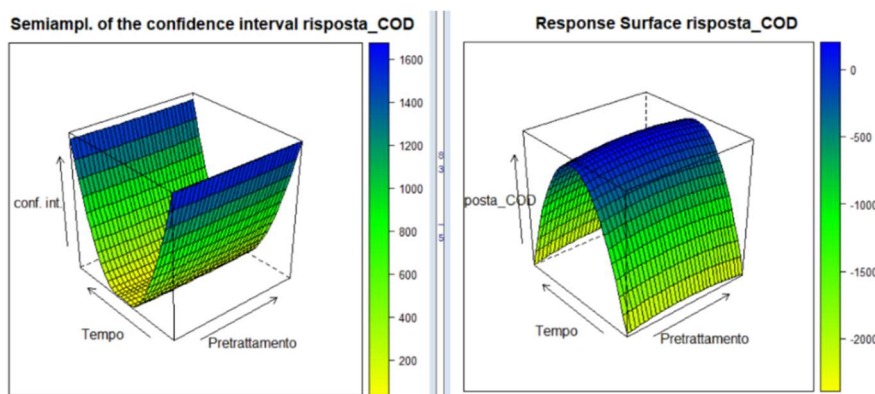


Figura 15 – D.o.E. con due parametri di input (tempo, solvente)

- ✓ D.o.E. 2: prova con tre parametri (Solvente, concentrazione e tempo)
 Anche in questo secondo caso le condizioni ottimali predette hanno riguardato EtOH 10% con un tempo di trattamento compreso tra 9 e 19 h (idealmente 14 h ma con un incertezza maggiore). Come si evince dalla Figura 16 il COD atteso è intorno a $220-240 \pm 70$.

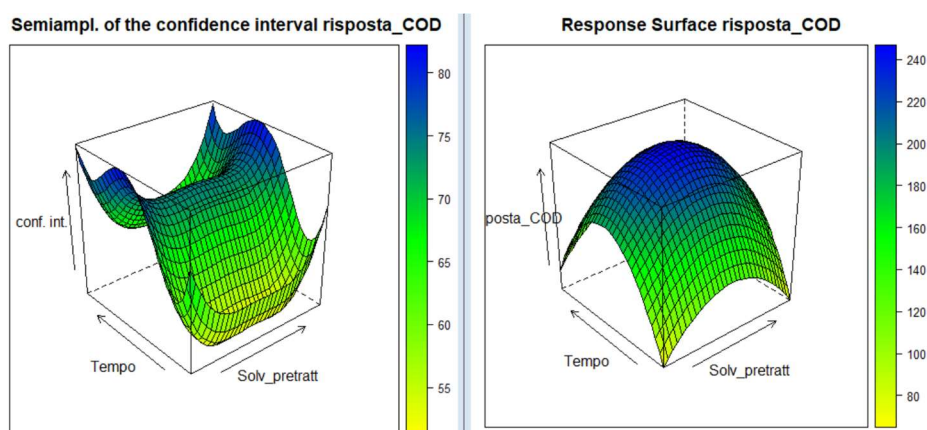


Figura 16 – D.o.E. con tre parametri di input (tempo, solvente e concentrazione)

In entrambi i casi il pretrattamento previsto come migliore è stato EtOH in soluzione al 10%. I tempi migliori ottenuti con questo solvente sono stati 4 e 14 ore. Come si evince da entrambi i D.o.E. EtOH 10% ha il massimo COD dopo circa 14 h di trattamento, mentre dall'analisi del DR_{CODt} lo stesso composto risulta efficace se applicato per 4 h. La seconda soluzione maggiormente efficace risulta essere H_2O_2 10% impiegata per 6.5 h (tempo stimato grazie al D.o.E.) e 4 h (tempo minimo stimato per avere un alto valore di DR_{CODt}). Volendo effettuare un'efficace degradazione della WS, confrontando due solventi in condizioni il più possibile simili, è stato deciso di testare la DA della paglia pretrattata con H_2O_2 ed EtOH nelle stesse concentrazioni (10%) e tempi di trattamento (4 h). Trattandosi di un solvente non sostenibile economicamente e a livello ambientale, il cui pH basico avrebbe potuto compromettere la qualità della DA, si è preferito non continuare a studiare gli effetti del NaOH sulla WS; visto che i risultati precedentemente mostrati non l'hanno evidenziato come maggiormente degradante. In base a queste considerazioni, la paglia alimentata nella DA2 è stata pretrattata con H_2O_2 10% di 4 h ed EtOH 10% anch'esso per 4 h.

4.3 Prima Digestione Anaerobica

L'obiettivo della prima campagna sperimentale (DA1) è stato quello di determinare il rapporto ottimale WS:CM in grado di generare la cumulata di metano maggiore. Le proporzioni testate sono state le seguenti cinque: 100:0, 90:10, 75:25, 50:50, 0:100.

4.3.1 Produzione e composizione del biogas

Dall'analisi quantitativa effettuata sulla produzione cumulata di biogas (Figura 17), si riscontrano andamenti pressoché simili in tre configurazioni su cinque. I valori di biogas maggiori in ordine crescente riguardano le co-digestioni con rapporto 75:25, 90:10 (DA1_WS75-CM25 e DA1_WS90-CM10) e paglia tal quale (DA1_WS).

Tutte le cumulate sono state calcolate mediando i valori ottenuti dal triplicato.

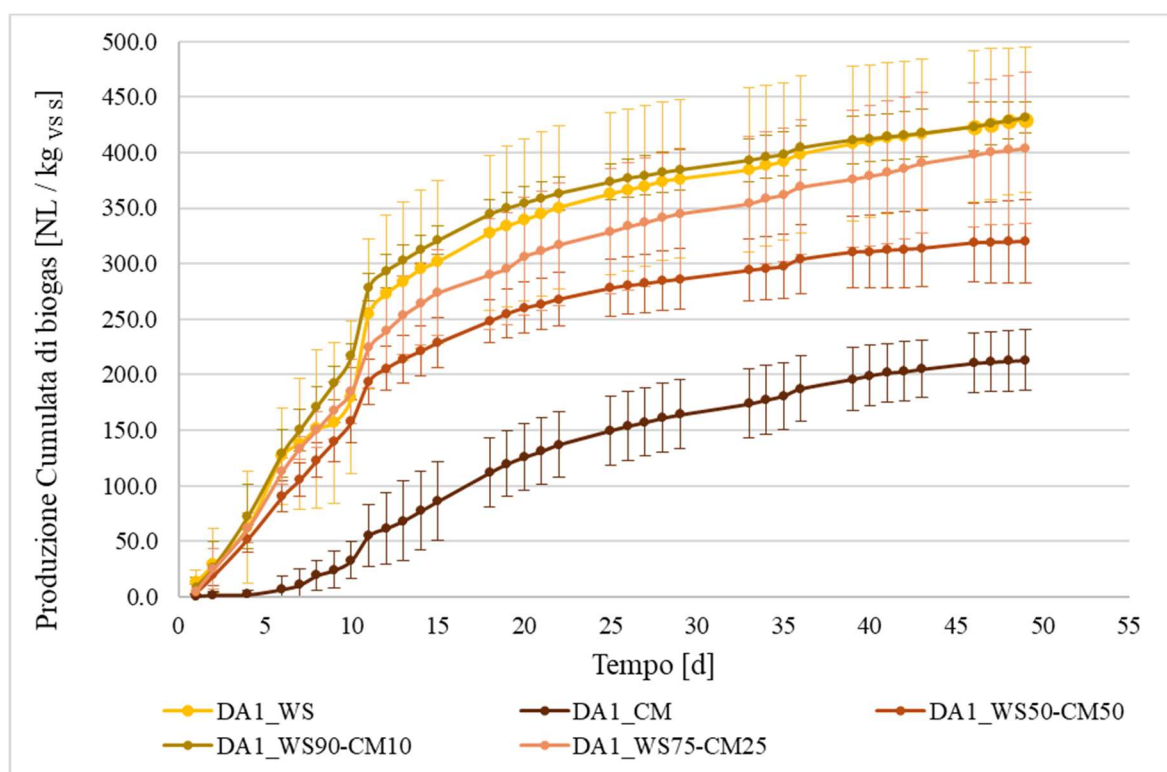


Figura 17 - Produzione cumulata di biogas della DA1

In Figura 18 si riportano le produzioni cumulate di biometano riferite alle cinque configurazioni. I reattori contenenti i più alti quantitativi di WS sono quelli che hanno performato maggiormente. Le curve più produttive hanno riguardato infatti DA1_WS90-CM10 e DA1_WS, con ammontare rispettivo pari a $199.7 \text{ NL}_{\text{CH}_4}/\text{kg}_{\text{VS}} \text{ s}$ e $198.58 \text{ NL}_{\text{CH}_4}/\text{kg}_{\text{VS}} \text{ s}$. Avendo effettuato le misurazioni su un solo reattore per triplicato, nella Figura 18 non sono state indicate deviazioni standard.

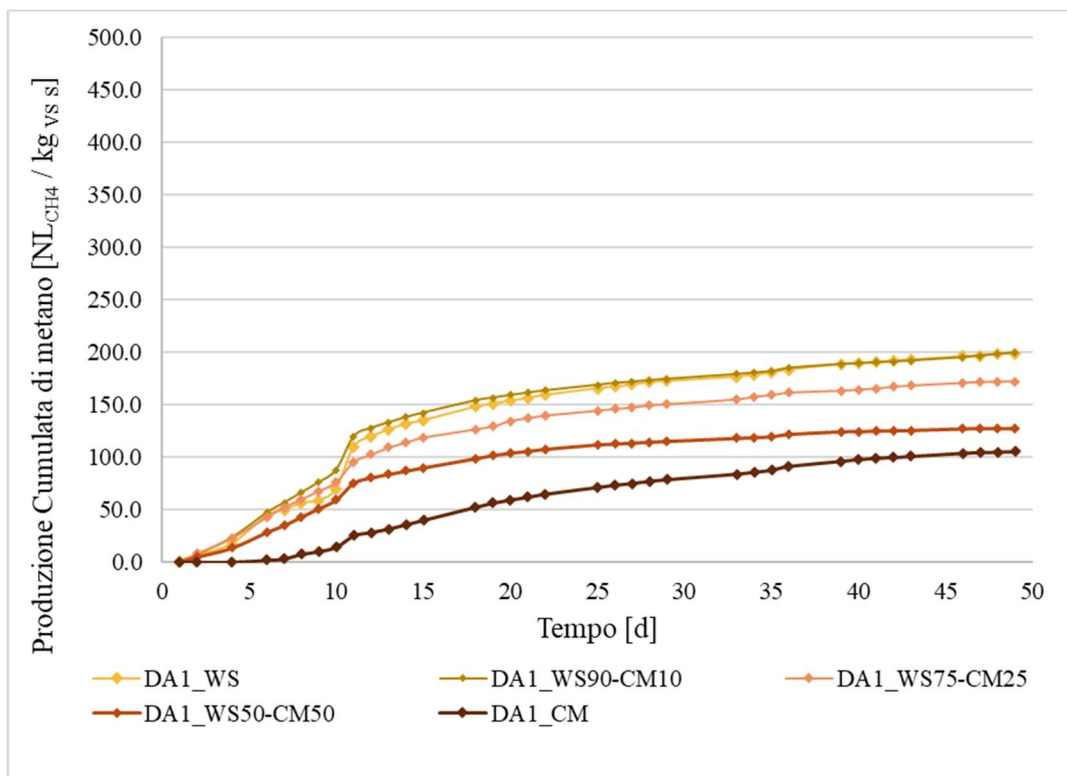


Figura 18 - Produzione cumulata di metano della DA1

La Tabella 37 riporta i risultati dell'analisi CHNS(O) dei substrati alimentati durante la DA1. Questi risultati, assieme alle composizioni elementari della Tabella 30 del paragrafo 4.1 e della percentuale di TS e VS/TS (Tabella 39), sono stati utilizzati per ricavare la massima resa teorica di biometano (TBMP) e la quantità specifica di biogas prodotto (PBS), visibili in Tabella 38, grazie alle formule (3.5), (3.6) e (3.9) del capitolo 3.3.2.

Tabella 37 – Analisi elementare dei substrati alimentati nella DA1

Substrato	C [%]	N [%]	S [%]	H [%]	O [%]	C/N
WS50-CM50	35.05	1.68	0.57	4.59	39.48	20.86
WS75-CM25	38.11	1.17	0.56	5.18	42.60	32.57
WS90-CM10	40.20	0.82	0.56	5.59	44.19	49.02

Tabella 38 – Rese di biogas e metano della DA1

	DA1_WS	DA1_WS90-CM10	DA1_WS75-CM25	DA1_WS50-CM50	DA1_CM
BPS [NL/kg _{VS} _s]	835.17	826.95	817.69	810.25	824.94
Produzione cumulata biogas [NL/kg _{VS} _s]	429.24 ± 65.42	431.65 ± 14.08	443.29 ± 9.47	319.99 ± 37.67	213.06 ± 27.50
TBMP [NL/kg _{VS} _s]	421.14	410.08	396.12	380.67	375.83
Produzione cumulata CH₄ [NL _{CH₄} /kg _{VS} _s]	198.58	199.7	172.29	127.31	105.16
CH₄:biogas [%]	46.26%	46.26%	38.87%	39.79%	49.36%

Notiamo che in tutte le configurazioni la percentuale di CH₄ rispetto al biogas è circa il 45-50%, fatta eccezione per le co-DA in rapporto 50:50 e 75:25 che riscontrano valori inferiori al 40%. Considerando che il guadagno energetico del processo è rappresentato proprio dalla produzione di biometano, possiamo stabilire come ottimali le configurazioni con i più alti valori di CH₄. In merito a quest'ultimo, la DA1_WS90-CM10 e la DA1_WS sono anche quelle che hanno prodotto i rapporti CH₄/biogas maggiori; pertanto, sono le configurazioni più redditizie di questa prima campagna sperimentale.

Secondo tali risultati, al diminuire dell'apporto di paglia diminuiscono le quantità di biometano generate. Si può dedurre quindi che, rispetto alla digestione del solo letame, la paglia funge da nutrimento per i batteri, migliorandone le rese di digestione. A prova di ciò, constatiamo nella DA1_WS una tra le più alte quote di biometano, paragonabile ad alcuni valori trovati in letteratura. Nell'articolo di *Victorin et al.* [68], inerente alla DA in condizioni mesofile (37 °C), miscelazione omogenea e rapporto 1:2 (S:I) della WS trattata fisicamente, vengono fornite le seguenti cumulate: 237 ± 16 NL_{CH₄}/kg_{VS} per la paglia non macinata, 287 ± 24 NL_{CH₄}/kg_{VS} per quella *roll-milled* e 269 ± 10 NL_{CH₄}/kg_{VS} per la *hammer-milled* WS. Si notano valori compresi in un range leggermente superiori a quello di questa tesi, probabilmente dovuti al rapporto S:I e alla miscelazione differente. Nella DA1, infatti, avendo condotto manualmente il mescolamento, risulterà una distribuzione chimico-fisica dei nutrienti meno equa per i microrganismi, con effetti negativi sulle rese di processo.

In letteratura si trovano numerosi studi riguardanti la co-digestione di paglia e letame bovino. La maggior parte degli articoli stabilisce un rapporto ottimale simile tra i due substrati [23],[69]. *Song e Zhang* hanno condotto un esperimento di digestione anaerobica mesofila in reattori batch da 1 L (con uno spazio di testa pari al 25%), testando diversi rapporti paglia:letame bovino. Nel loro *report*, nonostante le proporzioni pressoché simili rispetto a quelle di questa tesi (100:0, 90:10, 70:30, 50:50, 0:100), il rapporto più proficuo è risultato essere 50:50, con rese di metano

cumulate pari a 225 L_{CH4}/kg_{VS}, contro gli 84.3 L_{CH4}/kg_{VS} della paglia tal quale [23]. Dal loro studio è emerso come all'aumentare della quantità di letame corrispondesse un aumento sulla produzione cumulata di biometano. Una conclusione simile è stata riscontrata anche da *Krishania et al.* [69], conducendo una prova di DA in reattori batch mesofili da 5 L. Nel loro caso le cumulate di biogas maggiori sono state prodotte dalla co-digestione WS:CM 40:60 (190 L/kg_{VS}) e 0:100 (240 L/kg_{VS}). Per quanto riguarda la digestione della sola paglia sono stati generati 575 L/kg_{VS} di biogas e 191 di CH₄. Confrontando i risultati di *Krishania et al.* con quelli di questo lavoro si trovano quantitativi di metano pressoché simili per produzioni di biogas diverse, i rapporti CH₄:biogas risultano quindi essere nettamente sproporzionati fra loro (rispettivamente circa 33% per *Krishania et al.* e 46% per questo lavoro), segno di una buona riuscita di processo della DA1_WS. Per quanto concerne i rapporti paglia:letame 0:100 e 50:50, i loro risultati sono i seguenti: 565 ± 2 L/kg_{VS} di biogas e 240 ± 2 L/kg_{VS} di metano (~42.5%), 408 ± 3 L/kg_{VS} di biogas e 110 ± 2 L/kg_{VS} di CH₄ (~27%). Facendo un confronto possiamo dire che, anche in questo caso, i rendimenti ottenuti con la DA1 sono superiori a quelli del *paper* (~50% per CM tal quale e ~40% per il rapporto 50:50) [69].

Questi sono solo alcuni esempi di studi scientifici che evidenziano come il letame sia un nutrimento fondamentale per facilitare la degradazione lignocellulosica della paglia alla comunità microbica. Sebbene i valori di cumulata di biogas e biometano della paglia tal quale siano concordi [23], [26], [69], [68] o addirittura superiori [70] a quelli di letteratura, non si può affermare lo stesso per i reattori contenenti letame. È possibile supporre che il letame fresco impiegato nella DA1 abbia inibito la co-DA, probabilmente a causa della presenza di alte quantità di ioni ammonio (NH₄⁺) e ammoniaca (NH₃). Ciò spiegherebbe anche il minor il rapporto C/N del letame appena prelevato, rispetto a quelli trovati in letteratura [44], [60]. Per quanto riguarda il confronto tra il biogas teorizzato e quello effettivamente prodotto, si evince una discrepanza di circa il 50% per tutte le configurazioni, fatta eccezione per la DA1_CM, i cui valori discostano del 75%. Andamenti pressoché simili si osservano anche nelle cumulate di metano prodotte e teorizzate. Il distacco così marcato conferma la scarsa compatibilità tra il letame fresco e la comunità microbica.

I solidi totali delle matrici di partenza ricavati in Tabella 39 sono confrontabili con quelli dell'articolo di *Krishania et al.* (91.9% per la paglia e 17% per il letame bovino), mentre i solidi volatili riferiti al peso secco differiscono notevolmente fra loro (82.5 % VS/TS della WS e 80% per il CM) [69].

Tabella 39 - Solidi Totali e Volatili dei substrati iniziali costituenti la DA1

Acronimo	TS [%]	VS/TS [%]
WS	92.08	93.86
CM1	22.53	68.88
WS50-CM50	33.12	81.37
WS75-CM25	46.88	87.62
WS90-CM10	65.50	91.36

È possibile che le sostanze organiche volatili della DA1_WS, presenti in maggior quantità, abbiano influenzato positivamente le rese di processo comportando rendimenti superiori in termini di biometano. Un ragionamento analogo può essere fatto confrontando le diverse configurazioni della DA1: all'aumentare dell'apporto di WS aumentano VS/TS e di conseguenza la cumulata di CH₄.

Il rapporto C/N della Tabella 37 e le analisi della Tabella 39 tengono conto solamente dei substrati alimentati, senza prendere in considerazione l'inoculo. Qualora si considerassero per intero i reattori, il C/N effettivo diminuirebbe: 21.09% per la DA1_WS, 15.67% DA1_WS50-CM50, 17.99% DA1_WS75-CM25, 19.73% DA1_WS90-CM10 e 12.46% DA1_CM. L'inoculo consente di riportare il bilancio di nutrienti ad un livello ottimale di digestione, facendo diminuire i substrati maggiormente carboniosi quali DA1_WS e DA1_WS90-CM10. Per non alterare le condizioni anaerobiche dei microrganismi, considerato che i mL spiazzati giornalmente dai triplicati avevano quantità paragonabili, è stato deciso di analizzare al GC una sola delle tre sacche (considerando le altre miscele pressoché simili); per questa ragione nella produzione cumulata di metano (Figura 18 e Tabella 38) non sono indicate le deviazioni standard.

Avendo monitorato qualitativamente il biogas giornaliero, si riportano in Figura 19 le composizioni costituenti la miscela nelle configurazioni della DA1, in tre lassi temporali distinti: inizio, metà e fine prova. In tutti i casi, il primo giorno si registrano percentuali prevalenti di N₂, insufflato in gran quantità per inertizzare i reattori e favorire un ambiente anaerobico. Nonostante l'inertizzazione, si rilevano comunque piccole quantità di O₂ residue. I due composti di maggior interesse, CH₄ e CO₂, le cui percentuali sono espresse numericamente negli istogrammi, crescono in valore durante l'intero processo. Già dal quattordicesimo giorno si registra un ammontare di metano superiore a quello di anidride carbonica nel caso di DA1_WS e DA1_WS90-CM10. Queste due prove hanno mantenuto valori elevati di metano fino all'ultimo giorno, anche a fine digestione quando la produzione di biogas era minima, inferiore all'1% di quella totale e quindi ininfluyente.

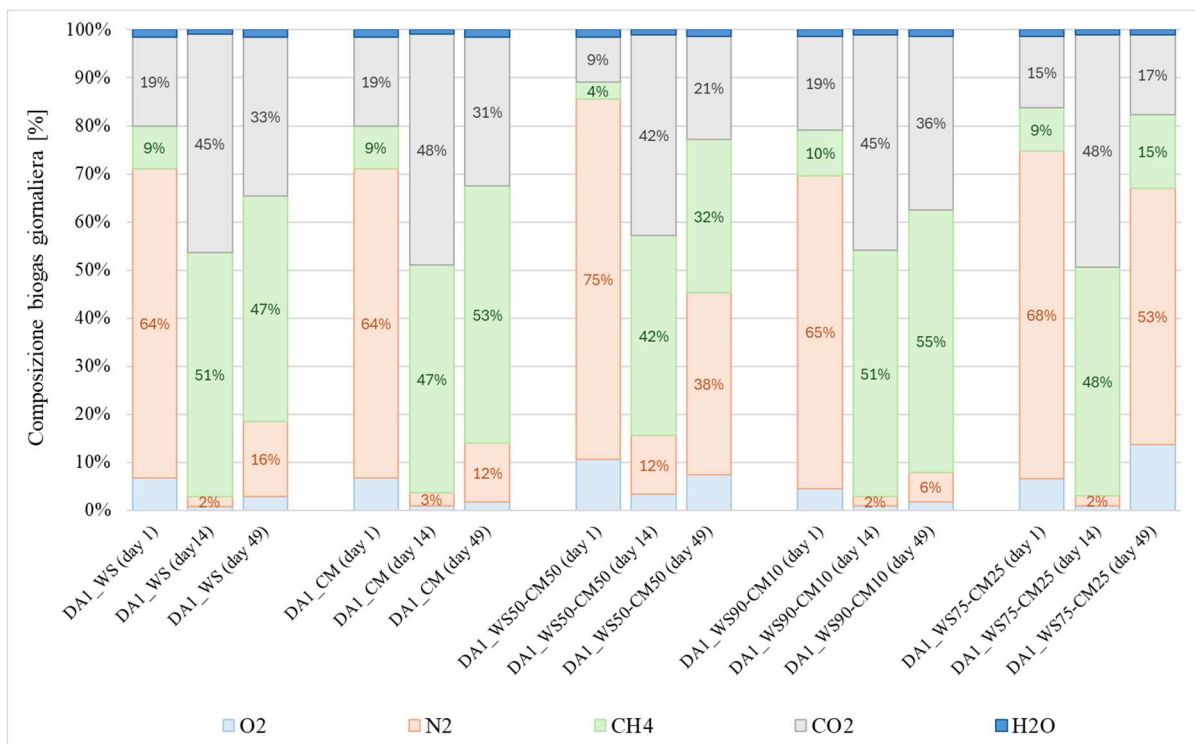


Figura 19 - Composizione del biogas di inizio, metà e fine prova (DA1)

4.3.2 Proprietà digestato

Per verificare il corretto svolgimento della DA1, è stato monitorato il pH dei substrati alimentati e dei digestati prelevati dopo quattordici (prelievo intermedio) e quarantatino giorni (digestato finale). In Tabella 40 sono mostrati i valori dei tre campionamenti, effettuati a seguito della miscelazione manuale dei reattori.

Tabella 40 - pH iniziali, intermedi e finali dei digestori della DA1

Acronimo	pH (day 0)	pH (day 14)	pH (day 49)
DA1_I	8.16 ± 0.12	7.90 ± 0.04	7.75 ± 0.14
DA1_WS	8.09 ± 0.04	7.49 ± 0.07	7.36 ± 0.06
DA1_CM	7.43 ± 0.01	7.46 ± 0.11	7.48 ± 0.05
DA1_WS50-CM50	7.76 ± 0.08	7.55 ± 0.19	7.41 ± 0.01
DA1_WS75-CM25	7.92 ± 0.06	7.47 ± 0.15	7.47 ± 0.33
DA1_WS90-CM10	8.12 ± 0.04	7.43 ± 0.16	7.37 ± 0.06

Le misurazioni di pH riportate nella Tabella 40 sono visibili graficamente in Figura 20. Notiamo andamenti decrescenti in tutte le digestioni contenenti WS, dovuti ad un aumento della concentrazione degli acidi grassi volatili (VFA) col progredire della degradazione [44]. L'unica configurazione con un pH pressoché invariato è quella relativa alla DA1_CM. È possibile che

il substrato di partenza tal quale fosse già ricco di queste sostanze, tanto da non influenzarne eccessivamente i gradienti di concentrazione col procedere della digestione.

In generale già durante il prelievo intermedio, si registrano misurazioni coerenti con i range di stabilità del processo, compresi tra 6.5 e 7.5 [9]. Tutto ciò è indice di un corretto svolgimento della prova: l'attivazione dei batteri metanogeni avviene a pH compresi tra 6.2 ed 8 [71].

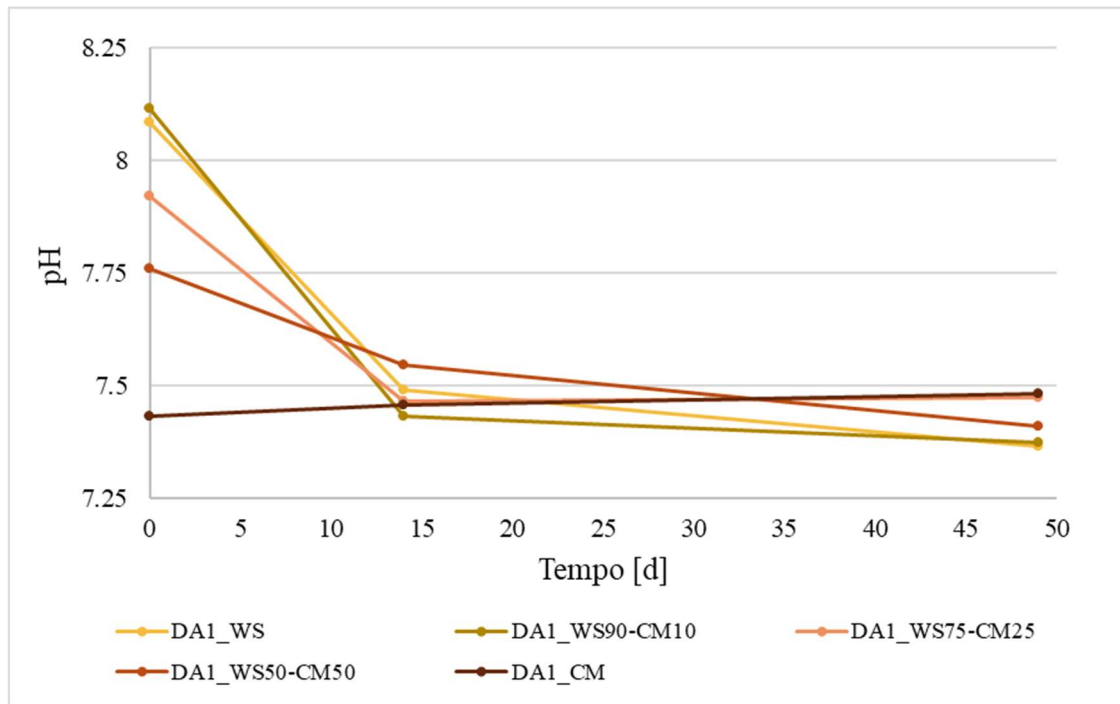


Figura 20 – pH digestati DA1

In Tabella 41 si riportano le percentuali di TS e VS/TS contenute ad inizio digestione, a seguito del prelievo intermedio (effettuato il quattordicesimo giorno) e nel digestato finale.

Avendo alimentato un quantitativo di TS pari a circa 8%, si nota la diminuzione maggiore percentuale per i digestati della DA1_WS e DA1_WS90-CM10.

L'analisi dei solidi volatili e totali effettuata sui digestati rivela un maggior numero di sostanza organica degradabile nel caso di DA1_WS, DA1_WS90-CM10 e DA1_WS75-CM25. Il valore di VS/TS cresce all'aumentare del quantitativo di WS alimentata, pertanto, è possibile affermare che la paglia apporti un quantitativo di nutrienti maggiore (rispetto alla digestione del solo letame), rendendo il digestato ricco di sostanze organiche non mineralizzate. Le uniche due configurazioni che registrano aumenti di VS/TS dal quattordicesimo giorno al quarantanovesimo sono DA1_CM e DA1_WS50-CM50 segno di una minor degradazione.

Tabella 41 - TS e VS/TS digestati DA1

Acronimo	Digestato intermedio (day 14)		Digestato finale (day 49)	
	TS [%]	VS/TS [%]	TS [%]	VS/TS [%]
DA1_I	3.14 ± 0.58	70.51 ± 0.18	3.13 ± 0.04	68.98 ± 2.60
DA1_WS	4.39 ± 0.82	77.45 ± 5.73	4.32 ± 0.21	75.12 ± 0.80
DA1_CM	5.20 ± 0.47	64.94 ± 1.89	5.69 ± 0.32	68.95 ± 0.81
DA1_WS50-CM50	4.93 ± 0.25	68.02 ± 1.82	4.67 ± 0.33	72.53 ± 1.45
DA1_WS75-CM25	6.36 ± 0.77	77.48 ± 9.56	4.71 ± 0.79	73.71 ± 0.71
DA1_WS90-CM10	4.79 ± 0.45	76.80 ± 2.23	4.50 ± 0.49	73.97 ± 1.02

In Tabella 42 sono mostrati i risultati dell'analisi elementare, effettuata sui digestati secchi di fine prova. Confrontando questi valori con quelli iniziali della Tabella 37, la diminuzione del rapporto C/N più rilevante, tra inizio e fine DA1, si registra per le configurazioni contenenti maggiore paglia: DA1_WS (-7.9), DA1_WS90-CM10 (-6.61) e DA1_WS75-CM25 (-5.52). Gli altri C/N restano pressoché invariati (-3.27 per la DA1_WS50-CM50 e -0.98 per DA1_CM). Secondo lo studio di *Tuszynska et al.* la diminuzione del valore di C/N sarebbe collegata ad un accumulo di NH_4^+ prodotti durante il processo [72]. Un letame di partenza già ricco di queste sostanze potrebbe essere la conferma del mancato divario tra il C/N di inizio DA1 e quello registrato alla fine, per i reattori contenenti rapporto 0:100.

A differenza di un letame stabilizzato da compostaggio, è stato dimostrato che un letame fresco appena raccolto contiene elevati quantitativi di NH_4^+ e NH_3 , che possono addirittura renderlo fitotossico se applicato direttamente al suolo [73].

La letteratura scientifica considera ottimale un rapporto C/N iniziale appartenente ad un *range* compreso tra 20-30 [74], [75], [76]. Conoscendo il rapporto C/N (compreso di inoculo) alimentato direttamente nei reattori, si nota come tutte le configurazioni con rapporto all'interno di tale *range* abbiano funzionato correttamente. DA1_WS, e DA1_WS90-CM10 sono infatti, le uniche due configurazioni con C/N prossimo o poco superiore a 20, con i maggiori quantitativi di CH_4 prodotti. Nonostante le altre tre abbiano C/N leggermente inferiori (15.67 per DA1_WS50-CM50, 17.99 per DA1_WS75-CM25 e 12.46 per DA1_CM), lo sbilanciamento di tale rapporto e la presenza di letame fresco pare abbiano compromesso l'attività microbica e le rese di processo.

Tabella 42 - Analisi elementare digestato finale (DA1)

Sigla	N [%]	C [%]	H [%]	S [%]	O [%]	C/N
DA1_I	3.16 ± 0.07	33.84 ± 0.66	3.97 ± 0.16	0.46 ± 0.11	27.55 ± 0.69	10.72 ± 0.19
DA1_WS	2.80 ± 0.08	36.92 ± 0.45	4.51 ± 0.09	0.51 ± 0.01	30.39 ± 0.47	13.19 ± 0.34
DA1_CM	2.96 ± 0.09	33.99 ± 0.44	4.22 ± 0.03	0.62 ± 0.04	27.16 ± 0.45	11.48 ± 0.36
DA1_WS50-CM50	2.87 ± 0.09	35.51 ± 0.31	4.41 ± 0.05	0.68 ± 0.15	29.07 ± 0.36	12.40 ± 0.44
DA1_WS75-CM25	2.97 ± 0.08	37.01 ± 0.44	4.66 ± 0.07	0.62 ± 0.02	28.82 ± 0.81	12.47 ± 0.33
DA1_WS90-CM10	2.84 ± 0.14	37.13 ± 0.80	4.60 ± 0.03	0.59 ± 0.05	28.45 ± 0.45	13.12 ± 0.85

4.4 Seconda Digestione Anaerobica

I risultati della seconda prova di digestione (DA2) verranno suddivisi in due parti: la prima inerente all'effetto dei pretrattamenti chimici sulla DA della sola paglia (rapporto 100:0), mentre la seconda riguardante lo stesso effetto sul rapporto di co-DA 90:10 (ambedue risultati ottimali nella DA1). Tra perossido di idrogeno, etanolo ed NaOH, testati in diverse concentrazioni e tempi di permanenza, sono state scelte come soluzioni ottimali H₂O₂ ed etanolo entrambe concentrate al 10% (V/V) ed impiegate con paglia per 4 h (rapporto 1:10 solido:liquido).

4.4.1 Produzione e composizione del biogas

4.4.1.1 Effetto trattamenti chimici sulla digestione anaerobica della paglia

Graficando l'analisi quantitativa effettuata sulle cumulate di biogas e biometano, si ottengono rispettivamente la Figura 21 e la Figura 22. Anche per questa seconda prova di digestione sono serviti 48 giorni per far raggiungere a ciascuna curva il *plateau*. Per quanto riguarda i pretrattamenti chimici, si evidenziano miglie di processo con ambedue le soluzioni testate (EtOH 10% ed H₂O₂ 10% delle 4 h), che mostrano cumulate di biogas superiori al doppio della configurazione con WS macinata (Figura 21). Se per il biogas tutte le curve sono state calcolate mediando i valori ottenuti dal duplicato, scartando eventuali *outlier*, l'analisi quantitativa del CH₄ è stata effettuata su un solo reattore per configurazione, così da evitare un'eccessiva alterazione microbica.

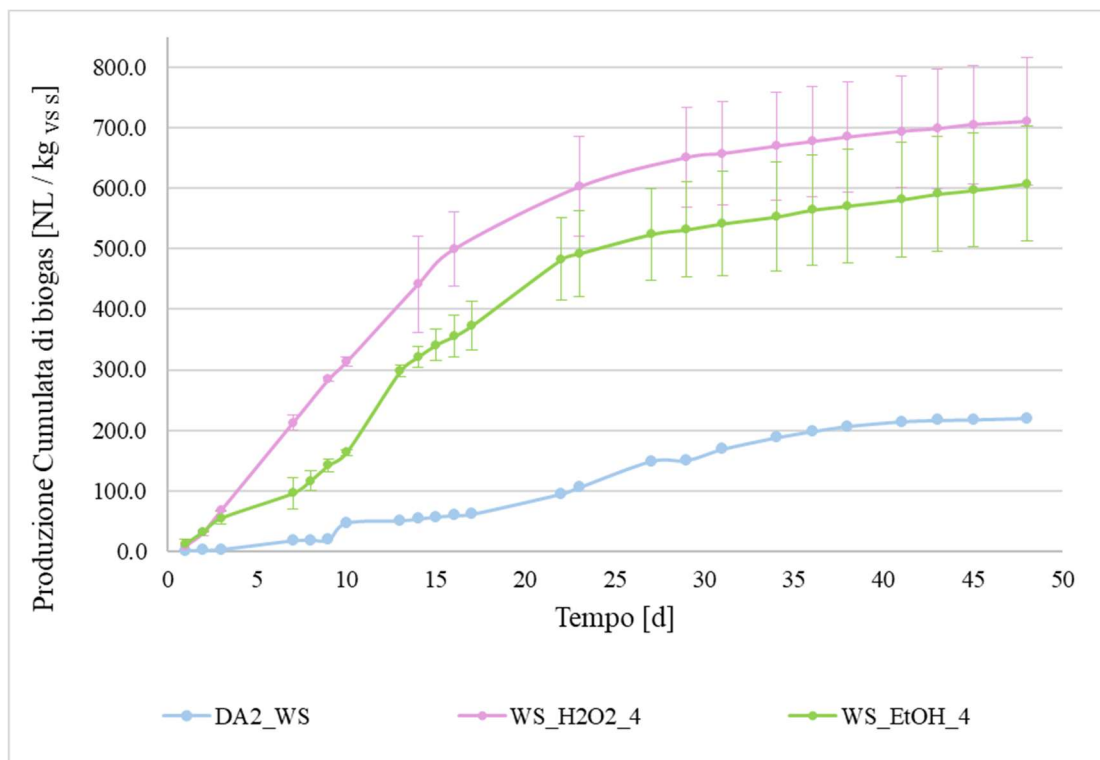


Figura 21 - Produzione cumulata di biogas della DA2 (100:0)

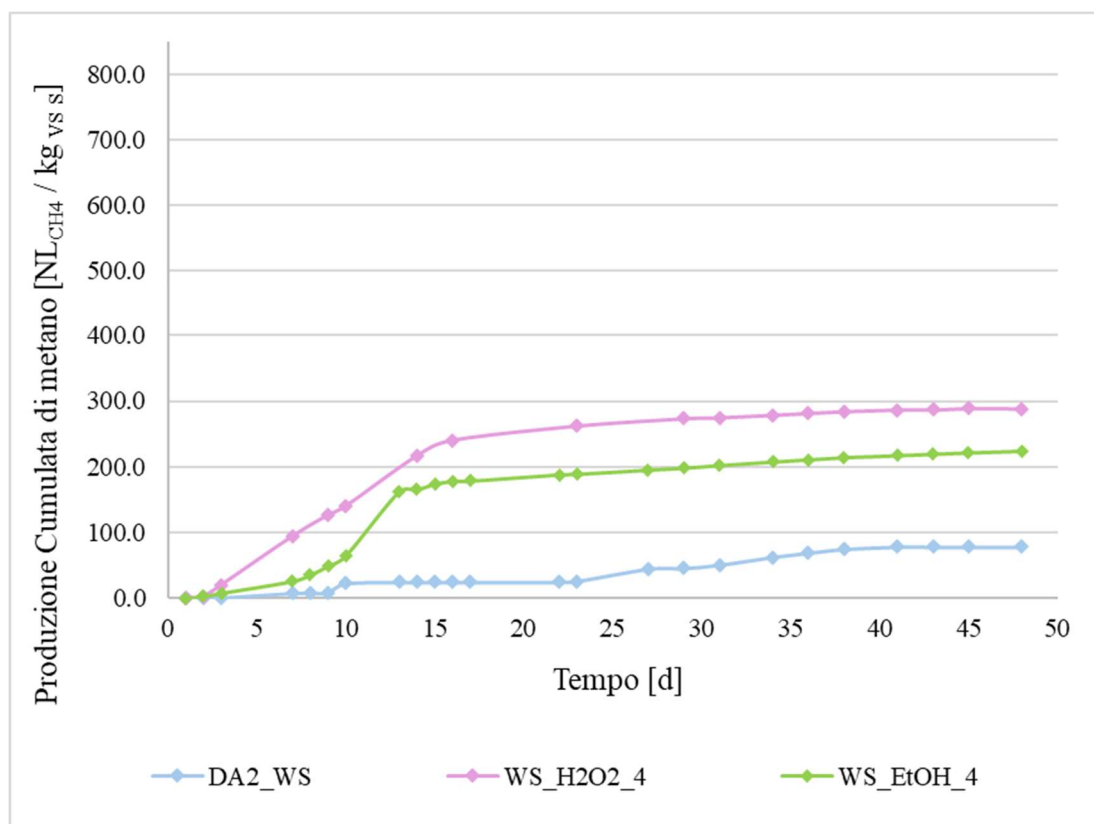


Figura 22 - Produzione cumulata di metano della DA2 (100:0)

In termini di rese di processo si notano sicuramente migliorie apportate dall'utilizzo dei pretrattamenti sulla paglia macinata. Confrontando la DA1_WS e la DA2_WS si registra un'attività microbica inferiore in questo secondo caso: se nella prima digestione erano stati prodotti 429.24 ± 65.42 NL/kg_{VS_s} di biogas e 198.58 NL_{CH₄}/kg_{VS_s}, per la DA2_WS si hanno valori dimezzati di biogas. La diversa attività registrata può essere dovuta all'utilizzo di un inoculo differente tra le due campagne sperimentali. La DA2_WS è comunque coerente con i lavori di *Song & Zhang* (84.3 L_{CH₄}/kg_{VS}) e *Chandra et al.* (78.4 L_{CH₄}/kg_{VS} e 188.4 L/kg_{VS} di biogas), segno di una buona riuscita di processo [23].

In un articolo di *Sarkar et al.* [77] viene effettuata la digestione mesofila di paglia degradata con combinazione organosolv-steam explosion con rese di metano di 292.9 L/kg_{VS}, in 24 giorni di digestione. Le rese di CH₄ della WS_EtOH_4 si avvicinano molto a tale valore, tuttavia richiedono HRT maggiori. Il trattamento organosolv dell'articolo è stato effettuato miscelando 40% di acqua, 30% di acetone e la restante parte di etanolo, a paglia macinata; la miscela è stata successivamente sottoposta ad esplosione di vapore a 180 °C per 1 h. La soluzione diversa e la combinazione con vapore ha sicuramente avuto un'efficacia di degradazione lignocellulosica maggiore, che ha consentito di avere alti valori di CH₄ con tempi di digestione dimezzati [77]. In Tabella 43, oltre ai quantitativi cumulati prodotti, sono visibili il potenziale teorico di biometano (TBMP) e la produzione specifica di biogas (BPS). TBMP e PBS sono stati ricavati partendo dall'analisi elementare dei substrati alimentati (Tabella 33) e dal quantitativo di solidi totali e volatili immessi (Tabella 32) del capitolo 4.1.

Tabella 43 - Rese di biogas e metano della DA2 (100:0)

	DA2_WS	WS_H2O2_4	WS_EtOH_4
BPS [NL/kg _{VS_s}]	835.17	871.68	846.72
Produzione cumulata biogas [NL/kg _{VS_s}]	220.15	710.05 ± 105.16	607.51 ± 94.12
TBMP [NL/kg _{VS_s}]	421.14	359.36	340.49
Produzione cumulata CH₄ [NL _{CH₄} /kg _{VS_s}]	77.79	288.32	223.66
CH₄:biogas [%]	35.33%	40.61%	36.81%

Nell'articolo di *Song & Zhang* [23] viene studiato l'effetto del pretrattamento chimico di H₂O₂ in quattro concentrazioni differenti (1%, 2%, 3%, 4%), impiegate sulla paglia di grano in rapporto 1:3 (w/V) per 7 giorni, a temperatura ambiente. I quantitativi di CH₄ maggiori sono stati ottenuti con le concentrazioni più alte, segno di un aumento della frazione solubile disponibile per i microrganismi anaerobici. Con H₂O₂ 3% sono state ottenute maggiorazioni di biometano del 50.3% (rispetto alla paglia non trattata) e del 40.8% nel caso di H₂O₂ 4% [23]. I risultati di questa tesi sembrano coerenti con questo articolo: sebbene il pretrattamento abbia avuto una durata di sole 4 h, la concentrazione elevata (10%) ha permesso di accorciare il tempo di degradazione lignocellulosica, rendendo appetibile la WS ai microrganismi. La produzione di biometano associata alla WS_H2O2_4 è circa quattro volte quella della paglia non trattata. In un articolo di *Mancini et al.* [26] inerente alla DA di paglia pretrattata con etanolo 50%, in rapporto 1:10 (w/V) e scaldata a 180 °C per 1 h, sono state ottenute produzioni di metano pari a 316 ± 1 L_{CH₄}/kg_{VS}, contro le 274 ± 3 della paglia non trattata (in condizioni mesofile a 37 °C). Anche in questo caso all'aumento del 15% di CH₄ si associa la parziale rimozione della lignina. Questa, infatti, ha un effetto di incapsulamento dei carboidrati che ostacola l'accessibilità enzimatica e la degradazione microbica della cellulosa ed emicellulosa [26]. In questo lavoro l'aumento di biometano tra WS macinata e WS trattata con etanolo è stato circa pari al 300%. Nonostante l'etanolo sia stato impiegato in concentrazione minore, rispetto a quella di *Mancini et al.*, il tempo di trattamento più elevato (pari a 4 h anziché una) ha fatto sì che il solvente risultasse comunque efficacemente degradante per la lignina. In letteratura è difficile trovare studi che abbiano eseguito gli stessi identici pretrattamenti di questo lavoro, tuttavia le considerazioni di *Oliva et al.* [78] e *Zhang & Wu* [79] sostengono la tesi secondo cui H₂O₂ ed EtOH siano due ottimi solventi, in grado di delignificare efficacemente la WS e le altre biomasse lignocellulosiche. Per entrambe le soluzioni, l'efficacia è strettamente correlata alla concentrazione, al tempo di utilizzo, al rapporto w/V e alla temperatura di pretrattamento. Nonostante le rese di processo della DA2_WS fossero minori rispetto a quelle ottenute con la prima digestione, entrambi i pretrattamenti chimici hanno migliorato la produzione cumulata di biogas e biometano superando persino le configurazioni ottimali della DA1. Il pretrattamento più efficace tra i due risulta essere quello effettuato con H₂O₂, che raggiunge cumulate di metano pari a 288.32 NL_{CH₄}/kg_{VS} s. Nella Figura 23 sono rappresentati gli istogrammi contenenti la composizione percentuale giornaliera del biogas. Le tre configurazioni (DA2_WS, WS_EtOH_4 e WS_H2O2_4) riportano la composizione ad inizio prova, al giorno quattordicesimo, ventiduesimo e finale. Sono riportati due istogrammi intermedi dato che il processo ha subito acidificazione (paragrafo 4.4.2.1) e le condizioni anaerobiche dei batteri sono state alterate.

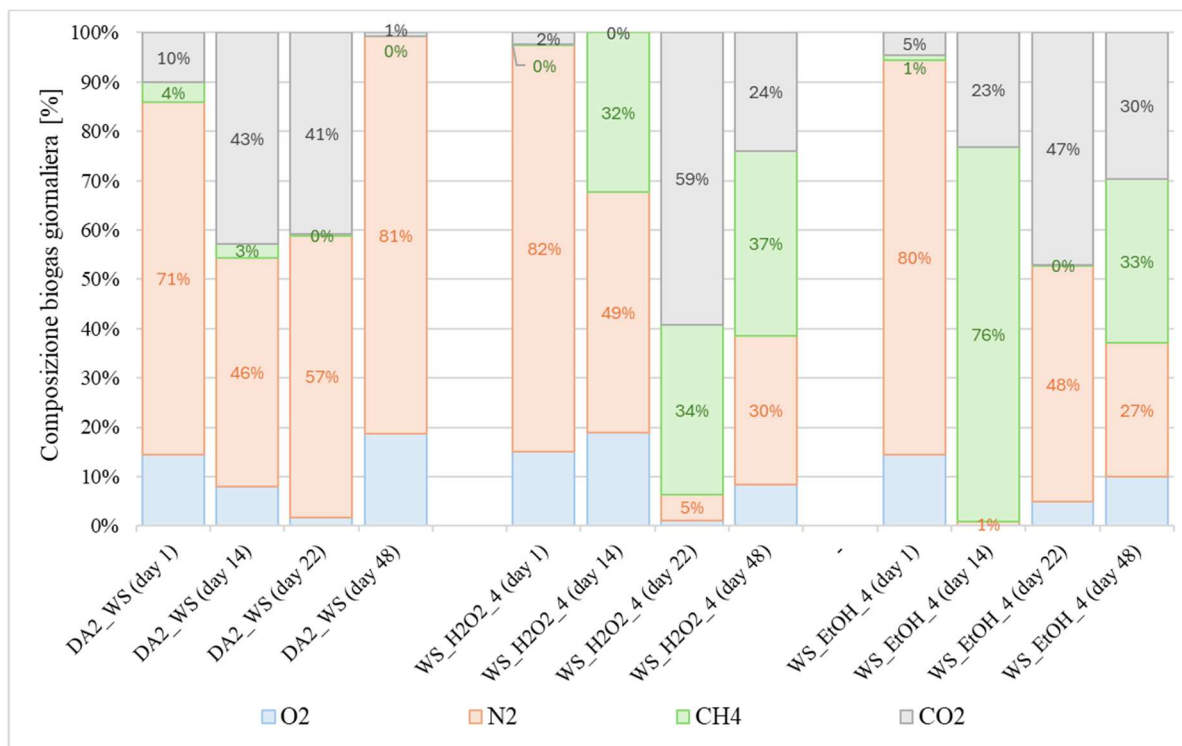


Figura 23 - Composizione del biogas di inizio, metà e fine prova (DA2 100:0)

La DA2_WS contiene alte percentuali di azoto e quantitativi di CH₄ pressoché nulli per tutte e quattro le giornate di analisi, segno di una digestione meno efficace rispetto alla DA1_WS. A differenza di quest'ultima, dove già dal giorno 14 si registrava un ammontare di biometano del 51%, notiamo un valore pressoché assente di CH₄. È possibile che l'attività batterica sia stata minore a causa dell'inoculo diverso e di una miscelazione manuale meno efficiente. Avendo monitorato il biogas su un solo reattore per configurazione, un'altra motivazione può essere legata al reattore analizzato. Volendo evitare alterazioni microbiche si è assunta la stessa composizione per prove con substrati identici, ciò non implica comunque stessa attività batterica: la miscelazione manuale differente può aver comportato il diverso *mass transfer* di sostanze, generando uno squilibrio di nutrienti e condizioni di degradazione eterogenee.

Confrontando all'interno della stessa digestione i rendimenti della WS macinata, pretrattata con perossido di idrogeno ed etanolo, si evince una migioria di processo anche dalle composizioni giornaliere di biogas. Nella pre-acidificazione (quattordicesimo giorno), entrambe le WS pretrattate hanno quantità di metano superiori al 30%, che restano tali fino alla fine (ad eccezione dei due giorni successivi all'acidificazione). È importante avere alte percentuali durante le giornate iniziali, dato che secondo lo studio di *Mancini et al.* [26], riguardante l'effetto di pretrattamenti chimici sulla paglia di grano, circa il 70% della cumulata totale di CH₄ viene prodotta proprio entro i primi 10 giorni.

4.4.1.2 Effetto trattamenti chimici sulla co-digestione di paglia e letame in rapporto 90:10

Analizzando la co-digestione 90:10 della paglia trattata e non, rispettivamente WS_{tr}:CM e WS:CM, si riportano di seguito le cumulate di biogas (Figura 24) e biometano (Figura 25).

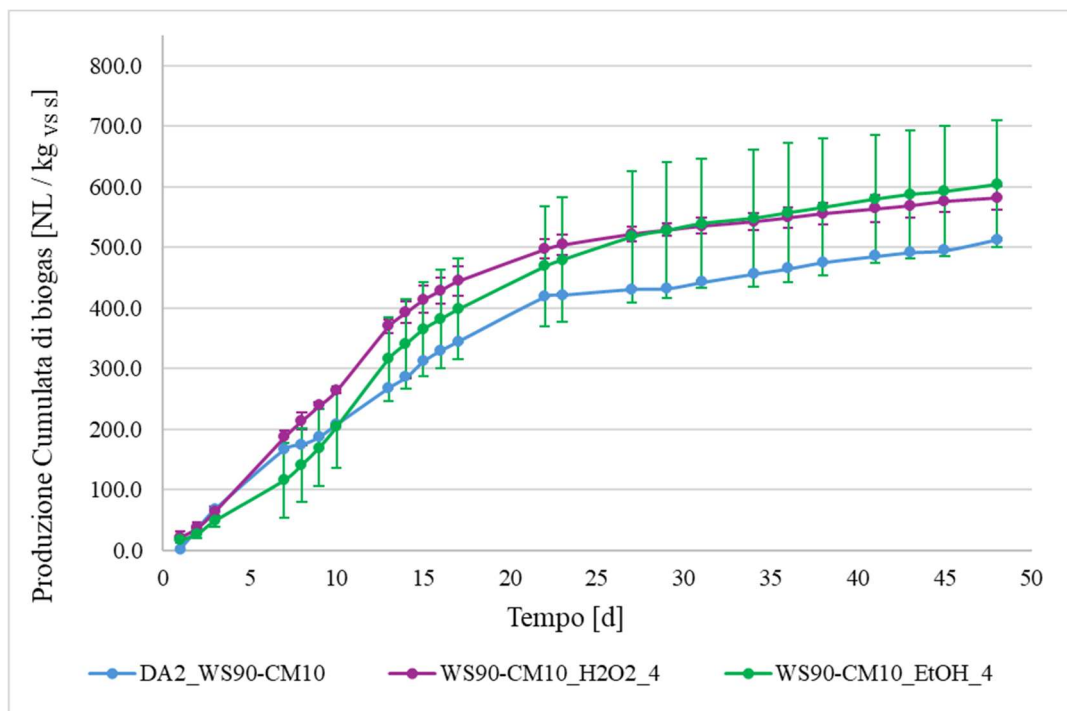


Figura 24 - Produzione cumulata di biogas della co-DA2 (90:10)

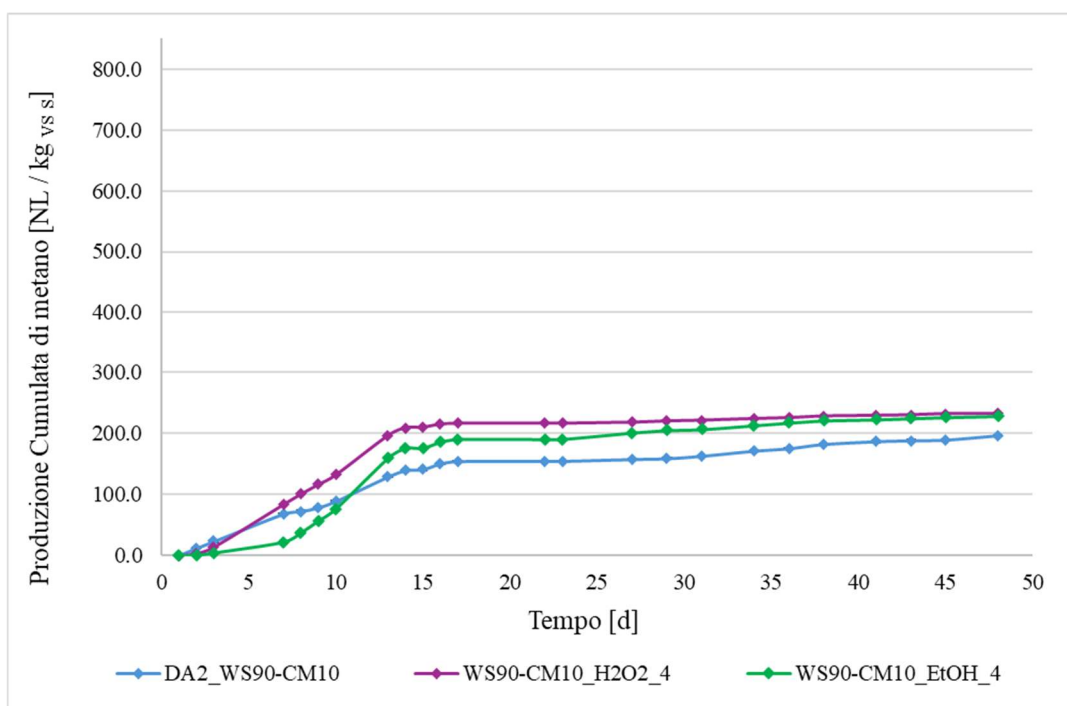


Figura 25 - Produzione cumulata di metano della co-DA2 (90:10)

Se per il rapporto 100:0 la cumulata di biogas della DA2_WS era assai distante dalle rispettive WS_H2O2_4 e WS_EtOH_4, nel caso di co-DA2 90:10 la cumulata della Figura 24, associata alla paglia tal quale, segue fedelmente le curve con rapporto 90:10 di WS_{tr}.

Come per la configurazione 100:0, le curve inerenti al biometano non hanno indicata la deviazione standard, dato che le analisi sono state eseguite solamente su un reattore per configurazione. Dall'immagine si nota come le curve si stabilizzino in 48 giorni.

I risultati della DA2_WS90-CM10 sono paragonabili a quelli della DA1_WS90-CM10, sia in termini di biometano che di biogas, segno di una buona riuscita del processo. Anche in questo caso i pretrattamenti chimici hanno delignificato efficacemente il substrato alimentato, producendo rese di biogas maggiori: la soluzione di etanolo registra una cumulata media di 604.31 NL/kg_{vs_s}, mentre H₂O₂ si arresta a 582.19 NL/kg_{vs_s}. Come per il biogas, anche le curve inerenti al metano hanno andamenti ravvicinati per tutte e tre le configurazioni. Rispetto alla cumulata di CH₄ della DA2_WS90-CM10 si nota una maggiorazione del 18% per la DA2_WS90-CM10_H2O2_4 e del 16% per la DA2_WS90-CM10_EtOH_4.

Tra la DA1_WS90-CM10 e la DA2_WS90-CM10 si registrano piccole differenze nella cumulata di biogas (431.65 ± 14.08 contro 513.42 NL/kg_{vs_s}), mentre per quanto concerne il metano cumulato, il divario è pressoché assente (199.7 contro 196.39 NL_{CH4}/kg_{vs_s}).

Nella Tabella 44 si riassumono le produzioni cumulate di biogas, biometano, TBMP e PBS associate alla co-DA2 90:10.

Tabella 44 - Rese di biogas e metano della co-DA2 (90:10)

	DA2_WS90-CM10	WS90-CM10_H2O2_4	WS90-CM10_EtOH_4
BPS [NL/kg _{vs_s}]	838.31	870.90	847.83
Produzione cumulata di biogas [NL/kg _{vs_s}]	513.42	582.19 ± 19.49	604.31 ± 104.53
TBMP [NL/kg _{vs_s}]	413.76	358.36	340.75
Produzione cumulata di metano [NL _{CH4} /kg _{vs_s}]	196.39	232.50 ± 33.20	228.59
CH₄:biogas [%]	38.25%	39.94%	37.83%

Rispetto al valore teorizzato, il biogas effettivamente prodotto per la co-digestione di WS:CM 90:10 è pari al 61.24%, mentre quelli riferiti alla WStr:CM sono del 66.8% e del 71.3% rispettivamente per il trattamento con H₂O₂ ed etanolo. Nonostante la maggior quantità di

biogas sia stata prodotta con quest'ultima soluzione, l'aumento più evidente in termini di biometano si registra per la configurazione WS90-CM10_H2O2_4, con un valor medio di 232.50 NL_{CH4}/kg_{VS} s, seguito dal pretrattamento con etanolo e dalla co-digestione senza pretrattamento.

Per quanto riguarda la paglia trattata con H₂O₂, sono state ottenute rese di metano comparabili con quelle dell'articolo di *Song & Zhang* [23]. Nel loro lavoro, un trattamento con perossido di idrogeno al 3% (impiegato per 7 giorni) effettuato su paglia co-digerita con letame, in rapporto 90:10, ha generato una cumulata compresa tra 200-225 L_{CH4}/kg_{VS}.

In letteratura non sono stati trovati studi che eseguissero la co-DA 90:10 della paglia trattata con etanolo; pertanto, non si hanno valori da poter confrontare con la WS90-CM10_EtOH_4.

In base a questi risultati, anche per la co-DA2 90:10 possiamo concludere che la soluzione maggiormente efficace tra le due testate sia il perossido di idrogeno.

I valori della Tabella 44 sono stati ottenuti conoscendo l'apporto dei VS/TS e TS percentuali (Tabella 45) e degli elementi costitutivi dei substrati alimentati (Tabella 46) senza tener conto della presenza dell'inoculo:

Tabella 45 - TS e VS/TS dei substrati alimentati ad inizio co-DA2 (90:10)

Acronimo	TS (%)	VS/TS (%)
WS90-CM10 (DA2)	66.25	91.78
WS _{tr1} 90-CM10	67.75	94.12
WS _{tr2} 90-CM10	67.34	95.79

Tabella 46 – Analisi elementare dei substrati di inizio co-DA2 (90:10)

Acronimo	C [%]	N [%]	S [%]	H [%]	O [%]	C/N
WS90-CM10 (DA2)	40.90	0.81	0.64	5.49	43.94	50.50
WS _{tr1} 90-CM10	42.66	1.06	0.52	3.27	44.50	40.29
WS _{tr2} 90-CM10	42.27	0.84	0.39	3.26	46.75	50.32

I tre substrati alimentano quantitativi di TS percentuali pressoché identici, mentre le sostanze organiche volatili sono minori nel caso di co-digestione con paglia macinata non pretrattata chimicamente. Il rapporto C/N della Tabella 46 ha valori superiori al *range* ottimale di digestione, dato che tiene conto solamente dei substrati senza considerare l'inoculo.

La Figura 26 riporta la composizione di biogas giornaliera delle tre co-digestioni in quattro giornate differenti. Per tutte e tre le configurazioni è stato necessario intervenire mediante acidificazione (come sarà descritto meglio nella trattazione del pH del capitolo 4.4.2.2) del quattordicesimo giorno. In questa data le produzioni di metano risultano inferiori a quelle generalmente registrate nei primi giorni di digestione [26], per poi tornare a valori elevati già

dal giorno ventiduesimo, segno di un efficace ripristino delle condizioni microbiche.

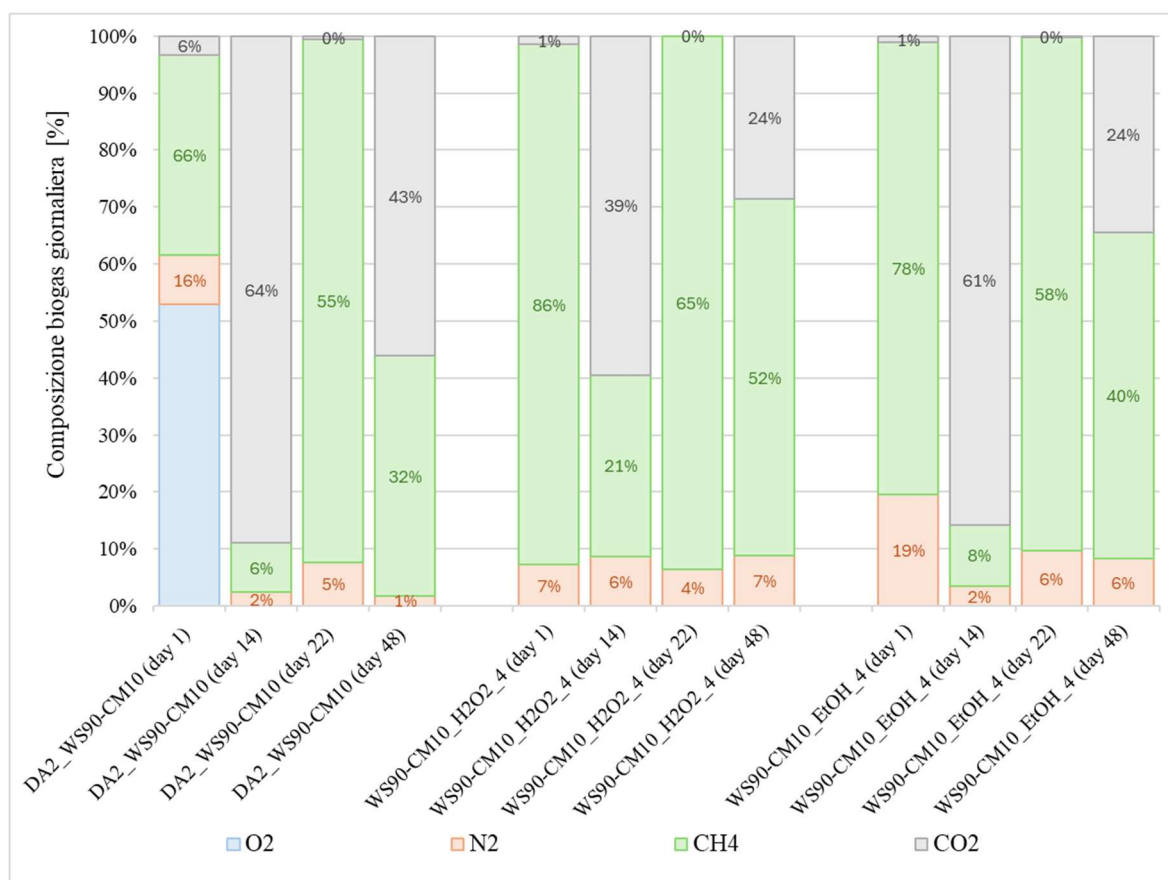


Figura 26 - Composizione del biogas di inizio, metà e fine prova (co-DA2 90:10)

4.4.2 Proprietà del digestato

Il corretto svolgimento della DA2 nei due rapporti di co-DA 90:10 e 100:0 è stato monitorato attraverso analisi del digestato (già effettuate precedentemente per la DA1). Nello specifico i risultati di questo capitolo tratteranno le misurazioni di pH, dei TS e VS/TS finali ed il CHNS(O).

4.4.2.1 Effetto trattamenti chimici sulla digestione anaerobica della paglia

In Tabella 47 sono riportate le misure di pH dei substrati ad inizio DA2, dei campionamenti dopo 14 e 20 giorni e dei digestati finali (giorno 48).

Confrontando il pH della DA1 e della DA2 delle stesse configurazioni 100:0 di paglia macinata al quattordicesimo giorno, si registrano valori notevolmente superiori nel caso di DA2.

Avendo già riscontrato cumulate di biogas e biometano della DA2_WS basse rispetto alle stesse della DA1, si è deciso di correggere il pH dei reattori (al giorno 20), riportandolo ai valori ottimali di processo (6.5-7.5). Tutte e tre le configurazioni (DA2_WS, WS_H2O2_4, WS_EtOH_4) con pH superiore a 7.5 sono state acidificate con quantitativi di HCl 5M

differenti, in modo da riportarne i valori entro un *range* ottimale. I mL di acido addizionati a ciascuna configurazione sono riportati in Tabella 48.

Tabella 47 - pH iniziali, intermedi (pre e post-acidificazione) e finali dei digestati della DA2 100:0

Acronimo	pH (day 0)	pH (day 14)	pH (day 20)	pH (day 48)
DA2_WS	8.11	7.68	7.30	7.75
WS_H2O2_4	8.13 ± 0.04	7.62 ± 0.40	7.35 ± 0.01	7.45 ± 0.07
WS_EtOH_4	8.08 ± 0.13	7.78 ± 0.08	7.23 ± 0.04	7.38 ± 0.03

Tabella 48 - Acidificazione pH DA2 (100:0) con aggiunta di HCl 5M

Acronimo	HCl aggiunto [mL]
DA2_WS	1.00 ± 0.00
WS_H2O2_4	0.50 ± 0.71
WS_EtOH_4	1.00 ± 0.00

In tutte e tre le configurazioni il pH ha un andamento decrescente nei primi 15 giorni di DA2, passando da valori superiori ad 8.0 fino ad un minimo di 7.62.

Nell'articolo [23] il pH giornaliero della co-digestione paglia:letame in rapporto 40:60 (da loro riscontrata come ottimale) è maggiore di quello rappresentante la stessa co-digestione con paglia pretrattata con H₂O₂ 3%. I risultati di questo articolo sono differenti da quelli ottenuti in questa tesi: il pH della WS_H2O2_4 è superiore alla DA2_WS, sia ad inizio prova che al ventesimo giorno. Nell'articolo di *Song e Zhang*, inoltre, tutto il processo si svolge a pH inferiori a 7.0-7.1, dovuti sia alla variazione della concentrazione dei VFA, che agli acidi presenti in alte concentrazioni nel letame [23]. Avendo a che fare con un rapporto 100:0, diverso da quello ottimale dell'articolo (40:60), l'assenza di CM alimentato durante la DA2 può aver contribuito alla mancata riduzione del pH. Sapendo che i batteri metanogeni sono attivi a *range* compresi tra 6.2 e 8, con un intervallo ottimale di 7.0-7.2 [23], ed avendo al quattordicesimo giorno pH pari a 7.6 (WS_H2O2_4), 7.78 (WS_EtOH_4) e 7.68 (DA2_WS) si spiegherebbero le ridotte rese di metano ottenute durante la DA2. Avendo cumulate di CH₄ giornaliero molto basse e notando una diminuzione della produzione di biogas, si è deciso di effettuare una riattivazione microbica attraverso l'acidificazione del pH. È possibile che l'inoculo differente e la miscelazione manuale abbiano generato zone ad alta concentrazione di sostanze azotate, causando a loro volta una basificazione del substrato. Non è stato possibile verificare quest'ipotesi, tuttavia l'utilizzo di HCl 5M ha permesso di terminare la DA2 con rese cumulate di biogas e biometano paragonabili a quelle di letteratura.

Graficando le variazioni di pH in funzione del tempo si ottiene l'immagine in Figura 27. Nel grafico il pH del ventesimo giorno tiene già conto della correzione con HCl 5M.

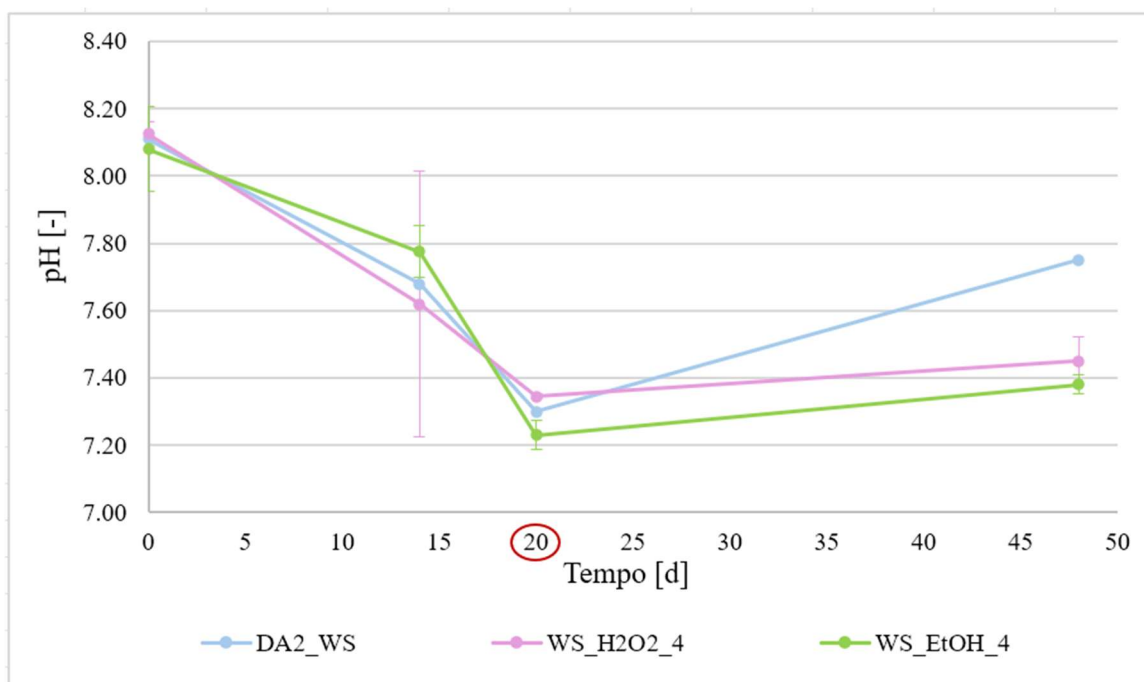


Figura 27 - pH DA2 100:0

La Tabella 49 mostra le analisi dei TS e VS/TS dei digestati prelevati prima e dopo acidificazione. Confrontando i VS/TS alimentati e quelli registrati al quattordicesimo giorno, la diminuzione maggiore tra i reattori, si riscontra per la configurazione WS_H2O2_4, seguita dalla paglia trattata con etanolo (WS_EtOH_4) e macinata (DA2_WS). Anche in questo caso il perossido di idrogeno si conferma la soluzione più degradante in grado di solubilizzare la biomassa lignocellulosica aumentandone la biodisponibilità.

Tabella 49 - TS e VS/TS digestati DA2 (100:0)

Acronimo	pre-acidificazione (day 14)		post-acidificazione (day 20)		Digestato finale (day 48)	
	TS [%]	VS/TS [%]	TS [%]	VS/TS [%]	TS [%]	VS/TS [%]
DA2_WS	7.53	79.94	6.96	79.76	7.34	76.04
WS_H2O2_4	7.25 ± 0.33	75.44 ± 1.40	7.34 ± 0.47	80.24 ± 1.78	6.37 ± 0.50	76.88 ± 0.55
WS_EtOH_4	7.46 ± 0.82	79.18 ± 1.56	7.02 ± 0.30	80.03 ± 0.60	7.29 ± 0.56	81.27 ± 1.73

L'analisi elementare dei digestati di fine DA2 è riportata in Tabella 50. Confrontando la DA1_WS e la DA2_WS a parità di quantitativi di paglia, inoculo e acqua alimentati, si nota un leggero aumento del rapporto C/N della seconda prova di digestione, dovuto probabilmente all'inoculo diverso. Tra le configurazioni della DA2 non si riscontrano evidenti discrepanze tra il C/N della paglia macinata e quelli relativi alla WS_{tr}. Tenendo conto del C/N

complessivamente presente nel reattore (calcolato contando anche l'inoculo) i valori per la DA2_WS, WS_H2O2_4 e WS_EtOH_4 sono rispettivamente pari a 20.46, 19.63 e 20.97. Confrontandoli con i risultati ottenuti a fine digestione (Tabella 50) si nota una riduzione minore di nutrienti nel caso di paglia trattata con etanolo (WS_EtOH_4), che registra il maggior valore di C/N finale, pari a 16.32.

Anche dalla DA2 si evince la forte dipendenza tra la digeribilità del substrato (monitorata attraverso il C/N) e le rese di processo.

Tabella 50 – Analisi elementare digestati finali della DA2 (100:0)

Acronimo	N [%]	C [%]	H [%]	S [%]	O [%]	C/N
DA2_WS	2.86 ± 0.20	41.40 ± 2.13	4.54 ± 0.03	0.65 ± 0.05	26.58 ± 2.14	14.50 ± 0.26
WS_H2O2_4	2.89 ± 0.25	40.58 ± 1.65	5.11 ± 0.19	1.25 ± 0.31	27.05 ± 1.71	14.07 ± 0.87
WS_EtOH_4	2.48 ± 0.09	40.53 ± 1.96	4.98 ± 0.18	0.62 ± 0.02	32.66 ± 1.97	16.32 ± 0.49

4.4.2.2 Effetto trattamenti chimici sulla co-digestione di paglia e letame in rapporto 90:10

La Tabella 51 mostra i valori di pH misurati per la co-DA2 90:10 sui substrati iniziali, intermedi (giorni 14 e 20) e finali. Anche per le configurazioni co-digerite è stato necessario eseguire l'acidificazione dei digestati con HCl 5M al ventesimo giorno, come espresso in Tabella 52.

Tabella 51 - pH iniziali, intermedi e finali dei digestati della co-DA2 90:10

Acronimo	pH (day 0)	pH (day 14)	pH (day 20)	pH (day 48)
DA2_WS90-CM10	8.14	8.33	7.09	8.28
WS90-CM10_H2O2_4	8.05 ± 0.02	7.47 ± 0.18	7.34 ± 0.04	7.54 ± 0.01
WS90-CM10_EtOH_4	8.06 ± 0.04	7.50 ± 0.08	7.32 ± 0.10	7.69 ± 0.01

Tabella 52 - Acidificazione pH co-DA2 (90:10) con aggiunta di HCl 5M

Acronimo	HCl aggiunto [mL]
DA2_WS90-CM10	1.50 ± 0.00
WS90-CM10_H2O2_4	0.50 ± 0.00
WS90-CM10_EtOH_4	0.50 ± 0.00

A differenza della DA2 in rapporto 100:0, dove i valori di pH diminuivano dal giorno zero al giorno 20 per tutte e tre le configurazioni, in questo caso si nota un aumento della basicità per quanto concerne la DA2_WS90-10 (Figura 28).

Confrontando questa configurazione con la DA1_WS90-CM10, nonostante il pH iniziale avesse valori pressoché identici, al giorno 14 si registra per la DA2_WS90-CM10 un aumento della basicità. È possibile supporre che il letame fresco abbia incrementato i valori di pH, data la possibile presenza di composti ammoniacali ed il diverso rapporto carbonio:azoto (C/N DA2_CM superiore al C/N della DA1_CM).

Per quanto riguarda la paglia pretrattata con H₂O₂, l'acidità della materia prima alimentata può aver contrastato l'aumento del livello di pH durante i primi 20 giorni di digestione [80]. L'efficacia dovuta alla soluzione di etanolo sembra aver scaturito lo stesso effetto, facendo aumentare la concentrazione di VFA con il degradarsi della sostanza organica. Per queste ragioni, la correzione di pH delle configurazioni WS_{tr}:CM, del ventesimo giorno, ha richiesto volumi assai minori di HCl rispetto a quelli introdotti nei reattori della DA2_WS90-CM10.

Per WS90-CM10_H2O2_4 e WS90-CM10_EtOH_4 l'intervallo di pH si avvicina al valore ottimale di processo (7.0-7.2) per poi discostarsi a fine digestione.

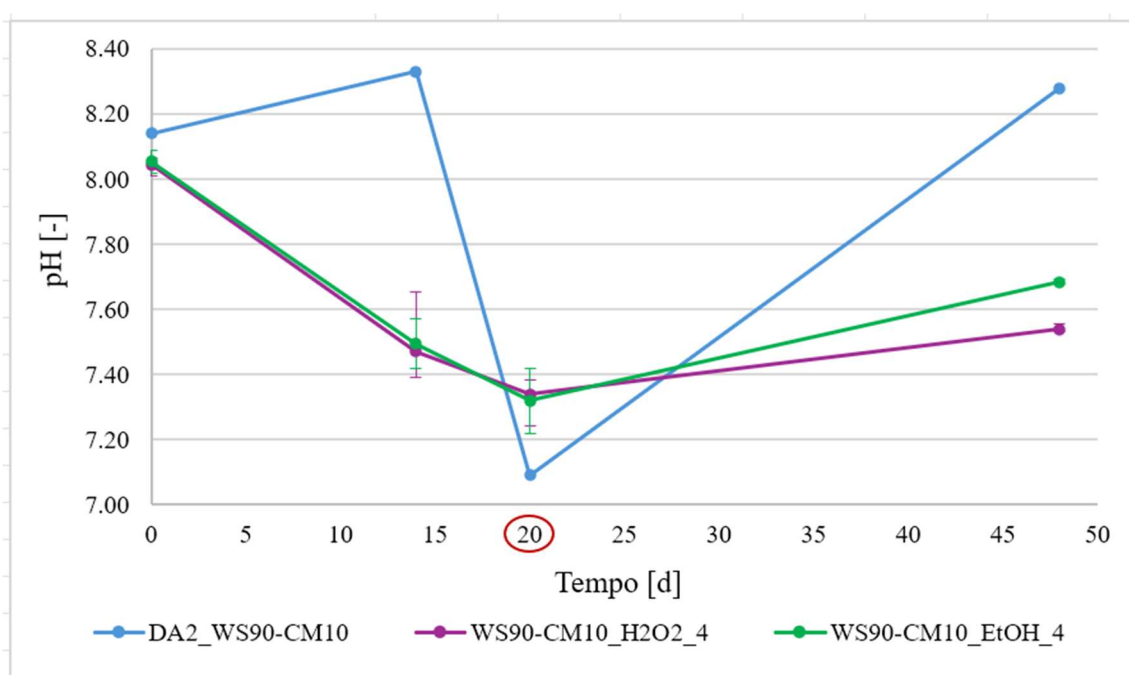


Figura 28 - pH co-DA2 90:10

In Tabella 53 sono riportate le analisi dei solidi totali e volatili dei digestati pre e post-acidificazione. Confrontando la Tabella 45 del capitolo 4.4.1.2 con quella seguente si nota tra i due pretrattamenti una diminuzione maggiore dei VS/TS per la WS90-CM10_H2O2_4, segno di un'efficace degradazione. Per quanto concerne i solidi totali di fine co-digestione, si registrano in tutte e tre le configurazioni valori inferiori a 7.2%.

Tabella 53 - TS e VS/TS digestati di fine co-DA2 (90:10)

Acronimo	pre-acidificazione (day 14)		post-acidificazione (day 20)		Digestato finale (day 48)	
	TS [%]	VS/TS [%]	TS [%]	VS/TS [%]	TS [%]	VS/TS [%]
DA2_WS90-CM10	7.70	79.69	6.12	79.55	6.93	75.76
WS90-CM10_H2O2_4	7.32 ± 0.42	79.50 ± 2.06	7.21 ± 1.09	79.44 ± 0.21	7.16 ± 0.78	75.85 ± 1.70
WS90-CM10_EtOH_4	7.73 ± 0.70	79.55 ± 0.90	6.80 ± 0.16	79.17 ± 2.77	7.15 ± 0.19	79.14 ± 0.49

Come per gli altri digestati, si riporta di seguito l'analisi elementare ed il rapporto C/N (Tabella 54) a seguito dei 48 giorni di co-DA.

Nonostante le tre configurazioni sembrano mostrare valori di C/N pressoché simili, dall'analisi elementare emerge un digestato meno carbonioso sia per la WS90-CM10_H2O2_4 che per la WS90-CM10_EtOH_4. Il perossido di idrogeno sembra aver degradato efficacemente la biomassa lignocellulosica, aumentandone la disponibilità di carbonio e facilitandone la conversione in metano e CO₂, con conseguente diminuzione del C% del digestato finale.

Avendo alimentato un C/N totale pari a 19.35 (DA2_WS90-CM10), 18.7 (WS90-CM10_H2O2_4) e 19.57 (WS90-CM10_EtOH_4), la diminuzione di nutrienti maggiore si ottiene nel caso della paglia non trattata (-4.76).

Tabella 54 - Analisi elementare digestati finali della co-DA2 (90:10)

Sigla	N [%]	C [%]	H [%]	S [%]	O [%]	C/N
DA2_WS90-CM10	3.01 ± 0.70	42.90 ± 3.23	4.86 ± 0.44	0.68 ± 0.17	24.31 ± 3.34	14.59 ± 2.18
WS90-CM10_H2O2_4	2.52 ± 0.13	39.14 ± 0.26	4.80 ± 0.15	0.58 ± 0.01	28.80 ± 0.32	15.54 ± 0.82
WS90-CM10_EtOH_4	2.66 ± 0.19	40.13 ± 1.16	4.78 ± 0.05	0.56 ± 0.01	31.01 ± 1.17	15.18 ± 1.50

4.5 Terza Digestione Anaerobica

La terza campagna sperimentale (DA3) è stata eseguita allo scopo di verificare eventuali ottimizzazioni/inibizioni di processo dovute alla presenza di biochar (BC), in reattori contenenti paglia non pretrattata e letame bovino.

Il biochar utilizzato nella terza digestione deriva dalla pirolisi a 700 °C della paglia di grano. Tale prodotto commerciale è stato inserito in reattori contenenti WS macinata e letame, nei rapporti risultati ottimali dalla prima digestione (100:0 e 90:10). Per la prova sono state testate tre concentrazioni differenti di BC: 2.5, 5 e 10 g/L (BC2.5, BC5, BC10).

In questa prova di digestione sono stati adoperati egual inoculo e stesso letame della DA2.

4.5.1 Produzione e composizione del biogas

4.5.1.1 Effetto dell'aggiunta di biochar sulla digestione della paglia

Di seguito si raffigurano le curve cumulate di biogas della terza prova di digestione (Figura 29). Non tutte le cumulate hanno rappresentata la deviazione standard dal momento che si è deciso di non considerare i reattori con produzioni di biogas anomale.

La cumulata di biogas più elevata si ottiene utilizzando 5 g/L di BC (565.41 NL/kg_{vs s}), seguita dalle concentrazioni 2.5 e 10 g/L. Complessivamente, rispetto alla DA3_WS, si notano attività biologiche maggiori con tutte e tre le concentrazioni di biochar.

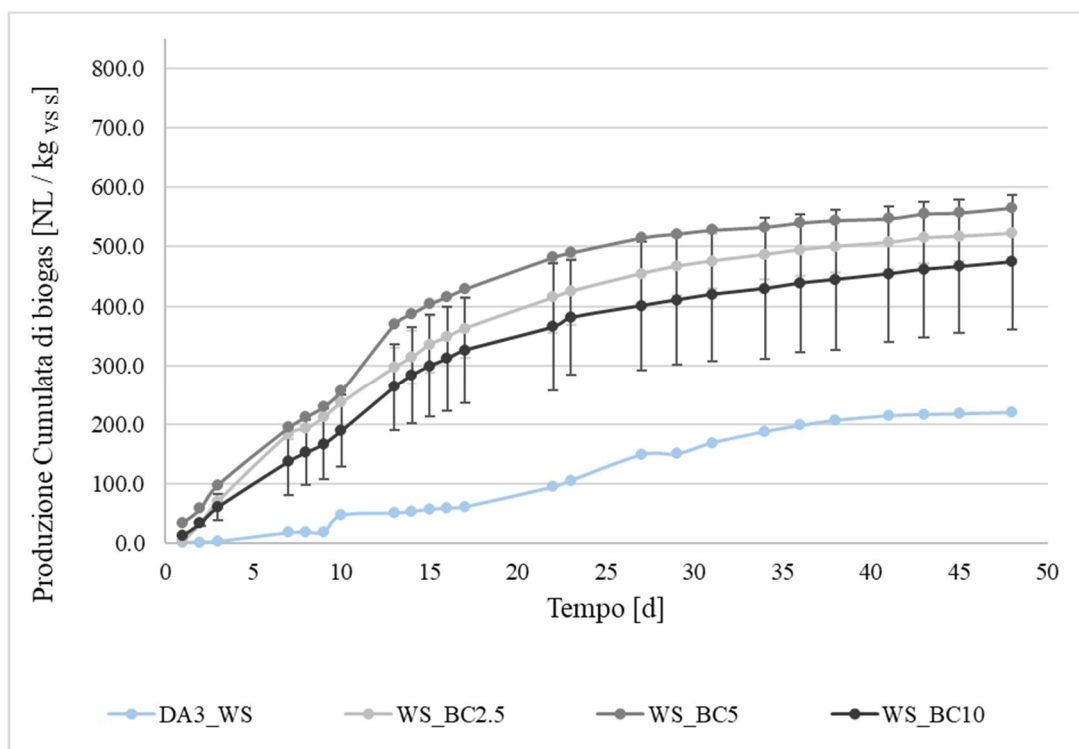


Figura 29 - Produzione cumulata di biogas della DA3 (100:0)

Nella Figura 30 sono graficate le cumulate di metano inerenti alla terza digestione. Tutte le

curve si stabilizzano già dal ventesimo giorno, fatta eccezione per la DA3_WS che necessita di un periodo doppio di giornate. La produzione maggiore si ottiene con la concentrazione di BC intermedia (5 g/L) seguita fedelmente dalla dose minore di BC (WS_BC2.5). Per quanto riguarda i reattori con concentrazione maggiore e senza BC si notano andamenti pressoché simili. Rispetto alla DA3_WS, si ottengono aumenti di metano del 171.08%, 186.28% e 31.16% aggiungendo rispettivamente in concentrazione crescente il BC. Soprattutto le dosi minori (2.5 e 5 g/L) hanno consentito di ottenere un biogas maggiormente ricco di CH₄, confermando tale sostanza carboniosa come ausilio alla DA e miglioria di processo.

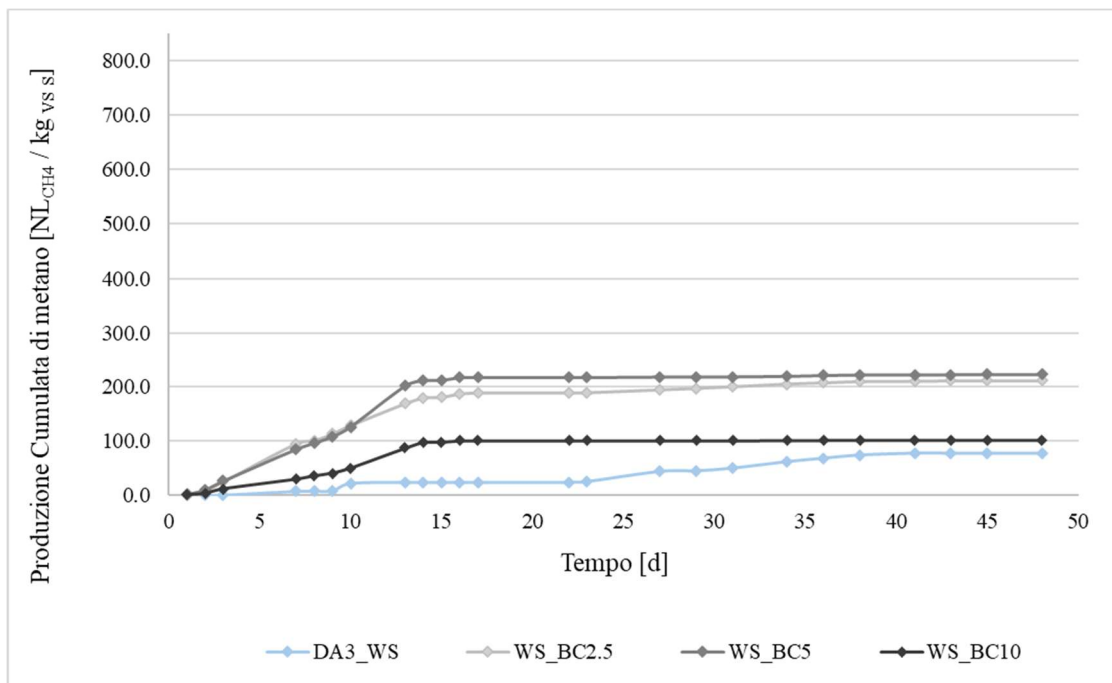


Figura 30 - Produzione cumulata di biogas della DA3 (100:0)

In un articolo di *Paritosh et al.* [51] riguardante una prova di digestione termofila (55 °C) eseguita in reattori batch da 600 mL, contenenti paglia macinata (5 mm) e inoculo (S:I 2:1), viene indagato l'effetto del BC dosato in cinque concentrazioni differenti: 5, 10, 15, 20, 30 g/L. Nello studio, la produzione maggiore di biometano si raggiunge con 10 g/L di BC (223.7 L_{CH₄}/kg_{VS}), seguita da 15 e 5 g/L (rispettivamente 179.6 e 173.0 L_{CH₄}/kg_{VS}). Digerendo solamente paglia macinata senza BC gli autori hanno ottenuto la quota minore di metano, pari a 111.85 L_{CH₄}/kg_{VS} [51]. Le cumulate di biometano di questa tesi hanno valori simili nel caso di 5 g/L di BC, mentre si discostano per difetto dalle concentrazioni pari a 0 e 10 g/L.

In Tabella 55 sono riportati numericamente le cumulate di biogas e biometano delle quattro digestioni 100:0 della DA3. I valori di BPS e TBMP sono identici in tutte le configurazioni, dato che calcolati conoscendo le percentuali di TS e VS/TS della WS e l'analisi elementare. Il BC, infatti, non apporta aumenti teorici di queste cumulate non fungendo da substrato e non essendo biodisponibile per la degradazione microbica.

La produzione di metano minore è associata ai reattori privi di BC ed è circa il 18.5% di quella teorizzata (TBMP). In questa tesi, emerge come dose maggiormente redditizia quella intermedia di 5 g/L contro i 10 g/L, che hanno generato solamente 102.03 NL_{CH₄}/kg_{VS}.

Avendo prodotto il 24.2% di CH₄ del TBMP, contro i 52.8% della WS_BC5 e 50.1% della WS_BC2.5, la configurazione contenente la maggior concentrazione di BC si classifica come meno performante tra le tre.

Tabella 55 - Rese di biogas e metano della DA3 (100:0)

	DA3_WS	WS_BC2.5	WS_BC5	WS_BC10
Produzione cumulata di biogas [NL/kgvs_s]	220.15	522.23 ± 43.39	565.41	474.41 ± 112.88
Produzione cumulata di metano [NL_{CH4}/kgvs_s]	77.79	210.88	222.44	102.03 ± 32.82
CH₄:biogas [%]	35.33%	40.38%	39.34%	21.51%
BPS [NL/kgvs_s]	835.17			
TBMP [NL/kgvs_s]	421.14			

Anche per la terza prova di digestione si è reso necessario acidificare i reattori al ventesimo giorno, a seguito dell'aumento di alcalinità dei digestati. È per tale ragione che nell'immagine seguente (Figura 31) si notano alte percentuali di azoto al giorno 22, residue dall'inertizzazione dei reattori post-acidificazione. Per quanto riguarda i giorni antecedenti a tale data, si riscontrano alti quantitativi di metano in tutte e tre le prove contenenti BC, a differenza della DA3_WS che al giorno 14 sembra aver già cessato l'attività.

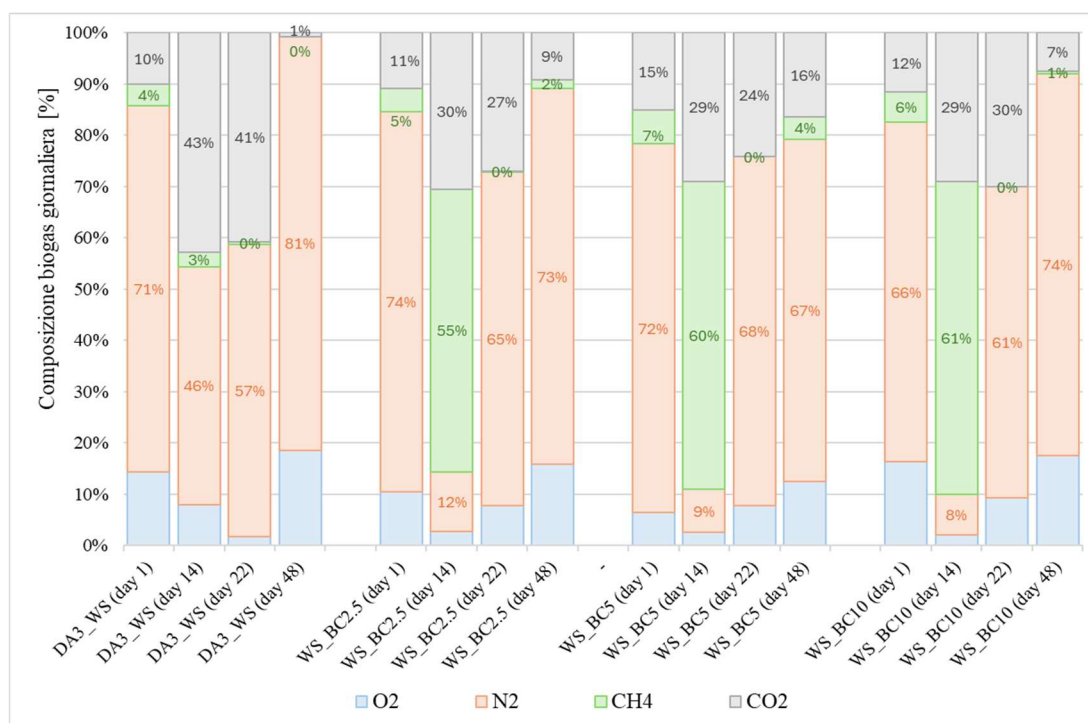


Figura 31 Composizione del biogas di inizio, metà e fine prova (DA3 100:0)

4.5.1.2 Effetto dell'aggiunta di biochar sulla co-digestione di paglia e letame in rapporto 90:10

Il biochar (BC) è stato aggiunto nelle stesse tre dosi (2.5, 5, 10 g/L) anche nei reattori contenenti rapporto WS:CM 90:10. Come per la DA3, sono state graficate le cumulate di biogas (Figura 32) e biometano (Figura 33) per le quattro configurazioni: tre contenenti BC ed il controllo.

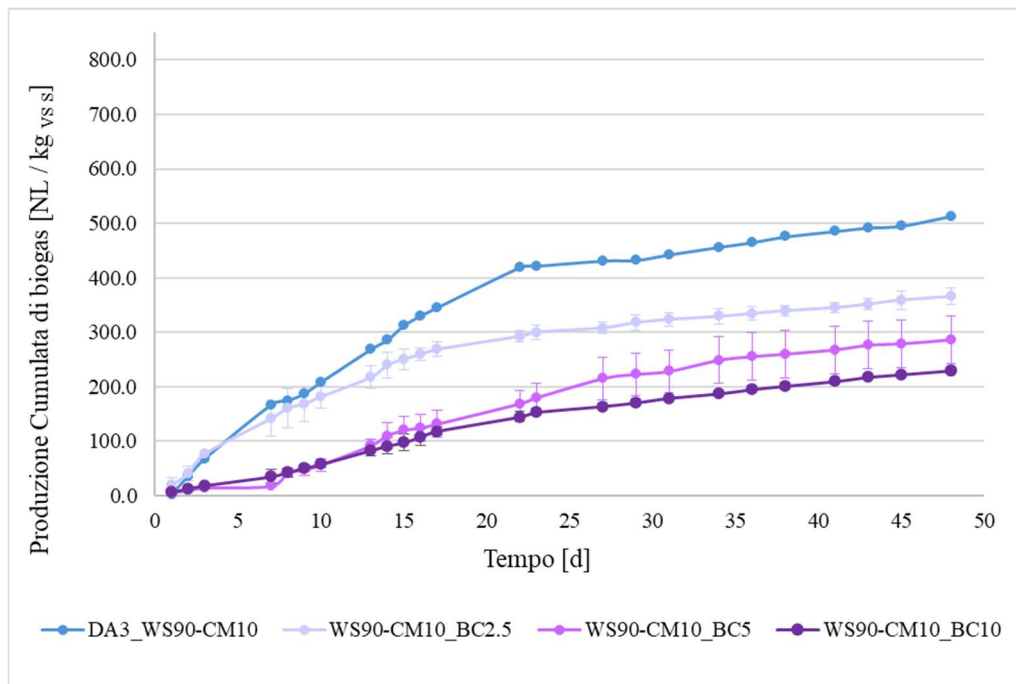


Figura 32 - Produzione cumulata di biogas della co-DA3 (90:10)

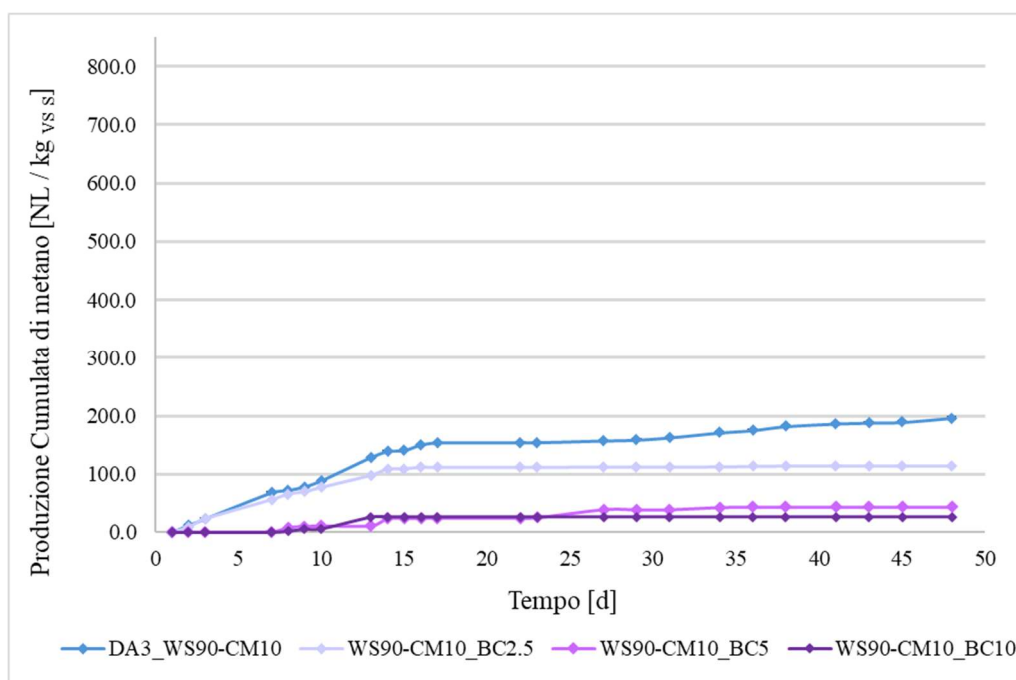


Figura 33 - Produzione cumulata di metano della co-DA3 (90:10)

Nella co-DA3 90:10 la quantità più elevata di biogas è stata raggiunta con i reattori privi di biochar (DA3_WS90-CM10), a differenza della prova con rapporto 100:0, che registrava la cumulata maggiore con 5 g/L di BC (Figura 29). Guardando le curve della Figura 32 si direbbe che all'aumentare della concentrazione di BC corrisponda una diminuzione del gas prodotto dai microrganismi anaerobi. Per quanto concerne le produzioni cumulate di metano (Figura 33) si notano andamenti diametralmente opposti a quelli misurati nella DA3 100:0, ma coerenti con la produzione di biogas della co-DA3 90:10.

Nel lavoro di *Ofon et al.* [49] viene eseguita una co-digestione mesofila (45 °C) con scarti della carta (PW) e letame di pollo (CM_o) con e senza aggiunta di biochar: 0, 1.6, 3.2, 4.8 e 8 g (rispettivamente 0, 20, 40, 60 e 100 g/L). Nello studio vengono utilizzati reattori batch con rapporto PW: CM_o fissato a quello ottimale di 65:35. Nonostante i substrati differenti da quelli di questa tesi, gli autori dell'articolo hanno osservato rese di biogas decrescenti con l'ammontare di BC aggiunto: 1021 L/kg_{VS} per 20 g/L di BC, 970 L/kg_{VS} per 40 g/L, 890 e 770 L/kg_{VS} rispettivamente per 60 e 100 g/L di biochar. Quest'ultimo valore di biogas è addirittura inferiore a quello misurato per il controllo senza BC (775 L/kg_{VS}). Secondo gli autori, l'aumento della produzione cumulata di biogas è strettamente correlato alla quantità di BC aggiunto (effetto dose-dipendente): per basse concentrazioni si hanno stimoli microbici positivi, mentre ad alti dosaggi l'attività microbica viene inibita [49].

In un secondo studio effettuato da *Hu et al.* [81] vengono indagati gli effetti del dosaggio di BC in relazione al rapporto substrato:inoculo. Nel *paper* sono effettuate prove di DA mesofila (37 °C) con alimenti per cani e fanghi di depurazione derivanti dal trattamento delle acque reflue, in tre rapporti S:I pari a 1:2, 1:1 e 2:1. Nelle configurazioni con rapporto unitario viene riscontrata una produzione di biometano decrescente con l'aumentare del BC aggiunto (0, 0.8 e 2.1 g/L). Se la produzione del controllo si avvicina a circa 440 NL/kg_{VS}, quelle ottenute con ambedue le dosi di BC si arrestano a circa 430 NL/kg_{VS}. Secondo quanto affermato dallo studio, la causa di tale fenomeno è da attribuire a lievi condizioni di sovraccarico del substrato (S:I unitario) ed allo sproporzionato rapporto C/N, che influisce in minor misura. Gli autori dell'articolo sostengono inoltre che bassi dosaggi di BC e condizioni di digestioni ottimali non vengano influenzate in modo rilevante dalla presenza del biochar. Quest'ultimo infatti ha un effetto benefico nel caso in cui si presentino condizioni di inibizione microbiche (accumulo di VFA) e alte condizioni di sovraccarico (S:I superiore all'unità) [81].

Anche in questa tesi si riscontrano rese di metano dei digestori contenenti BC minori rispetto al controllo (DA3_WS90-CM10). Avendo alimentato basse dosi di BC ed un rapporto S:I unitario, possono essere considerate valide le considerazioni fatte da *Hu et al.* [81], nonostante i substrati alimentati abbiano composizioni differenti. Secondo le curve della Figura 33, all'aumentare del biochar aggiunto corrisponde un eccessivo adsorbimento di nutrienti, con conseguente inibizione dell'attività e della cinetica microbica [82].

Nell'articolo di *Zhan et al.* [83] viene eseguita la co-digestione 80:20 di paglia di grano con lettiera di pollame e BC in reattori batch mesofili (37 °C), con un volume di lavoro di 550 mL. Nell'articolo le co-digestioni vengono suddivise in tre gruppi, a seconda del quantitativo di TS alimentati: 6, 8 e 10%. Alimentando l'8% di TS e 2.32 g di BC (4.2 g/L), *Zhan et al.* riscontrano quantitativi di metano generati pari a 268.9 L_{CH4}/kg_{VS} (in seguito a 100 giorni di DA) [83].

Sapendo che intorno al cinquantesimo giorno di digestione la produzione cumulata raggiunge valori superiori a 150 L_{CH4}/kg_{VS} e confrontando tale risultato con quelli della Tabella 56, si

notano differenze significative per quanto riguarda l'attività microbica. La configurazione che testa condizioni simili a quelle del *paper* è la WS90-CM10_BC5; tuttavia, in questo caso vengono generati 43.92 NL_{CH4}/kg_{vs}. Avendo alimentato un letame differente, nonostante il rapporto di co-digestione leggermente sproporzionato (90:10 contro gli 80:20 dell'articolo), possiamo attribuirne la causa alla tipologia di letame utilizzato, più che alle dosi di BC. La pollina ha generalmente maggior contenuto di sostanza secca e nutrienti (quali azoto) per unità di peso, rispetto al liquame bovino, che possono aver incrementato l'attività batterica del digestore, favorendo le rese di CH₄ maggiori [84].

Tabella 56 - Rese di biogas e metano della co-DA3 (90:10)

Acronimo	Produzione cumulata di biogas [NL/kg _{vs_s}]	Produzione cumulata di metano [NL _{CH4} /kg _{vs_s}]	CH ₄ :biogas [%]	BPS [NL/kg _{vs_s}]	TBMP [NL/kg _{vs_s}]
DA3_WS90-CM10	513.42	196.39	38.25%	838.31	413.76
WS90-CM10_BC2.5	365.53 ± 15.57	114.17	31.23%		
WS90-CM10_BC5	286.23	43.92	15.34%		
WS90-CM10_BC10	229.81 ± 1.47	26.39	11.48%		

A differenza della DA3 100:0, in cui le rese di processo erano state migliorate dalla presenza di BC, nella co-DA3 90:10 l'aggiunta di quest'ultimo provoca una riduzione drastica del biometano, soprattutto per quanto concerne WS90-CM10_BC5 e WS90-CM10_BC10, che raggiungono il 22% e 13%, rispetto alla cumulata di CH₄ maggiore (DA3_WS90-CM10).

Come si evince dal BPS e TBMP della Tabella 56, rispettivamente pari a 838.31 e 413.76 NL_{CH4}/kg_{vs_s}, il BC aggiunto non ne influenza i valori, dato che non è alimentato come substrato di co-DA, bensì come supporto ai processi metabolici. Le differenze tra la cumulata di CH₄ e la TBMP delle quattro configurazioni, all'aumentare della concentrazione di biochar aggiunto, sono le seguenti: 47.5% per la DA3_WS90-CM10, 27.6% nel caso di WS90-CM10_BC2.5, 10.6% e 6.4% per WS90-CM10_BC5 e WS90-CM10_BC10.

Guardando la composizione giornaliera del biogas (Figura 34), a differenza delle co-DA senza biochar e con 2.5 g/L BC, che al quattordicesimo giorno riportano percentuali di metano superiori al 50%, WS90-CM10_BC5 e WS90-CM10_BC10 registrano anomali livelli di azoto e quantitativi nulli di CH₄. Lo squilibrio di N₂ può essere causato da diversi fattori: letame ricco di composti azotati (NH₃ e NH₄⁺), inefficace miscelazione, variazioni di pH dovuti alla presenza di BC e in grado di aumentare l'alcalinità del substrato.

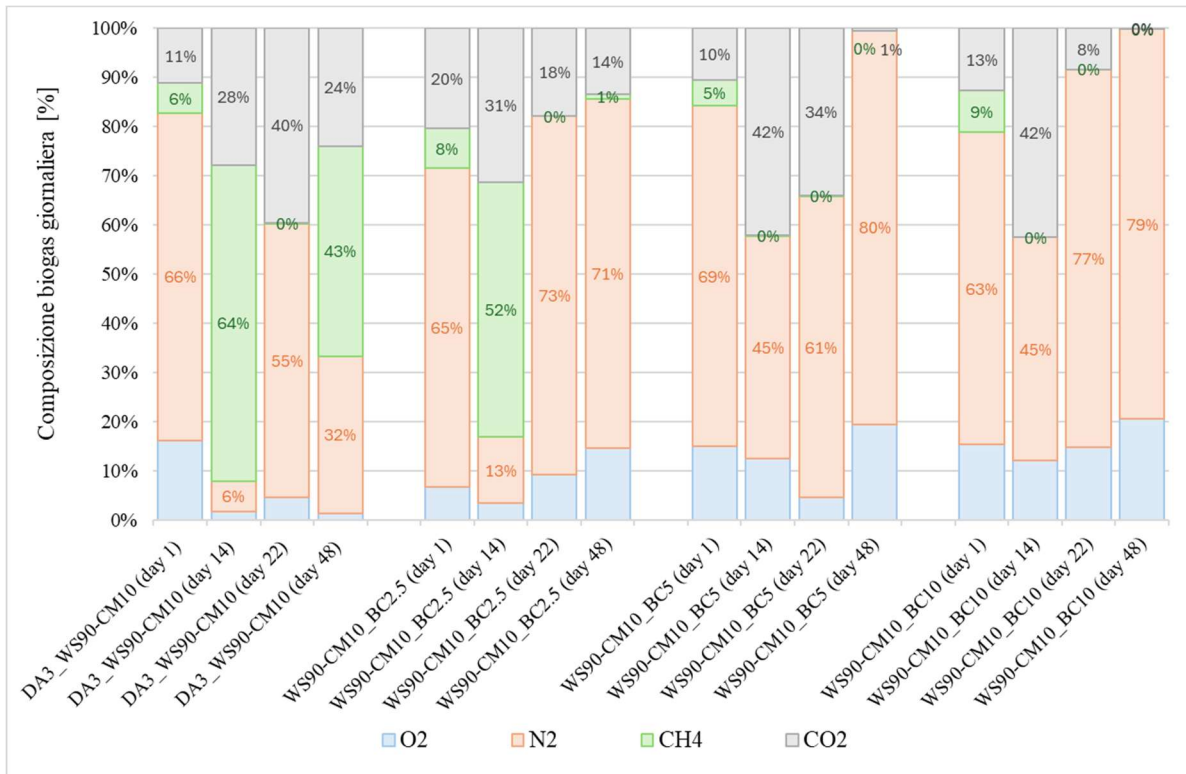


Figura 34 - Composizione del biogas di inizio, metà e fine prova (co-DA3 90:10)

4.5.2 Proprietà del digestato

4.5.2.1 Effetto dell'aggiunta di biochar sulla digestione della paglia

I valori di pH dei digestati della DA3 100:0 sono riportati in Tabella 57. Avendo scarse rese di biogas e rilevando un pH superiore a 7.5 (giorno 14), si è deciso di correggere ogni configurazione che superasse tale valore, mediante una soluzione di HCl 5M. Le dosi aggiunte per ciascun digestore sono indicate in Tabella 58.

Tabella 57 - pH iniziali, intermedi (pre e post-acidificazione) e finali dei digestati della DA3 100:0

Acronimo	pH (day 0)	pH (day 14)	pH (day 20)	pH (day 48)
DA3_WS	8.11	7.68	7.30	7.75
WS_BC2.5	7.98 ± 0.06	7.55 ± 0.04	7.32 ± 0.03	7.72 ± 0.08
WS_BC5	8.04	7.63	7.36	7.59
WS_BC10	7.99 ± 0.04	7.65 ± 0.10	7.30 ± 0.07	8.15 ± 0.44

Tabella 58 - Acidificazione pH DA3 (100:0) con aggiunta di HCl 5M

Acronimo	HCl aggiunto [mL]
DA3_WS	1.00 ± 0.00
WS-BC2.5	0.50 ± 0.00
WS-BC5	0.50 ± 0.00
WS-BC10	0.75 ± 0.35

Pur avendo effettuato l'acidificazione dei reattori, l'alcalinità del substrato cresce rispetto ai range ottimali di DA. Il pH maggiore si riscontra con la più alta concentrazione di BC (10 g/L). Confrontando la WS_BC5 e la WS_BC2.5 ci si aspetterebbe un pH finale minore nel caso di quest'ultima configurazione (vista la minor quantità di BC basico); tuttavia, i valori ottenuti smentiscono tale ipotesi. Come già detto più volte in questa trattazione, l'attività microbica è fortemente influenzata da molteplici fattori (C/N, miscelazione, S:I, pH). Avendo constatato che le rese di metano della DA3 vengono incrementate (per tutte e tre le concentrazioni di BC aggiunte) rispetto al controllo e notando digestati con pH pressoché simili tra DA3_WS, WS-BC2.5 e WS-BC5, possiamo confermare il biochar come acceleratore metabolico.

Il pH finale della WS-BC10 è quello che si discosta maggiormente dal controllo; tuttavia, l'elevata concentrazione non sembra aver inibito l'attività batterica, che registra comunque alte produzioni di biogas e metano.

Nell'articolo di *Paritosh et al.* [51], riguardante la digestione termofila (55 °C) di paglia di grano con aggiunta di biochar in diverse concentrazioni (5, 10, 15, 20 e 30 g/L), viene stimata come quantità ottimale di BC la concentrazione pari a 10 g/L, in grado di generare 223.7 L_{CH4}/kg_{VS}. A fine prova, il pH del digestato di questa configurazione ha un valor medio di 7.6 [51]. Nonostante le condizioni di digestione differenti, notiamo valori di pH molto simili per le configurazioni di questa tesi, nello specifico per la WS-BC5, WS-BC2.5 e DA3_WS.

In merito al valore di quest'ultima possono essere fatte le stesse considerazioni discusse nel paragrafo 4.4.2.1 ed inerenti al pH della DA2_WS, dato che il reattore è lo stesso ma nominato diversamente per comodità.

Graficando i valori della Tabella 57 si ottiene la Figura 35. È importante specificare che al ventesimo giorno sono riportati direttamente i valori post acidificazione.

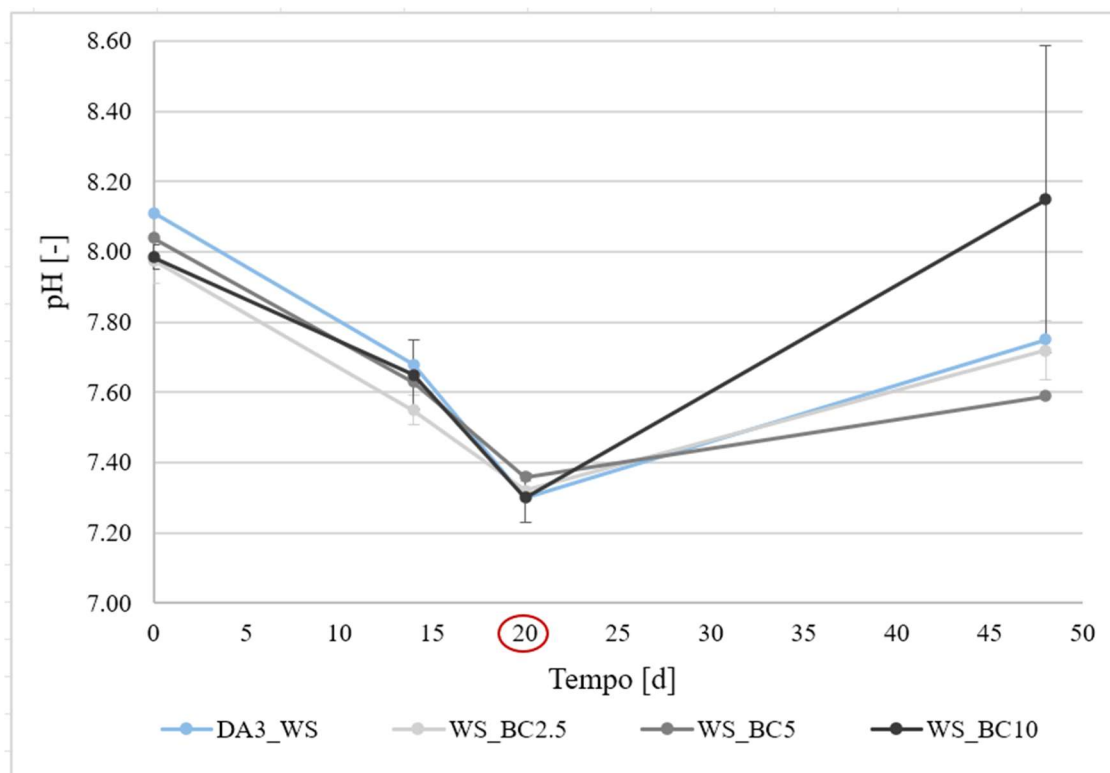


Figura 35 - pH DA3 100:0

Le analisi dei TS e VS/TS dei substrati intermedi (pre e post-acidificazione) e dei digestati finali sono mostrati in Tabella 59, mentre il CHNS(O) è riportato in Tabella 60.

Tabella 59 - TS e VS/TS digestati DA3 (100:0)

Acronimo	pre acidificazione (day 14)		post acidificazione (day 20)		fine DA3 (day 48)	
	TS [%]	VS/TS [%]	TS [%]	VS/TS [%]	TS [%]	VS/TS [%]
DA3_WS	7.53	79.94	6.96	79.76	7.34	76.04
WS_BC2.5	7.72 ± 0.01	80.01 ± 0.60	5.77 ± 0.98	79.44 ± 0.28	6.04 ± 0.64	76.66 ± 3.16
WS_BC5	6.79	78.74	6.683	78.76	6.65	74.55
WS_BC10	7.70 ± 0.47	80.90 ± 0.68	7.63 ± 0.27	80.59 ± 1.59	7.61 ± 0.85	76.40 ± 0.01

+

Tabella 60 - Analisi elementare digestati finali della DA3 (100:0)

Acronimo	N [%]	C [%]	H [%]	S [%]	O [%]	C/N
DA3_WS	2.86 ± 0.20	41.40 ± 2.13	4.54 ± 0.03	0.65 ± 0.05	26.58 ± 2.14	14.50 ± 0.26
WS_BC2.5	2.70 ± 0.10	37.86 ± 0.89	4.37 ± 0.10	0.56 ± 0.05	31.17 ± 0.90	14.05 ± 0.66
WS_BC5	2.76	39.03	4.63	0.51	27.62	14.14
WS_BC10	2.42 ± 0.15	44.94 ± 4.98	3.90 ± 0.54	0.47 ± 0.06	24.67 ± 5.01	18.67 ± 3.16

La percentuale dei TS alimentati complessivamente nei reattori cresce con l'aggiunta del biochar, rispettivamente pari a 8, 8.23, 8.46 e 8.91%. Confrontando tali valori con le analisi dei TS di fine DA3, si riscontrano le maggiori diminuzioni nel caso di WS_BC2.5 (-2.19%) e la WS_BC5 (-1.81%), segno di una buona degradazione del substrato organico alimentato. Il valore maggiore di solidi totali si ottiene nel caso di WS_BC10 e DA3_WS, confermando una minor attività microbica con conseguente riduzione del CH₄ prodotto. Per quanto riguarda i solidi volatili, la riduzione maggiore si ottiene per i reattori contenenti concentrazioni di BC di 5 g/L, dovuto all'efficace conversione delle sostanze organiche inizialmente presenti. Avendo alimentato una struttura lignocellulosica non pretrattata, la diminuzione dei VS/TS percentuali ha comunque valori contenuti (compresi tra 18 e 21%) in tutte e quattro le configurazioni. Per quanto concerne il rapporto C/N inizialmente alimentato si hanno valori crescenti con l'ammontare di BC aggiunto: 21.21 per WS_BC2.5, 21.94 per WS_BC5 e 23.33 per WS_BC10. Il rapporto C/N di fine digestione invece, riscontra valori pressoché simili, fatta eccezione per la WS_BC10 il cui valore è sicuramente correlato alla maggior concentrazione di biochar carbonioso.

4.5.2.2 Effetto dell'aggiunta di biochar sulla co-digestione di paglia e letame in rapporto 90:10

I pH dei digestati di fine co-DA3 riportano tutti valori superiori ad 8, fatta eccezione per la configurazione WS90-CM10_BC2.5 (Tabella 61). Anche in questo caso i valori del giorno venti sono stati corretti acidificando i reattori con HCl 5M (Tabella 62). Come si evince da questi risultati, le quantità maggiori di acido sono state aggiunte alla co-digestione senza BC, risultata in seguito la migliore in termini di rese di biogas e biometano.

Tabella 61 - pH iniziali, intermedi e finali dei digestati della co-DA3 90:10

Acronimo	pH (day 0)	pH (day 14)	pH (day 20)	pH (day 48)
DA3_WS90-CM10	8.14	8.33	7.09	8.28
WS90-CM10_BC2.5	8.05 ± 0.01	7.58 ± 0.06	7.34 ± 0.05	7.76 ± 0.10
WS90-CM10_BC5	8.05 ± 0.07	7.60 ± 0.07	7.32 ± 0.06	8.34 ± 0.52
WS90-CM10_BC10	8.05 ± 0.03	7.63 ± 0.02	7.36 ± 0.01	8.38 ± 0.04

Tabella 62 - Acidificazione pH co-DA3 (90:10) con aggiunta di HCl 5M

Acronimo	HCl aggiunto [mL]
DA3_WS90-CM10	1.50 ± 0.00
WS90-CM10-BC2.5	0.75 ± 0.35
WS90-CM10-BC5	0.50 ± 0.00
WS90-CM10-BC10	0.50 ± 0.00

Nonostante il pH della DA3_WS90-CM10 sia stato condizionato ai valori più acidi, il digestato finale di questa configurazione è più alcalino di quello monitorato per la WS90-CM10_BC2.5 (Figura 36). I reattori contenenti biochar nelle due concentrazioni maggiori hanno andamenti pressoché identici che culminano a pH superiori ad 8.3, come la configurazione senza BC. Avendo già detto precedentemente che il letame fresco appena raccolto può essere problematico (vista l'abbondanza di composti azotati) e compromettere l'attività biologica, è possibile che la compresenza di CM e BC alcalino abbiano instaurato condizioni sfavorevoli di pH compromettendo le rese di processo. Seguendo quest'ipotesi si spiegherebbe come mai le cumulate di metano associata alla co-DA (WS90-CM10_BC5 e WS90-CM10_BC10) siano così differenti dalle rispettive WS_BC5 e WS_BC10. Al digestato già alcalino della DA3_WS90-CM10 si aggiunge la presenza del BC altamente alcalino che ne fa discostare ancor di più il valore dalla neutralità.

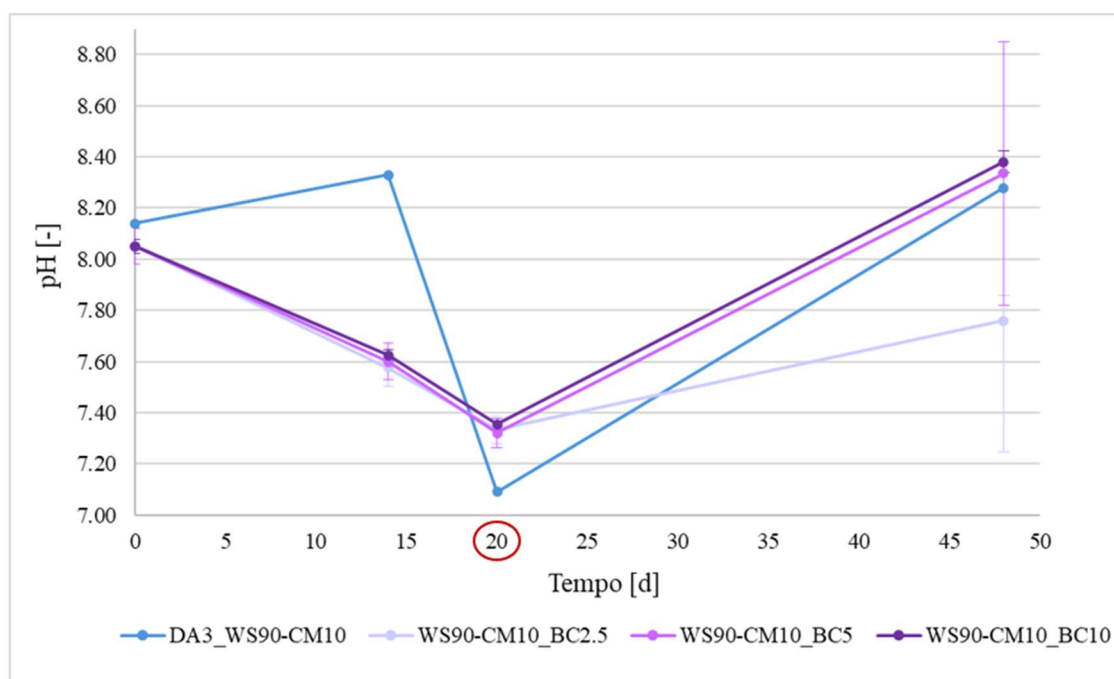


Figura 36 - pH co-DA3 90:10

Anche per la co-DA3 sono stati misurati i solidi totali e volatili contenuti nei digestati intermedi e finali (Tabella 63) e le percentuali elementari che li costituivano (Tabella 64).

Tabella 63 - TS e VS/TS digestati co-DA3 (90:10)

Acronimo	pre-acidificazione (day 14)		post-acidificazione (day 20)		fine co-DA3 (day 48)	
	TS [%]	VS/TS [%]	TS [%]	VS/TS [%]	TS [%]	VS/TS [%]
DA3_WS90-CM10	7.70	79.69	6.12	79.55	6.93	75.76
WS90-CM10_BC2.5	8.19 ± 0.29	79.07 ± 0.94	6.43 ± 0.64	78.18± 0.28	5.94 ± 0.26	71.85 ± 0.01
WS90-CM10_BC5	8.44 ± 0.47	77.22 ± 2.01	6.66 ± 0.94	79.17 ± 1.78	6.50 ± 0.09	76.80± 2.92
WS90-CM10_BC10	6.18 ± 1.80	78.65 ± 2.45	5.79 ± 1.04	80.23 ± 0.42	6.75 ± 0.93	75.28 ± 1.32

Tabella 64 - Analisi elementare digestati finali della co-DA3 (90:10)

Sigla	N [%]	C [%]	H [%]	S [%]	O [%]	C/N
DA3_WS90-CM10	3.01	42.90	4.86	0.68	24.31	14.59
WS90-CM10_BC2.5	2.71 ± 0.06	37.63 ± 0.29	4.44 ± 0.02	0.63 ± 0.02	26.44 ± 0.30	13.87 + 0.28
WS90-CM10_BC5	2.57 ± 0.15	39.55 ± 0.70	4.65 ± 0.06	0.61 ± 0.04	29.42 ± 0.72	15.41 + 1.01
WS90-CM10_BC10	2.74 ± 0.08	38.83 ± 0.83	4.61 ± 0.11	0.60 ± 0.00	28.50 ± 0.84	14.18 + 0.48

Sebbene i TS (%) più elevati si riscontrino nel digestato finale della DA3_WS90-CM10, questa configurazione risulta comunque la migliore in termini di produzione di biometano. Per i reattori contenenti anche BC, i TS minori sono registrati per la WS90-CM10_BC2.5 che, com'è stato detto già nel capitolo 4.5.1.2, genera i quantitativi di biogas e biometano maggiori rispetto alle altre co-DA con BC. Nonostante le scarse rese di processo, la diminuzione dei VS/TS ha valori paragonabili ai reattori in rapporto 100:0. È possibile fare la stessa considerazione anche per il rapporto C/N. Come per la DA3, la concentrazione di BC maggiore (10 g/L) è quella che riporta il risultato maggiore, rispetto alle altre in linea fra loro. In letteratura è difficile trovare articoli che riportino quantitativi di C/N da poter confrontare con quelli ottenuti in questo lavoro. In uno studio di *Ciurli et al.* [85] viene riportato il C/N del digestato derivante da DA mesofila di letame bovino (pari a 10.6) che può essere preso come base di riferimento per il confronto. Avendo compresenza di CM, inoculo e BC, è plausibile aver ottenuto C/N intorno a tale valore ed aumentato dal quantitativo di WS che ne apporta aumenti di carbonio.

Il C/N alimentato ad inizio co-DA3 ha valori pari a 22.05 (WS90-CM10_BC2.5), 22.96 (WS90-CM10_BC5) e 24.68 (WS90-CM10_BC10). A differenza della DA3, dove il BC maggiormente dosato comportava un C/N di fine digestione maggiore (18.67), il rapporto dei nutrienti del

digestato inerente alla WS90-CM10_BC10 si uniforma con gli altri valori.

Guardando tali risultati si direbbe che la degradazione microbica sia avvenuta correttamente: C/N finale si riduce drasticamente in tutte e tre le co-DA contenenti BC. Dato il quantitativo minore di biometano, rispetto al controllo, si può dedurre una probabile conversione dei nutrienti in composti azotati che hanno inibito la produzione dei metanogeni e spiegherebbero le alte rese di azoto di fine co-DA3 (Figura 34). L'effetto assorbente del BC può aver ulteriormente contribuito accelerando le reazioni e ritardando il rilascio dei composti d'interesse (CH₄ e CO₂).

4.6 Caratterizzazione dei digestati migliori per applicazioni agronomiche

Sui digestati finali delle configurazioni migliori delle tre prove di digestione è stata effettuata un'ulteriore analisi, volta a determinare il quantitativo di potassio (K), fosforo totale (P_{tot}), azoto totale (N_{tot}), azoto ammoniacale (NH₄⁺) e nitrati (NO₃⁻), per eventuali applicazioni agronomiche. I digestati analizzati e i rispettivi quantitativi ottenuti, mediante kit chimici, sono riportati in Tabella 65:

Tabella 65 – Analisi chimica eseguita sui digestati delle migliori configurazioni

Acronimo	K [mg/L]	P _{tot} [mg/L]	N _{tot} [mg/L]	NH ₄ ⁺ [mg/L]	NO ₃ ⁻ [mg/L]
DA1_WS	2050	266	2495	650	76
DA1_WS90-CM10	4090	155	2705	630	68
WS_H2O2_4	2250	253	2580	790	75.5
WS_BC5	2050	214	3025	865	88

Come si evince dalla Tabella 65, si è scelto di analizzare i due digestati che hanno permesso di ottenere le maggiori rese di biometano della DA1 (WS:CM 100:0 e 90:10), quello inerente al pretrattamento con perossido di idrogeno derivante dalla DA2 e infine la WS_BC5, risultata la configurazione che nella DA3 ha generato la cumulata di CH₄ maggiore.

Guardando complessivamente i risultati ottenuti per NO₃⁻, si notano valori coerenti tra le quattro configurazioni, con una discrepanza massima di 12.5 mg/L. L'azoto totale e gli NH₄⁺ registrano le concentrazioni maggiori nel caso di WS_BC5, segno di un accumulo dovuto all'assorbimento all'interno delle porosità del biochar. Per quanto riguarda il fosforo solubile (P_{tot}) ed il potassio (K), i valori non sembrano esser stati influenzati particolarmente dal pretrattamento chimico e dal BC, quanto più dalla presenza di letame. La DA1_WS90-CM raddoppia il valore del potassio rispetto agli altri digestati, mentre dimezza quello inerente al fosforo. Sapendo che K è altamente solubile e non viene trasformato biologicamente, il suo alto quantitativo deriva

direttamente dai substrati alimentati nella DA1_WS90-CM10. Non avendone alte quantità nella DA1_WS possiamo dedurre che tale apporto sia dato esclusivamente dal letame bovino.

Per quanto riguarda P_{tot} invece, sapendo che CM ne è un'importante riserva, è possibile che la maggior parte sia precipitato sottoforma di fosfati riducendone la quantità solubilizzata. La presenza del BC può aver avuto un effetto adsorbente scaturendone lo stesso effetto.

In un recente studio, relativo alla frazione liquida dei digestati provenienti da impianti di biogas agricoli, sono state stimate le quantità di fosforo e azoto dei digestati ottenuti da tre diverse categorie merceologiche: rifiuti lignocellulosici di origine agricola, alimentari (scarti di frutta e verdura) e reflui zootecnici (costituiti prevalentemente da letame bovino). In seguito alla centrifugazione del digestato a 4000 rpm è stata estratta la frazione liquida su cui effettuare le analisi. Il digestato da bestiame dell'articolo presentava la concentrazione di fosforo maggiore, mentre quella lignocellulosica era la minore (con 238.4 ± 8.5 mg PO_4^{3-}/L) [86]. I valori di P_{tot} di questo lavoro, misurati come fosforo solubile sulla frazione liquida del digestato, sono paragonabili a quelli del *paper* per tre delle quattro configurazioni analizzate (DA1_WS, DA2_WS_H2O2_4 e WS_BC5). L'unica configurazione il cui digestato ha valori inferiori di fosforo è quella della co-DA1 90:10.

Per quanto concerne il quantitativo di azoto totale, il valore stimato da *Tuszynska et al.* [86] variava in un *range* compreso tra 1363-3211 mg/L a seconda delle caratteristiche del substrato alimentato (2262 ± 20.0 mg/L per i reflui zootecnici e 1394 ± 45.7 mg/L per le matrici lignocellulosiche).

Sia per la DA1_WS che per DA1_WS90-CM10, abbiamo ottenuto valori di N_{tot} leggermente superiori al valor medio riportato da [86], comunque coerenti con l'intervallo. La presenza del letame nella DA1_WS90-CM10 ha sicuramente contribuito ad aumentare il quantitativo di azoto totale, così come ha fatto anche il BC della WS_BC5 che registra un ammontare di N_{tot} superiore alla DA1_WS. Sapendo che l'estratto liquido del BC registrava un quantitativo di azoto pari a 62 mg/L, possiamo confermarne l'incremento nel digestato finale della WS_BC5. Nel lavoro di *Tuszynska et al.* [86] l'azoto ammoniacale, formatosi durante l'idrolisi di proteine ed urea, ha costituito la forma predominante di azoto (dal 60 al 90%). La percentuale ottenuta in questa tesi è nettamente inferiore (~27% per la DA1_WS e ~23% per DA1_WS90-CM10), tuttavia rientra in quella di un altro studio in cui NH_4^+ costituiva dal 16-72% dell'azoto totale a seconda delle matrici alimentate [72]. Per quanto concerne NH_4^+ ed NO_3^- , WS_BC5 è il digestato maggiormente ricco di tali sostanze, a differenza delle altre tre configurazioni che presentano concentrazioni abbastanza simili tra loro.

Non sono state effettuate ulteriori analisi che potessero determinare qualitativamente e quantitativamente composti potenzialmente limitanti (Pb, Ni, Cu, Cd, Zn, Cr e Hg) per eventuali applicazioni in serra. È improbabile che le matrici alimentate abbiano quantitativi di metalli pesanti superiori alle normative, visto che si tratta prevalentemente di paglia di grano e letame. Tuttavia, anche queste sostanze potrebbero essere soggette a contaminazioni precedenti, per cui qualora i digestati si dovessero impiegare come fertilizzanti è obbligatorio effettuare ulteriori analisi.

4.7 Test di germinazione

Per stabilire se tali digestati potessero essere impiegati in ambito agronomico è stato effettuato il test di germinazione. I quattro digestati del capitolo precedente sono stati diluiti in sei concentrazioni: 1, 5, 10, 15, 25, 50%. In Tabella 66 sono riportate le misurazioni della lunghezza radicale del controllo e del campione analizzato (rispettivamente L_C ed L_I) ed il numero di semi germinati (G_C e G_I).

Tabella 66 – Test di germinazione sui digestati selezionati

Configurazione		Lunghezza radicale [mm]	Numero di semi germinati
Controllo	H ₂ O	20.225 ± 0.56	9 ± 0.5
DA1_WS	1%	23.67 ± 3.38	9.7 ± 0.56
	5%	6.13 ± 3.95	5.5 ± 1.9
	10%	3.95 ± 0.64	4.5 ± 0.71
	15%	0.375 ± 0.75	0 ± 0
	25%	0 ± 0	0 ± 0
	50%	0 ± 0	0 ± 0
DA1_WS90-CM10	1%	7.8 ± 3.35	8 ± 1.8
	5%	2.175 ± 2.95	3.25 ± 1.9
	10%	0.13 ± 0.02	0.25 ± 0.5
	15%	0 ± 0	0 ± 0
	25%	0 ± 0	0 ± 0
	50%	0 ± 0	0 ± 0
WS_H2O2_4	1%	38.83 ± 8.71	9.75 ± 0.5
	5%	26.80 ± 5.76	9.25 ± 1.5
	10%	5.7 ± 1.57	5 ± 1
	15%	0 ± 0	0 ± 0
	25%	0 ± 0	0 ± 0
	50%	0 ± 0	0 ± 0
WS_BC5	1%	18.93 ± 0.71	9.25 ± 1.5
	5%	5.38 ± 1.47	5.25 ± 0.96
	10%	0 ± 0	0 ± 0
	15%	0 ± 0	0 ± 0
	25%	0 ± 0	0 ± 0
	50%	0 ± 0	0 ± 0

Le configurazioni la cui lunghezza radicale è risultata maggiore rispetto al controllo, riguardano i digestati diluiti all'1% della WS_H2O2_4 e DA1_WS e quello al 5% della WS_H2O2_4. In tutte le configurazioni non si registrano semi germinati quando la diluizione del digestato è superiore al 10%. Guardando questi risultati si direbbe che il digestato derivante dal pretrattamento di paglia con perossido di idrogeno sia il più favorevole alla crescita radicale. Conoscendo il numero di semi germinati, la rispettiva lunghezza radicale ed applicando la formula (3.29) del paragrafo 3.6, si ottiene l'indice di germinazione (GI) della Tabella 67.

Tabella 67 – Indice di germinazione dei digestati ottimali

Diluizione digestato	GI [%]			
	DA1_WS	DA1_WS90-CM10	WS_H2O2_4	WS_BC5
1%	130.45 + 22.08	38.32 ± 24.05	107.53 ± 14.64	99.40 ± 13.96
5%	21.60 ± 16.14	6.77 ± 11.46	76.67 ± 34.03	16.66 ± 16.73
10%	9.83 ± 3.38	0 ± 0	8.05 ± 4.34	0 ± 0
15%	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
25%	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
50%	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

In un articolo di *Vitti et al.* [87] viene calcolato il GI del digestato derivante da rifiuti agricoli diluito al 5 e 10% con acqua, misurando la crescita radicale dei semi di *L. sativum* e *R. raphanistrum*. Per le diluizioni al 5% sono stati ottenuti GI pari a 31.7 ± 1.9 % con un numero di semi germinati medio di 6.5 e una lunghezza radicale pari a circa 71 mm.

Nel caso di diluizione 10% i valori del *paper* sono i seguenti: ~16% GI e semi germinati con lunghezza delle radici intorno a 3.8 mm [87]. Confrontando la Tabella 67 con il loro studio si notano valori di GI superiori solamente nel caso di DA1_WS diluito al 10%.

In questa tesi il *Germination index* maggiore si riscontra per il digestato diluito all'1% della DA1_WS, seguito dalla stessa diluizione per la WS_H2O2_4 e WS_BC5. Il GI con la stessa concentrazione di DA1_WS90-CM10, sebbene sia comunque elevato (~38 %), differisce notevolmente probabilmente data la presenza del CM.

In generale il digestato contenente BC e quello con letame hanno causato una germinazione minore rispetto alle configurazioni contenenti WS tal quale (trattata e non) nelle stesse diluizioni. Guardando questi risultati si deduce che tutti i digestati con diluizioni pari o superiori al 15% risultano fitotossici per le piante. La stessa conclusione si può fare per le diluizioni al 10% riguardanti i digestati contenenti CM e BC.

Avendo ricevuto dai produttori del BC un report sulle analisi inerenti alla presenza di sostanze tossiche (metalli pesanti, diossine, idrocarburi eterociclici aromatici) che ne verificava le concentrazioni al di sotto dei limiti, si possono escludere tali sostanze dalle cause di fitotossicità.

5. Conclusioni

In questa tesi la paglia di grano è stata valorizzata mediante digestione anaerobica mesofila, in reattori batch, al fine di ottenere il maggior quantitativo di biometano possibile. Il processo è stato ottimizzato mediante tre campagne sperimentali: la prima (DA1) inerente alla co-digestione di paglia e letame, la seconda (DA2) riguardante digestione di paglia pretrattata chimicamente con e senza letame bovino, nella terza (DA3) è stato aggiunto biochar in tre concentrazioni (2.5, 5 e 10 g/L), per accelerare l'attività microbica e la qualità dei prodotti finali.

Le matrici e i substrati di partenza sono stati caratterizzati mediante analisi elementare, solidi totali e volatili (rispettivamente TS e VS/TS).

In tutte le prove sono state eseguite analisi giornaliere sul biogas sia in termini qualitativi, mediante gascromatografia, che quantitativi (spiazzo) al fine di ricostruire le produzioni cumulate di biogas e biometano, da poter paragonare alle cumulate teoriche (TBMP, BPS) calcolate con la formula di *Buswell e Mueller*.

Per monitorare la qualità del digestato è stato eseguito un prelievo intermedio, dopo quattordici giorni, misurando pH, solidi totali e volatili. Nella seconda e terza prova, avendo scarse rese di metano e notando un pH superiore ai *range* ottimali, si è reso necessario acidificare i reattori con HCl 5M, riportandoli a pH inferiori a 7.5. Avendo alterato nuovamente le condizioni microbiche sono state riefettuate le analisi dei TS, VS/TS e pH su queste configurazioni. Le correzioni della seconda e terza campagna sperimentale non sembrano correlate rispettivamente al pretrattamento chimico e all'aggiunta di BC, quanto più al tipo di inoculo utilizzato (diverso rispetto alla prima digestione).

Per poter eseguire il confronto con le condizioni iniziali nei reattori, sono stati monitorati anche i TS, VS/TS e la percentuale dei composti elementari dei digestati finali delle tre prove. Nonostante la complessa e resistente struttura lignocellulosica, le rese di processo dello studio sono state soddisfacenti sia in termini di biogas che biometano. Nella DA1 le co-digestioni più redditizie sono state quelle con rapporto WS:CM 90:10 e 100:0.

Gli stessi rapporti sono stati mantenuti anche nella DA2 e DA3. Di tre reagenti testati in diverse concentrazioni e periodi, l'analisi del COD la velocità di degradazione hanno evidenziato come soluzioni ottimali etanolo 10% e perossido di idrogeno 10%, ambedue messe in soluzione in rapporto 1:10 (w/V) con WS per 4 ore. Sia la DA2 100:0 che la co-DA2 90:10 hanno confermato l'efficacia dei pretrattamenti chimici, mettendo in risalto H₂O₂ 10% come soluzione migliore. Per quanto riguarda la DA3 invece, l'aggiunta di biochar ha scaturito effetti diversi tra co-DA3 90:10 e 100:0. Nella prima, l'attività microbica sembra esser stata inibita con tutte e tre le concentrazioni di BC, in maniera direttamente proporzionale al dosaggio. Col rapporto 100:0 invece all'aumentare delle dosi di BC corrispondono quantitativi maggiori di biogas, rispetto al controllo contenente solo WS. In questa digestione la cumulata di metano maggiore si ottiene con 5 g/L di biochar.

Avendo constatato nella DA1 un'incompatibilità microbica con il letame fresco (ricco di composti azotati), si è giunti alla conclusione che il biochar della prova 90:10 abbia contribuito all'adsorbimento dei composti desiderati (CH₄ e CO₂) generando zone ricche di azoto che hanno alterato le condizioni batteriche.

Avendo stabilito le configurazioni reattoristiche migliori delle tre digestioni (100:0 e 90:10 per DA1, WS trattata con H₂O₂ 10% e digerita come singolo substrato per la DA2, e WS con 5 g/L per la DA3), si è andati ad analizzare chimicamente tali digestati per eventuali applicazioni agronomiche. Sono state misurate le concentrazioni di K, P, NH₄⁺, NO₃⁻ ed N_{tot}, sia sull'estratto liquido dei digestati che su quello del biochar. La fitotossicità dei quattro digestati è stata inoltre testata mediante prova di germinazione con semi di crescione (*L. sativum*). Dai risultati ottenuti si conclude che tutti i digestati risultano fitotossici a diluizioni superiori al 15%, mentre i digestati della co-DA1 e DA3 lo sono già se diluiti al 10%.

Questi risultati sono interessanti per indagare nuove combinazioni dei substrati, testando ad esempio l'effetto del biochar con il pretrattamento chimico della paglia. In futuro si potrebbe inoltre considerare di rieseguire le prove con un letame stabilizzato, ampliando la seconda e terza campagna sperimentale con tutti i rapporti di co-DA testati nella DA1.

6. Bibliografia

- [1] European Parliament, “Circular economy: definition, importance and benefits,” May 2023. Accessed: Feb. 09, 2026. [Online]. Available: <https://www.europarl.europa.eu/topics/en/article/20151201STO05603/circular-economy-definition-importance-and-benefits>
- [2] Il Sole 24 ore, “Chi produce più rifiuti alimentari tra i Paesi UE?”, Nov. 13, 2024. Accessed: Feb. 09, 2026. [Online]. Available: <https://www.infodata.ilsole24ore.com/2024/10/13/chi-produce-piu-rifiuti-alimentari-tra-i-paesi-ue/>
- [3] F. Neudecker *et al.*, “Strong high-density composites from wheat straw,” *Compos. Part A Appl. Sci. Manuf.*, vol. 188, p. 108533, Jan. 2025, doi: 10.1016/j.compositesa.2024.108533.
- [4] P. Rani, V. V. Pathak, and M. Bansal, “Co-digestion of wheat straw and animal manure pretreated with calcium hydroxide for biomethane production: Kinetic study,” *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, vol. 4, p. 100145, 2021, doi: 10.1016/j.crgsc.2021.100145.
- [5] Renato Vismara and Francesca Malpei, *Biogas da frazioni organiche di rifiuti solidi urbani in miscela con altri substrati*. Milano: Politecnico di Milano D.I.I.A.R. - Sezione Ambientale, in collaborazione con Consorzio Italiano Compostatori, 2007.
- [6] A. Kasinath *et al.*, “Biomass in biogas production: Pretreatment and codigestion,” Oct. 01, 2021, *Elsevier Ltd*. doi: 10.1016/j.rser.2021.111509.
- [7] P. Li *et al.*, “Investigation of interactions among major biomass components during anaerobic digestion under pH-adjustment conditions,” *J. Environ. Chem. Eng.*, vol. 13, no. 2, p. 115667, Apr. 2025, doi: 10.1016/j.jece.2025.115667.
- [8] C. Carotenuto, G. Guarino, L. I. D’Amelia, B. Morrone, and M. Minale, “The peculiar role of C/N and initial pH in anaerobic digestion of lactating and non-lactating water buffalo manure,” *Waste Management*, vol. 103, pp. 12–21, Feb. 2020, doi: 10.1016/j.wasman.2019.12.008.
- [9] APAT, “Digestione anaerobica della frazione organica dei rifiuti solidi,” Roma, 2005. Accessed: Oct. 12, 2025. [Online]. Available: <https://www.isprambiente.gov.it/contentfiles/00003400/3482-manuali-linee-guida-2005.pdf>
- [10] Innovative Green World, “Carico organico ottimale,” Staff IGW. Accessed: Nov. 12, 2025. [Online]. Available: <https://www.igwsrl.com/carico-organico-ottimale>
- [11] G. Srisowmeya, M. Chakravarthy, and G. Nandhini Devi, “Critical considerations in two-stage anaerobic digestion of food waste – A review,” *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 119, p. 109587, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.rser.2019.109587.
- [12] J. Yan and C. A. Salman, “Waste-to-energy (WtE): Current technologies and their future potential,” in *Waste Biorefineries*, Elsevier, 2023, pp. 25–61. doi: 10.1016/B978-0-323-91761-2.00005-2.
- [13] M. Mourshed, M. Kamal, N. I. Masuk, S. A. Chowdhury, and M. H. Masud, “Anaerobic Digestion Process of Biomass,” in *Encyclopedia of Renewable Energy, Sustainability*

- and the Environment*, Elsevier, 2024, pp. 771–782. doi: 10.1016/B978-0-323-93940-9.00025-6.
- [14] R. Kadam, K. Khanthong, H. Jang, J. Lee, and J. Park, “Occurrence, Fate, and Implications of Heavy Metals during Anaerobic Digestion: A Review,” *Energies (Basel)*, vol. 15, no. 22, p. 8618, Nov. 2022, doi: 10.3390/en15228618.
- [15] H. Wang, Y. Dong, Y. Yang, G. S. Toor, and X. Zhang, “Changes in heavy metal contents in animal feeds and manures in an intensive animal production region of China,” *Journal of Environmental Sciences*, vol. 25, no. 12, pp. 2435–2442, Dec. 2013, doi: 10.1016/S1001-0742(13)60473-8.
- [16] S. Mlinar, A. R. Weig, and R. Freitag, “Influence of NH₃ and NH₄⁺ on anaerobic digestion and microbial population structure at increasing total ammonia nitrogen concentrations,” *Bioresour. Technol.*, vol. 361, p. 127638, Oct. 2022, doi: 10.1016/j.biortech.2022.127638.
- [17] J. Yang *et al.*, “Ammonia inhibition in anaerobic digestion of organic waste: a review,” *International Journal of Environmental Science and Technology*, vol. 22, no. 5, pp. 3927–3942, Mar. 2025, doi: 10.1007/s13762-024-06029-1.
- [18] M. M. Gharpuray, Y. Lee, and L. T. Fan, “Structural modification of lignocellulosics by pretreatments to enhance enzymatic hydrolysis,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 25, no. 1, pp. 157–172, Jan. 1983, doi: 10.1002/bit.260250113.
- [19] L. F. Andersen, S. Parsin, O. Lüdtke, and M. Kaltschmitt, “Biogas production from straw—the challenge feedstock pretreatment,” *Biomass Convers. Biorefin.*, vol. 12, no. 2, pp. 379–402, Feb. 2022, doi: 10.1007/s13399-020-00740-y.
- [20] D. Gallegos, H. Wedwitschka, L. Moeller, A. Zehnsdorf, and W. Stinner, “Effect of particle size reduction and ensiling fermentation on biogas formation and silage quality of wheat straw,” *Bioresour. Technol.*, vol. 245, pp. 216–224, Dec. 2017, doi: 10.1016/j.biortech.2017.08.137.
- [21] A. Mohammad Rahmani, P. Gahlot, K. Moustakas, A. A. Kazmi, C. Shekhar Prasad Ojha, and V. K. Tyagi, “Pretreatment methods to enhance solubilization and anaerobic biodegradability of lignocellulosic biomass (wheat straw): Progress and challenges,” *Fuel*, vol. 319, p. 123726, Jul. 2022, doi: 10.1016/j.fuel.2022.123726.
- [22] E. Calcio Gaudino *et al.*, “Optimization of ultrasound pretreatment and enzymatic hydrolysis of wheat straw: From lab to semi-industrial scale,” *J. Clean. Prod.*, vol. 380, p. 134897, Dec. 2022, doi: 10.1016/j.jclepro.2022.134897.
- [23] Z. Song and C. Zhang, “Anaerobic codigestion of pretreated wheat straw with cattle manure and analysis of the microbial community,” *Bioresour. Technol.*, vol. 186, pp. 128–135, Jun. 2015, doi: 10.1016/j.biortech.2015.03.028.
- [24] C. Sambusiti, F. Monlau, E. Ficara, H. Carrère, and F. Malpei, “A comparison of different pre-treatments to increase methane production from two agricultural substrates,” *Appl. Energy*, vol. 104, pp. 62–70, Apr. 2013, doi: 10.1016/j.apenergy.2012.10.060.
- [25] Y. Z. Wang *et al.*, “Effect of Low Concentration Alkali and Ultrasound Combination Pretreatment on Biogas Production by Stalk,” *Adv. Mat. Res.*, vol. 383–390, pp. 3434–3437, Nov. 2011, doi: 10.4028/www.scientific.net/AMR.383-390.3434.
- [26] G. Mancini, S. Papirio, P. N. L. Lens, and G. Esposito, “Increased biogas production

- from wheat straw by chemical pretreatments,” *Renew. Energy*, vol. 119, pp. 608–614, Apr. 2018, doi: 10.1016/j.renene.2017.12.045.
- [27] A. M. da Costa Lopes, K. G. João, E. Bogel-Lukasik, L. B. Roseiro, and R. Bogel-Lukasik, “Pretreatment and Fractionation of Wheat Straw Using Various Ionic Liquids,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 61, no. 33, pp. 7874–7882, Aug. 2013, doi: 10.1021/jf401980p.
- [28] X. Wan *et al.*, “Pretreatment of Wheat Straw with Phosphoric Acid and Hydrogen Peroxide to Simultaneously Facilitate Cellulose Digestibility and Modify Lignin as Adsorbents,” *Biomolecules*, vol. 9, no. 12, p. 844, Dec. 2019, doi: 10.3390/biom9120844.
- [29] M. Brebu, D. Ioniță, and E. Stoleru, “Thermal behavior and conversion of agriculture biomass residues by torrefaction and pyrolysis,” *Sci. Rep.*, vol. 15, no. 1, p. 11505, Apr. 2025, doi: 10.1038/s41598-025-88001-8.
- [30] P. Basu, “Pyrolysis,” in *Biomass Gasification, Pyrolysis and Torrefaction*, Elsevier, 2018, pp. 155–187. doi: 10.1016/B978-0-12-812992-0.00005-4.
- [31] G. Czerski, K. Zubek, and P. Grzywacz, “Kinetics of Pyrolysis and Gasification Using Thermogravimetric and Thermovolumetric Analyses,” *GeoScience Engineering*, vol. 62, no. 1, pp. 17–25, Mar. 2016, doi: 10.1515/gse-2016-0004.
- [32] H. S. Kambo and A. Dutta, “A comparative review of biochar and hydrochar in terms of production, physico-chemical properties and applications,” *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 45, pp. 359–378, May 2015, doi: 10.1016/j.rser.2015.01.050.
- [33] S. Morales-Delarosa and J. M. Campos-Martin, “Catalytic processes and catalyst development in biorefining,” in *Advances in Biorefineries*, Elsevier, 2014, pp. 152–198. doi: 10.1533/9780857097385.1.152.
- [34] L. C. Ferreira, P. J. Nilsen, F. Fdz-Polanco, and S. I. Pérez-Elvira, “Biomethane potential of wheat straw: Influence of particle size, water impregnation and thermal hydrolysis,” *Chemical Engineering Journal*, vol. 242, pp. 254–259, Apr. 2014, doi: 10.1016/j.cej.2013.08.041.
- [35] L. C. Ferreira, A. Donoso-Bravo, P. J. Nilsen, F. Fdz-Polanco, and S. I. Pérez-Elvira, “Influence of thermal pretreatment on the biochemical methane potential of wheat straw,” *Bioresour. Technol.*, vol. 143, pp. 251–257, Sep. 2013, doi: 10.1016/j.biortech.2013.05.065.
- [36] D. Jackowiak, D. Bassard, A. Pauss, and T. Ribeiro, “Optimisation of a microwave pretreatment of wheat straw for methane production,” *Bioresour. Technol.*, vol. 102, no. 12, pp. 6750–6756, Jun. 2011, doi: 10.1016/j.biortech.2011.03.107.
- [37] M. Yadav and V. Vivekanand, “Combined fungal and bacterial pretreatment of wheat and pearl millet straw for biogas production – A study from batch to continuous stirred tank reactors,” *Bioresour. Technol.*, vol. 321, p. 124523, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.biortech.2020.124523.
- [38] C. Zhong, C. Wang, F. Wang, H. Jia, P. Wei, and Y. Zhao, “Enhanced biogas production from wheat straw with the application of synergistic microbial consortium pretreatment,” *RSC Adv.*, vol. 6, no. 65, pp. 60187–60195, 2016, doi: 10.1039/C5RA27393E.
- [39] W. Li, “Anaerobic digestion via codigestion strategies for production of bioenergy,” in *Biomass, Biofuels, Biochemicals*, Elsevier, 2022, pp. 233–252. doi: 10.1016/B978-0-

323-90633-3.00016-X.

- [40] M. Chiappero *et al.*, “Review of biochar role as additive in anaerobic digestion processes,” *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 131, p. 110037, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.rser.2020.110037.
- [41] Y. Deng, H. Mao, X. Wang, Z. Zhao, and Y. Zhang, “Enhancing humification and digestate maturity in high-solids anaerobic digestion of agricultural wastes using biochar,” *Water Res.*, vol. 287, p. 124378, Dec. 2025, doi: 10.1016/j.watres.2025.124378.
- [42] Katuscia Eroè and Tommaso Polci, “Cooperativa Agricola Speranza Scarti ed energia, una squadra vincente,” May 2021. Accessed: Oct. 06, 2025. [Online]. Available: <https://www.legambiente.it/wp-content/uploads/2021/07/Comunita-Rinnovabili-2021.pdf>
- [43] “Pastificio De Matteis.” Accessed: Oct. 06, 2025. [Online]. Available: <https://www.dematteisfood.it/IT/>
- [44] Z. Song and C. Zhang, “Anaerobic codigestion of pretreated wheat straw with cattle manure and analysis of the microbial community,” *Bioresour. Technol.*, vol. 186, pp. 128–135, Jun. 2015, doi: 10.1016/j.biortech.2015.03.028.
- [45] ISPRA, *Procedura di misurazione per la determinazione della Richiesta Chimica di Ossigeno (COD) mediante test in cuvetta: Metodo 5135*. 2014. Accessed: Oct. 06, 2025. [Online]. Available: https://www.isprambiente.gov.it/files/pubblicazioni/manuali-lineeguida/MLG_117_14.pdf
- [46] A. Kasinath *et al.*, “Biomass in biogas production: Pretreatment and codigestion,” *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 150, p. 111509, Oct. 2021, doi: 10.1016/j.rser.2021.111509.
- [47] S. Kumar, T. C. D’Silva, R. Chandra, A. Malik, V. K. Vijay, and A. Misra, “Integration of hydrothermal pretreatment and anaerobic co-digestion strategies to improve the biomethane yield from rice straw and waste algal biomass,” *Renew. Energy*, vol. 256, p. 124233, Jan. 2026, doi: 10.1016/j.renene.2025.124233.
- [48] U. U. Ndubuisi-Nnaji, U. A. Ofon, N. U. Asamudo, and V. M. Ekong, “Enhanced Biogas and Biofertilizer Production from Anaerobic Codigestion of Harvest Residues and Goat Manure,” *J. Sci. Res. Rep.*, pp. 1–13, Apr. 2020, doi: 10.9734/jsrr/2020/v26i330231.
- [49] U. A. Ofon *et al.*, “Optimization of biogas production with rice straw-derived biochar: Characterization, hormetic effects, and kinetics modelling,” *Cleaner Waste Systems*, vol. 11, p. 100288, Jun. 2025, doi: 10.1016/j.clwas.2025.100288.
- [50] C. Holliger *et al.*, “Towards a standardization of biomethane potential tests,” *Water Science and Technology*, vol. 74, no. 11, pp. 2515–2522, Dec. 2016, doi: 10.2166/wst.2016.336.
- [51] K. Paritosh and V. Vivekanand, “Biochar enabled syntrophic action: Solid state anaerobic digestion of agricultural stubble for enhanced methane production,” *Bioresour. Technol.*, vol. 289, p. 121712, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.biortech.2019.121712.
- [52] M. Mekala and V. R. Goli, “Data on acetic acid–methanol–methyl acetate–water mixture analysed by dual packed column Gas Chromatography,” *Data Brief*, vol. 18, pp. 947–960, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.dib.2018.03.111.

- [53] INFICON, “Brochure Micro-GC-Fusion.” Accessed: Oct. 10, 2025. [Online]. Available: [https://www.inficon.com/media/5377/download/Brochure---Micro-GC-Fusion-\(Italian\).pdf?v=1&inline=true&language=ja#:~:text=Micro%20GC%20Fusion%20offre%20un,on%2Dsite%20e%20in%20laboratorio](https://www.inficon.com/media/5377/download/Brochure---Micro-GC-Fusion-(Italian).pdf?v=1&inline=true&language=ja#:~:text=Micro%20GC%20Fusion%20offre%20un,on%2Dsite%20e%20in%20laboratorio).
- [54] F. Fantozzi and C. Buratti, “Biogas production from different substrates in an experimental Continuously Stirred Tank Reactor anaerobic digester,” *Bioresour. Technol.*, vol. 100, no. 23, pp. 5783–5789, Dec. 2009, doi: 10.1016/j.biortech.2009.06.013.
- [55] C. Liu, J. Wang, X. Ji, H. Qian, L. Huang, and X. Lu, “The biomethane producing potential in China: A theoretical and practical estimation,” *Chin. J. Chem. Eng.*, vol. 24, no. 7, pp. 920–928, Jul. 2016, doi: 10.1016/j.cjche.2015.12.025.
- [56] Y. Li, R. Zhang, G. Liu, C. Chen, Y. He, and X. Liu, “Comparison of methane production potential, biodegradability, and kinetics of different organic substrates,” *Bioresour. Technol.*, vol. 149, pp. 565–569, Dec. 2013, doi: 10.1016/j.biortech.2013.09.063.
- [57] H. B. Møller, S. G. Sommer, and B. K. Ahring, “Methane productivity of manure, straw and solid fractions of manure,” *Biomass Bioenergy*, vol. 26, no. 5, pp. 485–495, May 2004, doi: 10.1016/j.biombioe.2003.08.008.
- [58] ISPRA, “Batterie di saggi ecotossicologici per sedimenti e acque interne,” Roma, 2013. Accessed: Oct. 22, 2025. [Online]. Available: https://www.isprambiente.gov.it/files/pubblicazioni/manuali-lineeguida/MLG_88_2013.pdf
- [59] A. Cesaro, V. Belgiorno, and M. Guida, “Compost from organic solid waste: Quality assessment and European regulations for its sustainable use,” *Resour. Conserv. Recycl.*, vol. 94, pp. 72–79, Jan. 2015, doi: 10.1016/j.resconrec.2014.11.003.
- [60] H. Zhang *et al.*, “Combined influence of rumen microorganisms pre-incubation time and dosage on methanogenic performance and microbial community from wheat straw anaerobic digestion,” *Bioresour. Technol.*, vol. 435, p. 132956, Nov. 2025, doi: 10.1016/j.biortech.2025.132956.
- [61] X. Wang, Z. Yang, X. Liu, G. Huang, W. Xiao, and L. Han, “The composition characteristics of different crop straw types and their multivariate analysis and comparison,” *Waste Management*, vol. 110, pp. 87–97, Jun. 2020, doi: 10.1016/j.wasman.2020.05.018.
- [62] UK Biochar Research Centre, “Standard biochar specification sheet – Version 1.0,” Nov. 2014.
- [63] X. Zhang, P. Zhang, X. Yuan, Y. Li, and L. Han, “Effect of pyrolysis temperature and correlation analysis on the yield and physicochemical properties of crop residue biochar,” *Bioresour. Technol.*, vol. 296, p. 122318, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.biortech.2019.122318.
- [64] K. Wystalska and A. Kwarciak-Kozłowska, “The Effect of Biodegradable Waste Pyrolysis Temperatures on Selected Biochar Properties,” *Materials*, vol. 14, no. 7, p. 1644, Mar. 2021, doi: 10.3390/ma14071644.
- [65] G. Shen *et al.*, “Effect of hydrogen peroxide pretreatment on the enzymatic hydrolysis of cellulose,” *J. Food Process Eng.*, vol. 34, no. 3, pp. 905–921, Jun. 2011, doi: 10.1111/j.1745-4530.2009.00518.x.

- [66] Z. Zhang, J. Jia, M. Li, and Q. Pang, “H₂O₂ can Increase Lignin Disintegration and Decrease Cellulose Decomposition in the Process of Solid-State Fermentation (SSF) by *Aspergillus oryzae* Using Corn Stalk as Raw Materials,” *Bioresources*, vol. 9, no. 2, Apr. 2014, doi: 10.15376/biores.9.2.3077-3087.
- [67] K. Hagos, J. Zong, D. Li, C. Liu, and X. Lu, “Anaerobic co-digestion process for biogas production: Progress, challenges and perspectives,” *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 76, pp. 1485–1496, Sep. 2017, doi: 10.1016/j.rser.2016.11.184.
- [68] X. Wang, G. Yang, Y. Feng, G. Ren, and X. Han, “Optimizing feeding composition and carbon–nitrogen ratios for improved methane yield during anaerobic co-digestion of dairy, chicken manure and wheat straw,” *Bioresour. Technol.*, vol. 120, pp. 78–83, Sep. 2012, doi: 10.1016/j.biortech.2012.06.058.
- [69] A. Rabii, S. Aldin, Y. Dahman, and E. Elbeshbishy, “A Review on Anaerobic Co-Digestion with a Focus on the Microbial Populations and the Effect of Multi-Stage Digester Configuration,” *Energies (Basel)*, vol. 12, no. 6, p. 1106, Mar. 2019, doi: 10.3390/en12061106.
- [70] M. Victorin, Å. Davidsson, and O. Wallberg, “Characterization of Mechanically Pretreated Wheat Straw for Biogas Production,” *Bioenergy Res.*, vol. 13, no. 3, pp. 833–844, Sep. 2020, doi: 10.1007/s12155-020-10126-7.
- [71] M. Krishania, V. K. Vijay, and R. Chandra, “Methane fermentation and kinetics of wheat straw pretreated substrates co-digested with cattle manure in batch assay,” *Energy*, vol. 57, pp. 359–367, Aug. 2013, doi: 10.1016/j.energy.2013.05.028.
- [72] R. Chandra, H. Takeuchi, T. Hasegawa, and R. Kumar, “Improving biodegradability and biogas production of wheat straw substrates using sodium hydroxide and hydrothermal pretreatments,” *Energy*, vol. 43, no. 1, pp. 273–282, Jul. 2012, doi: 10.1016/j.energy.2012.04.029.
- [73] Marco Poliafico, “Anaerobic Digestion: Decision Support Software,” Cork Institute of Technology, Cork, Ireland, 2007. doi: 10.34719/OTIU8121.
- [74] A. Akhilar, A. Battimelli, M. Torrijos, and H. Carrere, “Comprehensive characterization of the liquid fraction of digestates from full-scale anaerobic co-digestion,” *Waste Management*, vol. 59, pp. 118–128, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.wasman.2016.11.005.
- [75] M. Gómez-Brandón, C. Lazcano, and J. Domínguez, “The evaluation of stability and maturity during the composting of cattle manure,” *Chemosphere*, vol. 70, no. 3, pp. 436–444, Jan. 2008, doi: 10.1016/j.chemosphere.2007.06.065.
- [76] O. Sarkar, U. Rova, P. Christakopoulos, and L. Matsakas, “Biogas potential of organosolv pretreated wheat straw as mono and co-substrate: substrate synergy and microbial dynamics,” *Sci. Rep.*, vol. 14, no. 1, p. 18442, Aug. 2024, doi: 10.1038/s41598-024-68904-8.
- [77] A. Oliva, L. C. Tan, S. Papiro, G. Esposito, and P. N. L. Lens, “Effect of methanol-organosolv pretreatment on anaerobic digestion of lignocellulosic materials,” *Renew. Energy*, vol. 169, pp. 1000–1012, May 2021, doi: 10.1016/j.renene.2020.12.095.
- [78] H. Zhang and J. Wu, “Optimization of Alkaline Hydrogen Peroxide Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Wheat Straw for Enhancing Sugar Yields,” *Fermentation*, vol. 9, no. 10, p. 871, Sep. 2023, doi: 10.3390/fermentation9100871.
- [79] Z. Song, G. Yang, Y. Guo, and T. Zhang, “Comparison of two chemical pretreatments

- of rice straw for biogas production by anaerobic digestion,” *Bioresources*, vol. 7, no. 3, pp. 3223–3236, Jun. 2012, doi: 10.15376/biores.7.3.3223-3236.
- [80] J. Hu, K. Stenchly, W. Gwenzi, M. Wachendorf, and K. Kaetzl, “Critical evaluation of biochar effects on methane production and process stability in anaerobic digestion,” *Front. Energy Res.*, vol. 11, Jul. 2023, doi: 10.3389/fenrg.2023.1205818.
- [81] J. Hu, K. Stenchly, W. Gwenzi, M. Wachendorf, and K. Kaetzl, “Critical evaluation of biochar effects on methane production and process stability in anaerobic digestion,” *Front. Energy Res.*, vol. 11, Jul. 2023, doi: 10.3389/fenrg.2023.1205818.
- [82] Y. Zhan, B. Zuo, X. Cao, Y. Xiao, and J. Zhu, “Biochar enhanced anaerobic co-digestion of poultry litter and wheat straw: Performance, microbial analysis, and multiple factors’ interaction,” *Renew. Energy*, vol. 231, p. 120907, Sep. 2024, doi: 10.1016/J.RENENE.2024.120907.
- [83] G. Ma, P. Ndegwa, J. H. Harrison, and Y. Chen, “Methane yields during anaerobic co-digestion of animal manure with other feedstocks: A meta-analysis,” *Science of The Total Environment*, vol. 728, p. 138224, Aug. 2020, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.138224.
- [84] A. Ciurli, G. Di Biase, M. Rossi, M. Grigatti, C. Ciavatta, and L. Cavani, “Dried Anaerobic Digestate from Slaughterhouse By-products: Emerging Cues for a Bio-Based Fertilization,” *Waste Biomass Valorization*, vol. 16, no. 2, pp. 927–943, Feb. 2025, doi: 10.1007/s12649-024-02737-4.
- [85] A. Tuszynska, A. Wilinska, and K. Czerwionka, “Phosphorus and nitrogen forms in liquid fraction of digestates from agricultural biogas plants,” *Environ. Technol.*, vol. 42, no. 25, pp. 3942–3954, Nov. 2021, doi: 10.1080/09593330.2020.1770339.
- [86] A. Vitti *et al.*, “Physico-Chemical Characterization and Biological Activities of a Digestate and a More Stabilized Digestate-Derived Compost from Agro-Waste,” *Plants*, vol. 10, no. 2, p. 386, Feb. 2021, doi: 10.3390/plants10020386.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare tutte le persone che mi hanno accompagnata durante questo percorso universitario: la mia famiglia, i miei amici e colleghi di corso.

Un grazie speciale va alla Professoressa Francesca Demichelis, alla Professoressa Tonia Tommasi e alla Dottoressa Melania Fiore, che mi hanno permesso di realizzare questo lavoro, condividendo con me preziosi consigli e permettendomi di acquisire nuove competenze. La vostra passione è stata un esempio di amore verso il lavoro e uno stimolo che sicuramente ispirerà il mio percorso futuro.