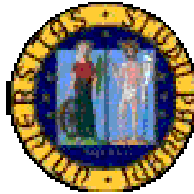


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA INDUSTRIALE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN INGEGNERIA CHIMICA E DEI PROCESSI INDUSTRIALI



**Tesi di Laurea Magistrale  
in Ingegneria Chimica e dei Processi Industriali**

**IMPIEGO DEL PERCOLATO DI DISCARICA COME FONTE  
DI NUTRIENTI PER LA COLTIVAZIONE DI MICROALGHE:  
SPERIMENTAZIONE E SIMULAZIONE DEL PROCESSO**

*Relatore: Prof. Alberto Bertucco*

*Correlatore: Ing. Elena Barbera*

*Dott. Eleonora Sforza*

*Laureando: ROBERTO RINALDI*

Anno Accademico 2015-2016



# Riassunto

In questa tesi si è affrontato il problema dell'impiego di un percolato di discarica come terreno per la coltivazione di microalghe (nello specifico *Acutodesmus obliquus*), al fine di ridurre la concentrazione di inquinanti in esso presenti.

Il processo esaminato prevede dapprima un pretrattamento fisico del percolato in particolari serre, da cui si ottiene un 50% in volume di acqua ricca di N ammoniacale. Gli esperimenti svolti hanno avuto lo scopo di verificare le capacità dell'alga di crescere a spese dell'azoto presente in questa soluzione. Si sono effettuate delle prove sperimentali di crescita microalgale in terreni di coltura composti dal percolato, dall'acqua ricca di N ammoniacale e dalla combinazione di percolato ed acqua ammoniacale. Con queste ultime due soluzioni sono state effettuate anche delle prove in reattore continuo.

I dati raccolti sperimentalmente hanno permesso d'impostare, mediante l'impiego di Aspen Plus<sup>TM</sup>, un modello per la simulazione di un processo in cui si ottengono contemporaneamente la crescita microalgale e il consumo dei nutrienti nell'acqua prodotta dal pretrattamento del percolato.



# Sommario

<b>INTRODUZIONE .....</b>	<b>1</b>
<b>CAPITOLO 1 - Normative e stato dell'arte sul trattamento del percolato .....</b>	<b>3</b>
1.1 Richiami alle normative principali .....	3
1.2 Il problema del percolato da discarica .....	5
1.3 Un sistema innovativo per il pretrattamento dei percolati.....	6
1.4 Microalghe e trattamento delle acque.....	7
1.4.1 Sistemi di coltivazione .....	9
1.5 Microalghe e il percolato da discarica .....	10
1.6 Scopo della tesi .....	12
<b>CAPITOLO 2 - Materiali e Metodi .....</b>	<b>15</b>
2.1 Specie algale e sistemi di crescita.....	15
2.2 Terreni di coltura .....	16
2.2.1 BG11 .....	16
2.2.2 Percolato .....	18
2.2.3 Acqua SOLWA .....	19
2.4 Metodi analitici per misurare la crescita microalgale.....	20
2.4.1 Conta cellulare .....	20
2.4.2 Densità ottica OD.....	21
2.4.3 Peso secco .....	22
2.5 Metodi analitici per misurare i nutrienti .....	23
2.5.1 Caratterizzazione del fosforo .....	23
2.5.2 Caratterizzazione dell'azoto.....	24
<b>CAPITOLO 3 - Risultati sperimentali .....</b>	<b>27</b>
3.1 Curva di controllo .....	27
3.2 Caso A: crescita in percolato .....	28
3.3 Caso B: crescita in acqua Solwa.....	30
3.4 Caso B2: crescita in acqua SOLWA con percolato.....	34
3.5 Esperimenti in continuo.....	38
3.5.1 Continuo in acqua Solwa con 1:20 di percolato .....	39

3.5.2 Continuo in acqua Solwa con aggiunta dei nutrienti del BG11 standard .....	41
<b>CAPITOLO 4 - Schema e simulazione di processo .....</b>	<b>43</b>
4.1 Simulazione dell'acqua SOLWA .....	43
4.2 Simulazione del processo di crescita .....	47
4.2.1 Componenti convenzionali e non convenzionali .....	47
4.2.2 Definizione del reattore e del layout .....	49
4.2.3 Riciclo e design specification .....	51
4.2.4 Risultati .....	51
<b>CONCLUSIONI .....</b>	<b>55</b>
<b>RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.....</b>	<b>57</b>

# Introduzione

Il percolato di discarica costituisce un problema ambientale rilevante al giorno d'oggi, poiché la sua produzione dalle discariche esistenti si aggira sul miliardo di ton/anno in Europa e di circa 400000 ton/anno solo in Veneto. La ricerca di soluzioni alternative per un corretto smaltimento di rifiuti come questo è sempre più incoraggiata, soprattutto nel caso in cui un rifiuto potrebbe diventare una materia prima per altri processi.

All'interno di quest'ottica si è voluto verificare la possibilità di impiego del percolato come fonte di nutrimento nella crescita delle microalghe, delle quali è già stata dimostrata l'efficacia nel trattamento delle acque reflue. In questo modo si otterrebbero simultaneamente nello stesso processo lo smaltimento di un rifiuto speciale e la produzione di biomassa algale, dalla quale è poi possibile ricavare, ad esempio, i lipidi necessari per la produzione di biodiesel. L'uso delle microalghe per ridurre la concentrazione di particolari inquinanti si può inserire in processi già esistenti; in questo caso lo scopo è stato di analizzare le potenzialità di una microalga come *Acutodesmus obliquus*, isolata in un ambiente di discarica, nel rimuovere l'azoto ammoniacale presente nell'acqua derivante dal pretrattamento fisico sul percolato condotto attraverso le serre della società SOLWA Srl di Marghera VE.

La tesi è articolata in quattro capitoli.

Nel primo si riportano le norme in vigore sugli scarichi industriali in acque superficiali, sulla gestione delle discariche, nonché quelle riguardanti il percolato. Successivamente si descrive il sistema innovativo per il pretrattamento di questo rifiuto messo a punto da SOLWA. Infine si riassume lo stato dell'arte sull'utilizzo delle microalghe come mezzo di depurazione delle acque reflue e del percolato.

Nel secondo capitolo si riportano le metodologie sperimentali utilizzate. In particolar modo si caratterizzano le qualità del percolato, dell'acqua che ne deriva dal pretrattamento e si descrive il metodo utilizzato per ricavarla in laboratorio.

Nel terzo capitolo si riportano i risultati sperimentali ottenuti nella coltivazione di *Acutodesmus obliquus* nei foto bioreattori seguendo tre approcci diversi, che si diversificano per il terreno di coltura utilizzato: percolato tal quale, acqua SOLWA e la loro combinazione. Per gli ultimi due casi, oltre ai consueti esperimenti in *batch*, si presentano e discutono anche i risultati ottenuti in un sistema di coltivazione in continuo.

Infine, nel quarto capitolo è riportata la costruzione di un flowsheet per ottenere, con l'uso di Aspen Plus<sup>TM</sup>, la simulazione di un processo di produzione microalgale in continuo, considerando il consumo degli inquinanti presenti nel terreno alimentato, in modo da riprodurre i valori misurati sperimentalmente.

Si desidera ringraziare SOLWA per aver collaborato ai fini della stesura di questa tesi. In particolar modo il Dr. Paolo Franceschetti per le sue competenze e per avermi dato la possibilità di conoscere una tecnologia innovativa. Inoltre si ringrazia la Dott.ssa Sara Canella per la sua gentilezza e la cura avuta nell'aspetto organizzativo.



# Capitolo 1

## Normative e stato dell'arte sul trattamento del percolato

In questo primo capitolo si riporteranno le principali norme in vigore sugli scarichi industriali in acque superficiali e sulla gestione di un rifiuto speciale come il percolato di discarica. ai fini dello studio svolto in questa tesi, si descrive il sistema innovativo per il pretrattamento di questo rifiuto messo a punto da SOLWA. Infine si vuole

### 2.1 Richiami alle normative principali

Il *d.lgs. del 26 Aprile 2006, n.152* ha portato diversi cambiamenti in materia ambientale, riguardanti le regole sulla valutazione di impatto ambientale, difesa del suolo, tutela delle acque, gestione dei rifiuti, riduzione dell'inquinamento atmosferico e risarcimento dei danni ambientali. Inoltre sono state abrogate molte delle norme preesistenti.

Le caratteristiche dello scarico delle acque, dopo i trattamenti di tipo biologico studiati in questa tesi, devono essere conformi ai valori di riferimento che si trovano in tabella 3 nell'allegato 5, parte terza, del D. Lgs 152/06, e riportati in parte nella seguente tabella (Tab. 1.1).

**Tabella 1.1.** Valori di legge per lo scarico industriale in acque superficiali e in fognatura(d.lgs. 152/06).

Parametri	U.M.	Scarico in acque superficiali (limite massimo)	Scarico in rete fognaria (limite massimo)
pH	unità	5,5-9,5	5,5-9,5
Solidi sospesi totali	mg/L	80	200
C.O.D. (come O <sub>2</sub> )	mg/L	160	500
#B.O.D.5 (come O <sub>2</sub> )	mg/L	40	250
Solfati (come SO <sub>4</sub> )	mg/L	1000	1000
Cloruri	mg/L	1200	1200
Azoto ammoniacale (come N)	mg/L	11,67	23,3
Azoto nitroso (come N)	mg/L	0,6	0,6
Azoto nitrico (come N)	mg/L	20	30
Fosforo totale (come P)	mg/L	10	10
Ferro	mg/L	2	4
Rame	mg/L	0.1	0,4
Zinco	mg/L	0.5	1
Piombo	mg/L	0.2	0,3
Alluminio	mg/L	1	2
Cadmio	mg/L	0.02	0,02
Cromo totale	mg/L	2	4
Nichel	mg/L	2	4
Tensioattivi Totali	mg/L	2	4
Grassi e olii animali/vegetali	mg/L	20	40
Idrocarburi totali	mg/L	5	10

Nell'allegato D, parte quarta, del D. Lgs 152/06 viene esplicitato l'indice dei rifiuti, i quali vengono identificati con un codice a sei cifre. Il percolato è inserito nella classe diciannove, che identifica i "Rifiuti prodotti da impianti di trattamento dei rifiuti, impianti di trattamento delle acque reflue fuori sito, nonché dalla potabilizzazione dell'acqua e dalla sua preparazione per uso industriale".

Per trovare la definizione di "percolato" si deve richiamare il D. Lgs. 36/03, in cui si attua la direttiva 1999/31/CE relativa alle discariche di rifiuti. Questo documento regola la gestione operativa e post operativa delle discariche, regolandone anche la progettazione.

## **1.2 Il problema del percolato da discarica**

Ai fini del D. Lgs. 36/03 con il termine “percolato” si intende: un liquido che si origina prevalentemente dall'infiltrazione di acqua nella massa dei rifiuti o dalla decomposizione degli stessi.

In base al suddetto decreto, il percolato e le acque di discarica devono essere captati per tutto il tempo di vita della discarica e per un ulteriore periodo non inferiore ai trent'anni successivi alla chiusura definitiva dell'impianto.

Il percolato costituisce un problema rilevante al giorno d'oggi, poiché la sua produzione si aggira sul miliardo di ton/anno in Europa e di circa 400000 ton/anno in Veneto (Solwa Srl). Le principali problematiche connesse al liquame sono l'alto impatto ambientale e le difficoltà gestionali, associate ai relativi derivati dal trattamento necessario.

Il percolato utilizzato in questo lavoro è stato prelevato presso la discarica di Tre Punte, nella località di Lovadina (TV). L'attività di questa discarica ha previsto fino al '99, anno di chiusura dell'area, la raccolta ed il conferimento di rifiuti solidi urbani; attualmente il sito viene gestito dalla Contarina SpA di Lovadina Spresiano (TV), che opera controlli semestrali sul percolato, in regola con ciò che è riportato nella tabella 2 dell'allegato 1 del D. Lgs. 36/03. Una questione importante nella progettazione delle discariche è limitare la quantità di acqua meteorica che penetra nel corpo della discarica stessa. Il sito di Tre Punte, con la sua scarsa impermeabilizzazione del capping, presenta questo problema, che comporta un percolato variabile nel tempo e soggetto alle condizioni esterne.

Attualmente il percolato aspirato, attraverso pompe ad immersione, viene stoccato all'interno di bacini sopra terra in attesa di essere smaltito in impianti preposti allo scopo. Periodicamente, attraverso l'uso di autopompe, esso viene trasportato in impianti di depurazione delle acque autorizzati al trattamento dei rifiuti speciali. Qui subisce un trattamento di nitrificazione e denitrificazione di tipo biologico. In alternativa, una delle pratiche più comuni consiste nel ricircolo del percolato all'interno della discarica che, una volta selezionati i giusti volumi e percentuali di ricircolo, ne incrementa la qualità. Altri metodi chimici e fisici usati per il trattamento dei percolati, includono l'ossidazione chimica, adsorbimento, coagulazione / flocculazione e aria di strippaggio, che risultano però molto costosi.

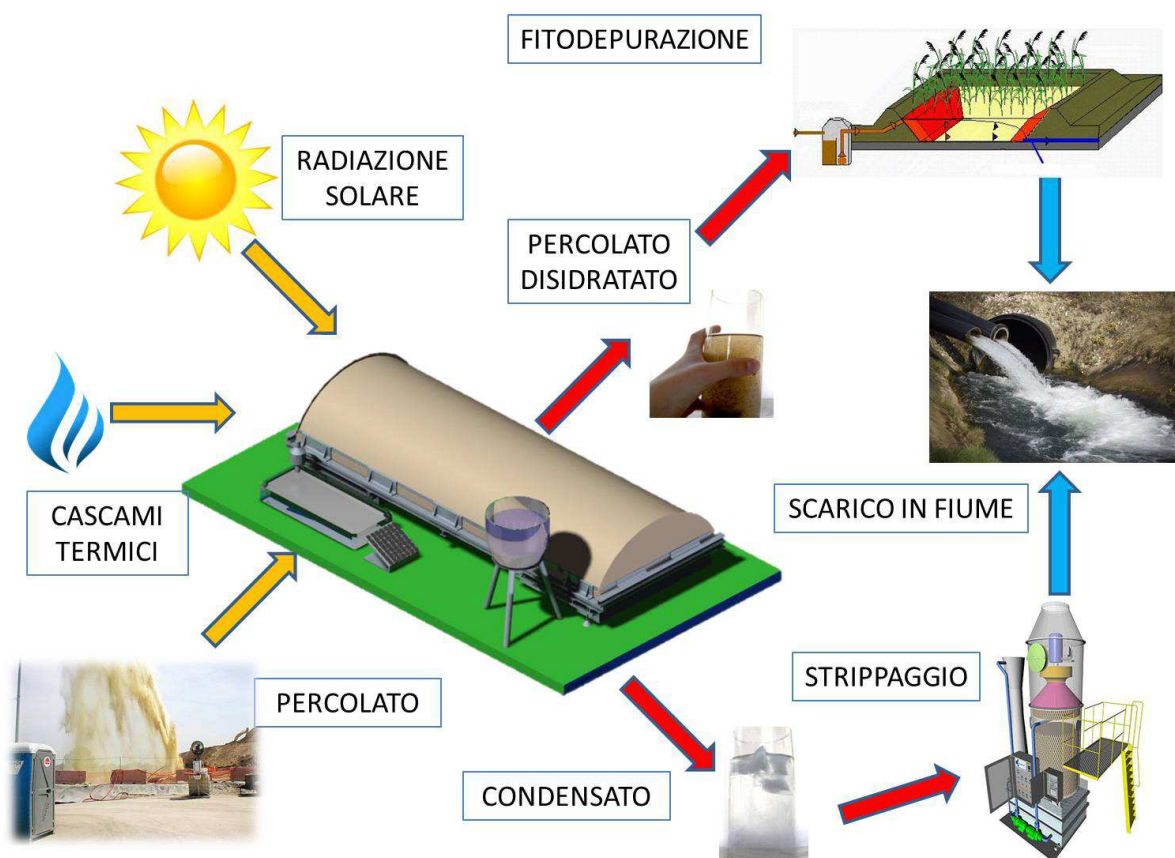
In uno scenario ideale, il trattamento del percolato dovrebbe essere caratterizzato da limitati costi di gestione e manutenzione, grazie ad un impianto autonomo, semplice da collocare presso le discariche.

### 1.3 Un sistema innovativo per il pretrattamento dei percolati

Un sistema per il pretrattamento del percolato che risponde con successo alle problematiche descritte in precedenza è rappresentato dalle “serre SOLWA”. SOLWA Srl propone infatti di sfruttare le serre solari, secondo un processo in cui, sfruttando la radiazione solare, all’incirca metà del volume di acqua viene evaporato e successivamente condensato. Tale processo consente di dimezzare dunque il volume del percolato da trattare, allo stesso tempo concentrando nell’acqua estratta quasi tutto l’azoto, in forma ammoniacale.

Attualmente, l’uso di queste serre s’inserisce in uno schema d’impianto (Fig. 1.1) in cui il percolato concentrato, con un adeguato rapporto C/N, viene destinato ad un impianto di fitodepurazione.

L’acqua evaporata, ricca di ammoniaca, viene quindi inviata ad uno scrubber, il quale fa decadere i sali d’ammonio, attraverso un’acidificazione della soluzione. L’acqua ottenuta può essere riversata in un corpo idrico superficiale.



**Fig 1.1:** Sistema di trattamento WastWa del percolato (SOLWA Srl).

In figura 1.2 è riportata l’apparecchiatura utilizzata per simulare la serra, ed ottenere acqua evaporata ricca di ammoniaca. Essa è alimentata da energia rinnovabile attraverso un pannello solare. Dei ventilatori forzano l’aria attraverso il percolato riposto sul piano della serra, e

quest'ultimo evapora sfruttando il calore solare assorbito dal fondo scuro e dal pannello superiore. I vapori vengono poi sospinti attraverso un condensatore da cui si ottiene acqua pura, ricca di azoto ammoniacale.



a)



b)

**Fig. 1.2** In figura a) la foto di un prototipo della serra SOLWA. In b) invece lo schema.

L'utilizzo di serre solari per il trattamento del percolato di discarica prevede svariati vantaggi:

- Funzionamento in continuo;
- Manutenzione ridotta;
- Mancanza di odori grazie al ricircolo dell'aria;
- Un costo ridotto e limitato all'investimento iniziale.

Si precisa fin d'ora che, nella nostra trattazione, si sono simulate in laboratorio le condizioni presenti nella serra raffigurata qui sopra, ottenendo dell'acqua analoga per caratteristiche chimico-fisiche.

D'altronde quest'impianto è soggetto alle condizioni meteorologiche, quindi risulta necessario in un clima, come quello Veneto, utilizzare metodi alternativi per ottenere sperimentalmente acqua su cui effettuare tutti gli studi e le ricerche che questo campo richiede.

## **1.4. Microalghe e trattamento delle acque**

La grande produzione di acque reflue di natura domestica, industriale e agroindustriale, è una conseguenza inevitabile di tutte le società contemporanee.

Queste acque contengono elevate quantità di fosforo e azoto, diretti responsabili dell'eutrofizzazione di fiumi, laghi e mari (de-Bashan e Bashan 2010), in quanto aumentano la crescita delle alghe su rive e sponde, comportando così un calo dell'ossigeno presente nelle acque, con conseguente calo della fauna ittica. L'eliminazione delle sostanze nutritive dalle acque prima dello scarico in corpi idrici è solitamente obbligatoria, anche se non viene eseguita in molti casi, specialmente nei paesi in via di sviluppo.

La coltura delle microalghe offre uno spunto interessante per i trattamenti delle acque reflue, proponendo un biotattamento terziario (Khan e Yoshida 2008) e consentendo il consumo dei nutrienti sopracitati (azoto e fosforo), e di una varietà di oligoelementi (K, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn), nutrienti essenziali per il metabolismo e la crescita di tali organismi (Li, Chen, et al. 2011a).

Studi precedenti hanno dimostrato il successo del trattamento di acque reflue urbane attraverso microalghe, in particolar modo in acque ricche di azoto e fosforo (Li, Chen, et al. 2011a, Li, Zhou, et al. 2011b) ed anche a bassa intensità di luce (Li, Zhou, et al. 2011b).

Decenni di studi hanno confermato che le microalghe possono produrre anche un grande varietà di metaboliti secondari utili (Moreno-Garrido 2008), permettendo quindi di considerare la biomassa prodotta come un sottoprodotto e non come rifiuto di processo. Le alghe così prodotte possono trovare diversi utilizzi, dalla produzione di biodiesel, ad applicazione nell'azienda cosmetica, fino a quella alimentare.

Azoto e fosforo necessitano di essere rimossi dalle acque di scarico al fine di purificarle. Di norma l'azoto viene rimosso in due modi: assorbimento dei composti azotati da parte di microrganismi e grandi organismi, i quali crescono nelle acque reflue concentrando l'azoto nella propria biomassa e rilasciando acqua con minor contenuto di esso; oppure tramite ossidazione dell'ammonio a nitrato, nitriti e ossidi di azoto, con conseguente formazione al termine del processo di azoto gassoso che si libera in atmosfera (de-Bashan e Bashan 2010).

Di più difficile rimozione è il fosforo. I principali processi commerciali per la rimozione di questo elemento dalle acque di scarico sono la precipitazione chimica con il ferro, o calce (de-Bashan e Bashan 2010) e, in misura minore, la rimozione biologica (de-Bashan e Bashan 2004, Stratful, et al. 1999). Sono vari gli esempi di rimozione dei fosfati nelle acque reflue attraverso microalghe, uno di questi è il ceppo di *Scenedesmus*, il quale, coltivato in acque reflue artificiali ha permesso di rimuovere più del 50% dei fosfati (Voltolina et al., 1999, 2004, 2005).

Altro aspetto importante nella depurazione delle acque è l'eliminazione dei metalli pesanti. L'argomento, di grande interesse per decenni (Perales-Vela, et al. 2006) ha portato alla creazione di norme ambientali sempre più rigide in materia di questi inquinanti.

La maggior parte delle tecnologie attualmente utilizzate per questi ultimi, è basata su reazioni chimico-fisiche, principalmente precipitazione e adsorbimento mediante resine a scambio ionico. Tali procedure sono poco selettive e non molto accurate, e prevedono il passaggio dei

contaminanti da una fase liquida ad una solida che viene smaltita in discarica, portando un rifiuto secondario. Altre strategie quali l'uso dei carboni attivi e l'osmosi inversa, sono utilizzate solo per il trattamento dell'acqua potabile a causa dei loro alti costi.

È noto da anni che molte alghe, sia marine, sia di acqua dolce sono in grado di assumere, in modo selettivo, diversi metalli dal mezzo acquoso, accumulandoli nelle celle.

Tracce di metalli pesanti come il ferro e il rame sono essenziali cofattori per diverse attività enzimatiche nelle microalghe, come nella maggior parte degli organismi, ma alte concentrazioni di questi elementi risultano tossiche. Tuttavia, alcune microalghe sono in grado di assorbire grandi quantità di metalli pesanti dalle acque reflue e fissarli in diverse strutture citoplasmatiche senza conseguenze tossiche.

Tra le specie tolleranti ai metalli pesanti ed efficaci nel trattamento di alcuni elementi, troviamo *Chlorella* e *Scenedesmus*. Ad esempio, si è visto che un ceppo di *Chlorella* può vivere in una sospensione ricca di cadmio, rimuovendone fino al 65%; alcune specie di *Scenedesmus* sono in grado di rimuovere l'uranio, rame, cadmio, e zinco (Perales-Vela, et al. 2006). Tuttavia questi sono risultati ottenuti in culture batch e devono ancora subire uno scale-up nelle condizioni e nei fotobioreattori utilizzati per la rimozione dei nutrienti e la produzione di biomassa, che vengono descritti nel paragrafo seguente.

#### **1.4.1 Sistemi di coltivazione**

Vi sono tre principali sistemi per la coltivazione delle microalghe:

- *Waste Stabilization Ponds* (WSP), che sono grandi bacini poco profondi in cui i liquami vengono trattati interamente da processi naturali che coinvolgono le microalghe e i batteri.

Essi, utilizzati per il trattamento delle acque reflue nei climi temperati e tropicali, risultano affidabili e di facile utilizzo poiché la loro manutenzione giornaliera è minima e l'energia solare è l'unico requisito per il loro funzionamento. Le ore di luce e la temperatura presenti nelle zone tropicali offrono a questo sistema di depurazione delle acque un'eccellente opportunità di utilizzo in queste parti del mondo.

- I foto bioreattori, i quali si differenziano chiusi differiscono principalmente per la loro struttura. Si possono trovare fotobioreattori piatti, elicoidali e tubolari (orizzontali o verticali).

Ad esempio, quest'ultimo fotobioreattore è caratterizzato da un tubo che può essere di vetro, Perspex o PVC, con un diametro che può variare da i 24 mm fino a 24 cm. All'interno del quale crescono le alghe, che vengono movimentate mediante una pompa. Nel reattore vi è poi una zona d'insufflazione d'aria e CO<sub>2</sub> utili alla crescita, mentre l'ossigeno prodotto dalla fotosintesi viene strappato per evitare gli accumuli.

Questi fotobioreattori sono utilizzati per far crescere una grande quantità di alghe tra cui la *Spirulina*, *Chlorella*, *Dunaliella*.

Rispetto ai sistemi aperti sopra citati ( *open ponds*), i fotobioreattori chiusi hanno un controllo migliore sulle condizioni di coltura quali la temperatura, l'ossigeno, l'anidride carbonica e il pH. Presentano però dei costi maggiori e il pericolo di danneggiare la struttura cellulare delle microalghe nella movimentazione di queste.

- Un terzo tipo di bioreattore sopperisce ad una delle limitazioni pratiche legata ad entrambi i sistemi di coltivazione appena descritti, ovvero la raccolta della biomassa prodotta dall'acqua trattata: un sistema come la filtrazione industriale e la centrifugazione possono risultare troppo costosi in alcuni casi. Per risolvere questo problema, si potrebbero usare tecniche d'immobilizzazione della biomassa. Questo campo di ricerca è emerso circa 20 anni fa dagli studi pionieristici di de La Noue (Chevalier e de la Noue 1985a, de la Noue e De Pauw 1988).

Il metodo più comunemente usato è l'immobilizzazione nei polimeri. Analogamente ad altri sistemi di biofiltrazione, anche qui vi è la separazione fisica tra i microrganismi e le acque reflue trattate. Le microalghe sono immobilizzate (intrappolate) vive all'interno del polimero perché i suoi pori sono più piccoli dei microrganismi, mentre il fluido scorre attraverso la matrice e sostiene il loro metabolismo, e la crescita (Cohen 2001). Dopo l'assorbimento dei contaminanti da parte delle microalghe, il refluo trattato diffonde fuori dai polimeri e successivamente viene raccolto e ritrattato più volte. I principali problemi che si possono incontrare in questo tipo di reattore sono l'efficienza del sistema di rimozione delle sostanze inquinanti e i costi. Questi ultimi sono legati sia al polimero che all'intero processo d'immobilizzazione. Tuttavia questa soluzione presenta anche diversi vantaggi: è un sistema semplice da usare, che permette d'impiegare le acque reflue così come sono, senza passare per la filtrazione, inoltre permette di ottenere biomassa concentrata da poter utilizzare come sottoprodotto.

## 1.5 Microalghe e il percolato da discarica

Come si è visto, il percolato è un liquido fortemente contaminato, che si accumula sotto la discarica per effetto dei processi d'infiltrazione. La sua composizione dipende da molti fattori, tra cui l'età della discarica, le condizioni climatiche e ovviamente la natura dei rifiuti contenuti nel sito. In una discarica per rifiuti urbani, dalla decomposizione anaerobica dei rifiuti si formano sostanze come il metano, anidride carbonica, ammoniaca e solfato di idrogeno (Mustafa, et al. 2012). Il percolato è quindi tipicamente composto da materiali organici, prodotti di decomposizione, prodotti chimici organici e infine da metalli dissolti. Le



sue caratteristiche principali sono: l'elevato contenuto di azoto che va dai 1000 a 5000 mg L<sup>-1</sup> (Zhao, et al. 2014) e, in alcuni casi, un alto contenuto di fosforo e metalli pesanti.

Per questo, il percolato deve essere trattato prima di essere scaricato nei corpi idrici, al fine di evitare un impatto deleterio sulla qualità dell'acqua e sulla vita acquatica. Rispetto al trattamento convenzionale a fanghi attivi delle acque di scarico urbane, il trattamento chimico-fisico del percolato di discarica risulta molto costoso, anche se tecnicamente fattibile (Cheung, et al. 1993, Zhang e Han 1998) come descritto nel paragrafo 1.2.

L'uso delle microalghe per la produzione del percolato ha un doppio vantaggio: ridurre i contaminanti sopra indicati mediante biorisanamento e di recuperarli per altri fini interessanti. La difficoltà nell'utilizzo di questo rifiuto per la crescita di microrganismi autotrofi è legata dall'elevata abbondanza di ammoniaca libera, derivante dal grande contenuto di azoto organico nei rifiuti solidi urbani (da proteine, amminoacidi o urea che si decompongono ad azoto ammoniacale e non riesce ulteriormente a decomporre in condizioni anaerobiche). Esso può inibire il fattore di crescita delle microalghe (Cheung, et al. 1993, Lin, et al. 2007, Zhao, et al. 2014).

Anche se è noto che le alghe utilizzino preferibilmente l' $\text{NH}_4^+$  come fonte di nutrimento per l'azoto (Przytocka-Jusiak, et al. 1984), fin dal 1976 con gli studi di Abeliovich e Azov si è scoperto che alti contenuti di ammoniaca, ad un pH superiore a 8.0 siano la prima causa d'inibizione della fotosintesi e della crescita di *Scenedesmus obliquus* (Abeliovich e Azov 1976). Azov e Goldman (1982) hanno riportato che un contenuto pari a 20.4 mg L<sup>-1</sup> di  $\text{NH}_3$  libera riduce del 50% l'assimilazione algale dei carboidrati (Azov e Goldman 1982). Per altre alghe, come *Nephroselmis pyriformis*, un contenuto di ammoniaca libera pari a 32.8 mg L<sup>-1</sup> risulta tossico (Kallqvist e Svenson 2003).

Per sopperire a questo, una strategia promettente può essere quella di isolare microalghe direttamente dagli stagni delle discariche, sfruttando quindi organismi tolleranti alle elevate concentrazioni di ammoniaca (Cheung, et al. 1993). È lo stesso concetto che permette ad alghe come *Chlorella* e *Scenedesmus* di resistere agli effetti di alte concentrazioni di metalli, che sarebbero tossiche o inibitorie per altre specie.

In questo modo si sono ottenuti degli interessanti risultati, con velocità di crescita notevoli in presenza di percolato (Sforza, et al. 2015). L'indice di crescita più elevato si nota, sia nello studio di Lin (2006) che nel lavoro di Sforza (2015), a diluizioni di percolato più basse, con un'aggiunta del 10% di percolato in acqua bidistillata. Nel primo lavoro citato le concentrazioni iniziali di  $\text{NH}_4^+$  sono pari a 134 mg L<sup>-1</sup>, mentre nel secondo sono pari a 216.81 mg L<sup>-1</sup>. In entrambi gli studi si è verificata comunque una crescita anche a concentrazioni di percolato superiori (con conseguente aumento anche di azoto ammoniacale). Questo ottimo risultato è stato ottenuto con due alghe isolate presso due diverse discariche: *Chlorella pyreïnodos* (Lin, et al. 2007) in prossimità di una discarica in Cina e *Acutodesmus obliquus*

(Sforza, et al. 2015) in uno stagno contenente percolato pretrattato da una discarica urbana situata nel Lazio.

L'assorbimento di azoto ammoniacale come micronutriente da parte della specie *A. obliquus*, a seconda delle varie diluizioni di percolato varia da 30 - 97% e, in generale, è superiore al 90% nel caso in cui il fosforo non risulti il nutriente limitante per la crescita (Sforza, et al. 2015).

Tra le altre particolarità della crescita di microalghe nel percolato, vi è che quest'ultimo ritarda la fase di crescita esponenziale, caratteristica di tutti questi microrganismi. Inoltre, all'aumentare della quantità di percolato, ne abbassa la velocità di crescita, il numero di cellule finali e la concentrazione di biomassa finale.

Le microalghe sono organismi autotrofi che usano l'energia solare per sintetizzare le proprie molecole organiche a partire da sostanze inorganiche. Per questo, in alcuni casi diminuire la diluizione di percolato in acqua può rendere la penetrazione della luce un agente limitante per la crescita di questi organismi (Lin, et al. 2007). Altro elemento fondamentale per la fotosintesi è l'anidride carbonica. L'ambiente da cui scaturisce il percolato può essere una buona fonte di CO<sub>2</sub>, in quanto è originato in una condizione satura di questo composto. Tuttavia, l'anidride carbonica disciolta si esaurisce rapidamente e come nella maggior parte dei trattamenti di acque reflue, sono richiesti lunghi tempi di permanenza (Adamsson, et al. 1998).

Mustafa e i suoi collaboratori (2011) hanno ottenuto una riduzione del 99.9% dell'azoto ammoniacale e dell'86% degli ortofosfati, con una produzione di biomassa algale che variava tra i 2 e i 5.54 g/L<sup>-1</sup>. Il risultato è stato ottenuto in vasche algali ad alto tasso (*high-rate algal pond*, HRAP), con una percentuale di carico del percolato pari al 2% e il 4%, dando dei tempi di ritenzione di idraulica pari a 100, 50 e 25 giorni. Il percolato utilizzato aveva subito un pretrattamento aerobico nella discarica e presentava un pH che variava tra i valori di 6 e 8 e non era probabilmente inibitorio per le microalghe nel HRAP (Mustafa, et al. 2012). Un pH elevato unito ad una grande concentrazione di NH<sub>4</sub><sup>+</sup> potrebbero promuovere la volatilizzazione dell'ammoniaca, portando ad un calo dell'azoto presente. Tuttavia, l'aumento del pH favorisce anche la tossicità del percolato aumentando la concentrazione di NH<sub>3</sub> libera, una forma che risulta molto più tossica della forma solubile NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Kallqvist e Svenson 2003).

## 1.6 Scopo della tesi

Lo scopo principale di questa tesi è verificare la crescita di *Acutodesmus obliquus* in terreni ricchi di azoto ammoniacale. Nello specifico si studia la possibilità di usare questa microalga per abbattere tale nutriente nell'acqua prodotta dal pretrattamento del percolato con serre SOLWA. L'obiettivo è di verificare se è possibile rientrare nelle norme di legge vigenti in

materia di scarichi industriali in acque superficiali. In aggiunta, si studia la possibilità di utilizzare il percolato tal quale come fonte dei micronutrienti necessari alla crescita dei microrganismi.

Infine, si vogliono simulare, mediante l'impiego di AspenPlus<sup>TM</sup>, la crescita microalgale e il consumo di nutrienti, al fine di poter fare delle valutazioni sull'impiego di tale processo a livello industriale.



# Capitolo 2

## Materiali e Metodi

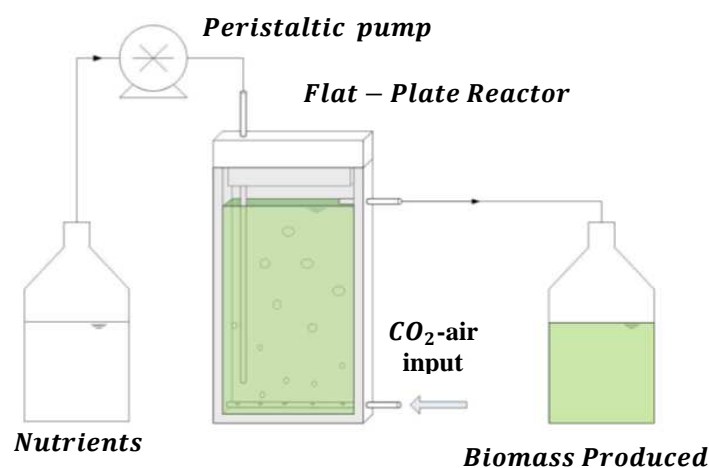
In questo capitolo verranno descritte la specie algale, le apparecchiature e le metodologie analitiche utilizzate per ottenere i risultati sperimentali di questa tesi.

### 2.1 Specie algale e sistemi di crescita

La specie microalgale utilizzata è *Acutodesmus obliquus*, in quanto essa è più resistente, rispetto a molte altre specie, a concentrazioni elevate di azoto ammoniacale. Tale scelta è avvalorata dagli studi di Ferrigo et al., 2014., il quale ha studiato questa particolare specie, isolata da un *pond* contenente percolato pretrattato di una discarica di rifiuti urbani. L'isolamento di specie algali da questi ambienti non è inusuale, e dunque non è sorprendente che *A. obliquus* mostri una straordinaria vitalità nelle acque reflue urbane, tollerando una vasta gamma di temperature e livelli di pH, fattori che la rendono uno strumento versatile per la purificazione delle acque (Kessler 1991). Si è verificato in particolare che *A. obliquus* è caratterizzata da una costante di crescita pari a  $0.893 \text{ d}^{-1}$ , raggiungendo una concentrazione finale elevata, di  $1.9 \text{ g/L}$  (Ferrigo, et al. 2014). Inoltre dagli stessi studi si è verificata la possibilità di usare quest'alga come fonte di lipidi per la produzione di biodiesel, data la capacità di accumularne buone percentuali (47% DW) anche in circostanze di N e P non limitanti, mentre invece generalmente per ottenere valori analoghi è necessaria una limitazione di nutrienti.

Per le curve di crescita in batch e i preinoculi sono state utilizzate bottiglie Drechsel di vetro da 250 mL, alimentate con una miscela gassosa di aria e  $\text{CO}_2$  (5% v/v) ad un flusso di  $1 \text{ L/h}$  ciascuna. L'intensità della luce, fornita attraverso delle lampade al neon, è misurata con un fotoradiometro (photoradiometer, Delta OHM HD 2102.1), che misura l'intensità della radiazione PAR (Photosynthetically Active Radiation, 400-700 nm). La sedimentazione, elevata per la specie *A. obliquus*, viene evitata attraverso l'uso di un'ancoretta magnetica posta sul fondo delle bottiglie. La corrente gassosa è fornita mediante 2 bombole contenenti rispettivamente aria e  $\text{CO}_2$ ; in uscita da ognuna di queste vi è un riduttore di pressione, in

modo da abbassare le pressioni dei gas, e un flussimetro volumetrico che permette di regolare le portate e quindi la composizione di  $\text{CO}_2$  in ingresso al fotobioreattore. Successivamente i due flussi si uniscono in una sola corrente, attraverso un raccordo a “T”, che a valle presenta un’ulteriore valvola per regolare la portata complessiva in ingresso ad ogni singolo reattore. Analogo è il sistema di alimentazione della miscela gassosa utilizzato nei reattori continui, in cui però il *bubbling* avviene mediante un tubo di silicone forato posto sul fondo del reattore. Gli esperimenti in continuo sono stati eseguiti in un reattore di tipo *flat-panel* verticale (figura 2.1), realizzato in policarbonato, con un volume di 290 mL e uno spessore interno di 1.4 cm. L’effetto combinato del *bubbling* e dell’ancoretta magnetica posta in verticale, permettono di approssimare tale fotobioreattore al comportamento di un CSTR. Il sistema prevede un continuo apporto di terreno, continuamente mescolato per evitare una eventuale sedimentazione dei sali, attraverso una pompa peristaltica (Watson Marlow sci400) con portata volumetrica regolabile, e una conseguente uscita della biomassa prodotta tramite un “troppo pieno” che funge da controllo di livello all’interno del pannello. La biomassa prodotta viene infine raccolta in un serbatoio esterno.



**Figura 2.1** Schematizzazione dell'impianto di produzione di alghe in condizioni continue.

## 2.2 Terreni di coltura

### 2.2.1 BG11

*Il terreno di coltura è il substrato dove viene fatta crescere la specie microalgale; nel caso di Acutodesmus obliquus si è usato, come controllo, il BG11. L'acronimo sta per 'Blue Green Medium' e identifica il terreno che deve essere utilizzato per la coltivazione di alghe d'acqua dolce.*

Nella tabella 2.1 si riportano le concentrazioni dei diversi componenti presenti nel medium utilizzato per la coltivazione dei preinoculi e per la curva di controllo.

**Tabella 2.1** Concentrazione dei vari componenti presenti in un BG11 standard, utilizzato per i preinoculi e la curva di controllo.

<b>Ingrediente</b>	<b>Concentrazione (g/L)</b>
<b>Na<sub>2</sub>MgEDTA</b>	$1 \cdot 10^{-3}$
<b>Ferric ammonium citrate</b>	$6 \cdot 10^{-3}$
<b>Citric acid · 1H<sub>2</sub>O</b>	$6 \cdot 10^{-3}$
<b>CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O</b>	$36 \cdot 10^{-3}$
<b>MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O</b>	$75 \cdot 10^{-3}$
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	$30.5 \cdot 10^{-3}$
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	$20 \cdot 10^{-3}$
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	$2.86 \cdot 10^{-3}$
<b>MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O</b>	$1.81 \cdot 10^{-3}$
<b>ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O</b>	$0.222 \cdot 10^{-3}$
<b>CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O</b>	$0.079 \cdot 10^{-3}$
<b>COCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O</b>	$0.05 \cdot 10^{-3}$
<b>NaMoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O</b>	$0.391 \cdot 10^{-3}$
<b>NaNO<sub>3</sub></b>	1.5
<b>HEPES pH 8</b>	2.38

Per tutto il resto degli esperimenti non si è aggiunta la soluzione tampone di HEPES che mantiene il pH ad un valore pari a 8. Il controllo del pH è stato svolto manualmente, misurandone il valore mediante un pHmetro e correggendolo quotidianamente mediante l'aggiunta di piccole quantità di HCl e NaOH, in base alle necessità (rispettivamente per abbassare o alzare il pH del terreno). In particolare, in tutti gli esperimenti che coinvolgono la presenza di percolato (tal quale o diluito) il pH è stato mantenuto in un range di valori compresi tra il 7.5 e l'8.

Nei terreni utilizzati nella maggior parte degli esperimenti, descritti qui di seguito, la fonte di azoto non è costituita da nitrato ( $\text{NaNO}_3$ ) ma è fornita in forma ammoniacale attraverso il percolato e/o attraverso l'acqua SOLWA (acqua derivante dalla evaporazione del percolato). In taluni casi si sono aggiunti a tali terreni solo due dei composti riportati precedentemente in tabella, il citrato ferrico di ammonio e il sale  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  utilizzati come fonte di Fe e P (importanti per la crescita delle microalghe).

### 2.2.2 Percolato

Il percolato utilizzato in questo lavoro è stato prelevato in due momenti diversi presso la discarica di Tre punte, nella località di Lovadina (TV). La discarica di rifiuti urbani è attualmente chiusa ed è gestita dalla Contarina SpA, che effettua controlli semestrali sul percolato raccolto nei pozzi situati lungo la discarica. Attraverso la caratterizzazione dell'azoto e del fosforo (spiegati successivamente) si sono trovate le seguenti concentrazioni d'inquinanti:

- Percolato del 2013: 832 mg/L di N ammoniacale e 6.25 mg/L di P.
- Percolato prelevato il 13/04/2015: 1700 mg/L di N ammoniacale e 11.35 mg/L di P.

Il pH misurato nei due casi è molto simile, ed è pari a 7.8 e 7.77 rispettivamente. Si riportano i valori medi delle 2 analisi compiute nel 2014 sul percolato del 2013 (fonte Contarina SpA):

**Tabella 2.2** Valori tipici presenti in un percolato di discarica (fonte Contarina SpA)

Descrizione analisi	Valore	Unità di misura
pH	7.8	
C.O.D.	2145	mg/L O <sub>2</sub>
B.O.D.5	810	mg/L
Azoto ammoniacale	2260	mg/L
Solfati (come SO <sub>4</sub> )	162.2	mg/L
Cloruri	1705	mg/L
Boro	3.95	mg/L
Manganese	0.0945	mg/L
Zinco	0.1275	mg/L

La discrepanza tra le analisi effettuate sull'azoto è causata dal diverso momento del prelievo e dalle condizioni climatiche dei giorni precedenti allo stesso, che ne influenzano la composizione (vedi capitolo 1). Per alcuni ragionamenti riportati nel paragrafo 3.4, non si



sono considerati i valori riportati in tabella 2.2, ma le analisi a disposizione dell'anno precedente.

### 2.2.3 Acqua SOLWA

Come per il percolato, anche l'acqua SOLWA utilizzata in questa tesi, ricavata dallo stesso, è ottenuta in due momenti e modi diversi.

La prima è ottenuta dal percolato del 2013, e dalle analisi effettuate si è riscontrato un contenuto di N ammoniacale pari 510 mg/L. Inoltre si precisa che quest'acqua è stata ricavata dal funzionamento delle serre SOLWA, abbondantemente spiegato nel capitolo precedente.

La seconda invece è stata ottenuta dal percolato del 13/04/2015, mediante un'apparecchiatura costruita in laboratorio per riprodurre il processo, e non attraverso le serre. Il concetto di base è del tutto analogo al principio che avviene in queste (evaporazione di acqua e azoto ammoniacale), l'unica differenza rilevante è che si ottiene un prodotto molto più concentrato, dal momento che l'ambiente di laboratorio permette minori perdite di vapori con l'ambiente esterno. Di seguito si descrive il funzionamento dell'evaporatore costruito in laboratorio (vedi figura 2.2):

1. Si riempie un pallone in vetro PYREX con una quantità nota di percolato tal quale (1-2 L).
2. Il pallone viene immerso in un bagno termico tale da ottenere all'interno del percolato una temperatura compresa tra i 70-80° C, di modo che subisca una lenta evaporazione.
3. I vapori prodotti passano poi attraverso un condensatore, in cui passa esternamente dell'acqua in controcorrente.
4. I vapori condensati nello scambiatore cadono all'interno di un secondo pallone, in cui si accumula l'acqua SOLWA. Per rendere più efficiente il sistema ed evitare dispersioni termiche si sono coibentate tutte le parti "calde", in modo da evitare la precoce condensazione dei vapori prima dell'ingresso al condensatore. Inoltre, si è inserita una pompa da vuoto a membrane per forzare il moto dei vapori. La pompa (KNF LABOPORT) da una parte crea una depressione in uscita dall'impianto, tirando i vapori caldi presenti. Dall'altra spinge quelli non condensati in uscita nuovamente all'interno del pallone iniziale.

Il processo viene fermato quanto l'acqua SOLWA ottenuta è pari al 50% in volume del percolato trattato (analogamente alle serre). Essa è risultata avere un valore di pH di 9.34 ed un contenuto di N ammoniacale pari a 2700 mg/L, dunque molto più alto di quello

precedente. Tuttavia, per garantire un confronto tra le prove sperimentali effettuate con le due diverse acque, l'acqua SOLWA prodotta in laboratorio è stata diluita in modo tale da ottenere la stessa concentrazione di azoto ammoniacale (510 mg/L) di quella ottenuta dalle serre.



Figura 2.2 Foto dell'evaporatore del percolato

## 2.4 Metodi analitici per misurare la crescita microalgale

La crescita di *A. obliquus* nei sistemi di coltura batch e continui viene monitorata attraverso le seguenti analisi:

- conta cellulare
- misura della densità ottica
- misura del peso secco

### 2.4.1 Conta cellulare

La concentrazione cellulare può essere misurata direttamente al microscopio ottico attraverso una camera di Bürker (Counting Chamber Bürker, HBG) (figura 2.3 a sinistra). Essa è costituita da un vetrino rettangolare e presenta due celle che hanno una profondità di 0.1 mm.

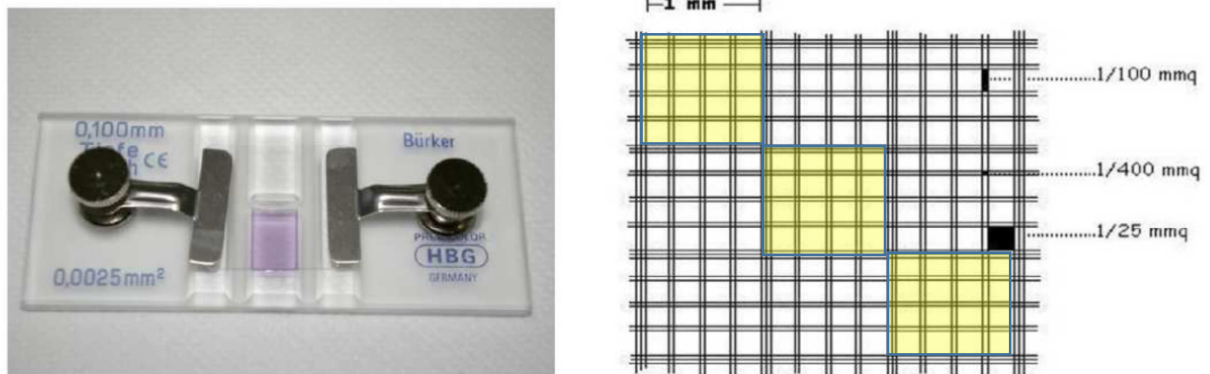
Il piano di ogni cella risulta diviso in 9 quadrati di lato 1 mm e separati da una linea tripla. Ciascuno dei quadrati comprende a sua volta 16 quadrati più piccoli, suddivisi da linee doppie.

Dopo aver riempito le camerette con il campione opportunamente diluito, si contano le cellule presenti nei tre quadrati in diagonale (delimitati dalle linee triple), come mostrato in figura 2.3.

Si calcola infine la concentrazione cellulare attraverso l'equazione 2.1:

$$\text{concentrazione cellulare} \left( \frac{\text{n}^\circ \text{cell}}{\text{mL}} \right) = \left( \frac{\sum \text{conta nei tre quadrati}}{3} \right) * f_d * 10^4 \quad (2.1)$$

dove  $f_d$  è il fattore di diluizione e il termine  $10^4$  è dovuto al fatto che ciascun quadrato è caratterizzato da un volume di  $0.1\mu\text{L}$ . La conta cellulare viene effettuata quotidianamente e, negli esperimenti batch, è utilizzata per calcolare la velocità di crescita microalgale. Per farlo si grafica il logaritmo della conta cellulare in funzione del tempo: la velocità di crescita è infatti pari al coefficiente angolare della retta che interpola i punti relativi alla fase di crescita esponenziale.



**Figura 2.3** Counting Chamber Bürker (a sinistra), una delle due camere (a destra).

### 2.4.2 Densità ottica OD

La densità ottica (Optical Density OD) della coltura è una misura indiretta della concentrazione cellulare; la sua determinazione avviene attraverso uno spettrofotometro (Spectronic Unicam UV-500 UV-visibile, a doppio fascio). Essa viene effettuata ad una lunghezza d'onda di 750 nm, che ricade fuori dall'intervallo di assorbimento dei pigmenti fotosintetici, e si basa sul fatto che quando il campione microalgale è colpito da radiazione luminosa, una parte di questa viene deviata per effetti di *scattering* dal campione stesso, in

base alla sua concentrazione cellulare. La misura quindi della densità ottica, conosciuta con il nome di assorbanza, viene effettuata con la seguente procedura standard:

#### 1. “Il bianco”

Prima di eseguire la misura del campione si azzerava il macchinario riempiendo le due cuvette, da 1.5-2 mL ciascuna, con il terreno di coltura dell’esperimento analizzato. Una viene inserita nel vano del campione e l’altra nel vano di riferimento.

#### 2. Misura del campione

Lasciando la cuvetta del terreno nel vano di riferimento, si sostituisce quella del campione con quello d’analizzare. È necessario in taluni casi diluire il campione con il proprio terreno per avere un valore di assorbanza compreso tra il 0.1 – 1, a cui corrisponde l’intervallo di linearità della misura effettuata dallo strumento.

### 2.4.3 Peso secco

Il peso secco di biomassa microalgale indica la quantità di microalghe essicate per unità di volume, solitamente espresso in g/L. Tale misura viene effettuata quotidianamente nei sistemi continui, mentre nei sistemi batch si esegue solo alla fine della curva di crescita. L’analisi segue una procedura standardizzata:

- 1) Viene raccolto un volume noto di campione dal sistema (5-7 mL);
- 2) Un filtro (Sartorius Stedim Biotech nitrocellulosa, dimensione dei pori 0,2 micron) viene posto ad essiccare in forno a 94 ° C per 10 minuti in modo da rimuovere l’umidità assorbita dall’ambiente. Successivamente viene subito pesato con la microbilancia (Atilon Acculab Sartorius Group) che ha una sensibilità di  $10^{-4}$  g. Il valore trovato rappresenta la tara della misura ( $DW_t$ );
- 3) Il campione prelevato viene separato dal terreno attraverso una beuta da vuoto, lasciando depositata sul filtro la biomassa presente nel campione. La beuta da vuoto è collegata ad un tubo Venturi che, una volta aperto, crea il vuoto all’interno.
- 4) Il filtro viene posto nuovamente in forno a 94°C per 2-4 ore, in modo da rimuovere l’acqua inter- e intra-cellulare;
- 5) Infine il filtro viene nuovamente pesato, il valore ottenuto rappresenta il peso lordo ( $DW_l$ ).

Il peso secco effettivo è dunque calcolato come:

$$DW = \frac{DW_l - DW_t}{\text{volume campione}} \quad (2.2)$$

## 2.5 Metodi analitici per misurare i nutrienti

Le tecniche di caratterizzazione del contenuto di fosforo e di azoto, riportate in questo paragrafo, sono importanti ai fini del lavoro svolto in questa tesi, in cui si verificano le potenzialità di *A. obliquus* in termini di crescita e di consumo dei nutrienti (principalmente N ammoniacale) presenti nel percolato.

### 2.5.1 Caratterizzazione del fosforo

La caratterizzazione del fosforo avviene con la misura dello ione ortofosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) presente nel terreno di cultura. Il metodo si basa sulla formazione di un complesso fosfomolibdico di colore blu (del gruppo dei blu di molibdeno), la cui concentrazione viene misurata per via colorimetrica (spettrofotometro). La preparazione del reagente prevede una miscela dei seguenti reagenti, preparati come specificato di seguito:

- **Acido Solforico 5 N:** preparato diluendo 35 ml di acido solforico 96% p/p in 250 ml di  $\text{H}_2\text{O}$  bidistillata.
- **Potassio antimonio Tartrato:** 0.34 g di polvere in 250 ml di  $\text{H}_2\text{O}$  bidistillata.
- **Ammonio molibdato:** 7.5 g di polvere in 250 ml di  $\text{H}_2\text{O}$  bidistillata.
- **Acido ascorbico:** 1.35 g di polvere in 25 ml di  $\text{H}_2\text{O}$  bidistillata.

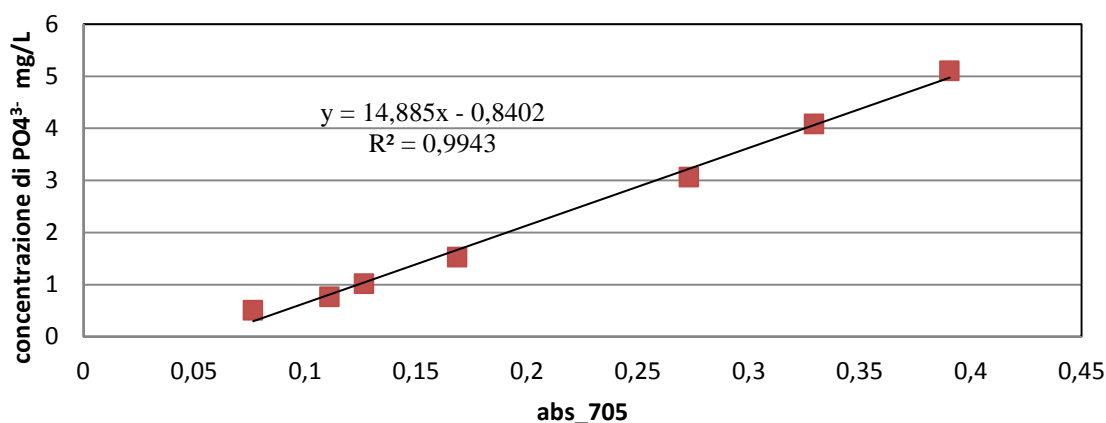
I vari reagenti vengono miscelati nelle quantità riportate in tabella 2.2. È possibile utilizzare il reagente entro le 3-4 ore dalla sua preparazione. Tra i reagenti l'unico a richiedere una preparazione istantanea è l'acido ascorbico che degrada molto velocemente con l'aria e la luce.

Tab 2.2 preparazione della miscela di reagenti (2 mL).

Reagenti	Volumi (mL)
<i>Acido Solforico 5 N</i>	1
<i>Potassio antimonio Tartrato</i>	0.2
<i>Ammonio molibdato</i>	0.4
<i>Acido ascorbico</i>	0.4

Una volta preparata la miscela di reagenti, se ne aggiungono 250  $\mu\text{L}$  ad ogni campione, il quale deve essere precedentemente diluito (volume finale campione di 2.5 mL) in modo da ottenere dei valori di concentrazione dello ione ortofosfato compresi tra 0.5 e 5 mg/L. Il tempo di reazione è di 5 minuti, nel quale il campione diventerà di colore blu. L'intensità del

colore dipende dalla concentrazione di ione fosfato. La lettura avviene nello spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di  $\lambda = 705$  nm. Il valore di assorbanza corrisponderà ad un rispettiva concentrazione di ione  $\text{PO}_4^{3-}$ . Per sapere questa relazione è necessario avere una retta di taratura costruita precedentemente con soluzioni a concentrazioni note (vedi figura 2.4).



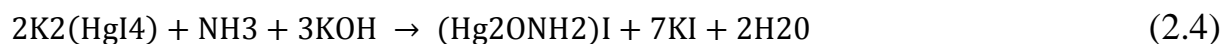
**Figura 2.4** Retta di taratura costruita a concentrazioni note di fosfato.

Dall'equazione della retta è possibile ottenere, una volta misurata l'assorbanza, la concentrazione dello ione:

$$[\text{PO}_4^{3-}] = 14.885 \cdot \text{Abs}(705 \text{ nm}) - 0.8402 \quad R^2 = 0.9943 \quad (2.3)$$

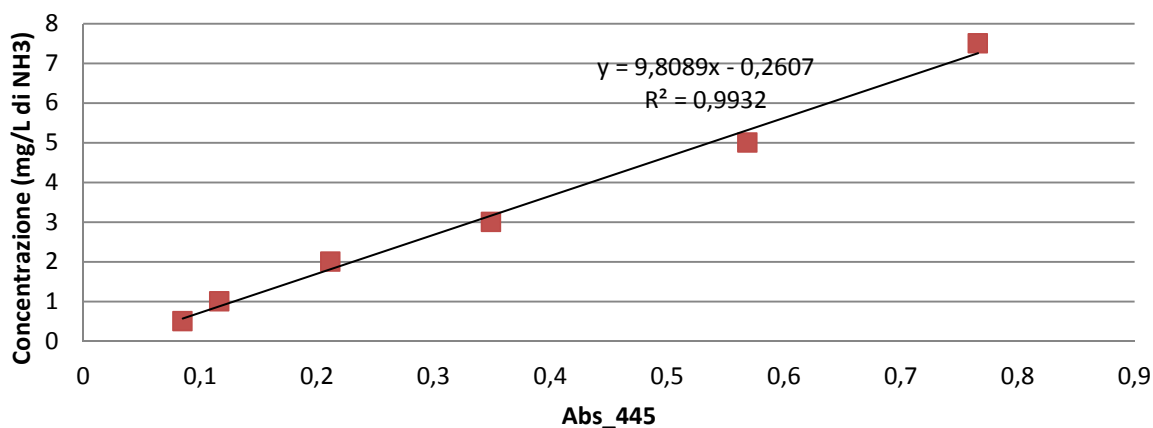
### 2.5.2 Caratterizzazione dell'azoto

L'azoto presente negli esperimenti svolti è solamente in forma ammoniacale. Per tale motivo la caratterizzazione di tale elemento viene svolta misurando soltanto questa forma. Per determinare la concentrazione di azoto ammoniacale si utilizza kit di reagenti predosati (HYDROCHECK SPECTRATEST). Esso si basa sulla reazione:



Il reattivo di Nessler (tetraiodomercurato di potassio) reagisce con l'ammoniaca dando luogo una reazione colorimetrica che porta alla formazione di un composto di colore giallo/arancione. L'assorbanza del campione, adeguatamente diluito per rientrare nei valori riportati dalla corrispettiva retta di taratura (figura 2.5), viene misurata allo spettrofotometro

ad una lunghezza d'onda di 445 nm. Il tempo di reazione per questo kit è di 5 minuti ed il campione deve avere un volume pari a 5 mL.



**Figura 2.5** Retta di taratura dell'ammonio ottenuta con il kit HYDROCHECK SPECTRATEST.

Si può calcolare così la concentrazione di ammonio presente nel campione attraverso la seguente relazione:

$$[\text{NH}_3] = 9.8089 \cdot \text{Abs} (445 \text{ nm}) - 0.2607 \qquad R^2 = 0.9932 \qquad (2.5)$$





# Capitolo 3

## Risultati sperimentali

In questo capitolo si riportano i risultati ottenuti sperimentalmente riguardo alla crescita della specie *Acutodesmus obliquus* nel percolato di discarica. L'obiettivo principale è di abbattere l'azoto presente in grande quantità in tale refluo attraverso la crescita di microalghe, per rientrare nei parametri di legge relativi alle acque di scarico.

Poiché si vuole inserire la fase di crescita delle microalghe in un processo già esistente, si sono seguiti due approcci differenti: il primo prevede la crescita direttamente in percolato, tale quale e diluito secondo diverse diluizioni (caso A); il secondo è caratterizzato dall'uso di percolato pretrattato come principale elemento dei terreni di crescita (caso B).

### 3.1 Curva di controllo

Per verificare le potenzialità di crescita dell'alga in condizioni non limitanti, si è misurata la crescita di *A. Obliquus* in semplice BG11 (vedi capitolo 2). I risultati ottenuti da questa prova permettono di confrontare i risultati successivi con un controllo, in cui nulla è tossico, nè limitante per la crescita della microalga presa in considerazione. Le condizioni sperimentali utilizzate sono riassunte in tabella 3.1.

**Tab 3.1** Condizioni di lavoro utilizzate nella curva di controllo

Condizioni di lavoro	
Temperatura	28°C
Volume	150 ml
Intensità luce	61 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
CO <sub>2</sub> alimentata	5% in volume

La costante cinetica della velocità di crescita misurata in tali condizioni è pari a  $0.538 \text{ d}^{-1}$  e in figura 3.1 viene riportata la concentrazione cellulare misurata nei primi 7 giorni.

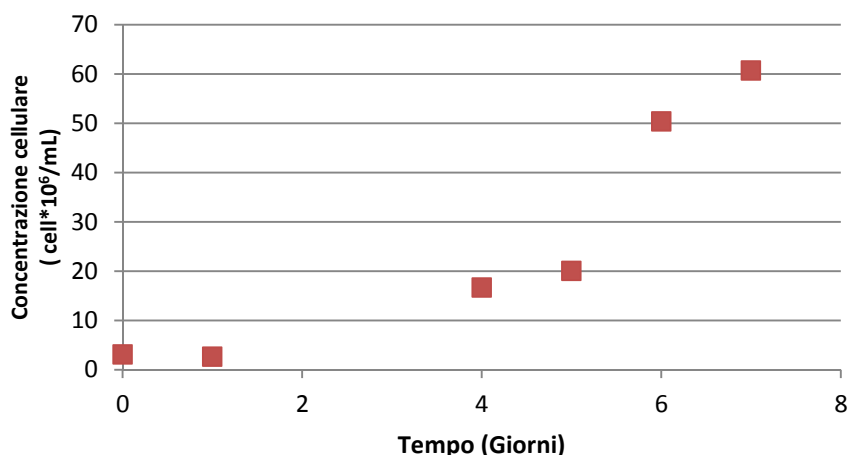


Fig. 3.1 Crescita di *Acutodesmus obliquus* in BG11 (curva di controllo).

### 3.2 Caso A: crescita in percolato

L’approccio A prevede il trattamento diretto del percolato da discarica, prima che questi venga processato nelle serre SOLWA. Lo scopo è di ridurre il quantitativo di microinquinanti prima dell’evaporazione in serra e prima del trattamento di fitodepurazione. In figura 3.2 si riporta lo schema a blocchi del processo, in cui il fotobioreattore viene inserito all’inizio.

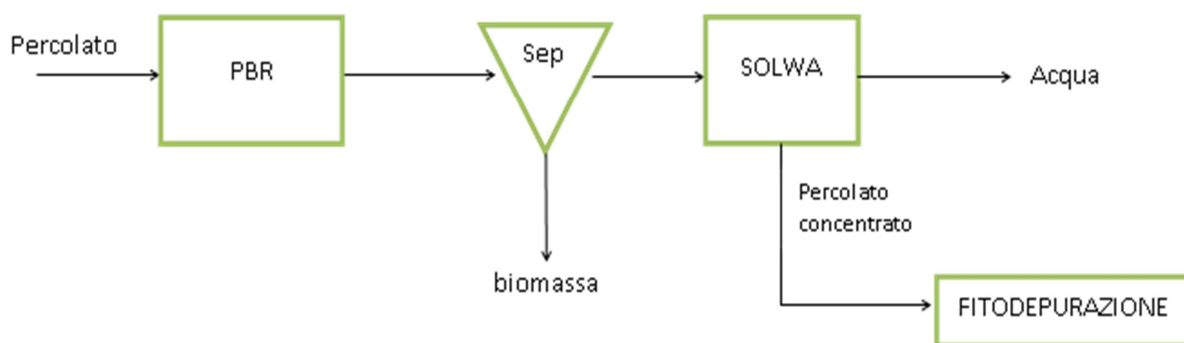


Fig. 3.2 Schema di processo con trattamento diretto del percolato.

Il percolato è di sua natura molto vario per quanto riguarda la presenza e la concentrazione dei microinquinanti. Per le curve di crescita ottenute negli esperimenti riportati in questo paragrafo si è utilizzato un percolato che, dalle analisi a disposizione (vedi capitolo 2), garantisce un apporto adeguato, in termini di nutrienti, per una crescita minima di *Acutodesmus obliquus*. In tabella 3.2 si riportano i valori di alcuni micronutrienti, rapportati, per riferimento, alla quantità di azoto presente nel mezzo, e si confrontano questi valori con quelli minimi per la crescita di una microalga (Oh-hama 1988).

**Tab 3.2** Confronto nutrienti, in rapporto all'azoto presente.

	MIN	BG11	PERCOLATO
N	1	1	1
K	0.08	0.02	0.89
P	0.05	0.02	0.02
Mg	0.02	0.03	0.06
S-SO4	0.03	0.12	0.16
Fe	$4 \cdot 10^{-3}$	$5.1 \cdot 10^{-3}$	$2.9 \cdot 10^{-3}$
Ca	$5.1 \cdot 10^{-4}$	0,04	0,07
Mn	$2 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-3}$	$8.7 \cdot 10^{-5}$
Cu	$1 \cdot 10^{-4}$	$8.1 \cdot 10^{-5}$	$1.1 \cdot 10^{-5}$
Zn	$9.2 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-4}$	$6.7 \cdot 10^{-5}$

Si può notare come, nel percolato preso in esame, siano presenti tutti i nutrienti necessari ad ottenere una crescita, sebbene alcuni di essi (quale il rame) risultano limitanti per garantire il consumo complessivo dell'azoto presente.

In figura 3.3 si riportano le curve di crescita in percolato tal quale e a due diverse diluizioni dello stesso. Come si può notare, nel caso di impiego del percolato tal quale, la crescita è risultata nulla. Pertanto, le successive diluizioni si sono rese necessarie per verificare che l'assenza di crescita della microalga nelle condizioni precedenti fosse dovuta al colore e alla torbidità del terreno. Questi esperimenti sono stati condotti con una intensità di luce pari a  $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Solo diluendo il percolato di un fattore 1:3 si è verificata una crescita microalgale moderata rispetto al controllo. Quest'ultimo dato avvalorava la presenza di micronutrienti necessari alle microalga per crescere in tale substrato. Inoltre il risultato è promettente vista la natura del terreno, che si presenta scuro e torbido. Tuttavia la velocità di crescita è bassa, con una costante cinetica pari a  $0.3 \text{ d}^{-1}$ , così come la concentrazione cellulare raggiunta ( $14 \cdot 10^6 \text{ cell/mL}$ ). La concentrazione finale di biomassa è  $1.129 \text{ g/L}$ , il consumo di azoto è pari al 47% e quello del fosforo è pari al 74%. Questi valori sono calcolati rispettivamente come:

$$Y_N = \frac{N_i - N_f}{N_i} * 100 ; \text{(equazione 3.1)} \quad Y_P = \frac{P_i - P_f}{P_i} * 100 ; \text{(equazione 3.2)}$$

dove  $N_i$  e  $P_i$  rappresentano le concentrazioni di azoto e di fosforo iniziali, mentre  $N_f$  e  $P_f$  i rispettivi valori finali.

Ciò indica che vi è un accumulo notevole dei nutrienti nelle cellule, nonostante la crescita ridotta. Per quanto riguarda le altre diluizioni, si sono trascurati i consumi poiché non si è verificata una crescita significativa della biomassa.

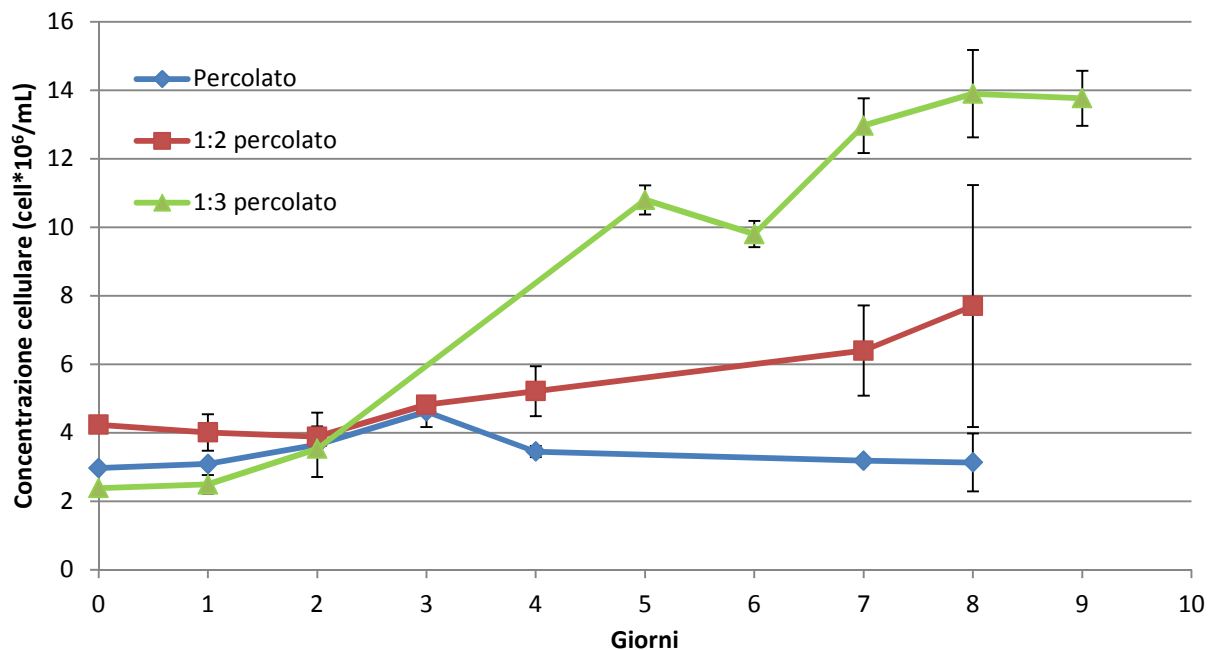
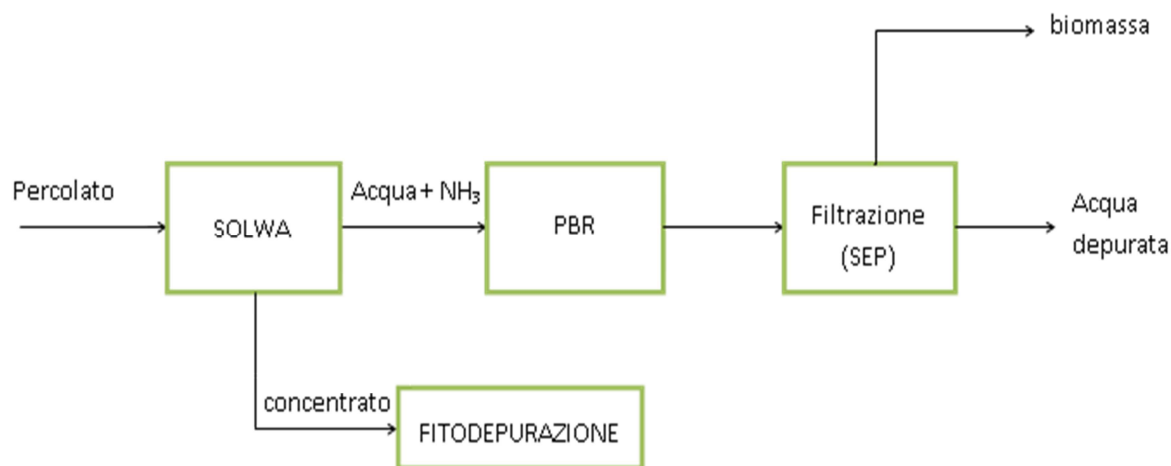


Fig. 3.3 Confronto curve di crescita a diverse diluizioni di percolato con acqua.

### 3.3 Caso B: crescita in acqua Solwa

L'approccio B studia la crescita delle microalghe in un terreno composto dall'acqua ottenuta dal percolato pretrattato attraverso le serre SOLWA. Il percolato subisce un'evaporazione del 50% circa, ottenendo così un concentrato di colore scuro e un'acqua limpida ricca di azoto ammoniacale. L'ammoniaca è altamente solubile in acqua dando luogo a soluzioni basiche. Inoltre, essa rappresenta una possibile fonte di azoto per la crescita delle microalghe.

In figura 3.4 si riporta lo schema a blocchi relativo degli esperimenti riportati in questo paragrafo. Il percolato, disidratato del 50% in volume, viene trattato in fitodepurazione, mentre l'acqua evaporata (qui denominata "acqua Solwa") viene utilizzata nel fotobioreattore come terreno di coltura.



**Fig. 3.4** Schema di processo con pretrattamento del percolato attraverso serre SOLWA.

In primo luogo si è misurata una curva di crescita con un terreno composto da semplice acqua solwa, diluita mediante acqua di acquedotto per garantire concentrazioni di  $\text{NH}_3$  al di sotto del limite di tossicità per le microalge. La concentrazione iniziale dell'esperimento è stata pari a 250 mg/L. Le condizioni di lavoro sono riassunte nella tabella 3.3, e sono valide anche per tutti gli esperimenti riportati in questo paragrafo.

**Tab 3.3** Condizioni di lavoro utilizzate:

Condizioni di lavoro	
Temperatura	28°C
Volume	150 ml
Intensità luce	63 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
$\text{CO}_2$ alimentata	5% in volume

La microalga non ha mostrato alcuna crescita, a causa della mancanza nell'acqua SOLWA di elementi come il P e altri micronutrienti, essenziali per la crescita.

Per questo motivo, si è deciso di effettuare una prova in cui il terreno fosse composto dal 50% di acqua SOLWA (226.6 mg/L di N) e il restante 50% da un terreno con le caratteristiche di un BG11 standard, senza la soluzione tampone *hepes* e senza il nitrato di sodio (la fonte di azoto è infatti rappresentata dall'ammoniaca). La curva di crescita così ottenuta è riportata in figura 3.5, con una velocità di crescita nei primi cinque giorni pari a  $0.59 \text{ d}^{-1}$  ed una concentrazione finale di 1.84 g/L ( $\pm 0.0849$ ) di biomassa. Il consumo di N è pari al 60.3%, per P è pari al 19.2%. La resa di tali nutrienti rispetto alla biomassa, calcolata come il rapporto tra il consumo del nutriente e la biomassa finale ottenuta, è rispettivamente pari al 9% e 0.11%.

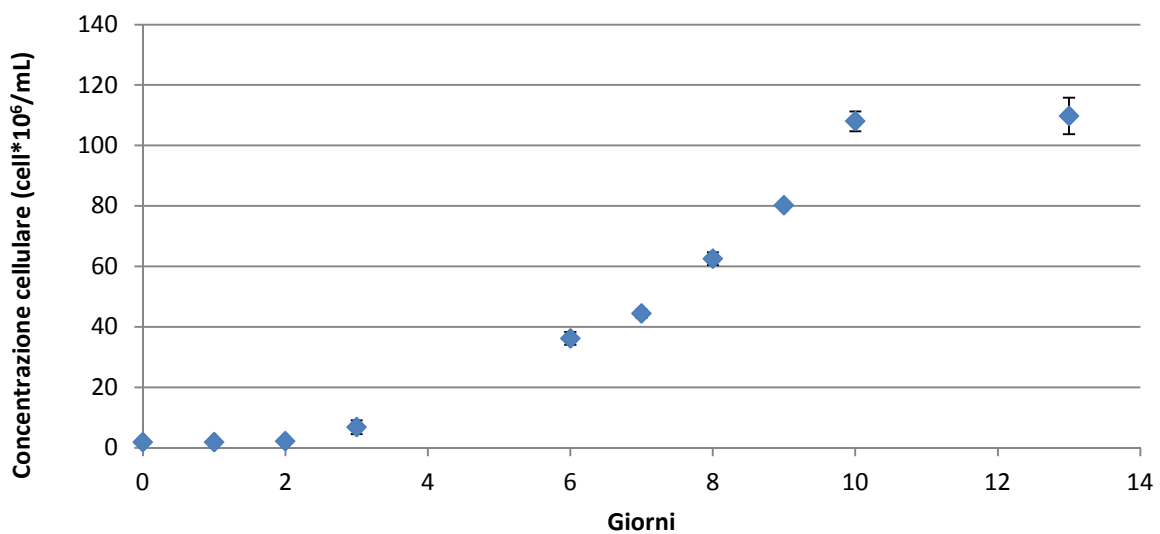
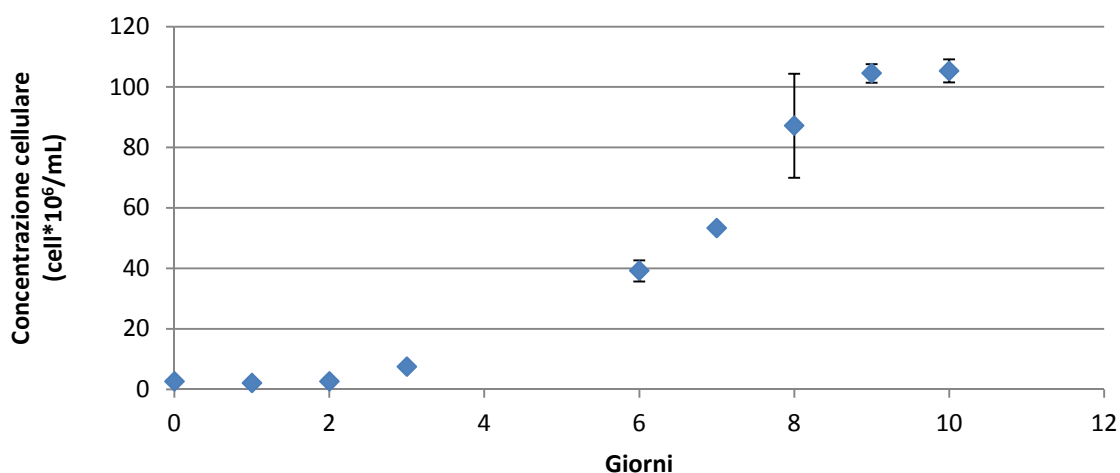


Fig. 3.5 Curve di crescita di *A. Obliquus* in un terreno al 50/50 in volume di acqua solwa e BG11.

Come anticipato, una problematica che si riscontra con la maggior parte delle microalghe è quella legata all'inibizione e avvelenamento dovuto ad una concentrazione elevata di ammoniaca in soluzione, in accordo con quanto riportato da Cheung et al. (1993), Lin et al. (2007), Zhao et al. (2014). Nel caso in esame l'alga *Acutodesmus obliquus* usata negli esperimenti riportati in questa tesi, essendo stata isolata da uno stagno contenente percolato pretrattato di una discarica di rifiuti urbani (come risulta dal lavoro di Ferrigo et al. 2014), è tollerante all'elevato tasso di N ammoniacale.

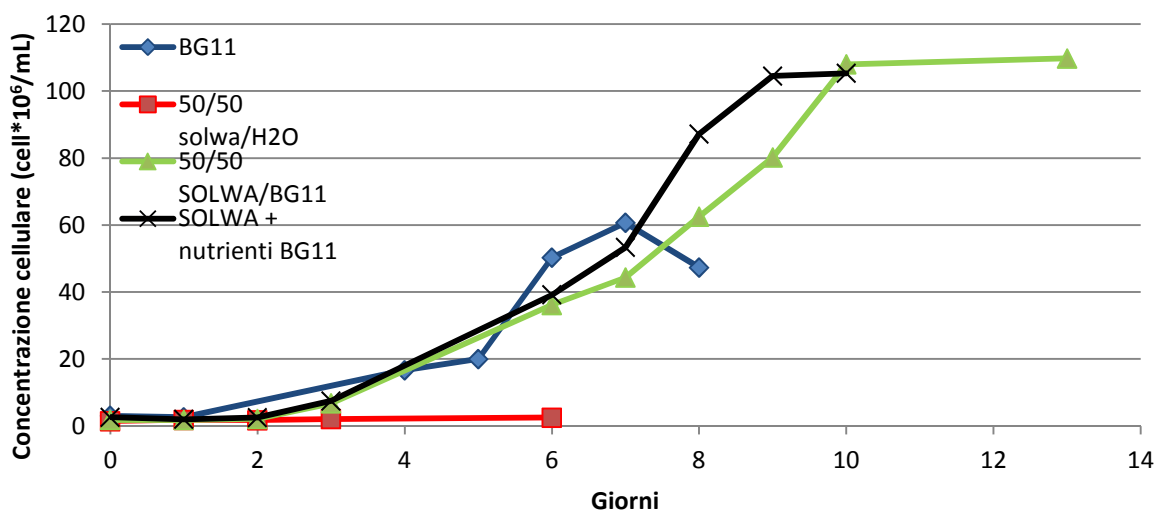
Per verificare questa tolleranza ad un'elevata concentrazione di N ammoniacale, si è eseguito un esperimento in batch con un terreno composto da acqua Solwa non diluita (483.8 mg/L di N) a cui sono stati aggiunti i nutrienti presenti in un BG11 standard (ancora senza hepes e nitrato di sodio) allo scopo di fornire al terreno tutti i micronutrienti necessari alla crescita.

Le condizioni di lavoro sono le medesime di quelle riportate in tab. 3.3, con un consumo di N pari al 46.7% e un consumo di P pari al 44.7%. Si è misurata una velocità di crescita di 0.59 d<sup>-1</sup> che permette di ottenere una concentrazione finale pari a 2.4 g/L ( $\pm 0.0494$ ). La resa di nutriente sulla biomassa è rispettivamente pari al 9.4% e allo 0.06%. In figura 3.6 è riportata la relativa curva di crescita.



**Fig. 3.6** Curve di crescita di *A. obliquus* in acqua solwa con nutrienti del BG11.

Come si può notare confrontando le curve di crescita ottenute (figura 3.7), i risultati migliori sono stati conseguiti utilizzando acqua SOLWA non diluita, con un contenuto di N ammoniacale elevato, a dimostrazione che *A. obliquus* è in grado di tollerare tali concentrazioni, e di crescere in tale terreno. Nella figura 3.7 sono riportate le varie curve di crescita descritte in questo paragrafo, confrontate con la curva di controllo (terreno BG11 standard). Da tale paragone si può individuare una fase *lag* comune nelle due curve di crescita in acqua SOLWA, che può essere spiegata con l'adattamento dell'alga ad un terreno ricco di ammonio. Questo non limita la crescita, anzi, la concentrazione cellulare finale risulta incrementata di circa il 45% rispetto alla curva in BG11 standard. Ciò dimostra anche che la microalga utilizza l'azoto ammoniacale dell'acqua SOLWA per crescere.

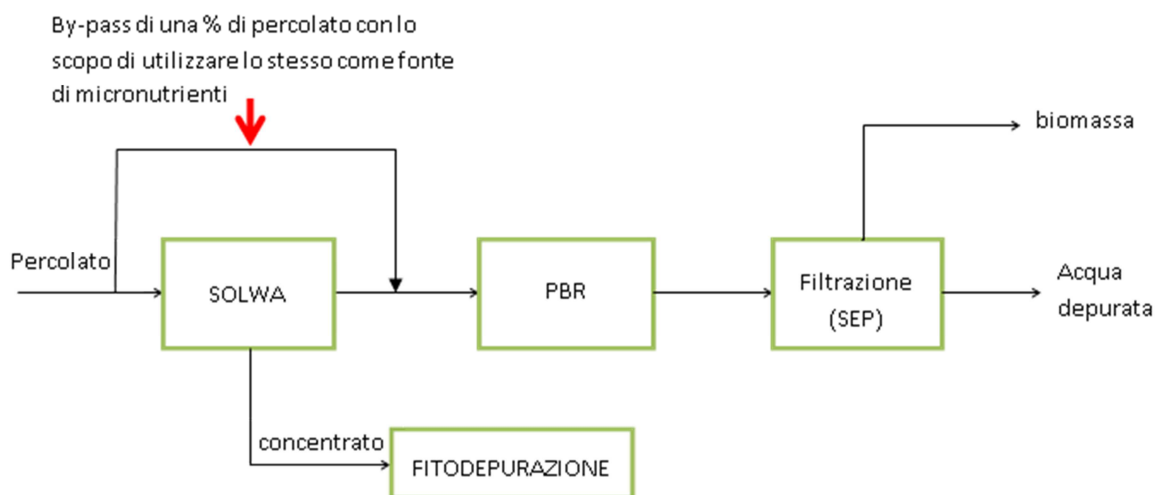


**Fig. 3.7** Curve di crescita di *A. obliquus* in acqua solwa e in BG11.

### 3.4 Caso B2: crescita in acqua SOLWA con percolato

Nel paragrafo 3.2 si è accennato all'efficacia del percolato tal quale come fonte dei nutrienti necessari per la crescita della microalga. L'inibizione alla crescita riscontrata negli esperimenti era probabilmente causata dal colore scuro che schermava il passaggio dei raggi luminosi attraverso il terreno, permettendo la fotosintesi solo negli strati superficiali.

L'intento principale del lavoro sperimentale rimane la riduzione dei contenuti di azoto ammoniacale, unico inquinante presente nell'acqua Solwa, ottenuta dal pretrattamento in serra del percolato. Per la crescita dell'alga servono tuttavia tanti altri micronutrienti. Questi potrebbero essere forniti attraverso il percolato stesso. In figura 3.8 si rappresenta la modifica allo schema teorico del processo appena descritto.

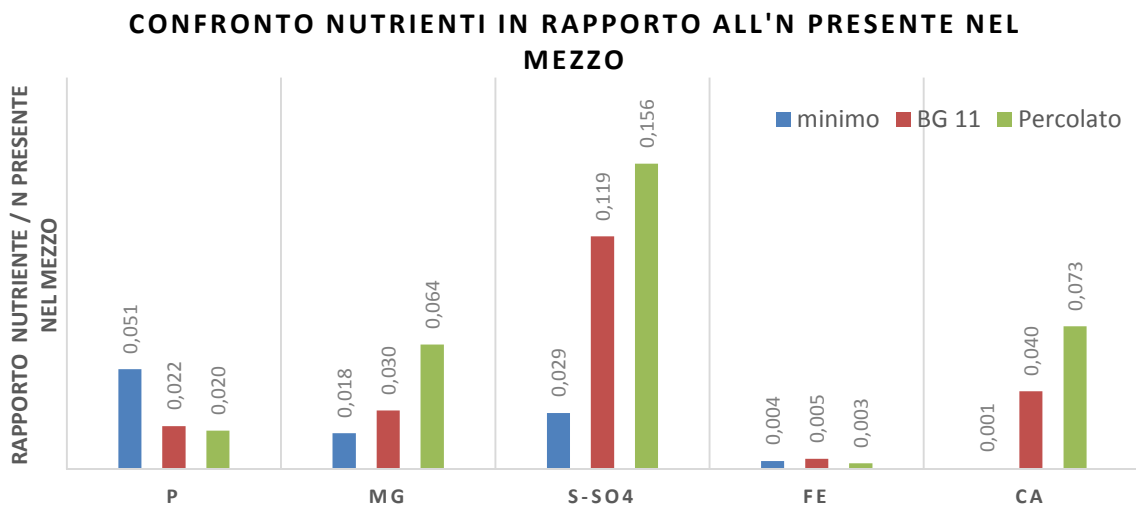


**Fig. 3.8** Schema di processo con pretrattamento del percolato attraverso serre SOLWA e by-pass del percolato come fonte di nutrienti.

La scelta della quantità di percolato da diluire nell'acqua SOLWA è vincolata da più fattori. Da una parte c'è il problema della luce riscontrato dalle crescite in percolato tal quale e diluito. Inoltre si è limitati dalla quantità di cloruri, non assimilabili dalle microalghe, e batteri presenti nel percolato da discarica, di cui si hanno le analisi di campionamento semestrale. L'obiettivo di questo studio è infatti di depurare un'acqua e un percolato affinché rientrino nei parametri di legge previsti per lo scarico in acque superficiali, e per questo si è considerato un limite massimo di percolato da aggiungere pari a 1:10 del volume (vedi capitolo 1).

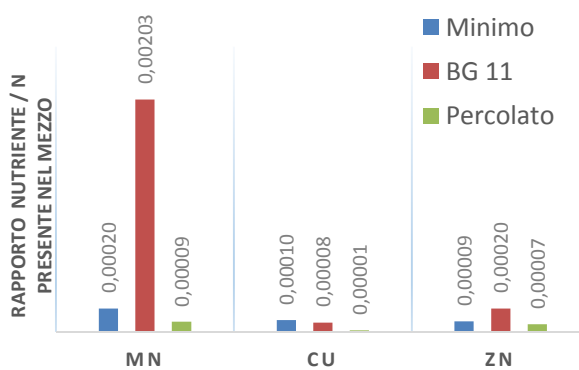
Per quanto riguarda la quantità minima di percolato da aggiungere all'acqua Solwa, si sono confrontate le concentrazioni dei nutrienti presenti nel BG11 standard con quelle del percolato da discarica a disposizione. Inoltre si sono presi in considerazione i valori minimi necessari alla crescita dell'alga (Oh-Hama e Miyachi 1988). Tali valori sono riportati in figura 3.9 a), b), c), per i vari nutrienti.



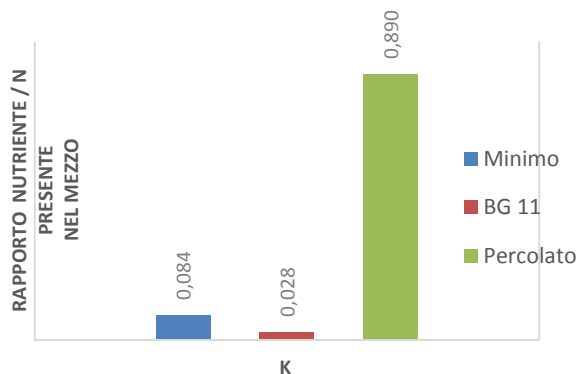


**Fig. 3.9 a)** Confronto tra i nutrienti presenti nel BG11, percolato e tra i dati di letteratura.

Dal confronto, si può notare che il percolato tal quale contiene in abbondanza la maggior parte dei nutrienti necessari ad assicurare il consumo totale di N presente (in questi calcoli posto pari a 1000 mg/L). Inoltre, esso è sufficiente a coprire il consumo minimo richiesto dall'alga, secondo i valori ricavati dalla letteratura. Questi ultimi si riferiscono al consumo di un mg/L di N. Tuttavia non è possibile basare il calcolo dell'aggiunta del percolato sul valore minimo necessario a consumare tutto l'azoto, in quanto nemmeno il percolato tal quale garantirebbe la quantità indispensabile per tutti i micronutrienti (Cu, Mn, Zn, Fe sono limitanti).



**Fig. 3.9 c)** Confronto tra il restante dei nutrienti presenti nel BG11, percolato e tra i dati di letteratura.



**Fig. 3.9 b)** Confronto tra il potassio presente nel BG11, percolato e tra i dati di letteratura.

Si è deciso quindi di seguire tre diluizioni campione di percolato in acqua Solwa, considerando che la crescita potrebbe essere limitata da qualche micronutriente presente in minor quantità. Le diluizioni sperimentate sono: 1:10, 1:20 e 1:30 di percolato in acqua

SOLWA. Si precisa che il percolato, oltre ai vari micronutrienti, richiede anche un'ulteriore aggiunta di azoto. In tutti e tre i casi si è integrato il macronutriente P aggiunto in forma di sale  $K_2HPO_4$ , al fine di mantenere un rapporto  $N/P$  non limitante, equivalente a quello del BG11. Inoltre si è aggiunta una fonte di Fe in forma di citrato ferrico di ammonio per compensare l'apporto ridotto del percolato. Infatti il Fe è uno dei micronutrienti fondamentali per la crescita (Markou, et al. 2014). Tutti gli esperimenti sono stati svolti alle condizioni di lavoro riportate in tabella 3.4. Le concentrazioni iniziali di N e P alle varie diluizioni sono riportate in tabella 3.5.

**Tab 3.4** Condizioni di lavoro utilizzate:

Condizioni di lavoro	
Temperatura	28°C
Volume	150 ml
Intensità luce	100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
CO <sub>2</sub> alimentata	5% in volume

**Tab 3.5** Concentrazioni iniziali di N e P (mg/L):

	1.10	1.20	1.30
N iniziale	500	450	433
P iniziale	11	10	9,5

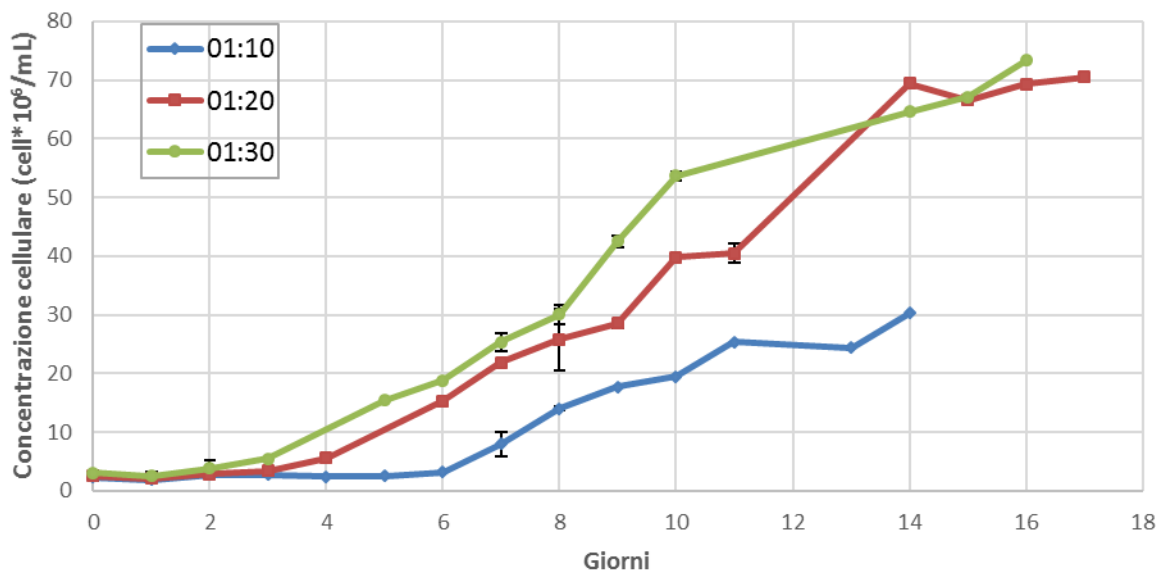
La tabella 3.6 raccoglie i dati di consumo, di resa e di concentrazione di biomassa finale per i tre esperimenti svolti.

**Tab 3.6** risultati sperimentali ottenuti dalle curve di crescita di *A. obliquus* in acqua SOLWA e percolato.

Caratteristiche esperimento	Concentrazione finale g/L	$Y_N$ (%)	$Y_{N/x}$	$Y_P$ (%)	$Y_{P/x}$	Velocità ( $d^{-1}$ )
SOLWA + 1:10 di percolato + P e Fe	2,20 ( $\pm 0,09$ )	50,5	11,47%	61,63	0,35%	0,38
SOLWA + 1:20 di percolato + P e Fe	2,85 ( $\pm 0,106$ )	47,4	7,60%	100	0,42%	0,4
SOLWA + 1:30 di percolato + P e Fe	2,69 ( $\pm 0,042$ )	55,7	8,34%	98,6	0,41%	0,42

Le diluizioni 1:20 e 1:30 presentano una crescita pressoché analoga, raggiungendo concentrazioni finali più alte rispetto alla diluizione 1:10, come mostrato in figura 3.10. Sebbene in tutti i casi era stata aggiunta nel terreno una quantità di P in eccesso, per consumare tutto l'azoto presente in soluzione, nel caso dell'1:20 e 1:30 si è verificato che tali concentrazioni erano limitanti, perché il fosforo è stato interamente consumato.

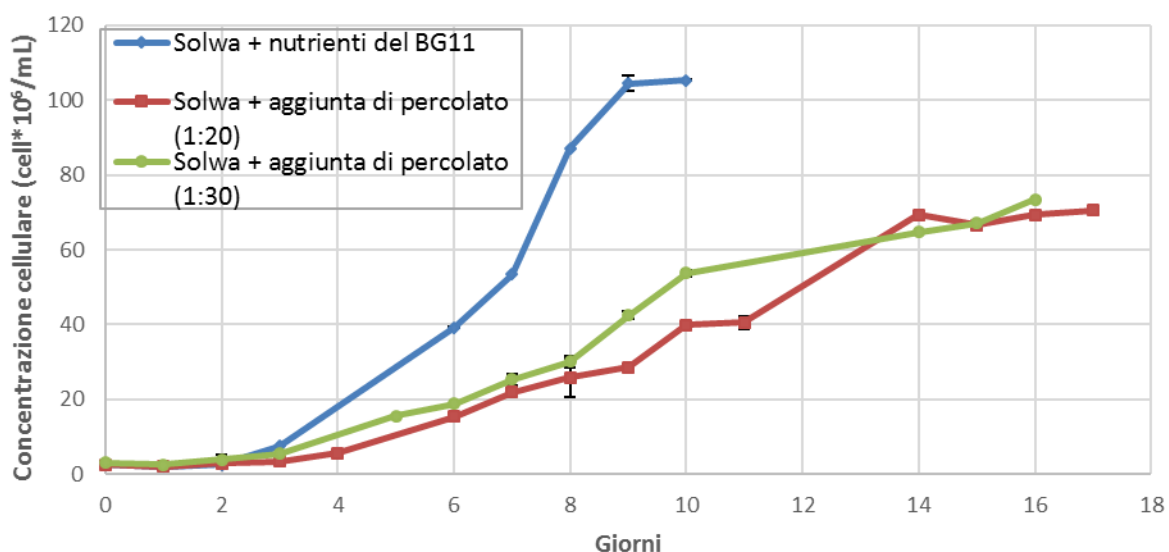
Nel caso di una diluizione 1:10 la crescita microalgale è probabilmente limitata dal colore leggermente più scuro del terreno, che limita la fotosintesi. La specie risulta stressata dalle condizioni di lavoro e presenta un accumulo maggiore di azoto nella biomassa (11.47%). In figura 3.12 si evidenzia inoltre una fase *lag*, spiegabile con l'adattamento della microalga alle condizioni stressanti del terreno sebbene la velocità di crescita nella fase esponenziale sia confrontabile con le altre diluizioni (Tab. 3.6).



**Fig. 3.10** Confronto tra le curve di crescita in acqua SOLWA con aggiunta di percolato come fonte di nutrienti.

Se si confrontano la curva di crescita in acqua SOLWA con l'aggiunta di tutti i nutrienti presenti in un BG11 standard (paragrafo 3.3) e le curve ottenute utilizzando il percolato come fonte di nutrienti, trascurando la diluizione 1:10, si nota che i risultati ottenuti sono soddisfacenti.

Infatti la velocità di crescita in questo caso è inferiore (circa  $0.4 \text{ d}^{-1}$  invece di  $0.59 \text{ d}^{-1}$ ) e la concentrazione cellulare finale è minore del 33% rispetto al caso precedente, ma la concentrazione di biomassa finale misurata come peso secco (vedi capitolo 2) risulta essere invece comparabile o superiore. In effetti le cellule apparivano infatti di dimensioni maggiori. Ciò può essere spiegato dalle condizioni stressanti create dall'aggiunta del percolato in acqua SOLWA.



**Fig. 3.11** Confronto tra le curve di crescita in acqua Solwa con aggiunta di percolato e quella in acqua Solwa con aggiunta dei nutrienti del BG11.

### 3.5 Esperimenti in continuo

Gli esperimenti batch descritti nei paragrafi precedenti hanno dimostrato le potenzialità di crescita di *A. obliquus* in terreni composti da percolato di discarica, in diverse condizioni. Tuttavia, a livello applicativo è interessante studiare la crescita e le potenzialità di un sistema continuo.

Gli esperimenti riportati in questo paragrafo hanno in comune le condizioni di lavoro riassunte in tabella 3.7. Essi sono stati svolti al fine di studiare l'influenza del tempo di permanenza e del terreno utilizzato sulla crescita dell'alga e sul consumo di nutrienti in un fotobioreattore di tipo *flat-panel*, operante in continuo.

**Tab 3.7** Condizioni di lavoro utilizzate:

Condizioni di lavoro	
Temperatura	28°C
Volume pannello	290 ml
Intensità luce	100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
CO <sub>2</sub> alimentata	5% in volume

### 3.5.1 Continuo in acqua Solwa con 1:20 di percolato

Poiché dagli esperimenti batch si è visto che una diluizione 1:20 di percolato in acqua SOLWA garantisce una crescita soddisfacente, si è utilizzato questo terreno per la coltivazione in continuo. Tale soluzione sarebbe preferibile a quella di un'aggiunta dei diversi micronutrienti come sali minerali, perché quest'ultimo potrebbe trattare volumi maggiori di refluo e non ci sarebbe bisogno di fonti aggiuntive per i nutrienti.

Innanzitutto, si è misurata la velocità di crescita nel sistema *flat-panel*. Tale valore è risultato pari a:  $0.55 \text{ d}^{-1}$ . La velocità di crescita così ottenuta identifica il  $\tau_{\min}$ , calcolato come:

$$\tau_{\min} = \frac{1}{k}$$

dove  $k$  è la costante della velocità di crescita e  $\tau_{\min}$  il tempo di permanenza minimo a cui operare il reattore.

Il tempo di permanenza così calcolato è pari a 1.8 d. Tuttavia, impostata una portata di alimentazione adeguata ad ottenere questo valore, si è verificata una condizione di *wash-out*: un fenomeno che accade quando il tempo di permanenza è troppo basso per permettere alla microalga di duplicarsi prima di uscire dal fotobioreattore.

Operare ad un  $\tau$  equivalente al  $\tau_{\min}$  non è dunque sufficiente, e quindi il suo valore è stato aumentato a 2.3 d. Si è così raggiunto uno stato stazionario in cui la concentrazione di biomassa è risultata pari a  $0.78 \text{ g/L}$  ( $\pm 0.098$ ). Il consumo di N e P è pari a 89.2 e 2.2 mg/L rispettivamente.

In particolare, la concentrazione di N in uscita è risultata di 360 mg/L, molto superiore al limite di legge (11.67 mg/L).

Per questo motivo, si è aumentato il tempo di permanenza a 3.3 d. in questo caso, la concentrazione di biomassa a stazionario è aumentata a  $1.195 \text{ g/L}$  ( $\pm 0.019$ ), come si vede da Fig. 3.14.

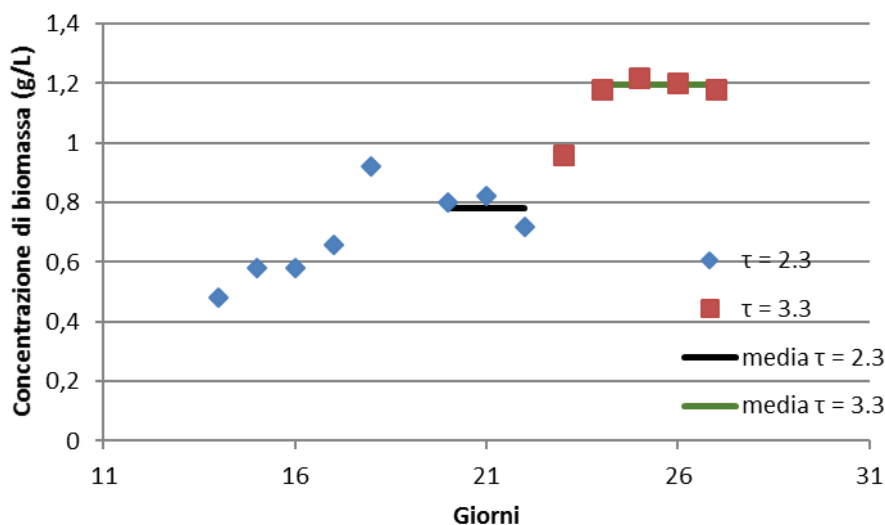


Fig. 3.12 Concentrazione di biomassa per i rispettivi tempi di residenza.

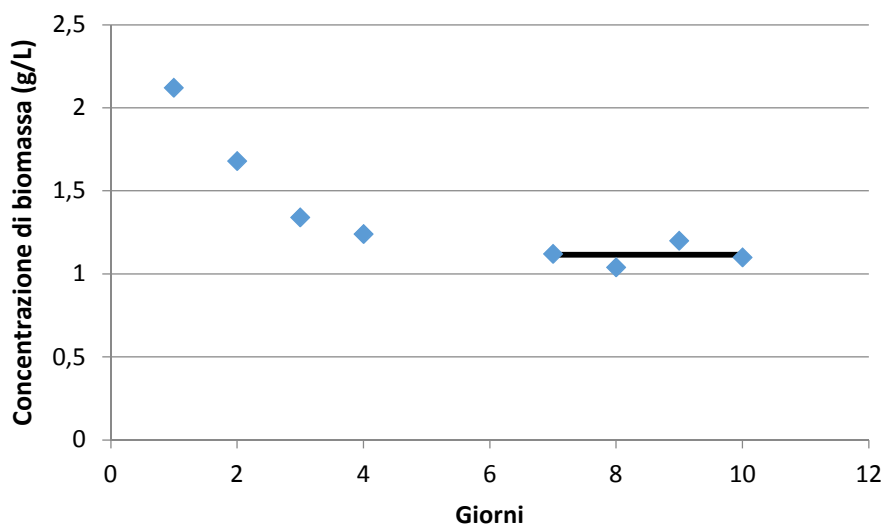
I consumi di N e P misurati sono rispettivamente di 150 mg/L e 5 mg/L. Ciò dimostra un consumo maggiore rispetto al tempo di permanenza di 2.3 d. La produttività, calcolata come il rapporto tra la biomassa prodotta e il tempo di permanenza, cresce da un valore di 0.339 a 0.362  $\text{gL}^{-1}\text{d}^{-1}$ . I risultati ottenuti sono positivi e un incremento del tempo di permanenza garantisce una produzione di biomassa maggiore, oltre che un maggiore consumo di nutrienti. La concentrazione di N in uscita è infatti minore (pari a 297 mg/L). Tuttavia, nonostante la crescita discreta ottenuta nelle prove in batch, col sistema in continuo si sono registrati una produzione e un consumo piuttosto ridotti, e insufficienti a garantire un abbattimento efficace dell'azoto nel mezzo. Ciò è probabilmente legato sia alla limitazione dovuta a qualche micronutriente che, come già anticipato nei paragrafi precedenti, è presente nel percolato in quantità limitante, sia alla velocità di crescita non particolarmente elevata della specie presa in considerazione. Un ulteriore aumento del tempo di residenza non avrebbe molto riscontro pratico, in quanto un valore pari 3 d è già considerato relativamente elevato. Per questi motivi si è scelto di verificare le potenzialità in continuo di *A. obliquus* in acqua Solwa, in cui tutti i micronutrienti necessari alla crescita sono ancora una volta aggiunti in forma di Sali (vedi paragrafo 3.3).

### 3.5.2 Continuo in acqua Solwa con aggiunta dei nutrienti del BG11 standard

La scelta di verificare le potenzialità dell'alga in questo terreno di coltura è avvalorata dai buoni risultati ottenuti nella crescita in batch (vedi paragrafo 3.3). In questo caso infatti la velocità di crescita risultava simile a quella del controllo (BG11).

Il tempo di permanenza in questo caso è stato posto pari a 2.3 d. La produzione di biomassa ottenuta è pari a 1.115 g/L ( $\pm 0.066$ ), nettamente superiore rispetto al risultato con il terreno descritto nel precedente paragrafo, ed un tempo di permanenza analogo, accreditando l'ipotesi di una limitazione dovuta ai micronutrienti. Anche il consumo di N e P da parte dell'alga aumenta, e risulta pari a 133 mg/L e 5.66 mg/L rispettivamente. Tuttavia, non è sufficiente a garantire un risultato tale da rispettare i limiti di legge.

In figura 3.15 si riporta l'andamento della concentrazione di biomassa nel tempo, evidenziando i punti di stato stazionario.



**Fig. 3.13** Concentrazione di biomassa.

Presumibilmente, un aumento del tempo di residenza condurrebbe ad un ulteriore miglioramento nella produzione di biomassa e nel consumo di azoto ammoniacale. Tuttavia è improbabile che il valore di concentrazione di quest'ultimo, pur aumentando  $\tau$  a circa 3.5 d, scenda al di sotto del valore previsto dalla legge. Ciononostante, si può affermare che i risultati ottenuti in questi esperimenti in continuo siano promettenti, in quanto confermano la capacità di *A. obliquus* di crescere in un terreno composto da acqua SOLWA con aggiunta di percolato, pur con le relative difficoltà.





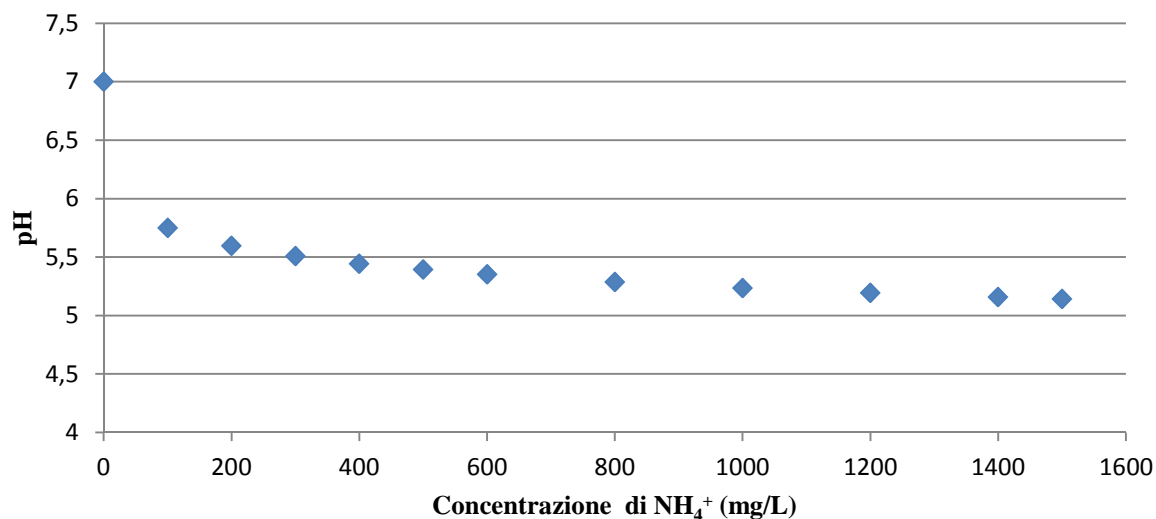
# Capitolo 4

## Schema e simulazione di processo

L'obiettivo di una simulazione di processo è di riprodurre il più fedelmente possibile i dati ottenuti sperimentalmente, così da permettere ragionamenti basati su volumi più grandi e poter studiare l'influenza delle variabili operative sulle performance di un processo in scala industriale. In questo capitolo si descrivono le principali operazioni svolte al fine di simulare la crescita in un sistema continuo di *A. obliquus* attraverso il simulatore di processo Aspen Plus<sup>TM</sup> v8.2.

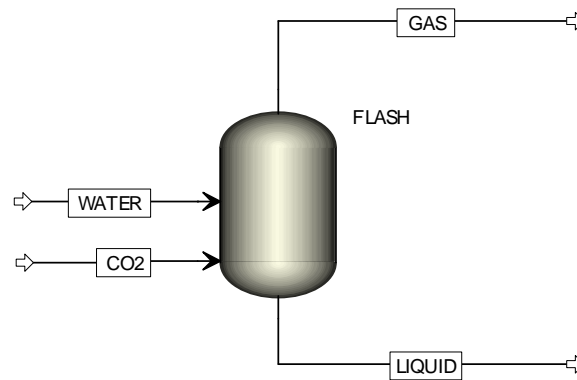
### 4.1 Simulazione dell'acqua SOLWA

L'acqua SOLWA utilizzata negli esperimenti descritti nei paragrafi precedenti, è caratterizzata principalmente da due proprietà: il contenuto di azoto ammoniacale della soluzione acquosa, ottenuta dall'evaporazione del percolato da discarica e il pH che ne consegue. Ai fini della simulazione per prima cosa si è reso necessario ricreare questo liquido. Inizialmente, ciò è stato fatto mediante l'aggiunta di cloruro d'ammonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) alla corrente di acqua, nelle quantità che riproducono la concentrazione reale. Poi attraverso uno studio di sensitività sulla variazione del pH in base alla concentrazione di cloruro d'ammonio (figura 4.1), si è notato come quest'ultimo tenda a far calare il pH della soluzione. In particolare, il pH così ottenuto risultava troppo basso rispetto al valore di 9.35, misurato sperimentalmente.



**Figura 4.1.** Variare del pH con la concentrazione dello ione ammonio disciolto in acqua con l'aggiunta di  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

Per risolvere tale scostamento, si è pensato di fornire l'azoto ammoniacale non solo come cloruro di ammonio, ma come una combinazione di quest'ultimo e di ammoniaca ( $\text{NH}_3$ ), in proporzioni tali da ottenere sia la concentrazione di N totale che il pH corretti. La concentrazione di N dell'acqua SOLWA qui riprodotta è di circa 2700 mg/L, così elevata perché ottenuta dall'evaporazione in laboratorio del percolato (vedi capitolo 2). La concentrazione dell'acqua SOLWA dipende oltre che al metodo di evaporazione, anche dalla natura stessa del percolato utilizzato come materia prima, il quale varia nel tempo perfino nella stessa discarica. Basandosi dunque sulla  $\text{pK}_a$  dell'equilibrio in esame, pari a 9.15 ad una temperatura di  $28^\circ\text{C}$ , le concentrazioni di  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e  $\text{NH}_3$  risultano rispettivamente pari a 4.08 g/L e 1.986 g/L. Il *flowsheet* impiegato risulta molto semplice (figura 4.2). Il *flash* è necessario per fornire al simulatore un blocco che riproduca l'equilibrio delle specie. Per definire le specie presenti all'equilibrio, si è utilizzata la finestra di dialogo "Electrolytes Wizard" che permette di stabilire le specie ioniche e i sali che si vanno a formare in base ai componenti selezionati, generando le reazioni di equilibrio che avvengono in fase liquida. Tra i componenti disponibili, si è inserita anche la  $\text{CO}_2$ , raffigurata come un'altra *stream* in ingresso al *flash*, è composta da aria con un eccesso di  $\text{CO}_2$  al 5% in volume (l'aria è approssimata con una corrente di  $\text{N}_2$ ).

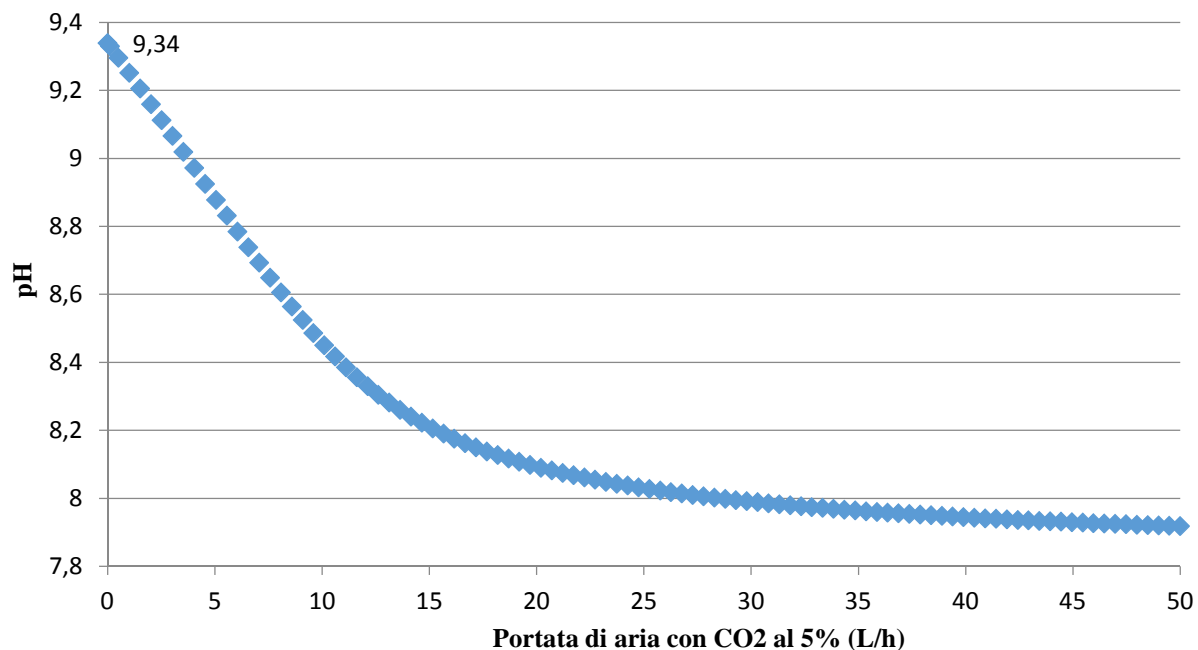


**Figura 4.2.** Flash utilizzato per il calcolo dell'equilibrio.

L'obiettivo dell'anidride carbonica è duplice: da un lato è un apporto essenziale per la fotosintesi delle microalghe, dall'altro contribuisce ad abbassare il pH della soluzione da 9.35 fino a un valore compreso tra 7 e 8, adatto alla coltivazione microalgale. L'equilibrio tra acqua e diossido di carbonio è descritto da:

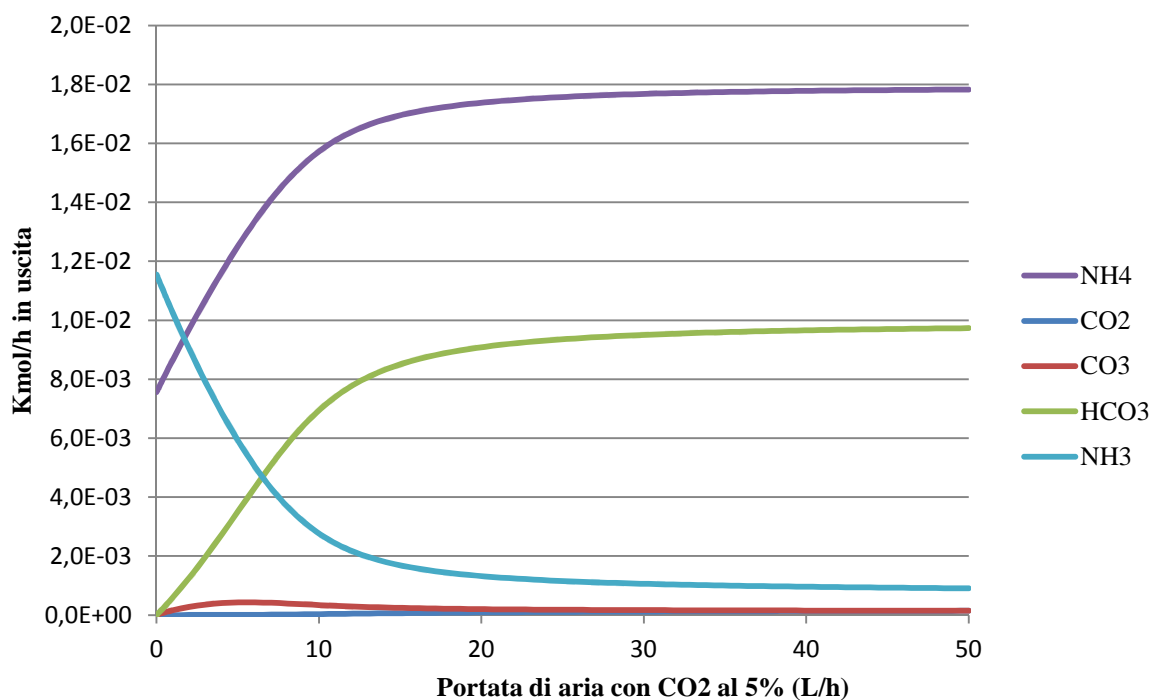


Si è quindi effettuato uno studio di sensitività del valore di pH della soluzione che riproduce l'acqua SOLWA al variare della portata di aria (arricchita con CO<sub>2</sub> al 5%), i cui risultati sono riassunti in figura 4.3. Innanzitutto, si nota come, in assenza di CO<sub>2</sub> (acqua SOLWA tal quale), il pH risulti pari a 9.34, comparabile al valore misurato sperimentalmente. In secondo luogo, all'aumentare della portata di CO<sub>2</sub> si nota un notevole calo iniziale del pH della soluzione liquida in uscita al *flash*, con la tendenza di raggiungere un valore asintotico di pH inferiore ad 8 (figura 4.3). Questo è molto importante per la crescita dell'alga e viene verificato anche sperimentalmente.



**Figura 4.3** Variare del pH con la portata di aria ( N<sub>2</sub> al 95% e CO<sub>2</sub> al 5%)

In figura 4.4 si riportano anche le portate molari dei diversi componenti in uscita nella fase liquida dal *flash* al variare del flusso di aria alimentato. Si può notare che la presenza di CO<sub>2</sub> disciolta è limitata dalla bassissima solubilità di questa sostanza in acqua, mentre la specie ionica di carbonio preponderante è nella forma di ione bicarbonato.



**Figura 4.4** Variazione nelle portate molari in uscita nel liquido al variare della portata di aria..

## 4.2 Simulazione del processo di crescita

L'obiettivo di questa simulazione è di riprodurre, in un caso base, i dati sperimentali ottenuti in laboratorio da un fotobioreattore *flat-panel* continuo, come riportato nel paragrafo 3.5.2. Di seguito si analizzano le scelte fatte per la simulazione e si descrive il *layout* del *flowsheet*.

### 4.2.1 Componenti convenzionali e non convenzionali

I componenti convenzionali coinvolti nella simulazione del processo di crescita sono gli stessi previsti nella simulazione dell'acqua SOLWA dello studio di cui al paragrafo precedente. La concentrazione di azoto ammoniacale nel terreno alimentato è stata posta in questo caso pari a circa 510 mg/L, che rappresenta la concentrazione di N presente nell'acqua SOLWA ottenuta attraverso le serre (e non in laboratorio), ovvero quella utilizzata negli esperimenti descritti nel capitolo 3. La corrente *mixed* di alimentazione in ingresso pari a 10000 L/h è composta quindi da una frazione massiva di  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e  $\text{NH}_3$  che ne garantisce il corretto apporto di N, e da una quantità di sale di idrogenofosfato di potassio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), fonte di P per la crescita della microalga, alle stesse concentrazioni utilizzate sperimentalmente. L'altra *stream* in ingresso al *flash* è una corrente di aria (approssimata con  $\text{N}_2$ ) con una percentuale in volume di anidride carbonica del 5%. Rispetto al precedente studio la portata volumetrica di aria è stata fissata in rapporto alla portata di terreno in alimentazione, facendo riferimento alle portate in ingresso al fotobioreattore utilizzate sperimentalmente. In tal modo si ottiene una portata volumetrica di aria- $\text{CO}_2$  (5% v/v) di 922509 L/h. Il resto dei componenti convenzionali che compaiono nella trattazione sono stati ricavati dalle reazioni di equilibrio tra le varie specie introdotte nel sistema come alimentazione, e sono stati determinati anche in questo caso attraverso lo strumento "*Elec Wizard*" presente in Aspen Plus<sup>TM</sup>. In tabella 4.1 si riassumono i valori dell'alimentazione, che ha una portata totale pari a 10000 L/h.

**Tabella 4.1.** *Composizione delle stream di alimentazione.*

Componenti	Frazione massiva nella portata d'ingresso
H <sub>2</sub> O	0.998
NH <sub>4</sub> CL	$8.49 \cdot 10^{-4}$
NH <sub>3</sub>	$3.5 \cdot 10^{-4}$
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	$6.26 \cdot 10^{-5}$
Frazione volumetrica della corrente gassosa	
N <sub>2</sub>	0.95
CO <sub>2</sub>	0.05

Per quanto concerne il componente “Alga”, il simulatore Aspen Plus<sup>TM</sup> non possiede nei propri database un composto assimilabile a questo. Esso pertanto è stato inserito come composto non convenzionale, specificandone le proprietà quali densità, calore specifico ed entalpia di formazione (Palma 2011). Nel caso base si è impostata una portata di alga in alimentazione pari a 2.5 Kg/h, tale da garantire una concentrazione in ingresso al reattore di 0.25 g/L.

La specie algale presa in esame (*A. obliquus*) può essere considerata simile alla specie *Scenedesmus obliquus* per quanto riguarda la composizione elementare. In particolare, si riporta l’analisi elementare di quest’ultima microalga in tabella 4.2 (Enzo 2012)

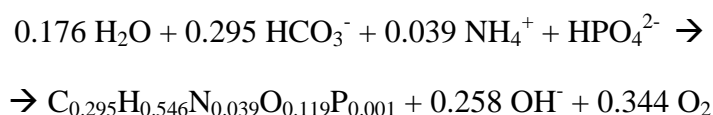
**Tabella 4.2.** *Analisi elementare di S. obliquus (Enzo, 2012).*

Elemento	Frazione ponderale (%)
C	52.1
H	8.04
N	8.05
O	28
P	0.35

Attraverso l’analisi elementare è possibile scrivere la formula bruta dell’alga (su base molare):



Il peso dell’unità monomerica è quindi pari a 6.567 kg/kmol. Inoltre si può scrivere la reazione di crescita della microalga, considerando le sostanze nutritive tra i reagenti e bilanciando le cariche necessarie:



Per quanto riguarda le fonti di P e C, che usualmente dovrebbero essere rappresentate nella reazione dallo ione ortofosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) e dall'anidride carbonica ( $\text{CO}_2$ ) disciolta, si sono fatte delle approssimazioni che verranno spiegate in seguito.

#### 4.2.2 Definizione del reattore e del layout

Come reattore è stato necessario utilizzare un blocco “USER defined”, in quanto si lavora con componenti non convenzionali. Nello specifico si è creata un “Excel Unit Operation Model”, che si interfaccia con il simulatore. Questa unità permette di definire, innanzitutto, alcuni parametri fissi da Aspen Plus<sup>TM</sup>, in questo caso il volume del reattore e la costante cinetica di crescita. Successivamente il foglio di calcolo importa, insieme a tali parametri, i dati relativi alle *stream* in ingresso e, dopo aver svolto gli opportuni calcoli, restituisce in output i valori d'interesse che vengono letti dal simulatore nella *stream* di uscita dal blocco. Nel nostro caso l'unità di Excel simula il fotobioreattore. Il fotobioreattore utilizzato sperimentalmente si comporta come un CSTR, per cui all'interno del foglio Excel si sono scritti i relativi bilanci di materia, in stato stazionario:

$$A = E - U + P - C \quad (4.3)$$

$$0 = \dot{V}C_{X,e} - \dot{V}C_{X,u} + r_X V_R \quad (4.4)$$

$$0 = C_{X,e} - C_{X,u} + r_X \tau \quad (4.5)$$

Nel caso specifico, la velocità di reazione è stata assunta con una cinetica semplice del primo ordine rispetto alla concentrazione di biomassa (senza considerare dunque il possibile effetto di limitazione dovuto alla luce o ai nutrienti), secondo la seguente equazione:

$$r_X = kC_X \quad (4.6)$$

da cui si ricava infine che:

$$C_{X,u} = C_{X,e} / (1 - k\tau) \quad (4.7)$$

Dove  $\tau$  è la variabile operativa chiamata “tempo di permanenza”, ha le dimensioni di un tempo ed esprime il tempo necessario a riempire il volume  $V_R$  con una portata volumetrica  $\dot{V}$ , dunque il tempo medio in cui le cellule microalgali permangono all'interno del reattore. Nel nostro caso  $\tau$  è stato impostato pari a 2.4 d (in accordo con il tempo di permanenza fissato sperimentalmente in laboratorio). Le variabili  $C_{X,u}$  e  $C_{X,e}$  rappresentano la concentrazione di biomassa rispettivamente in uscita e in ingresso al reattore (in g/L). La costante  $k$  rappresenta la costante cinetica della velocità di crescita dell'alga, ed è stata fissata pari a  $0.506 \text{ d}^{-1}$ , in accordo con altri valori di letteratura.

Si è quindi inserita la produzione di biomassa in Excel attraverso l'equazione 4.8, che consente di calcolarla in base alla concentrazione trovata in (4.7).

$$\dot{m}_{x,u} = C_{x,u} \dot{V} \quad (4.8)$$

Il consumo dei reagenti e la produzione di ossigeno sono stati calcolati in Excel a partire dalla stechiometria e dalla velocità di reazione. In particolare, mentre per i componenti non convenzionali la velocità di reazione deve essere espressa in termini ponderali, il consumo e la produzione degli altri composti convenzionali vanno esplicitati in termini molari. Essi sono dunque calcolati dividendo la velocità di produzione di biomassa per il valore del peso molecolare dell'unità monomera, e moltiplicando poi tale valore per il corrispondente coefficiente stechiometrico. Tali valori vengono dunque letti dal simulatore in un apposito foglio di *output*.

Il difetto principale riscontrato nell'utilizzare un'interfaccia come Excel, è che al suo interno non è possibile calcolare l'equilibrio di fase istantaneo e quindi approssimare le concentrazioni delle varie specie in funzione del decorso della reazione. Un chiaro esempio sono lo ione fosfato e l'anidride carbonica, che nella reazione di crescita della biomassa sono stati sostituiti, in questo caso, rispettivamente con lo ione idrogeno fosfato e idrogeno carbonato. Infatti nel primo caso le forme di dissociazione in acqua dell'acido fosforico, derivante dall'aggiunta del sale  $K_2HPO_4$ , sono in costante equilibrio e la forma ionica  $PO_4^{3-}$ , ovvero quella assimilata dalle microalghe, è la meno presente. Simile è il discorso riguardo alla  $CO_2$  che nella realtà, sebbene di per sé poco solubile, avrebbe un continuo equilibrio con le specie ioniche quali carbonato e bicarbonato, il quale tuttavia non è riproducibile dal modello utilizzato. Il consumo di  $PO_4^{3-}$  e di  $CO_2$  risulterebbe dunque, in un modello di reattore così impostato, troppo repentino, e non in grado di garantire una produzione adeguata di biomassa. Questo problema potrebbe essere risolto mediante l'uso di un modello di fotobioreattore di tipo PFR (Plug Flow Reactor), in cui le specie ioniche si riequilibrano lungo il profilo del reattore stesso. Tale modello non è tuttavia, data la maggiore complessità numerica, implementabile in un'unità Excel, e per questo motivo si è deciso di utilizzare altre specie come fonte di P e C rispettivamente, in quanto presenti in concentrazioni maggiori.

L'alga richiede un apporto elevato di C, data la sua natura che ne contiene il 52.1% in peso. Nel caso in esame si è verificato che nemmeno la quantità di  $HCO_3^-$  in equilibrio garantisce, da sola, una fonte sufficiente di questo nutriente, per le stesse motivazioni sopra descritte. Per questo si è reso necessario suddividere il fotobioreattore in più reattori CSTR in serie, intervallati da un'unità di *flash* con l'aggiunta di una corrente di aria del tutto analoga in portata e composizione a quella iniziale, al fine di ricalcolare dopo ogni reattore l'equilibrio della miscela e quindi ristabilire un valore di pH coerente alla situazione reale. Di fatto mediante l'inserimento delle correnti di  $CO_2$  e dei flash intermedi si riproduce una configurazione di fotobioreattore che tende a quella del PFR, e che dunque rappresenta in



modo più preciso ciò che succede nella realtà. Chiaramente, l'aggiunta della corrente d'aria in ogni *flash* è necessaria, in quanto in un sistema reale l'anidride carbonica viene alimentata continuamente.

Si vuole ricordare che un tale sistema di reattori simula il funzionamento di un singolo PBR. Per questo il volume del reattore, che era posto pari a circa 577 m<sup>3</sup> nel caso base (un singolo reattore), è stato diviso per 4 in modo da ottenere il  $\tau$  globale scelto di 2.4 d.

#### 4.2.3 Riciclo e design specification

In ingresso al reattore deve essere alimentata necessariamente una corrente non nulla di alga. Precedentemente, come caso base, si era imposta una corrente di alimentazione di microalga di 2.5 kg/h, tale da ottenere una concentrazione di 0.25 g/L in ingresso al reattore. Nel *flowsheet* finale questa alimentazione viene in realtà fornita attraverso il riciclo di una parte della corrente di biomassa prodotta in uscita dal sistema. Ciò avviene mediante un semplice *split*, che separa la portata in modo da ottenere una concentrazione di 0.25 g/L all'ingresso del primo fotobioreattore, dopo averla unita all'alimentazione (costituita soltanto da acqua SOLWA e fosfati) attraverso un semplice *mixer*. Il rapporto di riciclo necessario per ottenere tale specifica è regolato da una *design specification* imposta al nostro sistema.

Un riciclo di biomassa che non prevede una separazione dal resto dei componenti necessita tuttavia di un'ulteriore specifica, che permetta di regolare la portata di alimentazione del terreno di coltura al sistema in base proprio alla portata di riciclo definita dalla precedente specifica. Nel dettaglio si è quindi imposto di avere una portata d'ingresso al primo reattore costante, e pari a 10000 L/h.

#### 4.2.4 Risultati

I risultati che vengono riportati in questo paragrafo, rappresentano solo i valori ottenuti dal sistema finale, raffigurato in figura 4.5, soggetto alle specifiche sopra riportate. La concentrazione di biomassa e la produttività ottenute sono rispettivamente di 1.08 g/L e 0.451 gL<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, con una frazione di riciclo di 0.233 (rapporto tra la portata di riciclo e quella in uscita dall'ultimo *flash*, rispettivamente di 2310 L/h e 9909 L/h).

I consumi dell'azoto e del fosforo sono riassunti in tabella 4.3

**Tabella 4.3.** Consumi dei nutrienti.

	Concentrazioni in ingresso	Concentrazioni in uscita	Delta consumo	%
<b>N</b>	510 mg/L	409 mg/L	101 mg/L	19.7
<b>P</b>	11.1 mg/L	6.17 mg/L	4.93 mg/L	44.4

Si riportano anche i valori del pH simulati nelle *streams* (Tab. 4.4), poiché questo è un parametro importante per la crescita dell'alga. Il pH è stato calcolato come:

$$pH = -\log \dot{n}/\dot{V} \quad (4.9)$$

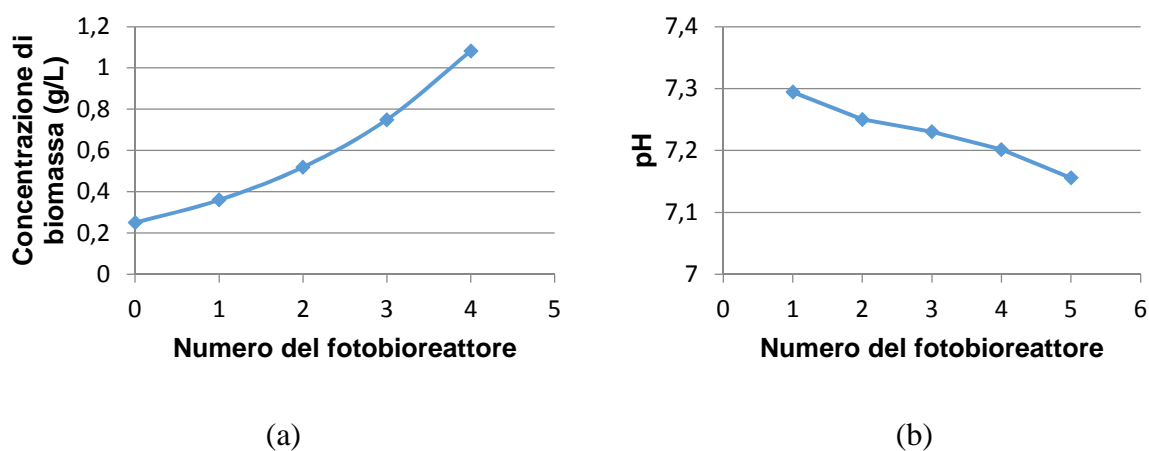
Dove  $\dot{n}$  è la portata molare di ioni  $H_3O^+$  (mol/h), mentre  $\dot{V}$  rappresenta la portata volumetrica della corrispettiva *stream* (L/h).

**Tabella 4.4.** Valori di pH per alcune streams.

	Alimentazione	Post mixer	OUT PBR1	OUT PBR2	OUT PBR3	OUTPBR4	OUT
pH	9.35	9.13	7.29	7.25	7.23	7.20	7.16

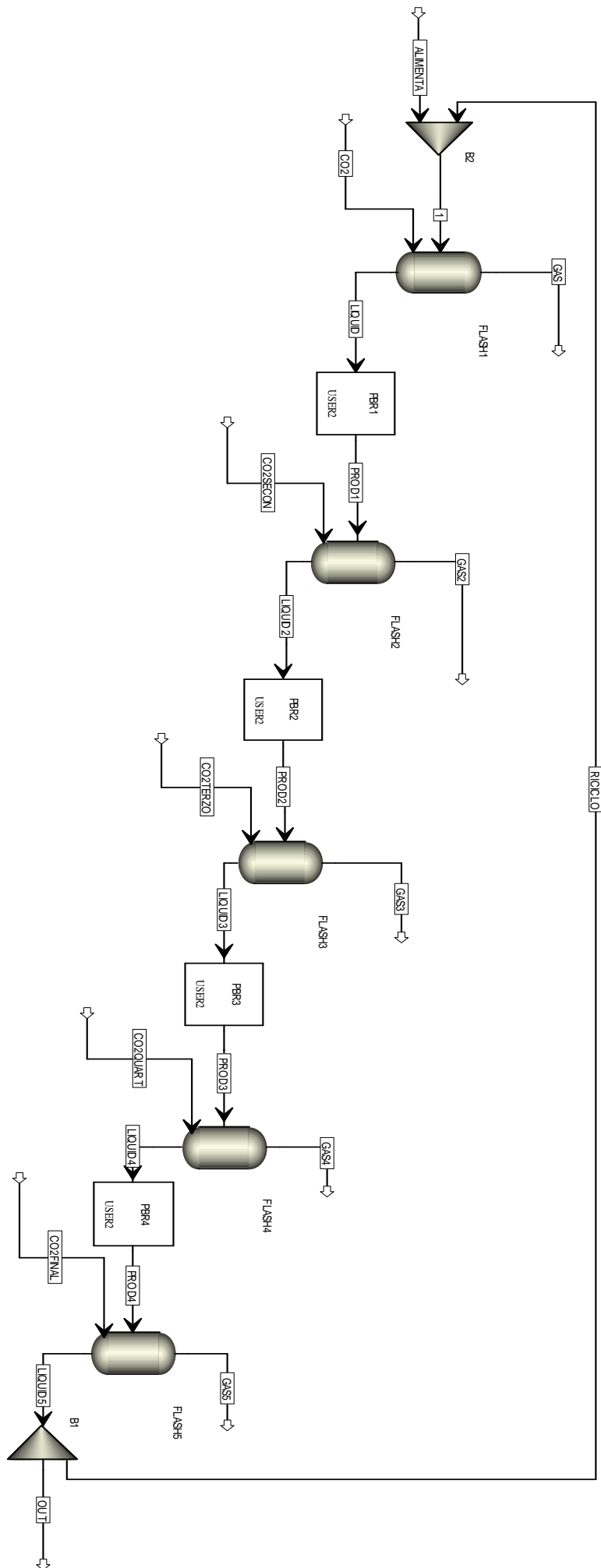
Si vede che i risultati riproducono in modo soddisfacente i valori ottenuti sperimentalmente, in cui la concentrazione di biomassa e la produttività risultavano pari a 1.115 g/L ( $\pm 0.066$ ) e 0.485 gL<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Anche per quanto riguarda i consumi di nutrienti, i dati di consumo calcolati sono fedeli a quelli sperimentali, pari a 133 mg/L per il N e 5.66 mg/L per il P (vedi paragrafo 3.5.2).

Il modello proposto costituisce dunque una buona base per la simulazione della crescita di microalghe in un fotobioreattore continuo e, in prospettive future, può essere utile per diversi casi di studio in cui far variare il tempo di permanenza o la *split fraction*, in modo tale da garantire una concentrazione maggiore di biomassa in ingresso al fotobioreattore e un conseguente aumento dei consumi dell'azoto. Per quanto i risultati attuali siano lontani dai limiti di scarico consentiti, fissati a 11.67 mg/L in acqua superficiale e 23.3 mg/L in rete fognaria, si potrebbero così ricercare delle condizioni operative tali da raggiungere questi valori. In figura 4.6 si riportano i profilo di pH e di produzione di biomassa simulati nel processo.



**Figura 4.6** Il profilo della concentrazione di biomassa in uscita da ogni PBR (a);  
in (b) la variazione del pH lungo il processo.

**Figura 4.5** Flowsheet finale del processo.





# Conclusioni

Lo scopo di questa tesi è valutare le possibilità di impiegare le microalghe per la depurazione degli inquinanti (principalmente azoto) presenti tipicamente in un percolato di discarica. Lo studio si compone di un'attività sperimentale, seguita da una parte di simulazione di processo. L'intento principale del lavoro sperimentale era di misurare la crescita di *A. obliquus* in terreni ricchi di N ammoniacale. Nello specifico si è verificato che la crescita in percolato tal quale è possibile solo lavorando con opportune diluizioni, e risulta comunque ridotta, anche se si è dimostrato che l'alga è in grado di sfruttare i nutrienti contenuti nel terreno. Nel caso di crescita in acqua SOLWA, *A. obliquus* ha mostrato una soddisfacente tolleranza a terreni con contenuti elevati di ammoniaca, consumando circa il 50% dell'azoto iniziale presente, ma richiedendo tuttavia l'aggiunta di P e altri micronutrienti. Di particolare interesse sono i risultati ottenuti dai terreni combinati, in cui si aggiunge all'acqua SOLWA una quantità di percolato tal quale, a diverse diluizioni, come fonte di tali micronutrienti. Anche in questo caso si è verificata una crescita microalgale che, sebbene inferiore al caso precedente, presenta valori accettabili.

Dagli esperimenti in continuo è emerso che l'utilizzo di un terreno composto da acqua SOLWA e percolato non è sufficiente a garantire una produzione di biomassa e un consumo di azoto tali da rientrare nei parametri di legge per la qualità dello scarico, nemmeno a tempi di residenza elevati (3.3 d).

L'utilizzo di acqua SOLWA con l'aggiunta dei nutrienti necessari in forma di sali inorganici ha consentito un lieve miglioramento in termini di produttività e consumo, che però è ancora lontano dagli obiettivi prefissati.

Al fine di poter fare delle valutazioni sull'impiego di tale processo a livello industriale si è impostato in Aspen Plus<sup>TM</sup> un *flowsheet* per simulare e riprodurre i valori sperimentali ottenuti nel reattore continuo. Nonostante le approssimazioni adottate, i calcoli della simulazione non si discostano molto dai risultati sperimentali. La configurazione proposta potrebbe dunque essere utilizzata come base per la valutazione dell'influenza delle variabili operative sulle performance del processo. Tuttavia, questo studio è stato limitato dall'utilizzo di un blocco Excel per la modellazione del fotobioreattore, che ha costretto ad adottare accorgimenti particolari. L'implementazione dello stesso in un blocco Fortran consentirebbe una modellazione più accurata.



# Riferimenti bibliografici

Abeliovich, A., e Y. Azov. «Toxicity of ammonia to algae in sewage oxidation ponds.» *Applied Environmental Microbiology*, 1976: 31, 801-806.

Adamsson, M., G. Dave, L. Forsberg, e B. Guterman. «Toxicity identification evaluation of ammonia, nitrite and heavy metals at the Stensund Wastewater Aquaculture plant, Sweden.» *Water Science and Technology*, 1998: 38, 151-157.

Azov, Y., e J.C. Goldman. «Free ammonia inhibition of algae photosynthesis in intensive cultures.» *Applied Environmental Microbiology*, 1982: 43, 735-739.

Cheung, K.C., L.M. Chu, M.H. Wong, e . «Toxic effect of landfill leachate on microalgae.» *Water, Air and Soil Pollution*, 1993: 69, 337-349.

Chevalier, P., e J. de la Noue. «Wastewater nutrient removal with microalgae immobilized in carrageenan.» *Enzyme Microb. Technol*, 1985a: 7, 621-624.

Cohen, Y. «Biofiltration – the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material.» *Bioresource Technology*, 2001: 77, 257-274.

de la Noue, J., e N. De Pauw. «The potential of microalgal biotechnology: a review of production and uses of microalgae.» *Biotechnol. Adv.*, 1988: 6, 725-770.

de-Bashan, L.E., e Y. Bashan. «Recent advances in removing phosphorus from wastewater and its future use as fertilizer (1997-2003).» *Water Res.*, 2004: 4222-4246.

de-Bashan, Luz E., e Yoav Bashan. «Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects.» *Bioresource Technology*, 2010: 1611-1627.

Enzo, M. «Sviluppo di un impianto pilota per la produzione di microalghe: misure di laboratorio e progetto di impianto.» *Tesi di Laurea in Ingegneria Chimica e dei Processi Industriali*. DII, Università di Padova., 2012.

Ferrigo, Davide, Giulio Galla, Eleonora Sforza, Tomas Morosinotto, Gianni Barcaccia, e Cristina Ceschi Berrini. «Biochemical characterization and genetic identity of an oil-rich *Acutodesmus obliquus* isolate.» *Springer Science+ Business Media Dordrecht*, 2014.

- 
- Kallqvist, T., e A. Svenson. «Assessment of ammonia toxicity in tests with the microalga, *Nephroselmis pyriformis* Chlorophyta.» *Water Research*, 2003: 37, 477-484.
- Kessler, E. «Scenedesmus: problems of a highly variable genus of green algae.» *Bot Acta*, 1991: 104, 169-171.
- Khan, Masil, e Naoto Yoshida. «Effect of l-glutamic acid on the growth and ammonium removal from ammonium solution and natural wastewater by *Chlorella vulgaris* NTM06.» *Bioresource Technology*, 2008: 575-582.
- Li, Yecong, et al. «Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production.» *Bioresource Technology*, 2011a: 5138-5144.
- Li, Yecong, Wenguang Zhou, Bing Hu, Min Min, Paul Chen, e Roger R. Ruan. «Integration of algae cultivation as biodiesel production feedstock with municipal wastewater treatment: Strains screening and significance evaluation of environmental factors.» *Bioresource Technology*, 2011b: 10861-10867.
- Lin, L., G.Y.S. Chan, B.L. Jiang, e C.Y. Lam. «Use of ammoniacal nitrogen tolerant microalgae in landfill leachate treatment.» *Waste Management*, 2007: 27, 1376-1382.
- Markou, Giorgos, Dries Vandamme, Koenraad Muylaert, e . «Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients.» *ScienceDirect*, 2014: 65, 186-202.
- Moreno-Garrido, I. «Microalgae immobilization: current techniques and uses.» *Bioresource Technology*, 2008: 99, 3949-3964.
- Mustafa, Emienour-Muzalina, Siew-Moi Phang, Wan-Loy Chu, e . «Use of an algal consortium of five algae in the treatment of a landfill leachate using the high-rate algal pond system.» *J Appl Phycol*, 2012: 24, 953-963.
- Oh-Hama, T., e S. Miyachi. *Chlorella*. Cambridge: Borowitzka editors, 1988.
- Palma, Gianmarco. «Produzione di microalghe in fotobioreattori: influenza della luce e sfruttamento della biomassa esausta.» *Tesi di Laurea in Ingegneria Chimica e dei Processi Industriali*. DII Università di Padova, 2011.
- Perales-Vela, Hugo Virgilio, Julian Mario Pena Castro, Rosa Olivia Canizares-Villanueva, e . «Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae.» *Chemosphere*, 2006: 64, 1-10.



Przytocka-Jusiak, M., M. Duszota, K. Matusiak, e R. Mycielski. «Intensive culture of *Chlorella vulgaris*/AA as the second stage of biological purification of nitrogen industry wastewaters.» *Water Research*, 1984: 18, 1-7.

Sforza, Eleonora, Mohammed-Hassan Khairallah Al Emara, Adel Sharif, e Alberto Bertucco. «Exploitation of urban landfill leachate as nutrient source for microalgal biomass production.» *Chemical Engineering Transactions*, 2015: vol. 43.

Stratful, I., S. Brett, M.B. Scrimshaw, e J.N Lester. «Biological phosphorus removal, its role in phosphorus recycling.» *Envir.Technol.*, 1999: 20, 681-695.

Voltolina, D., B. Cordero, M. Nieves, e L.P. Soto. «Growth of *Scenedesmus* sp. in artificial wastewater.» *Bioresour. Technol.* , 1999: 68, 265–268.

Voltolina, D., Gomez-Villa, H., Correa, G. «Biomass production and nutrient removal in semicontinuous cultures of *Scenedesmus* sp. (Chlorophyceae) in artificial wastewater, under a simulated day–night cycle.» *Vie Milieu* , 2004: 54, 21–25.

Zhang, L.Y, e J.L Han. «Detection and removal of organic pollutants in refuse leaching.» *China Environmental Sciencia*, 1998: 18, 184-188.

Zhao, Xin, et al. «Characterization of microalgae-bacteria consortium cultured in landfill leachate for carbon fixation and lipid production.» *Biosource Technology*, 2014: 156, 322-328.

Decreto legislativo governo 03.04.2006 n. 152

Decreto legislativo 13 gennaio 2003, n. 36

SOLWA Srl. . «Materiale interno all'azienda.»