



Ricerca di Sistema elettrico

Controlli chimico-analitici relativi allo sviluppo dell'integrazione di microalghe in processi produttivi di biogas

A. Bianco, A. Venditti

CONTROLLI CHIMICO-ANALITICI RELATIVI ALLO SVILUPPO DELL'INTEGRAZIONE DI MICROALGHE IN PROCESSI
PRODUTTIVI DI BIOGAS

Armandodoriano Bianco, Alessandro Venditti (Università di Roma "La Sapienza")

Settembre 2015

Report Ricerca di Sistema Elettrico

Accordo di Programma Ministero dello Sviluppo Economico - ENEA

Piano Annuale di Realizzazione 2014

Area: Produzione di energia elettrica e protezione dell'ambiente

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

Obiettivo: Sviluppo di sistemi per la produzione di biocombustibili

Responsabile del Progetto: Vito Pignatelli, ENEA.

Il presente documento descrive le attività di ricerca svolte all'interno dell'Accordo di collaborazione "Caratterizzazione di colture microalgali prodotte con l'ausilio di digestato liquido derivante da digestione anaerobica"

Responsabile scientifico ENEA: Fabio Barbato

Responsabile scientifico Università: Armandodoriano Bianco

Si ringrazia il personale del Dipartimento di Chimica dell'Università di Roma "La Sapienza" per il contributo in alcune determinazioni analitiche.

Indice

SOMMARIO.....	4
1 INTRODUZIONE.....	5
2 DESCRIZIONE DELLE ATTIVITÀ SVOLTE E RISULTATI.....	6
2.1 METODI.....	6
2.2 TABELLE DEI RISULTATI.....	7
2.2.1 <i>Tabelle relative ai campioni di decantato</i>	7
2.2.2 <i>Tabella relativa al campione di digestato</i>	8
2.3 DISCUSSIONE DEI RISULTATI ANALITICI.....	8
3 CONCLUSIONI.....	10
4 BIBLIOGRAFIA.....	11
CURRICULUM SCIENTIFICO DEL GRUPPO DI LAVORO IMPEGNATO NELL'ATTIVITÀ.....	12

Sommario

Questa ricerca riguarda l'attività di studio e sperimentazione di sistemi per la produzione di microalghe, da inserire a valle del processo di DA, al fine di definire le condizioni operative da adottare per ottenere migliori risultati in termini di resa energetica, economica ed ambientale, valutare la riduzione del contenuto in nutrienti, in termini di azoto, fosforo e potassio, degli effluenti liquidi e massimizzare la produzione di biomassa algale da riciclare nei digestori.

Nel presente documento vengono descritti e riportati i metodi e i risultati preliminari delle determinazioni analitiche svolte sulle acque di risulta ottenute dai processi di separazione della biomassa algale, nonché sul digestato liquido proveniente da un impianto a biogas, impiegato come fertilizzante delle colture microalgali.

Sono state inoltre analizzate una serie di campioni algali, prodotti nella struttura ENEA della Casaccia, per determinarne la quantità di biomassa secca e la composizione in proteine, lipidi, carboidrati e componente inorganica.

1 Introduzione

Nel panorama mondiale delle innovazioni più promettenti per il settore delle fonti rinnovabili di energia, un ruolo di primo piano è ricoperto dalla valorizzazione a fini energetici delle microalghe, con numerosi gruppi di ricerca pubblici e privati, impegnati a migliorare i processi produttivi connessi alla coltivazione di questa categoria di microorganismi acquatici e al loro impiego per la produzione di energia e/o biocombustibili.

Fra le caratteristiche di interesse delle microalghe, la più importante è l'elevatissima efficienza di produzione. Si stima che la produttività delle alghe per anno e per ettaro sia dalle 5 alle 30 volte superiore a quella delle piante terrestri [1]. Inoltre possono essere utilizzate per la produzione di diversi biocombustibili come il biogas, in quanto questo rappresenta un prodotto energetico di relativamente facile produzione, flessibile e che non richiede impianti complessi quali le raffinerie, necessarie per la produzione, come ad esempio per il biodiesel. Inoltre, mediante opportune purificazioni, può rappresentare un sostituto del gas metano naturale, prendendo il nome di biometano ed essere impiegato anche a fini di autotrazione. Le microalghe risultano adatte per essere sottoposte a digestione anaerobica a causa dell'assenza di lignina, che è un composto organico difficile da digerire molto spesso presente in matrici vegetali di origine terrestre [1,2].

Vi sono, tuttavia, aspetti che risultano problematici nell'ambito di una coltivazione di microalghe su scala commerciale. In particolare, per quanto riguarda l'aspetto chimico, le condizioni ottimali di coltivazione per ottenere una maggiore produzione di biomassa algale.

2 Descrizione delle attività svolte e risultati

I campioni algali vengono analizzati per determinarne:

- 1) biomassa totale: questo parametro permette di valutare la quantità totale di alghe sviluppatesi ed è un parametro importante per valutare le migliori condizioni di crescita per quanto riguarda la concentrazione dei nutrienti primari, che comunque vanno considerate insieme alle condizioni ambientali quali: temperatura ambiente, ore di esposizione alla luce solare, sua intensità, PAR ecc.
- 2) composizione del materiale algale (proteine, lipidi, carboidrati e componente inorganica): le informazioni sulla composizione in tali sostanze può permettere di valutare l' utilizzo come materiale di partenza per la produzione di biocombustibili.
- 3) Le acque di risulta, ottenute dopo la separazione della biomassa algale, vengono analizzate per determinare la quantità di nutrienti residui presenti (N; P; K). La valutazione dei nutrienti residui nelle acque di risulta permette peraltro di valutare eventuali nutrienti limitanti la crescita. Inoltre è possibile evidenziare quali elementi vengono consumati in modo maggiore dalle alghe durante il periodo vegetativo e valutare un eventuale uso delle acque di risulta per pratiche di fertirrigazione.
- 4) Le analisi della composizione in N, P, K del digestato liquido utilizzato come fertilizzante permettono di valutarne le potenzialità per questo utilizzo e quindi ottimizzarne i dosaggi, anche in base alle differenti partite di provenienza, che, come noto, differiscono soprattutto in base ai differenti input di alimentazione per i digestori, variabili nel tempo.

La valutazione globale dei dati raccolti fornisce indicazioni sulle condizioni nutritive ottimali per lo sviluppo di biomassa algale ed anche sulla composizione in proteine, lipidi e carboidrati, della stessa.

Diviene possibile inoltre valutare quali nutrienti fondamentali (N, P, K) risultano limitanti per una corretta crescita e sviluppo del materiale algale e se particolari condizioni di crescita possono favorire l'accumulo preferenziale di uno o più metaboliti primari (proteine, lipidi, carboidrati).

2.1 Metodi

Il recupero della biomassa dal decantato e dalle acque di risulta è stato effettuato per filtrazione sotto vuoto, su carta da filtro tipo Whatman fascia blu (pore size <math>< 2 \mu\text{m}</math> - Particle retention).

I "panelli" derivati dalla filtrazione sono stati mantenuti in essiccatore ad una temperatura di 45° C fino a completo essiccamento e peso costante prima di annotare i risultati.

L'estrazione della frazione lipidica totale viene effettuata sul materiale algale perfettamente essiccato mediante estrazione con diclorometano in Soxhlet protratta per minimo 12 ore [3]. Il contenuto in lipidi è determinato per via gravimetrica dopo aver eliminato completamente il solvente a pressione ridotta.

La determinazione del contenuto totale di azoto viene condotta sul materiale algale essiccato e sul residuo secco derivato dall'evaporazione delle acque di risulta (previamente private della frazione filtrabile di biomassa) utilizzando il metodo Kjeldhal [4, 5].

Le analisi su P e K sono effettuate seguendo i metodi analitici ufficialmente riconosciuti per la determinazione di tali elementi [6, 7].

I residui secchi derivati dalle acque di risulta, dopo recupero della biomassa algale, vengono calcolati su aliquote di filtrato (100 mL oppure 50 mL) dopo evaporazione del solvente a pressione ridotta ed essiccamento dei palloni di raccolta in stufa a 120°C, in modo da allontanare le tracce di acqua residua.

Le determinazioni N, P, K effettuate sui residui vengono condotte utilizzando le stesse metodiche sopra riportate [4, 5, 6, 7].

2.2 Tabelle dei risultati

Nelle tabelle seguenti sono indicati di seguito l'identificativo del campione fornito da ENEA e i risultati analitici ottenuti.

2.2.1 Tabelle relative ai campioni di decantato

Tabella 1. Biomasse da filtrato

ID ENEA	ID	Volume tot, L	Biomassa, g
15 - 1	11-06-15 Filtrato	1,96	3,8702
15 - 2	26-06-15 Filtrato	1,88	3,1244
15 - 3	27-07-15 Filtrato	1,97	2,148
15 - 4	06-08-15 Filtrato	1,89	2,0608
15 - 5	10-09-15 Filtrato	1,90	2,6680

Tabella 2. Composizione biomasse microalgali filtrate

ID ENEA	ID	Proteine, tot. %	Lipidi tot.%	Ceneri %*	Carboidrati tot. %*
15 - 1	11-06-15	29,8	3,3	12,1	54,8
15 - 2	26-06-15	30,3	2,9	21,3	45,5
15 - 3	27-07-15	31,2	3,5	9,8	55,5
15 - 4	06-08-15	29,5	4,0	15,2	51,3
15 - 5	10-09-15	31,0	3,7	13,0	52,3

* dato provvisorio da confermare

Tabella 3. Biomasse da acque di risulta

ID ENEA	ID	Volume tot, L	Biomassa, g
15 - 1	11-06-15 Risulta	3,80	0,157
15 - 2	26-06-15 Risulta	4,06	0,037
15 - 3	27-07-15 Risulta	3,80	0,016
15 - 4	06-08-15 Risulta	3,85	0,018
15 - 5	10-09-15	3,79	0,00

Tabella 4. Nutrienti nelle acque di risulta

ID ENEA	ID	Residuo secco g/L	azoto tot mg/L	NaNO ₃ mg/L	P ₂ O ₅ mg/L	PO ₄ ⁻³ mg/L	K ⁺ g/L	K ₂ O g/L
15 - 1	11-06-15 Risulta	0,502	27,50	83,5	24,3	32,5	0,1502	0,3621
15 - 2	26-06-15 Risulta	0,492	0	0	76,1	101,8	0,1017	0,2453
15 - 3	27-07-15 Risulta	0,170	49,51	150,3	0	0	0,1090	0,2628
15 - 4	06-08-15 Risulta	0,169	31,16	94,6	121,3	162,3	0,0606	0,1460
15 - 5	10-09-15 Risulta	0,152	0	0	36,5	48,85	0,0905	0,2180

2.2.2 Tabella relativa al campione di digestato

Tabella 5. Valori relativi al campione di digestato

Digestato	Residuo secco, g/L	N, mg/g	P, g/L	K, g/L
Palombini 2015	58,4	Azoto tot,= 12,5 NaNO ₃ = 24,0 NH ₃ = 0	P ₂ O ₅ = 1,42 PO ₄ ⁻³ = 1,84	K ⁺ = 4,41 K ₂ O = 10,85

2.3 Discussione dei risultati analitici

Per quanto riguarda l'analisi della biomassa totale il recupero delle microalghe mediante filtrazione sottovuoto avviene in questo secondo stadio della ricerca, relativo all'impiego di vasche da 1500 L, con particolare difficoltà, in quanto i campioni di microalghe forniti hanno dimensioni particolarmente ridotte, rallentando notevolmente la filtrazione.

Questo aspetto, negativo per quanto riguarda la velocità e semplicità del processo di recupero della biomassa algale, rappresenta un importante svantaggio in termini di tempi di lavorazione, che diventa molto più incidente quando i volumi di acque di coltura da filtrare diventano importanti, come nel caso di colture in vasca in pieno campo. Stiamo valutando altri metodi di separazione che risultino più veloci ed economici.

Per quanto riguarda le quantità di biomassa recuperate, i vari campioni analizzati danno, in questo secondo studio, contrariamente allo studio precedente riguardante fertilizzazioni diversificate (annata 2013), risultati abbastanza comparabili. Si va da un massimo di 3,87 grammi del campione del 11 giugno ad un minimo di circa 2,06 g del campione del 06 agosto.

La composizione in azoto proteico, lipidi, carboidrati e materiale inorganico (determinato come ceneri) è risultata invece, ancora una volta piuttosto costante. In particolare il contenuto in azoto proteico si attesta mediamente al 30%. Il valore medio intorno al 30% per il contenuto di azoto proteico è in accordo con quanto precedentemente trovato per questa specie da Gonzalez et al. (2010) [9].

Il contenuto in lipidi è variato da circa il 2,9% nel campione del 26 giugno al 4,0% del campione del 6 agosto. Questi valori sono sufficientemente in accordo con quanto riportato in letteratura [8] per quanto riguarda il contenuto lipidico di *Scenedesmus* sp. attestandosi tuttavia verso i valori più bassi riportati nella suddetta review, riferiti alla specie *S. quadricauda* [8]. In figura 1 è riportato un estratto della tabella con le composizioni riportate nel lavoro citato.

<i>Scenedesmus obliquus</i>	11,0-55,0
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	1,5-18,4
<i>Scenedesmus</i> sp.	19,6-21,1

Figura 1. Contenuto lipidico in *Scenedesmus* sp. [8]

In un recente lavoro di Xin et al. [10] viene riportato che in *Scenedesmus* si ha un aumento della percentuale di lipidi fino al 30%, in condizioni di carenza di azoto e fosforo. Nei campioni da noi analizzati non abbiamo osservato questo fenomeno, probabilmente dovuto alla contemporanea assenza di due elementi (N, P). Infatti nei campioni analizzati il fosforo è risultato sempre presente, tranne che per il campione del 27 luglio che però mostra un contenuto in lipidi del 3,5%.

Dall'analisi delle ceneri si sono avuti risultati questa volta non troppo differenti per i vari campioni algali, ottenendo percentuali che vanno dal 9,8% del campione del 27 luglio, al 21,3% del campione del 26 giugno. Il contenuto in carboidrati, considerando i valori ottenuti nelle altre determinazioni, è risultato compreso tra il 45,5% del campione del 26 giugno ed il 55,5% del campione del 27 luglio. Dall'analisi dei dati si nota

questa volta una modesta variazione del contenuto in carboidrati, che però rientra nei valori percentuali riportati in letteratura per *Scenedesmus* sp. [11].

Dalle analisi effettuate sul residuo secco ottenuto dalle acque di risulta per determinarne il contenuto in nutrienti N, P, K, è risultato che tutti i campioni non contengono azoto ammoniacale, ovviamente nei limiti di sensibilità del metodo. Due campioni risultano anche completamente esenti da azoto nitrico (campione 26 giugno e 10 settembre).

In tutti i campioni, invece, è sempre stato possibile ritrovare sia fosforo che potassio, tranne il campione del 26 giugno in cui il fosforo risulta assente. Questo risultato sembra confermare che è l'azoto il probabile elemento chiave per la crescita microalgale.

Per quanto riguarda le analisi effettuate sul nuovo digestato abbiamo ottenuto risultati che corrispondono sempre solo parzialmente a quanto riportato nel Rapporto a cura del Consorzio Italiano Bio-Gas [12]. Tuttavia è da ricordare che in questo caso abbiamo controllato un solo campione, l'unico impiegato in tutte le prove di coltura microalgale effettuate.

Risulta evidente che i dati da noi trovati per il campione di digestato si attestano a valori che possiamo considerare medi per quanto riguarda il contenuto di azoto nitrico, di fosforo e potassio, mentre risulta assente l'azoto ammoniacale.

Questo risultato può essere dovuto al fatto che l'ammoniaca è un gas a condizioni normali e può liberarsi dal campione. Inoltre è da tenere presente che il pH del digestato è risultato essere alcalino (come nel precedente campione del 2013), condizione che favorisce l'eliminazione dell'ammoniaca.

Il residuo secco ottenuto è di 58,5 g/L rispetto ai 74 g/L del precedente campione ed è abbastanza in linea con quanto riportato mediamente per frazioni chiarificate di digestato [12].

3 Conclusioni

Dai dati a disposizione si rileva ancora una volta un forte consumo di azoto da parte delle alghe in presenza di digestato (vedi i dati del contenuto di azoto nelle acque di risulta).

Come riportato nella precedente relazione del 2013, sarebbe da aggiungere periodicamente un'aliquota di digestato per reintegrare il contenuto di azoto.

Tuttavia un fattore importante è rappresentato dalla colorazione del digestato, che oltre una certa concentrazione contribuisce ad "opacizzare" il medium di coltura impedendo una ottimale penetrazione della luce e quindi una corretta illuminazione per il normale sviluppo delle microalghe. A tale proposito sarebbe auspicabile controllare con misure colorimetriche, come influisca l'opacità del mezzo di coltura andando a valutare l'intensità luminosa all'interno della soluzione di crescita a diverse concentrazioni di digestato aggiunto.

In conclusione, per una valutazione complessiva ed esaustiva della problematica della crescita delle microalghe, sarebbe auspicabile analizzare un numero maggiore di campioni sia di digestato che di microalghe.

Nel caso dei campioni esaminati sono state messe in opera vasche da 1500 L di coltura e questo permette certamente una maggiore facilità e omogeneità nei prelievi dei campioni. Il fattore limitante in questa fase della ricerca è stato il relativamente breve periodo di raccolta dei campioni e il breve tempo rimasto per interpretare i risultati analitici.

In ogni caso i dati riportati in questa relazione saranno ricontrollati, specialmente nei casi in cui si riscontrano delle potenziali incongruenze, e i risultati saranno riportati in successive relazioni integrative della presente.

4 Bibliografia

- [1] Schenk, P.M., Thomas-Hall, S.R., Stephens, E., Marx, U.C., Mussgnug, J.H., Posten, C., Kruse, O., Hankamer, B., 2008. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *BioEnergy Research* 1, 20–43.
- [2] C. Ryan, 2009. *Cultivating Clean Energy: The Promise of Algae Biofuels*. Report of Natural Resources Defense Council (NRDC), pp 81.
- [3] Martinez, M. J.; Crespi, M., “Soxtec lipids extraction from cotton from different producing areas. Comparison of dichloromethane or successive dichloromethane-methanol extractions”. *Grasas y Aceites (Sevilla)* (1997), 48(4), 226-230.
- [4] Lynch, Joanna M.; Barbano, David M., “Kjeldahl nitrogen analysis as a reference method for protein determination in dairy products”. *Journal of AOAC International* (1999), 82(6), 1389-1398.
- [5] Worner, Martin; Sieper, Hans Peter, “Nitrogen-/protein determination in feed”. *LaborPraxis* (1997), 21(11), 90-92.
- [6] Strzemiński, K., “Total and radioactive phosphorus determination in small plant samples with the gravimetric method of Lorenz.” *New Zealand Journal of Science and Technology, Section A: Agricultural Research Section* (1955), 37B, 243-57.
- [7] Vielhauer, S., “Results of previous work on potassium determination by the ISO [international Standardization Organization] (potassium chloride potassium sulfate)” *Landwirtschaftliche Forschung, Sonderheft* (1969), 23(11), 171-6.
- [8] Mata, T. M.; Martins, A. A., *Biodiesel production processes*. Edited by Delgado, J. M. P. Q *Current Trends in Chemical Engineering* (2010), 313-342.
- [9] Gonzalez Lopez, Cynthia Victoria; Ceron Garcia, Maria del Carmen; Fernandez, Francisco Gabriel Acien; Bustos, Cristina Segovia; Chisti, Yusuf; Sevilla, Jose Maria Fernandez, Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass, *Bioresource Technology* (2010), 101(19), 7587-7591.
- [10] Xin Li, Hong-ying Hu, Ke Gan, Ying-xue Sun, Effects of different nitrogen and phosphorus concentration on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology* 101 (2010), 5494-5500.
- [11] Shih-Hsin Ho, Akihiko Kondo, Tomohisa Hasunuma, Jo-Shu Chang, “Engineering strategies for improving the CO₂ fixation and carbohydrate productivity of *Scenedesmus obliquus* CNW-N used for bioethanol fermentation.” *Bioresource Technology*, 143 (2013), 163-171.
- [12] *Speciale Tecnico Quale Energia - Il biogas che fa bene al paese: guida ad una fonte rinnovabile virtuosa per l'ambiente.- A cura del Consorzio Italiano Bio-Gas. Dicembre 2012.*

Curriculum scientifico del gruppo di lavoro impegnato nell'attività

Il dottor Armandodoriano Bianco, nato a Roma il 5 gennaio 1947, si è laureato in Chimica con voti 110 su 110 e lode il 19 dicembre 1970, presso l'Università di Roma La Sapienza, dove ha svolto la sua carriera accademica.

E' professore ordinario, titolare della cattedra di Chimica delle sostanze organiche naturali presso la Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali (MFN) dell'Università di Roma La Sapienza, dove gli sono stati affidati diversi insegnamenti facenti capo al raggruppamento della Chimica Organica.

La sua carriera accademica inizia con una borsa di addestramento alla ricerca del CNR, poi viene nominato assistente incaricato. In seguito risulta vincitore del concorso ad assistente ordinario alla Cattedra di Esercitazioni di Chimica organica e Analisi organica. Sotto questa qualifica gli viene affidato l'incarico di insegnamento di Chimica delle sostanze naturali, per poi essere nominato professore incaricato stabilizzato. Risulta poi vincitore del concorso a professore associato e successivamente a professore ordinario.

Ha ricoperto e ricopre attualmente diversi incarichi istituzionali nell'ambito della Facoltà di Scienze MFN e del Dipartimento di Chimica. E' stato direttore della Scuola di Specializzazione in Chimica e Tecnologia delle Sostanze Organiche Naturali della Facoltà di Scienze MFN ed è attualmente direttore del Master interfacoltà (Facoltà di Scienze MFN e Facoltà di Farmacia e Medicina) in Sostanze organiche naturali dell'Università di Roma La Sapienza. E' presidente del Consiglio di Area Didattica in Chimica Industriale.

Ha ricoperto e ricopre diversi incarichi istituzionali nella Società Chimica Italiana (SCI), fra cui la presidenza della Sezione Lazio della Società medesima.

E' autore di oltre quattrocento lavori, fra pubblicazioni a stampa, brevetti e comunicazioni a congressi, nell'ambito della chimica delle sostanze organiche naturali ed è stato invitato a tenere relazioni (oltre settanta) in numerosi convegni nazionali ed internazionali. E' stato ed è titolare di contratti di ricerca con Istituti pubblici e privati ed ha coordinato e coordina numerosi progetti di ricerca finanziati dall'Università di Roma "La Sapienza", dal Ministero dell'Università e della Ricerca Scientifica e da altri Enti pubblici e privati.