



Ricerca di Sistema elettrico

## Sistemi per la produzione di microalghe da inserire a valle del processo di digestione anaerobica

Barbato F., De Mei M., Cogliani E.,  
Ferrari S., Petrazzuolo F.

SISTEMI PER LA PRODUZIONE DI MICROALGHE DA INSERIRE A VALLE DEL PROCESSO DI DIGESTIONE ANAEROBICA

Barbato F., De Mei M., Cogliani E., Ferrari S., Petrazzuolo F.

Settembre 2014

Report Ricerca di Sistema Elettrico

Accordo di Programma Ministero dello Sviluppo Economico – ENEA

Piano Annuale di Realizzazione 2013

Area: Produzione di energia elettrica e protezione dell'ambiente

Progetto: Sviluppo di sistemi per la produzione di energia elettrica da biomasse e l'upgrading dei biocombustibili

Obiettivo: Sviluppo dei sistemi di produzione di biocombustibili

Responsabile del Progetto: Vito Pignatelli, ENEA

## Indice

SOMMARIO.....	4
1 INTRODUZIONE.....	5
1.1 - COLTIVAZIONE MICROALGALIE IN GRANDI VOLUMI .....	6
1.1.1 <i>Seamibiotic, Ashkelon, Israele</i> .....	6
1.1.2 <i>Cyanotech, Hawaii, USA</i> .....	8
1.1.3 <i>Sapphire Energy, Columbus, New Mexico, USA</i> .....	10
2 DESCRIZIONE DELLE ATTIVITÀ SVOLTE E RISULTATI.....	14
2.1 ALLESTIMENTO DI UNA SERRA A TUNNEL OSPITANTE FOTOBIOREATTORI A SACCO E DI VASCHE PER COLTIVAZIONI MICROALGALI .....	14
2.2 AGITAZIONE DELLE COLTURE TRAMITE AIR LIFT A PIANO INCLINATO E AGITATORE A PALE .....	14
2.3 COLTURE DI LABORATORIO PER LA REALIZZAZIONE DI INOCULI E PROVE DI PRODUZIONE DI BIOGAS .....	16
2.4 COLTIVAZIONE DI MICROALGHE ALL'APERTO IN SACCHI DI POLIETILENE (FOTOBIOREATTORI) DA 30 L.....	17
2.5 PREDISPOSIZIONE DI VASCHE PER LE COLTURE MICROALGALI FERTILIZZATE CON DIGESTATO LIQUIDO .....	18
3 RISULTATI .....	22
3.2 DATI CLIMATICI .....	24
3.3 PRODUTTIVITÀ IN BIOGAS.....	25
4 CONCLUSIONI.....	27
4.1 ASPETTI FAVOREVOLI.....	27
4.2 ASPETTI CRITICI .....	27
5 RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI .....	28

## Sommario

Le attività del presente studio riprendono ed espandono quanto già realizzato nell'annata precedente di sperimentazioni sulle microalghe, svolte nello stesso ambito di utilizzo, in connessione con impianti a biogas. Il fuoco è stato quest'anno portato su un innalzamento dei volumi produttivi, passando dalle decine di litri tipici dei fotobioreattori a sacco, ai 1500 litri delle vasche aperte impiegate attualmente. Le attività principali sono dunque consistite nella risistemazione di una serra a tunnel atta ad ospitare sia vasche che fotobioreattori, nella realizzazione *in house* di sistemi per la movimentazione dell'acqua all'interno delle vasche e più in generale nell'adattamento di economiche piscine fuori terra per bambini all'impiego come vasche aperte per coltivazione microalgale. Sono stati eseguiti alcuni cicli produttivi che hanno permesso di accertare la sostanziale funzionalità dei sistemi colturali e di rendersi conto delle criticità su cui lavorare in futuro per l'ottimizzazione. Le rese in termini di produttività giornaliera hanno fornito risultati non disprezzabili, con medie di 40 mg/L, tenuto conto dello stato di sviluppo iniziale e del fatto che non è stata immessa CO<sub>2</sub> aggiuntiva oltre a quella atmosferica. Inoltre la quota standard di digestato impiegato come unico fertilizzante non è da considerarsi ancora ottimizzata e sicuramente sotto dosata. Le prove sulla produzione di biogas da parte delle biomasse algali hanno fornito dati preliminari interessanti che invitano ad un approfondimento successivo.

## 1 Introduzione

Il presente lavoro si inquadra in una tematica già iniziata nel corso delle attività dell'anno precedente e che riguarda la coltivazione di microalghe in connessione a impianti di biogas, sfruttando le capacità fertilizzanti di un sottoprodotto della digestione anaerobica, denominato "digestato liquido" e utilizzando la biomassa così prodotta per ottenere nuovo biogas, mediante un'operazione di riciclo di nutrienti.

Le attività di quest'anno si sono indirizzate verso una operatività su più larga scala rispetto all'anno precedente, focalizzandosi, oltre che sui già sperimentati fotobioreattori da 30 litri in sacchi di polietilene, sulla produzione algale in vasche da ca 1500 litri di volume utile, protette da una serra. Tali vasche sono state realizzate mediante la struttura di economiche piscine fuori terra per bambini, opportunamente adattate con attrezzature necessarie allo scopo della coltivazione microalgale. Le vasche sono state poste in condizioni ambientali con un certo grado di controllo su temperature e illuminazione, oltre che su vento e precipitazioni, ovvero in una serra con possibilità di utilizzo di aperture regolabili e teli ombreggianti. Si sono affrontate dunque problematiche operative nuove, dovute all'aumento dei volumi e al parziale controllo ambientale. Si sono potute altresì raggiungere dimensioni produttive che hanno consentito l'immissione di biomassa algale in un digestore sperimentale da 6 m<sup>3</sup>, presente presso il C.R. ENEA Casaccia e che viene impiegato per prove sul biogas. Sono state privilegiate soluzioni il più possibile a basso costo, stante la necessità di ridurre al minimo le spese di impianto e di conduzione per migliorare quanto più possibile i bilanci energetico/economici. Nella presente relazione, oltre alla descrizione delle attività sperimentali e dei relativi risultati, viene presentata una sintetica analisi dello stato dell'arte della coltivazione microalgale in vasche aperte o "open ponds", con riferimenti descrittivi a impianti in operatività in diverse località del mondo. Di seguito uno schema riassuntivo del funzionamento delle idee progettuali.

DIAGRAMMA DI FLUSSO PER INPUT, PROCESSI, SOTTO PRODOTTI E PRODOTTI

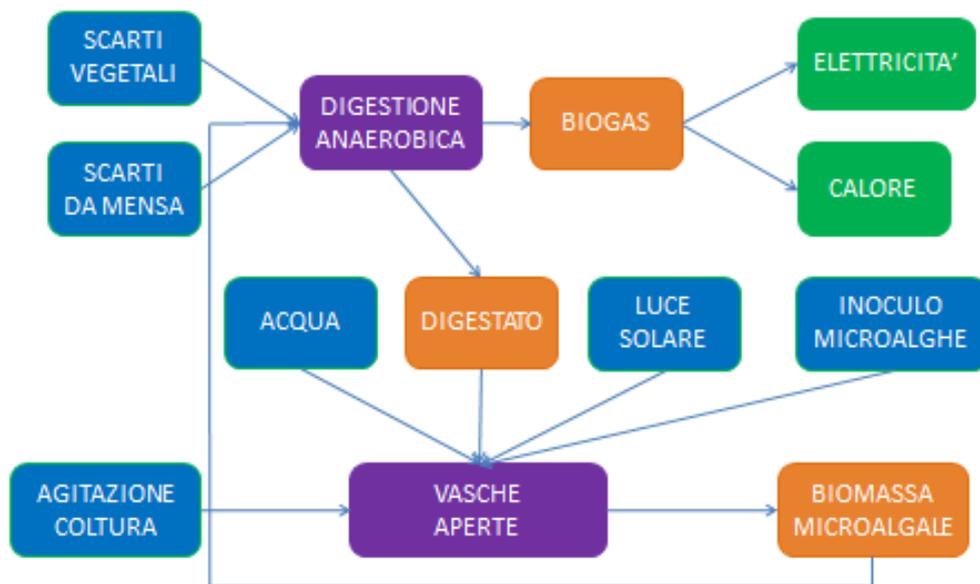


Figura 1. Diagramma di flusso

## 1.1 - Coltivazione microalgale in grandi volumi

La tematica delle tecniche di coltivazione microalgale in grandi volumi è vasta e articolata. Esistono svariate tipologie di impianti produttivi, così come diverse forme di vasche e più in generale di contenitori per effettuare la coltivazione. Commercialmente, la maggior parte di questi impianti produce microalghe per il consumo umano sotto forma di biomassa secca in compresse o in altre forme (es. Spirulina, Chlorella, Dunaliella) o per l'estrazione di biomolecole utili per la salute (es. carotenoidi, acidi grassi polinsaturi, altri antiossidanti) e per altri scopi (cosmesi, coloranti, prodotti per laboratori chimici). Per quanto riguarda il settore energetico, ancora non giungono notizie di impianti commercialmente validi, sebbene siano stati realizzati impianti sperimentali anche molto estesi e dai costi molto rilevanti, specialmente negli Stati Uniti.

Oggi gran parte della produzione mondiale viene realizzata con sistemi di coltura all'aperto in zone tropicali e sub-tropicali, dove è possibile ottimizzare le rese utilizzando al meglio la luce solare come sorgente di energia lungo tutto il corso dell'anno.

Per la produzione di microalghe su larga scala vengono utilizzate in maniera prevalente vasche aperte, "open ponds", a rimescolamento, poco profonde, configurate a circuito (raceways) e dotate di agitatori a pale elettromeccanici. Tali agitatori imprimono al mezzo di coltura un movimento rotatorio continuo. In molte regioni che non siano tropicali, gli impianti di colture algali all'aperto hanno spesso lo svantaggio di trovarsi in condizioni climatiche sfavorevoli, tali da non permettere cicli di produzione continuativi lungo tutto il corso dell'anno e obbligando quindi a massimizzare produzione e raccolta dell'alga per periodi limitati ai mesi più caldi. Inoltre, tali sistemi di coltivazione in vasche aperte non protette non garantiscono produzioni sicuramente monospecifiche e sono utilizzati prevalentemente per un limitato numero di specie cosiddette "estremofile" come *Arthrospira platensis* (Spirulina) e *Dunaliella salina*, che crescono in condizioni selettive estreme, rispettivamente di elevato pH (generalmente oltre 9) e di elevata salinità (oltre il 40 per mille), al fine evitare il più possibile problemi di contaminazione da altre specie algali o da altri microorganismi. Le "open ponds" si possono proteggere dalla pioggia e da altri agenti contaminanti, quali il vento e animali dotati di ali (insetti e uccelli), tramite teli plastici trasparenti o tramite serre. Nel fondo dei bacini in terra è spesso usato un rivestimento in telo plastico impermeabile per un migliore controllo dei parametri biotici e per evitare possibili percolazioni. L'uso dei teli tuttavia comporta un aumento significativo dei costi di impianto rispetto a soluzioni in argilla o terra battuta.

A titolo esemplificativo vengono di seguito illustrati alcuni impianti che impiegano tecniche di coltivazione differenti, facendo per lo più uso delle descrizioni fatte nei rispettivi siti web ufficiali e pertanto di dominio pubblico. Anche le immagini riportate sono state prese da siti web e da video ufficiali delle rispettive ditte, che peraltro si ringraziano per la disponibilità a far conoscere parte delle loro strutture.

### 1.1.1 Seambiotic, Ashkelon, Israele

L'impianto pilota di Seambiotic si trova vicino al mar Mediterraneo, all'interno del comprensorio della centrale termoelettrica Rutenberg. Il terreno è stato affittato dalla Israel Electric Corporation (IEC), a circa 100-150 metri dalla ciminiera, evitando così soverchi problemi di trasporto dei gas combustibili fino all'impianto di coltivazione microalgale, aspetto che caratterizza la Seambiotic. La superficie totale dell'impianto è di 1.600 m<sup>2</sup>, comprendente vasche aperte per una superficie totale di circa 1.000 m<sup>2</sup>.



**Figura 2. Impianto pilota Seambiotic**

L'impianto pilota, operativo a fini sperimentali e solo parzialmente commerciali, è costituito dai seguenti sistemi principali:

- a) Vasche per microalghe
- b) Sistema di alimentazione dell'acqua di mare
- c) Sistema di raccolta, essiccazione e trattamento
- d) Sistema di alimentazione delle colture con CO<sub>2</sub> e altri microelementi tramite i gas di scarico della centrale

Nelle vasche della Seambiotic, il medium acqua/alghe è agitato da ruote a pale, azionate da un motore elettrico. Le ruote a pale sono costruite utilizzando un asse di acciaio inox e lame in fibra di vetro. Le ruote a pale generano movimento dell'acqua irregolare, incluso il flusso nella direzione orizzontale a 20 cm / s ed oscillazioni nella sezione trasversale verticale. Pertanto, le particelle d'acqua hanno sia velocità verticali che orizzontali.



**Figura 3. Sistema di agitazione dell'impianto pilota Seambiotic**

L'acqua di mare è fornita dal sistema di acqua di raffreddamento del condensatore della turbina, dal canale di scarico della centrale. Una pompa sommersa con capacità di 20 m<sup>3</sup>/h installata nel canale di scarico riempie le vasche quando necessario.

Al fine di mantenere la condizione di coltura a livello ottimale, per mantenere quindi le alghe in continua crescita, è necessario spazzolare periodicamente il rivestimento impermeabile al fine di rimuovere i depositi di sabbia, alghe morte, materiale flocculato, e altri contaminanti. Un ciclo di pulizia ogni poche settimane durante la crescita, così come dopo un raccolto pieno, è sufficiente per mantenere le vasche in funzionamento continuo.

Le alghe vengono raccolte dalle vasche quando le colture raggiungono una densità cellulare di almeno 100 milioni di cellule /mL, pari a 0,5 g/L. Le alghe vengono spostate dalle vasche più piccole alle vasche più grandi con inoculi successivi. Per la raccolta, Seambiotic utilizza una centrifuga, che aumenta la concentrazione delle alghe dall'iniziale 0,1% a circa il 15-18% di solidi. La pasta algale così raccolta viene conservata congelata e disponibile per processi a valle. La pasta di alghe può anche essere essiccata per formare una polvere, utilizzando un essiccatore a spray. Le alghe seccate possono essere conservate senza raffreddamento. Di seguito lo schema del processo di raccolta/conservazione.

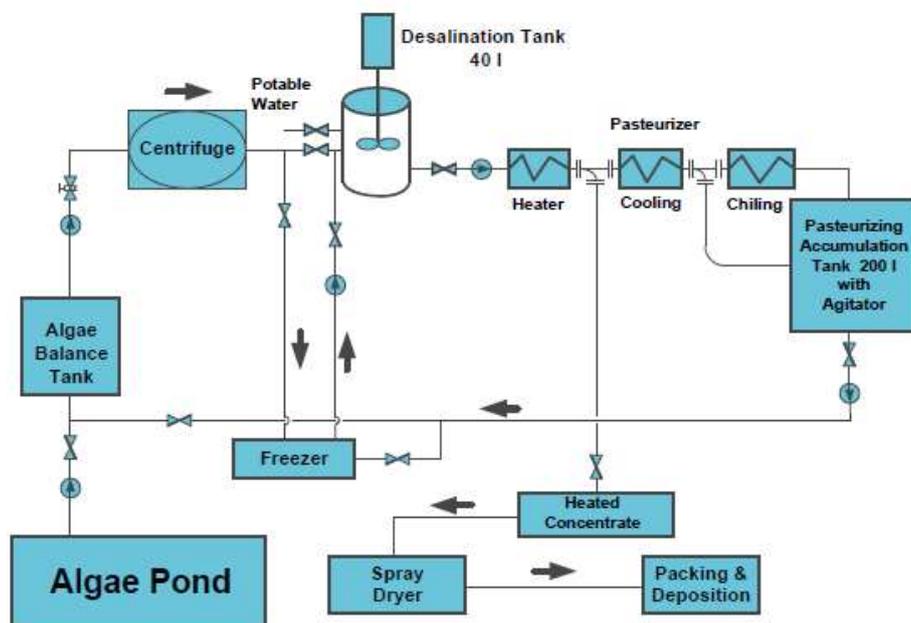


Figura 4. Schema di processo dell'impianto pilota Seambiotic

### 1.1.2 Cyanotech, Hawaii, USA

Cyanotech sviluppa e commercializza prodotti naturali provenienti da microalghe. La Società realizza prodotti a base di microalghe come supplemento nutrizionale e per diagnostica immunologica oltre che per coloranti alimentari.

Quello di Cyanotech alle Hawaii è l'unico impianto di microalghe che utilizzi acque profonde dell'oceano ultra puro come fonte di minerali e oligoelementi. L'acqua dell'oceano viene pompata da una profondità di ca 700 m, consentendo la fornitura di magnesio, calcio e ogni elemento traccia. Questa risorsa unica è utilizzata anche nel sistema di essiccazione (vedi essiccazione "Oceano Freddo").

La Spirulina, principale specie algale impiegata, viene coltivata in vasche poco profonde adiacenti l'Oceano Pacifico. Un'agitazione gentile fornita da ruote a pale assicura una perfetta esposizione al sole intenso hawaiano. Il mezzo di coltura impiega una miscela di acqua dolce e acque profonde dell'oceano ricche di minerali, in una base di bicarbonato di sodio alimentare. Questo sistema di coltivazione assicura un profilo nutrizionale costantemente superiore senza contaminazioni.

La Spirulina viene concentrata su filtri in acciaio inox. Utilizzando un processo privo di inquinamento con riciclo integrale, l'acqua residua dal processo di filtrazione viene riutilizzata per il ciclo di crescita successivo.

Prima dell'essiccazione, la Spirulina viene risciacquata tre volte. Numerosi risciacqui di acqua dolce danno alla Spirulina Hawaiana un gusto delicato privo di salinità.



**Figura 5. Impianto Cyanotech**

Il sistema di essiccazione “Oceano Freddo” è stato pensato soprattutto per eliminare l'ossidazione di carotenoidi e di acidi grassi che si verifica in essiccatoi standard. Il processo impiega un sistema chiuso che viene mantenuto in atmosfera modificata con meno dell'uno per cento di ossigeno, mediante flussaggio con azoto e anidride carbonica. Questo processo è stato brevettato e si basa sulle acque profonde molto fredde dell'oceano per fornire anche deumidificazione. Questo processo è utilizzato unicamente per la Spirulina Hawaiana.

La polvere essiccata viene immediatamente protetta dall'ossidazione. Utilizzando un processo sviluppato in proprio, assorbitori di ossigeno sono racchiusi in contenitori metallici termosaldati. Questo metodo di confezionamento garantisce che i clienti ricevano Spirulina fresca come il giorno in cui è stata raccolta.



**Figura 6. Particolare dell'impianto Cyanotech**

Oltre alla Spirulina, viene coltivato anche *Haematococcus pluvialis*, vedi foto sopra, da cui si ricava il pregiato carotenoide *astaxantina*, debitamente commercializzato in varie forme, sia puro che in composizioni con altri ingredienti attivi per la salute umana.

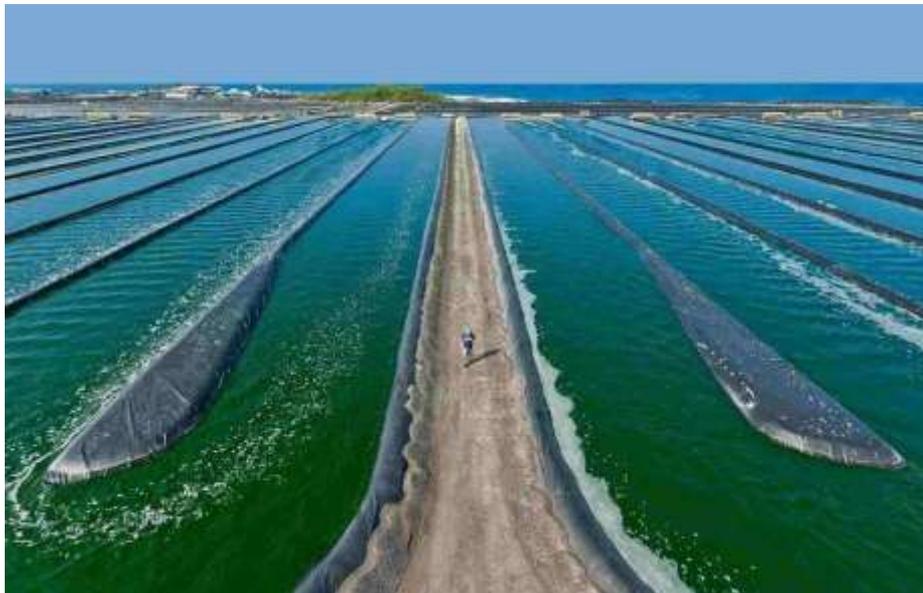


Figura 7. Particolare dell'impianto Cyanotech

### 1.1.3 Sapphire Energy, Columbus, New Mexico, USA

L'impianto di Columbus prevede l'utilizzo di vasche aperte, parzialmente ricoperte da teli plastici, per una estensione di 100 acri, corrispondenti a circa 40,4 ettari, in zona desertica lontana dal mare, con scarsissime piogge ma con buona disponibilità di acqua salata in falda. La zona non è adatta a coltivazioni agricole proprio per la salinità dell'acqua disponibile. L'impianto non è commerciale, ma serve per mettere a punto, attraverso sostanziosi finanziamenti pubblici e privati, soluzioni su vasta scala per l'impiego di microalghe a fini di produzione di biocombustibili.

Le alghe opportunamente selezionate rendono al meglio in climi desertici. Sapphire Energy utilizza acqua non potabile, non dolce e non utilizza terreni coltivabili, quindi non contribuisce alla deforestazione. Le alghe vengono raccolte tramite un sistema DAF (Dissolved Air Flotation) su larga scala e l'olio viene estratto dalla biomassa algale. Si concentrano poi gli oli e si prepara il greggio verde attraverso processi proprietari. Come un idrocarburo, il carburante a base di alghe si inserisce all'interno dell'infrastruttura energetica corrente attraverso la distribuzione. Non richiede ulteriori investimenti nelle infrastrutture energetiche da 10.000 miliardi dollari attualmente già esistenti nel mondo.

Il processo per trasformare le alghe in carburante è in sintesi questo: luce solare e CO<sub>2</sub> sono la fonte di energia e di carbonio, piuttosto che zuccheri o altri materiali organici. Applicando i principi utilizzati nel campo delle biotecnologie, Sapphire produce un olio di alghe molto ramificato, come nel greggio fossile, per ottenere un greggio biologico molecolarmente simile al greggio del tipo Light Sweet. Questo greggio verde viene poi lavorato in una raffineria come se fosse greggio tradizionale, in modo da poter ottenere tutti e tre i principali distillati: benzina, diesel e carburante per jet.



**Figura 8. Schema processo dell'impianto della Sapphire Energy**

Sapphire applica i principi della bio-agricoltura, ottimizzati per la crescita di un organismo industriale, allo sviluppo di microalghe. I ceppi sono allevati per resistere alle malattie o a predatori, per rendere le alghe facili da raccogliere, e per produrre oli che sfruttino i sistemi di raffinazione, trasporto e distribuzione esistenti, usati normalmente per il petrolio tradizionale.

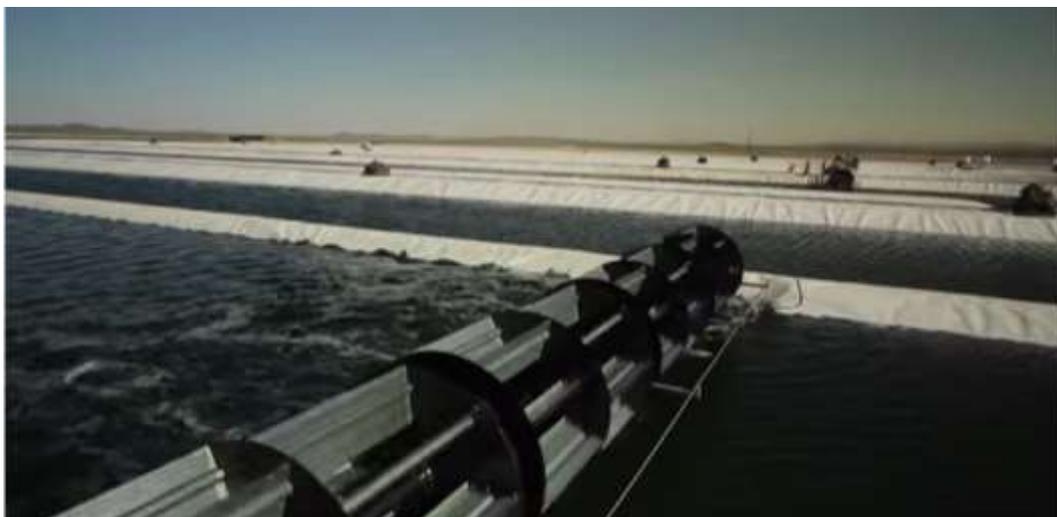
Partendo dall'inoculo nelle vasche di coltivazione fino all'estrazione dell'olio, il processo dura circa 14 giorni in media ed è continuo. Le alghe crescono tutto l'anno, per cui vi è un enorme potenziale produttivo.

Il greggio verde di Sapphire costituisce un beneficio per l'ambiente. Infatti, il carburante a base di alghe ha un basso impatto di carbonio in alternativa ai combustibili fossili attuali. Ogni kg di biomassa algale richiede l'assimilazione di 1,8 kg di CO<sub>2</sub>. Considerando che circa il 50 per cento della biomassa algale è costituito da olio, la produzione di ogni gallone di olio incorpora circa 12-14 kg di CO<sub>2</sub>. Su un ciclo di vita che consideri i GHG (Green House Gases), i carburanti prodotti da alghe ridurranno significativamente l'impatto di CO<sub>2</sub> del settore trasporti e riutilizzeranno beneficamente la CO<sub>2</sub> per la produzione di combustibili a basso impatto di carbonio.



**Figura 9. Panoramica dell'impianto della Sapphire Energy**

Vantaggio principale di Sapphire è l'essere stati in grado di portare diverse tecnologie di diversi settori produttivi nello sviluppo di alghe al fine di renderlo commercialmente valido. Vengono usate tutte le tecnologie di bio-agricoltura note per fare questo, compresa la selezione di specie, la selezione di tratti genetici specifici e la mutagenesi; in futuro verrà probabilmente usata anche la modificazione genetica, ma attualmente non vengono impiegati ceppi ingegnerizzati.



**Figura 10. Sistema di agitazione dell'impianto della Sapphire Energy**



**Figura 11. Particolare dell'impianto della Sapphire Energy**



Figura 12. Altro particolare dell'impianto della Sapphire Energy

## 2 Descrizione delle attività svolte e risultati

### 2.1 Allestimento di una serra a tunnel ospitante fotobioreattori a sacco e di vasche per coltivazioni microalgali

La serra, di cui era presente, presso l'area Capanna del C.R. ENEA Casaccia, solamente l'infrastruttura in tubi metallici, è stata ripristinata con la ricopertura di telo trasparente di dimensioni 15 x 8 metri, nonché di tendalini avvolgibili, sempre in polietilene trasparente, previsti sui fianchi. All'interno della serra si è installata una soffiante da 370 W e sono state montate 3 vasche da 3 x 2 x 0,66 metri, oltre a diversi fotobioreattori sotto forma di sacchi di polietilene da 30 L di volume utile. Col progredire delle temperature si è provveduto ad aprire i tendalini laterali e, in seguito, ad installare teli ombreggianti per ridurre le temperature all'interno della serra. All'interno della serra è stata anche installata una sonda per temperatura e umidità dell'aria in grado di registrare i dati ogni 15 minuti. Una sonda di temperatura con registrazione dei dati è stata inoltre immessa in una delle vasche.

### 2.2 Agitazione delle colture tramite air lift a piano inclinato e agitatore a pale

Le colture sperimentali sono state movimentate tramite un sistema "air lift a piano inclinato" facente uso di aria compressa ottenuta da una soffiante e un piano inclinato a pannello, sistema realizzato "in house". L'agitazione è stata in prevalenza ottenuta tramite tale sistema, sotto al quale veniva fatta scorrere aria compressa, immessa da un tubo orizzontale con fori posto lungo il bordo inferiore del pannello; le colonne di bolle, nel loro cammino obliquo seguendo il piano inclinato, determinano un corrispondente spostamento in senso ascendente obliquo di una massa d'acqua; questa determina a sua volta una corrente circolare per tutta la vasca, grazie al pannello verticale centrale di separazione.

E' stato inoltre realizzato e testato un agitatore rotativo dotato di 8 pale con motore elettrico a 12 Volt da 40 W, di impostazione classica per le open ponds. Anche questo sistema è stato completamente progettato e realizzato "in house".



Figura 13. Air lift a piano inclinato

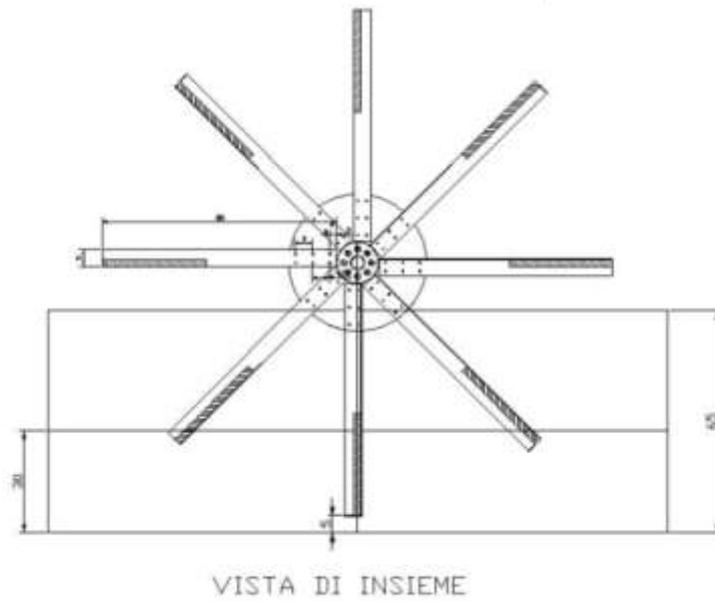


Figura 14. Disegno tecnico dell'agitatore a pale, vista laterale con misure in cm



Figura 15. foto dell'agitatore a pale funzionante in vasca



Figura 16. Particolare del motore elettrico

### 2.3 Colture di laboratorio per la realizzazione di inoculi e prove di produzione di biogas

Il ceppo utilizzato nelle colture in vasca è stato lo stesso impiegato nelle prove del 2013, ovvero lo *Scenedesmus dimorphus*. I fotobioreattori in sacco sono stati inoculati mediante colture effettuate in laboratorio con sistemi impieganti bottiglie di acqua minerale riciclate, acqua minerale e fertilizzante commerciale liquido per piante con rapporto NPK 7:5:6. Le colture venivano agitate tramite aria compressa, immessa tramite pipetta e tubicino in plastica. L'illuminazione veniva fornita da tubi al neon in continuo. In laboratorio sono state effettuate prove di sviluppo su altre specie di acqua dolce, ovvero *Botryococcus braunii*, *Arthrospira maxima*, *Arthrospira platensis*, su cui viene applicata la procedura "SOUR" per le prove di produzione di biogas.



Figura 17. Colture di laboratorio su bancone illuminato

Sulla base di prove preliminari effettuate nell'annata precedente, si sono allestite nuove prove rapide di produzione potenziale di biogas tramite la procedura respirometrica dinamica denominata "SOUR".

La procedura "SOUR" (Specific Oxygen Uptake Rate) è stata messa a punto da Lasaridi e Stentiford (1998) per la determinazione della stabilità dei compost. Più recentemente Schievano et al. (2008) hanno dimostrato l'esistenza di una correlazione altamente significativa fra la domanda specifica di ossigeno di una matrice per 20 ore, a 37 °C, in condizioni aerobiche dinamiche in cui l'unico fattore limitante è il C della matrice, e la sua produzione potenziale di biogas in condizioni anaerobiche in 60 giorni. Per la sua rapidità il test è uno strumento estremamente potente ed utile per la valutazione e l'approvvigionamento di matrici organiche da destinare alla digestione anaerobica.

Una quantità di campione dell'ordine di 0,3-0,5 g viene messa in beuta da 500 mL; a questa si aggiungono 12 mL di una soluzione tampone così composta:  $K_2HPO_4$  125 mM,  $KH_2PO_4$  62,5 mM,  $Na_2HPO_4$  125 mM,  $FeCl_3$  0,314 mM,  $CaCl_2$  82,4 mM,  $MgSO_4$  30,4 mM e 10 mL di una soluzione di  $NH_4Cl$  33,7 mM. Alla fine si porta il volume a 500 mL con acqua distillata e si aggiunge il magnete per l'agitazione. La beuta viene posta su piastra riscaldante con agitatore magnetico, e corredata con termometro Vertex per la termostatazione della piastra, aeratore costituito da una piccola pompa da acquario con pietra porosa, sensore per la misura dell'ossigeno disciolto. A differenza del  $BOD_5$  questa tecnica consiste nel rilevare il consumo di ossigeno in condizioni non limitanti, aerando periodicamente il campione: tutto questo viene realizzato mediante un'interfaccia seriale, collegata con un computer, che realizza cicli alternati di 15 min di aerazione e 15 minuti di rilevamento dati ( $O_2$  disciolto e temperatura). In ogni ciclo di misura i dati di ossigeno disciolto, espressi in mg  $O_2/L$ , avranno un andamento lineare decrescente nel tempo: la pendenza della retta rappresenta il rate di consumo di ossigeno (mg  $O_2/L/h$ ). Il grafico delle pendenze in funzione del tempo presenta una fase lag iniziale, un picco (in genere intorno alla quinta-sesta ora del test), una fase discendente: il valore del picco riferito all'unità di peso di sostanza secca contenuta nel campione rappresenta il SOUR (mg  $O_2/g$  ss  $h^{-1}$ ). L'integrale da 0 a 20 ore della curva delle pendenze permette di ricavare la domanda specifica di ossigeno  $OD_{20}$  (mg  $O_2/g$  ss), che, insieme al contenuto di solidi volatili, permette di stimare la produzione potenziale di biogas, mediante la seguente equazione di correlazione (Schievano et al., 2008):

$$ABP = 13,782 \times VS + 26,161 \times OD_{20}^{0,5} - 997,890$$

dove VS rappresenta il contenuto di solidi volatili del campione (% ss),  $OD_{20}$  è la domanda specifica di ossigeno del campione in 20 ore (mg  $O_2/g$  ss) e ABP è il potenziale di biogassificazione anaerobica (mL biogas/g ss).

#### 2.4 Coltivazione di microalghe all'aperto in sacchi di polietilene (fotobioreattori) da 30 L

Quasi niente di nuovo per questa attività rispetto a quanto già descritto nel rapporto del 2013 (RdS\_2013\_177 "Sistemi per la produzione di microalghe a fini di riciclo di digestato e fornitura di biomassa per biogas") in quanto la tecnologia adottata si è rivelata affidabile ed economica. L'unica differenza consiste nella copertura della serra e nelle conseguenti variazioni ambientali, sia come temperature che come illuminazione, una volta utilizzato il telo ombreggiante sulla serra nel periodo più caldo. Tale utilizzo, rispetto all'anno precedente, ha consentito di non perdere cicli produttivi durante i periodi con le temperature maggiormente elevate.

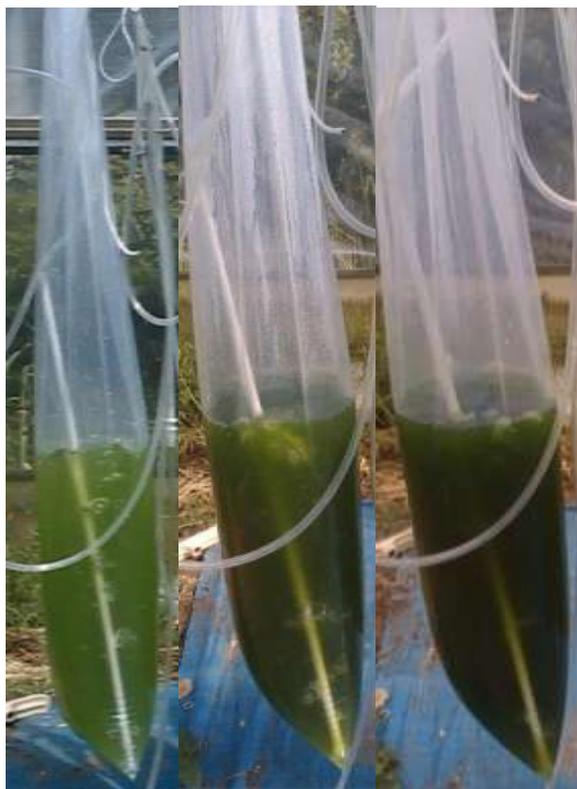


Figura 18. Fotobioreattore a sacco in stadi successivi di sviluppo

### 2.5 Predisposizione di vasche per le colture microalgali fertilizzate con digestato liquido

In una vasca è stato montato un agitatore a pale progettato e costruito *in house*, come del resto l'*air lift a piano inclinato* presente nelle altre due vasche. La vasca in telo plastico viene dapprima pulita, raccogliendo ed asportando i detriti solidi eventualmente presenti sul fondo. Viene in seguito riempita con una lama d'acqua, proveniente dall'acquedotto interno del centro, di ca 25 cm, corrispondenti a 1500 L di volume utile. Si procede alla sterilizzazione chimica dell'acqua mediante immissione di ipoclorito di sodio a 0,4 mL/L. Si attendono 24 ore con agitazione in funzione. Si introduce quindi il tampone con tiosolfato di sodio, soluzione madre di 125 g/L a 0,4 mL/L, per almeno 2 ore. Si immette poi il fertilizzante, costituito, nel caso delle prove qui illustrate, da digestato liquido proveniente dal settore di digestione anaerobica di un impianto a biogas. Per fertilizzare le vasche è stato impiegato unicamente digestato liquido proveniente dall'impianto a biogas della ditta "Palombini" di Nepi, distante una ventina di chilometri dal C. R. Casaccia.

La dose standard impiegata, dell'1<sup>0</sup>/<sub>00</sub> v/v, è stata adottata come via di mezzo tra esigenze di quantitativi adeguati di fertilizzante e grado di opacità del mezzo di coltura, che tende ad inibire la penetrazione della luce soprattutto nelle fasi iniziali della coltivazione, come già riportato nella relazione dell'anno precedente.



**Figura 19. Vasca con digestato appena immesso**

Si effettua l'inoculo con almeno 20 L (un fotobioreattore a sacco) di coltura matura a ca 1 g/L di ss. Si attende alcuni giorni per lo sviluppo della coltura, sempre con l'agitazione in funzione. Arrivati ad uno sviluppo giudicato sufficiente, si ferma l'agitazione per una notte onde favorire la decantazione delle alghe. Il giorno successivo si procede alla raccolta, inserendo una pompa ad immersione per acque sporche, che raccoglie l'acqua di risulta in contenitori cilindrici da 450 litri affiancati alla vasca. Rimane sul fondo della vasca uno strato di un paio di cm di alghe concentrate e acqua, che viene raccolto tramite aspiratore per liquidi e stoccato in bidoni plastici da 30 litri. Si raccolgono campioni per le analisi, sia di decantato che di acqua di risulta.



**Figura 20. Vasca matura pronta per la raccolta**

L'acqua di risulta, contenente un minimo di concentrazione algale che può fungere da nuovo inoculo, insieme a quanto rimane del tappetino algale, viene reimpressa in vasca. Acqua fresca viene aggiunta fino a ricostituire una lama d'acqua di 25 cm e viene instaurato un nuovo ciclo aggiungendo nuovo digestato liquido. In alternativa, si procede alla pulizia completa della vasca e si ricomincia ex novo un ciclo di coltivazione, come precedentemente descritto.

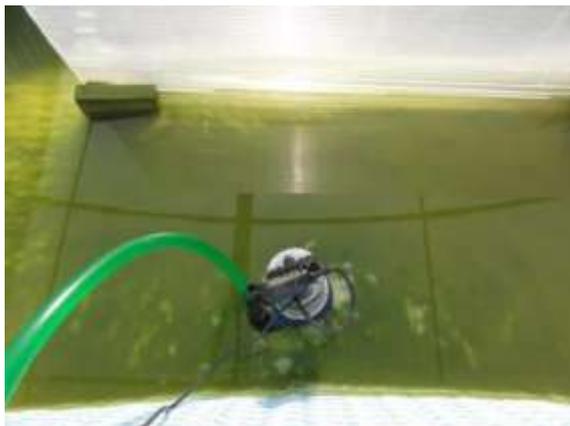


Figura 21. Raccolta acqua di risulta tramite pompa a immersione



Figura 22. Evidenziazione del decantato e sua raccolta tramite aspiratore per liquidi



Figura 23. Vasconi cilindrici da 450 litri per le acque di risulta

La biomassa microalgale è stata raccolta previa decantazione naturale. Le modalità di decantazione sono consistite nell'interruzione dell'agitazione della vasca per almeno una notte (generalmente dalle 16 alle 9 della mattina successiva) e nella raccolta separata dell'acqua (acqua di risulta) soprastante il "tappetino" di alghe che si formava sul fondo e visibile in alcune fotografie. L'acqua di risulta veniva prelevata dalla vasca e immessa in vasconi cilindrici da 450 litri. Il "tappetino" veniva aspirato tramite un aspiratore per liquidi ed immesso in bidoni/taniche da 30 litri. Il rapporto percentuale tra quanto contenuto nel decantato e quanto raccolto in totale rappresenta un buon indice della "separabilità" della biomassa microalgale prodotta nei diversi cicli colturali.



**Figura 24. Campioni di decantato e di acque di risulta**

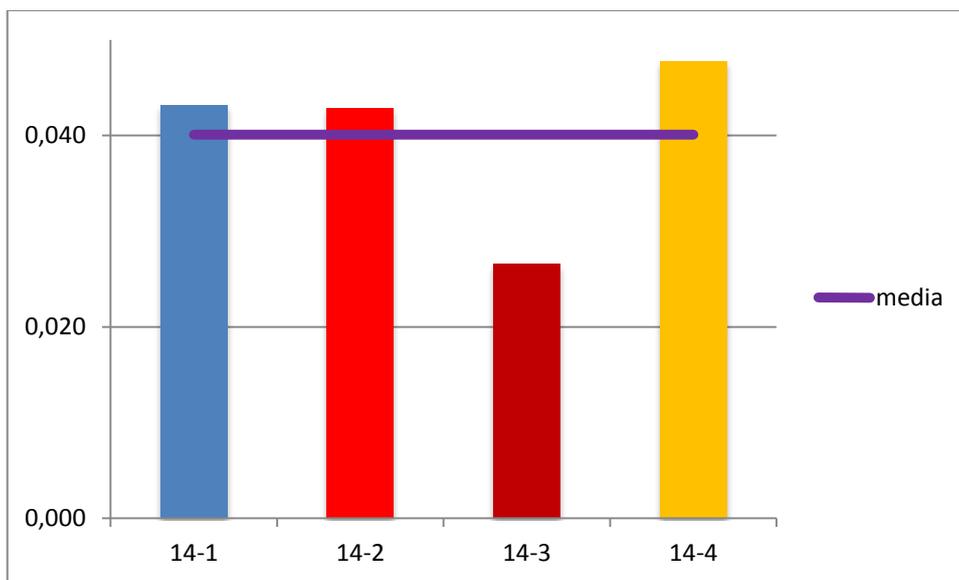
Le rese produttive, in peso secco, sono state misurate mediante filtrazione di campioni ottenuti dopo decantazione di colture mature, sommando quanto contenuto nei campioni di "decantato" a quanto contenuto nelle residue "acque di risulta". Si è rilevata, come anche nell'annata sperimentale precedente, qualche variabilità nelle capacità di decantazione delle colture algali, da porre in relazione con lo stato di sviluppo della coltura e con le relative condizioni fisiologiche delle alghe.

### 3 Risultati

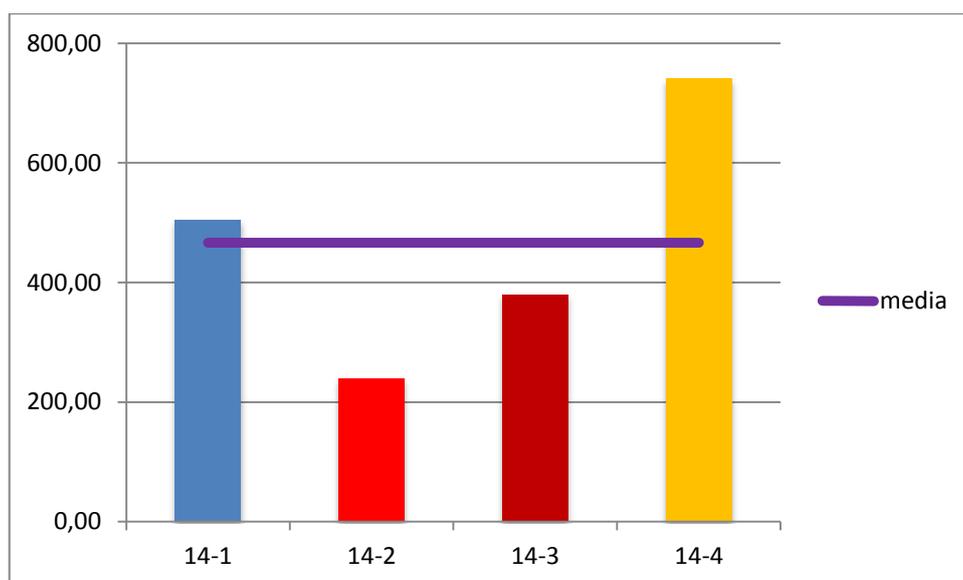
Oltre alle colture su cui sono state effettuate analisi, sono stati eseguiti diversi altri cicli produttivi di prova, sui quali non sono stati raccolti dati produttivi.

**Tabella 1. Prospetto dati produttivi delle vasche analizzate**

ID	data inoculo	data raccolta	durata g	volume iniz	volume fin	fertiliz	resa g/l	resa tot g	resa pro die	separabilità	riciclo H <sub>2</sub> O
14-1	3 giu 2014	12 giu 2014	9	1500	1300	1 <sup>0</sup> / <sub>00</sub>	0,39	505,08	0,04	73,50%	no
14-2	30 giu 2014	4 lug 2014	4	1500	1400	1 <sup>0</sup> / <sub>00</sub>	0,17	240,00	0,04	40,62%	si
14-3	4 lug 2014	15 lug 2014	11	1500	1300	1 <sup>0</sup> / <sub>00</sub>	0,29	380,17	0,03	44,50%	no
14-4	29 lug 2014	8 ago 2014	10	1650	1550	1 <sup>0</sup> / <sub>00</sub>	0,48	740,86	0,05	36,86%	no



**Figura 25. Resa giornaliera delle vasche analizzate, in g/L**



**Figura 26. Resa totale in grammi**

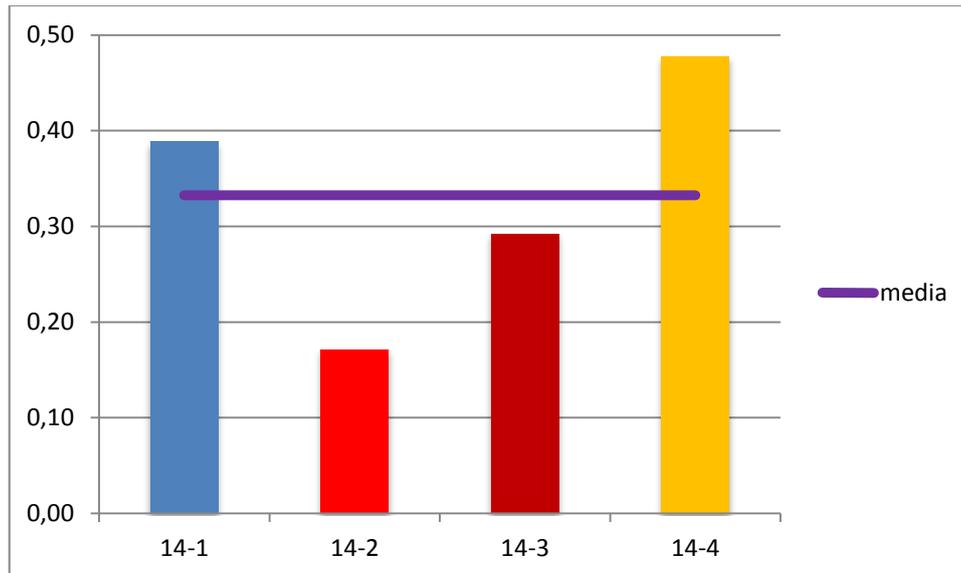


Figura 27. Resa in g/L

Tabella 2. Composizione microalghe raccolte

ID	Proteine totali, %	Lipidi totali, %	Ceneri, %	Carboidrati totali, %
14-1	30,5	4,1	22,3	43,1
14-2	28,8	3,3	15,4	52,5
14-3	31,6	2,8	20,3	45,3
14-4	30,3	3,5	22,4	46,8

Tabella 3. Nutrienti nelle acque di risulta

ID	azoto tot	NaNO <sub>3</sub>	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	K <sup>+</sup>	K <sub>2</sub> O
	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	g/l	g/l
14-1	22,5	65,5	7,5	9,8	0,23	0,59
14-2	18,3	45,6	115,5	180,6	0,15	0,41
14-3	14,5	27,2	220,3	275,8	0,34	0,62
14-4	62,4	115,7	42,2	55,3	0,25	0,49

### 3.2 Dati climatici

La stagione sperimentale è stata caratterizzata da un andamento climatico piuttosto variegato, con frequenti piogge e temperature dell'aria nel complesso non molto elevate, così come il flusso fotonico di interesse fotosintetico (PPF). Tali dati sono stati acquisiti da una stazione meteorologica situata a ca 100 m in linea d'aria dalla serra sperimentale. All'interno della serra è stata installata una sonda per temperatura e umidità dell'aria in grado di registrare i dati ogni 15 minuti. Una sonda di temperatura per acqua, con registrazione automatica dei dati, è stata inoltre immessa in una delle vasche.

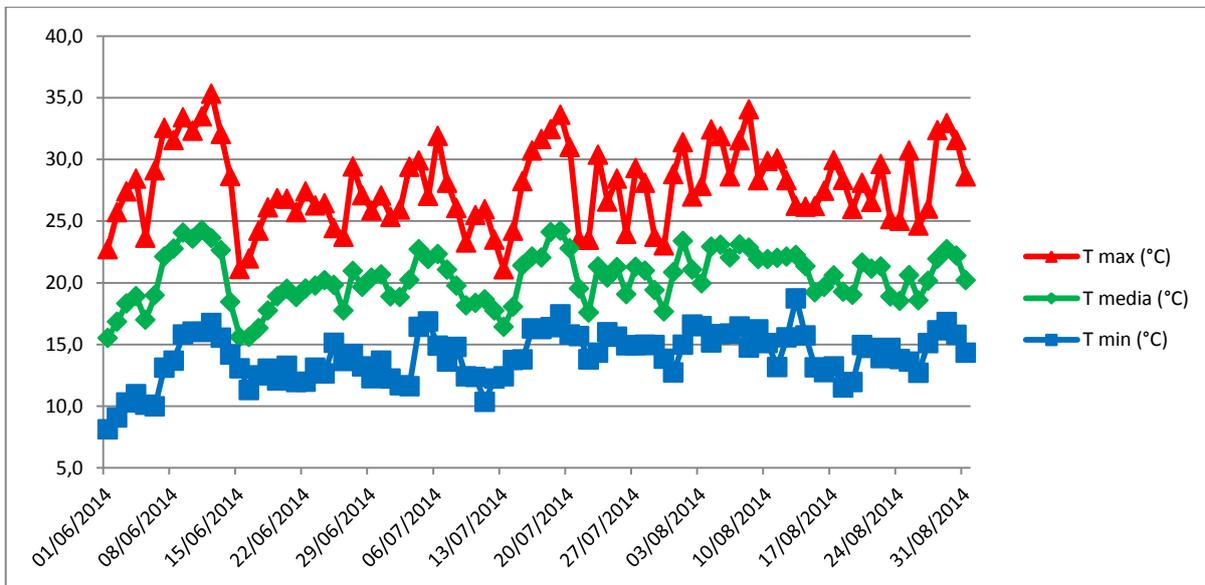


Figura 28. Temperature dell'aria in esterno

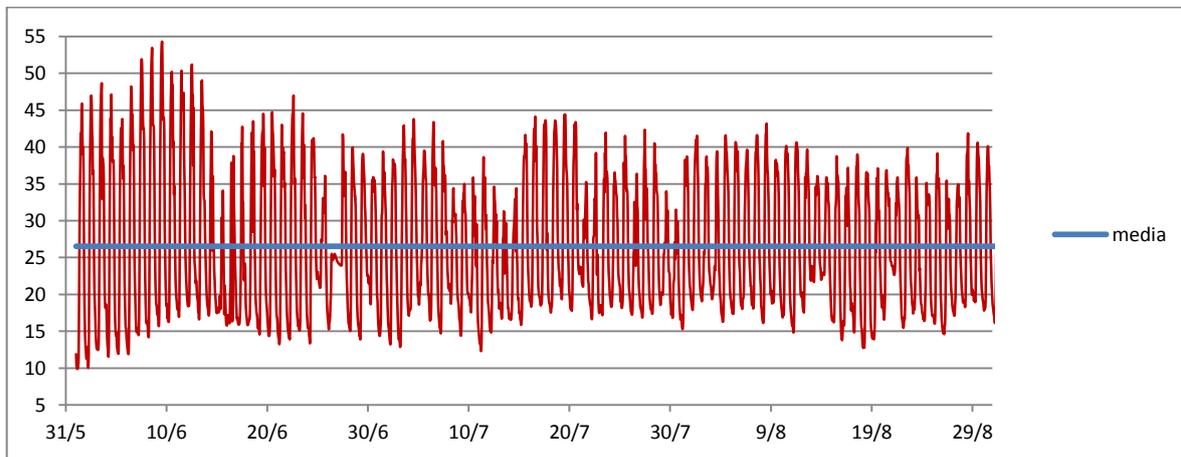


Figura 29. Temperature dell'aria in serra, in °C

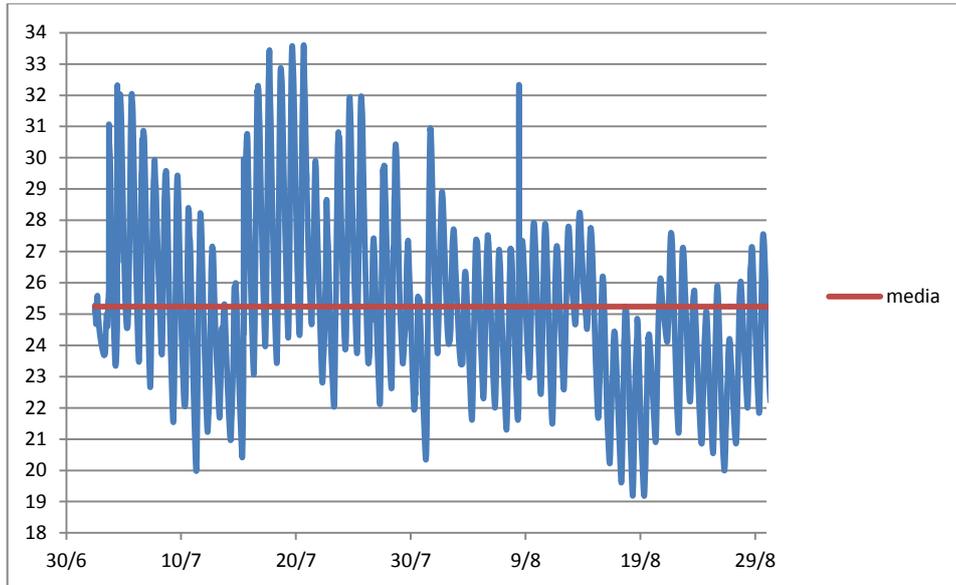


Figura 30. Temperatura delle colture in vasca

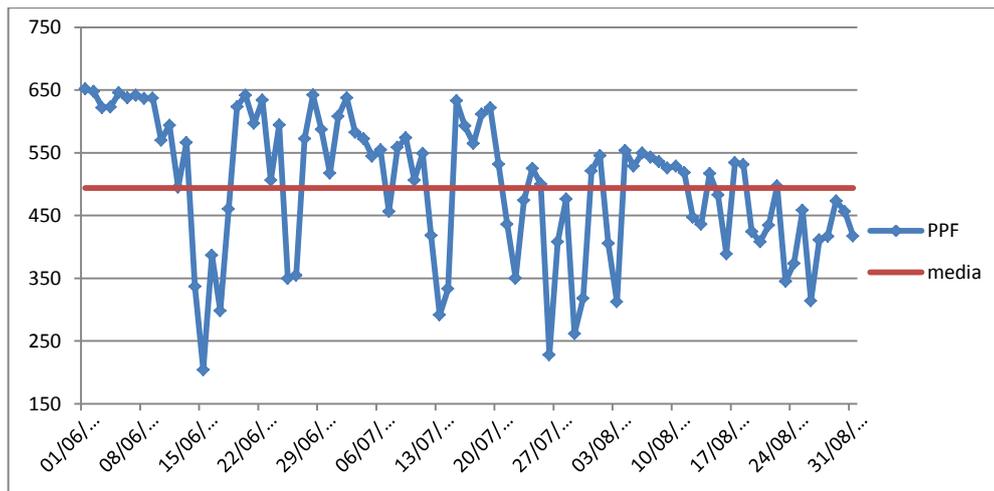


Figura 31. PPF – flusso fotonico fotosinteticamente attivo giornaliero medio ( $\mu\text{M fotoni m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ )

### 3.3 Produttività in biogas

Si presenta di seguito una tabella coi valori ottenuti durante prove effettuate nel 2013 .

Tabella 4. SOUR alga *S. dimorphus*; valori in  $\text{m}^3$  di biogas /t di ss, in grassetto valori medi  
DIG = digestato, FLC = fertilizzante liquido commerciale

25B	25C	PISC1
$2^0/_{00}$ DIG + $0,5^0/_{00}$ FLC	$10^0/_{00}$ DIG + $0,5^0/_{00}$ FLC	Da tanica - $3,4^0/_{00}$ DIG
398,98	452,05	344,13
435,58	475,73	365,62
		333,03
<b>417,28</b>	<b>463,89</b>	<b>347,59</b>

Nel 2014 le prove, anche su altre specie algali, sono attualmente in corso e i risultati verranno resi noti appena possibile.

Sono state inoltre effettuate alcune immissioni di decantato algale, mantenuto in taniche da 30 l per ca 4 settimane, nel digestore sperimentale situato nel Centro ENEA Casaccia, destinato a prove di produzione di biogas in codigestione.



Figura 32. Digestore anaerobico sperimentale da 6 m<sup>3</sup> presso C.R. ENEA Casaccia



Figura 33. Alimentazione del digestore con biomassa microalgale raccolta dalle vasche sperimentali

## 4 Conclusioni

### 4.1 Aspetti favorevoli

- La specie microalgale testata nelle vasche, lo *Scenedesmus dimorphus*, ha risposto alle nuove condizioni ambientali adattandosi prontamente e sviluppandosi velocemente. Il sistema di coltivazione ha dimostrato buone potenzialità produttive pur con i limiti della prima serie e con l'impostazione assolutamente spartana e "low cost".
- Il basso costo di impianto si riflette beneficamente sui bilanci energetici ed economici, sebbene l'esecuzione di elaborazioni dettagliate appaia ancora prematura in questa fase iniziale, caratterizzata più dalla ricerca delle maggiori problematiche operative che dal raggiungimento di produttività da considerare ottimali.
- I dati preliminari sulla produttività in biogas, presentando valori in linea con quanto si riscontra in alcuni lavori già pubblicati, fanno ben sperare per un miglioramento successivo in vista dell'applicazione di affinamenti tecnici già individuabili. Tra questi, il più rilevante appare essere l'utilizzo della biomassa algale per l'immissione nei digestori nell'arco di poche ore dalla raccolta, abbreviando al minimo i tempi di stoccaggio.

### 4.2 Aspetti critici

Il passaggio da ambienti quasi del tutto chiusi, quali quelli dei fotobioreattori in sacchi di polietilene, ad ambienti protetti, ma esposti alle contaminazioni quali quelli delle vasche aperte sperimentate nel presente lavoro, ha comportato alcune diversità nel ciclo produttivo algale:

- Dopo una prima fase in cui è assolutamente prevalente lo sviluppo della specie algale inoculata, della durata tipica di circa dieci giorni - un paio di settimane, sopravviene una fase di regressione della coltura, con l'instaurarsi di forme larvali e non di insetti che si nutrono delle alghe e che trasformano la biomassa vegetale in biomassa animale.
- Vi è differenza tra una coltura in vasca pulita e sterilizzata chimicamente tramite ipoclorito, inoculata da sacchi ex novo e una in cui si reimmette acqua di risulta della coltura precedente senza pulizia del fondo vasca. Il processo di riciclo dell'acqua di risulta, se addizionata di nuovo fertilizzante, ottiene tempi di sviluppo rapidi delle microalghe, ma una resistenza abbreviata alla fase di instaurazione delle larve di insetto. Occorre pertanto abbreviare il ciclo produttivo a meno di una settimana, preferibilmente a 4-6 giorni. Inoltre, vi è la possibilità che si sviluppino anche altre specie microalgali di origine naturale. Tuttavia rimangono da verificare tecniche di reimmissione di fertilizzante e di spazzolatura del fondo, come suggerito dagli israeliani di Seambiotic, che potrebbero migliorare i tempi di resistenza della coltura originale.
- La procedura di raccolta sperimentata è risultata piuttosto onerosa in termini di lavoro manuale necessario. Sarebbe auspicabile, ai fini di una produzione continuativa pre-commerciale, meccanizzare quanto più possibile le fasi di decantazione/raccolta.

## 5 Riferimenti bibliografici

- Alzate, M.E., Munoz, R., Rogalla, F., Fdz-Polanco, F., Perez-Elvira, S.I., 2012. Biochemical methane potential of microalgae: influence of substrate to inoculum ratio, biomass concentration and pretreatment. *Bioresour. Technol.* 123, 488–494.
- Barbato F. Tomei G., Di Gioia V., Pignatelli V. , 2009. Experiences of microalgae cultivation at lab-small scale. 2° Convegno della Società Italiana Bioenergia e Agroindustria, 4-5 maggio 2009, Roma
- Benemann, J.R., J.C. Van Olst, M.J. Massingill, J.C. Weissman and D.E. Brune (2003). “The controlled eutrophication process: using microalgae for CO2 utilization and agricultural fertilizer recycling.”. *Greenhouse Gas Control Technologies, Volume II* J. Gale and Y. Kaya (Eds.) Elsevier: 1433-1438
- Bohutskyi, P., Bouwer, E., 2013. Biogas production from algae and Cyanobacteria through anaerobic digestion: a review, analysis, and research needs. In: Lee, J.W. (Ed.), *Advanced Biofuels and Bioproducts*. Springer, New York, pp. 873–975.
- Bohutskyi P., Betenbaugh M.J., Bouwer E.J., 2014. The effects of alternative pretreatment strategies on anaerobic digestion and methane production from different algal strains. *Bioresource Technology* 155 366–372
- De Schamphelaire, L., Verstraete, W., 2009. Revival of the biological sunlight-to biogas energy conversion system. *Biotechnol. Bioeng.* 103 (2), 296–304.
- Li Xin, Hu Hong-ying, Gan Ke , Sun Ying-xue. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp.. *Bioresource Technology* 101 (2010) 5494–5500
- Mandal S., Mallick N., 2009. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Appl Microbiol Biotechnol* 84:281–291
- Schenk, P.M., Thomas-Hall, S.R., Stephens, E., Marx, U.C., Mussgnug, J.H., Posten, C., Kruse, O., Hankamer, B., 2008. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *BioEnergy Research* 1, 20–43. Schenk, P.M., Thomas-Hall, S.R., Stephens, E., Marx, U.C., Mussgnug, J.H., Posten, C., Kruse, O., Hankamer, B., 2008. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *BioEnergy Research* 1, 20–43.
- Sialve, B., Bernet, N., Bernard, O., 2009. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnol. Adv.* 27 (4), 409–416.
- Torzillo G, Pushparaj B, Masojidek J, Vonshak A (2003) Biological constraints in algal biotechnology. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 8:338–348
- Tredici M.R., Chini Zittelli G., 1998. Efficiency of Sunlight Utilization: Tubular Versus Flat Photobioreactors. *Biotechnology And Bioengineering*, Vol. 57, No. 2, January 20, 1998

### Contributi a convegni:

- Barbato F., Bianco A., Venditti A., Guarcini L. , Cogliani E. , Pignatelli V. “Trials on the use of digestate to cultivate *Scenedesmus dimorphus* in outdoor bag photobioreactors”, congresso “Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts”, 15 al 19 Giugno 2014, Santa Fè, New Mexico, USA