



Ricerca di Sistema elettrico

Sviluppo di sistemi per l'integrazione di microalghe in processi produttivi di biogas

Barbato F., Ninivaggi L., Cogliani E., Petrazzuolo F.

SVILUPPO DI SISTEMI PER LA INTEGRAZIONE DI MICROALGHE IN PROCESSI PRODUTTIVI DI BIOGAS

Barbato F., Cogliani E., Petrazzuolo F. (ENEA)

Ninivaggi L. (Sapienza Università di Roma)

Settembre 2015

Report Ricerca di Sistema Elettrico

Accordo di Programma Ministero dello Sviluppo Economico – ENEA

Piano Annuale di Realizzazione 2014

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

Si ringrazia per la collaborazione nei test di filtrazione con membrane il collega Claudio Russo.

Indice

SOMMARIO.....	4
1. INTRODUZIONE.....	5
2. DESCRIZIONE DELLE ATTIVITÀ SVOLTE.....	6
2.1. SERRA A TUNNEL OSPITANTE FOTOBIOREATTORI A SACCO E VASCHE PER COLTIVAZIONI MICROALGALI.....	6
2.2. DATI CLIMATICI.....	6
2.3. NOTE SUL NON UTILIZZO DELLA CO ₂	8
2.4. RISULTATI DEI CICLI PRODUTTIVI IN VASCA.....	8
2.5. COLTURE DI LABORATORIO PER LA REALIZZAZIONE DI INOCULI E PROVE DI PRODUTTIVITÀ IN BIOGAS.....	9
2.5.1. <i>Prove di produttività in biogas SOUR - Introduzione</i>	10
2.5.2. <i>Metodi</i>	10
2.5.3. <i>Risultati e Discussioni</i>	13
3. TECNICHE DI SEPARAZIONE BIOMASSA/MEZZO DI COLTURA.....	16
3.1. DECANTAZIONE.....	16
3.2. FILTRAZIONE A MEMBRANA.....	16
3.3. DAF - DISSOLVED AIR FLOTATION O FLOTTAZIONE.....	17
4. BILANCI ECONOMICO/PRODUTTIVI.....	18
5. CONCLUSIONI.....	20
6. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.....	21

Sommario

Nel corso dell'attuale anno di ricerca (2014-2015) nell'ambito dell' obiettivo "a.2 - Sistemi per la produzione di microalghe a valle del processo di DA", sono stati affrontati i seguenti temi:

- Prove colturali di diversi ceppi microalgali su scala di laboratorio e relative prove di potenzialità di sviluppo di biogas mediante tecnica SOUR.
- Continuazione delle tecniche colturali per *Scenedesmus dimorphus* in vasche protette sotto serra da 1500 L.
- Nuove tecniche di separazione tra biomassa microalgale e mezzo di coltura con miglioramento dell'efficienza rispetto alla semplice decantazione utilizzata in precedenza.
- Riepilogo delle esperienze effettuate nei tre anni con una prima stima di massima relativa a bilanci economico/produttivi.

1. Introduzione

Il lavoro oggetto di questo documento si inquadra nella tematica generale già iniziata nel corso delle attività degli anni precedenti che riguardano 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 ottenuta per produrre nuovo biogas, mediante un’operazione di riciclo di nutrienti. E’ possibile visualizzare tali concetti nel diagramma di flusso riportato in figura 1.

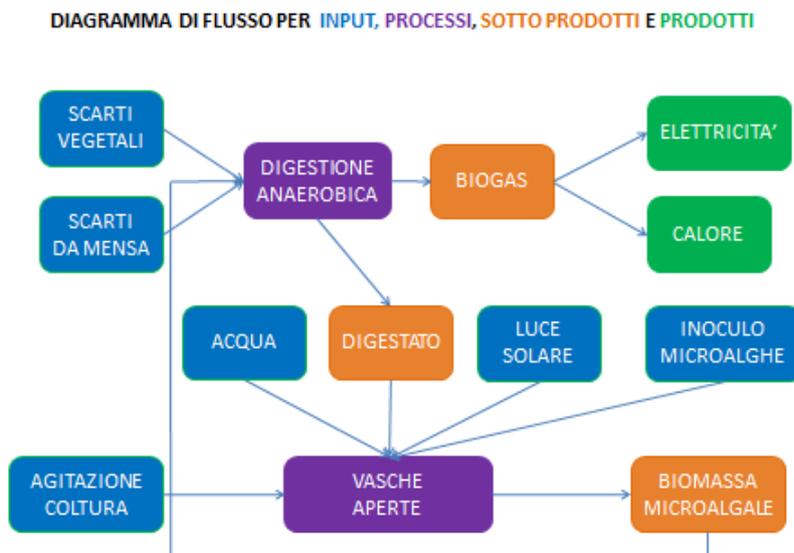


Figura 1. Diagramma di flusso delle idee progettuali

Le attività di quest’anno si sono indirizzate verso:

- Continuazione della produzione algale in vasche da ca 1500 L di volume utile, protette da una serra. Tali vasche sono realizzate mediante la struttura di economiche piscine fuori terra per bambini, opportunamente adattate con attrezzature necessarie allo scopo della coltivazione microalgale. Le vasche sono 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.
- Coltura di diversi ceppi microalgali in laboratorio, in particolare di *Botryococcus braunii*, *Arthrospira platensis* e *Scenedesmus dimorphus*, al fine di ottenere quantità di biomassa secca atte a svolgere analisi di potenzialità produttiva di biogas mediante la tecnica SOUR.
- Effettuazione di analisi con tecnica SOUR per la produttività in biogas delle suddette specie algali.
- Riepilogo delle esperienze realizzate nei tre anni di attività e prime stime relative a bilanci economico/produttivi.

2. Descrizione delle attività svolte

2.1. Serra a tunnel ospitante fotobioreattori a sacco e vasche per coltivazioni microalgali

La serra utilizzata, di 15x8 metri, è la stessa dell'anno scorso, rimessa in condizioni operative attraverso manutenzioni effettuate per riparare danneggiamenti al telo di copertura causati da eventi atmosferici avversi occorsi durante il periodo invernale. Per evitare temperature troppo elevate, per il periodo estivo è stata predisposta una copertura con telo ombreggiante, in modo da ottenere condizioni maggiormente compatibili con la crescita algale. La copertura è durata fino alla fine delle colture sperimentali realizzate nel settembre 2015. Il ceppo utilizzato nelle colture, in vasca da 3x2x0,6 metri, è stato lo stesso impiegato nelle prove del 2014, ovvero lo *Scenedesmus dimorphus*. I fotobioreattori a sacco utilizzati per gli inoculi delle vasche sono stati dello stesso tipo descritto negli anni precedenti.



2.2. Dati climatici

La stagione sperimentale è stata caratterizzata da un andamento climatico decisamente caldo, con non infrequenti piogge e temperature dell'aria nel complesso 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 vasca negli ultimi 3 cicli produttivi.



Figura 2. Temperature aria da stazione meteo

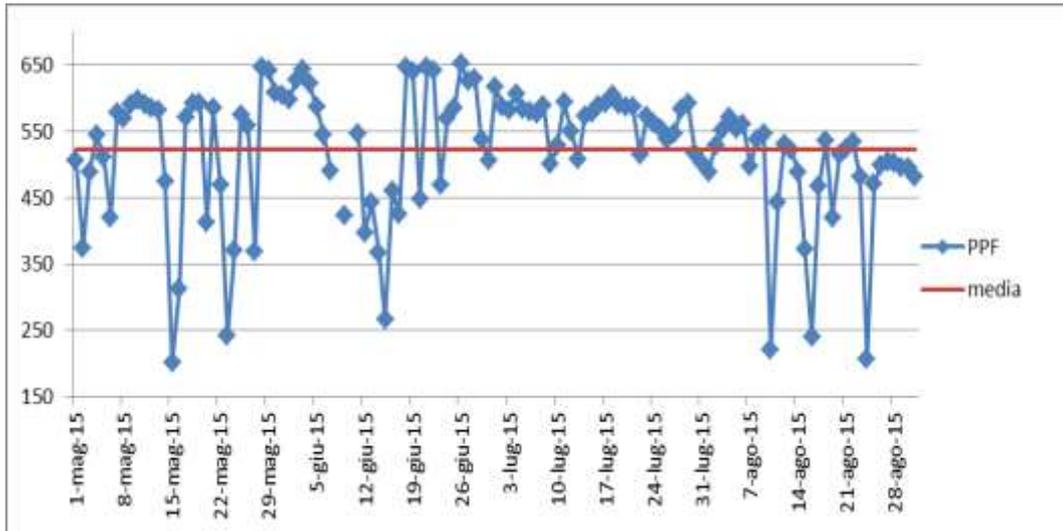


Figura 3. PPF– flusso fotonico fotosinteticamente attivo giornaliero (μM fotoni $\text{m}^{-2} \text{sec}^{-1}$); dati da stazione meteo

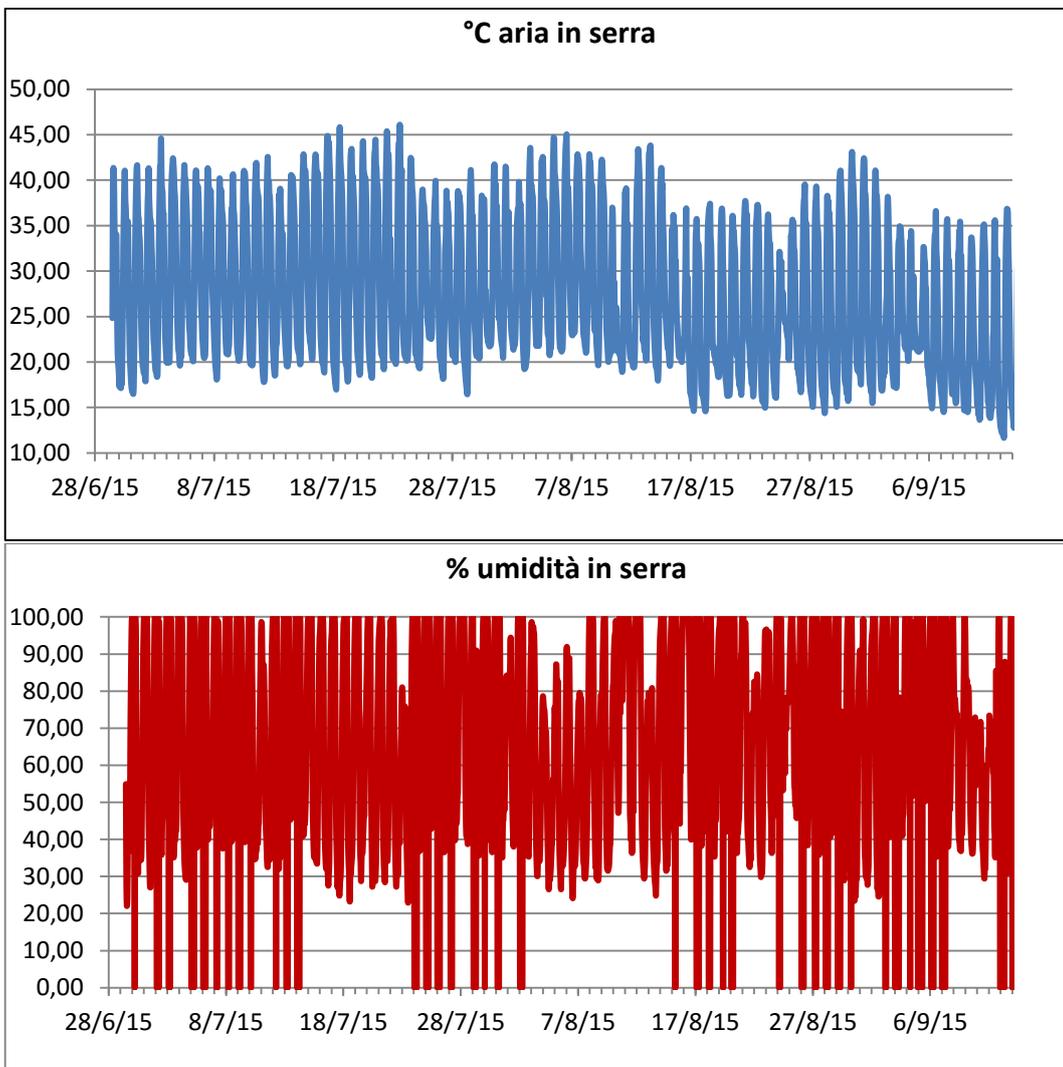


Figura 4. Temperatura e umidità in aria all'interno della serra a intervalli orari (29 giugno-14 set 2015)

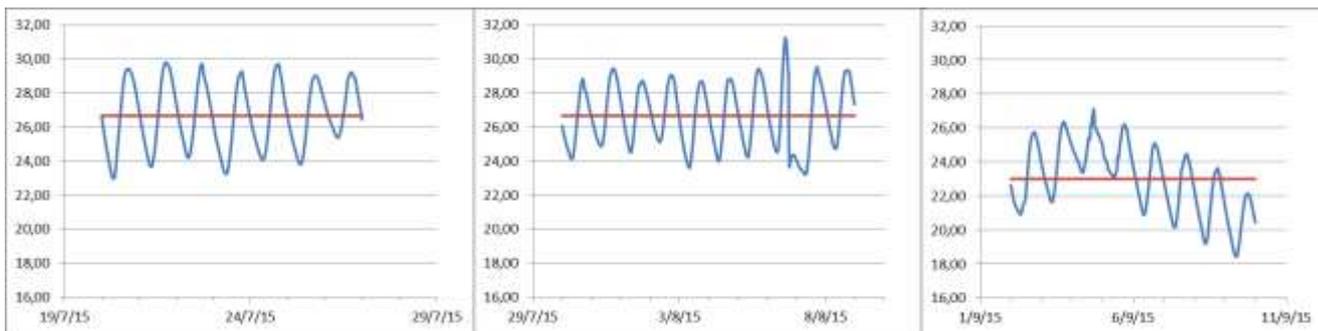


Figura 5. Temperature a intervalli di 15 min in mezzo di coltura per ultimi 3 cicli in vasca

2.3. Note sul non utilizzo della CO₂

Il non utilizzo della CO₂ è stato determinato, oltre che da problemi tecnici, anche da una serie di considerazioni che si riportano di seguito.

- L'uso di CO₂ pura in bombole, unica opzione nel nostro set up sperimentale, è un ulteriore costo rispetto alla CO₂ contenuta in fumi di scarico di caldaie o degli stessi motori a biogas CHP per l'ottenimento di elettricità e calore, opzione prima per una ipotesi produttiva potenziale.
- L'uso di CO₂ per velocizzare la crescita delle microalghe comporta inoltre un aggravio dei costi sotto forma di apparati di controllo piuttosto sofisticati per evitare immissioni indebite in atmosfera di CO₂ non utilizzata. Senza tali apparati si rischia di immettere in atmosfera più CO₂ di quanta ne venga effettivamente assorbita dalle alghe.
- L'impiego di CO₂ addizionata comporta variazioni di pH nel mezzo di coltura e di metabolismo cellulare delle alghe che possono ripercuotersi sulla composizione biochimica della biomassa risultante. Non si è ritenuto di aggiungere anche questo elemento di variazione al presente set up sperimentale.

2.4. Risultati dei cicli produttivi in vasca

Si sono effettuati diversi cicli produttivi e su 5 di questi sono state effettuate le analisi sulla resa della biomassa algale raccolta, che vengono riportate di seguito. Altre analisi chimiche sulla detta biomassa sono state realizzate sempre dal gruppo del prof. Bianco presso il Dipartimento di Chimica della Università "La Sapienza" di Roma e fanno parte di un altro report apposito, collegato al presente.

Anche durante le prove di quest'anno sono state riscontrate criticità legate allo sviluppo di larve di insetto, con particolari effetti negativi esercitati da larve di chironomidi tubicole (vermetti rossi) che arrivano ad impiantarsi su tutte le pareti immerse e capaci nel giro di 3-4 giorni di consumare per filtrazione l'intera biomassa microalgale di una vasca matura. Occorre pertanto sorvegliare la vasca in modo da raccogliere la biomassa prima dello sviluppo massivo di tali larve.

Le procedure di gestione per la coltivazione microalgale in vasca sono state in generale molto simili a quelle già descritte nel report precedente.

Il digestato utilizzato come fertilizzante proveniva come nelle precedenti annate dalla ditta Palombini di Nepi, ovviamente con caratteristiche chimiche diverse, variando in continuazione la composizione degli input per alimentare i digestori.

Tabella 1. Principali dati produttivi (preliminari, manca ultimo ciclo di settembre e da verificare gli altri)

ID	data inoculo	data raccolta	durata g	volume iniz	volume fin	fertiliz	resa g/l	resa tot g	resa pro die g/L	separabilità	litri decantato	riciclo H ₂ O
15-1	26/05/15	11/06/15	16	1500	1300	1 ‰	0,16	207,21	0,010	75,67	80	no
15-2	19/06/15	26/06/15	7	1500	1400	1 ‰	0,12	164,33	0,017	97,24	85	si
15-3	20/07/15	27/07/15	7	1500	1200	1 ‰	0,22	260,61	0,031	98,27	120	no
15-4	30/07/15	08/08/15	9	1600	1400	1 ‰	0,18	251,64	0,020	97,64	120	no
15-5	02/09/15	10/09/15	8	1500	1400	1 ‰	0,15	209,00	0,019	100,00	110	no

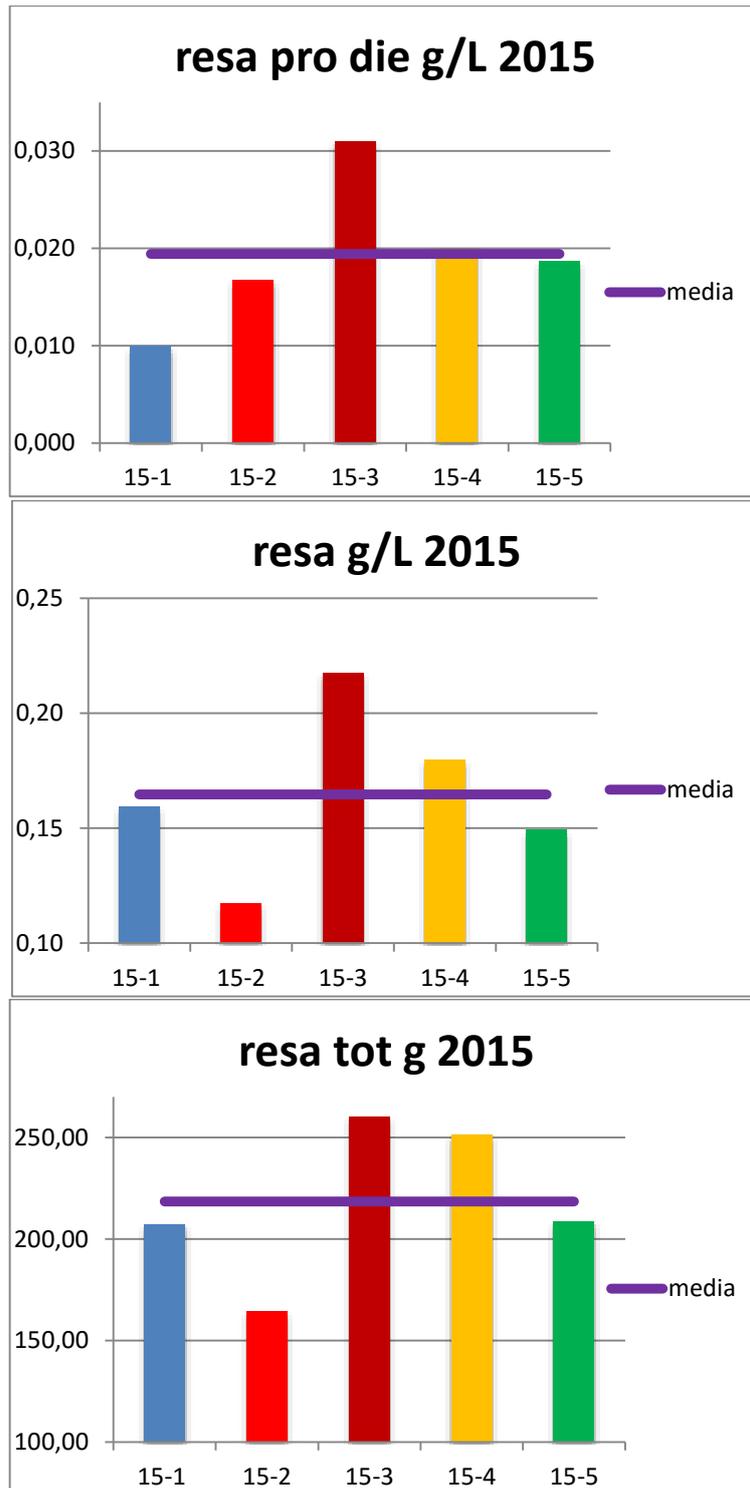


Figura 6. Grafici su rese dei cicli 2015

2.5. Colture di laboratorio per la realizzazione di inoculi e prove di produttività in biogas

I fotobioreattori in sacco della serra 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* e *Arthrospira platensis*, su cui è stata applicata la procedura "SOUR" per le prove di produzione di biogas.



Figura 7. Colture di laboratorio su bancone illuminato

2.5.1. Prove di produttività in biogas SOUR - Introduzione

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".

Qui di seguito sono descritte le attività sperimentali riguardanti la produzione potenziale di biogas da parte di biomasse microalgali di diverse specie effettuate nel periodo considerato in questa relazione.

I campioni di microalghe utilizzati originavano da diversi sistemi di coltivazione. In particolare, i ceppi di *Botryococcus braunii* e *Arthrospira platensis* sono stati ricavati da colture in laboratorio utilizzando bottiglie di plastica trasparenti tipicamente usate per acqua minerale, mentre i campioni di *Scenedesmus dimorphus* derivavano da un sistema di coltivazione in vasche all'aperto. Attraverso diversi passaggi, descritti in seguito, si è ottenuta in laboratorio la biomassa microalgale secca. Le potenzialità produttive di biogas da parte di alcuni ceppi microalgali sono state quindi testate mediante l'applicazione della procedura SOUR (Specific Oxygen Uptake Rate) a questo particolare tipo di biomassa.

2.5.2. Metodi

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 minuti 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 ($mg O_2 L^{-1} h^{-1}$). 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 ($\text{mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ SS h}^{-1}$). L'integrale da 0 a 20 ore della curva delle pendenze permette di ricavare la domanda specifica di ossigeno OD_{20} ($\text{mg O}_2/\text{g SS}$), 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):

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

dove VS rappresenta il contenuto di solidi volatili del campione (% SS), OD_{20} è la domanda specifica di ossigeno del campione in 20 ore ($\text{mg O}_2/\text{g SS}$) e ABP è il potenziale di biogassificazione anaerobica (mL biogas/g SS). Nel presente studio in genere sono stati utilizzati circa 2 L di coltura della specie interessata. Quest'ultima, giunta a maturità e decantata per almeno una notte, è stata versata in un contenitore di alluminio rivestito con carta da forno e posta in una stufa termostata a 105°C .



Figura 8. Coltura matura prima dell'essiccazione a 105°C

Se si considerano, ad esempio, i campioni di *Scenedesmus dimorphus* SC-A, SC-B, SC-C utilizzati nelle prove sperimentali, queste specie microalgali sono state coltivate con il sistema in vasche all'aperto nelle quali è stato utilizzato, come fertilizzante, il digestato liquido all'1^o/₁₀₀. Le tre colture microalgali, come si può osservare dalla tabella 3, differivano per modalità di essiccazione o centrifugazione e per sistema di confinamento della biomassa all'interno della beuta in cui si esegue la misura del SOUR (in soluzione libera, con uso di garza, di Falcon con buchi o di cestello metallico di contenimento). La necessità di confinare la biomassa nella soluzione di misura del SOUR è dettata dal fatto che le particelle di biomassa possono essere portate in alto dalle bolle di aria e possono rimanere adese sul collo della beuta e quindi sottratte all'ambiente di misura.

Tabella 2. Tre colture di *Scenedesmus* (SC-A, SC-B, SC-C) trattate in differenti modi prima di essere sottoposti al SOUR

ID	grammi utilizzati	essiccazione	centrifugazione	separazione biomassa
SC A1	0,35	105°C	no	in soluzione
SC A2	0,33	105°C	no	Garza
SC A3	0,352	105°C	no	Falcon con buchi
SC B1	0,351	45°C	no	cestello metallico
SC B2	0,382	105°C	no	cestello metallico
SC B3	0,35	105°C	no	cestello metallico
SC C1	0,362	105°C	si	cestello metallico
SC C2	0,366	105°C	si	cestello metallico
SC C3	0,349	105°C	si	cestello metallico

In particolare le colture SC-A e SC-B, una volta raccolte dalla vasca, sono state decantate per una notte, successivamente i campioni sono stati essiccati a 105°C. Mentre per quanto riguarda la coltura SC-C, dopo la raccolta, i campioni sono stati dapprima centrifugati a 3000 rpm per 20 min e poi essiccati in stufa a 105°C. Dopo circa due giorni, il campione essiccato è stato raccolto accuratamente, è stato pesato e posto in una falcon in attesa che venisse effettuata la misura.



Figura 9. Biomassa di Arthrospira dopo essiccazione a 105°

Per la prova respirometrica, sono stati posti circa 0,3-0,5 g del campione essiccato in una beuta da 500 mL, nella quale sono stati aggiunti 12 mL di una soluzione tampone composta da: 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, più 10 mL di una soluzione di NH_4Cl (33,7 mM) e portata a volume con acqua distillata.

La beuta veniva posta in un bagnetto termostatico a 37°C situato su una piastra con agitatore magnetico. Nella beuta, inoltre, è stata inserita una pietra porosa, alimentata da una piccola pompa ad aria da acquario, ed una sonda per la misura dell'ossigeno disciolto. Quest'ultima, prima della misurazione, veniva tarata al valore di zero con una soluzione di metabisolfito di sodio o potassio.

Il campione essiccato e grossolanamente frammentato, inizialmente è stato lasciato libero in soluzione nella beuta. Di ognuna delle colture analizzate sono state effettuate rispettivamente 3 prove SOUR. Nelle prime prove effettuate in soluzione libera si è osservato che, per effetto della forte agitazione, parte del campione microalgale rimaneva addensato sul collo della beuta al di sopra dell'interfaccia aria/acqua, quindi minore biomassa contribuiva alla determinazione dell' O_2 disciolto rilevato dal sistema SOUR. Per ovviare a questa problematica, nei successivi esperimenti effettuati è stato utilizzato un cestello in rete metallica a maglia fine realizzato in laboratorio, che permetteva di contenere il campione e di tenerlo costantemente in soluzione nella beuta.

L'aeratore permette il flussaggio di aria all'interno della beuta. Si parte con un periodo (15 min) di flussaggio. In questo periodo nella beuta l'ossigeno raggiunge rapidamente il valore di saturazione. Successivamente si valuta il rateo di assorbimento di ossigeno in 15 min di stop dell'aerazione .

Nella soluzione infatti si sviluppa una comunità microbica che degrada aerobicamente la matrice microalgale. Grazie ad una interfaccia seriale collegata ad un computer, si registra l'evoluzione del contenuto di ossigeno disciolto durante 20 ore. Quindi, successivamente, integrando i ratei specifici durante tutto l'esperimento si ottiene il valore dell' OD_{20} (Domanda specifica di ossigeno a 20 ore in $mg O_2/g SS$) e, attraverso l'equazione empirica descritta in precedenza si determina il potenziale biochimico di biogas (ABP).

Più oltre, in figura 10, è rappresentato un grafico tipico di un campione di Scenedesmus ottenuto dal programma di rilevazioni dati del SOUR.

Sull'asse delle ascisse si ha il tempo in ore, con la durata dell'esperimento di ca 20 ore totali, mentre sulle ordinate si ha $DO mgO_2/L$.

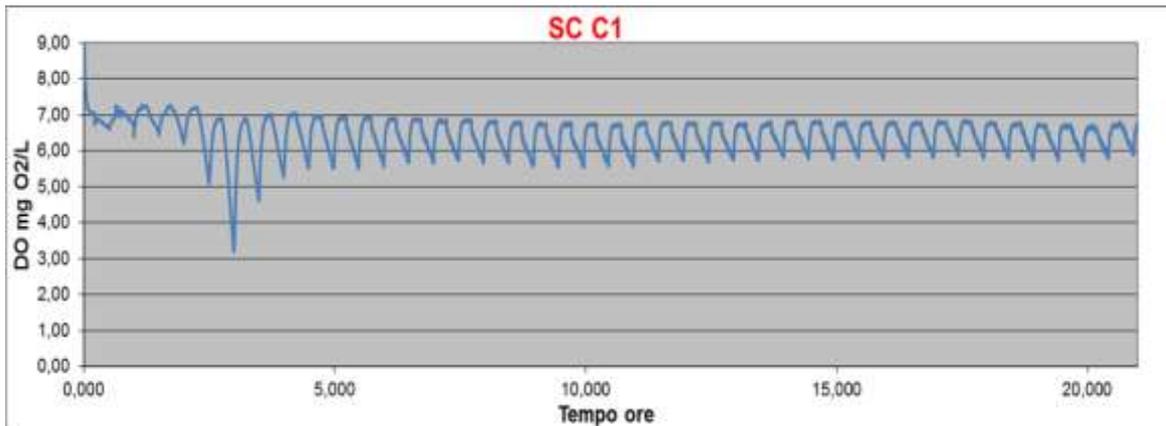


Figura 10. Grafico tipico ottenuto dal sistema di rilevazione SOUR di una coltura di *Scenedesmus* (SC-C)

2.5.3. Risultati e Discussioni

Sono state effettuate diverse prove per mettere a punto un metodo standard in grado di fornire risultati attendibili e in linea con quanto ottenuto attraverso altre metodiche.

La tabella 2 riassume le prove effettuate per le diverse specie microalgali con la tecnica SOUR. Si mostrano i differenti valori di ABP (mL/g SV) ottenuti e le rispettive medie e eventuali deviazioni standard.

Tabella 3. Riassunto degli esperimenti effettuati sulle diverse biomasse microalgali. (SC: *Scenedesmus dimorphus*, BOTRY: *Botryococcus braunii*, SPI21: *Arthrospira platensis*)

ID	grammi utilizzati	ABP mL/gSV	MEDIA ABP	Dev.stand. ABP mL/gSV
SC	0,403	499,868		
SC Z1	0,35	402		
SC Z2	0,35	438,05		
BOTRY	0,353	330,47		
SC A1	0,35	637,74	563,04	64,85
SC A2	0,33	530,33		
SC A3	0,352	521,06		
SC B1	0,351	292,64	319,38	23,73
SC B2	0,382	327,58		
SC B3	0,35	337,92		
SC C1	0,362	535,73	558,93	24,94
SC C2	0,366	555,77		
SC C3	0,349	585,30		
SPI21 A1	0,357	468,06	567,61	94,01
SPI21 A2	0,366	654,88		
SPI21 A3	0,33	579,89		

Nel grafico seguente sono rappresentati i diversi valori di ABP espressi in mL/g di solidi volatili (SV) ottenuti per le diverse specie microalgali testate durante gli esperimenti effettuati.

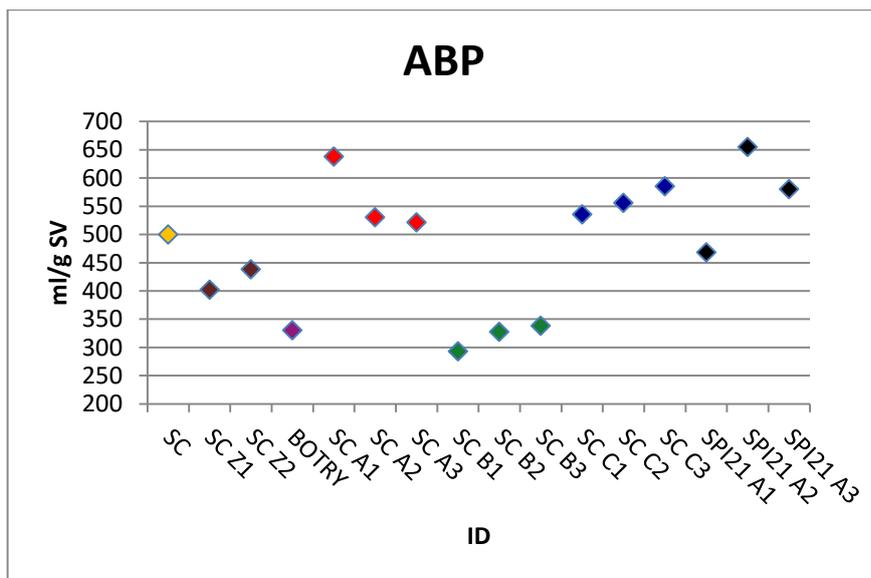


Figura 11. Valori di ABP (ml/g SV) delle diverse specie testate.
(SC:Scenedesmus dimorphus, BOTRY:Botryococcus braunii, SPI21: Arthrospira platensis)

Dati riportati da Mussnug et al. (2010) evidenziano che la produzione di biogas è dipendente dal ceppo selezionato, come anche qui ottenuto. Inoltre, nei lavori di Schievano e al. (2008) si riporta che l'ABP dipende non solo dal contenuto di SV, ma anche dalla composizione e qualità della matrice utilizzata. In questa ricerca, dai risultati relativi ai diversi ceppi sperimentati, si osserva una diversa capacità di produzione di biogas nelle varie colture; il valore di ABP oscilla tra 292,64 e 637,74 mL/g SV, a seconda della specie utilizzata. Nella figura 12 sono state riportate le medie degli ABP ottenuti per alcune delle colture microalgali e le corrispondenti deviazioni standard con n=3.

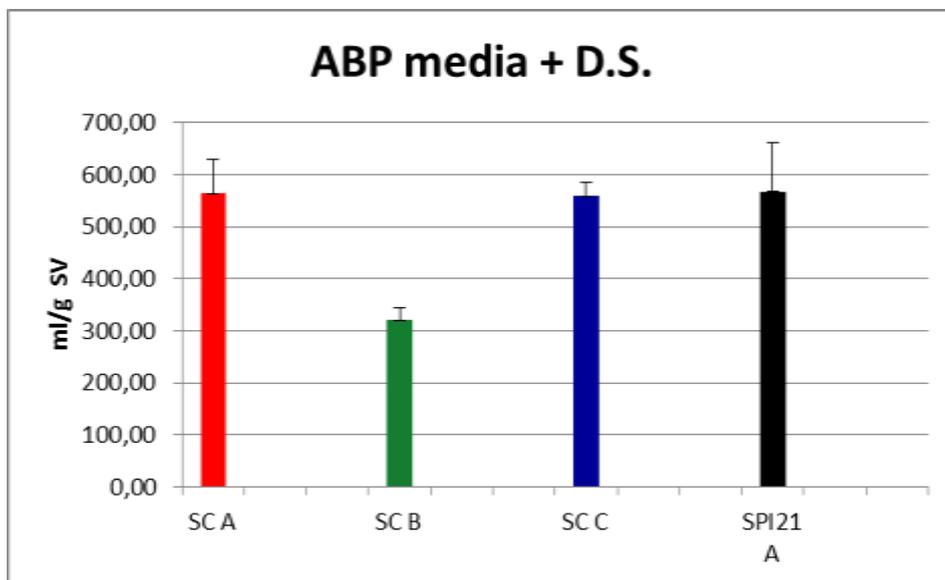


Figura 12. Media di ABP e rispettive deviazioni standard di diverse colture microalgali

Da riscontri in letteratura su sperimentazioni effettuate su varie specie (Grima M. et al., 2003; Mussnug et al., 2010; Tredici, 2010; Dębowski et al., 2013), si riconosce la biomassa microalgale come una fonte rinnovabile innovativa di substrato per la produzione di biogas.

Analizzando i dati ottenuti durante gli esperimenti e rivedendo l'esperienza pratica realizzata con la tecnica SOUR, sono emerse le seguenti considerazioni:

- ✓ Dalle osservazioni delle prove fatte sulla separazione della biomassa, si è verificato che il sistema del cestello metallico risulta il più idoneo per contenere il campione essiccato in soluzione nella beuta, evitandone la perdita per accumulo sul collo della beuta.

- ✓ Nell' articolo di Mussnug et al.(2010), le diverse specie microalgali studiate per la determinazione del potenziale di biogas, venivano raccolte mediante centrifugazione e il contenuto di biomassa concentrato nel pellet, veniva determinato mediante successiva essiccazione a 105°C per 24 ore.
Nel presente caso, si è osservato che sottoponendo una coltura microalgale a centrifugazione, prima dell'essiccazione a 105°C, si elimina l'eccesso di acqua presente al suo interno e si concentrano anche eventuali sospensioni extracellulari sotto forma di mucillagini che invece potrebbero non ritrovarsi con una semplice decantazione. La centrifugazione quindi, permette una maggiore concentrazione della biomassa utile per la determinazione del potenziale di biogas complessivo.
- ✓ Dalla figura 12, nella quale sono rappresentate le medie di ABP e le relative deviazioni standard, si può dedurre che l'efficienza della tecnica SOUR possa essere valutata considerando proprio i valori delle deviazioni standard. Un basso valore di deviazione standard può dunque essere considerato un indice di migliore efficacia del metodo e di migliore ripetitività e costanza dei risultati.

Partendo da queste considerazioni e dagli studi tuttora in corso, si è arrivati a definire un protocollo standard che ha fornito risultati da considerare soddisfacenti. Tuttavia, rimane la necessità di confrontare tali risultati con tecniche già consolidate.

A questo riguardo sono in programma prove che utilizzano la biomassa microalgale come substrato per il test BMP (dall'acronimo inglese Biochemical Methane Potential), con il quale si intende un test biochimico che fornisce indicazioni sulla biodegradabilità anaerobica di un substrato e del suo potenziale di metano in condizioni di laboratorio. Il BMP esprime la quantità di biogas/metano potenzialmente ottenibile dalla degradazione di una biomassa, ed è espresso come Nm³/kgSV (ovvero normal metri cubi di biogas o metano per kg di solidi volatili). Schievano et al. (2008) hanno infatti scoperto una correlazione altamente significativa fra la domanda specifica di ossigeno di una matrice per 20 ore a 37°C in condizioni aerobiche dinamiche e la sua produzione di biogas in condizioni anaerobiche in 60 giorni.

Sialve e al. (2009) sostengono che l'uso della fermentazione per ottenere metano è uno tra i metodi più efficaci per lo sfruttamento di energia da biomassa microalgale.

L'esperimento in programma sarà condotto mediante l'impiego dell' AMPTS II (Automatic Methane Potential Test System), un dispositivo analitico di nuova progettazione sviluppato dalla Bioprocess Control (Svezia). Tale dispositivo consente di effettuare misure continue, mediante reattori batch termostatati e agitati, dei flussi e delle quantità cumulate di biometano prodotte dalla digestione anaerobica di substrati biologici degradabili.

Il test ha una durata di circa 60 giorni.

Alla fine dell'esperimento si analizzeranno i dati ottenuti. Dalle comparazioni con tale metodica, si cercherà un riscontro dei risultati ottenuti tramite la tecnica SOUR in modo da utilizzare quest'ultima con i vantaggi che ne conseguono, soprattutto in termini di risparmio temporale, in ricerche future per lo studio del potenziale di biogas a partire da biomasse microalgali.

3. Tecniche di separazione biomassa/mezzo di coltura

3.1. Decantazione

La decantazione è la tecnologia più semplice e meno costosa economicamente, basandosi semplicemente sulla forza di gravità. Non tutte le microalghe rispondono allo stesso modo, vuoi per la tipologia cellulare (ad esempio presenza di raggi o spine o presenza di flagelli e nuoto autonomo), vuoi per ragioni di fisiologia interna e di risposte diversificate all'ambiente di crescita. E' stata impiegata per concentrare lo *Scenedesmus* nell'annata precedente con rendimenti alterni e non particolarmente efficienti in termini di separabilità, nel complesso. Anche i primi due dei cicli in vasca analizzati quest'anno sono stati separati in questo modo.



Figura 13. Decantato algale in vasca e raffronto visivo tra decantato e risulta

3.2. Filtrazione a membrana

La filtrazione a membrana avviene facendo passare la soluzione da separare internamente a tubicini di materiale poroso di diversa natura, come ceramica, ossido di titanio, zirconia, polimeri, in cui il permeato o risulta va tangenzialmente al flusso dall'interno del tubo verso l'esterno del tubo, mentre il concentrato o filtrato rimane all'interno del tubo, con una serie di passaggi ripetuti e l'immissione, attraverso una alimentazione generalmente associata ad una pompa per liquidi, di sempre nuovo liquido da filtrare. E' un procedimento piuttosto dispendioso energeticamente a causa della necessità di una pompa da far girare in continuo e di un sistema di raffreddamento, ma garantisce una ottima efficienza di separazione.



Figura 14. Apparato per filtrazione a membrana e raffronto visivo tra filtrato e risulta

3.3. DAF - Dissolved Air Flotation o Flottazione

Questa è una tecnica di separazione impiegata principalmente nel trattamento dei reflui civili o zootecnici. Consiste nell'immissione in pressione, in una data massa di reflu da trattare, di una mistura di acqua e micro bolle d'aria, a cui, nel movimento di queste ultime dal basso verso l'alto, aderiscono le micro particelle contenute nel reflu. Si avrà pertanto uno strato galleggiante composto di particelle adese a micro bolle, che si può facilmente raccogliere con procedimenti meccanici e separare dal resto. Per facilitare il processo possono venire immessi precedentemente al trattamento dei tensioattivi specifici per differenti tipologie di reflu, generalmente distinti in anionici e cationici. Previa prove preliminari effettuate in laboratorio, effettuate con la collaborazione della ditta ISPA srl e visti i buoni risultati ottenuti, ci si è forniti di un impianto pilota, arrivato però in tempi di ultimazione del progetto. Ci si riserva perciò di inviare successivamente risultati operativi, al momento ancora da ottenere.

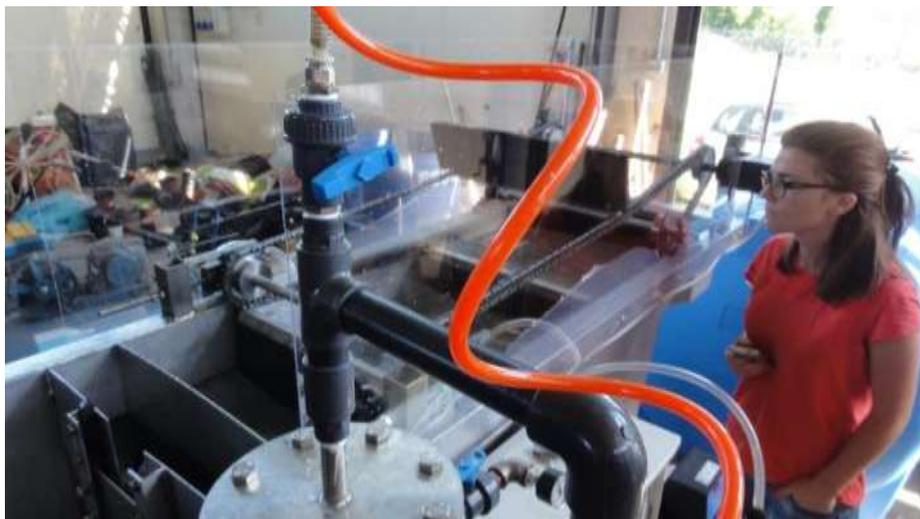


Figura 15. Due visuali del flottatore in funzione presso ENEA

4. Bilanci economico/produttivi

4.1. Calcoli per ciclo produttivo

Tenuto conto di una produzione media per ciclo di ca 0,24 g/L determinata come media fra i risultati delle annate 2014 e 2015, (biomassa microalgale secca per litro di volume) si ottengono produzioni per vasca per ciclo di ca 0,33 kg. Secondo le stime ottenute con la su riportata tecnica SOUR, da 1 kg di biomassa secca di *Scenedesmus* è possibile ricavare ca 600 L di biogas. Quindi da un ciclo produttivo su 1500 L si possono ricavare 0,2 m³ di biogas. Da 1 m³ di biogas si ricavano 1,8-2 kWh elettrici più 2-3 kWh termici. Quindi ca 5 kWh complessivi. Pertanto da un ciclo produttivo in vasca da 1500 L si potrà ricavare ca 1 kWh. Al costo di 0,2 €/kWh il ricavo per ciclo produttivo è di 0,2 euro. In termini di mancata spesa c'è da considerare quella relativa al digestato (ca 1,5 kg per ciclo) che usualmente viene sparso su terreno agricolo al costo di 3,5 €/t e quella della CO₂ sottratta all'atmosfera con la fotosintesi. Prendendo in considerazione invece il dato produttivo migliore ottenuto nelle tre annate di 1,29 g/L (in un sacco da 25 L, annata 2013) si ottiene un ricavo teorico di 1,18 euro per ciclo produttivo da 1500 L.

4.2. Costi di impianto e costi di gestione

L'argomento costi può essere affrontato distinguendo tra costi di impianto e costi di gestione. I nostri costi di impianto sono stati molto modesti in quanto abbiamo usufruito dell'intelaiatura metallica di una serra a tunnel dismessa, che abbiamo riadattato e fornito di telo plastico trasparente coprente, oltre che di telo ombreggiante mobile. Per le vasche, abbiamo utilizzato piscine plastiche fuori terra con intelaiatura metallica, di dimensioni 3x2x0,66 metri. Le abbiamo munite di un divisore centrale in policarbonato lamellare trasparente munito di staffe metalliche di supporto, che consentiva la creazione di una corrente circolare all'interno delle vasche. La movimentazione dell'acqua di coltura veniva effettuata tramite due sistemi diversi:

- il primo facente uso di un airlift a piano inclinato, realizzato con un foglio di policarbonato trasparente sostenuto in posizione inclinata da supporti metallici e munito di un tubo forato alla base per la fuoriuscita delle bolle d'aria. L'aria compressa era fornita da una soffiante da 360 W che alimentava anche altre utenze.
- Il secondo utilizzava una ruota a pale con motorino elettrico annesso (agitatore a pale) da 40 W a 12 Volt.

Entrambi i sistemi sono stati ideati e realizzati internamente in ENEA. I costi di impianto riferiti a tre anni di attività in una serra da 120 m² sono riportati nella tabella 4.

Tabella 4. Costi di impianto

Elemento	Costo unitario (€)	Numero di elementi	Costo totale (€) IVA compresa
Telo copertura serra	200	2	400
Telo ombreggiante	100	2	200
Vasca 3x3x0,66 m	90	3	270
Divisore centrale	40	3	120
Airlift	40	2	80
Agitatore a pale con motore elettrico	380	1	380
Soffiante x aria compressa	400	1	400
Serbatoio x trasporto filtrazione	200	1	200
Totale IVA compresa			2050

I costi gestionali comprendono elettricità, acqua, reagenti (ipoclorito di sodio, sodio tiosolfato), polietilene per i fotobioreattori a sacco utilizzati per inoculi, materiale di ferramenta, costi di personale.

In tabella 5 vengono riportati i costi gestionali, con esclusione dei costi di personale, per singolo ciclo colturale e per mese di attività, considerando in questo ultimo caso un utilizzo teorico su 100 m² (25 m³ di volume) di vasche a pieno regime.

Tabella 5. Costi gestionali. ND= non determinato

Elemento	Costo per singolo ciclo da 1,5 m ³ (quantità)	Costo per singolo ciclo (€)	Costo mensile (ipotesi produttiva su 100 m ²)
Elettricità per agitazione	0,04 kWh x 10 die= 9,6 kWh	1,92€ (0,2 €/kWh)	96 €
Acqua (coltura e pulizia)	1600 L	ND	ND
Reagenti x sterilizzazione chimica acqua	0,6 € ipo + 75 g tio = ca 0,9 €	0,9€	45 €
Polietilene x PBR inoculo	100 g 0,3 €	0,3 € (3 €/kg)	15 €
Filtrazione (membrana)		ND	
Decantazione	2000 kW x 0,5 h	0,2 €	10 €
DAF - Flottazione	ND	ND	
Personale	5 ore/uomo ogni 10 giorni	ND	100 ore/uomo
Totali		3,32 €	166 €
Ricavo teorico massimo		1,18 €	59 €

La tabella 5 comprende la prima colonna da sinistra con l'identificazione dei singoli elementi di costo, la seconda con i costi per ciclo di coltura in termini di unità di misura e relativa quantità, la terza il costo per singolo ciclo in euro. L'acqua non è stata conteggiata in quanto di approvvigionamento interno ENEA. Come metodo di separazione si è preso a riferimento la decantazione in quanto degli altri due metodi non si conoscono ancora con precisione i consumi. I totali sono al netto delle spese di personale, nel presente caso già incluse nel normale stipendio ENEA.

Oltre a queste colonne, se ne riporta una quarta con una visione ipotetica ma realistica, basata sull'esperienza operativa realizzata ma più orientata verso una dimensione produttiva. Tale visione prevede un utilizzo ottimale degli spazi di una serra da 120 m² di m 15x8, per ospitare vasche per una superficie totale di 100 m², pari a un volume utile di 25 m³. Quindi il rapporto è di 1:16,66 (m³) x 3 (cicli mensili) ovvero 1:50. Infine, come si vede, c'è un rapporto di ca 2,8:1 fra costi di gestione e ricavo teorico massimo.

5. Conclusioni

Aspetti favorevoli

- Le prove in vasca realizzate nell'ultimo anno dell'accordo di programma hanno fornito rese inferiori a quanto ottenuto in precedenza. Si ritiene che tale decremento di produzione sia da imputare da una parte all'impiego di inoculi generalmente meno densi; inoltre all'uso di digestato di qualità inferiore come fertilizzante. Altra condizione meno favorevole può essere ricercata nelle alte temperature medie raggiunte in questa annata, eccezionale da questo punto di vista, anche se l'impiego di misure per evitare innalzamenti eccessivi nelle colture, come l'utilizzo di teli ombreggianti, ha evitato morie da alte temperature.
- E' stata in buona parte messa a punto una metodica analitica per stabilire la potenzialità in biogas di alcune specie microalgali, mediante la procedura SOUR. Occorre tuttavia ancora confrontare i risultati raggiunti con metodiche già consolidate, ma più impegnative in termini di lunghezza dei tempi di analisi.
- E' stata testata una tecnologia di separazione tra biomassa e mezzo di coltura non impiegata in precedenza, ovvero la filtrazione tramite membrane, grazie alla disponibilità di strutture specifiche messe gentilmente a disposizione da altra unità ENEA. Tale tecnologia, meno onerosa anche in termini di lavoro fisico rispetto alla precedentemente usata decantazione, ha fornito risultati molto soddisfacenti in termini di efficacia di separazione, mentre dal punto di vista dei costi di gestione sembra essere non particolarmente favorevole.
- Ci si è forniti peraltro di un nuovo sistema di separazione che ha già dato alcune indicazioni favorevoli su test preliminari di laboratorio, effettuati con la collaborazione della ditta ISPA S.r.l., ovvero la flottazione o DAF. Ci si riserva di comunicare gli esiti di prove da condurre oltre la scadenza contrattuale di quest'anno.

Aspetti critici

- E' stata confermata la necessità di controllare lo sviluppo in particolare di larve di insetti chironomidi tubicole, filtratrici, note come "vermetti rossi", che possono determinare la scomparsa delle microalghie in fase matura nel giro di 3-4 giorni, trasformando la biomassa vegetale in biomassa animale.
- A fronte dei dati raccolti e analizzati per ottenere dei bilanci economico/produttivi, è emersa una netta inadeguatezza all'utilizzo proposto delle metodiche di coltivazione e di successivo filtraggio, nonché della specie microalgale utilizzata, lo *Scenedesmus dimorphus*, che pure risulta fra le migliori specie di acqua dolce in termini di produttività e rusticità, in quanto le spese necessarie per la sua produzione sono risultate decisamente superiori ai ricavi energetici in termini di biogas potenzialmente ottenibile. Nel migliore dei casi si è giunti a rapporti di 2,8:1 tra spese di gestione e ricavi.

In particolare, i processi da rivedere con maggiore attenzione dal punto di vista economico sono :

1. La disinfezione dell'acqua iniziale a base di ipoclorito e di tiosolfato. Probabilmente un trattamento a base di raggi UV sarebbe più economico.
2. Le spese energetiche per l'agitazione dell'acqua. Necessitano altri sistemi più efficienti rispetto a quelli impiegati, probabilmente anche tramite accensioni intermittenti temporizzate.
3. La filtrazione. Occorre verificare operativamente i costi energetici della flottazione, che dovrebbero essere ben inferiori rispetto alla tecnologia a membrana. La decantazione, sebbene sia la tecnica meno costosa, comporta efficienze di separazione non ottimali e anche poco prevedibili.

6. Riferimenti bibliografici

- Amaro M. H., Guedea C. A., Malcata X. F. (2011) “Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel”. *Applied Energy*, 88 3402-3410.
- Barbato F., Campiotti C.A, Giagnacovo G. et altri. (2012) “Sfruttamento delle microalghe tra realtà e prospettive”.
- Barbato F.(2009) Tecniche di coltura di microalghe. ENEA/TB04/01/2009 Technology Briefs ENEA. http://old.enea.it/produzione_scientifica/pdf_brief/Barbato_Microalghe.pdf
- Borowitzka M.A.. (1999) Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*,70(1-3):313–321.
- Brennan L., Owende P. (2010) Biofuels from microalgae. A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14, 557-577.
- Chisti Y. (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25, 294-306.
- Dębowski Marcin, Marcin Zieliński, Anna Grala n, Magda Dudek. (2013) Algae biomass as an alternative substrate in biogas production technologies—Review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 27 596–604.
- Demirbas A. (2011) Production of Biodiesel from Algae Oils, *Energy Sources, Part A*, 31, 163-168.
- Fernandez-Reiriz M.J., Perez-Camacho A., Ferreiro M.J., Blanco J., Planas M., Campos M.J., Labarta U. (1989) – Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. *Aquaculture* 83: 17-37.
- Gilbert R., Perl A.(2008) Transport revolutions: moving people and freight without oil, Earthscan,
- Grima E. M., Belarbi E.H., Fernández F.G, Robles A. M., and Chisti Y.. (2003) Recovery of micro algal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances*, 20(7-8):491–515.
- Gunaseelan, V.N. (1997) Anaerobic digestion of biomass for methane production: a review. *Biomass and bioenergy*, Vol. 13, Nos. 1/2, pp. 83-114,
- Jourdan J.P. (1999) *Cultivez votre spiruline*, edition Antenna Technology, Genève, Suisse.
- Komerath N. M., P. P. Komerath .(2011) Terrestrial Micro Renewable Energy Applications of Space Technology, *Physics Procedia*, 20 255-269.
- Kunjapur A.M., Eldridge R.B. (2010) Photobioreactor Design for Commercial Biofuel Production from Microalgae. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 49, 3516-3526.
- Lasaridi K. E., Stentiford E. I. (1998) A simple respirometric technique for assessing compost stability. *Water Research (Oxford)* n°32 (12); pag 3717-3723.
- Lund J.W.G., Kilpling C., Le Cren E.D. (1958) - The inverted microscope method of estimating algal numbers, and the statistical basis of estimation by counting. *Hydrobiologia*, 11 (2): 143–170.
- Mata T.M., Martins, A.A. e N.S. Caetano. (2009) “Microalgae for biodiesel production and other applications: a review”. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 217-232.
- Mussgnug J.H., Klassen V., Schlüter A., Kruse O.. (2010) Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *Journal of Biotechnology* 150 51–56.
- Passos F., Uggetti E., Carrère H. , Ferrer I. *Bioresource Technology* 172 (2014) Pretreatment of microalgae to improve biogas production: A review, 403–412,
- Pignatelli V.(2008) Biocarburanti: presente e futuro. Enea per la stampa <http://titano.sede.enea.it/Stampa/skin2col.php?page=eneaperdettagliofigli&id=169>
- Paul C., Min M., Yifeng C., Liang W., Yecong L., Qin C., Chenguang W., Yiqin W., Xiaoquan W., Yanling C., Shaobo D., Hennessy K., Xiangyang L., Yuhuan L., Yingkuan W., Martinez B., Ruan R. (2009) Review of the biological and engineering aspects of algae to fuels approach. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering* 2: 1-30
- Pulz, O.; Gross, W. (2004) Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65, 635–648.
- Rapporto Energia e Ambiente ENEA 2013:
<http://www.enea.it/it/produzionescientifica/pdfrea/REAScenariestrategie2013.pdf>

- Rodolfi L., Chini Zittelli G., Bassi N., Padovani G., Biondi N., Bonini G., Tredici M.R. (2009). Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor, *Biotechnol Bioeng.* 102(1), 100-12;
- Saifullah A. Z. A., Md. Karim A., Ahmad-Yazid.(2014) Microalgae: An Alternative Source of Renewable Energy, *American Journal of Engineering Research.*
- Schievano A., Pognani M., D'Imporzano G., Adani F. (2008). Predicting anaerobic biogasification potential of ingestates and digestates of a full-scale biogas plant using chemical and biological parameters. *Bioresource Technology*, in press.
- Sialve B., Bernet N., Bernard O. (2009) Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnol. Adv* 27, 409–416.
- Spolaore P., Joannis-Cassan C., Elie Duran, and Arsène Isambert.(2006) Commercial Applications of Microalgae: Review. *Journal of bioscience and bioengineering - Vol. 101, No. 2*, 87–96.
- Tredici M. R. (2010) Photobiology of microalgae mass cultures: understanding the tools for the next green revolution. *A review* 1(1), 143–162
- Ugwu C.U., Aoyagi H., Uchiyama H. (2008) Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology* 99 4021–4028.
- Verma M.N., Mehrotra S., Shukla A., Mishra B.N (2010) Prospective of biodiesel production utilizing microalgae as the cell factories: a comprehensive discussion. *African Journal of Biotechnology* 9: 1402-1411.
- Voronova E.N., Konyukhov I. V., Kazimirko Y.V., Pogosyan S.I., Rubin A.B. - (2009) Changes in the condition of photosynthetic apparatus of a diatom alga *Thalassiosira weissflogii* during photo adaptation and photo damage. *Russian Journal of Plant Physiology* 56: 753–760.
- www.agienergia.it (Dati Terna S.p.A)
- Ward A.J., Lewis D.M. , Greenb F.B.. (2014) Anaerobic digestion of algae biomass: A review *Algal Research* 5 204–214
- You-Chul J., Chul-Woong C., Yeoung-Sang Y. (2005) - Measurement of micro algal photosynthetic activity depending on light intensity and quality. *Biochemical Engineering Journal* 27: 127-131.