

POLITECNICO DI MILANO

Scuola di Ingegneria Civile ed Ambientale

Corso di studi in Ingegneria per l'Ambiente ed il Territorio



**POLITECNICO**  
**MILANO 1863**

**L'APPLICAZIONE DEI TRATTAMENTI  
MICROALGALI AI REFLUI AGRO-ZOOTECNICI:  
SPERIMENTAZIONE IN SEMI-CONTINUO A SCALA  
DI LABORATORIO**

Relatore: Prof. Elena Ficara

Correlatori: Dott. Micol Bellucci

Dott. Francesca Marazzi

Tesi di Laurea Magistrale di:

Tommaso Leandri Matr. 841706

Emanuele Pirola Matr. 841665

Anno Accademico 2016/2017



---

## Ringraziamenti

Per prima cosa desideriamo ringraziare la Professoressa Elena Ficara per il coraggio dimostrato nell'accettare noi come suoi tesisti. Grazie alla sua professionalità è stato possibile raggiungere questo risultato.

Volevamo ringraziare Francesca e Micol per averci supportato e sopportato in questi lunghi mesi di sperimentazione, sono state un aiuto preziosissimo. Volevamo altresì ringraziare la Professoressa Valeria Mezzanotte per la sua immancabile gentilezza e la sua solarità.

Volevamo poi ringraziare i nostri familiari (quelli che ci sono e quelli che non ci sono più) e le nostre ragazze, Eleonora e Nadia, per il sostegno quotidiano anche nei giorni più difficili in questi lunghi anni universitari.

Volevamo poi ringraziare i nostri amici (rigorosamente in ordine alfabetico). Dani, per la consueta dose di cazzate, Gian, per la calorosissima ospitalità da uomo del sud, Luca C, per la consueta presenza e le immancabili provocazioni, Luca I, per le serate finite sempre presto e per essere un buon compagno di beach, Parmo, faro d'intelligenza in un mare di ignoranza, Rocco, per i consigli di vita da uomo navigato, Sergio e la sua paranoia, per le gocciate d'alta scuola e le paternali finì a sé stesse, e infine Paesi, che volevamo non citare, ma ci sembrava brutto. In questi anni sono stati la migliore distrazione nei confronti dei gravosi impegni accademici, c'è molto di loro in questo traguardo.

Un doveroso grazie va anche a Tommi, alias Gorle. Senza la sua guida spirituale attraverso i tortuosi sentieri accademici probabilmente un giorno avremmo comunque raggiunto questo obiettivo, ma di sicuro non oggi.

Vogliamo infine estendere un grazie a tutte le persone che ci sono state vicine (ad entrambi, all'uno o all'altro) o con cui abbiamo avuto a che fare in questi anni, che per non scrivere un poema non abbiamo citato. È anche grazie a loro se siamo arrivati a questo traguardo.

---

---

## Sintesi

Il contesto economico odierno sta portando la nostra Società verso nuovi obiettivi. Uno dei più grandi è sicuramente quello di diminuire gli sprechi, recuperare energia e materia dagli scarti e contestualmente diminuire gli impatti ambientali che questi comportano. Nasce dunque la necessità di trovare una tecnologia che possa aiutare il conseguimento di questi obiettivi. Con queste finalità, negli ultimi anni, si sta studiando l'utilizzo delle microalghe come fonte di depurazione e di recupero di energia nei confronti delle acque di rifiuto.

In questa tesi è stata studiata la possibilità di applicare questa tecnologia ai reflui agro-zootecnici. Questi particolari tipi di flussi sono stati oggetto, negli ultimi anni, di problematiche non indifferenti. La loro crescita, in termini di volumi prodotti, ha reso non più sostenibile il loro riutilizzo come ammendante o fertilizzante. Inoltre, la loro ricchezza di inquinanti suggerisce la necessità di operarne un trattamento al fine di prevenire possibili fenomeni di inquinamento legati al suo utilizzo.

Oggetto di questa tesi è stato lo studio per via sperimentale della crescita delle microalghe su un refluo agro-zootecnico primario e sul digestato prodotto nella medesima filiera, a valle della linea fanghi.

Dai risultati è apparsa evidente la capacità delle microalghe di crescere su questi flussi. Nel processo di crescita esse sono state in grado di assimilare i nutrienti presenti nei medium, diminuendone, di conseguenza, la concentrazione di inquinanti allo scarico. Sia sul refluo zootecnico primario che sul digestato sono state osservate crescite notevoli e stabili della popolazione algale, con efficienze di rimozione superiori al 50% nei confronti dei principali inquinanti, quali azoto, fosforo e COD. Sono inoltre stati approfonditi alcuni aspetti specifici quali: l'effetto del dosaggio di fosforo per la correzione del rapporto N/P dei reflui, il dosaggio di anidride carbonica per la correzione del pH e la stimolazione dell'attività fotosintetica e l'interazione tra le microalghe ed i batteri nitrificanti.

---

---

# Indice dei contenuti

<b>RINGRAZIAMENTI</b> .....	<b>I</b>
<b>SINTESI</b> .....	<b>III</b>
<b>INDICE DEI CONTENUTI</b> .....	<b>V</b>
<b>INDICE DELLE FIGURE</b> .....	<b>IX</b>
<b>INDICE DELLE TABELLE</b> .....	<b>XIII</b>
<b>CAPITOLO 1 INTRODUZIONE</b> .....	<b>1</b>
1.1 L'ECONOMIA CIRCOLARE APPLICATA ALLE ACQUE REFLUE .....	1
1.2 LE ACQUE DI RIFIUTO.....	2
1.3 LE MICROALGHE PER DEPURARE LE ACQUE REFLUE .....	2
1.4 OBIETTIVI DELLA TESI .....	5
<b>CAPITOLO 2 STATO DELL'ARTE</b> .....	<b>7</b>
2.1 COSA SONO LE MICROALGHE .....	7
2.2 COLTIVAZIONE DELLE ALGHE VERDI.....	8
2.3 PARAMETRI DI CRESCITA .....	9
2.3.1 LUCE .....	9
2.3.2 TEMPERATURA.....	10
2.3.3 CARBONIO.....	11
2.3.4 AZOTO.....	13
2.3.5 FOSFORO.....	14
2.3.6 RAPPORTO N/P.....	15
2.3.7 ALTRI PARAMETRI .....	15
2.4 COLTIVAZIONE DELLE MICROALGHE NELLE ALCUQUE DI RIFIUTO .....	17
2.5 ESPERIENZE DI COLTIVAZIONE SU DIGESTATO .....	18
2.5.1 EFFETTI DEL RAPPORTO N/P SULLA CRESCITA DELLE MICROALGHE .....	19
2.5.2 METABOLISMO GENERALE.....	22

---

2.6	ESPERIENZE DI COLTIVAZIONE SU REFLUO ZOOTECNICO .....	25
2.6.1	REFLUO ZOOTECNICO.....	25
2.6.2	CRESCITA DELLE MICROALGHE NEL MEDIUM ZOOTECNICO.....	26
2.6.3	CONDIZIONI OPERATIVE DI PROCESSO.....	28
2.7	INTERAZIONI MICROALGHE BATTERI.....	30
<b>CAPITOLO 3 MATERIALI E METODI .....</b>		<b>33</b>
3.1	ORIGINE DEI REFLUI .....	33
3.1.1	DIGESTATO.....	34
3.1.2	REFLUO ZOOTECNICO.....	35
3.2	SET-UP SPERIMENTALI .....	36
3.2.1	SET-UP PROVE DI CRESCITA SU DIGESTATO .....	36
3.2.2	SET-UP PROVE DI CRESCITA SU REFLUO ZOOTECNICO .....	37
3.3	INOCULI MICROALGALI .....	38
3.3.1	INOCULO PER PROVE SU DIGESTATO .....	38
3.3.2	INOCULO PER PROVE SU REFLUO ZOOTECNICO .....	39
3.4	PIANO SPERIMENTALE.....	40
3.4.1	PROVE DI CRESCITA SU DIGESTATO .....	40
3.4.1.1	PRIMA PROVA IN BATCH - AGITAZIONE TRAMITE INSUFFLAZIONE DI ARIA .....	40
3.4.1.2	SECONDA PROVA IN BATCH - AGITAZIONE TRAMITE INSUFFLAZIONE DI CO <sub>2</sub> .....	41
3.4.1.3	PROVA IN SEMI-CONTINUO CON INSUFFLAZIONE DI CO <sub>2</sub> .....	42
3.4.2	PROVE DI CRESCITA SU REFLUO ZOOTECNICO (WW1).....	43
3.4.2.1	PROVA 1 .....	43
3.4.2.2	PROVA 2 .....	44
3.5	METODI ANALITICI .....	46
3.5.1	MISURAZIONE CRESCITA ALGALE .....	47
3.5.2	CALCOLO DEI PARAMETRI AGGREGATI.....	49
3.5.3	BILANCI DI MASSA DELL'AZOTO .....	51
3.5.4	ELABORAZIONI STATISTICHE .....	52
3.5.5	CALCOLI STECHIOMETRICI .....	52
<b>CAPITOLO 4 RISULTATI .....</b>		<b>55</b>
4.1	RISULTATI PROVE DI CRESCITA SU DIGESTATO.....	56
4.1.1	PROVE PRELIMINARI.....	56
4.1.1.1	PROVA IN BATCH CON INSUFFLAZIONE D'ARIA.....	56
4.1.1.2	PROVA IN BATCH CON INSUFFLAZIONE DI CO <sub>2</sub> .....	59
4.1.2	PROVA IN SEMI-CONTINUO CON INSUFFLAZIONE DI CO <sub>2</sub> .....	61
4.1.2.1	CONDIZIONI OPERATIVE: PH E TEMPERATURA .....	62

---



---

4.1.2.2	PARAMETRI DI CRESCITA: ASSORBANZA E TORBIDITÀ.....	64
4.1.2.3	PRODUZIONE DI BIOMASSA.....	71
4.1.2.4	EVOLUZIONE DELLA POPOLAZIONE MICROALGALE.....	74
4.1.2.5	RIMOZIONE DELLE SOSTANZE AZOTATE.....	76
4.1.2.6	RIMOZIONE FOSFORO E COD.....	83
4.1.2.7	PARAMETRI AGGREGATI.....	85
4.1.2.8	RESE DI RIMOZIONE.....	92
4.1.2.9	ANALISI DELLO STATO STAZIONARIO.....	93
4.1.2.10	ANALISI STATISTICHE.....	95
4.2.1.11	VALUTAZIONI STECHIOMETRICHE.....	98
4.2	RISULTATI PROVE DI CRESCITA SU REFLUO ZOOTECNICO.....	100
4.2.1	PROVA 1.....	100
4.2.1.1	CONDIZIONI OPERATIVE: PH E TEMPERATURA.....	100
4.2.1.2	PARAMETRI DI CRESCITA: ASSORBANZA E TORBIDITÀ.....	102
4.2.1.3	PRODUZIONE DI BIOMASSA.....	106
4.2.1.4	EVOLUZIONE DELLA POPOLAZIONE MICROALGALE.....	109
4.2.1.5	RIMOZIONE DELLE SOSTANZE AZOTATE.....	109
4.2.1.6	RIMOZIONE FOSFORO E COD.....	118
4.2.1.7	PARAMETRI AGGREGATI.....	122
4.2.1.8	RESE DI RIMOZIONE.....	128
4.2.1.9	ANALISI DELLO STATO STAZIONARIO.....	128
4.2.1.10	ANALISI STATISTICHE.....	130
4.2.1.11	VALUTAZIONI STECHIOMETRICHE.....	132
4.2.1	PROVA 2.....	134
4.2.2.1	CONDIZIONI OPERATIVE: PH E TEMPERATURA.....	135
4.2.2.2	PARAMETRI DI CRESCITA: ASSORBANZA E TORBIDITÀ.....	136
4.2.2.3	PRODUZIONE DI BIOMASSA.....	140
4.2.2.4	RIMOZIONE DELLE SOSTANZE AZOTATE.....	141
4.2.2.5	RIMOZIONE FOSFORO E COD.....	145
4.2.2.6	PARAMETRI AGGREGATI.....	147
4.2.2.7	RESE DI RIMOZIONE.....	153
4.2.2.8	ANALISI STATISTICHE.....	154
4.2.2.9	VALUTAZIONI STECHIOMETRICHE.....	156
<b>CAPITOLO 5 CONCLUSIONI.....</b>		<b>157</b>
<b>RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.....</b>		<b>159</b>
<b>APPENDICE A CALCOLI STECHIOMETRICI.....</b>		<b>165</b>

---

---

A.1 CALCOLI STECHIOMETRICI PROVA CON INSUFFLAZIONE D'ARIA .....	165
A.2 CALCOLI STECHIOMETRICI PROVA CON INSUFFLAZIONE DI CO <sub>2</sub> .....	167
A.3 CALCOLI STECHIOMETRICI PROVA IN SEMI-CONTINUO .....	168
A.4 CALCOLI CYECHIOMETRICI PROVA 2 .....	170
<b>APPENDICE B STIMA VSS .....</b>	<b>172</b>
B.1 MODELLI DI REGRESSIONE LINEARE PER LA STIMA DEI VALORI DI VSS.....	172
<b>APPENDICE C NITRIFICAZIONE.....</b>	<b>174</b>
C.1 PROCESSI DI NITRIFICAZIONE .....	174

---

## Indice delle figure

<i>Figura 3.2.1: Reattori a colonna di crescita utilizzati per le prove su digestato .....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 3.2.2: Reattori a colonna di crescita utilizzati per le prove su WW1.....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 4.1.1: Andamento assorbanza nei 4 reattori .....</i>	<i>57</i>
<i>Figura 4.1.2: Concentrazione nutrienti nei reattori durante la prova .....</i>	<i>57</i>
<i>Figura 4.1.3: Andamento temporale dell'assorbanza (a sinistra) e della concentrazione dell'ammonio (a destra) nei 4 reattori di crescita .....</i>	<i>60</i>
<i>Figura 4.1.4: Andamento temporale del valore del pH nelle colonne .....</i>	<i>61</i>
<i>Figura 4.1.5: Andamento temporale del pH nei reattori di crescita .....</i>	<i>63</i>
<i>Figura 4.1.6: Andamento temporale della temperatura nei reattori di crescita .....</i>	<i>63</i>
<i>Figura 4.1.7: Spettro assorbanza tra 340 e 900 nm.....</i>	<i>64</i>
<i>Figura 4.1.8: Andamento assorbanza nel tempo nei 4 reattori di crescita .....</i>	<i>68</i>
<i>Figura 4.1.9: Confronto tra l'andamento temporale dell'assorbanza e della torbidità nelle colonne della sperimentazione .....</i>	<i>66</i>
<i>Figura 4.1.10: Correlazione tra assorbanza (680 nm) e torbidità per tutti i reattori....</i>	<i>67</i>
<i>Figura 4.1.11: Andamento del valore del rapporto N/P nel tempo nei 4 reattori. Visti i valori assunti da tale rapporto per l'asse verticale è stata utilizzata una scala logaritmica .....</i>	<i>68</i>
<i>Figura 4.1.12: Comparazione tra assorbanza e temperatura per le 4 colonne di crescita. Come si può osservare il comportamento è pressoché il medesimo in tutti i reattori .....</i>	<i>70</i>
<i>Figura 4.1.13: Andamento temporale dei solidi sospesi nei 4 reattori di crescita.....</i>	<i>72</i>
<i>Figura 4.1.14: Correlazione tra assorbanza (680 nm) e VSS per tutti i reattori .....</i>	<i>74</i>
<i>Figura 4.1.15: Conte microalgali lungo il corso della sperimentazione .....</i>	<i>74</i>
<i>Figura 4.1.16: Suddivisione in specie delle microalghe nei 4 reattori di crescita .....</i>	<i>75</i>
<i>Figura 4.1.17: Concentrazione azoto ammoniacale nel tempo.....</i>	<i>76</i>

---

<i>Figura 4.1.18: Andamento temporale concentrazione NO<sub>2</sub> nelle colonne .....</i>	<i>78</i>
<i>Figura 4.1.19: Confronto grafico tra assorbanza, concentrazione ammonio, nitrato e nitrito .....</i>	<i>79</i>
<i>Figura 4.1.20: Andamento temporale NO<sub>3</sub> nei 4 reattori nel tempo .....</i>	<i>81</i>
<i>Figura 4.1.21: Profili in continuo dell'ossigeno disciolto, riferiti alla colonna NC1.I due profili sono stati misurati su 24h (sinistra) e 48h (destra).....</i>	<i>82</i>
<i>Figura 4.1.22: Andamento temporale delle concentrazioni di fosforo nel tempo.....</i>	<i>83</i>
<i>Figura 4.1.23: Andamento concentrazioni di COD nel tempo .....</i>	<i>84</i>
<i>Figura 4.1.24: Rimozione cumulata NH<sub>4</sub> nelle 4 colonne di crescita.....</i>	<i>86</i>
<i>Figura 4.1.25: Rimozione cumulata NO<sub>3</sub> nelle 4 colonne di crescita .....</i>	<i>87</i>
<i>Figura 4.1.26: Rimozione cumulata NO<sub>2</sub> nelle 4 colonne di crescita.....</i>	<i>87</i>
<i>Figura 4.1.27: Rimozione cumulata NO<sub>x</sub> nelle 4 colonne di crescita .....</i>	<i>88</i>
<i>Figura 4.1.28: Curve di rimozione cumulata dell'azoto totale.....</i>	<i>89</i>
<i>Figura 4.1.29: Curve di rimozione cumulata del fosforo.....</i>	<i>91</i>
<i>Figura 4.1.30: Curve di rimozione cumulata di COD nelle 4 colonne .....</i>	<i>92</i>
<i>Figura 4.1.31: Confronto tra rimozione e alimentazione di azoto nelle colonne di crescita .....</i>	<i>93</i>
<i>Figura 4.2.1: Andamento temporale del pH nei reattori di crescita.....</i>	<i>101</i>
<i>Figura 4.2.2: Andamento temporale della temperatura nei reattori di crescita .....</i>	<i>101</i>
<i>Figura 4.2.3: Spettro assorbanza della colonna I, II, III tra 340 e 900 nm .....</i>	<i>102</i>
<i>Figura 4.2.4: Andamento temporale del valore di assorbanza per le colonne di crescita.....</i>	<i>103</i>
<i>Figura 4.2.5: Andamento temporale della torbidità per tutti i reattori di crescita .....</i>	<i>105</i>
<i>Figura 4.2.6: Correlazione tra assorbanza (680 nm) e torbidità per tutti i reattori.....</i>	<i>106</i>
<i>Figura 4.2.7: Andamento temporale dei VSS per nei reattori di crescita .....</i>	<i>107</i>
<i>Figura 4.2.8: Correlazione tra i valori di assorbanza e i valori di VSS per ciascun reattore nel corso della prova .....</i>	<i>108</i>
<i>Figura 4.2.9: Conte microalgali lungo il corso della sperimentazione.....</i>	<i>109</i>
<i>Figura 4.2.10: Andamento temporale delle concentrazioni di NH<sub>4</sub><sup>+</sup> nei reattori di crescita .....</i>	<i>110</i>
<i>Figura 4.2.11: Andamenti temporali delle concentrazioni di nitrito nei reattori di crescita.....</i>	<i>112</i>

---

<i>Figura 4.2.12: Andamento delle concentrazioni di nitrato nei reattori di crescita.....</i>	<i>113</i>
<i>Figura 4.2.13: Profili misurazione in continuo di ossigeno disciolto nei reattori di crescita. Le misurazioni nella colonna II (seconda a partire dall'alto) sono durate 24h anziché 48h. Le misure sono riferite ai giorni 64-65 e il loro inizio è coinciso per tutte con l'inizio del ciclo.....</i>	<i>115</i>
<i>Figura 4.2.14: Andamento temporale delle concentrazioni di fosforo nei reattori di crescita .....</i>	<i>118</i>
<i>Figura 4.2.15: Andamento temporale del rapporto N/P nei reattori di crescita.....</i>	<i>119</i>
<i>Figura 4.2.16: Andamento delle concentrazioni di COD nei reattori di crescita .....</i>	<i>121</i>
<i>Figura 4.2.17: Rimozioni cumulate dell'ammonio nei reattori di crescita .....</i>	<i>122</i>
<i>Figura 4.2.18: Rimozioni cumulate nei reattori delle sostanze NO<sub>3</sub> (sinistra) e NO<sub>2</sub> (destra).....</i>	<i>123</i>
<i>Figura 4.2.19: Rimozione cumulate dell'azoto totale nei reattori di crescita .....</i>	<i>125</i>
<i>Figura 4.2.20: Curva di rimozione cumulate del fosforo nei reattori di crescita .....</i>	<i>126</i>
<i>Figura 4.2.21: Curva di rimozione cumulate del COD nei reattori di crescita .....</i>	<i>127</i>
<i>Figura 4.2.22: Andamento pH nei reattori di crescita .....</i>	<i>136</i>
<i>Figura 4.2.23: Andamento temperatura nei reattori di crescita .....</i>	<i>136</i>
<i>Figura 4.2.24: Andamento assorbanza a 680 nm nei 4 reattori di crescita .....</i>	<i>137</i>
<i>Figura 4.2.25: Andamento temporale della torbidità nei reattori di crescita .....</i>	<i>138</i>
<i>Figura 4.2.26: Correlazione tra i parametri assorbanza (680 nm) e torbidità .....</i>	<i>139</i>
<i>Figura 4.2.27: Andamento temporale del parametro VSS nei reattori di crescita .....</i>	<i>140</i>
<i>Figura 4.2.28: Correlazione tra i valori di VSS e di assorbanza (680 nm).....</i>	<i>141</i>
<i>Figura 4.2.29: Andamenti concentrazioni di ammonio nei 4 reattori .....</i>	<i>142</i>
<i>Figura 4.2.30: Concentrazioni di nitrato durante la prova nei reattori di crescita.....</i>	<i>143</i>
<i>Figura 4.2.31: Concentrazioni di nitrito durante la prova nei reattori di crescita .....</i>	<i>144</i>
<i>Figura 4.2.32: Concentrazioni di fosforo durante la prova nei reattori di crescita.....</i>	<i>145</i>
<i>Figura 4.2.33: Concentrazioni di COD durante la prova nei reattori di crescita .....</i>	<i>146</i>
<i>Figura 4.2.34: Rimozioni cumulate dell'ammonio nei reattori di crescita .....</i>	<i>148</i>
<i>Figura 4.2.35: Rimozioni cumulate di NO<sub>3</sub> nei reattori di crescita .....</i>	<i>149</i>
<i>Figura 4.2.36: Rimozioni cumulate nei reattori di crescita di NO.....</i>	<i>149</i>
<i>Figura 4.2.37: Rimozioni cumulate degli NO<sub>x</sub> nei reattori di crescita .....</i>	<i>149</i>
<i>Figura 4.2.38: Curve di rimozione cumulate dell'azoto totale.....</i>	<i>151</i>

---

*Figura 4.2.39: Rimozioni cumulate di fosforo nei reattori di crescita.....152*

*Figura 4.2.40: Rimozione cumulata del COD nei reattori di crescita .....153*

---

## Indice delle tabelle

<i>Tabella 2.5.1: Concentrazioni tipiche di azoto e fosforo nei digestati zootecnici (Prandini et al., 2015).....</i>	<i>19</i>
<i>Tabella 2.6.1: Confronto letteratura inerente rapporto N/P.....</i>	<i>23</i>
<i>Tabella 3.1.1: Parametri principali digestato.....</i>	<i>34</i>
<i>Tabella 3.1.2: Parametri chimico-fisici del refluo zootecnico in esame.....</i>	<i>35</i>
<i>Tabella 3.3.1: Parametri principali sospensione algale di partenza.....</i>	<i>39</i>
<i>Tabella 3.3.2: Parametri principali sospensione algale di partenza.....</i>	<i>39</i>
<i>Tabella 3.4.1: Parametri principali sospensione algale derivante da coltivazione con insufflazione aria, utilizzata per la seconda sperimentazione.....</i>	<i>41</i>
<i>Tabella 3.4.2: Parametri principali sospensione algale utilizzata per la terza sperimentazione, derivante dalla coltivazione con insufflazione di CO<sub>2</sub>.....</i>	<i>42</i>
<i>Tabella 3.4.3: Caratteristiche chimico-fisiche della sospensione algale derivante dalla prova 1 e utilizzata come inoculo per questa seconda sperimentazione.....</i>	<i>45</i>
<i>Tabella 3.4.4: Riassunto condizioni operative per i 4 reattori di crescita.....</i>	<i>46</i>
<i>Tabella 3.5.1: Coefficienti stechiometrici di produttività del sistema .....</i>	<i>53</i>
<i>Tabella 4.1.1: Concentrazioni nutrienti al tempo 0, inizio della prova, all'interno dei reattori.....</i>	<i>56</i>
<i>Tabella 4.1.2: Solidi sospesi totali presenti nei reattori di crescita a fine prova.....</i>	<i>58</i>
<i>Tabella 4.1.3: Concentrazioni dei nutrienti al tempo 0, inizio della prova, all'interno dei reattori.....</i>	<i>59</i>
<i>Tabella 4.1.4: Caratteristiche al tempo 0 dei principali parametri chimico-fisici nelle due coppie dei reattori di crescita.....</i>	<i>62</i>
<i>Tabella 4.1.5: Produzione, discriminata negli intervalli temporali, di solidi sospesi volatili.....</i>	<i>73</i>
<i>Tabella 4.1.6: Rese di rimozione (in percentuale) del sistema di coltivazione microalgale.....</i>	<i>92</i>

---

<i>Tabella 4.1.7: Valori medi di crescita e operativi rilevati nelle colonne nei giorni 78-103.....</i>	<i>94</i>
<i>Tabella 4.1.8: Valori medi concentrazioni nutrienti rilevati nelle colonne nei giorni 78-103.....</i>	<i>94</i>
<i>Tabella 4.1.9: Valori medi ratei di rimozione rilevati nelle colonne nei giorni 78-103....</i>	<i>94</i>
<i>Tabella 4.1.10: Percentuali azoto strippato nelle colonne nei giorni 78-103.....</i>	<i>94</i>
<i>Tabella 4.1.11: Rese di rimozione dei nutrienti rilevati nelle colonne nei giorni 78-10... </i>	<i>95</i>
<i>Tabella 4.1.12: Risultati t-test per i principali parametri operativi del sistema di crescita microalgale .....</i>	<i>95</i>
<i>Tabella 4.1.13: Risultati test di inferenza. I risultati della regressione sono i medesimi considerando tutti e 3 i diversi parametri di crescita microalgale.....</i>	<i>97</i>
<i>Tabella 4.1.14: Calcoli stechiometrici riferiti alla produzione e alla richiesta di ossigeno.....</i>	<i>98</i>
<i>Tabella 4.2.1: Caratteristiche chimico-fisiche reattori di coltivazione al tempo 0.....</i>	<i>100</i>
<i>Tabella 4.2.2: Ratei di produzione di biomassa, espressi come mgVSS/L/d.....</i>	<i>108</i>
<i>Tabella 4.2.3: Rese di rimozione (in percentuale) del sistema di coltivazione microalgale.....</i>	<i>128</i>
<i>Tabella 4.2.4: Valori medi di crescita e operativi rilevati nelle colonne nei giorni 25-53.....</i>	<i>129</i>
<i>Tabella 4.2.5: Ratei medi di concentrazione rilevati nelle colonne nei giorni 25-53....</i>	<i>129</i>
<i>Tabella 4.2.6: Ratei medi di rimozione dei nutrienti nei giorni 25-53.....</i>	<i>129</i>
<i>Tabella 4.2.7: Percentuale azoto strippato nei giorni 25-53.....</i>	<i>129</i>
<i>Tabella 4.2.8: Rese di rimozione dei nutrienti nei giorni 25-53.....</i>	<i>130</i>
<i>Tabella 4.2.9: Risultati dei t-test applicati ai parametri di crescita e all'ammonio.....</i>	<i>130</i>
<i>Tabella 4.2.10: Risultati dei t-test applicati ai parametri di crescita e all'ammonio.....</i>	<i>130</i>
<i>Tabella 4.2.11: Risultati dei t-test applicati alle concentrazioni dei nutrienti.....</i>	<i>130</i>
<i>Tabella 4.2.12: Risultati test di inferenza statistica.....</i>	<i>132</i>
<i>Tabella 4.2.13: Risultati calcoli stechiometrici relativi a produzioni di O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> e alle relative quantità necessarie alla sostenibilità dei processi interni.....</i>	<i>133</i>
<i>Tabella 4.2.14: Caratteristiche chimico-fisiche del tempo zero (inizio prova), per i 4 reattori di crescita.....</i>	<i>134</i>



---

<i>Tabella 4.2.15: Caratteristiche chimico-fisiche del refluo utilizzato in questa seconda sperimentazione.....</i>	<i>135</i>
<i>Tabella 4.2.16: Ratei di produzione di biomassa.....</i>	<i>141</i>
<i>Tabella 4.2.17: Rese di rimozione (%) del sistema di coltivazione microalgale.....</i>	<i>153</i>
<i>Tabella 4.2.18: Risultati dei t-test applicati alle concentrazioni di ammonio.....</i>	<i>154</i>
<i>Tabella 4.2.19: Risultati dei t-test applicati alle concentrazioni di nitrato .....</i>	<i>154</i>
<i>Tabella 4.2.20: Risultati dei t-test applicati alle concentrazioni di nitrito .....</i>	<i>154</i>
<i>Tabella 4.2.21: Risultati dei t-test applicati alle concentrazioni di COD .....</i>	<i>155</i>
<i>Tabella 4.2.22: Risultati dei t-test applicati alle concentrazioni di fosforo .....</i>	<i>155</i>
<i>Tabelle 4.2.23: Risultati calcoli stechiometrici relativi a produzioni di O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> e alle relative quantità necessarie alla sostenibilità dei processi interni, riferiti alla prova 2.....</i>	<i>156</i>
<i>Tabella A.1.1: Pesi delle diverse componenti derivanti dalla sospensione algale.....</i>	<i>165</i>
<i>Tabella A.1.2: Apporti, in termini di P, dell'inoculo e del digestato.....</i>	<i>166</i>
<i>Tabella A.2.1: Pesi delle diverse componenti derivanti dalla sospensione algale.....</i>	<i>167</i>
<i>Tabella A.2.2: Apporti in termini di P dell'inoculo e del digestato .....</i>	<i>168</i>
<i>Tabella A.3.1: Pesi delle diverse componenti derivanti dalla sospensione algale.....</i>	<i>168</i>
<i>Tabella A.3.2: Apporti in termini di P dell'inoculo e del digestato .....</i>	<i>169</i>
<i>Tabella A.4.1: Concentrazioni (mg) dei nutrienti presenti nel refluo WW1 in alimentazione .....</i>	<i>170</i>
<i>Tabella B.1: Risultati dei test statistici sui modelli di regressione lineare per la prova 1.....</i>	<i>172</i>
<i>Tabella B.2: Risultati dei test statistici sui modelli di regressione lineare per la prova 2.....</i>	<i>173</i>



---



---

# **CAPITOLO 1**

## **INTRODUZIONE**

### **1.1 L'economia circolare applicata alle acque reflue**

La crescita dell'economia mondiale e l'aumento della popolazione del pianeta sono chiari segnali del fatto che le risorse della Terra vengono consumate rapidamente. Le stime più recenti riguardo la crescita demografica mondiale, prevedono un incremento rilevante della popolazione: ad oggi si contano circa 7 miliardi di persone, che diventeranno 9.7 miliardi nel 2050 e più di 11 miliardi entro fine secolo (World Population Prospect: The 2015 Revision). La sostenibilità di questa tendenza non è facilmente prevedibile, tuttavia risulta di fondamentale importanza introdurre una gestione sostenibile delle risorse del pianeta al fine di preservarne l'integrità e garantire la sopravvivenza della specie umana.

L'approccio economico che ha sostenuto la crescita mondiale negli ultimi due secoli va profondamente rivisto: l'economia lineare va integrata e migliorata con l'introduzione di un nuovo concetto circolare, in cui il rifiuto non è più uno scarto bensì una risorsa, fonte di beni riutilizzabili (Yuan et al., 2006).

---

## 1.2 Le acque di rifiuto

Le acque reflue rappresentano una delle più critiche fonti di rifiuto. Le attività sociali, ricreative e produttive, che derivano principalmente da utenze agricole industriali e residenziali, richiedono e utilizzano grandi quantitativi di acqua. La conseguenza diretta di tali utilizzi è la produzione di scarichi che, per poter essere restituiti all'ambiente, devono essere necessariamente sottoposti a trattamenti depurativi. Infatti, un apporto eccessivo di nutrienti (quali azoto e fosforo) può causare eutrofizzazione nei corpi idrici superficiali, come fiumi e laghi. L'eutrofizzazione delle acque dolci è stato uno dei problemi preponderanti del ventesimo secolo (Rodhe, 1969). Secondo alcune ricerche, circa la metà dei laghi dell'emisfero settentrionale risulta eutrofizzato (International Lake Environment Committee, 1994). Questo fenomeno porta con sé diverse problematiche ambientali, connesse prevalentemente ai seguenti aspetti: riduzione della biodiversità con sostituzione delle specie dominanti e aumento della torbidità delle acque. Oltre alle conseguenze ambientali, il fenomeno di eutrofizzazione ha anche ripercussioni economiche rilevanti. Uno studio (Dotts et al., 2009) ha stimato in oltre 2 miliardi di dollari il costo annuale che l'eutrofizzazione comporta sulle casse statunitensi. Tale spesa non è riconducibile solo ai costi collegati al risanamento ambientale, ma anche al danno economico collegato al turismo e alla pesca.

Dall'età industriale in poi, molto è stato fatto nell'ambito del trattamento delle acque reflue. I risultati ottenuti grazie alle tecniche di risanamento sono stati descritti come il più grande contributo alla salute pubblica degli ultimi 150 anni (British Medical Journal, 2007). Tuttavia gli impatti negativi legati allo scarico delle acque reflue non sono stati ancora del tutto eliminati. Nasce, dunque, la necessità di trovare un nuovo metodo che possa ottimizzare questa

---

fase depurativa al fine di minimizzare gli effetti negativi e valorizzare tali flussi per poterne trarre benefici non solo economici, ma anche sociali: il recupero di materia ed energia diventa l'obiettivo preponderante della tecnica di risanamento, in linea con i principi proposti dall'economia circolare.

Spinti da queste motivazioni negli ultimi 50 anni è stato introdotto lo studio delle microalghe (Oswald e Gotaas, 1957) applicato al sistema di depurazione del refluo.

### **1.3 Le microalghe per la depurazione delle acque reflue**

Le tecnologie per i trattamenti primari e secondari delle acque reflue sono ormai da tempo consolidate e ben funzionanti. Esse riescono a rimuovere agevolmente buona parte di materiali grossolani (tramite grigliatura), delle sabbie (tramite dissabbiatura), dei solidi sospesi totali (tramite sedimentazione) e del carbonio biodegradabile (tramite ossidazione a fanghi attivi). I problemi principali che permangono riguardano i nutrienti e i micro-inquinanti, la cui concentrazione nell'effluente potrebbe essere tale da causare problemi di inquinamento o di eutrofizzazione nel corpo idrico presso il quale il refluo viene scaricato. Il trattamento tramite microalghe può risultare particolarmente efficace in tal senso grazie alla capacità fotosintetiche delle stesse: l'energia solare viene convertita in biomassa utile, la quale cresce incorporando nutrienti come Azoto e Fosforo (De La Noue e De Pauw, 1988).

Integrare questa tecnologia nel trattamento delle acque reflue può comportare diversi vantaggi, oltre ai benefici depurativi già citati. Le microalghe, infatti, possono avere una rilevanza economica non indifferente. Conclusa la fase di depurazione, a valle di una separazione delle stesse dal

---

flusso trattato, esse possono essere utilizzate in modi diversi: come ammendante per la fertilizzazione di terreni agricoli (Raposo et al., 2011), come materia prima per la produzione di biodiesel (Chisti, 2007; Mata et al., 2010) oppure come fonte per la sintetizzazione di biogas e bioetanolo (Mussnug, Jan H., et al., 2010). In particolare l'utilizzo delle microalghe potrebbe risultare una delle più innovative fonti di energia nel prossimo futuro, andando a sostituire gli attuali metodi di produzione di biodiesel, i quali ad oggi comportano grandi consumi di terreno coltivato: le microalghe, infatti, crescono in sospensione nelle acque, e ciò consente di sfruttare anche terreni a bassa o nulla fertilità come sede di impianti di crescita microalgale. A valle del processo di estrazione di lipidi per la produzione di biodiesel, la biomassa algale residua può essere utilizzata come fertilizzante o foraggio animale (Spolaore et al., 2006). Inoltre, prelevando CO<sub>2</sub> dall'ambiente durante il processo fotosintetico contribuiscono all'attenuazione delle emissioni di gas serra.

Sebbene l'utilizzo di sistemi algali presenti dei vantaggi rilevanti, permangono delle criticità che vanno ancora analizzate e risolte. La più grande difficoltà consiste nel separare e raccogliere efficientemente le microalghe dal flusso trattato, operazione che comporta complicazioni e costi non trascurabili (Hoffmann, 1998). Inoltre, la commercializzazione delle microalghe per un utilizzo in settori quali la cosmetica o l'industria mangimistica risulta ancora lontana dall'essere regolamentata (Becker, 1994). Anche la produzione di biodiesel, sebbene possa sembrare la frontiera del futuro, risulta ancora piuttosto limitata nell'attuale contesto economico. La produzione di questo combustibile, infatti, al momento risulta troppo onerosa per poter competere economicamente con i combustibili fossili comunemente utilizzati, pertanto, fino a che i costi di produzione non verranno notevolmente ridotti, una



---

sostituzione, totale o parziale, delle fonti energetiche tradizionali con il biodiesel risulta utopica (Mata et al., 2009).

Nel seguente lavoro, tuttavia, non ci si è soffermati sulle criticità appena elencate oppure sulla produzione di risorse a partire dalle microalghe, bensì sulla loro capacità di rimuovere nutrienti in particolari flussi di acque di rifiuto: la fase liquida del digestato da impianti a biogas alimentati da matrici agro-zootecniche e il refluo zootecnico post flottazione.

## **1.4 Obiettivo della tesi**

La tesi si pone come obiettivo lo studio della fattibilità della depurazione di reflui agro-zootecnici primari e digestati mediante un processo biologico innovativo basato sull'impiego di un consorzio di microalghe e batteri. La regione Lombardia è una regione caratterizzata da una forte vocazione agricola. La presenza di allevamenti intensivi ha portato, specialmente negli ultimi anni, ad una produzione di reflui superiore alle quantità spandibili secondo quanto definito dalla Direttiva Nitrati e suoi recepimenti. È dunque emersa la necessità di trovare soluzioni tecniche efficienti e a basso costo, che possano depurare questi reflui, particolarmente ricchi, in particolare, di sostanze azotate. Le microalghe possono essere in tal senso una interessante alternativa, e questo lavoro di tesi studierà la possibilità di un impiego efficace di questi microrganismi. Oltre a questo obiettivo generale, gli obiettivi specifici sono stati i seguenti:

- Valutazione della trattabilità di lungo periodo di un digestato di origine agro-zootecnica e della fattibilità di favorire l'efficienza del processo mediante aggiunta di fosforo per correggere il rapporto N/P del digestato.

- 
- Valutazione della trattabilità di un refluo suinicolo chiarito mediante flottazione e della fattibilità di favorire l'efficienza del processo mediante aggiunta di fosforo o di anidride carbonica.

---

## **CAPITOLO 2**

### **STATO DELL'ARTE**

Prima di procedere alla discussione degli esperimenti condotti all'interno di questo lavoro di tesi è stata effettuata un'analisi della letteratura disponibile riguardante le microalghe. Tale analisi è qui riportata e risulta funzionale ai fini della contestualizzazione dei risultati che saranno esposti.

#### **2.1 Cosa sono le microalghe**

Le microalghe sono organismi unicellulari o multicellulari semplici, a volte riuniti in colonie, largamente diffusi in ecosistemi caratterizzati da acqua dolce e salata. Alla loro grande diffusione corrisponde un altrettanto grande varietà o biodiversità: sono decine di migliaia le specie microalgali note le quali si differenziano per forma, colore e aspetti metabolici. Rispetto alle caratteristiche appena elencate, le microalghe si possono dividere in 4 macro-gruppi: Diatomee, Alghe Verdi, Dinoflagellati, Alghe Dorate. Di queste, quelle che si sono dimostrate più efficienti nel trattamento delle acque di rifiuto sono le Alghe Verdi e su queste si focalizzerà quindi l'attenzione.

---

## 2.2 Coltivazione delle alghe verdi

Le alghe costituiscono generalmente la base della catena alimentare. Esse sono ampiamente distribuite in tutto il mondo e crescono in ambienti e in condizioni estremamente diverse tra loro, di conseguenza la variabilità delle condizioni metaboliche che ne dominano la crescita risulta elevata. Tuttavia, per una crescita ottimale, certi fattori risultano determinanti. Tra questi vi sono la luce e i nutrienti, quali carbonio, azoto e fosforo. La mancanza di uno o più di questi elementi può comprometterne la crescita. Inoltre, come riportato da Spaargaren (1996), ogni elemento deve essere presente in adeguate quantità, con un appropriato rapporto uno con l'altro, affinché la crescita non risulti limitata. Nello specifico, la crescita è influenzata dalla forma chimica dei nutrienti disponibili e, in particolare, da quella del carbonio, ossia se esso sia presente in forma organica o inorganica.

Unitamente al carbonio, anche la luce ricopre un ruolo fondamentale nella crescita delle microalghe. Il metabolismo di queste, infatti, può sfruttare la luce come fonte di energia. Prevalentemente in funzione di questi due parametri, si possono dunque discriminare tre tipi diversi di crescita delle microalghe: fotoautotrofa, eterotrofa e mixotrofica (Hena et al., 2015).

Il metabolismo fotoautotrofo delle microalghe è basato sulla fotosintesi. Attraverso questo processo le microalghe utilizzano la luce come fonte di energia per produrre nuova biomassa assimilando acqua, nutrienti e carbonio inorganico. In questo tipo di crescita infatti, l'anidride carbonica funge da fonte di carbonio del processo metabolico di crescita.

Nel processo eterotrofo, invece, le microalghe crescono in assenza di luce: il carbonio organico in queste condizioni funge contemporaneamente da fonte di energia e da substrato per lo sviluppo microalgale.

---

Il metabolismo mixotrofico è una condizione particolare di sviluppo poiché le microalghe riescono simultaneamente a fotosintetizzare mentre assumono e metabolizzano carbonio organico. Tale processo, infatti, avviene in presenza contemporaneamente di luce e substrato organico.

## **2.3 Parametri di crescita**

Non solo una fonte di carbonio, vitamine, sali e nutrienti, ma anche l'equilibrio tra parametri operativi quali luce, ossigeno, anidride carbonica, pH e temperatura sono fondamentali per la crescita delle microalghe (Williams, 2002).

Al fine di ottimizzare la crescita algale, risulta indispensabile un'analisi approfondita di come questi parametri influiscano sullo sviluppo delle microalghe. Essi sono discussi nei paragrafi seguenti.

### **2.3.1 Luce**

La luce rappresenta la fonte di energia utilizzata dalle microalghe durante il processo di fotosintesi. Essa dunque risulta un parametro fondamentale laddove la crescita fosse fotoautotrofa o mixotrofica.

L'effetto della luce ha conseguenze diverse sulla crescita a seconda del tipo di specie di microalghe, tuttavia possono essere delineati alcuni aspetti di carattere generale. Il tipo di luce e l'intensità del raggio luminoso influenzano sia la crescita che la composizione della biomassa, con un effetto positivo sulla crescita all'aumentare dell'intensità della luce finché non viene raggiunto un valore limite di intensità. Questo limite (pari a 500 PAR, W/m<sup>2</sup>) coincide con l'intensità oltre cui le microalghe non sono più in grado di utilizzare l'energia irradiante per la fotosintesi la quale, di conseguenza, è dissipata e convertita

---

in calore. In queste condizioni la crescita algale potrebbe essere inibita (Sorokin & Krauss, 1958). Cicli alternati di illuminazione e oscurità si sono dimostrati efficienti per una crescita ottimale delle microalghe (Al-Quasmi et al., 2012). Altri studi, come ad esempio quelli di Van Wageningen, et al. (2012), hanno dimostrato che vi è una correlazione tra l'intensità irradiata e la composizione della biomassa algale; nello specifico è stato osservato che a basse intensità di luce corrisponde una maggiore presenza di grassi acidi.

### **2.3.2 Temperatura**

La temperatura è, insieme alla luce, il più rilevante fattore limitante nella coltivazione in sistemi all'aperto (outdoor). Questa limitazione è dovuta all'evidente impossibilità sperimentale di controllare questi parametri in ambienti aperti. La temperatura è stato l'oggetto di svariati studi in anni recenti, ma l'effetto che essa ha nei sistemi aperti risulta tuttora piuttosto incerto. Molte microalghe possono tollerare temperature fino a 15°C inferiori rispetto al loro ottimo, tuttavia un superamento di anche solo 2°C oltre alla temperatura ottimale può portare alla perdita della coltura. Questo aspetto è di particolare rilevanza dato che, nelle coltivazioni all'esterno, possono instaurarsi condizioni di elevata temperatura in casi di giornate particolarmente calde; in questi casi risulta necessario installare sistemi ausiliari di raffreddamento per mantenere la temperatura attorno al valore ottimale (Moheimani, 2005). È tuttavia complicato determinare il valore esatto di temperatura ottimale, anche a causa delle altre variabili in gioco che mutuamente influiscono una sull'altra. Ad esempio Martinez et al. (1999) hanno dimostrato che la massima crescita in termini di biomassa algale per le *Scenedesmus obliquus* avviene a temperature di circa 20°C. A questa temperatura, di contro, il consumo di fosforo è minimo. Tale consumo, infatti,

---

raggiunge il suo massimo a temperature comprese tra i 30°C e i 35°C, intervallo in cui la produzione della biomassa è minima. Analoghe considerazioni sono state fatte, per quanto riguarda l'azoto, da Converti, et al. (2009).

### 2.3.3 Carbonio

Il carbonio rappresenta l'elemento principale della biomassa algale. A questo elemento può corrispondere fino al 65% del peso secco della massa algale, anche questa percentuale varia significativamente a seconda del tipo di specie e delle condizioni di coltivazione. Un valore attorno al 50% del peso secco risulta tuttavia il più largamente osservato (Markou et al., 2014). La presenza abbondante di altri nutrienti, oltre al carbonio, comporta generalmente un incremento della concentrazione carboniosa all'interno della biomassa, grazie alla vantaggiosa condizione metabolica (Markou et al., 2014).

Nel caso di processi fotoautotrofi, la sintesi di carbonio organico è assicurata dal processo di fotosintesi nel quale la sua forma inorganica (CO<sub>2</sub>) viene convertita in materia organica.

L'anidride carbonica utilizzata nel processo di fotosintesi è quella disciolta nel mezzo liquido di coltivazione. L'anidride carbonica disciolta è in equilibrio con le forme ioniche (bicarbonato e carbonato), secondo i seguenti equilibri di dissociazione:



Viste le proprietà tipiche del sistema acido/base, il quantitativo di carbonio inorganico disciolto sarà strettamente collegato al valore del pH della soluzione e della sua alcalinità. Le condizioni ambientali in cui le microalghe operano ne influenzano il metabolismo comportando diversi meccanismi di

---

assimilazione dell'anidride carbonica, i quali risultano specie-dipendenti (Markou et al., 2014).

In caso di crescita fotoautotrofa la fonte di carbonio è di tipo inorganica. In tal caso esso viene fissato all'interno delle cellule microalgali e convertito forma organica tramite il ciclo di Calvin. La funzione principale di tale ciclo è quella di assimilare anidride carbonica fissandola all'interno di una molecola a 5 atomi di carbonio, processo che viene catalizzato attraverso un enzima specifico, chiamato RuBisCo (Ribulosio-Bifosfato Carbossilasi).

L'anidride carbonica può provenire da diverse sorgenti. Oltre all'aria atmosferica, possono essere utilizzate fonti alternative quali il gas puro, carbonati solubili o gas esausti di motori a scoppio (Mata et al., 2010).

Nel caso in cui il metabolismo microalgale sia di tipo eterotrofo, il carbonio organico è utilizzato contemporaneamente sia come fonte di carbonio che come fonte di energia. Tale metabolismo necessita di fonti esterne di materia organica, le quali sono generalmente molecole come monosaccaridi o acidi grassi volatili.

Laddove, infine, il metabolismo microalgale sia di tipo mixotrofico fonti di carbonio organico e inorganico vengono consumate contestualmente. Stante la natura ibrida di tale processo valgono le considerazioni fatte per i metabolismi precedentemente descritti.

La necessità progettuale di un'aggiunta esterna di substrato organico rende i processi eterotrofi e mixotrofici decisamente più onerosi rispetto a quelli fotoautotrofi. Di contro questi processi presentano ratei di crescita più elevati e maggior capacità di sintetizzare biomassa, poiché si tratta di processi di volume e non di superficie. Inoltre, condizioni di questo tipo risultano interessanti in quanto, nella coltivazione, vengono impiegati flussi caratterizzati da una forte presenza di materia organica. Le complessità



---

impiantistiche legate a questi tipi di sistemi, tuttavia, rendono generalmente preferibili configurazioni di coltivazione fotoautotrofe.

### **2.3.4 Azoto**

Le microalghe, rispetto alle piante terrestri, sono caratterizzate da un elevato contenuto di proteine (30%- 40%, Brown et al., 1997), motivo per cui, per permetterne la crescita, si richiedono alti quantitativi di azoto. Esso si può trovare all'interno di diverse sostanze organiche quali peptidi, proteine, enzimi, clorofilla e materiale genetico (Cai et al., 2013). Le microalghe svolgono un ruolo chiave nel convertire azoto inorganico (sotto forma di ione ammonio, nitrato e nitrito) in azoto organico attraverso l'assimilazione nella biomassa microalgale.

Il nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) è una delle fonti utilizzate nelle coltivazioni microalgali, spesso sotto forma di  $\text{NaNO}_3$ , meno frequentemente come  $\text{KNO}_3$  (Grobbelaar, 2004). L'ammoniaca (sotto forma di ione ammonio) viene anch'essa utilizzata come fonte di azoto per lo sviluppo delle microalghe grazie alla facilità con cui viene assimilata dalle stesse. La semplicità con cui avviene il processo di assimilazione è dovuta ad una minore richiesta di energia per la sua metabolizzazione rispetto a quella necessaria al consumo di azoto in forma ossidata. Per questo motivo l'ammoniaca è generalmente la fonte di azoto preferita delle alghe. Tuttavia questa, se presente sotto forma di ammoniaca libera, può risultare inibente nei confronti dello sviluppo microalgale, già a basse concentrazioni (Pérez-García et al., 2011). Un'ulteriore possibile fonte di azoto è il nitrito. Esso è generalmente la forma azotata meno preferita dalle alghe e si trova in ambienti naturali come prodotto intermedio del processo di nitrificazione che ossida l'ammoniaca a nitrato. Questa fonte di azoto, ad elevate concentrazioni, può avere effetti tossici (Chen et al., 2012).

---

Le microalghe possono utilizzare anche forme organiche di azoto, come per esempio urea (fonte azotata molto utilizzata nella coltivazione) o alcuni tipi di amminoacidi. La possibilità di utilizzare azoto organico come fonte di azoto risulta specie-dipendente.

Laddove siano presenti contemporaneamente più fonti di azoto nel medium di crescita è stato osservato che le microalghe assimilano inizialmente la fonte azotata più affine consumandola completamente e solo successivamente le altre (Boussiba & Gibson, 1991).

### **2.3.5 Fosforo**

Il fosforo rappresenta un elemento fondamentale nella crescita delle microalghe e ricopre un ruolo chiave nel metabolismo e nell'equilibrio delle cellule che le compongono. Si trova spesso sotto forma di acidi nucleici, lipidi e proteine; la sua assimilazione avviene sotto forma di ortofosfato (Cai et al., 2013). Il fosforo è generalmente l'elemento limitante del metabolismo microalgale, specialmente in ambienti naturali, stante la sua scarsità (Markou et al., 2014). Viceversa non è stata osservata inibizione per concentrazioni elevate di tale elemento. Questo è dovuto al fatto che le microalghe tendono spontaneamente ad immagazzinare fosforo, anche se non è direttamente richiesta una sua assimilazione. Questo immagazzinamento continuo, detto *luxury uptake*, di fosforo permette alle microalghe di disporre di una scorta tale per poter sopperire, in un secondo momento, a condizioni di scarsità (Powell et al., 2008). Tale comportamento può essere assunto dalle microalghe in condizioni di scarsità di nutrienti anche nei confronti di altri elementi.

A differenza del carbonio e dell'azoto il fosforo rappresenta una forma nutritiva non rinnovabile. Questo elemento, infatti, è una risorsa fossile e si pensa che nei prossimi 50/100 anni possa esaurirsi (Elser, 2012).

---

### **2.3.6 Rapporto N/P**

Un altro parametro di fondamentale importanza, se non il più importante, da tenere sotto controllo durante la crescita delle microalghe è il rapporto stechiometrico tra azoto e fosforo, abbreviato N/P, anche detto di Redfield. Tale rapporto si riferisce alla relazione tra la composizione dell'organismo e la composizione chimica del medium di crescita (Geider & La Roche, 2002). Rappresenta un'approssimazione della composizione media su scale molto grandi di tempo e di spazio, ma non descrive le condizioni di singole cellule o popolazioni. Nel 1958 Alfred Redfield concluse che il rapporto ottimale tra azoto e fosforo per la coltivazione algale fosse 16:1, in termini di massa.

Diversi studi hanno investigato la variabilità di questo parametro determinandone valori ottimali e valori critici atti anche ad una prima valutazione del nutriente limitante.

### **2.3.7 Altri parametri**

Oltre ai parametri già citati vi sono ulteriori fattori che influenzano la crescita delle microalghe. Tra questi si possono citare: la salinità, il pH, la presenza di micro e macronutrienti in traccia e la turbolenza.

La salinità, sia in sistemi aperti che chiusi, può influenzare lo sviluppo e la composizione delle microalghe. Ciascuna specie possiede un intervallo ottimale di salinità. Al di fuori di questo intervallo vi possono essere ripercussioni sui tassi di crescita delle microalghe (Borowitzka & Borowitzka, 1990). Una delle metodologie più immediate e utilizzate per il controllo della salinità consiste nell'aggiunta di acqua fresca o sali che permettono di aggiustarne il valore.

---

La turbolenza è un altro importante parametro di crescita poiché attraverso di essa è possibile omogeneizzare le condizioni metaboliche nel medium in cui sono presenti le microalghe. Inoltre, un buon grado di agitazione, specialmente nelle produzioni di larga scala, consente una buona distribuzione delle microalghe attorno alle zone di luce ed ombra all'interno del reattore (Barbosa, 2003). D'altro canto, alti gradi di turbolenza possono danneggiare le microalghe a causa delle condizioni di stress meccanico a cui sarebbero sottoposte (Eriksen, 2008). Il livello ottimale di turbolenza risulta infine specie-dipendente e va investigato con attenzione per ottimizzare la crescita.

L'andamento del pH subisce delle modifiche, a seconda del tipo di metabolismo in atto poiché dipende strettamente dalla stechiometria di crescita delle microalghe. In caso di metabolismo fotoautotrofo si ha una alcalinizzazione del sistema dovuto al consumo di anidride carbonica con un conseguente aumento di pH. Viceversa, nel caso di metabolismo eterotrofo, si ha un'acidificazione del sistema causata dalla contestuale produzione di anidride carbonica frutto della degradazione del carbonio organico. Infine, per quanto riguarda il metabolismo mixotrofico, il valore del pH dipende dal tipo di metabolismo dominante, tuttavia, nella maggior parte dei casi, il suo valore rimane approssimativamente costante (Chojnacka et al., 2004). In ogni caso, è preferibile operare ad un valore di pH attorno alla neutralità per ottenere migliori rese di crescita.

L'effetto della presenza di micro e macronutrienti in traccia, infine, risulta ancora poco approfondito. Come la presenza di questi elementi (quali metalli presenti nel medium in forma disciolta) possa influenzare la crescita resta ancora incerto, quello che è stato più volte osservato e documentato è, invece, la capacità delle microalghe di rimuovere diversi tipi di metalli quali zinco,

---

mercurio, cadmio, ferro e nichel (De-Bashan & Bashan, 2010). Tale capacità di rimozione può risultare estremamente interessante nell'ottica di un utilizzo delle microalghe con fini depurativi.

## **2.4 Coltivazione delle microalghe nelle acque di rifiuto**

Le considerazioni fatte sui parametri di crescita nel capitolo 2.3 derivano da studi fatti su medium sintetici in condizioni controllate e adeguate per lo sviluppo microalgale. Utilizzare medium sintetici però ha un costo, perciò l'investimento economico necessario alla coltivazione può superare di gran lunga i ricavi economici che potrebbero derivare dalla vendita di prodotti finiti ottenuti grazie al trattamento delle microalghe (Hena et al., 2015). Nasce quindi la necessità di ricercare un medium naturalmente disponibile, possibilmente in grandi quantità, sul quale le microalghe possano crescere autonomamente: una possibilità è costituita dalle acque di rifiuto. I primi a teorizzarne un suo utilizzo sono stati Oswald & Gotaas nel 1957. Come detto nell'introduzione, i benefici derivanti dall'utilizzo delle microalghe sono molteplici, tra i quali il più importante è la capacità di depurare il flusso refluo. Su questa peculiarità sarà incentrato questo studio.

Le caratteristiche chimico-fisiche delle acque di rifiuto sono tuttavia difficilmente controllabili e potenzialmente diverse da quelle ottimali di crescita. La composizione delle acque di rifiuto è, infatti, estremamente variabile, a seconda di diversi fattori quali la stagione, la provenienza, le condizioni meteorologiche e il tipo di scarico. Rispetto a quest'ultimo esse vengono quindi suddivise in: reflui municipali, industriali e agricoli. Ciascuno di questi flussi avrà effetti diversi sullo sviluppo della coltivazione (Cai et al., 2013).

---

Un'ulteriore distinzione può essere basata sul trattamento a cui il flusso è sottoposto. A seconda dei processi a cui è sottoposto il refluo nella filiera depurativa le caratteristiche chimico-fisiche saranno ancora una volta estremamente diverse tra loro. La depurazione con le microalghe è stata studiata a diversi livelli, sia dopo trattamenti primari che secondari, come la digestione anaerobica.

## **2.5 Esperienze di coltivazione su digestato**

Il digestato è un refluo caratterizzato da abbondanti concentrazioni di azoto a fronte di modeste concentrazioni di fosforo. Le principali criticità collegate alla crescita su digestato sono: l'elevato tenore di azoto, sotto forma di azoto ammoniacale, e l'elevata torbidità del refluo. Elevate concentrazioni di ammonio, in presenza di pH e temperatura elevati, possono comportare la formazione di ammoniaca libera ( $\text{NH}_3$ ) la quale è risultata essere tossica per molte specie di microalghe (Beccari et al., 1993). L'elevata torbidità del refluo, invece, influisce negativamente sulla capacità di penetrazione della luce, comportando una minore quantità di luce disponibile per i processi di fotosintesi delle microalghe (Wang et al., 2010). Le alte concentrazioni di azoto, a fronte di bassi tenori di fosforo, comportano inoltre l'instaurarsi di un rapporto N/P tra questi nutrienti particolarmente elevato. In questo lavoro di tesi ci si è soffermato sull'influenza che questo rapporto può avere sul metabolismo microalgale. Per questo motivo è stata condotta una ricerca bibliografica che aiuti a comprendere meglio lo stato dell'arte degli effetti che questo rapporto ha sul metabolismo di crescita delle microalghe.

---

### 2.5.1 Effetti del rapporto N/P sulla crescita delle microalghe

Vista la complessità del contesto di studio, tale argomento è stato analizzato con diverse modalità e sotto diversi aspetti. Gli studi analizzati si differenziano a seconda delle diverse peculiarità sperimentali: il tipo di alimentazione (batch o semi-continuo), il tipo di microalghe, il valore del parametro N/P, il tipo di controllo effettuato per mantenere tale rapporto, il tipo di medium di coltivazione. In certi casi è stato possibile trovare una relazione tra il rapporto N/P nel medium di crescita e il tasso di sviluppo delle microalghe direttamente correlato al tasso di rimozione di azoto e fosforo.

Risulta generalmente accettato dalla comunità scientifica che il rapporto ottimale N/P sia specie dipendente (Rhee, 1978). Data l'eterogeneità del contesto e il gran numero delle variabili in gioco, trarre conclusioni omogenee che descrivano un trend generale che caratterizzi tutti gli aspetti metabolici risulta estremamente complesso, se non impossibile. Quello che però risulta possibile fare è trarre delle linee guida generalmente ricorrenti.

Dato che l'assimilazione di nutrienti è il principale meccanismo di rimozione degli stessi, il tasso di crescita della popolazione microalgale influisce direttamente il tasso rimozione dei nutrienti. Azoto e fosforo possono essere utilizzati e rimossi simultaneamente con un buon grado di efficienza solo se il rapporto N/P nelle acque di rifiuto ricade all'interno di un intervallo opportuno. Generalmente le concentrazioni di azoto e fosforo all'interno dei reflui zootecnici ricadono negli intervalli illustrati nella tabella 2.5.1.

*Tabella 2.5.1: Concentrazioni tipiche di azoto e fosforo nei digestati zootecnici (Prandini et al., 2015).*

<b>Nutrienti</b>	<b>Range</b>
N <sub>TOT</sub> [mgN/L]	1500-2000
P <sub>TOT</sub> [mgP/L]	20-60

---

Analizzando la tabella, si riscontra una forte variabilità, a seconda delle diverse caratteristiche dei reflui zootecnici con cui si lavora. Questo ampio intervallo di valori potrebbe ostacolare il conseguimento del rapporto ottimale di crescita, rendendo il processo inefficiente e oneroso.

Al fine di ottenere una maggiore consapevolezza sul ruolo del parametro N/P del mezzo di coltivazione e sugli effetti sortiti da tale rapporto sulla crescita microalgale, sono stati approfonditi diversi studi riportati in letteratura.

### **Modifica al rapporto N/P interno in funzione del rapporto del medium di crescita**

Il fenomeno della modifica del rapporto azoto/fosforo proprio della biomassa algale risulta piuttosto frequente nella crescita delle microalghe. Quando queste vengono trasferite dal medium di crescita al medium che vuole essere depurato il rapporto tra azoto e fosforo all'interno delle cellule subisce una modifica, andandosi ad avvicinare a quello proprio del medium in cui sono immerse (Whitton et al., 2016). Tale modifica è dovuta al fatto che le microalghe, cambiando le condizioni di crescita, si adattano all'ambiente che le circondano (Beuckels et al., 2015). Questo fenomeno di aggiustamento del rapporto N/P interno è stato osservato che avviene nei primi giorni (in genere 3) a seguito del trasferimento delle microalghe, al seguito del quali resta pressoché costante attorno al valore raggiunto.

Esiste un collegamento tra il rapporto N/P del medium in cui le alghe sono accresciute e il rapporto N/P proprio della biomassa microalgale. Qualora questo fosse inizialmente basso, esso subisce un incremento in condizioni azoto-limitanti; il contrario avviene, invece, per specie algali il cui bilancio chimico interno fosse più sbilanciato verso l'azoto, nelle medesime condizioni azoto-limitanti. Tale comportamento suggerisce una maggior capacità di assorbire forme azotate per trasformarle in biomassa da parte delle



---

microalghe caratterizzate da rapporti iniziali bassi, motivo per cui, in condizioni azoto-limitanti certe specie risultano preferibili per fini depurativi (Mandalam & Palsson, 1998). Diverso è il comportamento del rapporto N/P interno in ambienti caratterizzati da abbondanza di nutrienti. Per quanto riguarda l'azoto, infatti, i migliori rendimenti di rimozione corrispondono a specie microalgali dotate di un elevato rapporto N/P iniziale. Se tale rapporto raggiunge valori maggiori di 18 l'efficienza depurativa nei confronti dell'azoto è elevatissima (>99%), specialmente se confrontata con efficienze del 25-60% per specie dotate di un rapporto minore di 18 (Whitton et al., 2016). Questo comportamento è dovuto al fatto che un maggior contenuto iniziale di azoto comporta, a fini accrescitivi, una maggior richiesta di azoto da parte delle cellule. Per quanto riguarda il fosforo il comportamento è differente. Specie caratterizzate da un basso contenuto iniziale si sono dimostrate più efficienti nel rimuovere i fosfati (Ruiz-Martinez et al., 2015).

#### **Agente limitante**

Quando la crescita di un microrganismo avviene in ambienti metabolici in cui sono presenti diversi elementi trovare quale di questi sia quello che limita lo sviluppo risulta estremamente interessante. Le acque di rifiuto sono in tal senso un substrato estremamente eterogeneo; al loro interno coesistono infatti un numero elevatissimo di elementi in quantità e forma assai variabile. Nello studiare le condizioni che possano favorire la crescita, a fini depurativi, delle microalghe in questo medium, oltre che al rapporto tra azoto e fosforo si deve, dunque, anche tenere conto se uno di questi elementi risulta limitante ai fini del processo. Per rapporti N/P da 100:1 fino a 5:1 l'elemento limitante è, nella quasi totalità dei casi, il fosforo. Come riportato da Xin et al. (2010) al variare del rapporto il rendimento di rimozione del fosforo resta costante (>99%) mentre quello dell'azoto aumenta al suo diminuire raggiungendo

---

rendimenti di rimozione comparabili con quelli del fosforo solo quando tale rapporto raggiunge il valore di 30:1. Questo comportamento permette di considerare il fosforo agente limitante laddove il medium di crescita sia un'acqua di rifiuto. Tale assunzione può risultare forte, ma visti gli elevati valori di N/P nei reflui, considerare il fosforo agente limitante è, in linea generale, corretto. Anche la capacità delle cellule microalgali di assumere più fosforo di quanto strettamente necessario alla crescita (Markou et al., 2014), potrebbe avallare questa tesi. Tale fenomeno, detto *luxury uptake*, è stato verificato e accertato in diversi studi sperimentali (Powell et al., 2008).

### **2.5.2 Confronto letteratura sugli effetti del rapporto N/P**

Le assunzioni fatte nei capitoli precedenti, per quanto possano essere ritenute corrette se si parla di acque di rifiuto, sono strettamente specifiche. Da un'analisi approfondita della letteratura disponibile, per quanto riguarda il rapporto azoto fosforo, le conclusioni a cui si può giungere sono spesso estremamente diverse tra loro se non addirittura, alle volte, contraddittorie. Queste discrepanze potrebbero essere causate dall'elevata numerosità di variabili che caratterizza il contesto in esame (vedi paragrafo 2.3 e seguenti) e dal fatto che il rapporto N/P non domina singolarmente la crescita microalgale, poiché anche le singole concentrazioni di azoto e fosforo influenzano i metabolismi in atto. Per questo motivo si è deciso di proporre un confronto tra alcuni dei testi analizzati nella seguente tabella.

Tabella 2.6.1: Confronto letteratura inerente rapporto N/P.

Riferimento	Medium	Specie algale	N/P ratio	Risultati crescita algale	Rimozione Azoto e Fosforo
Beuckels, Smolders, Muylaert (2015)	Sintetico	<i>Chlorella</i> e <i>Scenedesmus</i>	1 - 25	<i>Scenedesmus</i> non influenzata dal rapporto N/P del medium, finché non si raggiungono condizioni limitanti. <i>Chlorella</i> cresce in modo direttamente proporzionale al parametro N/P.	Maggiori rimozioni per maggiori rapporti N/P. Rimozione azoto dipende solo da N. Rimozione fosforo per alti N dipende solo da P, per bassi N si hanno basse rimozioni.
Seung-Hoon et al. (2013)	Refluo, digestato	Consorzio ( <i>Scenedesmus</i> , <i>Chlorella</i> , <i>Nitzschia</i> )	120; 31	La crescita algale è influenzata dal rapporto N/P.	La rimozione di azoto e fosforo risulta più efficiente in corrispondenza di N/P pari a 31.
Li et al. (2010)	Sintetico	<i>Scenedesmus</i>	2 - 100	La crescita non è influenzata dal rapporto N/P finché non si raggiungono condizioni limitanti.	Rimozione del fosforo risulta indipendente dal parametro N/P. La rimozione dell'azoto invece risulta inversamente proporzionale al parametro N/P.

Liu & Vyerman (2015)	Sintetico	<i>Cladophora sp ; Klebsormidium sp.; Pseudanabaena sp.</i>	1 - 20	La crescita algale è influenzata dal rapporto N/P, l'effetto risulta specie dipendente.	La rimozione del fosforo è direttamente proporzionale al parametro N/P. La rimozione dell'azoto invece è indipendente dal parametro N/P.
Whitton et al. (2016)	Refluo, post sedimentazione secondaria	<i>Chlorella e Scenedesmus</i>	1,1 - 22,1	La crescita algale è influenzata dal rapporto N/P.	La rimozione del fosforo è direttamente proporzionale al parametro N/P. La rimozione dell'azoto invece è inversamente proporzionale al parametro N/P.
Liang & Wang et al. (2010)	4 tipi di refluo: #1 prima del trattamento primario; #2 dopo trattamento primario; #3 dopo fanghi attivi; #4 dopo centrifugazione	<i>Chlorella</i>	5,9; 4,7; 53,2; 0,36	Crescita algale direttamente proporzionale a N/P in tutti e 4 i flussi (nel #3 crescita bassa dovuta a fosforo limitante).	Maggiori rimozioni per maggiori rapporti N/P.

---

## **2.6 Esperienze di coltivazione su refluo zootecnico primario**

Questo tipo di refluo ricopre un ruolo piuttosto importante nel tema della gestione delle acque reflue, non solo per il continuo incremento di quantitativi prodotti negli ultimi 10 anni (ogni anno solo in Italia vengono generate circa 150 milioni di tonnellate all'anno di refluo agro-zootecnico suino), ma anche per la ricchezza di nutrienti contenuti, azoto e fosforo in particolare, che diversificano questo tipo di flusso dagli altri (Cai et al., 2013).

### **2.6.1 Refluo Zootecnico**

Il refluo zootecnico proveniente da allevamenti suini è uno dei reflui agroindustriali più ricchi di contaminanti. Esso è caratterizzato da grandi quantitativi di materia organica, azoto e fosforo (vedi tabella 2.5.1) e inoltre vi possono essere presenti alte concentrazioni di metalli pesanti (De Godos et al., 2010). Una delle più importanti criticità per il trattamento di questo tipo di refluo è la scelta di microalghe adatte a supportare la rimozione degli alti carichi di materia organica, sia sotto forma di carbonio che di azoto. Permangono le medesime criticità citate per il digestato, ovvero l'effetto inibente di elevate concentrazioni di ammoniaca libera e gli elevati valori di torbidità.

Il contenuto di nutrienti per questo tipo di refluo dipende da svariati fattori, quali: il tipo di animali allevati e la loro dieta, la grandezza e la produttività dell'allevamento, la gestione e la politica dell'azienda e infine la localizzazione dell'allevamento. La metodologia di smaltimento più comune per un flusso di tipo zootecnico è quella di utilizzarlo come fertilizzante.

---

Tuttavia a causa dell'elevato apporto di nutrienti contenuti all'interno del refluo, spesso i raccolti sui quali esso viene cosparso non riescono ad assimilare completamente i nutrienti presenti. Questo comporta un accumulo sul terreno di nutrienti in eccesso che in casi di piogge subiscono ruscellamento con conseguente sversamento all'interno di corpi idrici, eutrofizzandoli (Cai et al., 2013). Questo problema è stato trattato anche all'interno della normativa europea, in particolare attraverso la Direttiva sui Nitrati 91/676/CEE del 12 dicembre 1991. Tale provvedimento stabilisce un valore di riferimento per quanto riguarda la concentrazione di nitrati nelle acque sotterranee e un livello massimo di concentrazione ammissibile per garantire la qualità dell'acqua potabile e per cercare di arginare i fenomeni di eutrofizzazione. Il limite massimo dei nitrati proveniente da fonti agricole nelle acque superficiali, indicato all'interno della Direttiva, è pari a 50 mg/L.

### **2.6.2 Crescita delle microalghe nel medium zootecnico**

I nutrienti presenti nel refluo zootecnico vengono utilizzati, in fase operativa, per far crescere la biomassa algale favorendo, contestualmente, la depurazione del flusso trattato. La crescita microalgale può essere ottenuta sfruttando diverse condizioni di crescita: fotoautotrofa, eterotrofa e mixotrofica. Al fine di ottimizzare la resa del sistema potrebbe risultare vantaggioso combinare questi tre tipi di condizioni. È stato riscontrato che porre una fase di crescita mixotrofica tra la fase fotoautotrofa e quella eterotrofa comporta le massime rese in termini di biomassa cresciuta, COD degradato e consumo di sostanza azotate. In alternativa, una configurazione più semplice, ma leggermente meno vantaggiosa, è rappresentata dalla sequenza di una fase fotoautotrofa e di una eterotrofa (Hena et al., 2015). L'inserimento di una fase mixotrofica tra le due fasi, serve a ridurre lo stress

---

subito dalle alghe nel passaggio da una condizione in cui sono sottoposte alla luce ad una in cui sono in totale assenza di illuminazione. Il comportamento generale può risultare tuttavia specie dipendente.

Un refluo zootecnico contiene, inevitabilmente, diverse popolazioni batteriche. Queste possono crescere in consorzio con le alghe e degradare il carbonio organico disciolto. In questo processo di degradazione i batteri sfruttano l'ossigeno prodotto dalle microalghe durante il processo di fotosintesi (Gonzalez et al., 2008) rilasciando contemporaneamente anidride carbonica, la quale viene assimilata dalle microalghe (Oswald et al., 1988).

### **Pretrattamento del refluo**

Per quanto riguarda il refluo zootecnico, fornire dei range di concentrazione delle principali componenti risulta complicato. A seconda della provenienza dello scarico possono presentarsi intervalli estremamente variabili dei parametri principali, anche di oltre un ordine di grandezza. Ad esempio si possono trovare reflui con valori di COD superiori ai 4000 mg/L così come reflui caratterizzati da valori di COD ampiamente inferiori ai 1000 mg/L.

Le concentrazioni di nutrienti nei reflui zootecnici, per quanto variabili, risultano tuttavia generalmente elevate. Ne consegue, dunque, la necessità di pretrattare il flusso da trattare al fine di operare in range adeguati alla crescita microalgale. Tra i pretrattamenti si annoverano: la filtrazione, l'aggiunta di nutrienti e la diluizione con acqua di rete o con effluenti con un contenuto di nutrienti minore. Tale necessità deriva dal fatto che un'abbondante presenza di certi tipi di sostanze (ad esempio alte concentrazioni di  $\text{NH}_4$ , unitamente ad un pH elevato) ostacola lo sviluppo della biomassa (Gonzalez et al., 2008). Per ottenere una rimozione soddisfacente di nutrienti il refluo può venir diluito, in fase operativa, fino a 10 o 20 volte (Zhu et al., 2013; De Godos et al., 2009).

---

La necessità di diluire il refluo non è tuttavia legata alla sola presenza di sostanze a concentrazioni potenzialmente inibenti. Diluire il refluo è, infatti, fondamentale anche per il corretto svolgimento della fotosintesi da parte delle microalghe. La luce deve riuscire a penetrare a tutti i livelli del medium di cultura affinché la fotosintesi proceda omogeneamente. Per questo motivo risulta di fondamentale importanza analizzare un ulteriore parametro: l'assorbanza. Se questa raggiunge valori superiori al 3 per una lunghezza d'onda pari a 680 nm la luce potrebbe non raggiungere omogeneamente tutti gli strati della cultura con conseguenze negative sulla fotosintesi delle microalghe (Moheimani, 2005).

#### **Influenza della concentrazione di COD**

Stante la citata grande variabilità di nutrienti presenti nel refluo zootecnico, risulta interessante stabilire per i vari parametri quale sia l'intorno migliore per ottenere il maggior sviluppo di biomassa algale. Visto il ruolo centrale del COD come fonte di nutrimento per i batteri che forniscono CO<sub>2</sub> al processo fotosintetico delle microalghe, risulta interessante trovarne una concentrazione ottimale. Zhu et al. Nel 2013 hanno dimostrato come la concentrazione ottimale di COD potrebbe essere circa 1900 mg/L. Per tali valori lo sviluppo microalgale è massimo e lo stesso si può dire per il tasso di rimozione di nutrienti. Solamente la velocità di crescita delle microalghe è maggiore per concentrazioni minori di COD; una velocità di crescita maggiore a minore concentrazioni è spiegata dalla maggior quantità di luce ricevuta dalle microalghe in condizioni più diluite la quale accelera il processo di crescita.

### **2.6.3 Condizioni operative di processo**

La volontà di applicare metodi di depurazione basati sulle microalghe comporta la necessità di verificare l'applicabilità di tali metodologie a scala



---

reale, cioè (nella maggior parte dei casi) outdoor e, quindi, in condizioni non totalmente controllate. Studiare il comportamento in condizioni outdoor risulta fondamentale in quanto tutti i maggiori impianti di trattamento delle acque reflue presenti al giorno d'oggi sono di questo tipo.

Fattori ambientali come la luce e la temperatura rappresentano i principali parametri che influiscono sulla produzione di biomassa e, quindi, sulla qualità dell'effluente depurato (Vonshak, 1997). Di questi il parametro più critico è la temperatura, poiché a basse temperature (10°C - 15°C) la cinetica metabolica delle microalghe risulta rallentata mentre ad alte temperature (30°C – 35°C) la crescita viene ostacolata da condizioni di stress ossidativo. Un'ulteriore limitazione di queste configurazioni è rappresentata dall'eccessiva ossigenazione a cui è sottoposto il sistema. Questa può portare ad un'eccessiva velocità ossidazione del COD presente nel flusso ad opera dei batteri. La produzione di CO<sub>2</sub> non è supportata da un contemporaneo consumo da parte delle alghe, saturando il sistema e compromettendone la resa (Mata et al., 2010).

Tuttavia i sistemi outdoor presentano notevoli vantaggi: tra cui costi contenuti di realizzazione e durabilità elevata. L'aspetto economico, in particolare, rende questi sistemi (quantomeno al momento) insostituibili, motivo per cui, negli ultimi anni, si è cercato di capire la sostenibilità di questi sistemi per trattamenti microalgali. De Godos et al. nel 2009 hanno eseguito delle sperimentazioni outdoor verificando la fattibilità in termini di rimozione dei nutrienti: le rese trovate, infatti, erano del tutto comparabili con quelle ottenute in sistemi indoor, anche nei mesi caratterizzati da temperature più rigide o più torride (inferiori a 7°C nei mesi invernali e superiori ai 17°C nei mesi estivi).

---

Restano tuttavia problematiche per quanto riguarda il controllo delle condizioni di processo. Raffrontando due sistemi identici per concentrazioni e caratterizzazioni dei flussi trattati e differenziati solo per le condizioni di processo, ovvero controllate e non, i risultati ottenuti raramente sono comparabili. Il mancato controllo di parametri quali pH, salinità e temperatura influenza in maniera negativa la resa di rimozione delle sostanze azotate, in particolare per quanto riguarda l'ammonio (Gonzalez et al., 2011).

## **2.7 Interazione microalghe batteri**

L'interazione tra microalghe e batteri è inevitabile nel momento in cui si utilizzano coltivazioni microalgali per la depurazione di flussi reflui, per questo motivo capire le interazioni tra questi due microrganismi è essenziale al fine di esplorare in completezza i processi di trattamento delle acque reflue (Choi, 2010). La presenza simultanea di entrambi i microrganismi all'interno di un sistema biologico può sortire effetti sia positivi che negativi: positivi se entrambi i microrganismi producono vicendevolmente sostanze in grado di migliorare la crescita delle due specie, negativi se invece producono tossine inibenti per lo sviluppo delle popolazioni (Mujtaba et al., 2016). La riuscita di tale tipo di interazione dipende sia dalle specie in gioco che dai fattori ambientali che caratterizzano il sistema biologico. Il miglior processo biologico che si possa instaurare tra le due specie di microrganismi è quello in cui le microalghe producono ossigeno tramite la fotosintesi e quest'ultimo viene sfruttato dai batteri sia per l'ossidazione delle sostanze azotate che per la degradazione del COD. I batteri eterotrofi producono in questo modo anidride carbonica, molecola fondamentale per la sintesi di nuova biomassa microalgale (Gonzalez et al., 2008; de Bashan, 2005). I batteri nitrificanti,

---

invece, grazie all'ossigeno fornito dalle microalghe completano i processi di nitrificazione in cui avviene l'ossidazione dell'ammonio in nitrito e nitrato, come descritto in appendice C.1.

---

---

## **CAPITOLO 3**

# **MATERIALI E METODI**

Gli esperimenti e le analisi descritte in questo capitolo sono stati condotti presso il laboratorio DISAT dell'Università degli Studi di Milano-Bicocca.

### **3.1 Origine dei reflui**

I reflui provenienti utilizzati in questa sperimentazione provengono dall'azienda agricola Corte Grande, situata a Casaleto di Sopra, in provincia di Cremona, che alleva circa 20.000 suini.

All'interno di tale realtà è presente un impianto di trattamento del refluo zootecnico proveniente dall'allevamento stesso. L'impianto comprende una prima fase di purificazione del refluo suino, attraverso flottazione, per separare la frazione liquida da quella solida. Dopo la separazione, il surnatante, qui chiamato WW1, è inviato al trattamento biologico, mentre il fango è avviato alla digestione anaerobica, in digestori operanti in loco, che lavorano in condizioni di mesofilia (Volume = 3000 m<sup>3</sup>, Tempo di residenza idraulico ≈ 30 giorni, T = 40°C). Tali digestori, oltre che dal fango separato nel processo di flottazione, sono alimentati da frazioni minori di permeato di siero e da mais. Il refluo in uscita dai digestori è infine alimentato a una centrifuga adibita alla

---

separazione della frazione solida da quella liquida. Il surnatante, chiamato in questa sede semplicemente digestato (WW2) ed il refluo suinicolo a valle della flottazione (WW1) sono stati utilizzati come medium di crescita per le microalghe e le loro caratteristiche sono qui di seguito descritte.

### 3.1.1 Digestato

Una delle sperimentazioni ha utilizzato il digestato proviene dall'azienda agricola citata. Le caratteristiche chimico-fisiche di questo flusso sono riportate nella tabella sottostante.

Tabella 3.1.1: Parametri principali digestato (WW2).

<b>DIGESTATO</b>	
<i>ABS 680 (TQ)</i>	2,1
<i>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N (mg/L)</i>	1350
<i>NO<sub>3</sub>-N (mg/L)</i>	15,7
<i>NO<sub>2</sub>-N (mg/L)</i>	0,68
<i>PO<sub>4</sub>-P (mg/L)</i>	10,6
<i>N/P</i>	129
<i>COD (filtrato) (mg/L)</i>	5400
<i>TSS (mg/L)</i>	1300
<i>VSS (mg/L)</i>	1005

Le caratteristiche del digestato qua riportate evidenziano un refluo carente di fosforo, di nitrati e di nitriti. Di contro, presenta una concentrazione elevata di ammonio e un conseguente elevato rapporto N/P. L'elevata concentrazione di ammonio ha comportato, per tutte le sperimentazioni che hanno utilizzato questo refluo come medium di crescita, una sua diluizione, differente di volta in volta a seconda della prova.

Il digestato è stato campionato in data 01/02/2017 e durante la sperimentazione questo refluo è stato tenuto in frigorifero.

---

### 3.1.2 Refluo zootecnico

L'altro refluo utilizzato nelle sperimentazioni è il WW1, ovvero il surnatante separato dopo il processo di flottazione.

I suoi principali parametri chimico-fisici sono riportati nella tabella 3.1.2.

*Tabella 3.1.2: Parametri chimico-fisici del refluo zootecnico in esame (WW1).*

<b>Refluo zootecnico</b>	
<i>ABS 680 (TQ)</i>	0,17
<i>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N (mg/L)</i>	180
<i>NO<sub>3</sub>-N (mg/L)</i>	0
<i>NO<sub>2</sub>-N (mg/L)</i>	0
<i>PO<sub>4</sub>-P (mg/L)</i>	1,97
<i>N/P</i>	91,4
<i>COD (filtrato) (mg/L)</i>	677
<i>TSS (mg/L)</i>	163
<i>VSS (mg/L)</i>	116
<i>Torbidità</i>	146

Anche questo refluo presenta modeste concentrazioni di nutrienti, eccezion fatta per l'ammonio. Tuttavia le concentrazioni di questo nutriente non raggiungono valori particolarmente elevati. Per questo motivo in tutte le sperimentazioni in cui il WW1 è stato utilizzato come medium di crescita, esso è stato alimentato tal quale, senza diluizioni.

Il WW1 è stato campionato in data 06/03/2017 e durante la sperimentazione questo refluo è stato tenuto in freezer a -18°C per mantenerne inalterate le caratteristiche chimico-fisiche; esso è stato scongelato prima di ogni utilizzo.

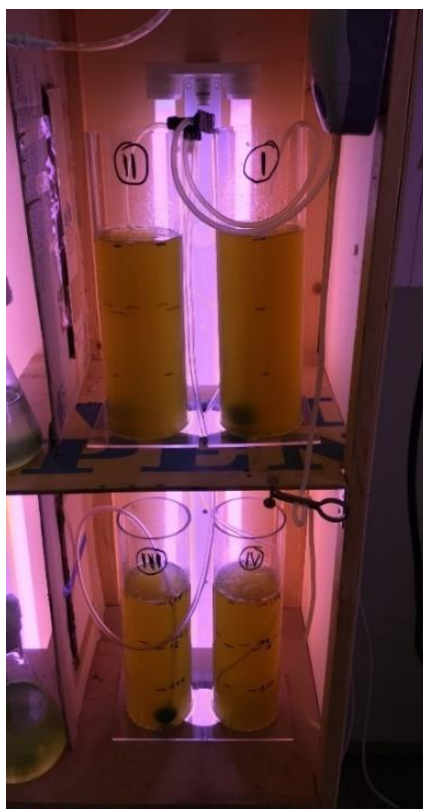
---

## 3.2 Set-up sperimentali

### 3.2.1 Set-up prove di crescita su digestato

Le sperimentazioni sono state condotte in quattro reattori a colonna, illustrati in figura 3.2.1, in plexiglas delle medesime dimensioni: diametro di base 10 cm, altezza totale 35 cm con un'altezza utile pari a 20 cm. Questi sono stati riempiti con un volume utile di 1,5 litri e sottoposti alla luce radiante proveniente da lampade a fluorescenza posizionate dietro i reattori (OSRAM modello FLUORA, ciascuna da 18 W, PAR: 40 W/m<sup>2</sup>, radianza misurata attraverso radiometro Hach Lange). A seconda dell'esperimento, l'agitazione è stata ottenuta mediante insufflazione di gas (aria o CO<sub>2</sub>) o mediante agitazione meccanica utilizzando un miscelatore magnetico per ciascun reattore, posto al di sotto del reattore stesso. Infine, per contenere le perdite volumetriche collegate al fenomeno dell'evaporazione, i quattro reattori sono stati coperti superiormente con dell'apposito parafilm. Nel corso di una delle prove effettuate è stata insufflata CO<sub>2</sub>, tramite una bombola di anidride carbonica (SAPIO, di volume pari 25L) e attraverso un apposito sistema di insufflazione. A partire dalla bombola, attraverso un sistema di tubi, l'anidride carbonica veniva insufflata mediante l'uso di diffusori in vetro direttamente nelle colonne, con una portata di 1500 Nml/min (pari a 1 vvm). Il set-up di crescita è illustrato nella figura 3.2.1.





*Figura 3.2.1: Reattori a colonna di crescita utilizzati per le prove su digestato.*

### **3.2.2 Set-up prove di crescita su refluo zootecnico**

Per questi esperimenti come fotoreattori sono stati utilizzati provettoni in vetro di 4,5 cm di diametro, 20 cm di altezza e del volume utile di 150 ml.

I reattori a colonna sono stati posizionati davanti a sei lampade (OSRAM modello FLUORA, ciascuna da 18 W, PAR: 40 W/m<sup>2</sup>), alla medesima distanza, in modo che le condizioni di illuminazione fossero omogenee.

L'agitazione è stata fornita attraverso un apposito agitatore magnetico, posizionato sotto ciascun reattore. Infine, per contenere le perdite evaporative, i tre reattori sono stati chiusi superiormente tramite un tampone di cotone. Il set-up di prova è stato riportato in figura 3.2.2. Quando necessario, è stata insufflata CO<sub>2</sub>, tramite la medesima bombola di anidride carbonica (SAPIO, di volume pari 25L) utilizzata nella sperimentazione sul

---

digestato e sfruttando la medesima rete di tubi, sostituendo solamente i diffusori immessi nelle colonne. Tale insufflazione di CO<sub>2</sub> è avvenuta tramite iniezioni della durata di 10 minuti, due volte a settimana, con un flusso pari a 750 Nml/min (pari a 5 vvm).



Figura 3.2.2: Reattori a colonna di crescita utilizzati per le prove su WW1.

## 3.3 Inoculi micoalgali

### 3.3.1 Inoculo per prove su digestato

L'inoculo utilizzato per questa sperimentazione è stato prelevato da un reattore di 12 litri installato presso il laboratorio dell'Università degli Studi di Milano-Bicocca e già presente per una sperimentazione antecedente. L'inoculo era costituito da un consorzio di microalghe differenti: in particolare *Clamydomonas spp.* e *Chlorella spp.* Queste erano state coltivate sullo stesso digestato che viene utilizzato in questa sperimentazione. Le caratteristiche fisico-chimiche della sospensione microalgale utilizzata come inoculo sono riportate nella tabella 3.1.1.

Tabella 3.3.1: Parametri principali sospensione algale di inoculo.

<b>SOSPENSIONE ALGALE INIZIALE</b>	
Assorbanza a 680 nm (TQ)	1,57
$NH_4^+-N$ (mg/L)	64,6
$NO_3-N$ (mg/L)	54,7
$NO_2-N$ (mg/L)	210
$PO_4-P$ (mg/L)	-
N/P	-
COD (filtrato) (mg/L)	858
TSS (mg/L)	1075
VSS (mg/L)	935

### 3.3.2 Inoculo per le prove su refluo zootecnico

Si è utilizzato come inoculo microalgale un campione proveniente da una precedentemente sperimentazione e conservato a 4°C. Tale campione, di volume pari a 50 ml, è stato diluito in una sospensione di 250 ml con refluo WW1, la quale è stata accresciuta per 10 giorni fino ad arrivare ad un valore di assorbanza discreto, pari a 0,5.

Le caratteristiche chimico-fisiche dell'inoculo così preparato sono riportate nella tabella 3.3.2.

Tabella 3.3.2: Parametri principali sospensione algale di partenza.

<b>INOCULO TEMPO 0</b>	
Assorbanza a 680 nm (TQ)	0,489
$NH_4^+-N$ (mg/L)	113
$NO_3-N$ (mg/L)	0,00
$NO_2-N$ (mg/L)	0,00
$PO_4-P$ (mg/L)	9,15
N/P	12,4
TSS (mg/L)	431
VSS (mg/L)	368
COD (TQ) (mg/L)	45
Torbidità	452

---

## **3.4 Piano sperimentale**

### **3.4.1 Prove di crescita su digestato**

Sono state effettuate tre prove di crescita su digestato. Le prove descritte sono consequenziali: ogni prova è stata impostata a partire dalla precedente col fine di ottimizzare il set sperimentale di crescita.

#### **3.4.1.1 Prima prova in batch - agitazione tramite insufflazione di aria**

Il primo esperimento condotto consiste in una prova di tipo batch in cui i quattro reattori a colonna sono stati allestiti in parallelo e risultano caratterizzati dalle medesime condizioni di esercizio. La sospensione algale di partenza è quella descritta nel capitolo 3.3.1 ed è stata diluita 20 volte al fine di ridurre la concentrazione microalgale iniziale. È stato poi dosato digestato in modo che l'azoto iniziale risultasse in ogni colonna pari a 200 mg/L. Il rapporto N/P è stato fissato a 10 aggiungendo dall'esterno del fosforo. I calcoli stechiometrici sono presentati in appendice A, paragrafo A.1.

Ogni colonna era dunque così costituita: 75 ml di inoculo, 200 ml di digestato e 1225 ml di acqua di rete. Le concentrazioni iniziali di azoto e fosforo totale sono risultate pari a 200 mgN/L e 19,9 mgP/L per un rapporto N/P iniziale pressoché pari a 10.

Il piano di monitoraggio è stato il seguente: analisi complete di tutti i parametri di interesse (sostanze azotate, azoto fosforo, COD, assorbanza, torbidità, pH, T e solidi) due volte a settimana, all'inizio e alla fine della stessa. Tale piano è stato mantenuto senza modifiche per tutte le prove di crescita su digestato che sono state effettuate.

---

La biomassa cresciuta in questa prima sperimentazione è stata riutilizzata in quella successiva servendo da nuovo inoculo.

### **3.4.1.2 Seconda prova in batch - agitazione tramite insufflazione di CO<sub>2</sub>**

Questa seconda prova differiva dalla precedente in quanto l'agitazione è stata sostituita con l'insufflazione dell'anidride carbonica, tramite appositi aeratori. L'insufflazione di anidride carbonica avveniva in continuo.

Eccezion fatta per la sostituzione dell'aria con la CO<sub>2</sub>, la configurazione operativa è rimasta la medesima della sperimentazione precedente: l'inoculo è stato ricavato dalla sperimentazione precedente unendo in un unico contenitore le 4 sospensioni delle diverse colonne (tabella 3.4.1). Questa sospensione è stata diluita 20 volte per ridurre la concentrazione delle microalghe. È stato dosato digestato e Sali di fosforo per ottenere una concentrazione di azoto e fosforo rispettivamente pari a 200 mgN/L e 20 mgP/L. I calcoli stechiometrici sono riportati in appendice A, paragrafo A.2.

*Tabella 3.4.1: Parametri principali sospensione algale derivante da coltivazione con insufflazione aria, utilizzata per la seconda sperimentazione.*

<b>SOSPENSIONE ALGALE INIZIALE</b>	
<i>ABS 680 (TQ)</i>	1,09
<i>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N (mg/L)</i>	0,00
<i>NO<sub>3</sub>-N (mg/L)</i>	0,00
<i>NO<sub>2</sub>-N (mg/L)</i>	15
<i>PO<sub>4</sub>-P (mg/L)</i>	1,12
<i>N/P</i>	13,39
<i>TSS (mg/L)</i>	769
<i>VSS (mg/L)</i>	637

Ogni colonna era così costituita: 75 ml di inoculo, 220 ml di digestato e 1205 ml di acqua di rete, con le concentrazioni di azoto e fosforo iniziali pari a, rispettivamente, 201 mg/L e 20,1 mg/L

---

La biomassa algale ottenuta in questa seconda sperimentazione è stata utilizzata come inoculo per la successiva sperimentazione in semi-continuo.

### 3.4.1.3 Prova in semi-continuo con insufflazione di CO<sub>2</sub>

In questa terza prova si è deciso di modificare il setup dell'esperimento: la CO<sub>2</sub> non è stata più immessa in continuo, bensì due volte a settimana tramite insufflazione di 30 minuti direttamente nelle colonne ad una portata di circa 1500 Nml/min (pari a 1 vvm). La gestione delle colonne è stata poi differenziata: una coppia di reattori (NC1 e NC2) è stata alimentata con un digestato caratterizzato dal suo rapporto N/P pari a 129 gN/gP. L'altra coppia (C1 e C2) invece è stata alimentata con un digestato il cui rapporto è stato corretto a 10 gN/gP dosando KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

In questa terza prova la sospensione algale utilizzata per inoculare le alghe era pari ad un terzo della volumetria totale dei reattori. La sospensione è stata ricavata dalla sperimentazione precedente unendo in un unico contenitore i 4 substrati delle diverse colonne e prelevando da questo un volume di 500 ml, inoculato nella seguente prova. Le caratteristiche chimico-fisiche della sospensione algale sono riportate nella tabella 3.4.2.

*Tabella 3.4.2: Parametri principali sospensione algale utilizzata come inoculo per la terza prova con digestato.*

<b>SOSPENSIONE ALGALE INIZIALE</b>	
ABS 680 (TQ)	1,6
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg/L)	130,00
NO <sub>3</sub> -N (mg/L)	16,10
NO <sub>2</sub> -N (mg/L)	48
PO <sub>4</sub> -P (mg/L)	17,2
N/P	2,79
TSS (mg/L)	498
VSS (mg/L)	494

---

Anche in questa sperimentazione la diluizione del digestato è ottenuta a partire da calcoli stechiometrici, riferiti all'azoto totale. Da questi è stato ottenuto il volume di digestato alimentato alle colonne, pari a 149 ml. Nelle colonne NC1 e NC2 non è stato aggiunto fosforo sotto forma di sale, diversamente, per le colonne C1 e C2, al fine di aggiustare il rapporto N/P a 10, è stato necessario fornire del fosforo.

Un'ulteriore novità è stata l'introduzione di un sistema di alimentazione in semi-continuo: i reattori hanno operato con un tempo di residenza idraulico (HRT) di 10 giorni. La continuità del processo è stata garantita da due alimentazioni settimanali di volume pari a 500 ml.

Come influente è stato utilizzato il digestato, diluito 6,83 volte con acqua di rete per ridurre la concentrazione di azoto a 200 mgN/L. L'influente alimentato alle colonne NC1 e NC2 era caratterizzato da rapporto N/P proprio della diluizione e pari a 129. Quello invece alimentato alle colonne C1 e C2 da un rapporto N/P pari a 10. I calcoli stechiometrici mediante cui sono stati ricavati i valori riportati in questo paragrafo sono presentati in appendice A, paragrafo A.3.

La concentrazione risultante di fosforo nelle due diverse configurazioni è risultata pari a 6,79 mg/L per le colonne NC1 e NC2 e 20 mg/L per le colonne C1 e C2.

### **3.4.2 Prove di crescita su refluo zootecnico (WW1)**

#### **3.4.2.1 Prova 1**

La sospensione inoculata descritta nel capitolo 3.2.2 è stata successivamente suddivisa in 3 reattori a colonna i quali sono stati poi portati a volume mediante aggiunta di refluo. In ogni reattore dunque sono stati immessi 83 ml di sospensione e 67 ml di refluo WW1.

---

Ai reattori non è stata fornita né aria né anidride carbonica, per verificare se la crescita microalgale potesse essere supportata dall'anidride carbonica prodotta dai batteri per ossidazione della sostanza organica.

L'alimentazione in semi-continuo ha avuto lo scopo di riprodurre un eventuale trattamento di depurazione, tipicamente gestito in modo continuo o semi-continuo. Il tempo di residenza idraulico (HRT) dei reattori è stato di 10 giorni. Tale HRT è stato fissato in continuità con una precedente sperimentazione (Elaborato di tesi di Maria Beatriz, 2016) nel quale è stato riscontrato che 10 giorni è il tempo di residenza idraulico ottimale. L'alimentazione in ciascun reattore è stata condotta due volte alla settimana, di volume diverso: una prima alimentazione, all'inizio della settimana, di volume pari a 45 ml e una seconda alimentazione, nella seconda parte della settimana, di volume pari a 60 ml. Tali volumi sono stati ricavati partendo dall'HRT. Essendo questo di 10 giorni ed essendo il volume di ogni reattore pari a 150 ml, era necessario alimentare 15 ml al giorno, corrispondenti a 45 ml o 60 ml per cicli, rispettivamente, di 3 o 4 giorni. Tali volumi sono stati alimentati dopo un prelievo di ugual volume della sospensione algale, sul quale sono state effettuate le analisi chimiche e fisiche di monitoraggio. Tale piano è stato così organizzato: due volte a settimana le analisi complete di tutti i parametri di interesse (sostanze azotate, azoto fosforo, COD, assorbanza, torbidità, pH, T e solidi), una volta a settimana le analisi dei solidi, del fosforo e del COD (quest'ultima analisi nella seconda metà della sperimentazione, così come in quella successiva, è stato misurato due volte a settimana).

### **3.4.2.2 Prova 2**

La sospensione algale, utilizzata come inoculo per questa seconda sperimentazione, è stata ricavata dalla prova precedente, miscelando il



contenuto dei tre reattori. Le sue caratteristiche sono riportate in tabella 3.4.3. Tale sospensione, di volume pari a 220 ml, è stata diluita con 390 ml di refluo WW1, lo stesso utilizzato nella sperimentazione precedente. Del volume totale, pari a 610 ml, una piccola parte (10 ml) è stata utilizzata per eseguire le analisi del tempo 0, il resto è stato suddiviso in quattro diversi reattori. In questo modo, ciascuna colonna presentava un volume pari a 150 ml.

*Tabella 3.4.3: Caratteristiche chimico-fisiche della sospensione algale derivante dalla prova 1 e utilizzata come inoculo per questa seconda sperimentazione.*

<b>SOSPENSIONE ALGALE INIZIALE</b>	
<i>ABS 680 (TQ)</i>	2,08
<i>ABS 420</i>	2,88
<i>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N (mg/L)</i>	14,4
<i>NO<sub>3</sub>-N (mg/L)</i>	3,56
<i>NO<sub>2</sub>-N (mg/L)</i>	4,74
<i>PO<sub>4</sub>-P (mg/L)</i>	5,14
<i>N/P</i>	33,9
<i>COD (TQ) (mg/L)</i>	455
<i>Torbidità</i>	1902
<i>TSS (mg/L)</i>	1390
<i>VSS (mg/L)</i>	1190

Dei 4 reattori, tre possedevano le medesime caratteristiche chimico-fisiche di partenza, mentre in una di queste il rapporto N/P è stato aggiustato a 10, tramite aggiunta di fosforo, i cui calcoli stechiometrici sono riportati in appendice A, paragrafo A.4. Una colonna è stata alimentata con refluo avente un rapporto N/P corretto. Nel refluo alimentato a questo reattore il contenuto di fosforo è stato artificialmente incrementato dosando KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> per portarne il rapporto N/P a 10.

In due reattori è stata insufflata anidride carbonica, ad una portata di circa 750 Nml/min (pari a 5 vvm), due volte a settimana. Infine in un reattore l'HRT è stato impostato pari a 12 giorni.

---

Complessivamente le condizioni nei reattori sono riassunte nella tabella 3.4.4.

*Tabella 3.4.4: Riassunto condizioni operative per i 4 reattori di crescita.*

Condizione	Denominazione del reattore			
	CO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> +P	Controllo	HRT12
N/P corretto	No	Si	No	No
Dosaggio CO <sub>2</sub>	Si	Si	No	No
HRT (giorni)	10	10	10	12

Come nella sperimentazione precedente, la prova si è svolta in semi-continuo con alimentazione bisettimanale e le analisi chimico-fisiche sono state svolte sul volume di sospensione alla fine del ciclo bisettimanale. Il piano di monitoraggio è rimasto il medesimo della prova 1.

### 3.5 Metodi analitici

Per i seguenti analiti è stato utilizzato un metodo colorimetrico in kit (Hach Lange), applicato su campioni filtrati a 1,2 µm.

- N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (LCK303)
- P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (LCK348)
- N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (LCK342)
- N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (LCK339)
- COD (LCK514)

Per determinare le concentrazioni di fosforo e COD è risultata necessaria una fase di pre-digestione operata tramite il forno Hach Lange LT200. Nel caso del fosforo, l'operazione di digestione è stata effettuata a 100 C° per un'ora, mentre per la valutazione del COD la fase di digestione è stata condotta a 148 C° per due ore. La lettura finale dei kit per le analisi chimiche è avvenuta con lo spettrofotometro VIS Hack VR3900.

---

Conducibilità, pH e temperatura sono state misurate tramite la sonda Tecnovetro XS PC510 pH-metro, sul campione tal quale.

Inoltre, per il monitoraggio della concentrazione delle specie azotate sono state utilizzate strisce colorimetriche (Hach Lange) utili alla stima del range di concentrazione dell'analita, così da applicare la giusta diluizione per la relativa misura con il kit.

### **3.5.1 Misurazioni crescita algale**

Le misurazioni sulla crescita algale sono state effettuate attraverso la valutazione di quattro diversi parametri:

- Densità ottica a 420 e 680 nm
- Torbidità
- Solidi Sospesi Totali (TSS) e Solidi Sospesi Volatili (VSS)
- Conte al microscopio

#### Assorbanza

Questa misura è stata effettuata attraverso l'uso dello spettrofotometro VIS Hach VR3900, che ne quantifica il valore all'interno di un range di lunghezze d'onda compreso tra 340 e i 900 nm. Laddove questa misura fornisse valori maggiori di 1 in corrispondenza della lunghezza d'onda di interesse, risulta necessario diluire il campione. Per gli studi condotti in questa sperimentazione, la lunghezza d'onda di maggiore interesse è risultata essere quella a 680 nm, poiché corrisponde al valore per cui l'assorbanza della clorofilla è massima (Griffiths et al., 2011).

#### Torbidità

La procedura è del tutto simile a quella necessaria per la misura dell'assorbanza ed impiega lo spettrofotometro introdotto precedentemente.

---

Se necessario, è stata operata una diluizione del campione per rientrare all'interno del range di misurazione dello strumento.

### SST e SSV

I solidi sospesi totali e volatili sono stati un ulteriore parametro importante per quantificare la crescita microalgale. Tale misura è stata ricavata mediante filtrazione a 1,2  $\mu\text{m}$ . I filtri sono stati inseriti all'interno di un forno a 105 C° per due ore, a seguito delle quali sono stati fatti raffreddare in un essiccatore e successivamente pesati su una bilancia con la precisione di  $10^{-4}$  grammi. Tramite questa misurazione, applicando la formula 3.4.1, è stato possibile determinare il valore di TSS.

$$TSS \left[ \frac{mg}{L} \right] = \frac{m_{FILTRO} - m_{105^\circ}}{V_{FILTRATO}} \quad (3.4.1)$$

La determinazione del valore di VSS è avvenuta a valle di un'ulteriore passaggio, che è consistito nel mantenere i filtri all'interno di una muffola alla temperatura di 550 C° per un'ora e successivo raffreddamento e pesatura. Con la formula 3.4.2, è stato ricavato il valore di VSS della coltura.

$$VSS \left[ \frac{mg}{L} \right] = \frac{m_{105^\circ} - m_{550^\circ}}{V_{FILTRATO}} \quad (3.4.2)$$

Nelle formule 3.4.1 e 3.4.2  $m_i$  rappresenta la massa del filtro in corrispondenza di una delle fasi del processo di misura dei solidi, mentre  $V_{FILTRATO}$  rappresenta il volume della sospensione filtrata.

La conta delle microalghe infine è un metodo altrettanto essenziale per analizzare la crescita delle stesse, controllarne lo stato di salute ed effettuarne un riconoscimento basato su parametri morfologici. La procedura di conta è

---

consistita nella preparazione del campione, diluito in maniera appropriata, per evitare sovrapposizione delle cellule nella camera di Burker. Per la conta è stato utilizzato un microscopio Optika B-350 con un ingrandimento di 40x e una camera di Burker.

### 3.5.2 Calcolo dei parametri aggregati

#### RESE DI RIMOZIONE

Per ricavare la resa di rimozione, i ratei di rimozione e la massa cumulata rimossa di un componente di interesse (ammonio, nitrito, nitrato, fosforo e COD) è stata confrontata la massa della componente a valle dell'alimentazione con quella residua nel reattore appena prima dell'alimentazione successiva, cioè a cavallo di ciascun ciclo di alimentazione in semi-continuo.

La massa della i-esima componente al tempo j di inizio è stata ottenuta dalla somma della massa della sostanza i-esima presente nel reattore dopo il prelievo della sospensione trattata dal ciclo precedente e della massa della medesima componente immessa nel sistema attraverso alimentazione:

$$m_{i,j}[mg] = C_{i,j} \left[ \frac{mg}{L} \right] * (V_{reattore} - V_{prelievo})[L] + C_{i,alimento} \left[ \frac{mg}{L} \right] * V_{alimento}[L]$$

(3.5.1)

Dove  $C_{i,j}$  rappresenta la concentrazione che permane nel reattore al termine del ciclo precedente,  $C_{i,alimento}$  rappresenta la concentrazione della medesima sostanza i nel refluo alimentato,  $V_{prelievo}$  il volume del prelievo corrispondente al volume di refluo alimentato,  $V_{reattore}$  il volume del reattore e  $V_{alimento}$  il volume di refluo alimentato.

La massa della i-esima componente al tempo j, al termine del ciclo di trattamento è stata calcolata come:

---


$$m_{i,j+1}[mg] = C_{i,j} \left[ \frac{mg}{L} \right] * V_{reattore}[L] \quad (3.5.2)$$

È stato così possibile ricavare la massa rimossa dell'i-esima componente per il j-esimo ciclo compreso tra  $t_j$  e  $t_{j+1}$ .

$$\begin{aligned} Rimozione_{i,j}[mg] = \\ m_{i,j+1}[mg] - m_{i,j}[mg] \end{aligned} \quad (3.5.3)$$

Tale valore di rimozione viene riferito alla durata del ciclo per ricavare il rateo di rimozione conseguito dal sistema:

$$rateo_{i,j} \left[ \frac{mg}{d} \right] = \frac{Rimozione_{i,j}[mg]}{t_{j+1} - t_j [d]} \quad (3.5.4)$$

La curva di massa rimossa fino al tempo  $t_j$  per la i-esima componente è stata ricavata mediante la seguente formula:

$$m_{i,cumulata,j} [mg] = \sum_{x=0,j} Rimozione_{i,x} [mg] \quad (3.5.5)$$

Tramite questo procedimento è stato anche possibile ricavare la produzione di TSS e VSS. È importante notare come non si tratti di una rimozione, bensì una produzione in quanto i solidi (cioè le microalghie) non sono rimossi, ma prodotti dal sistema.

$$\begin{aligned} SS (VS)_{prodotti\ dal\ sistema} \\ = m_{SS,j}[mg] - m_{TSS(VSS),j+1}[mg] \end{aligned} \quad (3.5.6)$$

A partire dalla 3.4.6 e applicando la 3.4.4 e 3.4.5 è stato possibile, in maniera del tutto analoga, ricavare sia il rateo che la produzione cumulata di solidi.

Infine sono state ricavate le rese di rimozioni del sistema, lungo tutto il periodo di sperimentazione delle prove, in termini percentuali. Tale rese sono state calcolate sui nutrienti di interesse presenti nel refluo, ricavate analizzandone gli ingressi e le uscite dal sistema. La resa percentuale è stata ricavata tramite la formula 3.4.7:

---


$$\eta_i[\%] = \frac{m_{i,cumulata,j} [mg]}{m_{i,cumulata\ alimento,j} [mg]} * 100 \quad (3.5.7)$$

Dove per  $m_{i,cumulata\ alimento,j}$  si intende la massa cumulata della componente i-esima immessa nel sistema ricavabile anch'essa mediante le formule 3.4.2 e 3.4.5, applicate all'alimentazione.

### 3.5.3 Bilanci di massa dell'azoto

In primo luogo è stato quantificato l'apporto dell'azoto totale fornito al sistema; è stato poi quantificato l'azoto assimilato dalle alghe e quello ossidato dai batteri nitrificanti.

Per quanto concerne l'assimilazione algale, è stato ipotizzato che essa sia pari al 10% del peso in massa delle microalghe quantificato con i TSS, in quanto 10% è un valore medio della percentuale di azoto presente nella biomassa microalgale.

$$m_{N,assimilato} [mg] = 0,1 * TSS_{prodotti\ dal\ sistema} [mg] \quad (3.5.8)$$

Per quanto riguarda i processi di ossidazione, sono state analizzate le produzioni di nitrito ( $NO_2$ ) e nitrato ( $NO_3$ ) attraverso la formula 3.4.3 riportata al paragrafo precedente. Confrontando la massa di azoto ammoniacale rimosso con quello assimilato ed ossidato è stato possibile ricavare la parte dell'azoto strippato in atmosfera:

$$m_{N,strippato} [mg] = m_{NH_4,rimosso} [mg] - m_{NO_2,prodotto} [mg] - m_{NO_3,prodotto} [mg] - m_{N,assorbito\ da\ microalghe} [mg] \quad (3.5.9)$$

I valori in massa ricavati mediante le formule riportate in questo paragrafo e nel paragrafo 3.5.2 sono stati divisi per i relativi volumi, per ottenere ratei volumetrici.

---

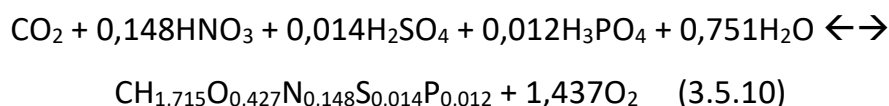
### 3.5.4 Elaborazioni statistiche

Le elaborazioni statistiche proposte sono state effettuate con il programma Rstudio®. Sono stati svolti t-test per verificare l'uguaglianza statistica del comportamento medio dei duplicati e test di inferenza per riscontrare l'eventuale dipendenza dell'andamento di un parametro da altri. La significatività del t-test è indicata dal valore di p-value, più questo è alto più l'andamento dei parametri testati sarà simile. Il livello di significatività è fissato al 5%.

Le analisi di inferenza statistica consistono in regressioni multi parametriche in cui si verifica l'influenza di un parametro rispetto ad un altro attraverso l'analisi del p-value. Diversamente dal t test, in questo caso alti valori di p-value sono sintomo di una mancata dipendenza. Valori estremamente bassi, invece, indicano un forte legame tra i parametri. Anche in questo caso il livello di significatività è stato posto a 0,05.

### 3.5.5 Calcoli stechiometrici

Sono stati infine impostati dei calcoli stechiometrici la cui finalità è stata quella di verificare se l'ossigeno prodotto dalle microalghe fosse in grado di sostenere i processi di nitrificazione e di ossidazione del COD. Inoltre è stato verificato se la CO<sub>2</sub> prodotta fosse sufficiente a supportare la crescita microalgale. La stechiometria di riferimento è quella di Pruvost et al. (2009) ed è la seguente:



A partire dai dati relativi alla biomassa prodotta, in termini di VSS e ricavati mediante 3.5.6, è stato possibile ricavare i quantitativi di ossigeno prodotti,



rifacendosi ai rapporti stechiometrici forniti dalla formula 3.5.10. Attraverso questa formula è stato inoltre possibile ricavare la quantità di CO<sub>2</sub> stechiometricamente necessaria al processo di crescita.

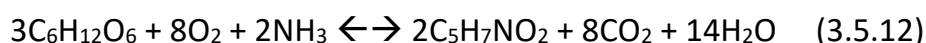
Per ricavare la quantità di ossigeno necessaria ai processi di nitrificazione sono state utilizzate le formule presenti in appendice C.1, a partire dai dati di produzione di NO<sub>x</sub> ricavabili mediante la formula 3.5.3.

Per determinare la quantità di ossigeno necessaria all'ossidazione del COD, è stata utilizzata la seguente formula:

$$\Delta O_{2, \text{consumato}} = \text{COD}_{\text{substrato consumato}} * (1 - Y) \quad (3.5.11)$$

Dove Y rappresenta il rendimento di crescita della biomassa eterotrofa ed è pari a 0,67 (Bonomo, 2008), mentre per il substrato consumato è stato calcolato il COD rimosso dal sistema mediante la formula 3.5.3.

Infine, per stimare la quantità di CO<sub>2</sub> prodotta nel processo di ossidazione del COD, operato dai batteri eterotrofi, è stata utilizzata la seguente stechiometria (Metcalf & Eddy, 2006):



A partire dai dati relativi al COD consumato è stato così possibile ricavare la CO<sub>2</sub> prodotta, mediante i rapporti stechiometrici propri della formula 3.5.12.

A titolo riepilogativo vengono riportati in tabella 3.5.1 i rapporti stechiometrici ricavati dalle equazioni di riferimento riportate in questo paragrafo.

Tabella 3.5.1: Coefficienti stechiometrici di produttività del sistema.

Processo chimico	Rapporti stechiometrici
<i>Fotosintesi microalghe</i>	1,96 [gO <sub>2</sub> /gVSS <sub>prodotto</sub> ]
<i>Ossidazione a NO<sub>2</sub></i>	3,42 [gO <sub>2</sub> /gN-NO <sub>2,prodotto</sub> ]
<i>Ossidazione a NO<sub>3</sub></i>	1,14 [gO <sub>2</sub> /gN-NO <sub>3,prodotto</sub> ]
<i>Consumo COD</i>	0,47 [gO <sub>2</sub> /gCOD <sub>rimosso</sub> ]

---

---

## **CAPITOLO 4**

### **RISULTATI**

Le configurazioni e le metodologie sperimentali illustrate nel capitolo precedente sono servite per studiare la crescita della popolazione microalgale su substrati di origine zootecnica.

All'interno di questo capitolo sono stati riportati i risultati relativi alle sperimentazioni effettuate utilizzando il digestato (paragrafo 4.1) con il contenuto di P corretto e non corretto ed il refluo zootecnico (paragrafo 4.2). Sul refluo zootecnico, attraverso la prima prova, è stata osservata una crescita della popolazione microalgale senza insufflazione di gas e senza aggiunta di fosforo (paragrafo 4.2.1). Nella seconda prova (paragrafo 4.2.2) è stato valutato l'effetto sulla resa del sistema della modifica di alcune condizioni operative.

---

## 4.1 Risultati prove di crescita su digestato

### 4.1.1 Prove preliminari

Nei paragrafi 4.1.1.1-2 vengono riportati i risultati delle prove preliminari descritte al paragrafo 3.4.1.1-2.

#### 4.1.1.1 Prova in batch con insufflazione d'aria

L'obiettivo di questa prima prova era di verificare l'efficacia del set-up sperimentale, in particolare per quanto riguarda l'adeguatezza delle condizioni ambientali per la crescita delle microalghe e la ripetibilità delle condizioni di crescita nelle 4 colonne operanti in parallelo.

Le condizioni iniziali di prova, ottenute miscelando la sospensione di inoculo con digestato (si veda paragrafo 3.4.1.1) erano le medesime per tutte le colonne e sono riportate in tabella 4.1.1; esse sono state scelte in modo che nei reattori fossero presenti le condizioni ambientali adeguate per il processo di crescita microalgale.

Tabella 4.1.1: Concentrazioni nutrienti al tempo 0, inizio della prova, all'interno dei reattori.

TEMPO 0	
ABS 680 (TQ)	0,08
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg/L)	184
NO <sub>3</sub> -N (mg/L)	4,84
NO <sub>2</sub> -N (mg/L)	10,6
PO <sub>4</sub> -P (mg/L)	20
N/P	9,98
COD (Filtrato) (mg/L)	766
TSS (mg/L)	271

La prova si è dimostrata valida in quanto fin dai primi giorni della sperimentazione è stata apprezzata una notevole crescita della biomassa

algale, valutata in termini di assorbanza, in aumento durante lo svolgimento della prova, come si può facilmente riscontrare nel grafico di figura 4.1.1.

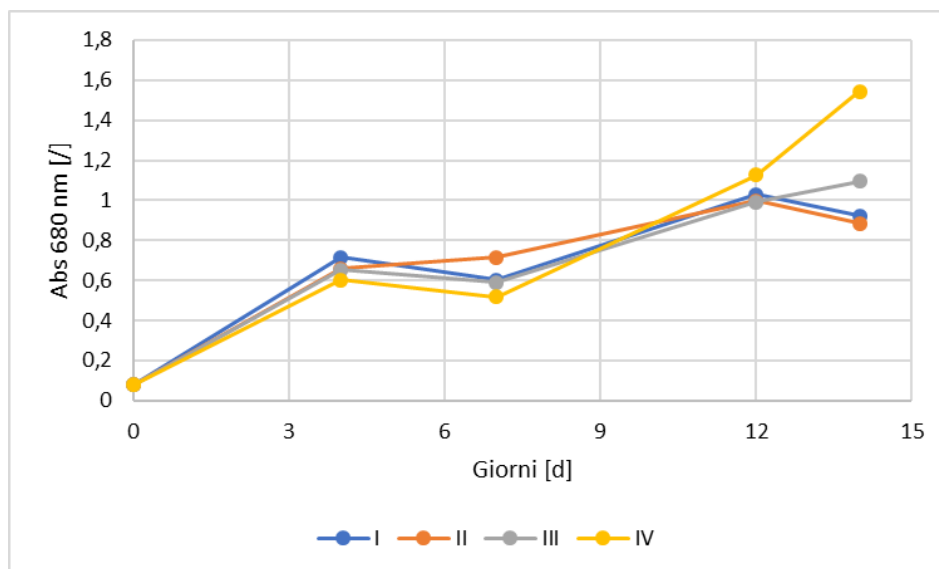


Figura 4.1.1: Andamento assorbanza nei 4 reattori.

Lo sviluppo microalgale è stato possibile grazie al consumo dei nutrienti presenti nei reattori. L'andamento temporale delle concentrazioni delle sostanze azotate e del fosforo è riportato nei seguenti grafici.

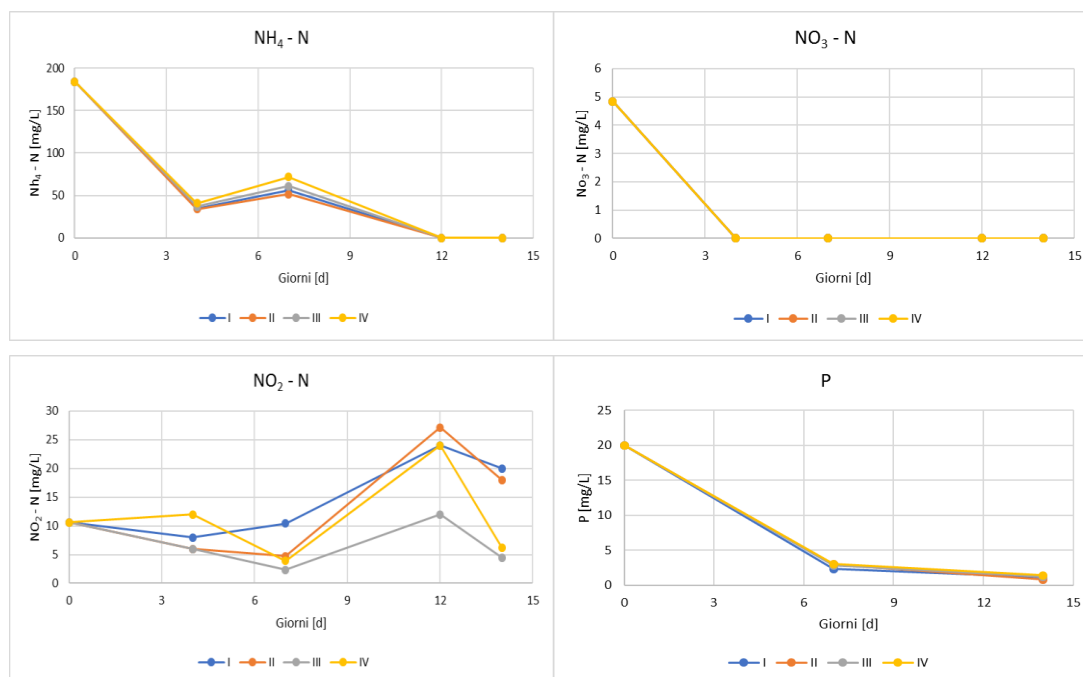


Figura 4.1.2: Concentrazione nutrienti nei reattori durante la prova.

---

Come si può notare dai grafici di figura 4.1.2, la rimozione dei nutrienti è apprezzabile e simile in tutti 4 i reattori. Si nota, infatti, una rimozione del 100% dell' $\text{NH}_4$  e dell' $\text{NO}_3$  presenti all'inizio della prova e una rimozione superiore al 95% del fosforo presente al tempo 0. Diverso è, invece, il comportamento dell' $\text{NO}_2$ . Il suo andamento è variabile, con una concentrazione finale superiore a quella iniziale. Tale andamento è giustificato dalla presenza di nitrificazione di cui il nitrito è il prodotto intermedio, oltre che dal fatto che le stesse microalghe possono assimilare lo stesso nitrito come fonte di azoto. L'aumento di concentrazione di  $\text{NO}_2$  è certamente dovuto ai batteri AOB ammonio-ossidanti, i quali ossidano l'azoto ammoniacale a nitrito. Dall'assenza, comune per tutte le colonne, di  $\text{NO}_3$  nei giorni successivi al tempo 0, invece, si può supporre che la cinetica dei batteri NOB nitrito-ossidanti sia stata inibita o che, in alternativa, il nitrato prodotto è subito assimilato dalle microalghe come nutriente.

L'efficace rimozione dell'ammonio non è attribuibile alle sole microalghe. Favorito dall'insufflazione d'aria e dagli alti valori di pH (sempre superiore al 9), una quota parte di rimozione dell'ammonio può essere dovuta a processi di strippaggio. Questa ipotesi è supportata dai calcoli effettuati sul partizionamento dell'azoto. Analizzando il tenore finale di solidi presenti all'interno dei reattori è stato possibile quantificarne la produzione ottenuta durante la prova e, di conseguenza, la quantità di azoto assimilata nella biomassa algale.

*Tabella 4.1.2: Solidi sospesi totali presenti nei reattori di crescita a fine prova.*

Colonna	I	II	III	IV
TSS finali (mg/L)	492	509	496	602
Produzione (mg/L/d)	15,8	17	16,1	23,6

---

Il metodo descritto al paragrafo 3.5.3 ha consentito di ricavare l'incidenza dei fenomeni di strippaggio, i quali sono stati stimati pari al 77%, 78%, 85% e 81% della rimozione dell'azoto ammoniacale rispettivamente nelle colonne I, II, III e IV.

Per limitare l'incidenza dello strippaggio si è deciso di cambiare la modalità di sperimentazione, abbandonando l'agitazione mediante insufflazione d'aria e sostituendola con l'insufflazione di anidride carbonica.

#### 4.1.1.2 Prova in batch con insufflazione di CO<sub>2</sub>

In questo paragrafo sono riportati i principali risultati relativi alla prova descritta nel capitolo 3.4.1.2. Questa prova è nata con l'intento di risolvere le criticità riscontrate nella sperimentazione precedente. Il più importante cambiamento è stato la sostituzione dell'insufflazione d'aria con l'insufflazione della CO<sub>2</sub>.

La condizioni iniziale delle colonne è stata la medesima, ed è riassunta in tabella 4.1.3.

*Tabella 4.1.3: Concentrazioni dei nutrienti al tempo 0, inizio della prova, all'interno dei reattori.*

<b>TEMPO 0</b>	
<i>ABS 680 (TQ)</i>	0,055
<i>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N (mg/L)</i>	198
<i>NO<sub>3</sub>-N (mg/L)</i>	0,7
<i>NO<sub>2</sub>-N (mg/L)</i>	2,3
<i>PO<sub>4</sub>-P (mg/L)</i>	20,1
<i>N/P</i>	10,00
<i>COD (filtrato) (mg/L)</i>	792

Anche in questa prova si è osservata crescita microalgale, come testimoniato da un andamento crescente dell'assorbanza (Figura 4.1.3). A differenza della prova precedente, tuttavia, la biomassa algale si è sviluppata

parallelamente ad un consumo di ammonio non così marcato come nella prova con insufflazione d'aria, come osservabile dai grafici riportati nella figura 4.1.3, che illustra gli andamenti temporali di questi due parametri durante la sperimentazione.

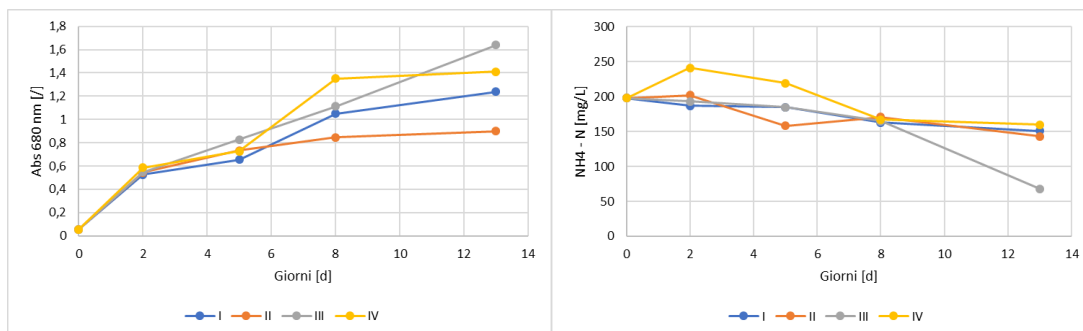


Figura 4.1.3: Andamento temporale dell'assorbanza (a sinistra) e della concentrazione dell'ammonio (a destra) nei 4 reattori di crescita.

Come si può notare nella figura 4.1.3, in questa sperimentazione sono stati osservati valori di assorbanza elevati e analoghi a quelli riscontrati nella sperimentazione precedente, senza alti consumi di ammonio. Tale comportamento avvalorava l'assunzione fatta al capitolo 4.1.1.1 che attribuiva al fenomeno di strippaggio una quota parte della rimozione di ammonio. Il consumo d'ammonio in questo caso oscilla, infatti, tra il 25% e il 65%, mentre nella prova precedente il consumo era in tutti i reattori del 100%.

Secondo i calcoli di bilancio di massa, la percentuale di azoto strippato varia tra il 10% e il 50%. L'abbassamento della percentuale di azoto strippato è un indicatore dell'efficienza del nuovo set-up sperimentale, anche se la variabilità del valore ottenuto è indicatore dell'instabilità del sistema. Infatti la prova ha presentato altri tipi di criticità: con la strumentazione utilizzata, non è stato possibile ottenere un flusso di CO<sub>2</sub> omogeneo e continuo per tutte e 4 le colonne. Tale squilibrio è stato verificato dalle misurazioni effettuate sul pH di ciascun reattore (figura 4.1.4), in cui è possibile notare un andamento oscillatorio di questo parametro.



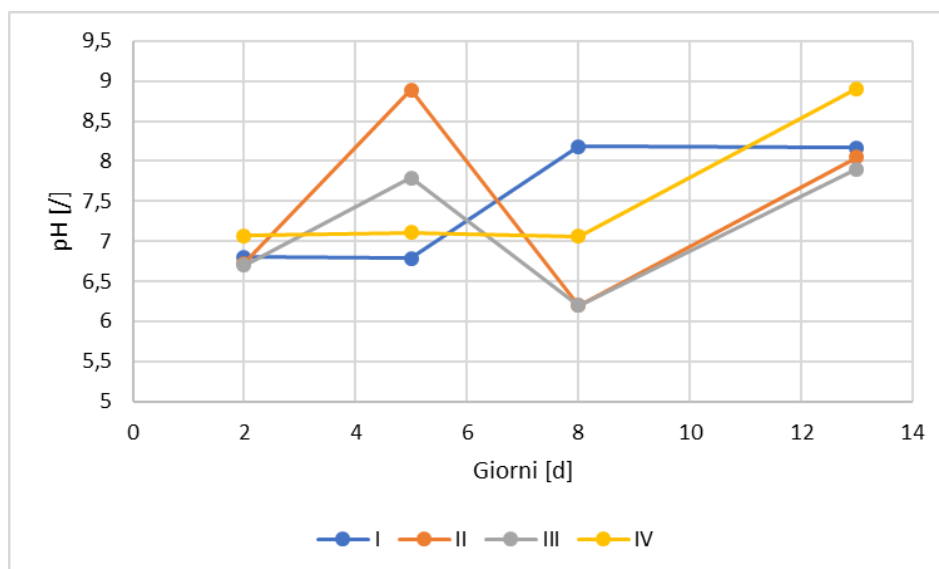


Figura 4.1.4: Andamento temporale del valore del pH nelle colonne.

Le criticità citate hanno portato alla necessità di trovare un ulteriore riassetto della configurazione sperimentale. La modalità di insufflazione della CO<sub>2</sub> della prova successiva è stata quindi modificata, rendendola discontinua (si veda paragrafo 3.4.1.3). La sospensione algale ottenuta mescolando il contenuto dei 4 reattori è stata utilizzata come inoculo della prova successiva, stante la buona salute delle alghe osservate al microscopio.

#### 4.1.2 Prova in semi-continuo con insufflazione di CO<sub>2</sub>

In questo paragrafo verranno riportati i risultati relativi alla prova descritta nel capitolo 3.4.1.3, ovvero la prova in semi-continuo con insufflazione giornaliera di anidride carbonica.

La conduzione di un sistema di coltivazione microalgale con alimentazione in semi-continuo è l'obiettivo reale di questo lavoro di tesi perché consente di valutare il comportamento e la stabilità di lungo periodo del sistema. Le prove preliminari in batch, precedentemente riportate, sono state utili per poter studiare la configurazione ottimale del sistema utilizzato in questa terza ed ultima sperimentazione.

In questa prova, in particolare, si vogliono indagare: la crescita microalgale sul digestato e gli effetti di una correzione del parametro N/P sul comportamento del sistema. Per questo motivo i 4 reattori non sono identici, bensì presentano un rapporto N/P, nel digestato alimentato, differente a due a due: i reattori di crescita NC1 e NC2 sono caratterizzati dal rapporto azoto/fosforo proprio del digestato (non corretto quindi, da qui la sigla), mentre i reattori C1 e C2 da un digestato il cui rapporto N/P è aggiustato a 10 gN/gP. Al fine di comprendere al meglio le dinamiche di sviluppo della prova vengono riportati nelle seguenti tabelle le caratterizzazioni delle condizioni iniziali di entrambe le coppie dei reattori.

*Tabella 4.1.4: Caratteristiche al tempo 0 dei principali parametri chimico-fisici nelle due coppie dei reattori di crescita.*

<b>TEMPO 0</b>			
<b>Colonne NC1 e NC2</b>		<b>Colonne C1 e C2</b>	
ABS 680 (TQ)	0,53	ABS 680 (TQ)	0,53
$NH_4^+-N$ (mg/L)	177	$NH_4^+-N$ (mg/L)	177
$NO_3^-N$ (mg/L)	6,93	$NO_3^-N$ (mg/L)	6,93
$NO_2^-N$ (mg/L)	16,1	$NO_2^-N$ (mg/L)	16,1
$PO_4-P$ (mg/L)	6,79	$PO_4-P$ (mg/L)	20
N/P	29,5	N/P	10
COD (filtrato) (mg/L)	645	COD (filtrato) (mg/L)	645

#### **4.1.2.1 Condizioni operative: pH e temperatura**

Gli andamenti di pH e temperatura nel corso della prova sono riportati nelle figure 4.1.5 e 4.1.6. Essendo stata la misura della temperatura sempre pressoché identica per tutti i reattori, per questo parametro è riportato un solo profilo con la media delle temperature rilevate.

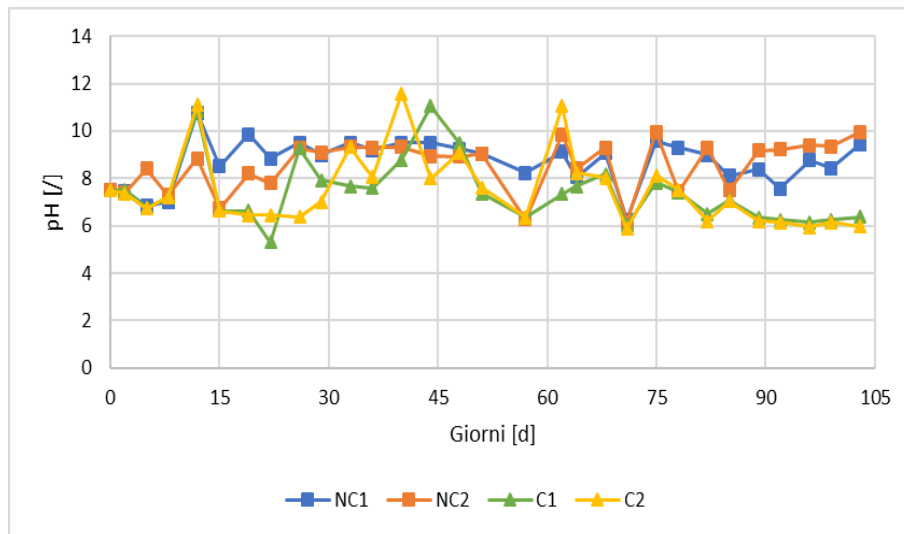


Figura 4.1.5: Andamento temporale del pH nei reattori di crescita.

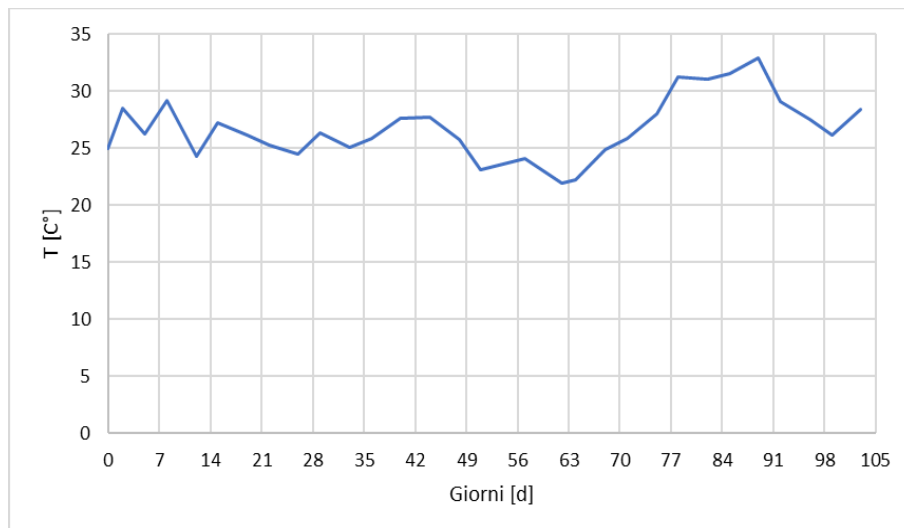


Figura 4.1.6: Andamento temporale della temperatura nei reattori di crescita.

L'andamento della temperatura si è dimostrato strettamente collegato alle condizioni ambientali del laboratorio: un primo periodo con temperature pressoché costanti, seguito da due settimane di calo di temperatura causate dalle abbondanti precipitazioni cadute su Milano in quel periodo, dopo le quali la temperatura è salita con l'arrivo del bel tempo. Il calo finale è dovuto all'accensione dell'aria condizionata. L'andamento temporale del pH, viceversa, non è collegato alle condizioni ambientali del laboratorio, bensì ai processi biochimici che avvenivano nei reattori.

---

### 4.1.2.2 Crescita microalgale: assorbanza e torbidità

Il principale parametro con cui è stata misurata la crescita delle microalghe è stata l'assorbanza. Tale valore è stato misurato lungo lo spettro che va da 340 a 900 nm, ponendo particolare attenzione alla lunghezza d'onda di 680 nm alla quale è associato il massimo assorbimento di luce da parte della clorofilla.

Nella figura 4.1.7 è stato riportato lo spettro dell'assorbanza misurata nelle sospensioni. Come si può notare vi è un picco di assorbanza ad una lunghezza d'onda approssimativamente pari a 680 nm, sintomo di una forte presenza di microalghe. Gli spettri sono riferiti al 16 marzo, ossia dopo circa 15 giorni di sperimentazione.

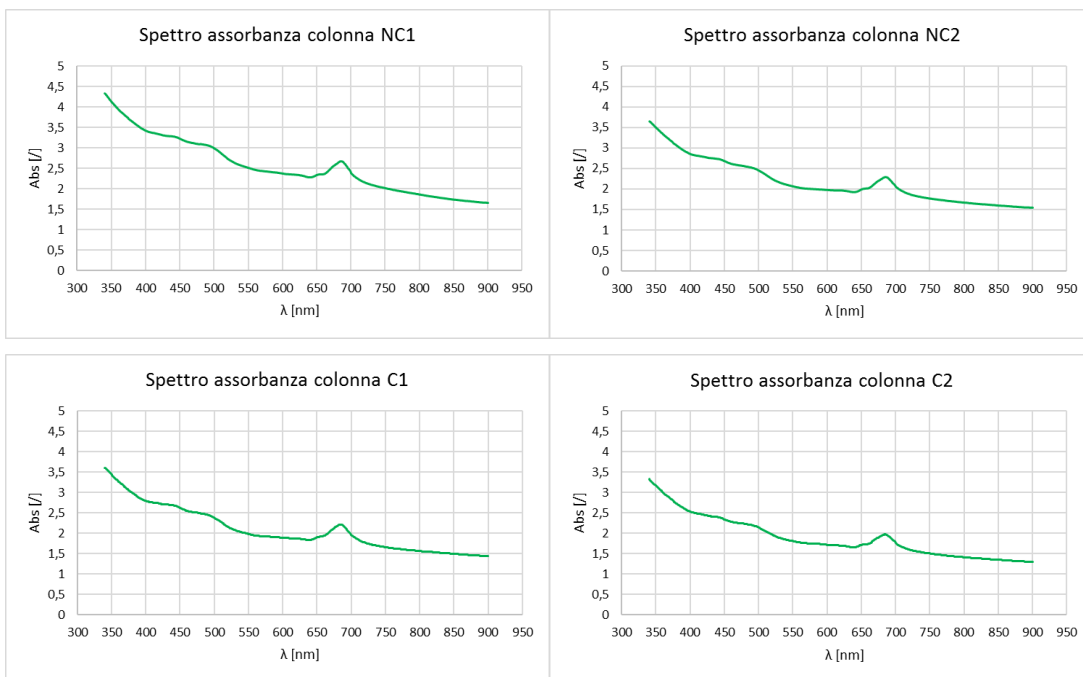


Figura 4.1.7: Spettro assorbanza tra 340 e 900 nm.

Fin dai primi giorni della prova è stato riscontrato un aumento rilevante del valore di assorbanza che testimonia un'effettiva crescita della popolazione microalgale, per tutti e 4 i reattori, indicativo dell'efficacia del sistema di coltivazione. L'andamento di questo parametro nel tempo è riportato nel grafico di figura 4.1.8.

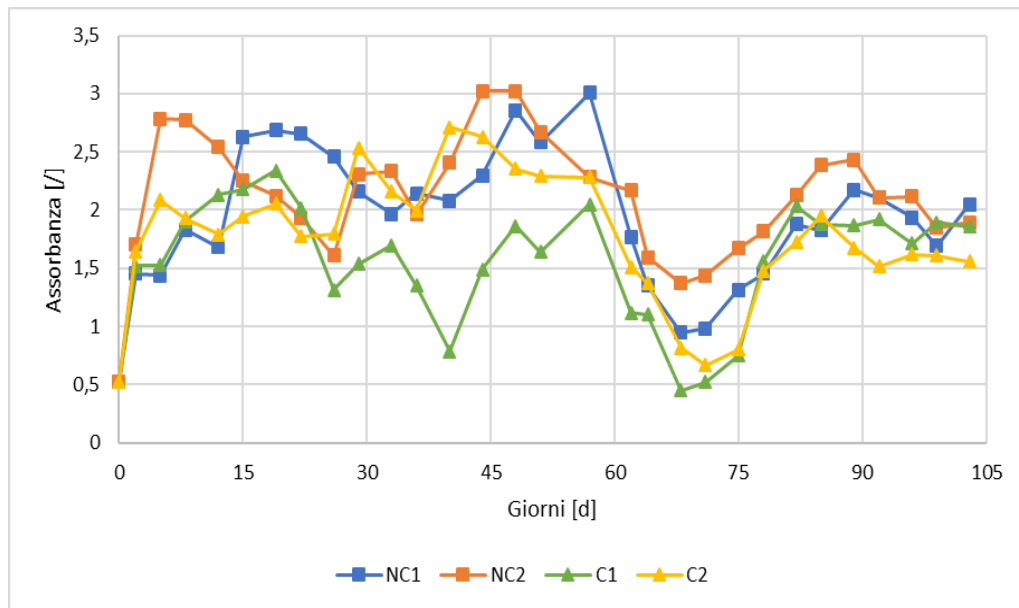
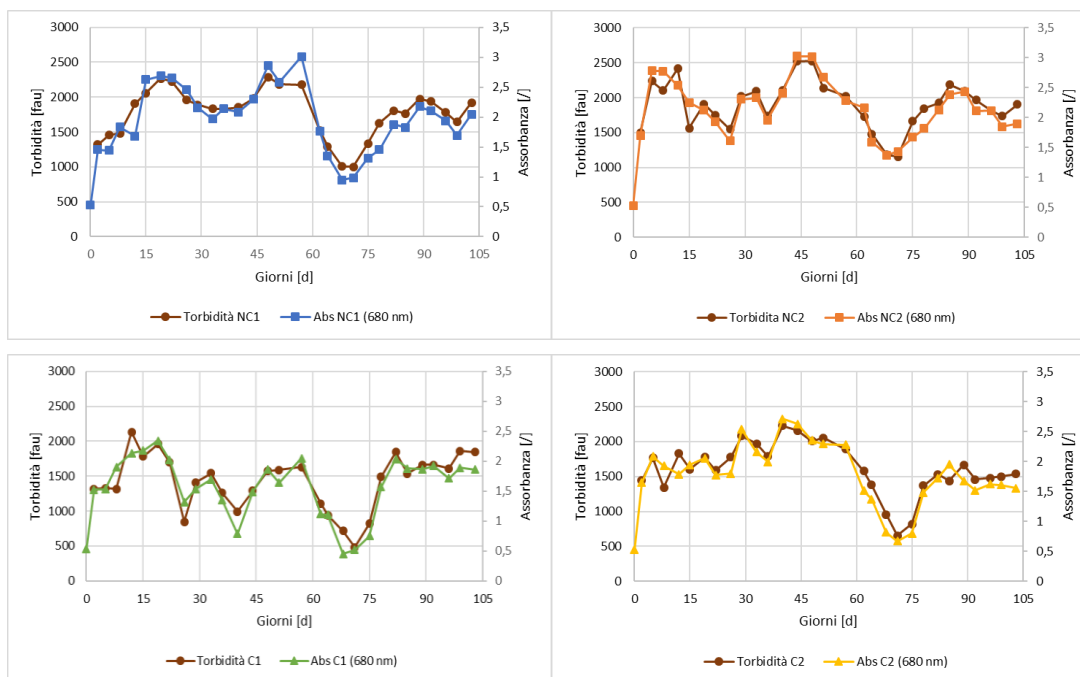


Figura 4.1.8: Andamento assorbanza nel tempo nei 4 reattori di crescita.

Come si può notare nella figura 4.1.8, fin dai primi giorni la crescita delle microalghe è stata apprezzabile, raggiungendo valori di densità ottica circa pari o superiori a 2 in tutti i reattori di crescita dopo meno di dieci giorni di sperimentazione. Successivamente è stata raggiunta una fase pressoché stazionaria (fino al sessantesimo giorno, eccezion fatta per la colonna C1 che è stata soggetta a problematiche di tipo tecnico, di cui si parlerà successivamente). L'accoppiamento tra le repliche (NC1 e NC2; C1 e C2) nei primi giorni non è risultato ottimale, ma è migliorato col proseguire della sperimentazione. L'accoppiamento dei risultati ottenuti per le repliche sarà studiato statisticamente nel capitolo 4.1.2.10.

I valori di assorbanza rilevati sono risultati ben correlati con quelli della torbidità. Sebbene la misura della torbidità risenta della presenza di particelle di grosse dimensioni (come, ad esempio, aggregati di alghe) essa è ritenuta un parametro affidabile per la stima della concentrazione delle microalghe. Confrontando i valori misurati dell'assorbanza e della torbidità si può notare una forte correlazione tra l'andamento dei due parametri, che dunque

avvalora l'affidabilità della misura dell'assorbanza e permette di considerarne i valori misurati come indicatori effettivi della crescita della biomassa microalgale. In figura 4.1.9 si può notare l'andamento temporale di questi due parametri di crescita per le colonne. Come è evidente dal confronto grafico l'andamento temporale è estremamente simile.



*Figura 4.1.9: Confronto tra l'andamento temporale dell'assorbanza e della torbidità nelle colonne della sperimentazione.*

La regressione lineare tra i due parametri ha mostrato un valore di  $R^2$  superiore a 0,9 (Il grafico con la correlazione tra assorbanza e torbidità con il relativo valore di  $R^2$  è riportato in figura 4.1.10.), indicativo di un forte legame tra l'andamento dei due parametri. Le considerazioni fatte in questo capitolo saranno tuttavia prevalentemente basate sul valore dell'assorbanza in quanto questo è generalmente ritenuto il parametro più accurato per stimare la concentrazione delle microalghe (Su et al., 2016).

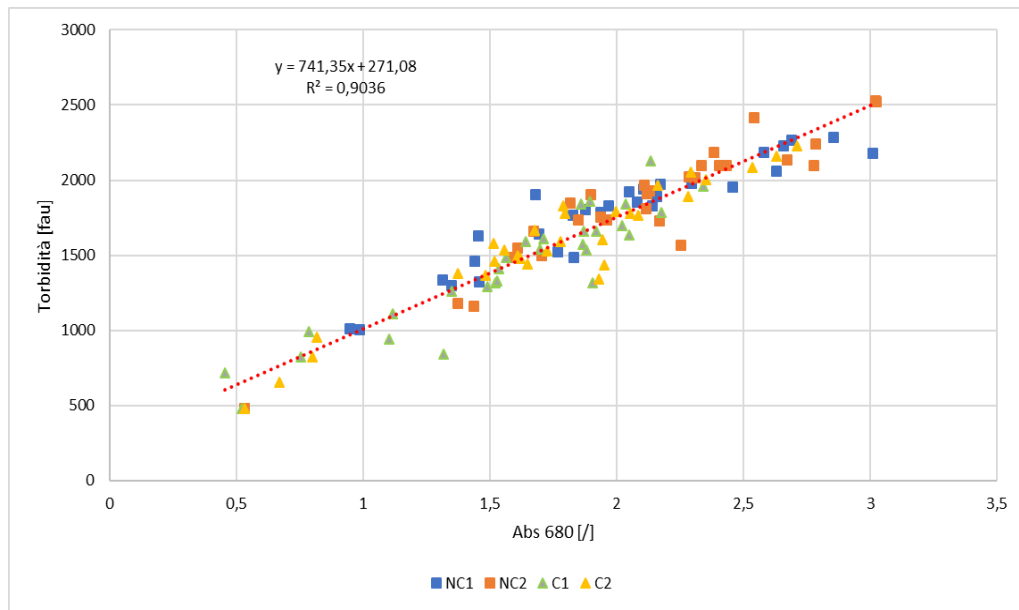


Figura 4.1.10: Correlazione tra assorbanza (680 nm) e torbidità per tutti i reattori.

L'andamento dell'assorbanza, riportato in figura 4.1.8, ha permesso di trarre alcune considerazioni. Una prima osservazione riguarda il fatto che le colonne C1 e C2 non presentavano valori di assorbanza superiori a quelli delle colonne NC1 e NC2. Le colonne C1 e C2 erano alimentate con un refluo avente un rapporto N/P ideale e quindi dovevano essere quelle in cui la crescita è maggiormente favorita. Tuttavia non è stata riscontrata una maggior crescita della biomassa microalgale. Sembra quindi che il valore N/P iniziale del digestato fosse sufficiente e il fosforo non limitante. È ora importante analizzare il grafico dell'andamento del rapporto azoto-fosforo nei reattori lungo la prova. Tale grafico è riportato nella figura 4.1.11.

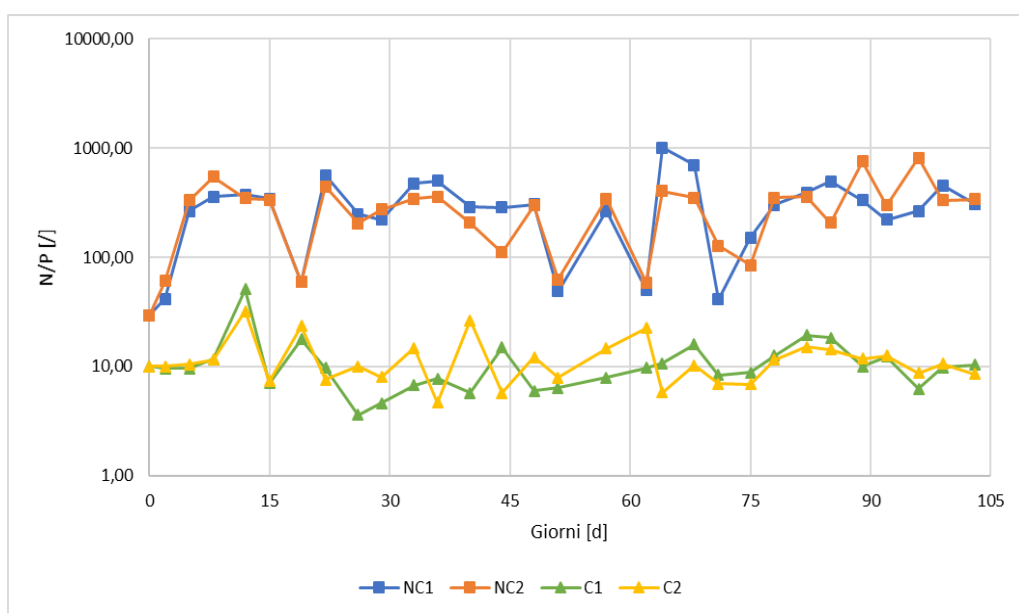


Figura 4.1.11: Andamento del valore del rapporto N/P nel tempo nei 4 reattori.

Come si può notare dal grafico di figura 4.1.11, il rapporto tra azoto e fosforo nelle colonne NC1 e NC2, ha assunto dopo pochi giorni di sperimentazioni valori estremamente elevati e superiori fino a due ordini di grandezza a quello teoricamente ottimale di 10. Un ambiente così carente di fosforo non ha tuttavia limitato la crescita, come osservabile dal grafico in figura 4.1.8. Sebbene il fosforo presente ad inizio prova sia assimilato dalla biomassa algale (dedotto dall'aumento del rapporto N/P nella prima settimana), essa si è sviluppata anche quando questo nutriente è risultato scarso. Nelle colonne C1 e C2, invece, il rapporto N/P all'interno dei reattori di crescita si è mantenuto pressoché pari a 10 lungo tutta la sperimentazione. Il valore ottimale di questo parametro non si è tuttavia tradotto in una maggior crescita.

Dalla figura 4.1.8 si possono osservare ulteriori informazioni sull'andamento della prova. Per quanto riguarda la colonna C1, essa, attorno al quarantesimo giorno di sperimentazione, ha subito un forte rallentamento della crescita della biomassa microalgale presente nella colonna. Questo



---

rallentamento è indicato dall'andamento decrescente dell'assorbanza dopo 40 giorni. Le problematiche connesse a questa coltura sono imputabili a cause di tipo tecnico, ovvero la rottura di un agitatore meccanico, il quale non ha funzionato correttamente tra i giorni 33 e 40. La scarsa agitazione ha provocato la decrescita della popolazione, la quale tuttavia ha ripreso a crescere una volta sostituito il pezzo difettoso.

Un altro aspetto rilevante riguarda la contaminazione delle colonne da parte di cianobatteri. Essa si è manifestata in tutte le colonne, seppur con rilevanza differente, attorno al sessantesimo giorno di sperimentazione. La fase decrescente dell'assorbanza, è coincisa con lo sviluppo notevole della comunità cianobatterica, molto rilevante nelle colonne C1 e C2, meno nelle colonne NC1 e NC2. Lo sviluppo di queste colonie ha comportato problematiche tecniche non indifferenti. I cianobatteri infatti sono caratterizzati da lunghi filamenti colloidali i quali aderiscono alle pareti del reattore e tendono a galleggiare, peggiorando l'efficienza di miscelazione e di illuminazione del reattore. Il proliferare di questa comunità ha comportato la necessità di una setacciatura grossolana della sospensione (avvenuta il giorno 68), per rimuovere i cianobatteri. Tale setacciatura ha favorito la ripresa della crescita delle microalghe nelle colonne NC1 e NC2, mentre nelle colonne C1 e C2, parallelamente ad una nuova crescita algale, si è assistito ad una nuova comparsa di cianobatteri.

Lo sviluppo dei cianobatteri è stato presumibilmente favorito da un calo della temperatura all'interno dei reattori. Come riportato da molti autori tra i quali Moheimani (2005), questo parametro ha una notevole influenza sul metabolismo delle microalghe. Tra il giorno 45 e 68 si è assistito ad un calo della temperatura di circa 5 gradi, fino a valori di processo di circa 20°, dovuto a temperature basse in laboratorio. Questo calo ha comportato un

discostamento della temperatura da quella ottimale di crescita con una conseguente difficoltà delle alghe ad acclimatarsi alla nuova condizione ambientale. Le minori velocità di crescita e le temperature inferiori potrebbero aver contribuito alla decrescita della popolazione microalgale. L'influenza della temperatura sulla crescita della biomassa algale è nota (Schmidt et al., 2016) e trova riscontro nel confronto tra i valori assunti da tale parametro e dall'assorbanza.

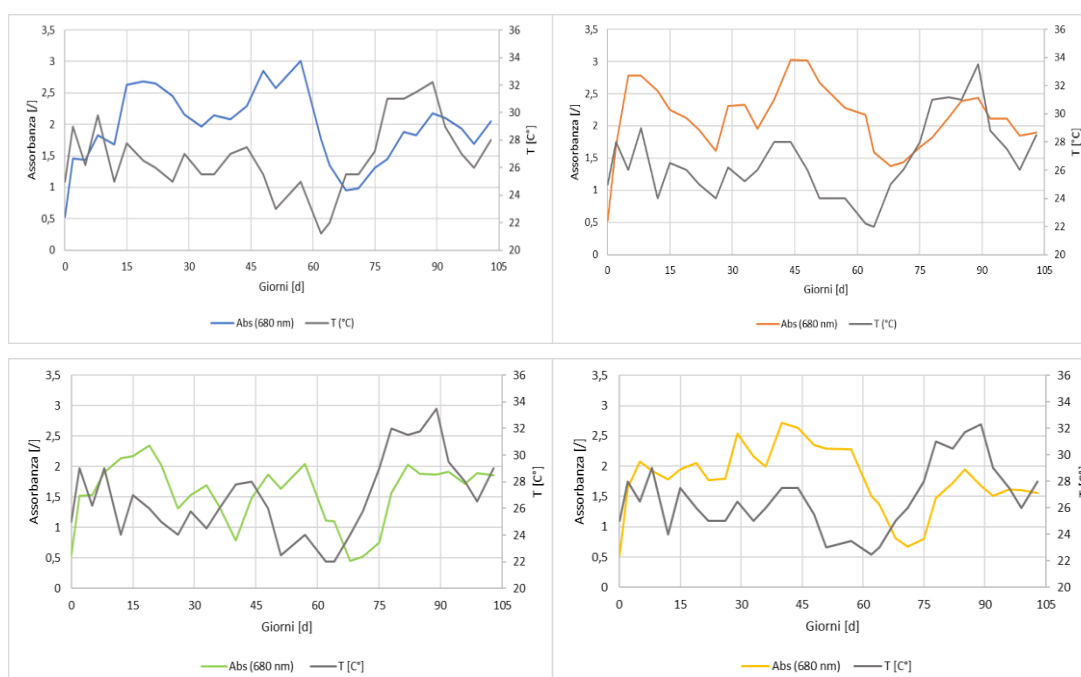


Figura 4.1.12: Comparazione tra assorbanza e temperatura per le 4 colonne di crescita.

Come si può osservare il comportamento è pressoché il medesimo in tutti i reattori.

Dal grafico in figura 4.1.12 è facilmente individuabile una correlazione tra assorbanza e temperatura. La decrescita dell'assorbanza ha coinciso con la decrescita della temperatura nei reattori e solo un aumento della seconda ha permesso la ripresa della coltura. La minor efficienza di crescita delle microalghe, dovuta all'abbassamento della temperatura, può aver favorito il proliferare dei cianobatteri che hanno rallentato lo sviluppo delle microalghe sia per competizione che per ombreggiamento. Questo fenomeno sarà meglio

---

approfondito in seguito (vedi capitolo 4.1.2.4). Si può notare inoltre come tra i due parametri (assorbanza e temperatura) vi sia un ritardo temporale di circa un ciclo: l'assorbanza al tempo  $t_i$  è cresciuta solo se già al tempo  $t_{i-1}$  è stato osservato un aumento di temperatura, sintomo del fatto che le microalghe, prima di riprendere a crescere, hanno necessitato di un periodo di acclimatamento. Tale dipendenza è stata studiata attraverso una regressione multi-parametrica tra l'andamento dell'assorbanza e degli altri parametri in gioco, tra cui la temperatura. L'analisi di inferenza statistica è riportata nel paragrafo 4.1.2.10.

In seguito alle problematiche appena citate il sistema si è nuovamente stabilizzato, raggiungendo valori di crescita confrontabili con quelli ottenuti nei primi 60 giorni di sperimentazione. Tale ripresa è stata favorita dalla setacciatura, con la quale sono stati rimossi i cianobatteri, e da un innalzamento della temperatura come riscontrabile nella figura 4.1.6. Come detto precedentemente, subito dopo la setacciatura, nelle colonne C1 e C2 sono nuovamente comparsi dei cianobatteri (seppur in modesta quantità) i quali tuttavia, con il proseguire della sperimentazione, sono totalmente scomparsi dal sistema. Come si può notare dal grafico riportato in figura 4.1.8, l'assorbanza è cresciuta in tutte le colonne confermando il trend osservato nel periodo antecedente la setacciatura: la crescita appare pressoché omogenea per tutte le colonne con apparente mancanza di influenza della correzione del rapporto N/P.

### **4.1.2.3 Produzione di biomassa**

Un ulteriore strumento di analisi utile alla quantificazione della crescita microalgale è stata la misura dei solidi, totali e volatili, presenti nella sospensione. Sono stati ricavati i ratei di produzione dei solidi,

discriminandone la velocità prima e dopo l'intervallo temporale in cui le colture hanno subito un decadimento della popolazione microalgale, dunque prima e dopo i giorni 57 e 68. I solidi sospesi totali e volatili sono stati pressoché coincidenti lungo tutta la sperimentazione. Il loro rapporto è sempre stato superiore allo 0,95, per questo motivo vengono riportati gli andamenti dei solidi sospesi volatili (VSS), in quanto più fedeli indicatori della biomassa algale.

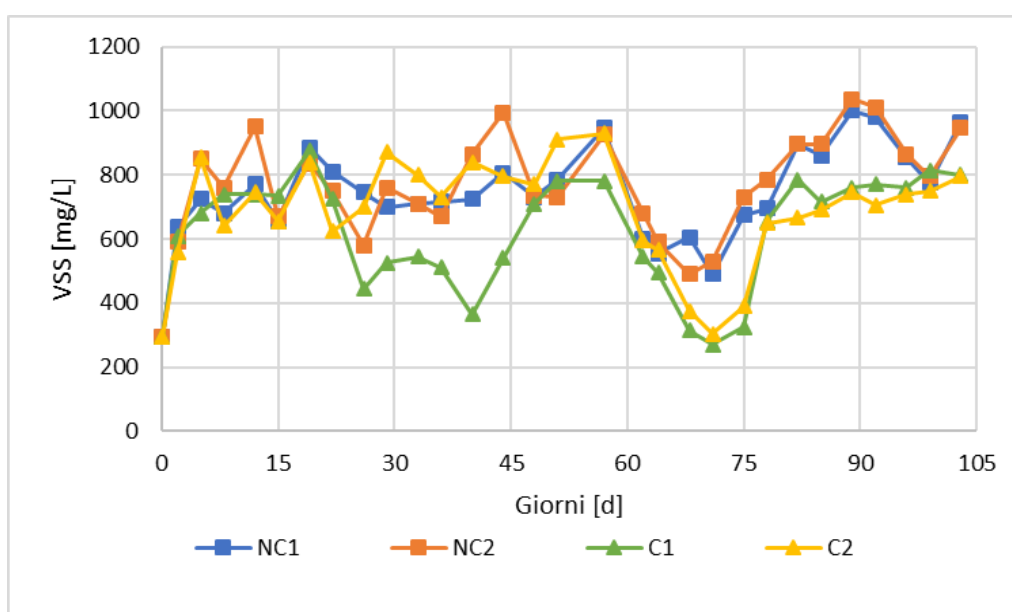


Figura 4.1.13: Andamento temporale dei solidi sospesi volatili nei 4 reattori di crescita.

Nella figura 4.1.13 si può notare come il tenore di solidi subisca un calo dopo il giorno 57. In seguito alla setacciatura del giorno 68, unitamente al ritorno di condizioni favorevoli al metabolismo microalgale, il valore dei solidi sospesi è tornato a crescere. Nei primi 57 giorni di sperimentazione la produzione media dei solidi sospesi volatili è stata pressoché omogenea in tutte le colonne. Nei giorni compresi tra il 57esimo e il 68esimo si è assistito ad un calo dei solidi, con un rateo di crescita in netto calo. In questi giorni, si è assistito alla decrescita del tenore dei solidi. È importante notare che nei giorni di calo termico, con conseguente produzione di cianobatteri, i solidi non sono aumentati, bensì, al contrario, diminuiti. Questa decrescita è strettamente

legata alla natura di questi microrganismi, i quali, essendo filamentosi, non si presentavano sospesi nel medium di crescita, bensì adesi alle pareti. Infine, dal giorno 68 fino a fine sperimentazione, la produzione media è tornata a crescere, in tutte le colonne. Tali valori di produttività ricalcano in maniera estremamente fedele quelli osservati prima della setacciatura. Tale analogia conferma quanto affermato nel capitolo 4.1.2.2, ovvero che il metabolismo di crescita osservato nelle colonne dopo la setacciatura è assolutamente confrontabile con quello riscontrato nei primi 60 giorni di sperimentazione. I tenori di produzione di solidi in questi tre intervalli temporali sono riportati in tabella 4.1.5.

*Tabella 4.1.5: Produzione, discriminata negli intervalli temporali, di solidi sospesi volatili.*

Intervallo di tempo [d]	Produzione media VSS [mg/L/d]			
	Colonna NC1	Colonna NC2	Colonna C1	Colonna C2
0-57	69 ± 41	70 ± 49	58 ± 47	70 ± 46
57-68	36 ± 35	31 ± 29	14 ± 29	20 ± 39
68-103	69 ± 24	75 ± 20	60 ± 34	56 ± 28

È importante notare come il tenore dei solidi rispecchi in maniera estremamente fedele la crescita delle microalghe, essendo il suo andamento pressoché sovrapponibile a quello dell'assorbanza. La similitudine tra i due andamenti è testimoniata da un alto valore di  $R^2$  (figura 4.1.14).

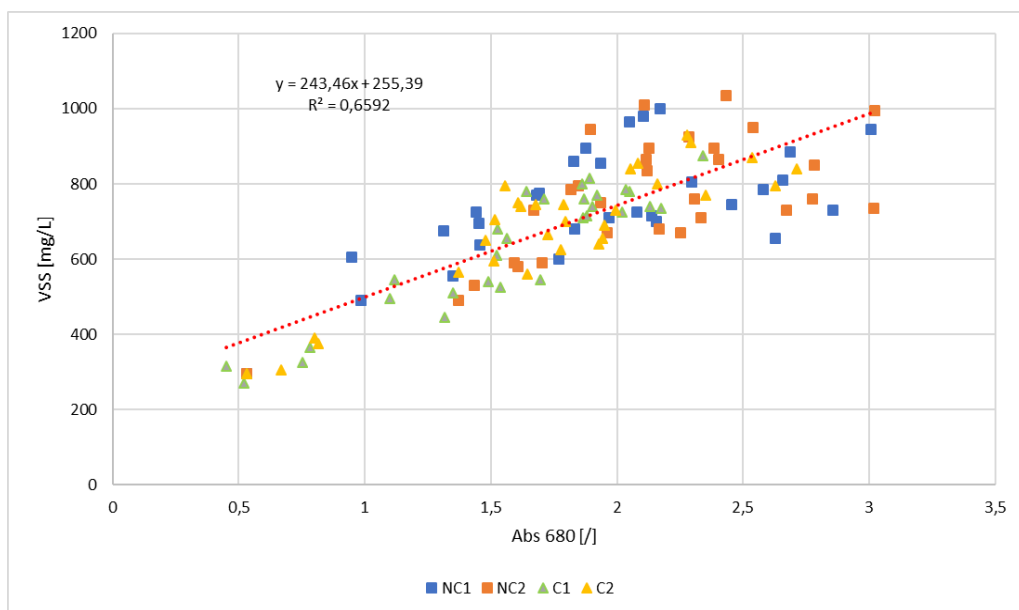


Figura 4.1.14: Correlazione tra assorbanza (680 nm) e VSS per tutti i reattori.

#### 4.1.2.4 Evoluzione della popolazione microalgale

Attraverso le conte microalgali è stata valutata l'evoluzione della popolazione, sia in termini quantitativi, che in termini di specie. Nelle figure 4.1.15 e 4.1.16 sono riportati sia la stima del numero di microalghie presenti nei reattori che la suddivisione di queste in specie.

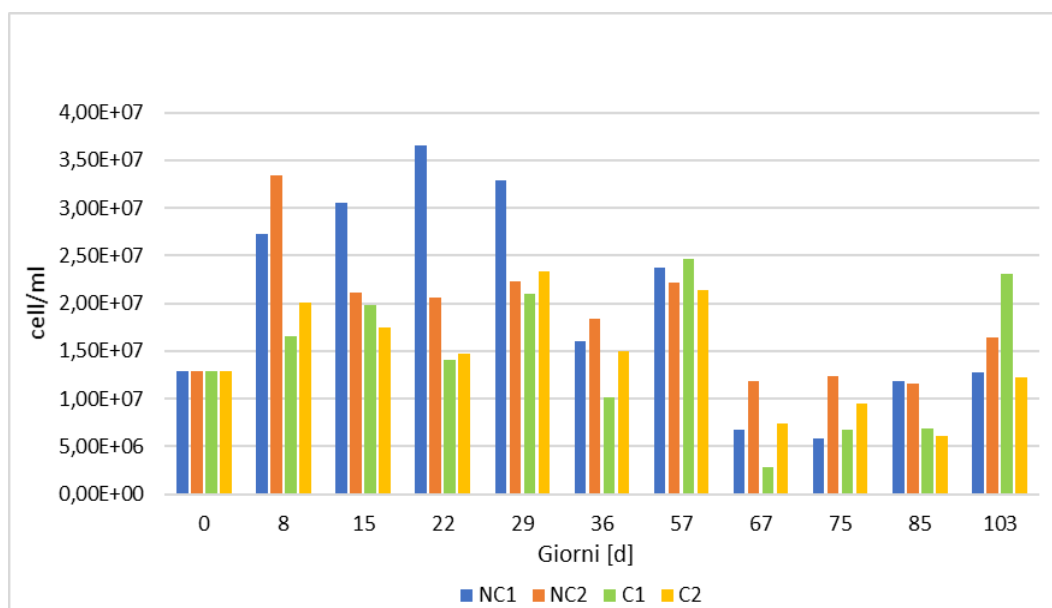


Figura 4.1.15: Conte microalgali lungo il corso della sperimentazione.

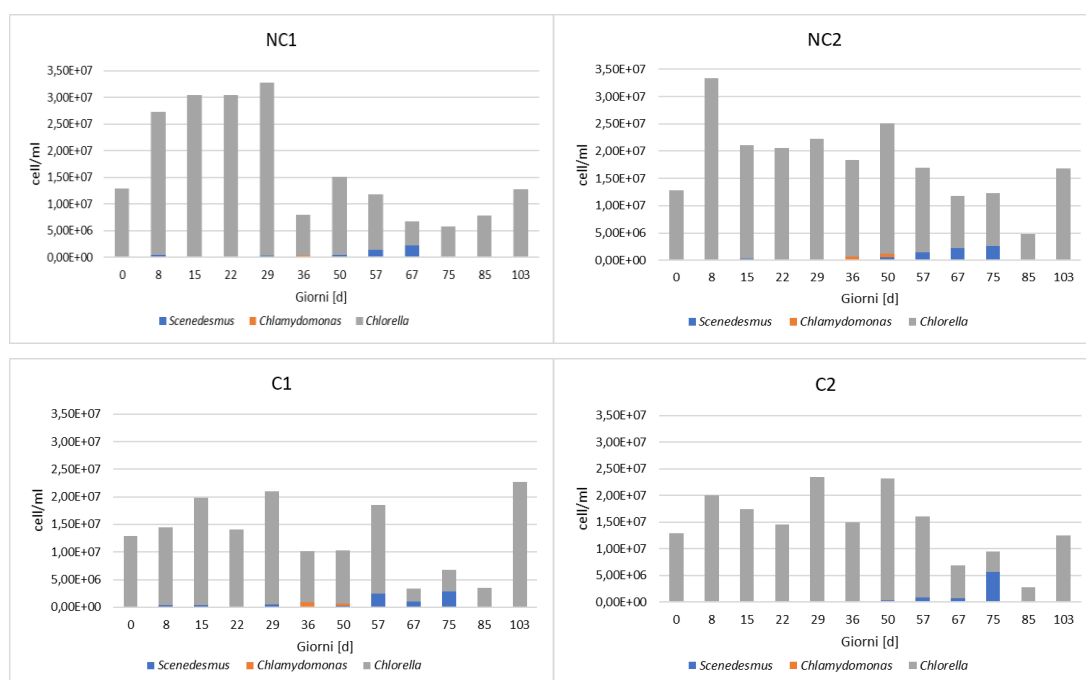


Figura 4.1.16: Suddivisione in specie delle microalghe nei 4 reattori di crescita.

Attraverso la figura 4.1.16 si può notare come la specie *Chlorella* sia stata la specie dominante lungo tutta la sperimentazione. Dallo stesso grafico e da quello di figura 4.1.15 si può inoltre osservare quanto esposto nei paragrafi precedenti, ovvero il decadimento della popolazione microalgale nel periodo centrale della sperimentazione. Questo decadimento, dovuto presumibilmente ad un abbassamento della temperatura, si è tradotto in un minor numero di microalghe presenti nei reattori di crescita.

In corrispondenza del decadimento microalgale si è assistito alla comparsa dei cianobatteri. La loro comparsa è presumibilmente dovuta alle variazioni repentine dei parametri quali temperatura, pH e concentrazione di CO<sub>2</sub>, che hanno posto in condizioni di stress le microalghe (Dodds & Whiles, 2010; Arias et al., 2017). I cianobatteri sono caratterizzati da range di tollerabilità molto ampi e, quindi, in condizioni di stress risultano più resistenti e competitivi delle microalghe. Per questo motivo essi sono riusciti a prevalere su di esse, favoriti dall'abbondanza di nutrienti necessari alla crescita. In seguito al periodo di

---

stress si sono reinstaurate condizioni operative favorevoli allo sviluppo microalgale. Condizioni nuovamente favorevoli hanno comportato un nuovo proliferare delle microalghe, con la scomparsa quasi totale dei cianobatteri dai reattori di crescita. Il nuovo sviluppo della comunità algale risulta evidente anche dai grafici 4.1.15 e 4.1.16.

#### 4.1.2.5 Rimozione sostanze azotate

La principale finalità di questo lavoro di tesi è quella di studiare l'effetto depurativo che le microalghe possono svolgere. In questo paragrafo si analizza l'andamento delle sostanze azotate riscontrate durante la prova.

##### Azoto ammoniacale

Il nutriente più presente nei digestati agricoli è l'azoto ammoniacale. Esso raggiunge concentrazioni così elevate da rendere necessaria una diluizione del refluo in vista del suo trattamento.

L'andamento temporale della concentrazione di questo nutriente in uscita dai reattori è riportato nella figura 4.1.17.

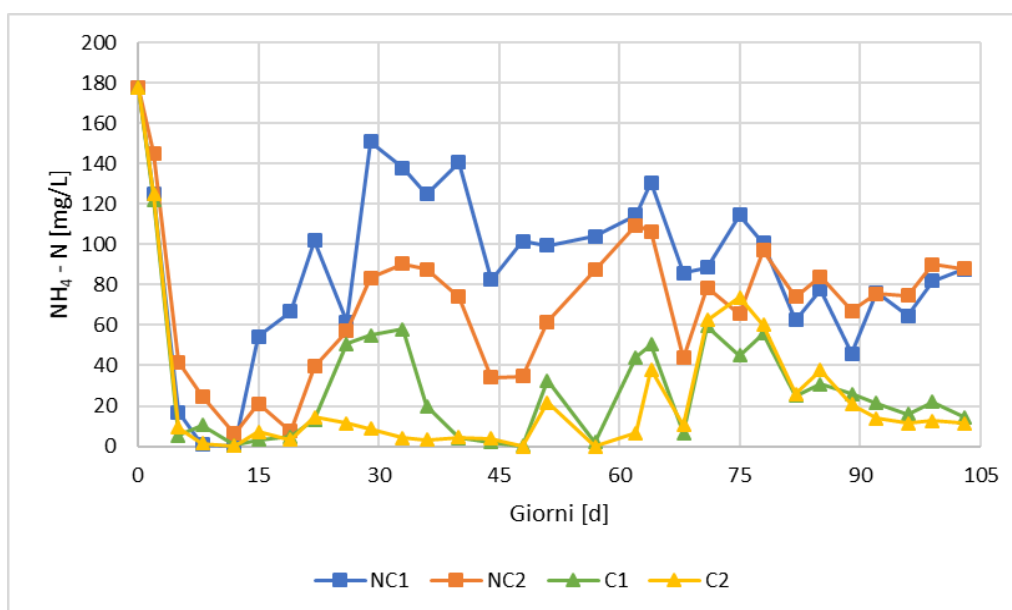


Figura 4.1.17: Concentrazione azoto ammoniacale nel tempo.



---

Il grafico di figura 4.1.17 mostra come nei primi giorni della sperimentazione gran parte dell'azoto ammoniacale sia stato rimosso dal sistema. Questa rimozione ha trovato una doppia giustificazione. In primo luogo tale calo è stato causato da una forte crescita delle microalghe (come riscontrabile dal grafico di figura 4.1.8), che ha comportato l'assunzione dell'azoto per assimilazione. In secondo luogo, un calo così netto della concentrazione di azoto ammoniacale è imputabile al processo di nitrificazione che ha avuto luogo all'interno dei reattori. A questo argomento sarà riservato il prossimo paragrafo.

Per quanto riguarda il comportamento delle repliche, gli andamenti sono risultati simili. Nelle colonne NC1 e NC2 la concentrazione residua dell'azoto è risultata maggiore rispetto alle colonne C1 e C2. La differenza è dovuta al fenomeno di nitrificazione che, come verrà discusso successivamente, è avvenuta diversamente nelle due coppie di reattori. Nelle colonne NC1 e NC2 i periodi della sperimentazione nei quali l'azoto ammoniacale ha raggiunto concentrazioni minime sono coincisi con quelli in cui è risultato massimo il valore dell'assorbanza (ad esempio tra i giorni 40 e 50 per la colonna NC2).

Per comprendere meglio l'andamento delle concentrazioni di questo nutriente occorre analizzare anche le altre specie azotate.

### **Nitrito e Nitrito**

L'andamento temporale della concentrazione del nitrito nelle colonne è riportato nella figura 4.1.18.

La presenza del nitrito all'interno del medium di crescita è strettamente legata al ruolo svolto dalla nitrificazione. Essa è svolta da batteri AOB (ammonio-ossidanti) che ossidano l' $\text{NH}_4$  a  $\text{NO}_2$ . La presenza di nitrito nel refluo alimentato alle colonne è trascurabile (<0,1 mg/L), motivo per cui la sua

---

presenza è sicuramente dovuta ad una sua comparsa attraverso processi di ossidazione dell'ammonio.

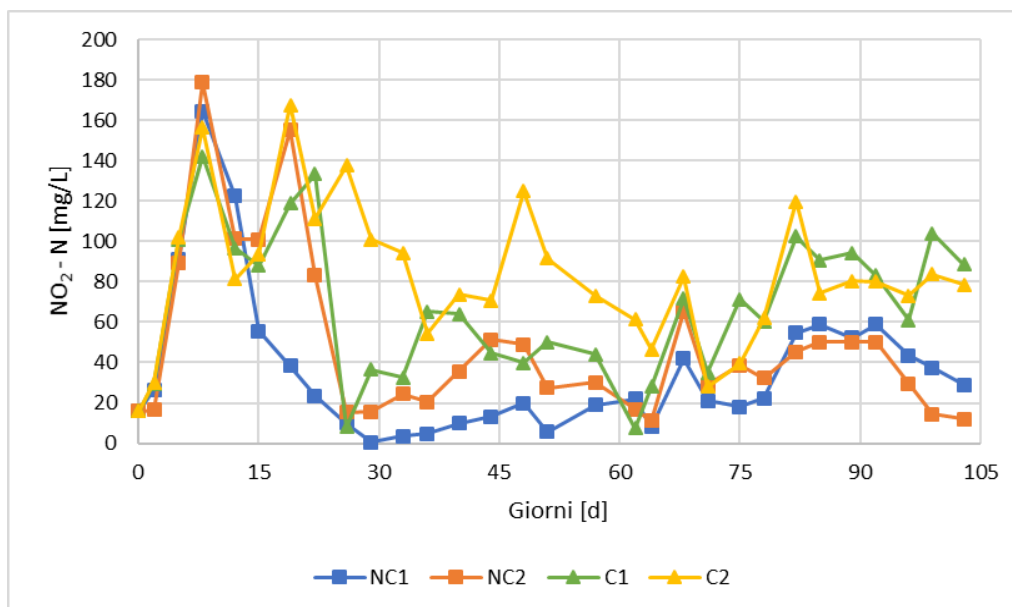


Figura 4.1.18: Andamento temporale concentrazione  $\text{NO}_2$  nelle colonne.

L'andamento delle concentrazioni del nitrito è risultato piuttosto diverso da colonna a colonna, tuttavia la sua concentrazione è risultata generalmente minore in NC1 e NC2 rispetto a C1 e C2.

L'andamento del nitrito è generalmente in controtendenza con quello dell'ammonio. Analizzando l'andamento del grafico si può notare come i picchi di concentrazione del nitrito siano coincisi con i primi giorni della sperimentazione (nei primi 20 giorni) e nei giorni successivi al giorno in cui è avvenuta la setacciatura dei medium di crescita (68esimo giorno di sperimentazione). Sembra cioè che la produzione di nitrito sia stata massima nei periodi in cui la concentrazione algale è risultata minima.

Una conferma a questo trend si può avere confrontando i grafici dell'assorbanza con quelli delle concentrazioni di ammonio, nitrito e nitrato. Il confronto è riportato in figura 4.1.19.

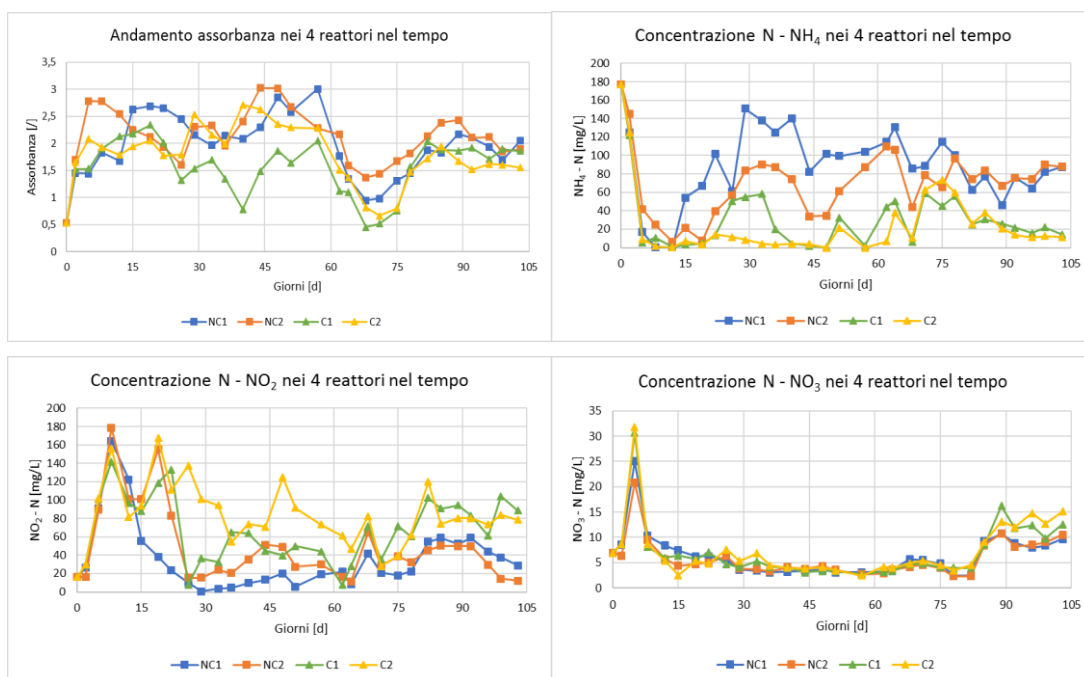


Figura 4.1.19: Confronto grafico tra assorbanza, concentrazione ammonio, nitrato e nitrito.

Come si può notare da un attento confronto grafico, nei primi giorni di sperimentazione l'assorbanza non aveva ancora raggiunto valori superiori al 2. Una concentrazione microalgale non ancora elevata si è tradotta in una formazione di nitrito da parte dei batteri in tutti i reattori di crescita. Con il proseguire della sperimentazione, la popolazione algale è cresciuta e ha raggiunto valori di concentrazione elevati, in particolare nelle colonne NC1 e NC2. Contestualmente il fenomeno della nitrificazione ha subito un'importante riduzione. Dato che l'ammonio era presente in entrambi i reattori in concentrazioni piuttosto elevate, l'inferiore tasso di nitrificazione non è da attribuirsi ad una limitazione da ammonio né da una limitazione da ossigeno, che al contrario sarebbe significativa solo durante i periodi di minor crescita algale. Sembra piuttosto che la nitrificazione sia stata limitata dalla competizione con la comunità microalgale per le risorse comuni. Tralasciando in questo frangente l'analisi della colonna C1 a causa dei problemi tecnici citati in precedenza e analizzando il suo duplicato, si può notare come i valori

---

misurati dell'assorbanza abbiano faticato a stabilizzarsi al di sopra di 2. Questo comportamento si è tradotto, dunque, in una formazione continua e abbondante di nitrito lungo tutta la sperimentazione. Allo stesso modo, nella colonna NC2, in corrispondenza di due picchi di concentrazione molto elevati, sono stati registrati valori di assorbanza o non ancora elevati o in decrescita. Infine, in seguito alla setacciatura avvenuta al giorno 68 è stato registrato un nuovo aumento dell'attività batterica in tutte le colonne dovuto al calo dell'assorbanza indotto da questa operazione.

Un'ulteriore interessante considerazione è come ad un picco della concentrazione del nitrito segua immediatamente la decrescita della stessa. Questo comportamento è sintomo del fatto che il nitrito, specialmente se presente in grandi quantità, viene assimilato dalle alghe o direttamente o in seguito ad una sua trasformazione in nitrato. La prima ipotesi risulta tuttavia la più probabile in quanto, come si dirà successivamente, la produzione di  $\text{NO}_3$  risulta limitata.

Risulta infine interessante notare come la maggior nitrificazione riscontrata nelle colonne C1 e C2 suggerisca che l'ossidazione da ammonio a nitrito sia favorita da concentrazioni elevate di fosforo, quali quelle presenti nelle colonne con correzione del rapporto N/P.

L'andamento temporale delle concentrazioni di nitrato è riportato nel grafico di figura 4.1.20. Questo nutriente era presente in modesta concentrazione al tempo 0 e la sua concentrazione nel refluo alimentato è di 2,5 mg/L.

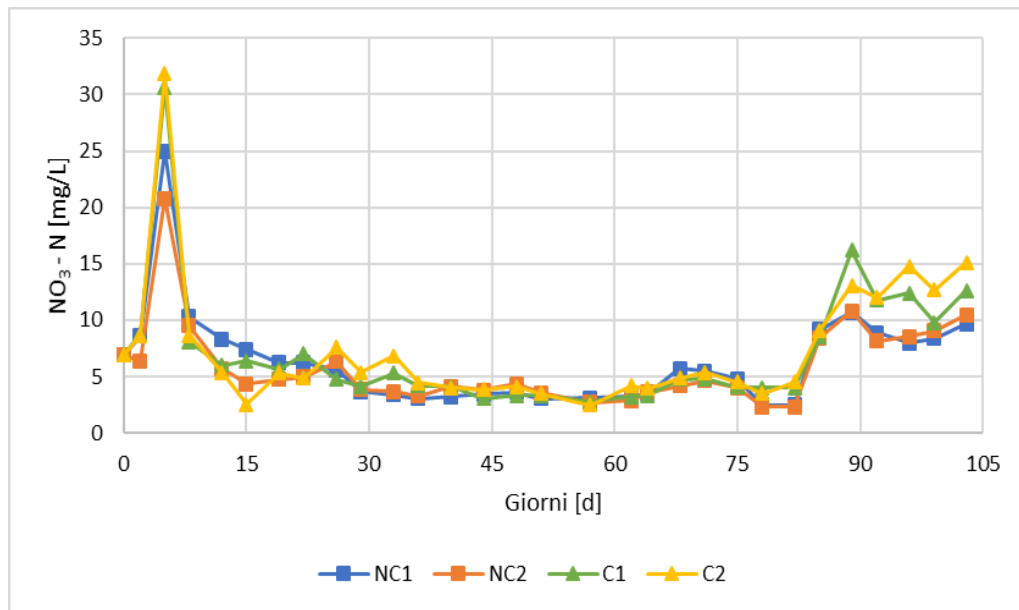


Figura 4.1.20: Andamento temporale  $\text{NO}_3$  nei 4 reattori nel tempo.

Il nitrato è un prodotto dell'ossidazione del nitrito operata dai batteri nitrito-ossidanti NOB. Le concentrazioni rilevate nei reattori sono risultate essere decisamente inferiori rispetto a quelle misurate per le altre forme azotate. Tuttavia una minima attività nitrito ossidante è stata comunque presente, quantificata dalla leggera differenza della concentrazione dell'azoto nitrico tra l'influente e l'effluente. Vi era quindi una quota parte di nitrato, seppur modesta, prodotta dal sistema.

Il picco iniziale della concentrazione di questo nutriente è presumibilmente dovuto alle condizioni al tempo zero che hanno favorito la formazione di nitrato. Tali condizioni ne hanno comportato una sua significativa produzione, durante i primi 5 giorni di sperimentazione. Come si può notare dalla rapida diminuzione dopo il giorno 5, il nitrato presente è stato assimilato dalle microalghe, in maniera pressoché identica per tutte 4 le colonne di coltivazione. Solo verso la fine della sperimentazione sono state riscontrate concentrazioni di  $\text{NO}_3$  piuttosto elevate, presumibilmente a causa di condizioni operative maggiormente favorevoli per gli NOB. Dal giorno 82 al giorno 87,

infatti, la CO<sub>2</sub>, è stata immessa tutti i giorni anziché le canoniche due volte a settimana. Tale modifica ha comportato una maggior formazione di nitrato, la quale è rimasta più elevata rispetto alla prima parte della sperimentazione anche con il ritorno dell'insufflazione bisettimanale. Tuttavia, seppur più alte, le concentrazioni rilevate sono rimaste decisamente inferiori a quelle rilevate per gli altri nutrienti, motivo per cui la rilevanza del fenomeno è ancora una volta considerabile come secondaria.

Un ulteriore processo che è stato considerato di secondaria importanza è quello della denitrificazione. Questo processo riduce NO<sub>3</sub> a N<sub>2</sub> in forma gassosa e avviene in condizioni anossiche. Per valutare l'eventuale rilevanza di questo processo è stata misurata la concentrazione dell'ossigeno disciolto durante le 24 ore.

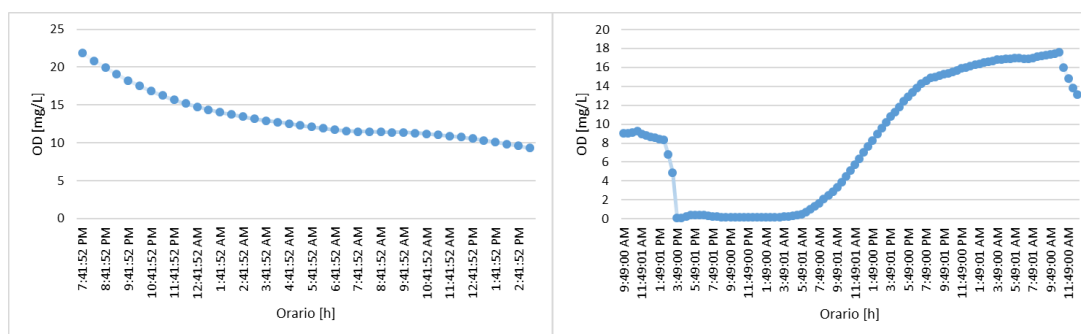


Figura 4.1.21: Profili in continuo dell'ossigeno disciolto, riferiti alla colonna NC1. I due profili sono stati misurati su 24h (sinistra) e 48h (destra).

Nel grafico a sinistra di figura 4.1.21, misurato un giorno in cui l'anidride carbonica non è stata insufflata, si può notare come anche nelle ore notturne, quindi in assenza di fotosintesi, la concentrazione di ossigeno disciolto non vada mai a zero. Nel grafico a destra si può notare come le condizioni di anossia si verifichino solo dopo l'immissione di CO<sub>2</sub> (alle 3 del pomeriggio) che comporta lo strappaggio dell'ossigeno disciolto. La frazione del tempo di ciclo in cui si verificano condizioni anossiche risulta complessivamente inferiore al

---

10%. Ciò implica che sia ragionevole ipotizzare che la trasformazione a  $N_2$  sia trascurabile.

#### 4.1.2.6 Rimozione fosforo e COD

##### Fosforo

L'andamento delle concentrazioni di fosforo nel corso della sperimentazione è stato ben diverso nelle due coppie di reattori di crescita caratterizzate dal diverso valore del rapporto N/P, come osservabile nella figura 4.1.22.

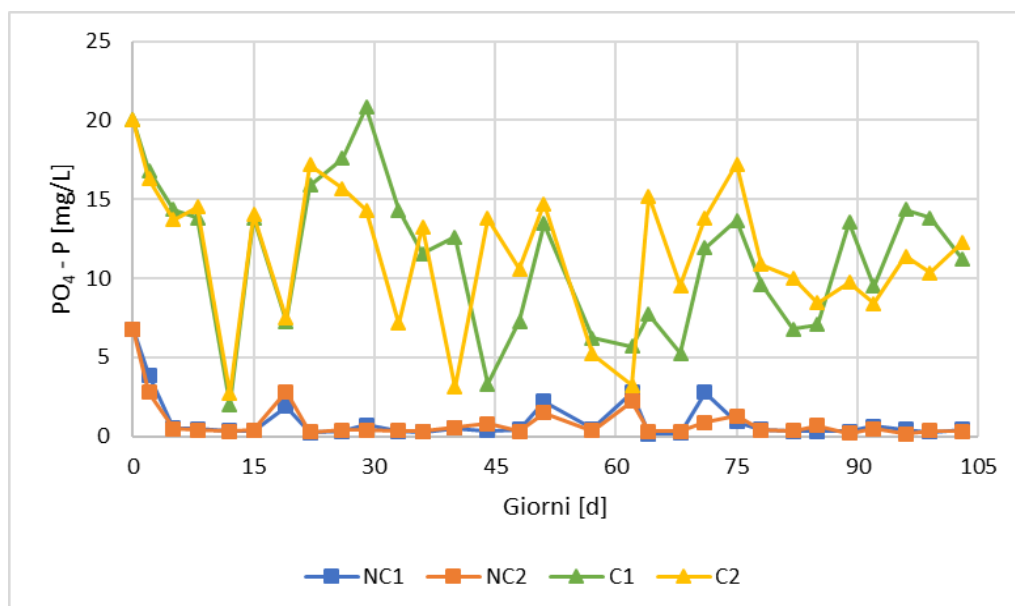


Figura 4.1.22: Andamento temporale delle concentrazioni di fosforo nel tempo.

Come si può notare, immediatamente a valle dell'inizio della prova la concentrazione del fosforo presente nelle colonne ha subito una repentina diminuzione. Essa ha raggiunto valori prossimi allo zero per le colonne NC1 e NC2 causando una diminuzione di circa 6 mg/L, la quale è risultata analoga anche nelle colonne C1 e C2. Nelle colonne NC1 e NC2, alimentate con un refluo in cui è presente una concentrazione di fosforo pari a circa 1,5 mg/L, la concentrazione è rimasta lungo tutta la prova pari circa a 0. I picchi isolati in cui il fosforo cresce fino a qualche mg/L sono stati presumibilmente dovuti al

---

rilascio per lisi e solubilizzazione di parte di parte del fosforo assimilato dalla popolazione microalgale.

I minimi di concentrazione del fosforo sono risultati strettamente collegati ad un forte innalzamento del valore del pH del medium di crescita. Un alto pH può aver causato l'instaurarsi di fenomeni di precipitazione.

Tuttavia, come già anticipato, un ambiente così fortemente fosforo-limitante nelle colonne NC1 e NC2 non ha limitato la crescita delle microalghie, le quali sono cresciute lungo tutta la sperimentazione, raggiungendo, inoltre, picchi di assorbanza più elevati di quelli raggiunti nelle colonne con correzione della concentrazione di fosforo.

La maggior presenza di fosforo nelle colonne C1 e C2 si è tradotta in una maggior nitrificazione da parte dei batteri AOB, come riportato nel paragrafo 4.1.2.5.

### COD

L'andamento delle concentrazioni di COD nel tempo nei 4 reattori di crescita è riportato nel grafico sottostante.

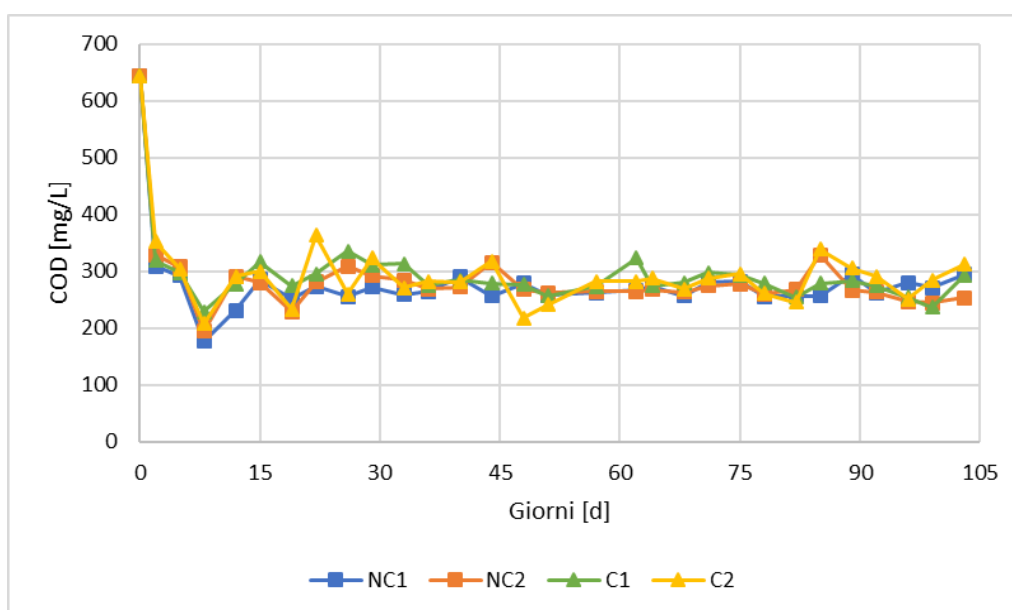


Figura 4.1.23: Andamento concentrazioni di COD nel tempo.



---

Il grafico in figura 4.1.23 evidenzia come l'andamento del COD nel tempo sia stato regolare e sostanzialmente identico per tutte le colonne. La sua concentrazione è diminuita nettamente nei primi giorni di sperimentazione, in corrispondenza della forte crescita microalgale, mentre nei successivi giorni il suo consumo è risultato essere pressoché costante. Si può così osservare come questa rimozione non abbia seguito in modo chiaro la dinamica della crescita delle alghe, motivo per cui è più probabile che il consumo di COD sia imputabile ad un suo consumo da parte dei batteri eterotrofi piuttosto che ad una sua assimilazione da parte delle microalghe per via eterotrofa.

#### **4.1.2.7 Parametri aggregati**

Verranno ora riportate le rimozioni di nutrienti conseguite dal sistema di crescita microalgale.

##### **Ammonio**

L'ammonio è, come più volte detto, il principale nutriente presente nei digestati. Per le colonne sono stati ottenuti i seguenti valori di rimozione medi:

- Colonna NC1:  $11 \pm 10$  mgN-NH<sub>4</sub>/L/d
- Colonna NC2:  $15 \pm 14$  mgN-NH<sub>4</sub>/L/d
- Colonna C1:  $18 \pm 8$  mgN-NH<sub>4</sub>/L/d
- Colonna C2:  $18 \pm 7$  mgN-NH<sub>4</sub>/L/d

Il grafico della rimozione cumulata dell'ammonio è il seguente.

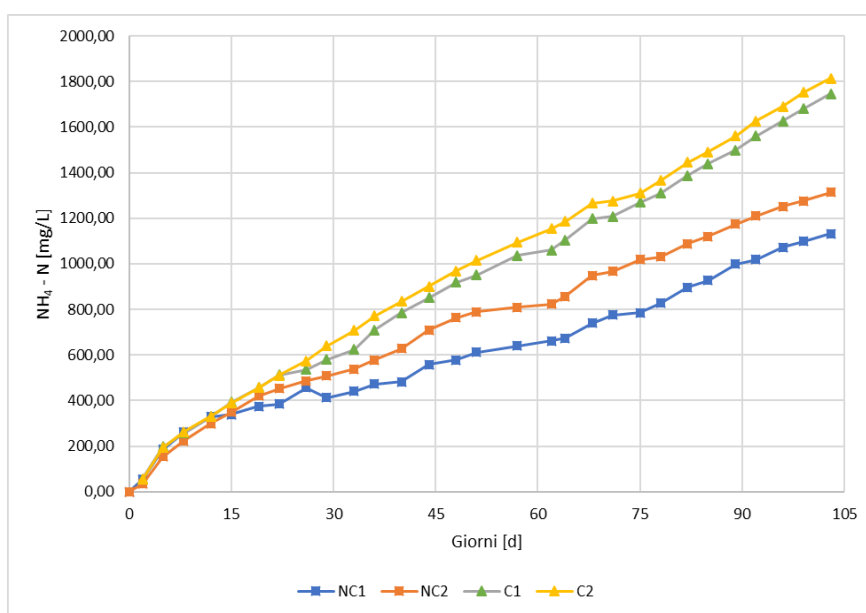


Figura 4.1.24: Rimozione cumulata  $\text{NH}_4$  nelle 4 colonne di crescita.

Dal grafico si può notare come la rimozione dell'ammonio sia stata maggiore nelle colonne con rapporto N/P corretto rispetto a quelle con il rapporto tra i nutrienti non corretto. Questa maggior rimozione non è dovuta ad una maggiore crescita, bensì ad un minore contributo della nitrificazione nelle colonne NC1 e NC2. Si può notare, inoltre, come nei giorni critici in cui si è assistito ad un calo di temperatura con conseguente rallentamento della cinetica di crescita delle microalghe, nelle colonne senza correzione del rapporto N/P vi sia una diminuzione della rimozione dell' $\text{NH}_4$  (giorni 50-65, la curva si appiattisce). Tale diminuzione è meno evidente nelle colonne C1 e C2 poiché il processo di nitrificazione, più rilevante in questi reattori, non è stato altrettanto influenzato dalle basse temperature.

### NO<sub>x</sub>

Sono ora riportate le rimozioni medie per nitriti e nitrati:

- Colonna NC1:  $-4 \pm 8$  mgN- $\text{NO}_2$ /L/d;  $-0,43 \pm 1,31$  mgN- $\text{NO}_3$ /L/d
- Colonna NC2:  $-5 \pm 10$  mgN- $\text{NO}_2$ /L/d;  $-0,37 \pm 1,13$  mgN- $\text{NO}_3$ /L/d
- Colonna C1:  $-8 \pm 9$  mgN- $\text{NO}_2$ /L/d;  $-0,51 \pm 1,79$  mgN- $\text{NO}_3$ /L/d

- Colonna C2:  $-8 \pm 9 \text{ mgN-NO}_2/\text{L/d}$ ;  $-0,54 \pm 1,86 \text{ mgN-NO}_3/\text{L/d}$

Il segno meno dei ratei qui riportati è un indicatore del fatto che gli  $\text{NO}_x$  non sono propriamente rimossi dal sistema, bensì prodotti. Tale assunzione conferma quanto sostenuto all'inizio del capitolo.

Le cumulate sono riportate nella figura seguente. È riportata inoltre la cumulata degli  $\text{NO}_x$ , somma dei contributi di nitrito e nitrato.

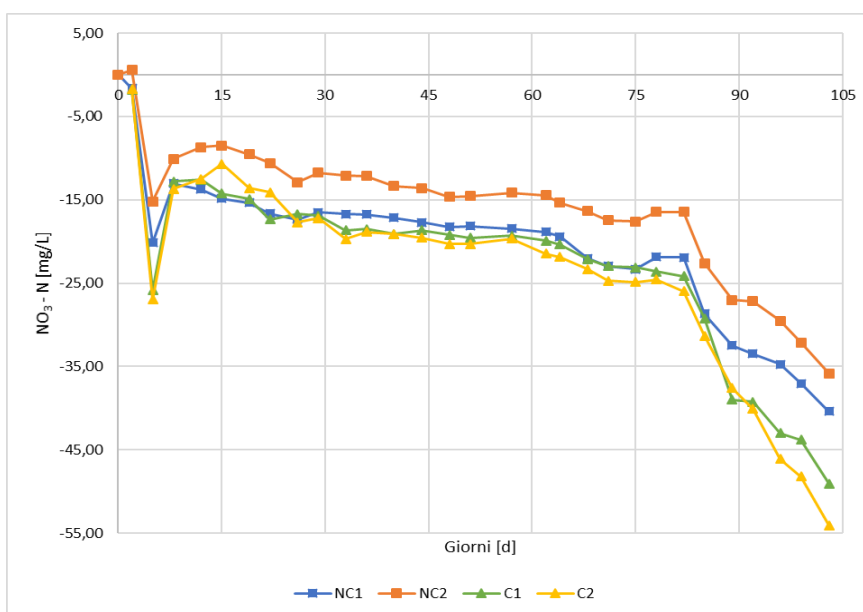


Figura 4.1.25: Rimozione cumulata  $\text{NO}_3$  nelle 4 colonne di crescita.

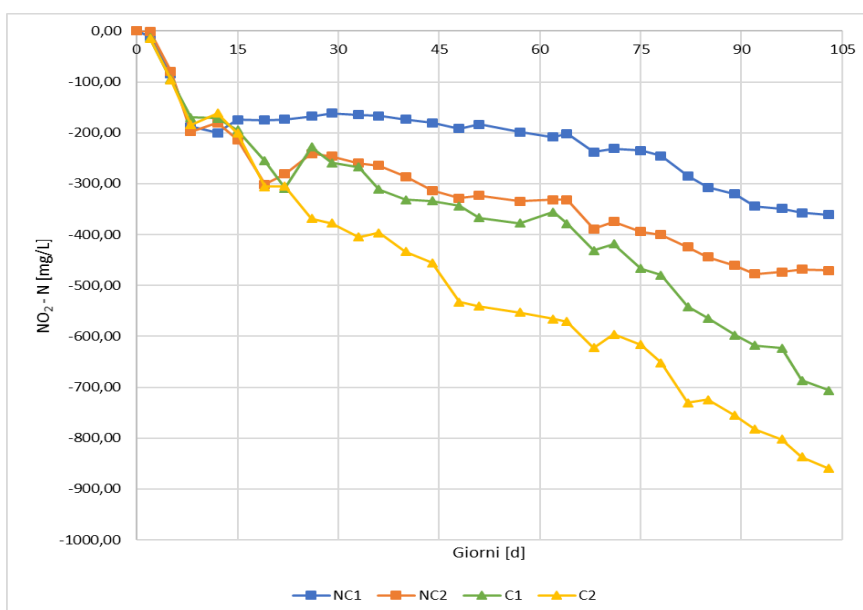


Figura 4.1.26: Rimozione cumulata  $\text{NO}_2$  nelle 4 colonne di crescita.

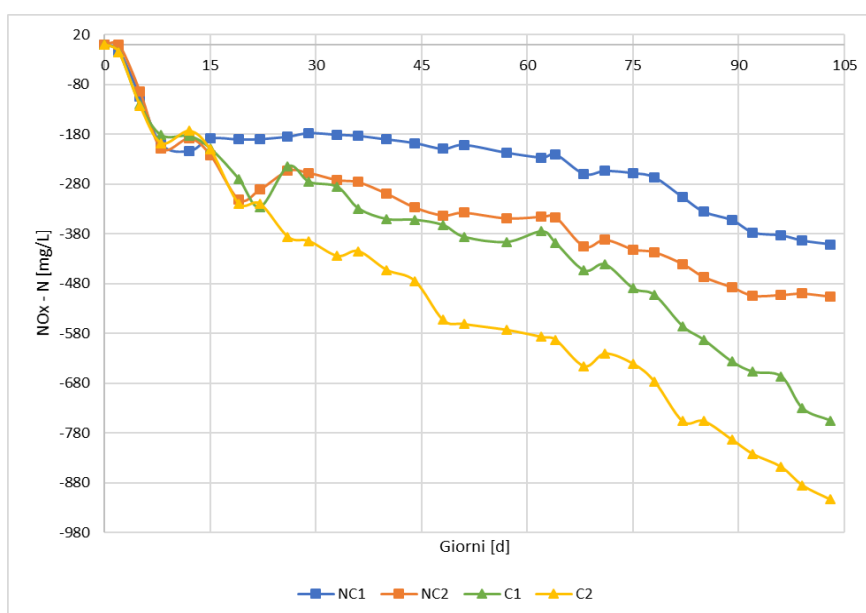


Figura 4.1.27: Rimozione cumulata  $\text{NO}_x$  nelle 4 colonne di crescita.

In accordo con quanto detto nel capitolo precedente, dai grafici soprastanti si può notare come la produzione di  $\text{NO}_x$  sia risultata più forte nelle colonne C1 e C2, specialmente per quanto riguarda il nitrito. Tale osservazione conferma l'ipotesi di una maggior nitrificazione in queste colonne.

### **Azoto totale**

Sommando con segno le componenti azotate rimosse è stato infine possibile stimare la rimozione ottenuta dal sistema nei confronti dell'azoto totale. Sono stati ottenuti i seguenti valori:

- Colonna NC1:  $7 \pm 8 \text{ mgN}_{\text{tot}}/\text{L}/\text{d}$
- Colonna NC2:  $10 \pm 15 \text{ mgN}_{\text{tot}}/\text{L}/\text{d}$
- Colonna C1:  $9 \pm 7 \text{ mgN}_{\text{tot}}/\text{L}/\text{d}$
- Colonna C2:  $9 \pm 7 \text{ mgN}_{\text{tot}}/\text{L}/\text{d}$

Le cumulate delle rimozioni di azoto totale sono riportate nella figura 4.1.26.

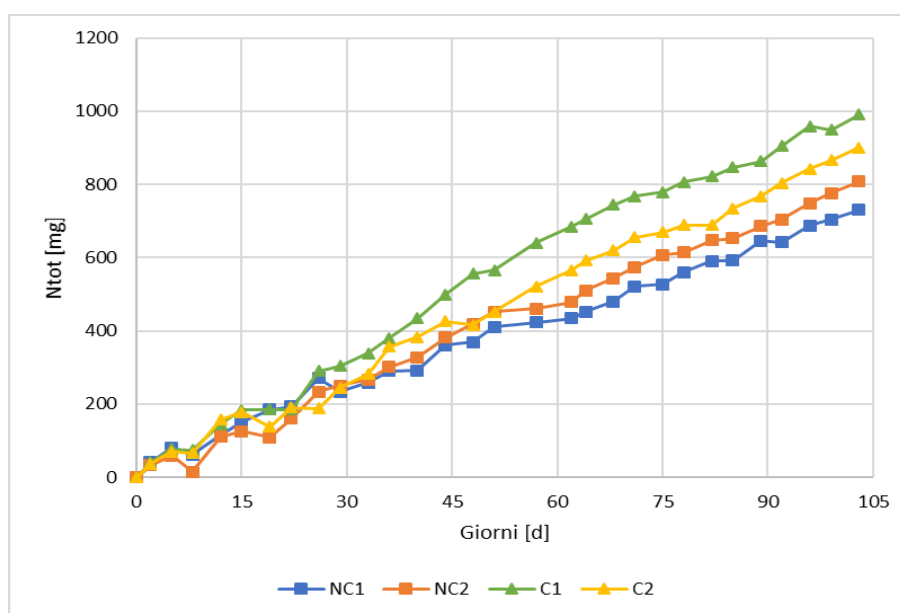


Figura 4.1.28: Curve di rimozione cumulata dell'azoto totale.

Risulta interessante notare come la miglior rimozione di azoto totale sia ottenuta nella colonna C1, la quale è stata soggetta, nel corso della sperimentazione, a problematiche di tipo tecnico. Tali problematiche si sono tradotte in una comunità microalgale meno sviluppata e con una conseguente minore capacità di assimilare azoto nella propria biomassa (vedi capitolo 4.1.2.5). Tale minor capacità non ha comportato solo una maggior nitrificazione, bensì anche una maggior quantità di azoto strippato in atmosfera, come si potrà evincere dai calcoli sul partizionamento. La miglior rimozione non è dunque, in questo caso, un fattore qualificante per il sistema, ma al contrario una criticità.

### **Azoto strippato**

Attraverso la metodologia di calcolo riportata nel paragrafo 3.5.3 è stata effettuata una stima dell'azoto strippato in atmosfera nel corso della sperimentazione. Questo rappresenta la quota parte di azoto che non è stato assimilato dalle alghe né trasformato in un prodotto della nitrificazione. La quantificazione è partita dal calcolo del totale di ammonio rimosso a cui è stato

---

in secondo luogo sottratto l'azoto assimilato dalle alghe e quello trasformato in NO<sub>x</sub>. I valori ottenuti sono i seguenti:

- Colonna NC1: 107 mgN/L pari al 15% del totale rimosso
- Colonna NC2: 168 mgN/L pari al 21% del totale rimosso
- Colonna C1: 499 mgN/L pari al 50% del totale rimosso
- Colonna C2: 340 mgN/L pari al 38% del totale rimosso

Risulta evidente, come accennato al capitolo precedente, la maggior incidenza dei fenomeni di strippaggio nella colonna C1, dovuti in prevalenza ai problemi tecnici accorsi a tale colonna che ne hanno compromesso le capacità depurative mediante accrescimento della biomassa microalgale. È importante notare, inoltre, come le colonne con la correzione del rapporto N/P abbiano presentato una percentuale maggiore di azoto strippato in atmosfera. Fenomeni di strippaggio più marcati sono presumibilmente una diretta conseguenza del minor sviluppo della comunità microalgale in queste colonne. I risultati ottenuti sono un'ulteriore indicazione di come l'aggiustamento del rapporto N/P non abbia favorito, in linea generale, le prestazioni depurative del sistema microalgale.

### **Fosforo**

Vengono ora riportati i ratei di rimozione del fosforo nelle 4 colonne di crescita:

- Colonna NC1:  $0,17 \pm 0,42$  mgP/L/d
- Colonna NC2:  $0,19 \pm 0,44$  mgP/L/d
- Colonna C1:  $0,85 \pm 1,27$  mgP/L/d
- Colonna C2:  $0,75 \pm 1,52$  mgP/L/d

Le relative curve di produzione cumulata sono riportate nella figura 4.1.29.

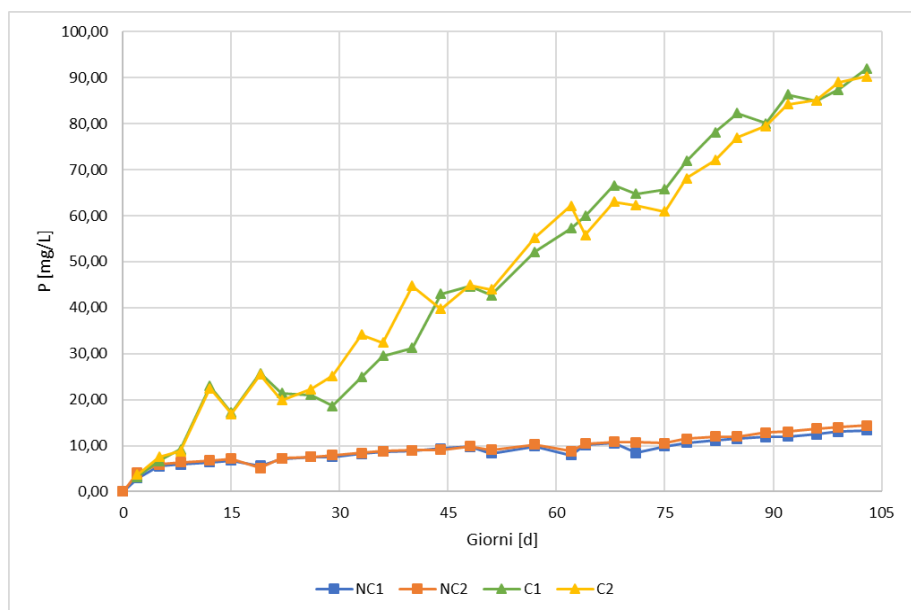


Figura 4.1.29: Curve di rimozione cumulata del fosforo.

Sia dai ratei che dal grafico in figura 4.1.29 si può facilmente notare come vi sia differenza tra le coppie di colonne. La profonda differenza di rimozione è dovuta alla correzione del rapporto N/P, la quale, nelle colonne C1 e C2, ha comportato un'immissione non trascurabile di fosforo con l'alimentazione. Nei reattori NC1 e NC2, viceversa, essendo stato minimo l'apporto di fosforo con l'alimento, la rimozione di questo nutriente è risultata di importanza decisamente inferiore.

### **COD**

Sono infine riportati i ratei di rimozione del COD nei 4 reattori:

- Colonna NC1:  $55 \pm 28$  mgCOD/L/d
- Colonna NC2:  $55 \pm 26$  mgCOD/L/d
- Colonna C1:  $54 \pm 28$  mgCOD/L/d
- Colonna C2:  $53 \pm 25$  mgCOD/L/d

Le relative curve di rimozione cumulata sono riportate in figura 4.1.30.

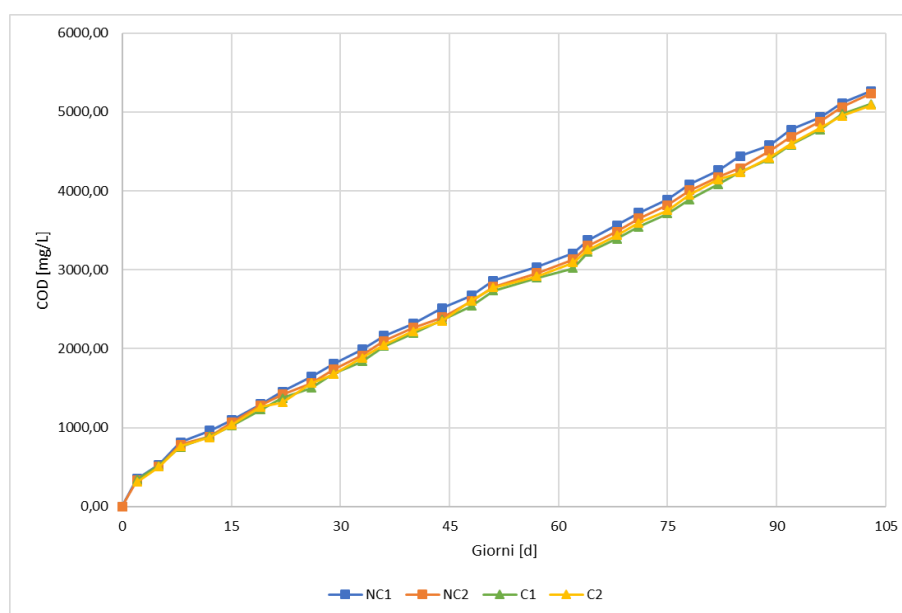


Figura 4.1.30: Curve di rimozione cumulata di COD nelle 4 colonne.

L'aspetto rettilineo delle curve riportate confermano quanto detto nel paragrafo 4.1.2.6.

#### 4.1.2.8 Rese di rimozione

Vengono infine riportate le rese di rimozione, calcolate per ogni nutriente e riferite all'intero periodo di sperimentazione. Tali rese forniscono il grado di efficienza di rimozione del sistema nei confronti delle componenti di interesse. Le percentuali di rimozione sono riportate nella tabella 4.1.6.

Tabella 4.1.6: Rese di rimozione (in percentuale) del sistema di coltivazione microalgale.

Colonna	N <sub>TOT</sub> [%]	P [%]	COD [%]
NC1	35	85	66
NC2	39	92	66
C1	48	46	64
C2	44	45	64

Dalla tabella 4.1.6 si può notare ancora una volta come la minor rimozione di fosforo rilevata nelle colonne C1 e C2 sia un'ulteriore indicazione di come l'aggiunta di fosforo non abbia migliorato le prestazioni del sistema, dato che



---

una sua maggior presenza si è tradotta in una minor resa di rimozione. Per quanto riguarda il COD, le rese di rimozione risultano interessanti e simili per tutte le colonne. Per quanto riguarda l'azoto, infine, le rese di rimozione, per quanto non elevate, hanno confermato l'efficacia delle microalghe nella rimozione delle sostanze azotate. In figura 4.1.31 viene riportato un grafico di confronto tra l'azoto totale in alimentazione ai reattori e quello rimosso dalle microalghe.

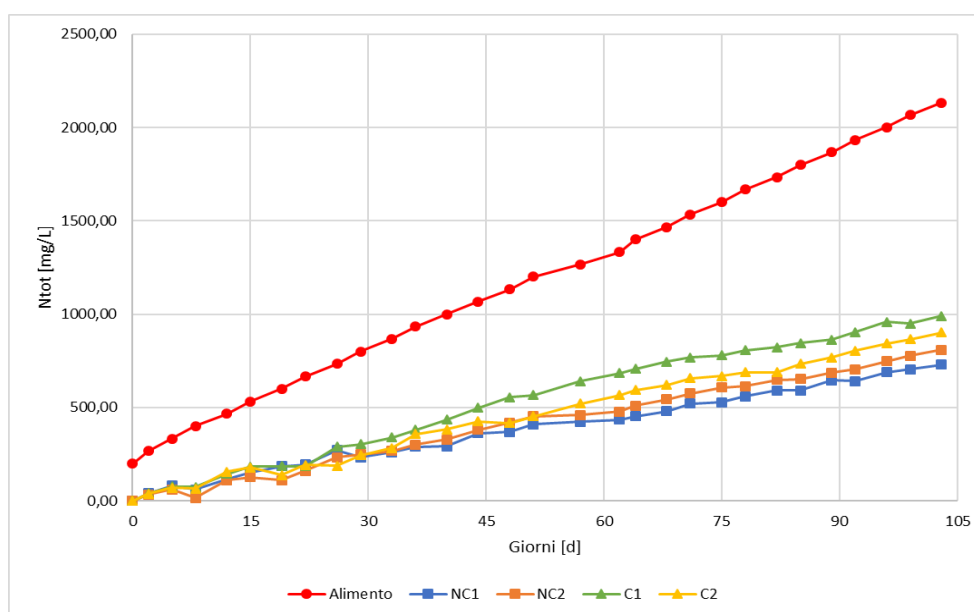


Figura 4.1.31: Confronto tra rimozione e alimentazione di azoto nelle colonne di crescita.

#### 4.1.2.9 Analisi dello stato stazionario

La prova di crescita in semicontinuo riportata nei paragrafi 4.1.2 ha avuto una durata di 103 giorni nei quali si è assistito a cicli e, talvolta, a problematiche di tipo tecnico. Per dare uniformità ai risultati descritti si è dunque deciso di proporre un'analisi quantitativa di tutti i parametri caratterizzanti il sistema e le sue rese, in un periodo in cui esso è stato soggetto a condizioni pressoché stazionarie. Per questo motivo è stata proposta la seguente analisi, riferita all'intervallo di tempo che va dal giorno 78 fino a fine prova.

Nelle tabelle 4.1.7-11 sono riportati i valori medi e le relative deviazioni standard dei parametri di crescita, concentrazioni dei nutrienti, parametri aggregati, azoto strippato e rese del sistema, relativi al periodo citato.

4.1.7: Valori medi di crescita e operativi rilevati nelle colonne nei giorni 78-103.

Reattore	Abs [//]	pH [//]	T [°C]	VSS [mg/L]
<b>NC1</b>	1,89 ± 0,23	8,63 ± 0,63	29,5 ± 2,3	878 ± 106
<b>NC2</b>	2,09 ± 0,23	8,92 ± 0,92	29,7 ± 2,4	903 ± 91
<b>C1</b>	1,84 ± 0,14	6,55 ± 0,45	30,2 ± 2,4	757 ± 51
<b>C2</b>	1,64 ± 0,15	6,40 ± 0,57	29,5 ± 2,2	717 ± 49

Tabella 4.1.8: Valori medi concentrazioni nutrienti rilevati nelle colonne nei giorni 78-103.

Reattore	NH <sub>4</sub> -N [mg/L]	NO <sub>3</sub> -N [mg/L]	NO <sub>2</sub> -N [mg/L]	P [mg/L]	N/P [//]	COD [mg/L]
<b>NC1</b>	74,5 ± 16,7	7,48 ± 3,2	44,6 ± 13,9	0,39 ± 0,12	346 ± 94,5	271 ± 16,5
<b>NC2</b>	81,2 ± 10,1	7,52 ± 15,9	35,5 ± 3,4	0,35 ± 0,17	431 ± 223	266 ± 26,6
<b>C1</b>	26,4 ± 13	9,92 ± 4,3	85,5 ± 16,8	10,7 ± 3	12,4 ± 4,4	269 ± 18,8
<b>C2</b>	24,2 ± 17,2	10,6 ± 4,5	81,5 ± 16,9	10,2 ± 1,35	11,6 ± 2,4	286 ± 32,6

Tabella 4.1.9: Valori medi ratei di rimozione rilevati nelle colonne nei giorni 78-103.

Reattori	Rateo NH <sub>4</sub> -N [mg/L/d]	Rateo NO <sub>3</sub> -N [mg/L/d]	Rateo NO <sub>2</sub> -N [mg/L/d]	Rateo P [mg/L/d]	Rateo COD [mg/L/d]
<b>NC1</b>	12,1 ± 4,21	-0,62 ± 0,81	-4,61 ± 3,38	0,13 ± 0,06	50,9 ± 13
<b>NC2</b>	10,3 ± 3,15	-0,65 ± 0,77	-2,79 ± 3,26	0,14 ± 0,10	51,2 ± 9,6
<b>C1</b>	17,1 ± 2,35	-0,88 ± 0,88	-8,71 ± 6,48	1,02 ± 1	50,9 ± 10,9
<b>C2</b>	18,1 ± 2,46	-1,01 ± 0,67	-8,56 ± 6,26	1,14 ± 0,75	48,1 ± 11,8

Tabella 4.1.10: Percentuali azoto strippato nelle colonne nei giorni 78-103.

Reattori	% Azoto strippato
<b>NC1</b>	1,5
<b>NC2</b>	5,7
<b>C1</b>	31,8
<b>C2</b>	30,3

Tabella 4.1.11: Rese di rimozione dei nutrienti (%) rilevati nelle colonne nei giorni 78-103.

	N <sub>TOT</sub> [%]	NH <sub>4</sub> [%]	P [%]	COD [%]
Colonna NC1	35	57	85	66
Colonna NC2	39	66	92	66
Colonna C1	48	88	46	64
Colonna C2	44	91	45	64

#### 4.1.2.10 Analisi statistiche

Uno strumento molto utile per garantire affidabilità ai risultati presentati nei capitoli precedenti sono le analisi statistiche. Queste, per essere effettuate, necessitano di campioni di dati piuttosto lunghi, motivo per cui sono state effettuate solo per la prova in semicontinuo.

##### Confronto tra repliche

Per verificare l'accoppiamento tra i risultati delle colonne omologhe (NC1 e NC2; C1 e C2) sono stati effettuati dei test statistici. Nello specifico è stato effettuato un t-test accoppiato tra i principali parametri operativi. Con tale test è stata verificata l'ipotesi nulla di media uguale per parametri omologhi tra le colonne caratterizzate dalle medesime condizioni operative. Se il valore di p-value ottenuto è risultato maggiore di 0,05 (livello di significatività del test) allora l'ipotesi nulla di media uguale per il parametro testato non poteva essere rifiutata. In caso contrario l'ipotesi va rigettata.

Tabella 4.1.12: Risultati t-test per i principali parametri operativi del sistema di crescita microalgale.

T TEST	Abs (680 nm)	Torbidità	NH <sub>4</sub>	NO <sub>3</sub>	NO <sub>2</sub>	P	N/P	VSS
Colonne NC1 & NC2 (p-value)	0,339	0,286	0,111	0,832	0,1507	0,344	0,897	0,231
Colonne C1 & C2 (p-value)	0,549	0,296	0,163	0,584	0,156	0,842	0,744	0,489

---

L'analisi statistica è stata effettuata senza considerare i dati misurati tra il giorno 33 ed il giorno 48, per tutte le colonne. L'eliminazione di questi dati dall'analisi è resa necessaria dal fatto che il reattore C1 è stato soggetto a problematiche di tipo tecnico, che hanno compromesso l'efficacia del sistema. Per coerenza di analisi, dunque, non sono stati considerati nel t-test i dati relativi ai giorni menzionati, anche per le altre colonne.

I risultati riportati in tabella 4.1.1 evidenziano un livello di accoppiamento significativo. La similitudine riscontrata a coppie attraverso i test è una conferma della ripetibilità della prova.

#### **Verifica statistica effetti correzione N/P**

Attraverso l'analisi dei dati rilevati nel corso della sperimentazione si è concluso, nel capitolo 4.3.1, che l'aggiustamento del rapporto N/P non ha contribuito ad aiutare la resa del sistema di crescita microalgale. Osservando l'andamento del valore dell'assorbanza nel tempo per le 4 colonne si è infatti osservato che la correzione del rapporto azoto-fosforo nelle colonne C1 e C2 non si è tradotta in una maggior crescita della biomassa. È stata così provata statisticamente questa affermazione applicando un t-test accoppiato ad una coda ai valori medi dell'assorbanza misurati nelle coppie di colonne. È stato possibile applicare questo test in quanto è stato dimostrato nel paragrafo precedente che è possibile ritenere uguali le medie dell'assorbanza rilevate nelle due coppie di colonne omologhe. Per entrambi i duplicati sarà dunque considerata una sola serie di misure con la media delle assorbanze rilevate.

I risultati del test confermano quanto ipotizzato. Il valore di p-value ottenuto è estremamente basso e pari  $6,71 \cdot 10^{-7}$  e comporta dunque il rifiuto dell'ipotesi di media uguale tra le due serie di osservazioni. Viene dunque accettata l'ipotesi alternativa del test a una coda, ovvero che la media di uno dei due campioni è maggiore dell'altra. Nello specifico risulta che la media

delle assorbanze delle colonne NC1 e NC2 è superiore a quella delle colonne C1 e C2. La statistica ha confermato, dunque, che l'aggiunta di fosforo sotto forma di sale per aggiustare il rapporto N/P non ha permesso di conseguire una maggior crescita microalgale.

### **Prove di inferenza statistica**

All'interno di questo paragrafo sono discussi i risultati dei test d'inferenza. Data la finalità di questi test, in cui si vogliono determinare le possibili cause che insistono su un aumento o su una riduzione della comunità microalgale, le regressioni che vengono presentate non sono state impostate su valori puntuali, bensì sulle variazioni dei parametri tra due istanti temporali successivi. Sono stati dunque oggetto di studio i differenziali di assorbanza, VSS e torbidità tra due misure consequenziali, le rimozioni di nutrienti osservate nei medesimi intervalli temporali e le rispettive variazioni della temperatura.

Sono state impostate, dunque, delle regressioni multiparametriche tra le differenze di assorbanza, di VSS e di torbidità con le rimozioni dei nutrienti e la differenza di temperatura e pH, tra due misurazioni successive, e con la temperatura media del periodo stesso. Sono state considerate le variazioni di tutti e 3 i parametri indicatori della crescita microalgale (assorbanza, torbidità e VSS), facendo la regressione di ognuno di questi parametri con i differenziali precedentemente elencati. Tale operazione ha fornito robustezza al test di inferenza. I risultati ottenuti sono riportati in tabella 4.1.13.

*Tabella 4.1.13: Risultati test di inferenza. I risultati della regressione sono i medesimi considerando tutti e 3 i diversi parametri di crescita microalgale.*

<i>Reattori</i>	<i>Rimozione NH<sub>4</sub></i>	<i>Rimozione NO<sub>2</sub></i>	<i>Rimozione NO<sub>3</sub></i>	<i>Rimozione P</i>	<i>Variazione Temperatura</i>	<i>Temperatura media</i>	<i>Variazione pH</i>
<b>NC1</b>	No	No	No	No	Si	No	No
<b>NC2</b>	No	No	No	No	No	No	No
<b>C1</b>	No	No	No	No	Si	No	No
<b>C2</b>	No	No	No	No	Si	No	No

---

Come si può osservare dalla tabella 4.1.13 la crescita delle microalghe pare che sia stata influenzata statisticamente solo dalla variazione di temperatura. Le rimozioni di nutrienti osservate tra due istanti temporali successivi sembrano non aver inciso sullo sviluppo delle microalghe. Tale mancata dipendenza è presumibilmente dovuta alla complessità del sistema di crescita. Essendoci rimozione contestuale di azoto sia da parte delle microalghe che da parte dei batteri, la statistica non è riuscita ad osservare una corrispondenza diretta tra rimozioni e crescita microalgale, in quanto non è riuscita a discriminare la quota parte singolarmente assorbita dalle alghe. Inoltre, l'analisi di inferenza conferma quanto sospettato nel capitolo 4.1.2.2, ovvero che la crescita delle alghe abbia risentito delle variazioni di temperatura rilevate nei reattori.

#### 4.1.2.11 Valutazioni stechiometriche

Attraverso la metodologia descritta al paragrafo 3.5.5 sono stati ricavati, a partire dai dati relativi alla biomassa prodotta in termini di VSS, i valori di ossigeno prodotti. Successivamente, sono stati ricavati sia i valori di ossigeno necessari alla nitrificazione, che quelli necessari all'ossidazione del COD. I risultati sono stati riportati nella tabella 4.1.14.

*Tabella 4.1.14: Calcoli stechiometrici riferiti alla produzione e alla richiesta di ossigeno.*

	Reattori			
	NC1	NC2	C1	C2
O <sub>2</sub> prodotto [g/L/d]	0,13	0,12	0,09	0,11
O <sub>2</sub> necessario per nitrificazione [g/L/d]	0,01	0,02	0,03	0,03
O <sub>2</sub> necessario per ossidazione COD [g/L/d]	0,02	0,02	0,02	0,02

---

Dalla tabella 4.1.14 si può notare come l'ossigeno sia stato prodotto dalle microalghe in quantità maggiore di quanto necessario ai contestuali processi di ossidazione dell'ammonio e del COD. Per questo motivo si può affermare che l'ossigeno non è stato limitante nei confronti dei metabolismi avvenuti nei reattori di coltivazione e che, di conseguenza, il set-up della prova può ritenersi valido nell'ottica della progettazione di un sistema di coltivazione microalgale che possa sostenere i processi interni di nitrificazione dell'ammonio e ossidazione del COD.

---

## 4.2 Risultati prove di crescita su refluo zootecnico

### 4.2.1 Prova 1

In questo paragrafo vengono illustrati i risultati relativi alla prova di coltura di microalghe su refluo zootecnico WW1. La metodologia di tale sperimentazione è stata descritta all'interno dei paragrafi 3.2.2 e 3.4.2.

L'obiettivo di questa prova era di studiare il comportamento di lungo periodo del sistema in termini di resa di produzione di nuova biomassa e, contestualmente, di resa di rimozione di nutrienti dal refluo.

Sono stati riportati in tabella 4.2.1 i valori delle concentrazioni dei principali nutrienti nei reattori di crescita al tempo iniziale (tempo 0). Dato che le tre colonne sono state impostate tutte allo stesso modo, la caratterizzazione del tempo 0 è la medesima per tutte.

Tabella 4.2.1: Caratteristiche chimico-fisiche reattori di coltivazione al tempo 0.

TEMPO 0	
ABS 680 (TQ)	0,348
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg/L)	143,00
NO <sub>3</sub> -N (mg/L)	0,00
NO <sub>2</sub> -N (mg/L)	0,00
PO <sub>4</sub> -P (mg/L)	5,96
N/P	24
COD (TQ) (mg/L)	322

#### 4.2.1.1 Condizioni operative: pH e temperatura

Gli andamenti di pH e temperatura nel corso della prova sono riportati in figure 4.2.1 e 4.2.1. Essendo stata la misura della temperatura sempre pressoché identica per tutti i reattori, per questo parametro è riportato un solo profilo con la media delle temperature rilevate.



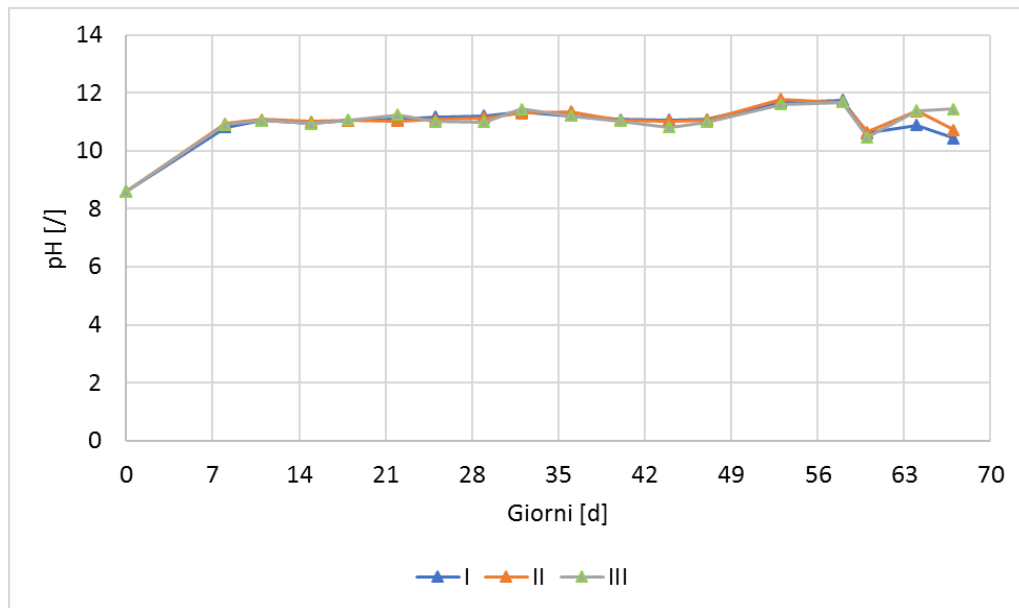


Figura 4.2.1: Andamento temporale del pH nei reattori di crescita.

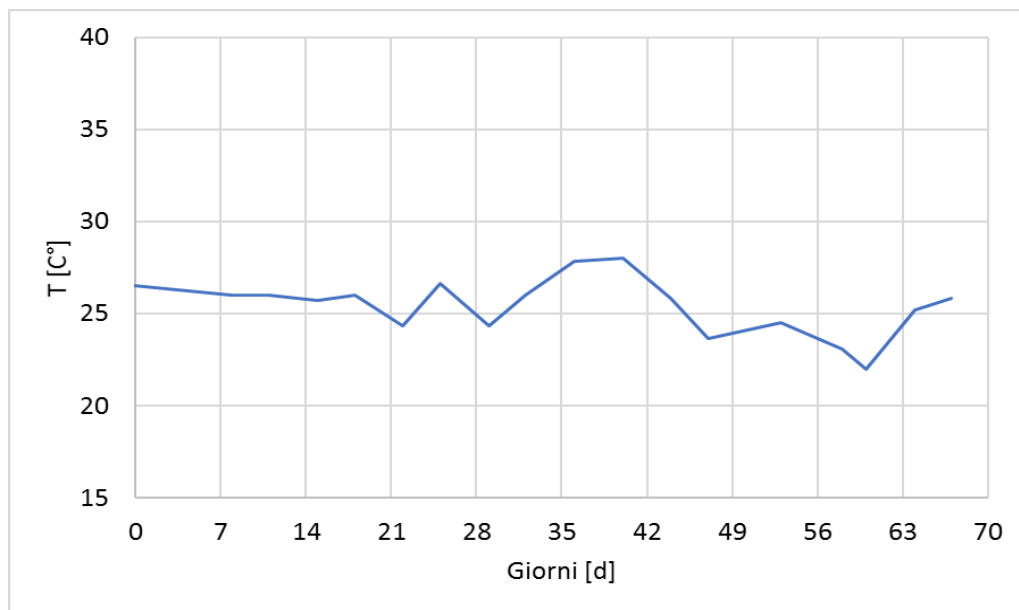


Figura 4.2.2: Andamento temporale della temperatura nei reattori di crescita.

Le considerazioni sul grafico di figura 4.2.2 relativo alla temperatura sono le medesime fatte in precedenza per il grafico omologo della prova in semicontinuo di crescita su digestato (si rimanda al paragrafo 4.1.2.1). Per quanto riguarda il pH, invece, si può notare in figura 4.2.1 che esso si è mantenuto lungo tutta prova attorno al valore 11, senza grosse variazioni.

---

#### 4.2.1.2 Parametri di crescita: assorbanza e torbidità

Per monitorare la crescita e lo sviluppo di biomassa all'interno dei reattori vi sono diversi parametri, il più comodo è l'assorbanza ottica (Su et al., 2016). Di tutto lo spettro, la lunghezza d'onda più significativa è quella di 680 nm poiché ad essa è associato il massimo assorbimento di luce da parte della clorofilla. L'assorbanza a 680 nm fornisce dunque, in maniera indiretta, un'indicazione sulla presenza di alghe nella sospensione ed è proporzionale alla loro concentrazione nella stessa.

A titolo esemplificativo, è riportata la figura 4.2.3 contenente i grafici dell'intero spettro di assorbanza della colonna I, II e III, misurati il giorno 23/03/2017, ovvero dopo 18 giorni di sperimentazione.

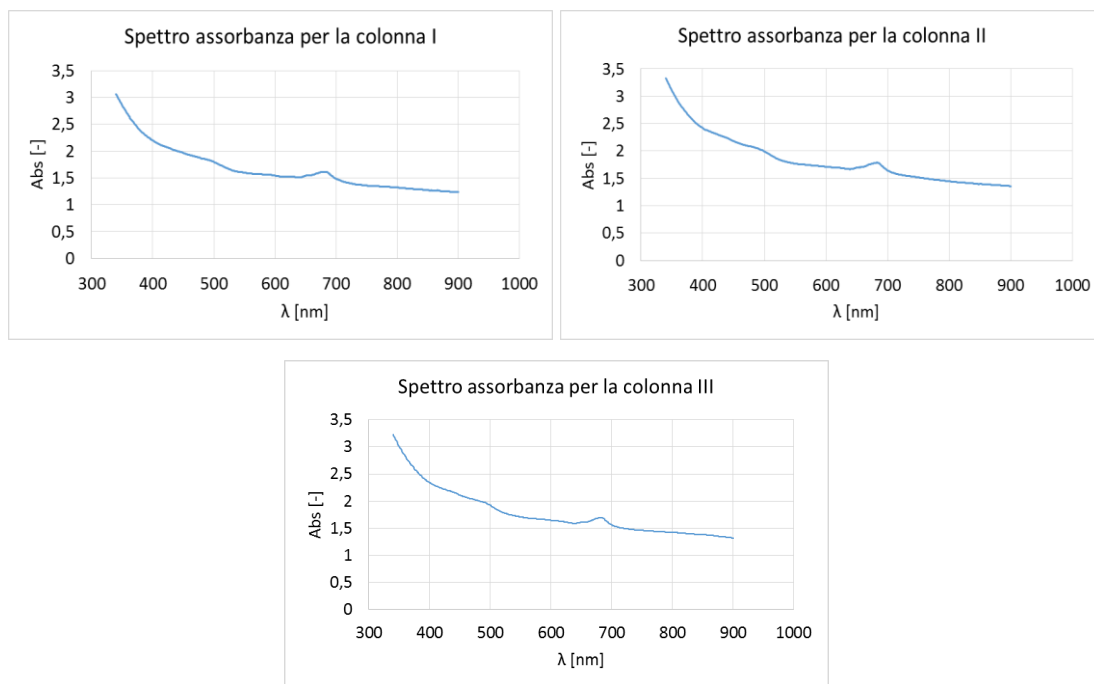


Figura 4.2.3: Spettro assorbanza della colonna I, II, III tra 340 e 900 nm.

Come si può notare dalla figura 4.2.3, vi è un picco proprio in corrispondenza della lunghezza d'onda pari a 680 nm, rappresentativo della presenza algale nel medium di crescita.

---

Come illustrato nella tabella 4.2.1, tutti i reattori di coltivazione sono stati avviati con un valore di assorbanza all'interno del medium pari a 0.348. Per tutte le colonne si è assistito ad una crescita netta da parte della popolazione microalgale, confermata dalle misurazioni di assorbanza acquisite nel tempo lungo tutta la sperimentazione, di cui è stato riportato un grafico riassuntivo in figura 4.2.4.

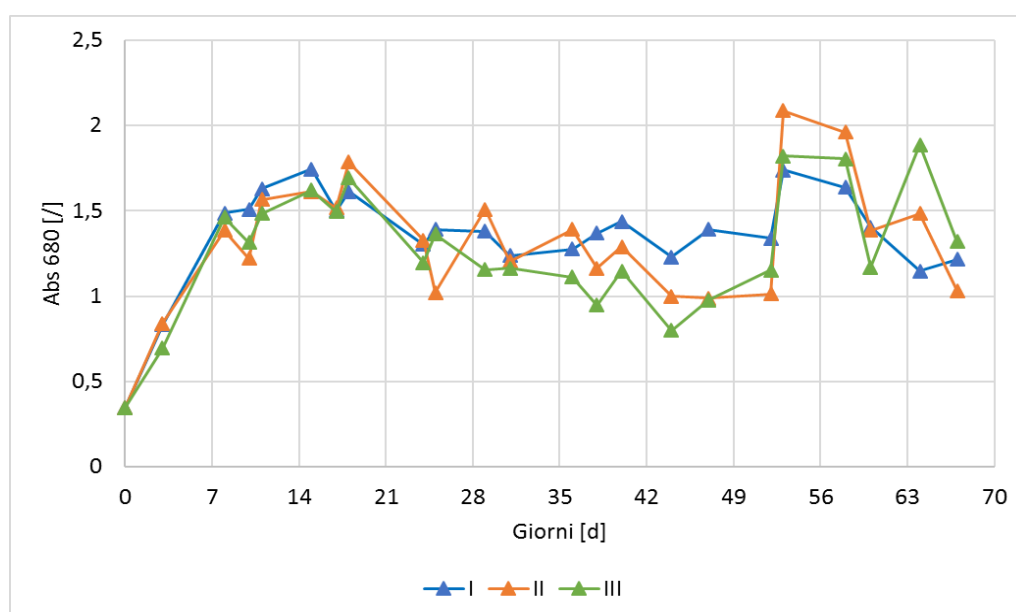


Figura 4.2.4: Andamento temporale del valore di assorbanza per le colonne di crescita.

Dal grafico in figura 4.2.4, si può notare come nei primi 8 giorni di sperimentazione la popolazione microalgale si sia sviluppata in maniera notevole, con l'assorbanza che cresce dal valore di 0.348 rilevato al tempo 0 arrivando a valori intorno all'1.5 per tutte le colonne. Per questo motivo, stando a questo parametro di crescita, è possibile affermare che la configurazione adottata ha consentito lo sviluppo e il mantenimento della comunità algale.

Un altro aspetto interessante che si può dedurre dal grafico 4.2.4 è che le tre repliche hanno avuto andamenti temporali simili. Andamenti in crescita si corrispondono praticamente sempre lungo tutta la sperimentazione. I tre

---

reattori possono dunque essere considerati come repliche. Questo aspetto tuttavia verrà indagato in maniera più approfondita attraverso appositi test statistici, attraverso i quali sarà possibile trarre una conclusione generale sull'effettiva uguaglianza dei tre replicati (Si rimanda al paragrafo 4.2.1.10).

Dal giorno 40 in poi si è assistito per tutte e tre le colonne ad un calo di assorbanza a cui è seguito un andamento oscillante e discontinuo. Tale comportamento potrebbe essere stato causato da un calo di temperatura, presentatosi in quei giorni.

Come si può notare dalla figura 4.2.2, dal giorno 40 in poi vi è stata una diminuzione netta della temperatura, con un picco minimo in corrispondenza del giorno 60. La temperatura in media è passata da più di 26 °C a 23 °C dopo il giorno 40. Questo calo potrebbe aver influito negativamente sul metabolismo delle microalghe. È infatti noto che il tasso di crescita massimo è in funzione della temperatura e per una popolazione di *Chlorella spp* è stato sperimentato avere un ottimo in corrispondenza di temperature tra 28 e i 35 °C. Al di fuori di questo range ottimale, il tasso specifico di crescita si riduce, portando quindi ad un rallentamento generale della cinetica (Babel et al., 2001). Tale rallentamento, in un reattore in semi-continuo, porta ad un calo del numero di alghe, quantificato dai valori di assorbanza più bassi.

In opposizione al trend negativo assunto dall'assorbanza dal giorno 40 in poi, al giorno 53 è stato registrato un aumento dell'assorbanza. Tale controtendenza è dovuta probabilmente al fatto che il giorno 53, corrispondente alla data 27/04/2017, è occorso a seguito del ponte del 25 Aprile, occasione per cui l'ateneo è rimasto chiuso. A causa di ciò, i reattori sono stati senza ricambio di substrato per circa una settimana. L'aumento locale del tempo di ciclo ha permesso alle microalghe di disporre di un maggiore tempo di contatto coi nutrienti del refluo, il che ha comportato un

---

incremento della concentrazione di alghe, confermato dagli alti valori di assorbanza. Tali valori si sono mantenuti alti anche durante la misurazione successiva, probabilmente perché avvenuta 5 giorni dopo a causa del ponte del 1 Maggio (quindi non dopo gli usuali 4 giorni). Per rispettare l'HRT i volumi di ricambio sono stati adeguati, in modo da garantire ugualmente un ricircolo totale di 150 ml in 10 giorni. Dopo questa discontinuità nei valori di assorbanza, tale parametro ha subito un calo, dovuto probabilmente alla temperatura che è sempre rimasta intorno ai 22 °C in quei giorni. La temperatura non deve aver influito nelle misurazioni del 27/04 e del 2/05, nonostante fosse più bassa rispetto alla media dei giorni precedenti, poiché le microalghe, avendo avuto maggior tempo di contatto con il substrato, non hanno risentito particolarmente della cinetica rallentata dalla diminuzione di temperatura.

Un altro parametro significativo per valutare la numerosità della popolazione microalgale è la torbidità. Nella figura 4.2.5 è stato riportato il grafico contenente l'andamento temporale di tale parametro durante il corso della sperimentazione.

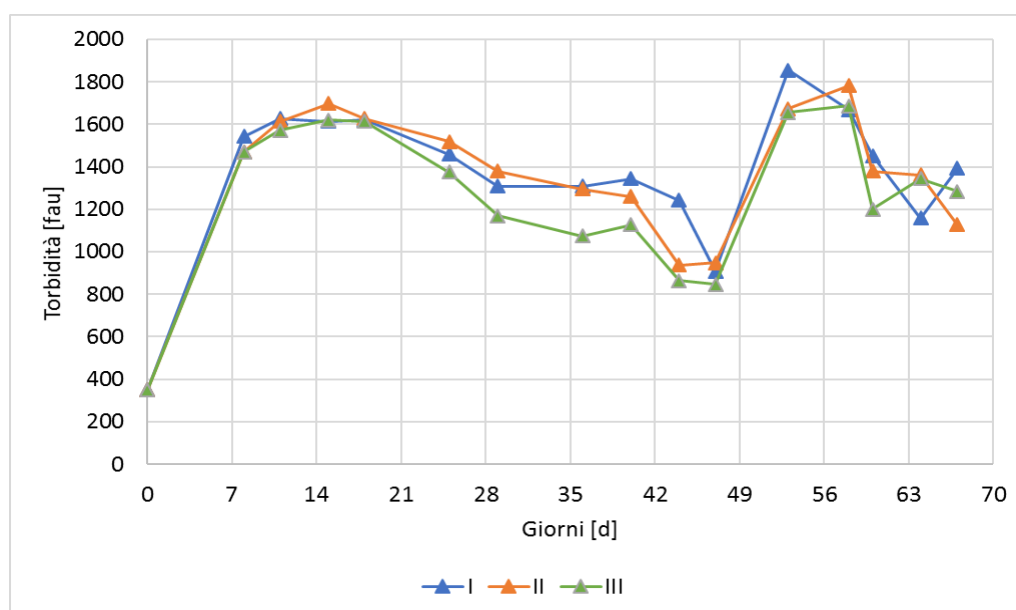


Figura 4.2.5: Andamento temporale della torbidità per tutti i reattori di crescita.

---

Dal grafico in figura 4.2.5 si può evincere come l'andamento della torbidità rispecchi piuttosto fedelmente l'andamento dell'assorbanza: i picchi di crescita o decadimento si presentano contemporaneamente per entrambi i parametri. Tali affermazioni sono confermate dai risultati ottenuti effettuando una correlazione tra i valori di assorbanza e i valori di torbidità. Nella figura 4.2.6 è stato riportato il grafico rappresentante i risultati della correlazione.

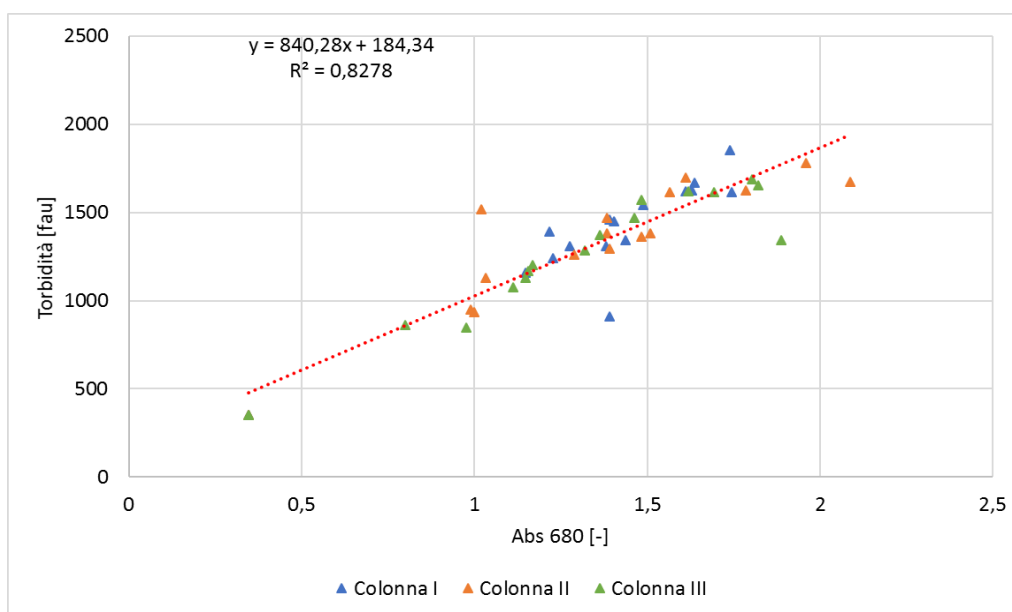


Figura 4.2.6: Correlazione tra assorbanza (680 nm) e torbidità per tutti i reattori.

Come indicato in figura 4.2.6, la correlazione di tutte le serie di dati relative alle tre colonne è stata caratterizzata da un valore di  $R^2$  piuttosto elevato, pari a 0.83. Dato che la correlazione tra i due parametri è risultata soddisfacente, per motivi pratici, verrà adottato come unico parametro di crescita l'assorbanza, il quale è considerato solitamente il parametro più accurato per stimare la concentrazione di microalghe in una sospensione (Su et al., 2016).

### 4.2.1.3 Produzione di biomassa

Un ulteriore parametro indicativo riguardo la crescita e lo sviluppo della popolazione microalgale è l'analisi dei solidi sospesi, sia totali (TSS) che volatili

---

(VSS). Questi sono entrambi parametri che misurano il tenore di solidi all'interno di una sospensione, attraverso la metodologia descritta nel capitolo 3.4.1. Dato che i VSS quantificano la sola biomassa organica, dunque esclusivamente le componenti algali e batteriche, questo parametro verrà discusso in modo più approfondito. L'andamento dei solidi sospesi volatili (VSS) nel corso della sperimentazione è riportato in figura 4.2.7.

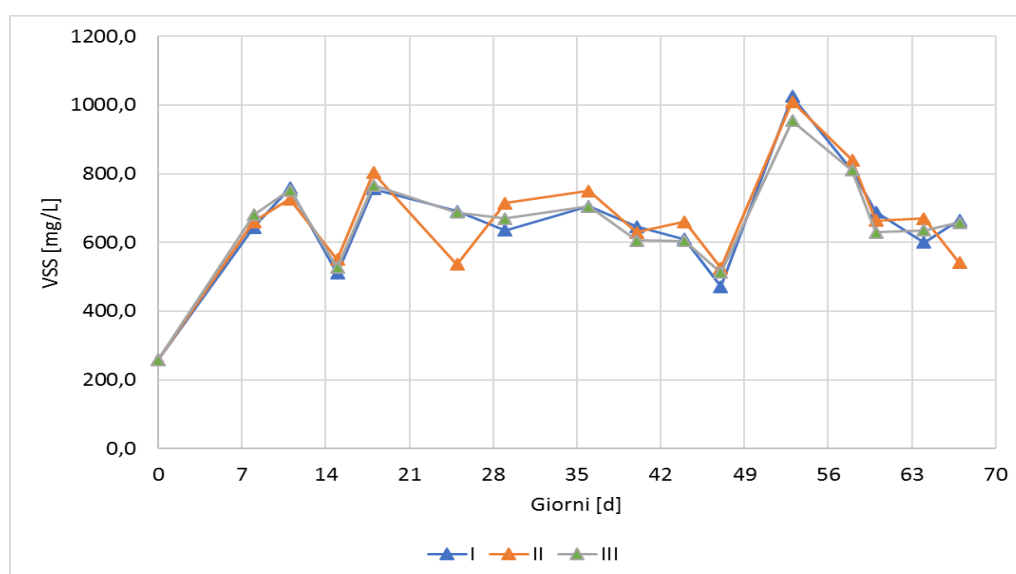


Figura 4.2.7: Andamento temporale dei VSS per nei reattori di crescita.

Come si può notare dal grafico in figura 4.2.7, i profili di concentrazione di biomassa, lungo l'intero periodo della sperimentazione, sono estremamente simili per tutti e tre i reattori. Questo avvalorava le considerazioni fatte precedentemente sulla replicabilità delle tre colonne.

La metodologia di sperimentazione prevedeva una misurazione a settimana del tenore di solidi volatili, tuttavia, per disporre di un campione più numeroso, è stata analizzata la correlazione tra i valori sia di assorbanza che di torbidità con i valori di VSS. A partire da questa analisi, è stato ricavato un modello di regressione in grado di stimare i valori di VSS tramite i valori di assorbanza o torbidità, a seconda del grado di correlazione tra i parametri. Il procedimento è stato riportato nel dettaglio all'interno dell'appendice B.1.

Nella figura 4.2.8 è stata riportata la correlazione tra i valori di VSS e i valori di assorbanza per tutte le colonne.

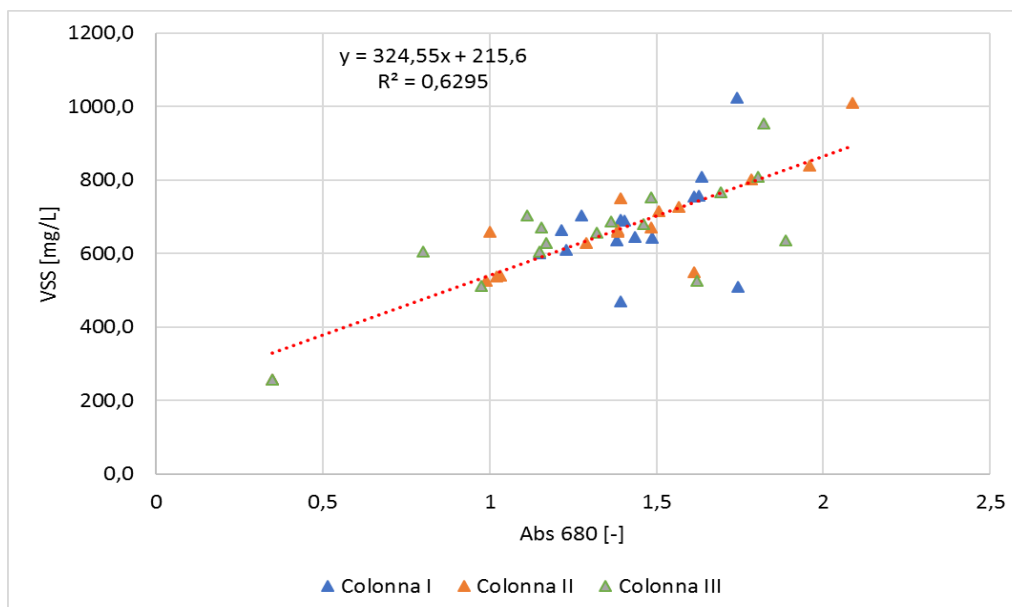


Figura 4.2.8: Correlazione tra i valori di assorbanza e i valori di VSS per ciascun reattore nel corso della prova.

Come indicato nella figura 4.2.8, la correlazione tra i valori di assorbanza e i valori di VSS per tutte e tre le colonne è stata caratterizzata da un  $R^2$  pari a 0.63. Nonostante il grado di correlazione sia risultato più basso rispetto a quello ottenuto correlando assorbanza e torbidità, tuttavia esso è stato considerato accettabile e di conseguenza è stato possibile assumere come unico parametro di crescita il valore di assorbanza.

Terminata la prova, sono stati ricavati i valori di produzione di biomassa, i quali sono stati riportati nella tabella 4.1.2.

Tabella 4.2.2: Ratei di produzione di biomassa, espressi come mgVSS/L/d.

	Parametro	Rateo [mg/L/d]
<b>COLONNA I</b>	VSS	58,7 ± 35,7
<b>COLONNA II</b>	VSS	54,8 ± 37,3
<b>COLONNA III</b>	VSS	56,9 ± 29,5



---

#### 4.2.1.4 Evoluzione della popolazione microalgale

Attraverso le conte microalgali è stata valutata l'evoluzione della popolazione, in termini quantitativi. Nella figura 4.2.9 è stata riportata la stima del numero di microalghe presenti nei reattori.

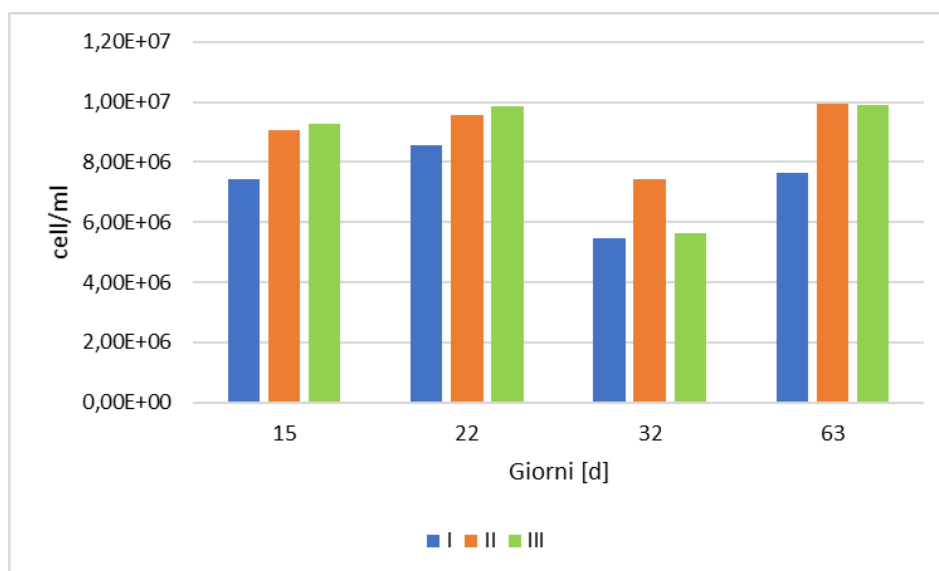


Figura 4.2.9: Conte microalgali lungo il corso della sperimentazione.

La figura 4.1.9 conferma il trend osservato nei grafici dei paragrafi 4.2.1.2-3. Si può infatti notare come circa a metà della sperimentazione, in corrispondenza dell'abbassamento del valore dell'assorbanza, siano state rilevate meno microalghe nei reattori di crescita. Le microalghe presenti sono risultate essere esclusivamente al genere *Chlorella*.

#### 4.2.1.5 Rimozione sostanze azotate

Anche in questa sperimentazione l'aspetto più interessante è quello di studiare la capacità di assimilazione dei nutrienti contenuti all'interno del refluo. Sono qui riportate le analisi qualitative dell'andamento delle sostanze azotate nel corso della sperimentazione.

---

### Azoto ammoniacale

L'ammonio ( $\text{NH}_4^+$ ) è il nutriente più presente nel refluo utilizzato per questa sperimentazione. La sua concentrazione presente nel refluo di tipo WW1 è di 180 mgN/L, come riportato nella tabella 3.1.2.

L'andamento delle concentrazioni di ammonio nella sospensione all'interno delle colonne di crescita lungo il periodo della sperimentazione è stato riportato nel grafico contenuto nella figura 4.2.10.

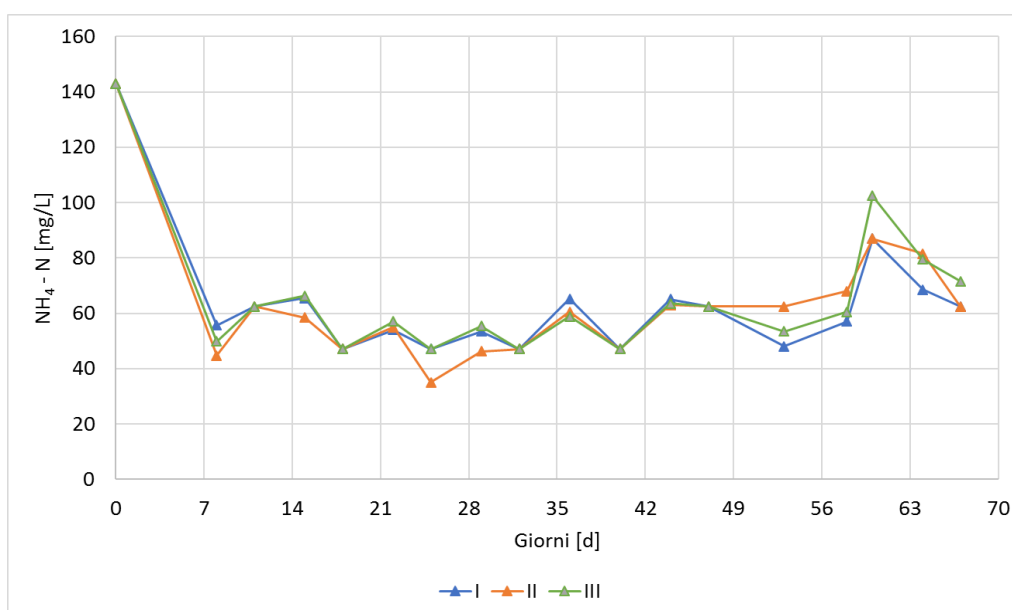


Figura 4.2.10: Andamento temporale delle concentrazioni di  $\text{NH}_4^+$  nei reattori di crescita.

Analizzando il grafico di figura 4.2.10 si può notare che gli andamenti delle concentrazioni sono simili per tutti i reattori. Tale considerazione è stata analizzata tramite un opportuno test statistico (si rimanda al paragrafo 4.2.1.10).

Nella prima settimana di sperimentazione si è assistito ad un calo della concentrazione di ammonio, dovuto al rapido sviluppo della popolazione microalgale. La crescita, in questa prima fase, è veloce grazie alla grande disponibilità di nutrienti presenti nel medium di crescita. Conclusa questa prima fase, lo sviluppo della popolazione microalgale entra in fase stazionaria.

---

Allo stesso modo, anche il consumo di nutrienti assume un comportamento stazionario, testimoniato anche dal grafico: dal giorno 11 in poi, escluso il giorno 60, le concentrazioni si assestano attorno al valore di 60 mg/L per tutti e tre i reattori di crescita.

In corrispondenza del giorno 60 della sperimentazione, è stato misurato un picco di concentrazione per tutte e tre le colonne. Tale discontinuità è strettamente collegata al calo di assorbanza misurato in corrispondenza dello stesso giorno di sperimentazione, discusso nel capitolo 4.2.1.2. Il rallentamento della cinetica metabolica delle microalghe, a causa della diminuzione della temperatura, ha comportato un accumulo di ammonio, poiché non assimilato dai microrganismi. Nei giorni successivi, grazie ad un innalzamento della temperatura, le concentrazioni di ammonio sono nuovamente calate, riportandosi a valori simili riscontrati in precedenza.

### **Nitrito e Nitrato**

La concentrazione di nitrito ( $\text{NO}_2$ ) nel refluo in alimentazione è nulla. La sua comparsa nella sospensione, dunque, è dovuta a processi di nitrificazione. La produzione di nitrito avviene ad opera di batteri ammonio-ossidanti (AOB) i quali, tramite il consumo dell'ossigeno disciolto presente nel medium di crescita, ossidano l'ammonio a nitrito. Il processo di nitrificazione è stato descritto in maniera più approfondita in appendice C.1.

Gli andamenti dei valori di concentrazione di nitrito lungo la durata della prova sono stati riportati nella figura 4.2.11.

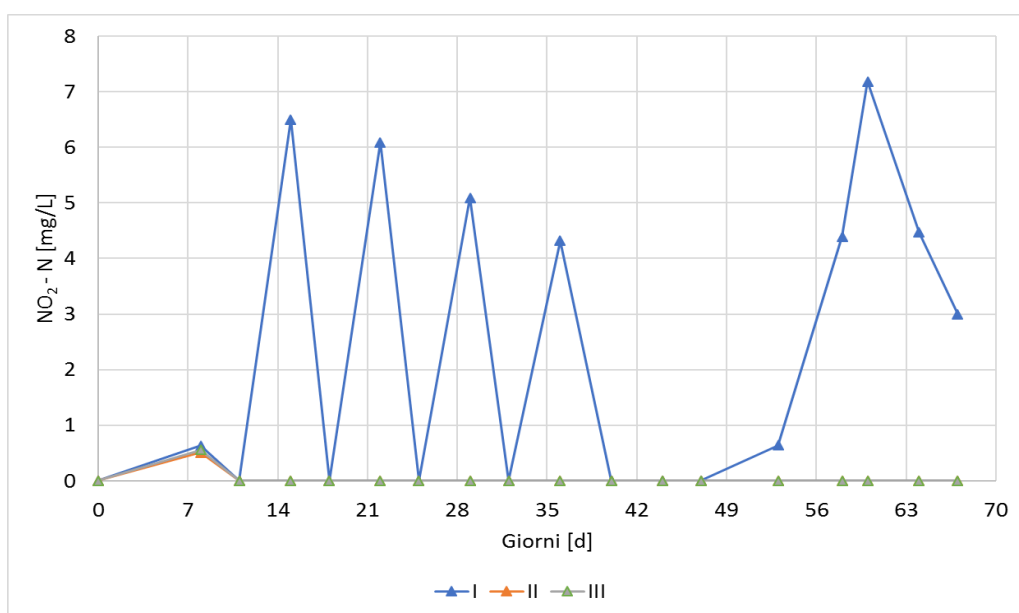


Figura 4.2.11: Andamenti temporali delle concentrazioni di nitrito nei reattori di crescita.

Come si può notare dal grafico in figura 4.2.11, le concentrazioni di nitrito sono risultate diverse nei reattori. Nelle colonne di crescita II e III, la concentrazione di nitrito, esclusi i primi giorni di sperimentazione, sono sempre state nulle. La rilevanza del processo di nitrificazione in queste colonne può quindi essere considerato trascurabile. L'andamento delle concentrazioni di NO<sub>2</sub> per le colonne II e III è estremamente simile, per cui è possibile affermare che, sotto questo parametro, il comportamento delle colonne è identico.

Nella colonna I, diversamente dalle altre due, sono state registrate concentrazioni di nitrito non nulle, seppur basse, lungo la sperimentazione. Dal giorno 10 al giorno 40, è stato riscontrato un andamento particolare delle concentrazioni di NO<sub>2</sub>: questo veniva prodotto, seppur in quantità modeste (5 mg/L circa), a fine ciclo, dopodiché ad inizio ciclo veniva rimosso, registrando concentrazioni nulle. Intorno al giorno 50 della sperimentazione è stato misurato un accumulo crescente di nitrito, con picco in corrispondenza del giorno 60. Tale fenomeno è strettamente legato al calo di assorbanza

---

registrato in quei giorni, dovuto ad un calo di temperatura. Nei giorni successivi, con un incremento della temperatura, l'assorbanza è cresciuta e le concentrazioni di nitrito sono nuovamente calate.

Per quanto riguarda il nitrato ( $\text{NO}_3$ ), esso non è presente nel refluo suinicolo. Di conseguenza, come per il nitrito, l'eventuale presenza di concentrazioni di nitrato è stata attribuita all'attività batterica di nitrificazione, nello specifico ai batteri NOB nitrito-ossidanti che ossidano l' $\text{NO}_2$  a  $\text{NO}_3$ .

L'andamento delle concentrazioni del nitrato durante la sperimentazione è riportato nella figura 4.2.12.

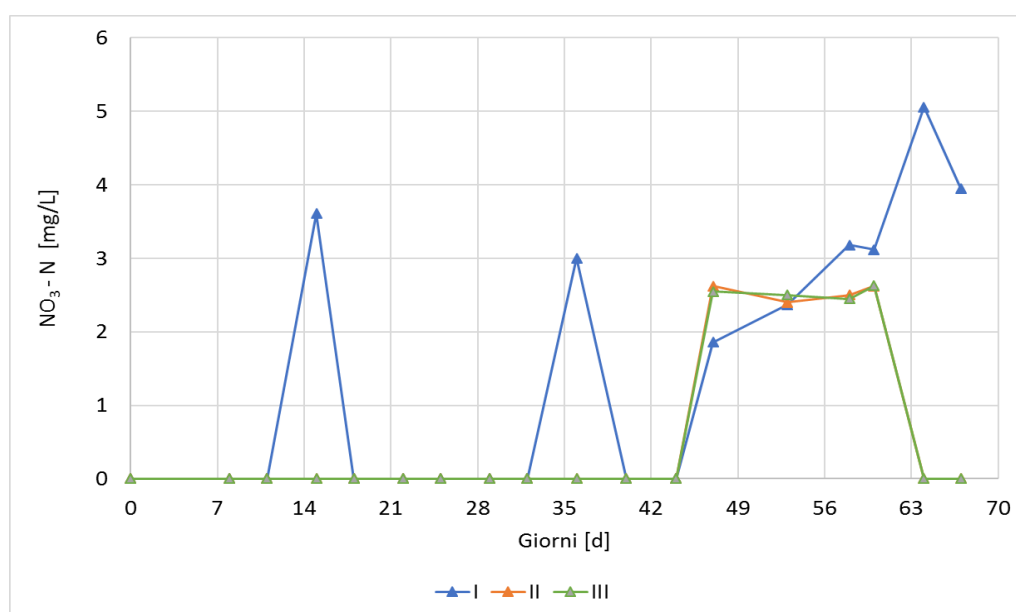


Figura 4.2.12: Andamento delle concentrazioni di nitrato nei reattori di crescita.

Dal grafico si può notare come gli andamenti delle concentrazioni di  $\text{NO}_3$  siano diversi nei tre reattori. Le colonne II e III nei primi 47 giorni di sperimentazione hanno riportato valori nulli di concentrazione di nitrato. Tra il giorno 47 e il giorno 60, invece, sono state misurate concentrazioni dell'ordine di 2,5 mg/L circa, in entrambe le colonne. Tale produzione è stata riscontrata in corrispondenza dei giorni in cui vi è stato il calo di temperatura, la cui influenza sul sistema biologico è stata discussa nei capitoli precedenti.

---

Nello stesso periodo i ricambi di alimento sono stati sospesi a causa della chiusura dell'ateneo per feste nazionali (24/04 e 01/05), come descritto precedentemente al capitolo 4.2.1.2. La ripresa delle tempistiche di ricambio standard della sperimentazione unita ad un incremento di temperatura, ha comportato, dal giorno 60 in poi, un calo totale delle concentrazioni di  $\text{NO}_3$ , per cui si sono registrati valori pari a zero. Le concentrazioni di nitrato misurate nella colonna I sono risultate, come per il nitrito, differenti rispetto alle altre colonne. L'attività batterica all'interno di questo reattore, come discusso per il nitrito, è risultata più presente: nei giorni 15, 36 e da 47 in poi, infatti, sono state riscontrate basse concentrazioni di  $\text{NO}_3$ .

Complessivamente, le basse concentrazioni di nitrito e del nitrato osservate suggeriscono che: (i) i batteri nitrificanti non hanno giocato un ruolo fondamentale nella trasformazione dell'azoto ammoniacale; oppure (ii) che il nitrito ed il nitrato, se prodotti dai batteri nitrificanti, siano stati efficacemente utilizzati dalle microalghe per assimilazione; o, infine, (iii) che il nitrito o nitrato prodotti dai nitrificanti siano stati contestualmente rimossi per denitrificazione. La seconda ipotesi è poco probabile dato che la letteratura scientifica suggerisce che l'azoto ammoniacale è la forma preferibile per l'assimilazione da parte delle microalghe (Arumugam et al., 2013). Per quanto riguarda la terza ipotesi, esse potrebbe risultare probabile sono nel caso in cui nei reattori si siano alternate condizioni aerobiche ed anaerobiche, alternanza potenzialmente ottenibile grazie a cicli luce e buio. Sono state quindi misurate le concentrazioni di ossigeno disciolto nei tre reattori in continuo per 48h e sono riportate in figura 4.2.13.

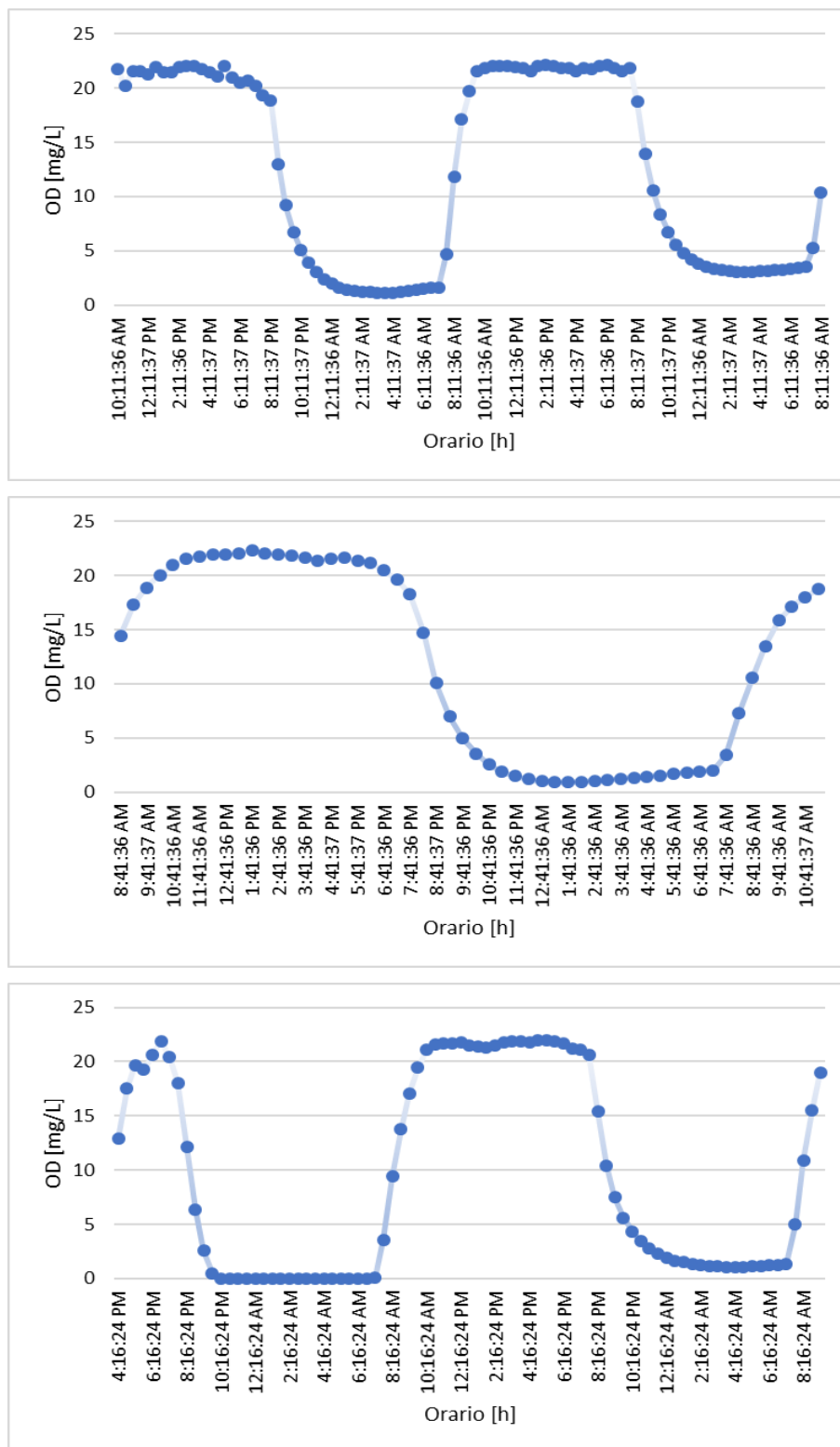


Figura 4.2.13: Profili misurazione in continuo di ossigeno disciolto nei reattori di crescita. Le misurazioni nella colonna II (seconda a partire dall'alto) sono durate 24h anziché 48h. Le misure sono riferite ai giorni 64-65 e il loro inizio è coinciso per tutte con l'inizio del ciclo.

---

Dagli andamenti riportati in figura 4.2.13 si deduce che condizioni di anossia si sono presentate durante la sperimentazione. Si può infatti notare come le concentrazioni di ossigeno disciolto nei reattori tendano ad essere basse, ma raramente nulle durante le ore notturne. La terza ipotesi non può dunque essere scartata, tuttavia i profili di ossigeno disciolto suggeriscono che il processo di nitrificazione/denitrificazione non possa aver giocato un ruolo determinante.

Assumendo dunque più probabile la prima ipotesi, ci si chiede il motivo per cui i batteri nitrificanti non si siano sviluppati nei reattori, pur realizzandosi in essi condizioni apparentemente per loro favorevoli. Vi sono nei reattori, infatti, sia azoto ammoniacale che ossigeno, prodotto per fotosintesi, principali substrati di crescita per questi batteri. Possono in merito essere fatte due principali ipotesi: sussistono condizioni limitanti oppure inibenti.

Per quanto riguarda possibili fenomeni di inibizioni questi potrebbero essere associati ad alti livelli di ammoniaca libera, ad altri elementi presenti nel refluo alimentato (metalli, organici, sali), oppure all'elevata irradianza.

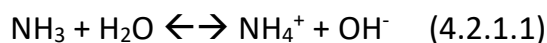
L'effetto di inibenti specifici associati al refluo è improbabile sia perché questi sarebbero stati presenti in egual misura durante tutta la sperimentazione in disaccordo con il fatto che la nitrificazione ha mostrato fasi più o meno attive, sia perché lo stesso refluo è trattato con successo un impianto di nitrificazione/denitrificazione convenzione presso l'azienda agricola da cui il refluo è stato campionato.

Anche l'inibizione per elevati livelli di irradianza è esclusa. Nelle prove di crescita su digestato, infatti, si è operato con analoghi livelli di PAR e in queste sperimentazioni la nitrificazione è avvenuta con continuità lungo tutto il periodo di analisi.



---

Resta dunque l'ipotesi che l'inibizione sia dovuta alle alte concentrazioni di ammoniaca libera. Essa è un gas solubile che si trova in acqua in equilibrio con lo ione ammonio  $\text{NH}_4^+$ , come mostrato nella seguente reazione 4.2.1.1:



Alte temperature e pH basici possono comportare la formazione di ammoniaca libera (Kim et al., 2006). Come si può notare nelle figure 4.2.1 e 4.2.2 alti valori di temperatura e pH elevati sono stati misurati lungo tutta la sperimentazione.

La concentrazione di ammoniaca libera può essere stimata con la formula seguente:

$$C_{\text{NH}_3} \left[ \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right] = \frac{C_{\text{NH}_4} \left[ \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right] * 10^{\text{pH}}}{10^{\text{pH}} + \exp\left(\frac{6344}{T[^\circ\text{C}] + 273,15}\right)} \quad (4.2.1.2)$$

Le concentrazioni inibenti di  $\text{NH}_3$  sono diverse per le due famiglie di batteri nitrificanti: per gli AOB si ha un'inibizione per concentrazioni intorno ai 10-150 mg/L, mentre per gli NOB sono più basse, intorno ai 10 mg/L (Beccari et al., 1993). Tali concentrazioni inibenti tuttavia non sono assolute, bensì variano a seconda dei contesti biologici specifici. Considerando che il valore di pH è variato tra 10,5 e 11,5, che la temperatura è variata tra 22°C e 29°C e la concentrazione ad inizio ciclo dell'azoto ammoniacale è stata tra 87 mgN- $\text{NH}_4/\text{L}$  e 125 mgN- $\text{NH}_4/\text{L}$ , si può calcolare che l'ammoniaca libera è variata tra 81 mgN- $\text{NH}_3/\text{L}$  e 124 mgN- $\text{NH}_3/\text{L}$ . Queste concentrazioni, confrontate con gli intervalli di potenziale inibizione suggeriti in letteratura, lasciano supporre che sia molto probabile che vi sia un'inibizione da parte dell'ammoniaca libera.

L'alternativa all'inibizione è che vi siano delle risorse limitanti. Tra queste le principali indiziate sono quelle condivise con le microalghe come il fosforo e l'anidride carbonica. Questa alternativa sembra essere coerente con il fatto che i momenti in cui si è osservata la maggior attività nitrificante ha

---

tipicamente coinciso con una contestuale minor efficienza di crescita delle microalghe (abbassamento di temperatura, cicli più lunghi in cui la fase finale del ciclo può aver coinciso con una ridotta velocità di crescita delle microalghe). È stato riportato da uno studio di De Godos, nel 2010, che vi è una possibilità che in presenza di CO<sub>2</sub> limitante, microalghe e batteri nitrificanti competano con conseguenze negative sulla crescita di entrambi i microrganismi. Le informazioni per ora raccolte non consentono ancora di trarre una conclusione certa.

#### 4.2.1.6 Rimozione fosforo e COD

##### Fosforo

La concentrazione di fosforo presente all'interno del refluo in alimentazione ai reattori di crescita è risultata pari a 2 mg/L. Un valore così basso di fosforo unito ad una grande concentrazione di ammonio presente nel flusso ha comportato un valore del parametro N/P del substrato alimentato piuttosto elevato, pari circa a 91. Nelle figure 4.2.14 e 4.2.15 sono riportati sia gli andamenti delle concentrazioni di fosforo che l'andamento del rapporto N/P lungo la durata della prova.

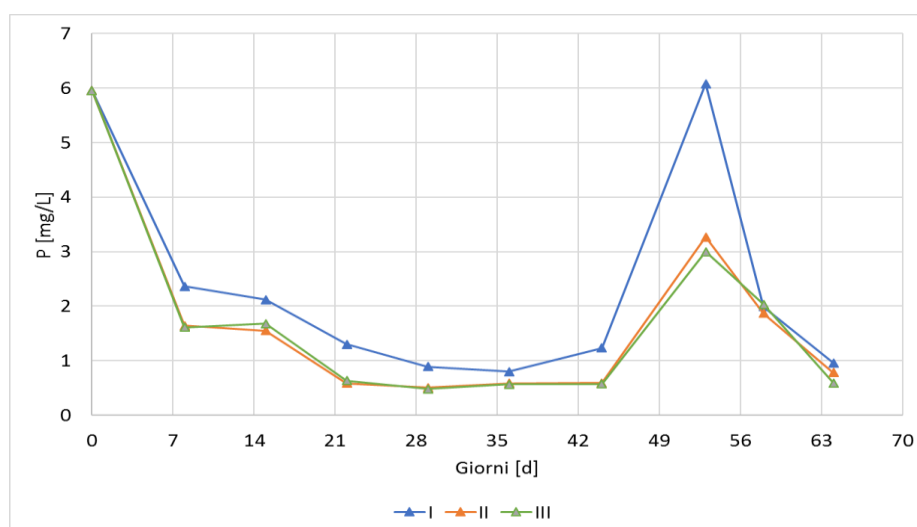


Figura 4.2.14: Andamento temporale delle concentrazioni di fosforo nei reattori di crescita.

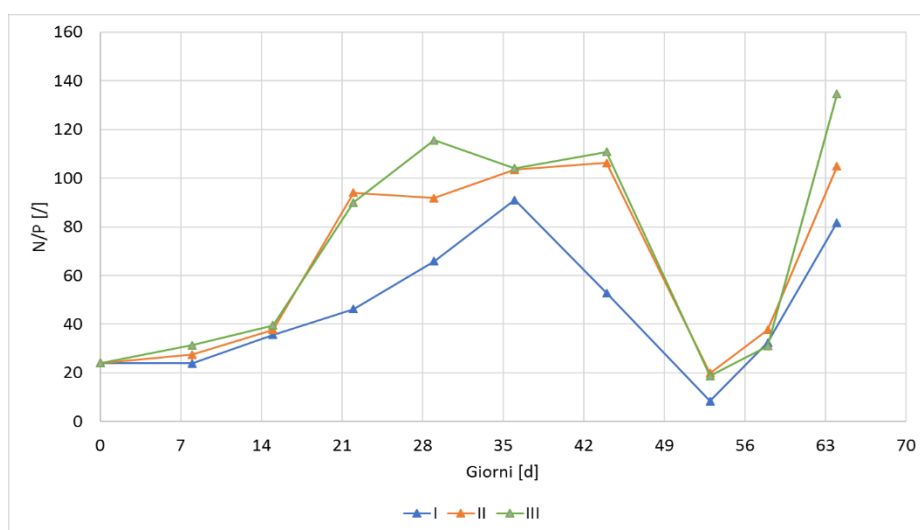


Figura 4.2.15: Andamento temporale del rapporto N/P nei reattori di crescita.

Analizzando il grafico di figura 4.2.14, si può notare come le concentrazioni di fosforo siano sempre risultate piuttosto basse, intorno ai 2 mg/L per tutte le colonne. Come testimoniato dal grafico, si ha avuto una rimozione effettiva di fosforo, fino a valori intorno a 1 mg/L nell'ultimo giorno di sperimentazione, per tutti i reattori. Come per l'ammonio, anche per il fosforo vi è stata una forte assimilazione nei primi 8 giorni di sperimentazione. Questo fenomeno, come spiegato in precedenza, è probabilmente dovuto ad una grande disponibilità di fosforo iniziale, il quale è quindi stato assimilato dalle microalghe. È noto che le microalghe sono anche in grado di assimilare più fosforo rispetto a quanto stechiometricamente necessario. Si tratta del fenomeno detto di *luxury uptake* che consente alle alghe di accumulare scorte di fosforo per fronteggiare successivi momenti di carenza (Powell et al., 2008). Un simile fenomeno non è noto per i batteri nitrificanti.

Dopo i primi giorni di sperimentazione le concentrazioni di fosforo si sono assestate attorno al valore di 1 mg/L e si sono mantenute pressoché costanti. Nonostante i bassi contenuti di fosforo dell'alimento (2 mg/L) la crescita non è risultata ostacolata, pertanto, anche in condizioni di alimentazione con un

---

refluo caratterizzato da un elevato rapporto N/P, è stato osservato uno sviluppo della popolazione microalgale.

La rimozione di fosforo, in questo tipo di contesto biologico, può avvenire anche per il fenomeno di precipitazione, il quale compare in condizioni di elevato pH (Cai et al., 2013).

Il picco di concentrazione di fosforo in corrispondenza del giorno 53 della sperimentazione, è, probabilmente, dovuto ad un errore di sovrastima in sede di analisi. Nei giorni successivi è riportato a valori più bassi e in linea con le registrazioni precedenti.

Il rapporto N/P delle colonne, inizialmente pari a 24, ha subito un forte incremento, in tutti i reattori, a causa della riduzione delle concentrazioni di fosforo, assestandosi attorno a valori mediamente pari a 46 per la colonna I, 65 e 70 per le colonne II e III. L'andamento del rapporto N/P non sembra aver influito particolarmente sulla crescita microalgale. Tale assunzione è stata verificata tramite opportuni test statistici, discussi nel capitolo 4.2.1.10.

Per quanto riguarda l'effetto che la disponibilità del fosforo può aver avuto nei confronti del processo di nitrificazione, si può notare che il reattore I in cui la concentrazione di P è risultata superiore a quella dei reattori II e III è anche stato il reattore in cui si è osservata sporadicamente nitrificazione. Inoltre, la fase di ridotta attività algale ha coinciso con maggiori concentrazioni di fosforo ed anche maggiori produzioni di nitriti e di nitrati.

### **COD**

Il tenore di COD nel flusso in alimentazione, come riportato nella tabella 3.1.1, è pari a 677 mg/L. L'andamento dei valori di concentrazione di COD, all'interno dei reattori per la durata della sperimentazione, è stato riportato in figura 4.2.16.

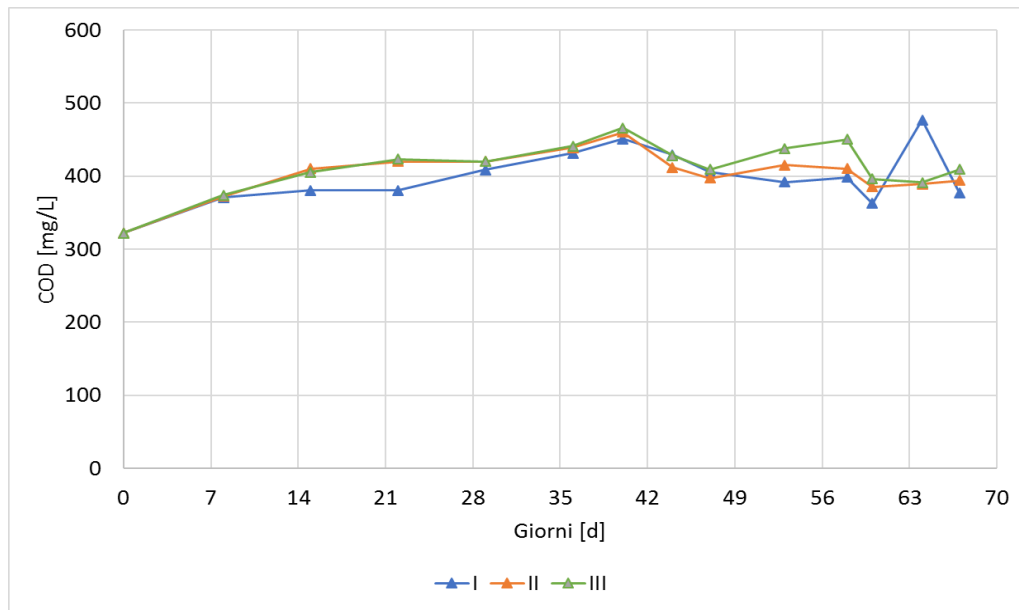


Figura 4.2.16: Andamento delle concentrazioni di COD nei reattori di crescita.

Dal grafico di figura 4.2.16 si evince come l'andamento delle concentrazioni di COD sia piuttosto simile in tutti e tre i reattori. Lungo il corso della sperimentazione, l'andamento delle concentrazioni si è stabilizzato, entrando nella fase stazionaria. Plausibilmente, il COD in alimentazione del refluo è stato degradato fornendo la  $CO_2$  necessaria per la crescita delle microalghe.

Non è tuttavia da escludersi che le microalghe possano aver contribuito alla rimozione del COD attraverso la crescita mixotrofica. Come indicato negli studi di Mata et al. (2009), la specie *Chlorella vulgaris* (la più presente nei reattori di crescita in questa prova, si veda capitolo 4.2.1.4) può svilupparsi anche in condizioni di mixotrofia. Le variazioni di tutti i parametri in gioco possono portare ad una modifica del metabolismo microalgale. Attraverso calcoli stechiometrici è stata indagata la possibilità che vi sia degradazione di COD da parte delle alghe, per i quali si rimanda al capitolo 4.2.1.11.

Il picco di concentrazione per la colonna I, in corrispondenza del giorno 64, è verosimilmente legato ad un calo di assorbanza. La scarsa presenza di microalghe ha ridotto l'apporto di ossigeno necessario ai batteri per la

---

degradazione del carbonio organico, generando, di conseguenza, un accumulo di COD.

#### 4.2.1.7 Parametri aggregati

In questo paragrafo verranno discusse le rese di rimozione dei nutrienti e i ratei di rimozione.

##### Ammonio

Sono stati riportati i ratei medi di rimozione, espressi in mg/L/d, dell'ammonio rimosso dal consorzio microalghe-batteri. Tali valori sono stati ricavati seguendo la metodologia descritta all'interno del capitolo 3.4.2.

- Colonna I:  $12,4 \pm 2,31$  mgNH<sub>4</sub>/L/d
- Colonna II:  $12,5 \pm 3,22$  mgNH<sub>4</sub>/L/d
- Colonna III:  $11,9 \pm 2,44$  mgNH<sub>4</sub>/L/d

Tramite la figura 4.1.4 invece è stato riportato relativi il grafico relativo alla rimozione cumulata di tale sostanza.

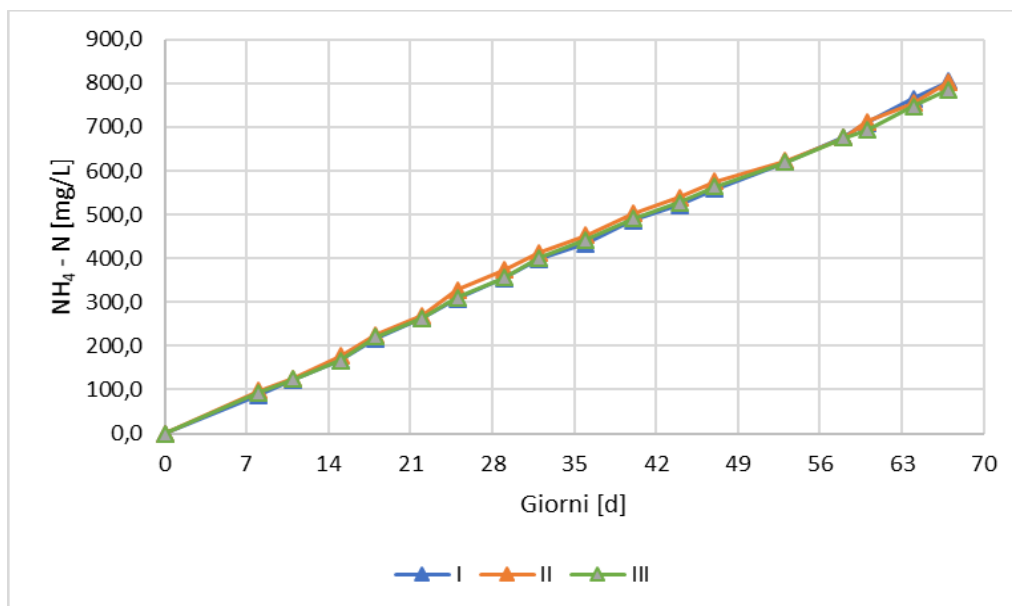


Figura 4.2.17: Rimozioni cumulata dell'ammonio nei reattori di crescita.

Come si può notare dal grafico, la rimozione dell'ammonio è avvenuta in modo lineare durante la sperimentazione. I valori di rimozione ricavati sono decisamente simili: l'andamento delle rimozioni cumulate per le tre colonne è pressoché identico.

### NO<sub>x</sub>

Il refluo in alimentazione presenta valori nulli di nitrato e nitrito (NO<sub>3</sub> e NO<sub>2</sub> rispettivamente), di conseguenza la comparsa di queste sostanze azotate è dovuta esclusivamente all'ossidazione da parte dei batteri nitrificanti dell'ammonio presente nel refluo.

- Colonna I:  $-0,23 \pm 1,12$  mgNO<sub>2</sub>/L/d;  $-0,19 \pm 0,47$  mg NO<sub>3</sub>/L/d
- Colonna II:  $0 \pm 0,03$  mgNO<sub>2</sub>/L/d;  $-0,09 \pm 0,29$  mg NO<sub>3</sub>/L/d
- Colonna III:  $0 \pm 0,03$  mgNO<sub>2</sub>/L/d;  $-0,09 \pm 0,24$  mg NO<sub>3</sub>/L/d

La presenza del segno meno davanti ai valori dei ratei di rimozione è dovuta al fatto che tali sostanze non sono state rimosse dal sistema, bensì sono state prodotte dai batteri nitrificanti (AOB per la produzione di NO<sub>2</sub> e NOB per la produzione di NO<sub>3</sub>).

Nella figura 4.2.18 sono stati riportati i grafici delle rimozioni cumulate per entrambe le sostanze azotate.

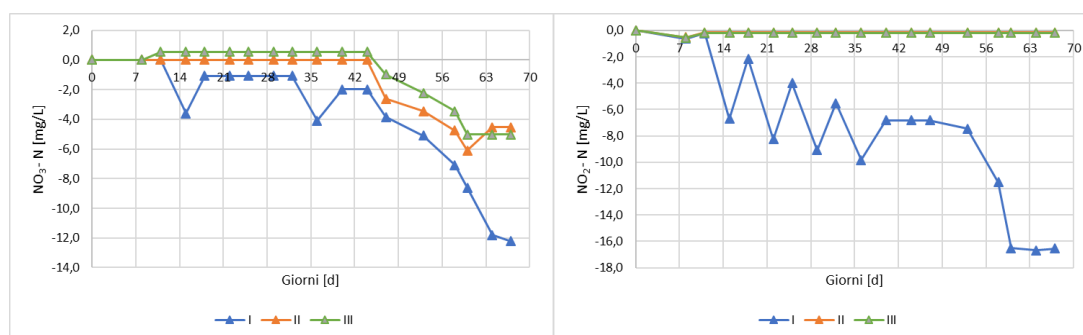


Figura 4.2.18: Rimozioni cumulate nei reattori delle sostanze NO<sub>3</sub> (sinistra) e NO<sub>2</sub> (destra).

Come si evince dai grafici in figura 4.2.18, durante la prova sono stati registrati andamenti differenti tra la colonna I e le colonne II e III. L'attività batterica nelle colonne II e III, come spiegato nel capitolo 4.2.1.5, è risultata

---

piuttosto inibita, di conseguenza le rimozioni cumulate sia per il nitrito che per il nitrato si sono assestate attorno a valori nulli. Sono state misurate produzioni di  $\text{NO}_3$  trascurabili ( $< 7 \text{ mg/L/d}$ ) solo verso la conclusione della sperimentazione.

Per quanto riguarda la colonna I, la produzione cumulata di nitrato è divisibile in due fasi: una prima fase, ad inizio sperimentazione, stazionaria, con produzioni trascurabili e una seconda fase più lineare in cui vi è stato un accumulo nel tempo di nitrato. Per quanto concerne la produzione di nitrito, anch'essa ha avuto andamenti diversi nel tempo: una prima fase oscillatoria (fino al giorno 40 della sperimentazione), una seconda fase stabile, con valori che si sono assestati attorno a  $6 \text{ mg/L/d}$ , e infine una fase lineare di accumulo di nitrito verso la fine della prova. I motivi di tali comportamenti sono già stati discussi all'interno del capitolo 4.2.1.5.

È stata riscontrata una forte similitudine tra gli andamenti delle rimozioni cumulate delle colonne II e III, confermata anche dai valori medi dei ratei di rimozione, che sono risultati estremamente simili.

### **Azoto totale**

I risultati ottenuti precedentemente sono stati uniti al fine di analizzare l'andamento complessivo delle rimozioni di azoto totale di tutti i reattori di crescita durante la prova. I ratei di rimozione dell'azoto totale sono i seguenti:

- Colonna I:  $12 \pm 3,16 \text{ mgN}_{\text{tot}}/\text{L/d}$
- Colonna II:  $12,4 \pm 3,17 \text{ mgN}_{\text{tot}}/\text{L/d}$
- Colonna III:  $11,8 \pm 2,51 \text{ mgN}_{\text{tot}}/\text{L/d}$

Come nei capitoli precedenti, è stata ricavata la curva di rimozione cumulata per tutti i reattori: i risultati sono stati riportati nella figura 4.1.19.



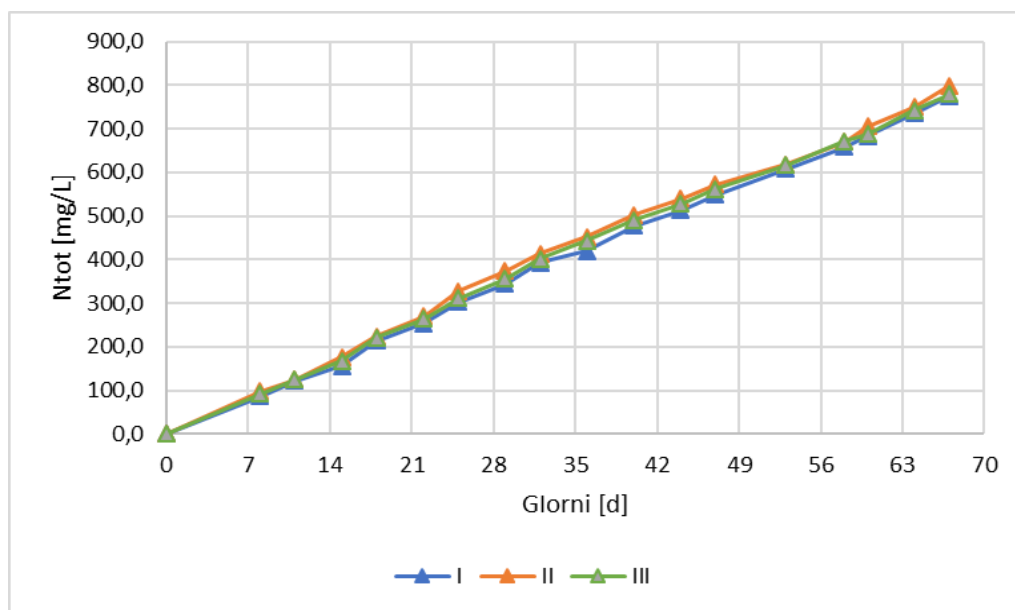


Figura 4.2.19: Rimozione cumulata dell'azoto totale nei reattori di crescita.

Dato che le produzioni di  $\text{NO}_x$  per tutte le colonne sono risultate trascurabili, l'andamento delle curve di rimozioni cumulate risulta simile a quello dell'ammonio, sostanza più abbondante all'interno del sistema biologico.

### **Azoto strippato**

Applicando la metodologia presentata nel paragrafo 3.5.3 è stata effettuata una quantificazione dell'azoto strippato. Sono stati ricavati i seguenti valori:

- Colonna I: 357 mgN/L pari al 46% del totale rimosso
- Colonna II: 335 mgN/L pari al 42% del totale rimosso
- Colonna III: 347 mgN/L pari al 44% del totale rimosso

Come si evince dalla tabella 4.1.9, le percentuali di strippaggio sono fortemente simili per tutte le colonne. Tali percentuali, piuttosto elevate, sono in linea con le condizioni operative che si sono instaurate nel sistema: un valore così elevato di pH per tutta la durata della sperimentazione (vedi figura 4.2.1), infatti, ha favorito l'insorgere di questi processi.

## Fosforo

Sono stati successivamente ricavati i ratei di rimozione del fosforo:

- Colonna I:  $0,07 \pm 0,27$  mgP/L/d
- Colonna II:  $0,15 \pm 0,21$  mgP/L/d
- Colonna III:  $0,16 \pm 0,21$  mgP/L/d

Nella figura 4.2.20, invece, è stato riportato il grafico rappresentante la curva di rimozione cumulata del fosforo.

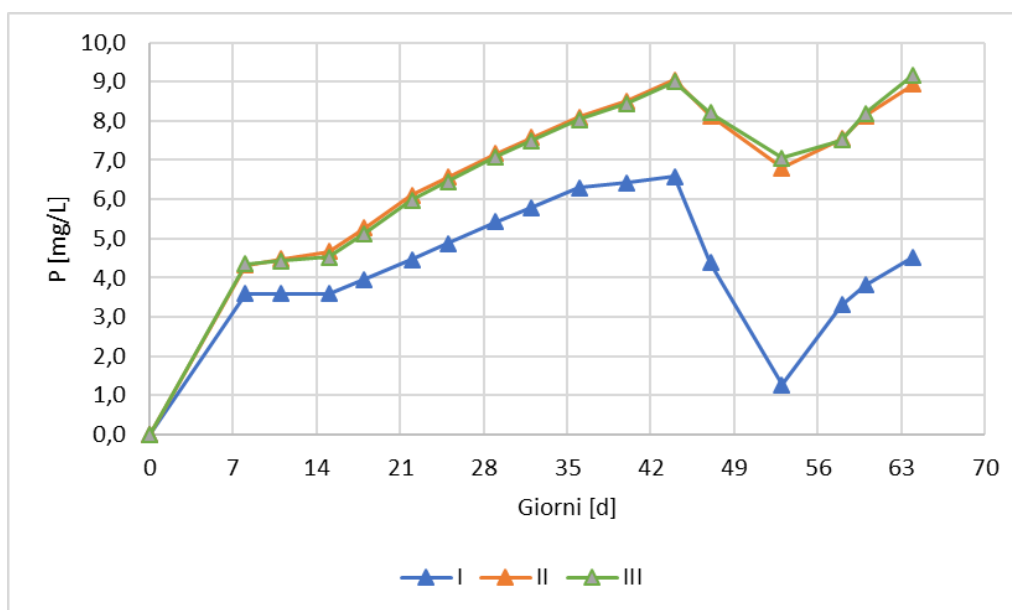


Figura 4.2.20: Curva di rimozione cumulata del fosforo nei reattori di crescita.

Per realizzare la curva di rimozione cumulata e per determinare i ratei di rimozione, è stato necessario stimare le concentrazioni mancanti, poiché le prime settimane di sperimentazione il valore di fosforo è stato ricavato una sola volta a settimana. Per ricavare tali valori è stata effettuata una media tra due misurazioni successive. L'approssimazione è attendibile, dato che i valori di fosforo si sono sempre mantenuti stabili nel corso della sperimentazione, senza riportare variazioni marcate tra una misurazione e la successiva.

Dal grafico in figura 4.1.20 si evince come la rimozione del fosforo, ad opera delle microalghe, sia stata lineare fino al giorno 40 della sperimentazione. In

---

seguito, a causa della morte di una parte della popolazione microalgale, come descritto al capitolo 4.2.1.6, vi è stato un rilascio di fosforo nella sospensione che ha comportato un accumulo di tale sostanza in tutti i reattori, confermato dall'andamento della curva di rimozione cumulata.

### COD

Sono stati infine ricavati i ratei di rimozione del COD:

- Colonna I:  $28 \pm 19,9$  mgCOD/L/d
- Colonna II:  $26,3 \pm 16,4$  mgCOD/L/d
- Colonna III:  $25,6 \pm 17,5$  mgCOD/L/d

Nella figura 4.2.21 invece sono state riportate le curve di rimozioni cumulate su tutto il periodo della sperimentazione.

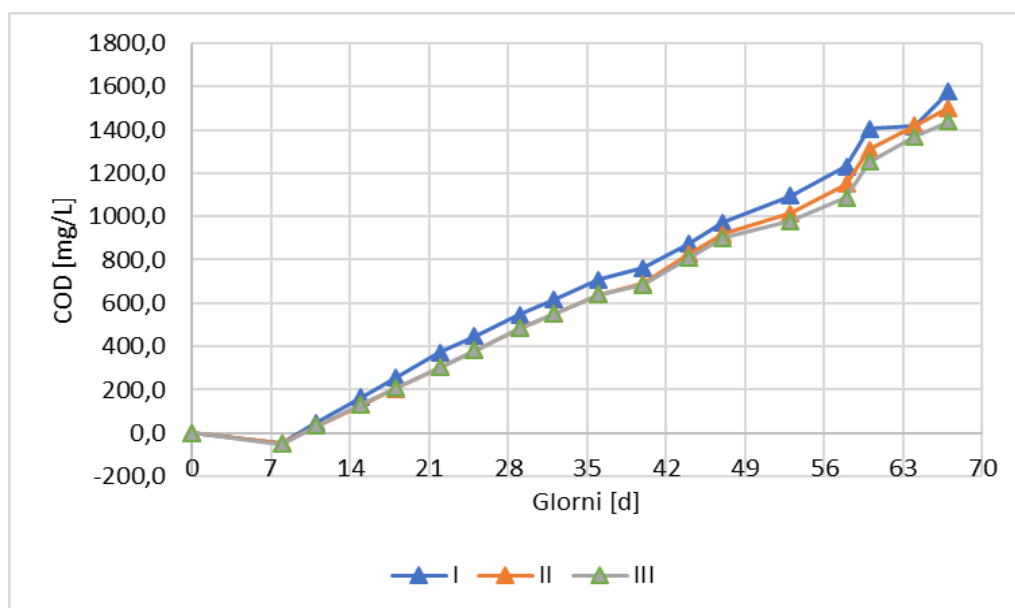


Figura 4.2.21: Curva di rimozione cumulata del COD nei reattori di crescita.

Come per il fosforo, anche per il COD è stato necessario determinare i valori di concentrazione mancanti, poiché seguendo la metodologia di sperimentazione adottata per questo esperimento, le analisi sulla concentrazione di fosforo nei reattori sono state effettuate una volta a settimana. Anche in questo caso, come per il fosforo, dato che le

---

concentrazioni misurate si sono sempre assestate attorno a valori stazionari, per determinare i valori mancanti è stata effettuata una media tra due misurazioni successive.

Dalla figura 4.2.21 si può notare come la rimozione del COD sia stata pressoché lineare per tutte e tre le colonne, con andamenti analoghi.

#### **4.2.1.8 Rese di rimozione**

Vengono infine riportate le rese di rimozione, calcolate per ogni nutriente e riferite all'intero periodo di sperimentazione. Tali rese forniscono il grado di efficienza di rimozione del sistema nei confronti delle componenti di interesse. Le percentuali di rimozione sono riportate nella tabella 4.2.3.

*Tabella 4.2.3: Rese di rimozione (%) del sistema di coltivazione microalgale.*

	N <sub>TOT</sub> [%]	NH <sub>4</sub> [%]	P [%]	COD [%]
Colonna I	63,5	66	46,5	34,5
Colonna II	65,5	66	67	33
Colonna III	64	64	69	31

In questa prova le rese di rimozione del COD si sono dimostrate piuttosto basse e non confrontabili con quelle ottenibili attraverso altri sistemi di trattamento. Le rese sono pressoché identiche in tutti i replicati, con una buona efficienza di rimozione dell'azoto, sintomo, anche in questo caso, di efficacia del sistema di coltivazione microalgale nei confronti della rimozione delle sostanze azotate.

#### **4.2.1.9 Analisi dello stato stazionario**

La prova di crescita in semicontinuo riportata nei paragrafi 4.2.1 ha avuto una durata di 67 giorni nei quali si è assistito a cicli e, talvolta, a comportamenti variabili. Per dare uniformità ai risultati descritti si è dunque deciso di proporre

un'analisi quantitativa di tutti i parametri caratterizzanti il sistema e le sue rese, in un periodo in cui esso è stato soggetto a condizioni pressoché stazionarie. Per questo motivo è stata proposta la seguente analisi, riferita all'intervallo di tempo che va dal giorno 25 fino al giorno 53. Nelle tabelle 4.2.4-8 sono riportati i valori medi e le relative deviazioni standard dei parametri di crescita, concentrazioni dei nutrienti, parametri aggregati, azoto strippato e rese del sistema, relativi al periodo citato.

Tabella 4.2.4: Valori medi di crescita e operativi rilevati nelle colonne nei giorni 25-53.

Reattori	Abs [1]	pH [1]	T [°C]	VSS [mg/L]
I	1,4 ± 0,16	11,2 ± 0,21	25,9 ± 1,78	683 ± 169
II	1,33 ± 0,4	11,21 ± 0,27	25,9 ± 1,67	690 ± 164
III	1,19 ± 0,32	11,1 ± 0,25	25,7 ± 1,80	677 ± 139

Tabella 4.2.5: Ratei medi di concentrazione rilevati nelle colonne nei giorni 25-53

Reattori	NH <sub>4</sub> -N [mg/L]	NO <sub>3</sub> -N [mg/L]	NO <sub>2</sub> -N [mg/L]	P [mg/L]	N/P [1]	COD [mg/L]
I	55,4 ± 8,55	1,03 ± 1,33	1,44 ± 2,26	2,11 ± 2,02	46,4 ± 28	416 ± 21,9
II	53,8 ± 11,1	0,71 ± 1,23	0	1,14 ± 1,07	71,3 ± 33,8	423 ± 20,4
III	55,4 ± 6,74	0,72 ± 1,23	0	1,07 ± 0,97	79 ± 37,6	432 ± 18,6

Tabella 4.2.6: Ratei medi di rimozione dei nutrienti nei giorni 25-53.

Reattori	Rateo NH <sub>4</sub> -N [mg/L/d]	Rateo NO <sub>3</sub> -N [mg/L/d]	Rateo NO <sub>2</sub> -N [mg/L/d]	Rateo P [mg/L/d]	Rateo COD [mg/L/d]
I	11,84 ± 2,44	-0,13 ± 0,4	0,11 ± 0,98	-0,08 ± 0,34	23,8 ± 5,63
II	11,9 ± 3,42	-0,13 ± 0,31	0	0,03 ± 0,19	23,7 ± 7,17
III	11,9 ± 2,45	-0,09 ± 0,18	0	0,05 ± 0,17	22,8 ± 7,33

Tabella 4.2.7: Percentuale azoto strippato nei giorni 25-53.

Reattori	% Azoto strippato
I	35
II	31
III	39

Tabella 4.2.8: Rese di rimozione dei nutrienti nei giorni 25-53.

Reattori	$N_{TOT}$	$P$	$COD$
<i>I</i>	56	30	32
<i>II</i>	54	31	31
<i>III</i>	57	34	29

#### 4.2.1.10 Analisti statistiche

##### Prove di analogie sui replicati

Applicando la metodologia descritta nel paragrafo 3.5.3 sono stati ottenuti i seguenti risultati riportati nelle tabelle 4.2.9, 4.2.10, 4.2.11. Con questi test sono state verificate le ipotesi di riproducibilità delle colonne, come detto nei paragrafi relativi alle analisi qualitative.

Tabella 4.2.9: Risultati dei t-test applicati ai parametri di crescita e all'ammonio.

T-TEST periodo 0-18 d	$ABS$ (680)	Torbidità	$NH_4$
Colonna I & Colonna II (p-value)	0,66	0,96	0,19
Colonna I & Colonna III (p-value)	0,36	0,19	0,45
Colonna II & Colonna III (p-value)	0,61	0,15	0,19

Tabella 4.2.10: Risultati dei t-test applicati ai parametri di crescita e all'ammonio.

T-TEST periodo 36-67 d	$ABS$ (680)	Torbidità	$NH_4$
Colonna I & Colonna II (p-value)	0,87	0,53	0,18
Colonna I & Colonna III (p-value)	0,7	0,14	0,11
Colonna II & Colonna III (p-value)	0,46	0,17	0,84

Tabella 4.2.11: Risultati dei t-test applicati alle concentrazioni dei nutrienti.

T-TEST	$NO_3$	$NO_2$	$P$
Colonna I & Colonna II (p-value)	< 0,05	< 0,05	< 0,05
Colonna I & Colonna III (p-value)	< 0,05	< 0,05	< 0,05
Colonna II & Colonna III (p-value)	0,33	0,94	0,61

---

L'intero set di dati a disposizione è stato suddiviso in due intervalli temporali: dal giorno 0 al giorno 18 della sperimentazione e dal giorno 36 al giorno 67 della sperimentazione: il primo periodo di crescita esponenziale e il secondo di crescita stazionaria. Per quanto concerne l'andamento delle concentrazioni dei nutrienti nel tempo, i risultati sono piuttosto in linea con le considerazioni fatte precedentemente. Per l'ammonio, per esempio, i valori di p-value sono superiori al valore soglia di 0.05, sia nel primo che nel secondo periodo di sperimentazione. Tali risultati permettono di assumere che le tre colonne, sotto questo parametro, siano risultate statisticamente identiche. Per gli altri nutrienti, invece, i risultati sono diversi, poiché come già accennato nei capitoli precedenti, l'attività batterica della colonna I è stata più prolifica che nella II e nella III. Di conseguenza per nitrito, nitrato e fosforo gli andamenti temporali delle concentrazioni sono risultate statisticamente identiche solo per le colonne II e III. I valori riportati nella tabella 4.2.11 sono riferiti all'intera sperimentazione, quindi su tutti i dati.

Per quanto concerne i parametri di crescita, i valori di assorbanza e di torbidità si sono rilevati statisticamente identici in tutte e tre le colonne sia ad inizio sperimentazione che nella seconda metà della prova, come si evince anche dai grafici 4.1.4 e 4.1.5 del capitolo 4.2.1.2 e come testimoniato dai valori di p-value.

I risultati ottenuti, dunque, permettono di affermare che in termini di crescita le tre colonne sono risultate statisticamente identiche. Questo risultato è molto importante poiché conferma lo stato iniziale dei reattori i quali sono stati avviati nelle medesime condizioni operative. In merito alla rimozione dei nutrienti invece i risultati sono in linea con le argomentazioni fatte nel capitolo 4.2.1.5, in cui è stata discusso come l'attività batterica sia stata diversa tra la colonna I e le colonne II e III. Tale comportamento è stato

---

confermato anche dai test di accoppiamento, attraverso i quali è emersa la forte similitudine solo tra le colonne II e III.

### **Prove di inferenza statistica**

In analogia con quanto fatto per la prova di crescita su digestato in semi-continuo, sono stati effettuati dei test d'inferenza statistica. La modalità di questi test è la medesima, si rimanda dunque al paragrafo 4.1.2.10.

I risultati dei test di inferenza sono riportati nella tabella 4.2.12.

*Tabella 4.2.12: Risultati test di inferenza statistica.*

<i>Reattori</i>	<i>Rimozione NH<sub>4</sub></i>	<i>Rimozione NO<sub>2</sub></i>	<i>Rimozione NO<sub>3</sub></i>	<i>Rimozione P</i>	<i>Variazione Temperatura</i>	<i>Temperatura media</i>	<i>Variazione pH</i>
<i>I</i>	Si	No	No	No	No	No	No
<i>II</i>	Si	No	No	No	No	No	No
<i>III</i>	Si	No	No	No	No	No	No

Dalla tabella 4.2.12 si può notare come la crescita sia risultata dipendente, a livello statistico, dalla rimozione dell'ammonio. L'assenza di nitrati e nitriti nel refluo, unita alla mancata produzione di tali sostanze per nitrificazione, ha reso l'ammonio l'unico nutriente disponibile, il quale ha assunto un ruolo centrale nella crescita delle microalghe. La dipendenza da questo nutriente ha trovato riscontro anche nei test statistici effettuati. La mancanza di dipendenza statistica con la variazione di temperatura probabilmente è dovuta ad un errore dovuto all'incertezza dei dati e alla poca numerosità del campione.

#### **4.2.1.11 Valutazioni stechiometriche**

Attraverso la metodologia descritta al paragrafo 3.5.5 sono stati ricavati, a partire dai dati relativi alla biomassa prodotta in termini di VSS, i valori di ossigeno prodotti. Successivamente, sono stati ricavati sia i valori di ossigeno necessari alla nitrificazione, sia quelli necessari all'ossidazione del COD, sia la



---

CO<sub>2</sub> prodotta nel processo di ossidazione del COD stesso. I risultati sono stati riportati nella tabella 4.2.12.

*Tabella 4.2.13: Risultati calcoli stechiometrici relativi a produzioni di O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> e alle relative quantità necessarie alla sostenibilità dei processi interni.*

	Reattori		
	I	II	III
O <sub>2</sub> prodotto [g/L/d]	0,12	0,11	0,11
O <sub>2</sub> necessario per nitrificazione [g/L/d]	0,02	< 0,001	< 0,001
O <sub>2</sub> necessario per ossidazione COD [g/L/d]	0,01	0,01	0,01
CO <sub>2</sub> prodotta da ossidazione COD [g/L/d]	0,02	0,02	0,02
CO <sub>2</sub> necessaria per la produzione di biomassa [g/L/d]	0,12	0,10	0,10

Come si può notare dalla tabella 4.2.12, l'ossigeno prodotto dallo sviluppo delle microalghe è risultato sufficiente alla sostenibilità dei processi di ossidazione dell'ammonio e del COD. L'anidride carbonica prodotta in quest'ultimo processo, tuttavia, è risultata insufficiente a sostenere il processo di crescita delle microalghe, essendo questa stata prodotta in quantità minori rispetto a quelle necessarie per la stechiometria di crescita. Il set-up sperimentale così impostato si è dunque rivelato essere CO<sub>2</sub> limitante. Per questo motivo nella prova successiva sono stati impostati dei reattori in cui avviene insufflazione di questo gas.

---

## 4.2.2 Prova 2

In questo capitolo vengono illustrati i risultati relativi alla seconda prova di coltura su refluo zootecnico WW1. La metodologia di tale sperimentazione è stata descritta all'interno del capitolo 3.4.2.2.

L'obiettivo di questa nuova sperimentazione è rimasto il medesimo: valutare le capacità del sistema biologico di rimuovere i nutrienti presenti nel refluo. La novità consiste nella diversificazione delle condizioni operative, motivo per cui l'analisi dei risultati verterà sul confronto con quelli ottenuti nella prova precedente, per analizzare se le migliorie apportate si sono tradotte in una maggior efficienza di crescita.

Nella tabella 4.2.14 è stata riportata la caratterizzazione del tempo 0 per le 4 colonne di crescita.

*Tabella 4.2.14: Caratteristiche chimico-fisiche del tempo zero (inizio prova), per i 4 reattori di crescita, le cui condizioni operative sono state illustrate nella tabella 3.4.4.*

<b>TEMPO 0</b>		
<b>Colonne:</b>	<b>Controllo, HRT12 CO2</b>	<b>CO2+P</b>
ABS 680 (TQ)	0,61	0,61
NH4+-N (mg/L)	97,7	97,7
NO3-N (mg/L)	3,53	3,53
NO2-N (mg/L)	4,41	4,41
PO4-P (mg/L)	3,12	10,5
N/P	33,9	10
COD (filtrato) (mg/L)	391	391
Torbidità	560	560
TSS (mg/L)	540	540
VSS (mg/L)	430	430

Il refluo alimentato, sempre in semi-continuo, alle colonne di crescita è, come nella sperimentazione precedente, il WW1. Ne è stata effettuata una nuova caratterizzazione poiché, nei mesi in cui è stato immagazzinato,

---

potrebbe aver subito delle modifiche alle concentrazioni delle sue principali componenti. I valori di queste analisi sono riportati nella tabella 4.2.15.

*Tabella 4.2.15: Caratteristiche chimico-fisiche del refluo utilizzato in questa seconda sperimentazione.*

<b>WW1</b>	
ABS 680	0,177
$NH_4^+-N$ (mg/L)	203
$NO_3^-N$ (mg/L)	2,82
$NO_2^-N$ (mg/L)	6,42
$PO_4-P$ (mg/L)	4,6
N/P	46,14
COD (TQ) (mg/L)	784
TSS (mg/L)	168
VSS (mg/L)	122
Torbidità	153

Si può notare dalla tabella 4.2.15 che le caratteristiche sono rimaste pressoché le medesime, eccezion fatta per le concentrazioni di nitrito e nitrato le quali, diversamente dalla prova precedente, non sono più uguali a zero. Permangono tuttavia concentrazioni modeste.

#### **4.2.2.1 Condizioni operative: pH e temperatura**

Gli andamenti di pH e temperatura nel corso della prova sono riportati in figura 4.2.22 e 4.2.23. Le considerazioni riguardanti il grafico della temperatura sono le medesime di quelle fatte nel capitolo 4.1.2.1. Nello specifico questa prova è stata impostata a primavera inoltrata, quando le temperature ormai si erano assestate verso temperature più alte e minor variazione di questo parametro. Come si può notare dal grafico 4.2.23, infatti, la temperatura non ha mai subito brusche variazioni. Il comportamento del pH è il medesimo della prova 1 (si rimanda al capitolo 4.2.1.1).

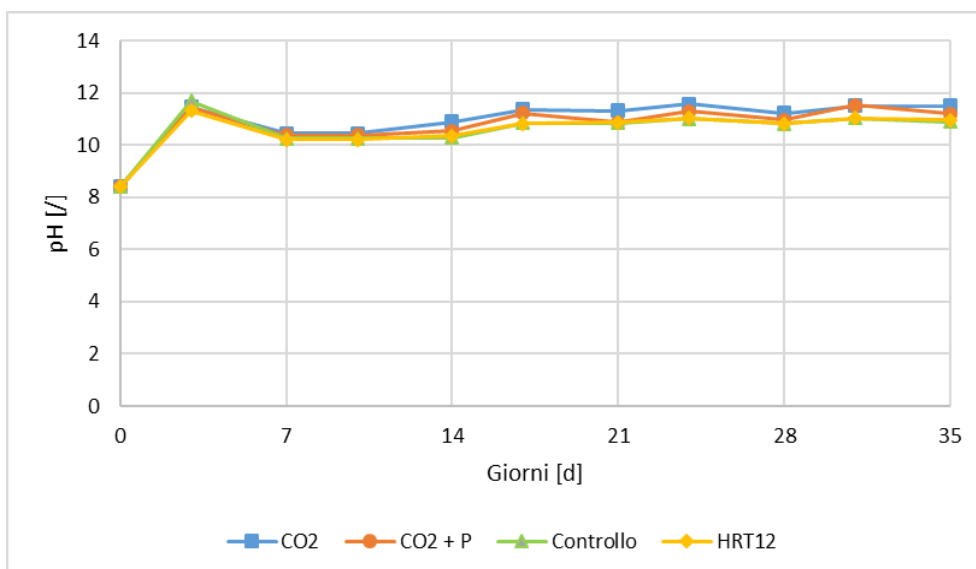


Figura 4.2.22: Andamento pH nei reattori di crescita.

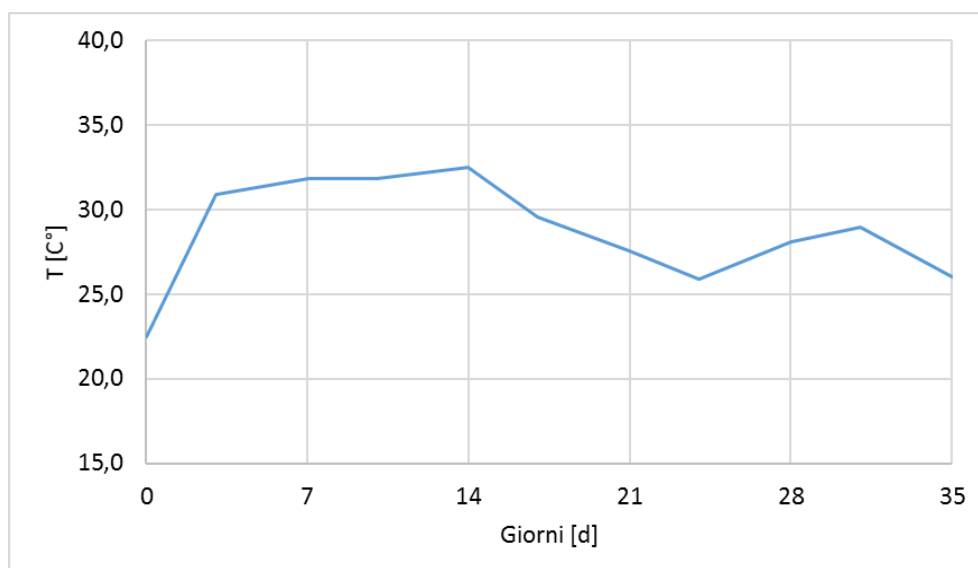


Figura 4.2.23: Andamento temperatura nei reattori di crescita.

#### 4.2.2.2 Parametri di crescita: assorbanza e torbidità

Anche in questa seconda sperimentazione questi parametri sono stati utilizzati come strumento di stima della crescita algale. La maggior attenzione sarà anche in questo caso rivolta all'assorbanza. Il suo andamento temporale a 680 nm nei 4 reattori di crescita è riportato in figura 4.2.24.

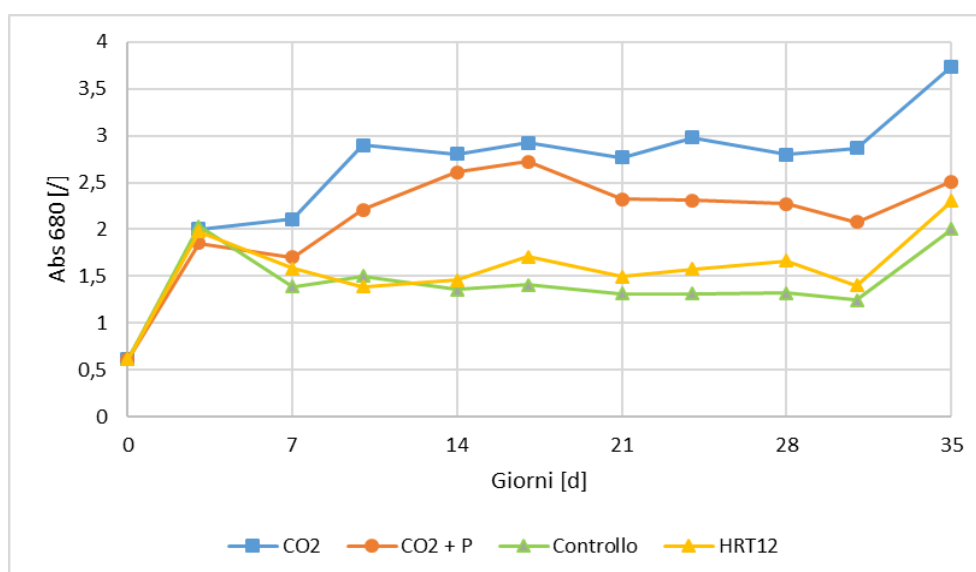


Figura 4.2.24: Andamento assorbanza a 680 nm nei 4 reattori di crescita.

L'analisi della figura 4.2.24 conferma, in prima istanza, l'avvenuta crescita della popolazione microalgale in tutti i reattori di crescita. Il profilo rispecchia in primo luogo l'andamento teorico e in secondo luogo la crescita osservata nella prova precedente: essa è, in una prima fase, veloce per poi stabilizzarsi attorno a valori pressoché costanti.

L'informazione di maggior interesse deducibile dal grafico di figura 4.2.24 è la differenza dei valori rilevati tra le colonne con insufflazione di CO<sub>2</sub> e quelle in cui questo gas non viene insufflato. Nei reattori CO<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>+P, infatti, l'assorbanza rilevata è pressoché doppia rispetto a quella misurata nelle colonne Controllo e HRT12. Questa ampia differenza consente di trarre una importante conclusione: l'insufflazione di anidride carbonica ha migliorato le rese di crescita della comunità microalgale. Questo maggior proliferare è dovuto ad una maggior disponibilità di carbonio inorganico che ha permesso un aumento di velocità delle cinetiche di crescita. È interessante notare che, nella colonna Controllo, la media di assorbanza rilevata in questa prova è pari 1,36, pressoché la stessa rispetto a quelle misurate nelle 3 colonne nella prima prova le quali erano pari a 1,36, 1,36 e 1,28 rispettivamente per le colonne I, II

---

e III. La forte somiglianza dei valori misurati nel corso di entrambe le prove, conferma l'affidabilità dei risultati ottenuti, in quanto, essendo state impostate con le medesime condizioni operative, hanno fornito gli stessi risultati.

Dal grafico di figura 4.2.24 si possono ricavare ulteriori informazioni. Si può notare, in primo luogo, come un maggior tempo di residenza per colonne dotate delle medesime condizioni operative (Controllo e HRT12) non si è tradotto in una maggior crescita. Sebbene nel reattore HRT12 la crescita sia lievemente più elevata, l'aumento di assorbanza può essere considerato trascurabile: in media, la colonna HRT12 ha riportato una crescita maggiore del 10% rispetto alla colonna Controllo. In secondo luogo si può poi notare come la correzione del rapporto N/P del refluo alimentato alle colonne non abbia favorito la crescita microalgale. L'assorbanza rilevata nella colonna CO<sub>2</sub>+P è infatti, lungo tutta la prova, minore o al più uguale a quella misurata nel suo duplicato senza correzione del rapporto N/P. Un rapporto azoto-fosforo pari a 10 nel WW1 alimentato non ha dunque comportato un maggior sviluppo della comunità microalgale.

Per quanto concerne la torbidità, è stato riportato in figura 4.2.25 l'andamento temporale di tale parametro nel corso della sperimentazione.

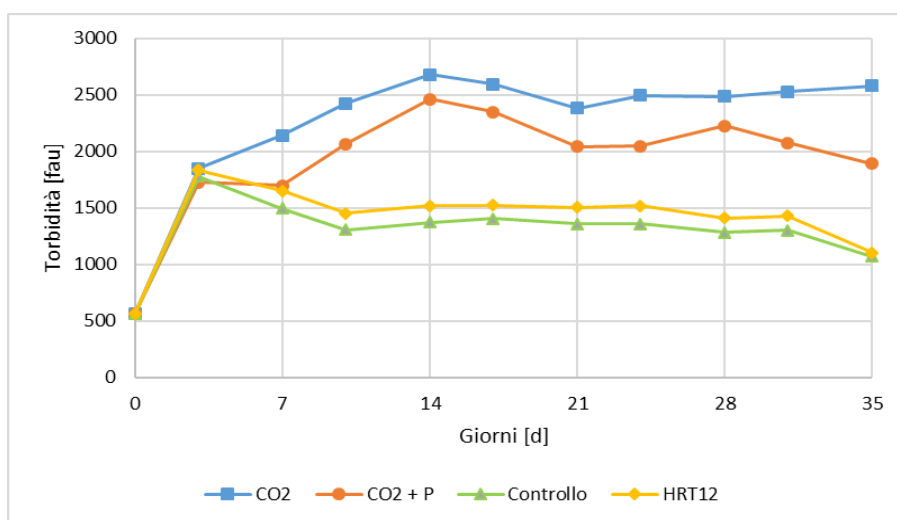


Figura 4.2.25: Andamento temporale della torbidità nei reattori di crescita.

Il profilo temporale di questo parametro rispecchia, piuttosto fedelmente, il comportamento riscontrato precedentemente con l'assorbanza: si è assistito ad una prima fase di crescita rapida ed esponenziale e successivamente ad una fase stazionaria attorno a valori costanti di questo parametro.

I risultati ottenuti dalla misurazione della torbidità riportano le medesime conclusioni fatte nel paragrafo precedente: nelle colonne CO<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>+P si ha avuto maggiore crescita della popolazione algale che nelle colonne Controllo e HRT12; nello specifico, le colonne CO<sub>2</sub> e HRT12 hanno riportato una maggior crescita rispettivamente nei confronti delle colonne CO<sub>2</sub>+P e Controllo. Anche attraverso tale parametro, dunque, si ha avuto un'ulteriore riprova di come l'insufflazione di CO<sub>2</sub> abbia beneficiato le colonne CO<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>+P di un maggiore sviluppo della popolazione microalgale.

L'analogia dei profili temporali dei parametri di assorbanza e torbidità è stata studiata tramite la correlazione degli stessi, riportata nella figura 4.2.26.

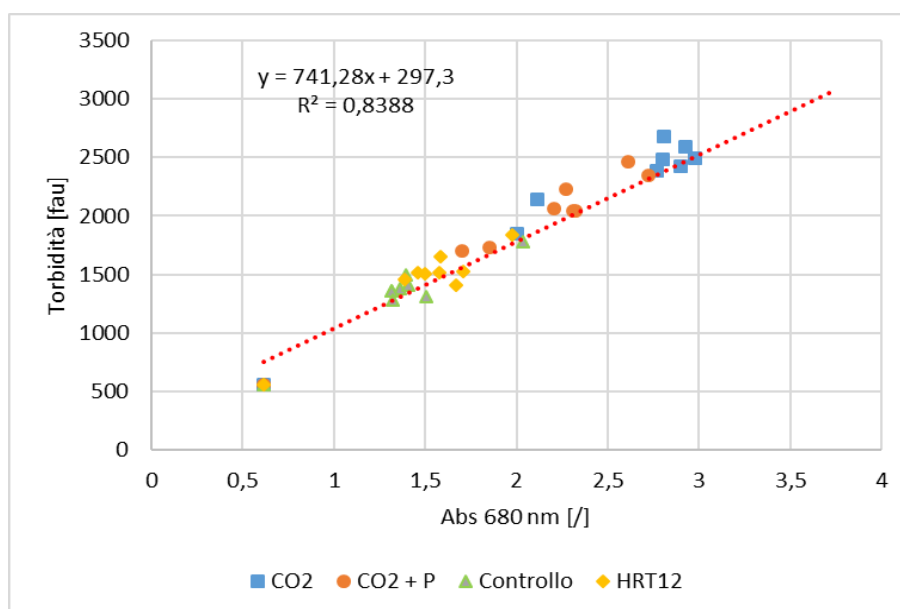


Figura 4.2.26: Correlazione tra i parametri assorbanza (680 nm) e torbidità.

Come si evince dal grafico in figura 4.2.26, la correlazione tra i due parametri è robusta. Infatti è stato ricavato un R<sup>2</sup> pari a 0,83, calcolato

---

sull'unione di tutte le serie di dati. Anche in questa sperimentazione, come per la precedente, è stato possibile assumere come unico parametro di crescita l'assorbanza, in quanto parametro più accurato per valutare lo sviluppo della comunità microalgale.

### 4.2.2.3 Produzione di biomassa

È stato analizzato il tenore dei solidi sospesi volatili (VSS), rilevato nel corso della sperimentazione. L'andamento temporale della concentrazione di tale parametro nel tempo è stato riportato in figura 4.2.27.

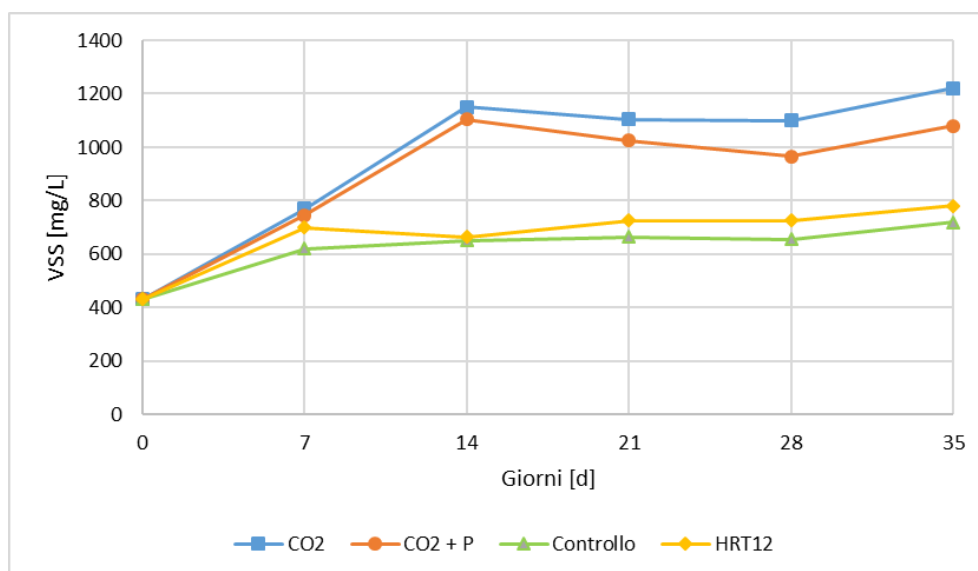


Figura 4.2.27: Andamento temporale del parametro VSS nei reattori di crescita.

Come si può dedurre dal grafico 4.2.27, anche questo parametro di crescita riporta gli stessi andamenti riscontrati sia con assorbanza che con la torbidità. Le considerazioni fatte precedentemente risultano dunque ulteriormente avvalorate. La fase di crescita esponenziale osservabile nei grafici 4.2.24 e 4.2.25 risulta per i VSS meno evidente, poiché le misurazioni sono state fatte una volta a settimana e probabilmente non ne è stato registrato il picco nei primi giorni di sperimentazione.



Nel grafico in figura 4.2.28 è stata riportata la correlazione tra i VSS e l'assorbanza, al fine di verificarne la somiglianza nei profili temporali.

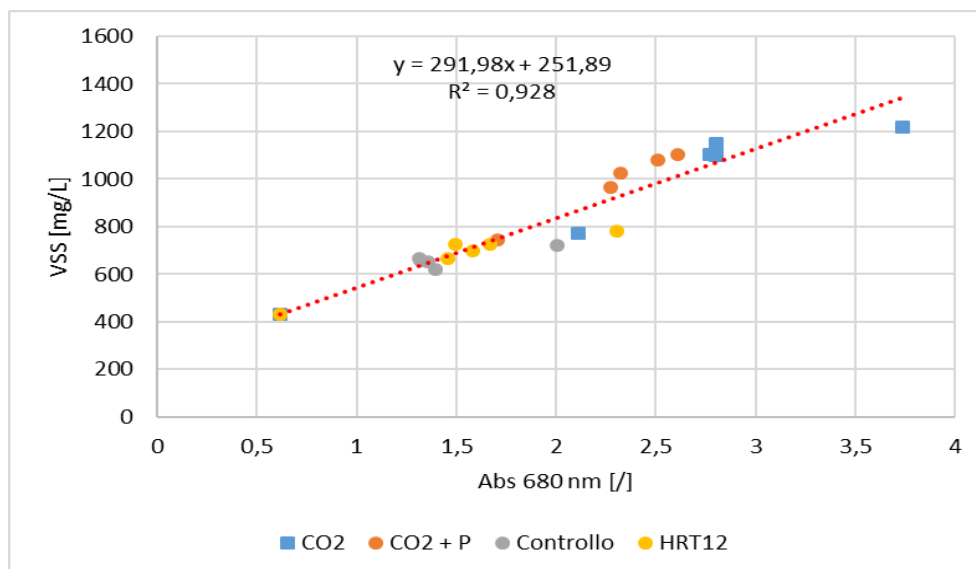


Figura 4.2.28: Correlazione tra i valori di VSS e di assorbanza (680 nm).

Come indicato in figura 4.2.28 la correlazione tra questi due parametri di crescita è estremamente elevata, con  $R^2$  pari a 0,93. Il risultato ottenuto è un'ulteriore conferma dell'affidabilità del valore dell'assorbanza come indicatore di crescita della popolazione microalgale.

I ratei di produzione di biomassa lungo la sperimentazione sono riportati in tabella 4.2.16.

Tabella 4.2.16: Ratei di produzione di biomassa.

Reattore	Rateo [mg/L/d]
CO <sub>2</sub>	111 ± 34,2
CO <sub>2</sub> + P	107 ± 34,4
Controllo	60,6 ± 32,9
HRT12	64,8 ± 28,3

#### 4.2.2.4 Rimozione sostanze azotate

Anche in questa sperimentazione la principale finalità è quella di studiare la capacità di crescita delle microalghe attraverso l'assimilazione dei nutrienti

---

contenuti all'interno del refluo. Il consumo di tali sostanze è stato monitorato lungo lo svolgimento della prova e l'andamento temporale dei principali nutrienti è discusso nei seguenti paragrafi.

### **Azoto ammoniacale**

L'andamento temporale delle concentrazioni di ammonio è stato riportato nel grafico in figura 4.2.29.

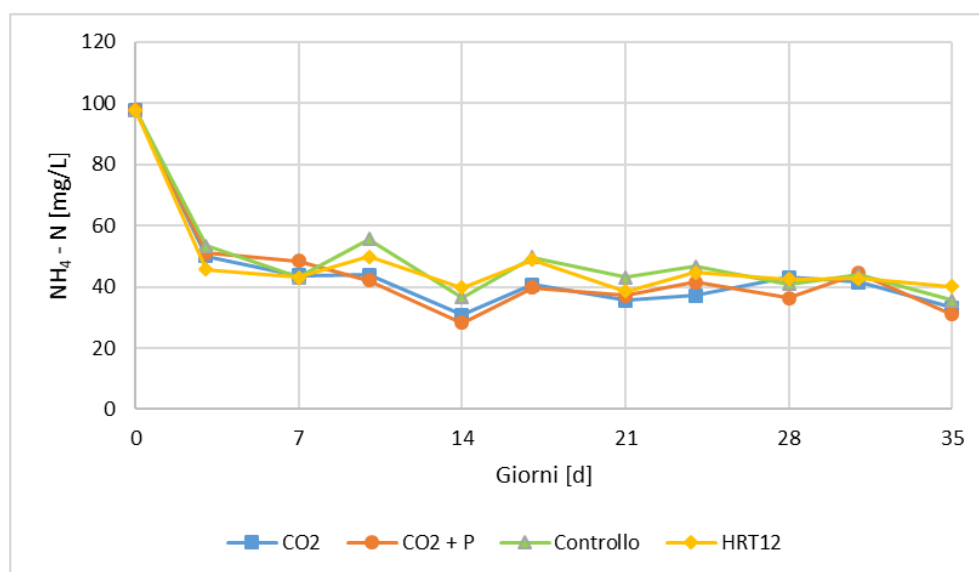


Figura 4.2.29: Andamenti concentrazioni di ammonio nei 4 reattori.

I profili temporali delle concentrazioni di ammonio riportati nella figura 4.2.29 sono fortemente simili in tutti i reattori biologici. L'andamento riscontrato in questa seconda prova ha riportato lo stesso comportamento verificatosi nella prima prova: forte consumo iniziale di ammonio legato alla prima fase di crescita esponenziale delle microalghe e successiva stabilizzazione della rimozione dell'ammonio, sintomo di un raggiunto equilibrio tra ammonio in ingresso al sistema e ammonio assimilato.

L'andamento osservato si discosta dalle considerazioni fatte nel capitolo 4.2.2.2, poiché non sono più evidenti profili accoppiabili a due a due tra le quattro colonne di crescita. Questa osservazione permette di trarre una conclusione interessante: la maggior crescita riscontrata nelle colonne CO<sub>2</sub> e

---

CO<sub>2</sub>+P non è imputabile ad un maggior consumo di ammonio, ma presumibilmente ad un sistema più favorevole allo sviluppo microalgale, ulteriore conferma di come l'insufflazione di anidride carbonica abbia migliorato le rese di crescita della popolazione microalgale. L'uguaglianza dei profili attesta una rimozione di ammonio fortemente simile in tutti i reattori. Tale rimozione, dati i valori di assorbanza pressoché doppi nelle colonne CO e CO<sub>2</sub>+P rispetto alle altre due, fa supporre che nelle colonne con insufflazione di CO<sub>2</sub> l'ammonio consumato sia stato in gran parte assorbito dalle microalgahe, mentre nelle colonne senza insufflazione di anidride carbonica sia stato soggetto a fenomeni di strippaggio più marcati. Tale supposizione verrà analizzata anche nei capitoli successivi.

### **Nitrato e Nitrito**

Gli andamenti delle concentrazioni di nitrato e nitrito, nel corso della prova, sono stati riportati nei grafici in figura 4.2.30 e 4.2.30.

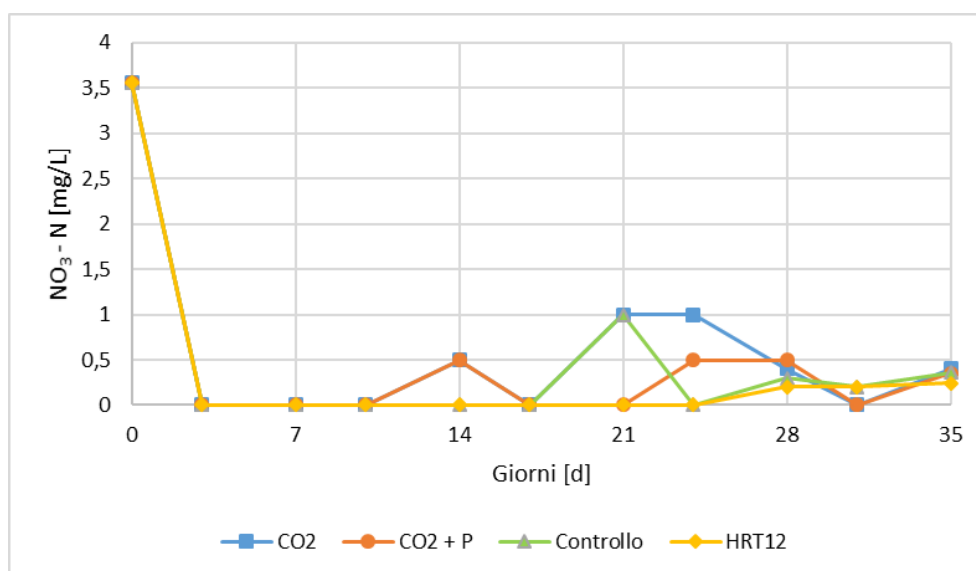


Figura 4.2.30: Concentrazioni di nitrato durante la prova nei reattori di crescita.

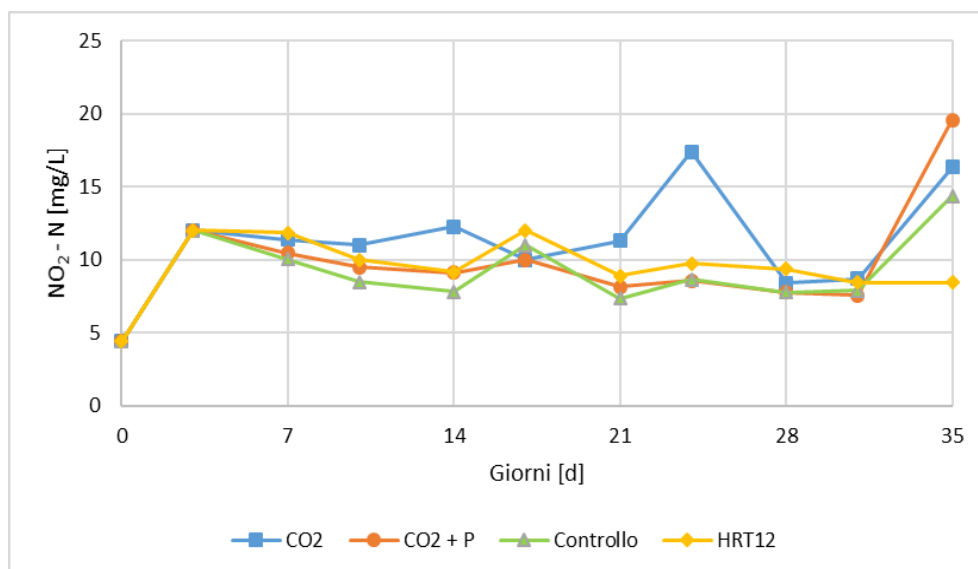


Figura 4.2.31: Concentrazioni di nitrito durante la prova nei reattori di crescita.

Per quanto riguarda il nitrato, come mostrato in figura 4.2.30, vi è stato un consumo iniziale legato alla fase di crescita rapida delle microalghe. Per il nitrito, invece, è stato registrato un aumento delle concentrazioni, dovuto alla maggiore proliferazione dei batteri AOB ad inizio prova. Successivamente, sia le concentrazioni di  $\text{NO}_3$  che quelle di  $\text{NO}_2$  si sono pressoché stabilizzate attorno a valori costanti. I valori bassi di nitrato registrati sono da imputarsi a diversi fattori: basse concentrazioni in ingresso con l'alimento (circa 3mg/L), assimilazione da parte delle microalghe e infine l'inibizione dei batteri NOB i quali non sono stati nelle condizioni favorevoli per completare i processi di nitrificazione. Rispetto alla prova 1, la presenza di nitrato è imputabile per lo più alle caratteristiche dell'alimento. Diversamente dalla prova 1, infatti, sono stati registrati valori non nulli di nitrato in alimento. Per quanto riguarda il nitrito, invece, si è assistito ad una maggiore produzione di tale sostanza rispetto alla prova 1. I motivi di tale differenza sono dovuti probabilmente ad una maggiore concentrazione di nitrito in alimento (circa 6 mg/L rispetto ai 0 mg/L in ingresso nella prima prova) e ad una maggiore proliferazione dei batteri AOB. La maggiore proliferazione di questi ultimi potrebbe essere

---

dovuta al fatto che vi era una maggiore concentrazione di AOB nel refluo in alimentazione. Una loro minore inibizione dovuta a concentrazioni di ammoniaca libera minori rispetto alla prova 1 è stata esclusa poiché i valori di pH e temperatura sono rimasti pressoché uguali anche in questa seconda sperimentazione.

#### 4.2.2.5 Rimozione fosforo e COD

##### Fosforo

L'andamento nel tempo delle concentrazioni di fosforo nei reattori è stato riportato in figura 4.2.32.

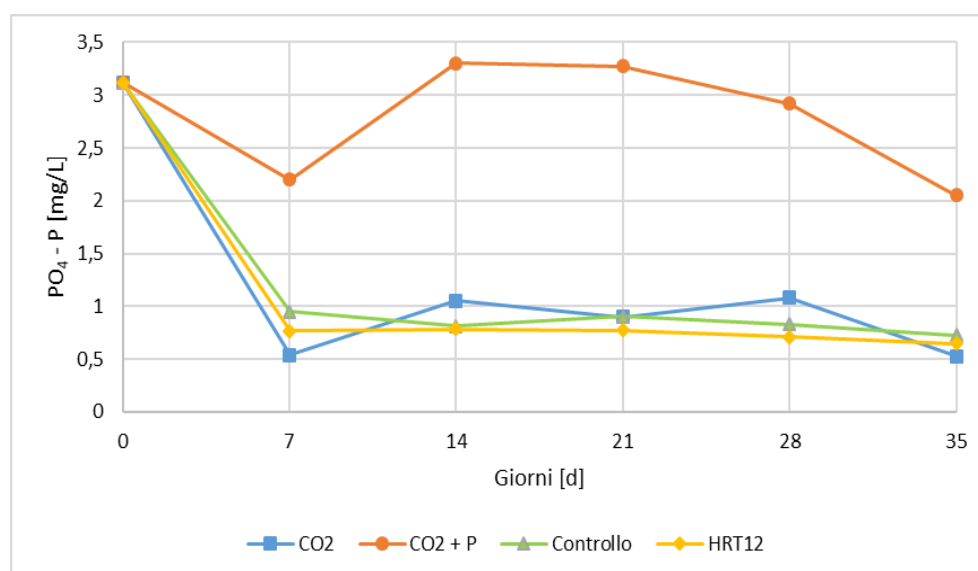


Figura 4.2.32: Concentrazioni di fosforo durante la prova nei reattori di crescita.

Come si può notare dal grafico 4.2.32, il profilo temporale delle concentrazioni di fosforo della colonna CO<sub>2</sub>+P si distacca dalle altre tre colonne. Tale comportamento è in linea con le condizioni operative a cui è stato soggetto tale reattore, poiché per esso è stato aggiustato il rapporto N/P del refluo in alimentazione tramite aggiunta di fosforo. Nelle altre tre colonne, per cui non è stata prevista tale modifica, il comportamento è risultato pressoché identico. A seguito di un consumo iniziale di questo nutriente,

---

testimoniato dal calo di concentrazione registrato, si è assistito nel corso della prova ad una stabilizzazione dei valori attorno a 1 mg/L per i reattori CO<sub>2</sub>, Controllo e HRT12 e attorno al valore di 3 mg/L per il reattore CO<sub>2</sub>+P. Il maggior apporto di fosforo presente nel reattore CO<sub>2</sub>+P non ha influito sulle rese di crescita della popolazione microalgale, la quale si è sviluppata ugualmente nel reattore CO<sub>2</sub>, registrando perfino valori di assorbanza superiori. Tale risultato permette di assumere che l'immissione aggiuntiva di fosforo oltre a quella presente nel refluo in alimentazione non ha portato benefici alla crescita delle microrganismi.

### COD

L'andamento delle concentrazioni di COD, registrate durante la prova, è stato riportato nella figura 4.2.33.

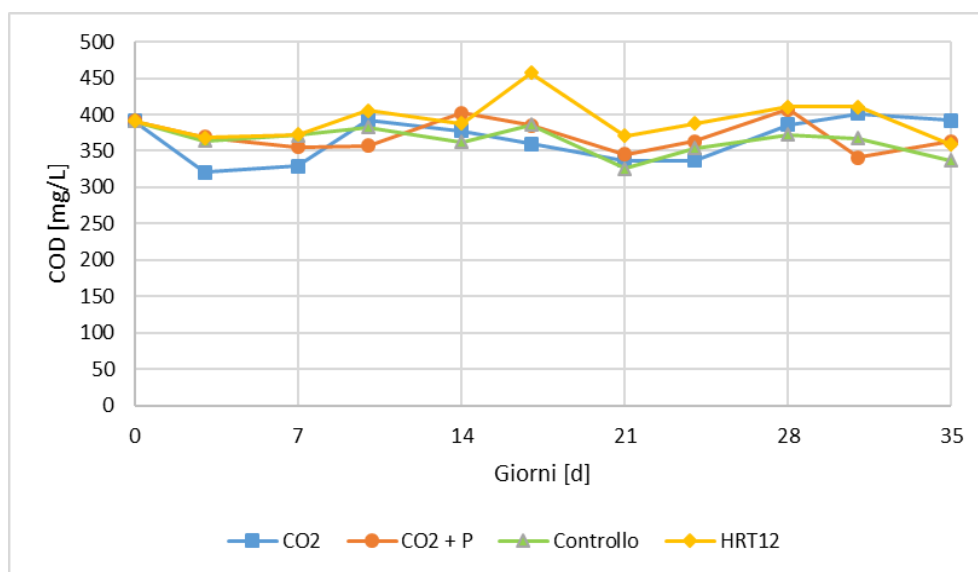


Figura 4.2.33: Concentrazioni di COD durante la prova nei reattori di crescita.

Il profilo temporale di concentrazione del COD è sempre stato stabile in tutti i reattori di crescita con valori intorno a 400 mg/L circa. Da tale comportamento si può dedurre che il COD in ingresso, tramite il refluo, sia stato di volta in volta degradato dall'attività batterica carbonio-degradante fornendo la CO<sub>2</sub> necessaria per la crescita microalgale.

---

Siccome gli andamenti sono risultati piuttosto simili in tutte le colonne di crescita, si può affermare che per questo parametro le condizioni operative differenti non abbiano influito sul suo andamento, probabilmente sintomo del fatto che tale nutriente fosse presente in abbondanza rispetto alle necessità del sistema biologico.

#### **4.2.2.6 Parametri aggregati**

La durata della prova e il comportamento controllato che ha avuto nel periodo della sperimentazione ha comportato il fatto che l'intera prova può essere considerata come stazionaria. Per questo motivo questa seconda prova di crescita su refluo zootecnico WW1 non è stata oggetto di un'analisi dello stato stazionario come le precedenti (vedi capitolo 4.1.2.9 e 4.2.1.9). I risultati presentati in questo paragrafo sono dunque indicatori effettivi e robusti dell'andamento effettivo della prova.

##### **Ammonio**

Come per la sperimentazione precedente, sono stati ricavati i ratei medi di rimozione, attraverso la metodologia descritta nel capitolo 3.5.2.

- Colonna CO<sub>2</sub>: 20,6 ± 12,6 mgNH<sub>4</sub>/L/d
- Colonna CO<sub>2</sub>+P: 20,1 ± 11,6 mgNH<sub>4</sub>/L/d
- Colonna Controllo: 19,4 ± 11,7 mgNH<sub>4</sub>/L/d
- Colonna HRT12: 19,8 ± 12,3 mgNH<sub>4</sub>/L/d

Nel grafico in figura 4.2.34, invece, è stata riportata la curva di rimozione cumulata dell'ammonio.

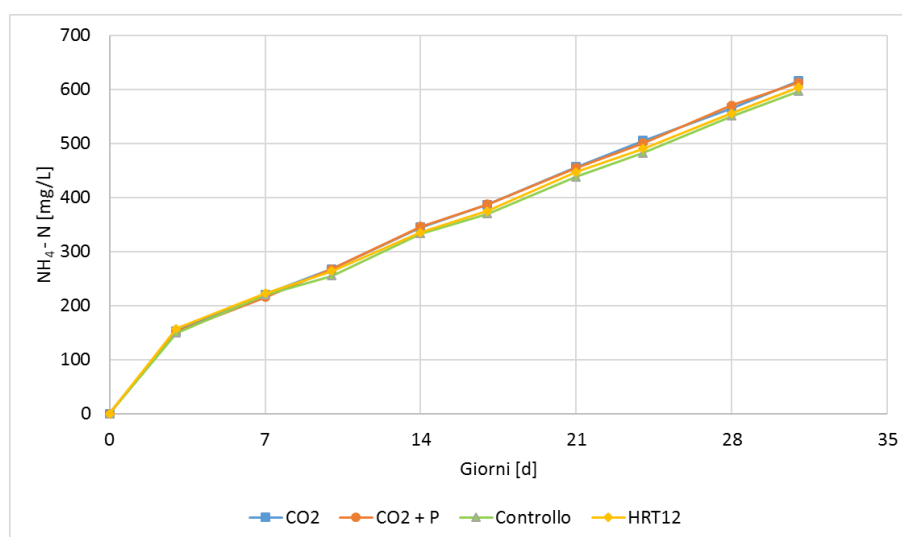


Figura 4.2.34: Rimozioni cumulate dell'ammonio nei reattori di crescita.

Anche in questa seconda prova sono stati ricavati andamenti delle curve di rimozione cumulata pressoché lineari. L'unica discontinuità presente è stata misurata in corrispondenza dei primi giorni di sperimentazione, giustificata dalla fase di crescita esponenziale delle microalghe, che ha comportato una forte rimozione dell'ammonio. È importante notare come le diverse condizioni operative non abbiano influito sulle rese di rimozione, probabilmente perché tale nutriente è risultato essere presente in abbondanza.

### NO<sub>x</sub>

Sono stati in seguito riportati i valori medi dei ratei di rimozione di NO<sub>2</sub> e NO<sub>3</sub>:

- Colonna CO<sub>2</sub>:  $-0,7 \pm 1,18$  mgNO<sub>2</sub>/L/d;  $0,36 \pm 0,33$  mg NO<sub>3</sub>/L/d
- Colonna CO<sub>2</sub>+P:  $-0,43 \pm 0,82$  mgNO<sub>2</sub>/L/d;  $0,37 \pm 0,32$  mg NO<sub>3</sub>/L/d
- Colonna Controllo:  $-0,44 \pm 0,91$  mgNO<sub>2</sub>/L/d;  $0,37 \pm 0,33$  mg NO<sub>3</sub>/L/d
- Colonna HRT12:  $-0,54 \pm 0,86$  mgNO<sub>2</sub>/L/d;  $0,37 \pm 0,3$  mg NO<sub>3</sub>/L/d

Nella figura 4.2.35, 4.2.36 e 4.2.37 sono stati riportati i grafici delle rimozioni cumulate per entrambe le sostanze azotate e per la somma di esse.



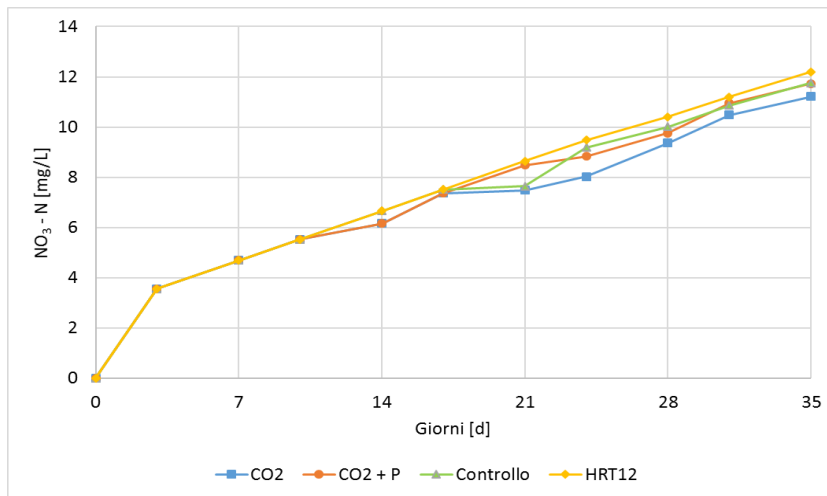


Figura 4.2.35: Rimozioni cumulate di NO<sub>3</sub> nei reattori di crescita.

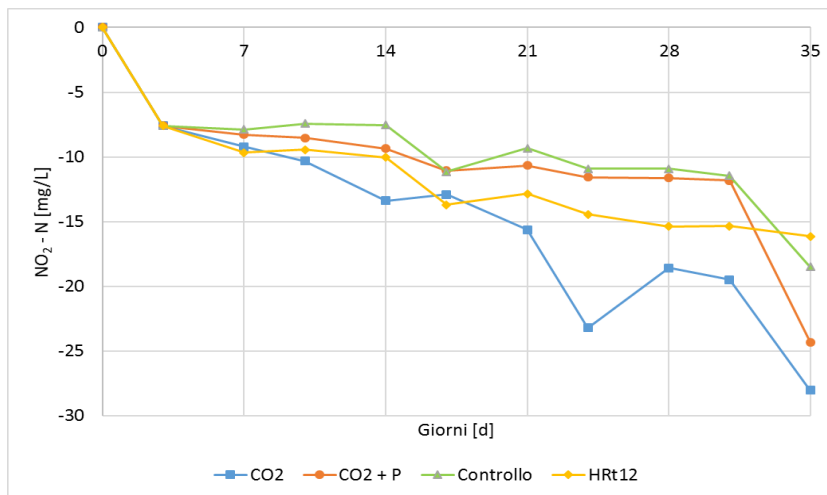


Figura 4.2.36: Rimozioni cumulate nei reattori di crescita di NO<sub>2</sub>.

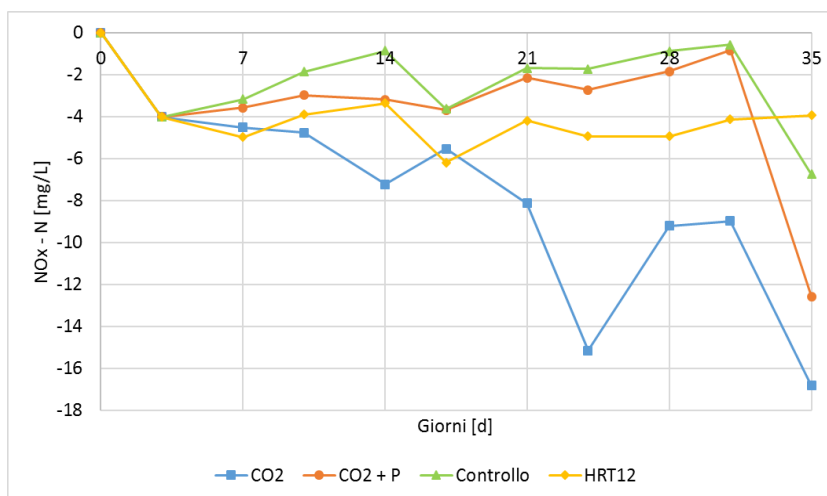


Figura 4.2.37: Rimozioni cumulate degli NO<sub>x</sub> nei reattori di crescita.

---

A differenza della prova 1, il nitrato è stato rimosso lungo la sperimentazione e non prodotto. Tale comportamento probabilmente è dovuto al fatto che nel refluo in alimentazione era presente, seppur in concentrazioni basse, tale sostanza, la quale era assente nel refluo utilizzato nella prova 1. L'NO<sub>3</sub> alimentato è stato consumato dalle microalghe di volta in volta, motivo per cui si è verificata una rimozione di tale sostanza lungo il periodo sperimentale. Per quanto riguarda il nitrito, invece, è stata registrata una continua produzione lungo la sperimentazione. Il trend riscontrato, probabilmente, è dovuto sia alle concentrazioni di fondo, provenienti dal refluo, che non sono state trasformate dai batteri NOB, che ad una quota parte di ammonio che è stato ossidato a NO<sub>2</sub> tramite i batteri AOB. Gli andamenti nel tempo sono risultati piuttosto simili nei reattori CO<sub>2</sub>+P, Controllo e HRT12, mentre vi è stata una produzione maggiore nella colonna CO<sub>2</sub>, soprattutto verso la fine della sperimentazione. Il picco di produzione registrato in corrispondenza del giorno 24 può essere dovuto ad un'inibizione dei batteri NOB a causa di un elevato valore di pH (circa 11,5). Tale inibizione si è tradotta in un accumulo di NO<sub>2</sub> che non è stato trasformato in NO<sub>3</sub>. Tra i diversi reattori, sottoposti a condizioni operative differenti, non sono stati riscontrati comportamenti differenti.

### **Azoto totale**

I ratei medi di rimozione dell'azoto totale sono i seguenti:

- Colonna CO<sub>2</sub>: 19,5 ± 10,7 mgN<sub>tot</sub>/L/d
- Colonna CO<sub>2</sub>+P: 19,7 ± 10,6 mgN<sub>tot</sub>/L/d
- Colonna Controllo: 19,1 ± 10,6 mgN<sub>tot</sub>/L/d
- Colonna HRT12: 19,4 ± 11,3 mgN<sub>tot</sub>/L/d

È stata ricavata la curva di rimozione cumulata per tutti i reattori: i risultati sono stati riportati nella figura 4.2.38.

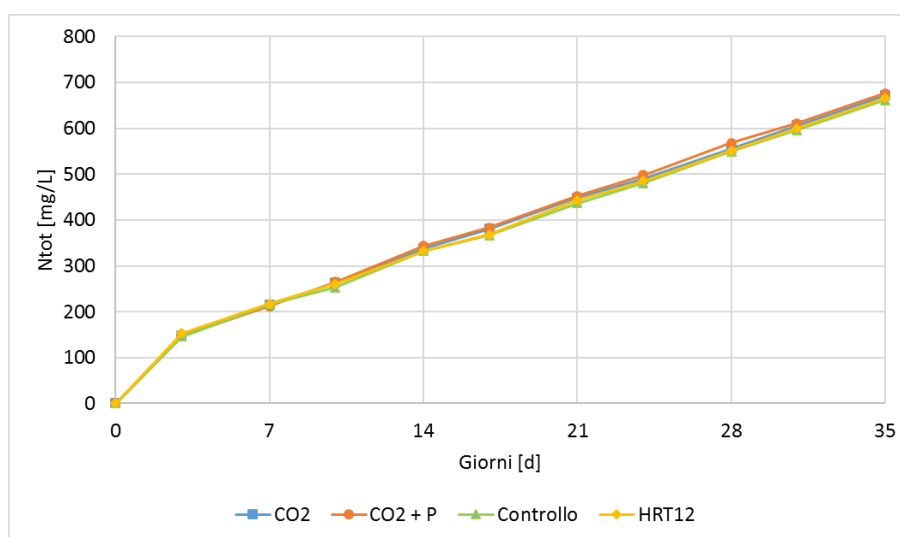


Figura 4.2.38: Curve di rimozione cumulate dell'azoto totale.

Gli andamenti riportati in figura 4.2.38 sono estremamente simili per tutte le colonne e rispecchiano piuttosto fedelmente quegli ottenuti per l'ammonio: tale analogia trova una giustificazione nelle basse rese di rimozione riscontrate per gli  $\text{NO}_x$ , quasi trascurabili nei confronti di quelle misurate per l'azoto ammoniacale.

### **Azoto strippato**

Applicando la metodologia presentata nel capitolo 3.5.3 è stata effettuata una quantificazione dell'azoto strippato:

- Colonna  $\text{CO}_2$ : 214,6 mgN/L pari al 32% del totale rimosso
- Colonna  $\text{CO}_2+\text{P}$ : 271,9 mgN/L pari al 40% del totale rimosso
- Colonna Controllo: 414,52 mgN/L pari al 62% del totale rimosso
- Colonna HRT12: 385,5 mgN/L pari al 58% del totale rimosso

Dalle percentuali ricavate e si può notare come la percentuale di azoto strippato nelle colonne senza insufflazione di anidride carbonica sia più elevata. Tale considerazione era del tutto prevedibile, essendo analoghi i tassi di rimozioni, ma diverse le crescite ottenute. Questo risultato sottolinea l'importanza della quantificazione dell'azoto strippato poiché, grazie a questo

---

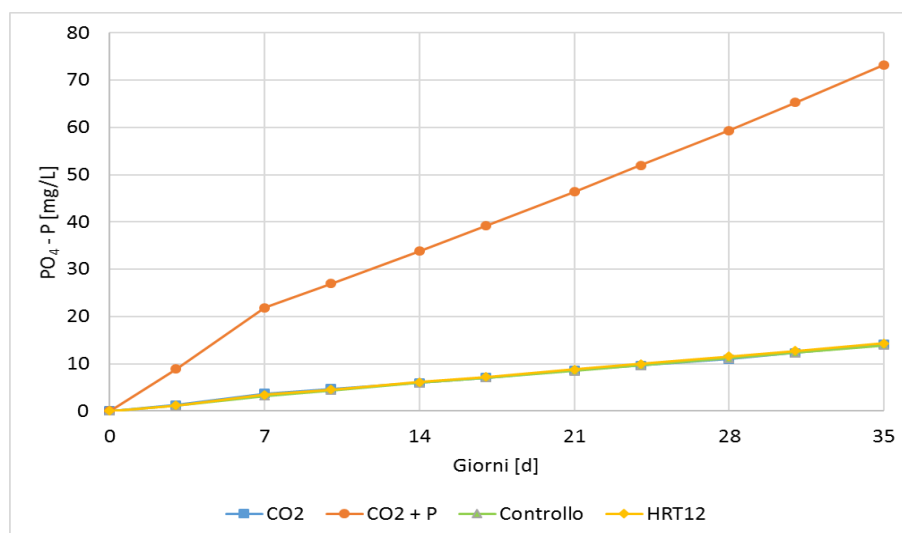
dato, si è potuto osservare come non basti quantificare quanto azoto viene rimosso dal sistema, ma bisogna anche calcolare quanto azoto sia effettivamente assimilato dalle microalghe.

### **Fosforo**

I ratei medi di rimozione del fosforo sono i seguenti:

- Colonna CO<sub>2</sub>: 0,39 ± 0,09 mgP/L/d
- Colonna CO<sub>2</sub>+P: 2,09 ± 0,54 mgP/L/d
- Colonna Controllo: 0,39 ± 0,05 mgP/L/d
- Colonna HRT12: 0,4 ± 0,06 mgP/L/d

Nella figura 4.2.39, invece, sono stati riportati i grafici delle curve di rimozione del fosforo.



*Figura 4.2.39: Rimozioni cumulative di fosforo nei reattori di crescita.*

Nella figura 4.2.39 è possibile notare come vi sia una differenza tra le rimozioni avvenute nei reattori CO<sub>2</sub>, Controllo e HRT12 e quella avvenute nel reattore CO<sub>2</sub>+P, la maggior rimozione rilevata nel reattore CO<sub>2</sub>+P è strettamente legata al maggior ingresso di fosforo con l'alimento.

### **COD**

Infine sono stati riportati i valori medi dei ratei di rimozione del COD:

- Colonna CO<sub>2</sub>: 37,9 ± 9,6 mgCOD/L/d
- Colonna CO<sub>2</sub>+P: 38,7 ± 14,7 mgCOD/L/d
- Colonna Controllo: 37,6 ± 12,3 mgCOD/L/d
- Colonna HRT12: 33,1 ± 13,9 mgCOD/L/d

Nella figura 4.2.40, invece, sono state riportate le curve di rimozione del COD.

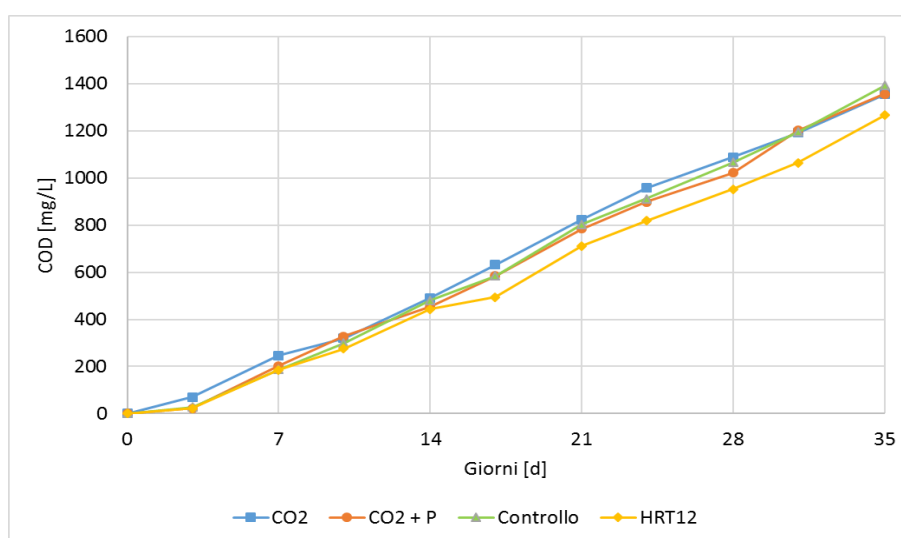


Figura 4.2.40: Rimozione cumulata del COD nei reattori di crescita.

Come si può notare dal grafico in figura 4.2.40, le rimozioni sono simili in tutti i reattori, con rimozioni pressoché lineari. Rispetto alla prova precedente vi è stata una minore rimozione del COD, dell'ordine di circa 200-300 mg/L al termine della prova.

#### 4.2.2.7 Rese di rimozione

Le rese percentuali di rimozione sono riportate nella tabella 4.2.17.

Tabella 4.2.17: Rese di rimozione (%) del sistema di coltivazione microalgale.

	N <sub>TOT</sub> [%]	NH <sub>4</sub> [%]	P [%]	COD [%]
CO <sub>2</sub>	76	88	74	42
CO <sub>2</sub> +P	77	88	83	42
Controllo	75	86	73	43
HRT12	76	86	75	39

Le rese di rimozione ottenute si sono rivelate anche in questa seconda prova modeste nei confronti della rimozione del COD. Rispetto alla prova 1 si rileva un aumento della rimozione del fosforo e dell'azoto. Il tasso di rimozione delle sostanze azotate uguale per tutti i reattori di crescita conferma quanto enunciato in precedenza (si rimanda al paragrafo 4.2.2.7, strippaggio).

#### 4.2.2.8 Analisi statistiche

##### Prove di analogie sui replicati

Applicando la metodologia descritta nel paragrafo 3.5.3 sono stati ottenuti i seguenti risultati riportati nelle tabelle 4.2.18-22. Con questi test sono state verificate le ipotesi di riproducibilità a coppie delle colonne.

Tabella 4.2.18: Risultati dei t-test applicati alle concentrazioni di ammonio.

	<b>CO<sub>2</sub></b>	<b>CO<sub>2</sub>+P</b>	<b>Controllo</b>	<b>HRT12</b>
<b>CO<sub>2</sub></b>		0,99	< 0,05	< 0,05
<b>CO<sub>2</sub>+P</b>	0,99		< 0,05	< 0,05
<b>Controllo</b>	< 0,05	< 0,05		0,34
<b>HRT12</b>	< 0,05	< 0,05	0,34	

Tabella 4.2.19: Risultati dei t-test applicati alle concentrazioni di nitrato.

	<b>CO<sub>2</sub></b>	<b>CO<sub>2</sub>+P</b>	<b>Controllo</b>	<b>HRT12</b>
<b>CO<sub>2</sub></b>		0,21	0,22	< 0,05
<b>CO<sub>2</sub>+P</b>	0,21		0,99	0,14
<b>Controllo</b>	0,22	0,99		0,25
<b>HRT12</b>	< 0,05	0,14	0,25	

Tabella 4.2.20: Risultati dei t-test applicati alle concentrazioni di nitrito.

	<b>CO<sub>2</sub></b>	<b>CO<sub>2</sub>+P</b>	<b>Controllo</b>	<b>HRT12</b>
<b>CO<sub>2</sub></b>		0,13	< 0,05	0,11
<b>CO<sub>2</sub>+P</b>	0,13		0,21	0,82
<b>Controllo</b>	< 0,05	0,21		0,54
<b>HRT12</b>	0,11	0,82	0,54	

Tabella 4.2.21: Risultati dei t-test applicati alle concentrazioni di COD.

	<b>CO<sub>2</sub></b>	<b>CO<sub>2</sub>+P</b>	<b>Controllo</b>	<b>HRT12</b>
<b>CO<sub>2</sub></b>		0,61	0,93	< 0,05
<b>CO<sub>2</sub>+P</b>	0,61		0,39	< 0,05
<b>Controllo</b>	0,93	0,39		< 0,05
<b>HRT12</b>	< 0,05	< 0,05	< 0,05	

Tabella 4.2.22: Risultati dei t-test applicati alle concentrazioni di fosforo.

	<b>CO<sub>2</sub></b>	<b>CO<sub>2</sub>+P</b>	<b>Controllo</b>	<b>HRT12</b>
<b>CO<sub>2</sub></b>		< 0,05	0,86	0,48
<b>CO<sub>2</sub>+P</b>	< 0,05		< 0,05	< 0,05
<b>Controllo</b>	0,86	< 0,05		< 0,05
<b>HRT12</b>	0,48	< 0,05	< 0,05	

Come si può notare dalla tabella 4.2.18 è stato rilevato accoppiamento tra le colonne con e senza insufflazione di anidride carbonica per quanto concerne l'ammonio, ovvero la sostanza azotata più presente nel refluo in alimentazione. Dalle tabelle 4.2.19 e 4.21.20, invece, si può notare come vi sia accoppiamento tra gli andamenti delle concentrazioni di nitrato e nitrito, tra tutte le colonne, a causa della bassa attività batterica rilevata in tutti i reattori.

Non sono stati riportati i risultati dei t-test applicati ai parametri di assorbanza e torbidità poiché per nessuna coppia di reattori è stato rilevato accoppiamento. Gli andamenti di questi parametri nelle colonne con e senza insufflazione di CO<sub>2</sub>, per quanto simili, non sono risultati statisticamente uguali. Applicando successivamente un t-test ad una coda è stato dimostrato, successivamente, che la colonna CO<sub>2</sub> è stata quella caratterizzata da un valore di assorbanza mediamente più elevato.

Per questa seconda prova non sono stati effettuati **test d'inferenza statistica** poiché la modesta numerosità del campione non permette di avere serie abbastanza lunghe da fornire robustezza all'analisi.

---

#### 4.2.2.9 Valutazioni stechiometriche

In maniera del tutto analoga a quanto fatto per la prova1 e i cui risultati sono stati riportati nel paragrafo 4.2.1.11, sono state effettuate le analisi stechiometriche per verificare se il set-up sperimentale di crescita abbia sostenuto i processi di formazione delle microalghe e di ossidazione dei nutrienti. I risultati di questa analisi sono riportati in tabella 4.2.23.

*Tabella 4.2.23: Risultati calcoli stechiometrici relativi a produzioni di O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> e alle relative quantità necessarie alla sostenibilità dei processi interni, riferiti alla prova 2.*

	Reattori			
	CO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> +P	Controllo	HRT12
O <sub>2</sub> prodotto [g/L/d]	0,18	0,18	0,12	0,12
O <sub>2</sub> necessario per nitrificazione [g/L/d]	0,002	0,002	0,002	0,002
O <sub>2</sub> necessario per ossidazione COD [g/L/d]	0,01	0,01	0,01	0,01
CO <sub>2</sub> prodotta da ossidazione COD [g/L/d]	Insufflata	Insufflata	0,09	0,08
CO <sub>2</sub> necessaria per produzione biomassa[g/L/d]	Insufflata	Insufflata	0,11	0,12

Dalla tabella 4.2.23 si può notare come, anche in questo caso, l'ossigeno prodotto dalle microalghe sia stato sufficiente a supportare i processi di ossidazione dell'azoto ammoniacale e del COD. Quest'ultimo processo, nelle colonne Controllo e HRT12, tuttavia, non ha prodotto abbastanza CO<sub>2</sub> per sostenere in autonomia il processo di crescita delle microalghe, così come riscontrato nella prova 1. Per questo motivo, nelle colonne CO<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>+P, in cui è stata insufflata anidride carbonica, si è osservata una crescita nettamente superiore.



---

## **CAPITOLO 5**

### **CONCLUSIONI**

Le prove di crescita su digestato hanno riportato i seguenti risultati: ratei medi di crescita algale compresi tra 56 e 69 mgVSS/L/d, in tutti i reattori, con rese di rimozioni pari al 45% per l'azoto totale, comprese tra il 60% e il 90% per l'ammonio, per il fosforo pari al 50% nelle colonne con correzione del rapporto N/P e al 90% nelle colonne senza correzione, e infine rese di rimozione del COD pari al 65%, in tutte le colonne. Dai risultati si è potuto osservare come le basse concentrazioni di fosforo non abbiano influito negativamente sulla crescita. Tale risultato potrebbe risultare particolarmente interessante sotto l'aspetto dei costi di processo: l'osservata mancata necessità di un'aggiunta di fosforo per bilanciare il rapporto N/P e favorirne la crescita, rende il sistema di crescita meno oneroso e, quindi, potenzialmente più interessante. L'HRT utilizzato (pari a 10 giorni) è stato presumibilmente limitante nei confronti della crescita. La necessità di lavorare ad HRT più elevati, qualora fossero richieste efficienze di depurazione superiori, unitamente alla necessità di diluire il refluo viste le alte concentrazioni da cui è caratterizzato, rendono tuttavia il sistema di trattamento studiato potenzialmente poco sostenibile, a livello di spazi richiesti. Ulteriori criticità potrebbero essere rappresentate dalla necessità dell'insufflazione di CO<sub>2</sub>, al fine di contenere i fenomeni collegati allo

---

strippaggio, e dalla necessità di agitare la sospensione. Tali procedure hanno, infatti, un costo associato non trascurabile.

Le prove di crescita sul WW1 hanno riportato i seguenti risultati: ratei medi di crescita algale pari a 57 mgVSS/L/d per la prova 1 e compresi tra e 61 mgVSS/L/d e 110 mgVSS/L/d nella prova 2; rese di rimozioni pari al 65% e 75% per l'azoto totale nelle prove 1 e 2, pari al 65% e 85% per l'ammonio, pari al 50% e 70% per il fosforo e infine rese di rimozione del COD pari al 40% in entrambe le prove. In tutte le colonne si è potuto osservare come le microalghe siano riuscite a crescere sul flusso senza necessità di diluizione.

Dal confronto delle due prove effettuate si è tuttavia notato come il sistema di crescita sia limitato dalla disponibilità di CO<sub>2</sub>: per ottimizzare le crescite ne è stata necessaria l'insufflazione il che comporta, evidentemente, impatti di tipo economico. Anche in queste prove l'HRT è stato probabilmente un fattore limitante nei confronti delle rese: laddove se ne volessero ottenere di più elevate si dovrebbe operare ad HRT maggiori. Di contro, anche in queste prove di crescita, è stata riscontrata la mancanza di benefici dovuti alla correzione del rapporto N/P del refluo alimentato, tramite aggiunta esterna di fosforo.

Fare un'analisi delle criticità elencate per entrambe le prove potrebbe essere particolarmente interessante, nell'ottica dell'applicazione del trattamento studiato a vasta scala.

---

## Riferimenti bibliografici

1. Al-Qasmi, M., Raut, N., Talebi, S., Al-Rajhi, S., & Al-Barwani, T. (2012, July). A review of effect of light on microalgae growth. In *Proceedings of the world congress on engineering* (Vol. 1, pp. 4-6).
2. Arias D.M., Uggetti E., García-Galàn M.J., García J. (2017). Cultivation and selection of cyanobacteria in a closed photobioreactor used for secondary effluent and digestate treatment. *Science of Total Environment* 587-588, 157-167.
3. Arumugam, M., Agarwal, A., Arya, M. C., & Ahmed, Z. (2013). Influence of nitrogen sources on biomass productivity of microalgae *Scenedesmus bijugatus*. *Bioresource technology*, 131, 246-249.
4. Barbosa, M. J. (2003). *Microalgal photobioreactors: scale-up and optimization*.
5. Beccari, M., Passino, R., Ramadori, R., & Vismara, R. (1993). *Rimozione di azoto e fosforo dai liquami: basi microbiologiche e biochimiche della nitrificazione denitrificazione e defosfatazione trattamenti biologici e chimico fisici delle acque criteri di dimensionamento*. Hoepli.
6. Becker, E. W. (1994). *Microalgae: biotechnology and microbiology* (Vol. 10). Cambridge University Press.
7. Beuckels, A., Smolders, E., & Muylaert, K. (2015). Nitrogen availability influences phosphorus removal in microalgae-based wastewater treatment. *Water research*, 77, 98-106.
8. Bonomo, L., Masotti, L., & Verlicchi, P. (2008). Trattamenti delle acque reflue.
9. Borowitzka, L. J., & Borowitzka, M. A. (1990). Commercial production of  $\beta$ -carotene by *Dunaliella salina* in open ponds. *Bulletin of Marine Science*, 47(1), 244-252.
10. Boussiba, S., & Gibson, J. (1991). Ammonia translocation in cyanobacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 88(1), 1-14.
11. Brown, M. R., Jeffrey, S. W., Volkman, J. K., & Dunstan, G. A. (1997). Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151(1-4), 315-331.
12. Cai, T., Park, S. Y., & Li, Y. (2013). Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 19, 360-369.

- 
13. Chen, W., Tong, H., & Liu, H. (2012). Effects of nitrate on nitrite toxicity to *Microcystis aeruginosa*. *Marine pollution bulletin*, 64(6), 1106-1111.
  14. Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, 25(3), 294-306.
  15. Choi, O., Das, A., Yu, C. P., & Hu, Z. (2010). Nitrifying bacterial growth inhibition in the presence of algae and cyanobacteria. *Biotechnology and bioengineering*, 107(6), 1004-1011.
  16. Chojnacka, K., & Marquez-Rocha, F. J. (2004). Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. *Biotechnology*, 3(1), 21-34.
  17. Converti, A., Casazza, A. A., Ortiz, E. Y., Perego, P., & Del Borghi, M. (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 48(6), 1146-1151.
  18. De-Bashan, L. E., Antoun, H., & Bashan, Y. (2005). Cultivation factors and population size control the uptake of nitrogen by the microalgae *Chlorella vulgaris* when interacting with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Ecology*, 54(2), 197-203.
  19. De-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2010). Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects. *Bioresource technology*, 101(6), 1611-1627.
  20. de Godos, I., Blanco, S., García-Encina, P. A., Becares, E., & Muñoz, R. (2009). Long-term operation of high rate algal ponds for the bioremediation of piggery wastewaters at high loading rates. *Bioresource Technology*, 100(19), 4332-4339.
  21. de Godos, I., Vargas, V. A., Blanco, S., González, M. C. G., Soto, R., García-Encina, P. A., ... & Muñoz, R. (2010). A comparative evaluation of microalgae for the degradation of piggery wastewater under photosynthetic oxygenation. *Bioresource Technology*, 101(14), 5150-5158.
  22. de Godos, I., Vargas, V. A., Blanco, S., González, M. C. G., Soto, R., García-Encina, P. A., ... & Muñoz, R. (2010). A comparative evaluation of microalgae for the degradation of piggery wastewater under photosynthetic oxygenation. *Bioresource Technology*, 101(14), 5150-5158.
  23. de la Noue, J., & de Pauw, N. (1988). The potential of microalgal biotechnology: a review of production and uses of microalgae. *Biotechnology advances*, 6(4), 725-770.
  24. Dodds, W., Whiles, M. (2010). *Freshwater Ecology. Concepts and Environmental Applications of Limnology*. II edizione, pp 829. Academic Press.
  25. Elser, J. J. (2012). Phosphorus: a limiting nutrient for humanity? *Current opinion in biotechnology*, 23(6), 833-838.

- 
26. Eriksen, N. T. (2008). The technology of microalgal culturing. *Biotechnology letters*, 30(9), 1525-1536.
  27. Geider, R. J., & La Roche, J. (2002). Redfield revisited: variability of C [ratio] N [ratio] P in marine microalgae and its biochemical basis. *European Journal of Phycology*, 37(1), 1-17.
  28. Golueke, C. G., Oswald, W. J., & Gotaas, H. B. (1957). Anaerobic digestion of algae. *Applied microbiology*, 5(1), 47.
  29. González, C., Marciniak, J., Villaverde, S., García-Encina, P. A., & Muñoz, R. (2008). Microalgae-based processes for the biodegradation of pretreated piggery wastewaters. *Applied microbiology and biotechnology*, 80(5), 891-898.
  30. González-Fernández, C., Molinuevo-Salces, B., & García-González, M. C. (2011). Nitrogen transformations under different conditions in open ponds by means of microalgae–bacteria consortium treating pig slurry. *Bioresource technology*, 102(2), 960-966.
  31. Hena, S., Fatimah, S., & Tabassum, S. (2015). Cultivation of algae consortium in a dairy farm wastewater for biodiesel production. *Water Resources and Industry*, 10, 1-14.
  32. Hena, S., Fatimah, N., Tabassum, S., & Ismail, N. (2015). Three stage cultivation process of facultative strain of *Chlorella sorokiniana* for treating dairy farm effluent and lipid enhancement. *Water research*, 80, 346-356.
  33. Hoffmann, J. P. (1998). Wastewater treatment with suspended and nonsuspended algae. *Journal of Phycology*, 34(5), 757-763.
  34. International Lake Environment Committee (ILEC) 1994. Lake Biwa Research Institute and International Lake Environment Committee; Data Book of World Lake Environments-a Survey of the State of World Lakes. Vol. IV. 1994. ILEC and United Nations Environment Programme, Otsu.
  35. Lee, S. H., Ahn, C. Y., Jo, B. H., Lee, S. A., Park, J. Y., An, K. G., & Oh, H. M. (2013). Increased microalgae growth and nutrient removal using balanced N: P ratio in wastewater. *J Microbiol Biotechnol*, 23(1), 9.
  36. Liu, J., & Vyverman, W. (2015). Differences in nutrient uptake capacity of the benthic filamentous algae *Cladophora* sp., *Klebsormidium* sp. and *Pseudanabaena* sp. under varying N/P conditions. *Bioresource technology*, 179, 234-242.
  37. Markou, G., Vandamme, D., & Muylaert, K. (2014). Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. *Water research*, 65, 186-202.
  38. Martinez, M. E., Jimenez, J. M., & El Yousfi, F. (1999). Influence of phosphorus concentration and temperature on growth and phosphorus uptake by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, 67(3), 233-240.

- 
39. Mandalam, R. K., & Palsson, B. Ø. (1998). Elemental balancing of biomass and medium composition enhances growth capacity in high-density *Chlorella vulgaris* cultures.
  40. Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 14(1), 217-232.
  41. Moheimani, N. R. (2005). *The culture of coccolithophorid algae for carbon dioxide bioremediation* (Doctoral dissertation, Murdoch University).
  42. Mujtaba, G., & Lee, K. (2016). Advanced Treatment of Wastewater Using Symbiotic Co-culture of Microalgae and Bacteria. *Applied Chemistry for Engineering*, 27(1), 1-9.
  43. Mussnug, J. H., Klassen, V., Schlüter, A., & Kruse, O. (2010). Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *Journal of biotechnology*, 150(1), 51-56.
  44. Oswald, W. J., & Gotaas, H. B. (1957). Photosynthesis in sewage treatment. *Trans. Am. Soc. Civ. Eng.*, 122(1), 73-105.
  45. Oswald, W. J. (1988). Micro-algae and waste-water treatment.
  46. Perez-Garcia, O., Escalante, F. M., de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water research*, 45(1), 11-36.
  47. Powell, N., Shilton, A. N., Pratt, S., & Chisti, Y. (2008). Factors influencing luxury uptake of phosphorus by microalgae in waste stabilization ponds. *Environmental science & technology*, 42(16), 5958-5962.
  48. Raposo, M. F. D. J., & Morais, R. M. S. C. (2011). *Chlorella vulgaris* as soil amendment: Influence of encapsulation and enrichment with rhizobacteria.
  49. Redfield, A. C. (1958). The biological control of chemical factors in the environment. *American scientist*, 46(3), 230A-221.
  50. Rhee, G. Y. (1978). Effects of N: P atomic ratios and nitrate limitation on algal growth, cell composition, and nitrate uptake. *Limnology and oceanography*, 23(1), 10-25.
  51. Rodhe, W. (1969). Crystallization of eutrophication concepts in northern Europe.
  52. Ruiz-Martínez, A., Serralta, J., Romero, I., Seco, A., & Ferrer, J. (2015). Effect of intracellular P content on phosphate removal in *Scenedesmus* sp. Experimental study and kinetic expression. *Bioresource technology*, 175, 325-332.
  53. Sorokin, C., & Krauss, R. W. (1958). The Effects of Light Intensity on the Growth Rates of Green Algae. *Plant physiology*, 33(2), 109.
  54. Spaargaren, D. H. (1996). The design of culture media based on the elemental composition of biological material. *Journal of biotechnology*, 45(2), 97-102.

- 
55. Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of bioscience and bioengineering*, 101(2), 87-96.
  56. Su, Y., Mennerich, A., & Urban, B. (2016). A comparison of feasible methods for microalgal biomass determinations during tertiary wastewater treatment. *Ecological Engineering*, 94, 532-536.
  57. Van Wagenen, J., Miller, T. W., Hobbs, S., Hook, P., Crowe, B., & Huesemann, M. (2012). Effects of light and temperature on fatty acid production in *Nannochloropsis salina*. *Energies*, 5(3), 731-740.
  58. Vargas, J. V. C. (2011). Stoichiometric model of the cultivation of microalgae in industrial systems. *HNO*, 397(439.23), 439-23.
  59. Vonshak, A. (Ed.). (1997). *Spirulina platensis arthrospira: physiology, cell-biology and biotechnology*. CRC Press.
  60. Wang, Liang, et al. "Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella* sp." *Bioresource technology*101.8 (2010): 2623-2628.
  61. Wang, L., Min, M., Li, Y., Chen, P., Chen, Y., Liu, Y. & Ruan, R. (2010). Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Applied biochemistry and biotechnology*, 162(4), 1174-1186.
  62. Whitton, R., Le Mével, A., Pidou, M., Ometto, F., Villa, R., & Jefferson, B. (2016). Influence of microalgal N and P composition on wastewater nutrient remediation. *Water research*, 91, 371-378.
  63. Williams JA. Keys to Bioreactor selection. CEP Magazine 2002; 34–41.
  64. World population prospects: The 2015 revision, key findings and advance tables
  65. Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G., & Ying-xue, S. (2010). Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource technology*, 101(14), 5494-5500.
  66. Yuan, Z., Bi, J., & Moriguichi, Y. (2006). The circular economy: A new development strategy in China. *Journal of Industrial Ecology*, 10(1-2), 4-8.
  67. Zhu, L., Wang, Z., Shu, Q., Takala, J., Hiltunen, E., Feng, P., & Yuan, Z. (2013). Nutrient removal and biodiesel production by integration of freshwater algae cultivation with piggery wastewater treatment. *Water research*, 47(13), 4294-4302.

---



---

# APPENDICE A

## CALCOLI STECHIOMETRICI

### A.1 Calcoli stechiometrici prova con insufflazione aria

Sono qui riportati i calcoli stechiometrici effettuati nella prima sperimentazione relativi alla determinazione delle concentrazioni dei nutrienti nel medium di crescita.

A partire dai dati riportati in tabella 3.1.1 sono stati ricavati i valori in massa dei nutrienti per un volume di sospensione algale pari a 75 ml, applicando la seguente formula:

$$m_i[mg] = C_i \left[ \frac{mg}{L} \right] * V_i[L] \quad (A. 1.1)$$

Tabella A.1.1: Pesi delle diverse componenti derivanti dalla sospensione algale.

Componente	Peso [mg]
$NH_4^+-N$	4,85
$NO_3-N$	4,10
$NO_2-N$	15,75
$PO_4-P$	0
<i>N tot</i>	24,7
<i>P tot</i>	0

A partire da questi valori, la quantità di digestato da fornire ai reattori è stata valutata in modo da garantire una concentrazione di azoto totale su tutto il volume del reattore pari a 200 mg/L. Disponendo di un reattore di 1,5 L, sarà dunque necessaria una quantità totale di 300 mg di azoto, ricavata tramite la formula A.1.1. Applicando la seguente formula si ricava la quantità (in massa) di azoto da immettere attraverso il digestato:

$$m_{N,digestato} [mg] = m_{N,obiettivo} [mg] - m_{N,inoculo} [mg] \quad (A. 1.2)$$

Si ricava così che la quantità di azoto derivante dal digestato per ottenere la concentrazione obiettivo è 275,3 mg. Grazie alla tabella 3.1.2, è nota la concentrazione totale di azoto presente nel digestato. Applicando la seguente formula:

$$V_{digestato} [L] = \frac{m_{N,digestato} [mg]}{C_{N,digestato} \left[ \frac{mg}{L} \right]} \quad (A. 1.3)$$

È stato possibile ricavare il volume di digestato da immettere nei reattori al fine di garantire la concentrazione di azoto pari a 200 mg/L. Tale volumetria risulta pari a 0,201 L, ovvero 201 ml.

Al fine di operare con un rapporto N/P pari a 10 sono stati presi in considerazione gli apporti di fosforo dell'inoculo e del digestato utilizzando la formula A.1.1 a partire dai dati presenti in tabella 3.1.1 e 3.1.2.

*Tabella A.1.2: Apporti in termini di P dell'inoculo e del digestato.*

<i>Fonte</i>	<i>Fosforo [mg]</i>
<i>Sospensione algale</i>	0
<i>Digestato</i>	2,13

Essendo la concentrazione obiettivo di fosforo pari a 20 mg/L, applicando la formula A.1.1, si ricava che nei reattori dovranno essere presenti 30 mg di P. La quantità di fosforo da aggiungere per garantire tale concentrazione è ricavata mediante la seguente formula:

$$m_{P,da\ aggiungere}[mg] = m_{P,obiettivo}[mg] - m_{P,substrati}[mg] \quad (A.1.4)$$

Ne consegue una quantità di fosforo da aggiungere pari a 27,87 mg, che saranno forniti tramite l'aggiunta di sale  $KH_2PO_4$  dosato in funzione del suo peso molare attraverso la seguente formula:

$$m_{sale,da\ aggiungere}[g] = m_{P,da\ aggiungere} * \frac{m_{sale}[\frac{g}{mol}]}{m_P[\frac{g}{mol}]} \quad (A.1.5)$$

Risulta così un'aggiunta di  $KH_2PO_4$  pari a 0,1225, ovvero 122,46 mg.

## A.2 Calcoli stechiometrici prova con insufflazione di $CO_2$

Seguendo il medesimo procedimento si è giunti alla quantificazione delle diverse concentrazioni dei substrati all'interno dei reattori. Attraverso la A.1.1 e utilizzando i dati della tabella 3.2.1 sono stati ricavati gli apporti in massa di ogni componente derivante dalla sospensione algale. Il volume di sospensione è pari a 75 ml.

Tabella A.2.1: Pesi delle diverse componenti derivanti dalla sospensione algale.

Componente	Peso [mg]
$NH_4^+-N$	0
$NO_3^-N$	0
$NO_2^-N$	0,9
$PO_4^-P$	0,075

---

<i>N tot</i>	0,9
<i>P tot</i>	0,075

Attraverso l'utilizzo delle formule A.1.2 e A.1.3 è stato quantificato il volume di digestato da fornire ai reattori al fine di garantire una concentrazione di azoto pari a 200 mg/L. Il volume di digestato risulta pari a 220 ml. Si possono così quantificare gli apporti di fosforo grazie alla formula A.1.1.

*Tabella A.2.2: Apporti in termini di P dell'inoculo e del digestato.*

<i>Fonte</i>	<i>Fosforo [mg]</i>
<i>Sospensione algale</i>	0,075
<i>Digestato</i>	2,34

Applicando infine le formule A.1.4 e A.1.5 è stata determinata la quantità di sale da aggiungere per ottenere un rapporto N/P pari a 10. Tale quantità risulta pari a 0,1219 g, ovvero 122 mg di  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

### **A.3 Calcoli stechiometrici prova in semicontinuo**

Il procedimento è ancora una volta il medesimo. Attraverso l'utilizzo della formula A.1.1, sfruttando i dati riportati in tabella 3.3.1 sono stati ricavati gli apporti in massa delle sostanze azotate e del fosforo della sospensione algale. Il volume della sospensione utilizzato in questa sperimentazione è pari a 500 ml.

*Tabella A.3.1: Pesi delle diverse componenti derivanti dalla sospensione algale.*

<i>Componente</i>	<i>Peso [mg]</i>
$\text{NH}_4^+\text{-N}$	65
$\text{NO}_3\text{-N}$	8,05
$\text{NO}_2\text{-N}$	24
$\text{PO}_4\text{-P}$	8,6
<i>N tot</i>	97,05
<i>P tot</i>	8,6

---

Attraverso l'utilizzo delle formule A.1.2 e A.1.3 è stato ricavato il volume di digestato da fornire alle colonne per garantire una concentrazione di azoto totale pari a 200 mg/L. Tale volume risulta pari a 149 ml. Si possono così quantificare gli apporti di fosforo:

*Tabella A.3.2: Apporti in termini di P dell'inoculo e del digestato.*

<i>Fonte</i>	<i>Fosforo [mg]</i>
<i>Sospensione algale</i>	8,6
<i>Digestato</i>	1,59

In questa sperimentazione si è deciso installare con rapporto N/P aggiustato a 10 e due reattori caratterizzati da un rapporto N/P proprio della miscela ottenuta. Il sale per il bilanciamento del fosforo è dunque aggiunto solo alle colonne III e IV, ed è stato quantificato grazie alle formule A.1.4 e A.1.5. Tale aggiunta risulta pari a 0,087 g, ovvero 87 mg di  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

Risulta infine necessaria la caratterizzazione dell'influente che sarà alimentato due volte a settimana. Esso è costituito solamente da digestato diluito, avrà una concentrazione di 200 mg/L di azoto totale e per due colonne sarà immesso senza aggiunte esterne di fosforo, mentre per le restanti due sarà alimentato con rapporto N/P corretto a 10. Mediante la formula A.1.2, a partire dalle caratteristiche del digestato riportate in tabella 3.1.2, è stato ricavato il volume di refluo presente in ogni alimentazione di 500 ml. Esso risulta pari a 73,2 ml. La restante volumetria sarà colmata da acqua distillata. Per aggiustare il rapporto N/P è stata stimata, attraverso le formule A.1.4 e A.1.5 l'aggiunta di sale che sarà necessario fornire all'alimento delle colonne III e IV. Tale aggiunta risulta pari a 0,0405g, ovvero 40,5 mg di  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

---

## A.4 Calcoli stechiometrici prova 2

Per la seconda prova di crescita sul WW1 è stata installata una colonna in cui l'alimentazione avveniva tramite refluo con rapporto N/P aggiustato a 10. Per correggere il rapporto azoto-fosforo è stato aggiunto diidrogenato di fosfato,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

Per quantificare l'aggiunta di  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  è stato necessario, in primo luogo, calcolare le quantità di azoto e fosforo, in termini di massa, presenti all'interno del refluo. A tale scopo è stata utilizzata la formula A.1.1 riportata di seguito.

$$m_i[\text{mg}] = C_i \left[ \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right] * V_i[\text{L}] \quad (\text{A. 1.1})$$

Come riportato nel capitolo 3.3.1, i ricambi di substrato sono avvenuti due volte a settimana (lunedì e giovedì) con volumi diversi, di conseguenza le concentrazioni, in termini di massa, presenti nel refluo saranno diverse a seconda della quantità di volume sostituito.

Tabella A.4.1: concentrazioni (mg) dei nutrienti presenti nel refluo WW1 in alimentazione.

REFLUO WW1			
Lunedì		Giovedì	
Volume [L]	0,045	Volume [L]	0,06
Componente	Peso [mg]	Componente	Peso [mg]
$\text{NH}_4^+-\text{N}$	9,14	$\text{NH}_4^+-\text{N}$	12,2
$\text{NO}_3-\text{N}$	0,13	$\text{NO}_3-\text{N}$	0,2
$\text{NO}_2-\text{N}$	0,21	$\text{NO}_2-\text{N}$	0,4
$\text{PO}_4-\text{P}$	0,21	$\text{PO}_4-\text{P}$	0,3
N totale	9,47	N totale	12,7
P totale	0,21	P totale	0,3

I rapporti N/P del refluo sono risultati pari a: 45.1 con il ricambio del lunedì e 42.3 con il ricambio del giovedì. Di conseguenza per disporre di un rapporto N/P pari a 10 è stato necessario aggiungere 0.737 mg di fosforo il lunedì e 0.97 mg il giovedì. Tali valori sono stati ricavati tramite la formula A.1.2.

---

$$m_{P,da\ aggiungere}[mg] = m_{P,obiettivo}[mg] - m_{P,substrati}[mg] \quad (A.4.1)$$

L'aggiunta del fosforo necessario per ottenere il rapporto N/P desiderato è stata effettuata attraverso l'aggiunta di sale  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , dosato in funzione del suo peso molare attraverso la seguente formula:

$$m_{sale,da\ aggiungere}[g] = m_{P,da\ aggiungere} * \frac{m_{sale}[\frac{g}{mol}]}{m_P[\frac{g}{mol}]} \quad (A.4.1)$$

Sono state ricavate, in questo modo, le seguenti aggiunte di sale  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , diverse a seconda del giorno in cui è stato effettuato il ricambio.

- Lunedì: 0.0032 g di  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- Giovedì: 0.0043 g di  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

---

## APPENDICE B

### STIMA VSS

#### B.1 Modelli di regressione lineare per la stima dei valori di VSS

Come spiegato nel capitolo 4.1.2, la metodologia di sperimentazione prevedeva una sola misurazione a settimana del tenore di solidi, sia totali che volatili. Per disporre di un campione numeroso è stato valutato il modello lineare migliore in grado di stimare i valori di VSS, a partire dai dati di assorbanza o torbidità, a seconda della migliore correlazione tra i parametri.

È stata implementata una regressione lineare multiparametrica, attraverso il software Rstudio®, per tutte le colonne tra i valori di assorbanza e torbidità con i valori di VSS. I risultati sono stati riportati nella tabella B.1.

Tabella B.1: Risultati dei test statistici sui modelli di regressione lineare per la prova 1.

	<b>Correlazioni</b>	<b>P-Value</b>	<b>Modello di regressione lineare</b>
<i>Colonna I</i>	VSS-Torbidità	0,0049	$VSS = 0,40 * (Torbidità) + 107$
<i>Colonna II</i>	VSS-Abs 680	0,0016	$VSS = 349 * (Abs) + 181$
<i>Colonna III</i>	VSS-Torbidità	0,018	$VSS = 0,33 * (Torbidità) + 234$

Nella tabella B.1 sono stati riportati i migliori modelli di regressione lineare, ovvero quelli caratterizzati da p-value più basso tra quelli testati.



---

A partire da tali risultati, si è proceduto con la stima dei valori di VSS mancanti tramite le equazioni riportate all'interno della tabella B.1.

La medesima metodologia è stata applicata anche alla prova 2, poiché anche nella seconda sperimentazione la misurazione del tenore dei solidi è stata effettuata una volta a settimana. Nella tabella B.2 sono stati riportati i migliori modelli regressivi, con relativo p-value, per la stima dei valori di TSS mancanti.

*Tabella B.2: Risultati dei test statistici sui modelli di regressione lineare per la prova 2.*

	<b>Correlazioni</b>	<b>P-Value</b>	<b>Modello di regressione lineare</b>
<i>Colonna AC10</i>	VSS-Abs 680	0,0035	$VSS = 320,3 * (Abs\ 680) + 200$
<i>Colonna ACC10</i>	VSS-Abs 680	0,0004	$VSS = 341,7 * (Abs\ 680) + 203,3$
<i>Colonna NA10</i>	VSS-Abs 680	0,002	$VSS = 294,7 * (Abs\ 680) + 251,5$
<i>Colonna NA12</i>	VSS-Abs 680	0,002	$VSS = 287,9 * (Abs\ 680) + 256,2$

---

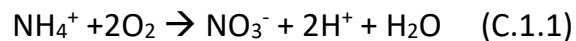
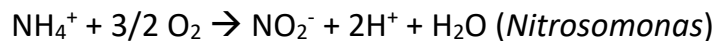
# APPENDICE C

## NITRIFICAZIONE

### C.1 Processi di nitrificazione

Per processo di nitrificazione s'intende l'ossidazione biologica dei composti inorganici dell'azoto ( $\text{NH}_4$  e  $\text{NO}_2$ ). Tale ossidazione avviene ad opera di batteri ammonio ossidanti e nitrito ossidanti, di cui i generi più importanti nel campo dei trattamenti biologici risultano essere i *Nitrosomonas* (ammonio ossidanti, siglato AOB) e *Nitrobacter* (nitrito ossidante, siglato NOB) (Beccari et al.,1993).

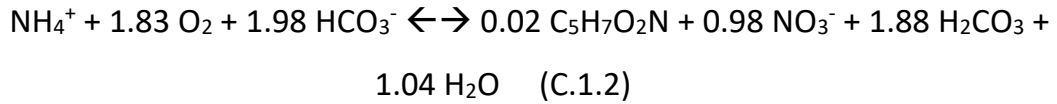
Il processo di nitrificazione può essere rappresentato mediante le seguenti reazioni.



Assumendo che la composizione cellulare dei batteri sia AOB che NOB sia  $\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$  e che i rendimenti di crescita siano rispettivamente circa 0.15

---

mgVSS/mgN-NH<sub>3</sub> e 0.02 mgVSS/mgN-NH<sub>3</sub>, l'equazione biochimica di ossidazione completa è data dalla reazione B.1.2 (Beccari et al.,1993).



Dalla reazione C.1.2. è possibile dedurre importanti aspetti riguardanti il controllo del processo biologico:

- Significativa richiesta di ossigeno
- Significativa richiesta di alcalinità per tamponare l'acidità prodotta
- Produzione di biomassa nitrificante per peso unitario di azoto ammoniacale ossidato

Per quanto riguarda la cinetica delle reazioni di nitrificazione, i due stadi di ossidazione avvengono in serie. Da diversi studi è emerso che la cinetica più limitante è quella dei batteri AOB (Beccari et al.,1993), di conseguenza la cinetica totale di nitrificazione può essere espressa unicamente dalla reazione ammonio-ossidante.

Temperatura e pH influiscono sulla cinetica di produzione di biomassa batterica. L'incidenza della temperatura sulla velocità di crescita dei batteri è stata studiata da più autori, qui di seguito è stata riportata, a titolo esemplificativo, la relazione di Barnes e Bliss (1983).

$$\mu_{mnT} = \mu_{mn15} e^{0.095(T-15)} \quad (\text{B. 1.3})$$

$$K_{nT} = K_{n15} e^{0.118(T-15)} \quad (\text{B. 1.4})$$

Dove  $\mu_{mnT}$  è il tasso massimo di crescita della biomassa (mg biomassa mg<sup>-1</sup> biomassa d<sup>-1</sup>), mentre  $K_{nT}$  è la costante di semisaturazione (mg substrato L<sup>-1</sup>). Il range ottimale di crescita è attorno ai 30-36 C°, tuttavia sono state riscontrate crescita anche per temperature inferiori (4 C°) e superiori (50 C°).

Per quanto riguarda l'influenza del pH, il meccanismo è ancora poco chiaro e anche in letteratura vi sono lavori divergenti (Beccari et al.,1993). Diversi

---

autori tuttavia hanno individuato come range ottimale di pH valori compresi tra 7.2-8.5.

Uno degli aspetti importanti sul controllo di tale parametro è il fatto che il pH influenza la produzione di ammoniaca libera, sostanza tossica per la crescita sia batterica che microalgale. Valori elevati di pH uniti a temperature anch'esse elevate favoriscono la produzione di ammoniaca libera, motivo per cui risulta fondamentale il controllo di tale parametro.