

# Politecnico di Milano

Scuola di Ingegneria Civile e Ambientale

Corso di studi in Ingegneria per l'Ambiente e il Territorio - Tecnologie di risanamento  
ambientale



**POLITECNICO**  
MILANO 1863

## **Analisi foto-respirometriche e modellazione matematica applicate alla descrizione e all'ottimizzazione di sistemi di coltivazione di microalghe**

Relatore: Prof.ssa Elena Ficara

Correlatore: Ing. Simone Rossi

Tesi di Laurea magistrale di: Filippo Sangiovanni

Matricola: 953715

Anno accademico: 2021-2022

---

## Ringraziamenti

I miei più sinceri ringraziamenti alla professoressa Elena Ficara per l'opportunità di approfondire un tema così avanguardista e che incarna i principi più virtuosi alla base dell'Ingegneria Ambientale. Il supporto e la disponibilità dimostrati, nel lavoro di tesi da me svolto, sono stati molto preziosi e altrettanto graditi.

Ringrazio di cuore l'ingegnere Simone Rossi per avermi accompagnato un passo alla volta nel percorso affrontato, dimostrando costantemente pazienza, serietà e solerzia. Posso affermare, oltre ad aver arricchito enormemente il mio bagaglio culturale da questa collaborazione, di aver trovato un amico leale e prezioso.

Ringrazio la mia famiglia per avermi supportato in questi anni di studio e impegno, senza la quale non sarebbe stato possibile raggiungere questo traguardo. A mia mamma per la pazienza e l'amore mostrato verso un figlio non sempre perfetto, a mio fratello che ha reso la mia vita meno noiosa e con il quale ho superato le numerose difficoltà incontrate, a mia nonna che è sempre stata la mia fan numero uno e ha sempre dimostrato fiducia in me anche quando non ne avevo io stesso, ai miei zii che mi hanno insegnato a prendere la vita come un grande gioco e, infine, a mio nonno che mi guarda dall'alto e che devo ringraziare per avermi trasmesso i valori fondamentali che costituiscono la mia persona.

Ringrazio gli amici dell'università, e non, con i quali ho condiviso gioie e fatiche di questo percorso di studi, senza i quali sicuramente non lo avrei portato a termine. A Fabio che ha sempre aiutato tutti a finire la corsa, nonostante arrivi sempre per primo al traguardo, e che posso definire un fratello. A Germano e Cardi compagni di goliardia e divertimento, ma amici veri e leali. A Sofia, che, con la sua sensibilità, ha saputo confortarmi nei momenti più tristi e accompagnarmi in quelli più gioiosi. Ad Alessandro e Matteo che mi hanno accolto nel momento più difficile e sono tutt'oggi compagni di mille avventure e di chissà quante altre ancora. A Marco con il quale condivido tanti pensieri ed ha sempre una parola buona per metterli a tacere. A Martina che, con la sua spensieratezza, sa placare le acque del mio animo.

---

## **Abstract**

The study of alternative and sustainable production processes is a crucial aspect to develop our society. The transition from a consumer type of economy to a circular economy necessarily requires a massive and consistent commitment. In this scenario, the development of theoretical notions and practical techniques of the microalgae cultivation are becoming relevant. The controlled growth of these microorganisms can be integrated with widespread processes, such as the purification and stabilization of liquid, gaseous and solid flows. By doing so, it would be possible to partially reduce the consumption of raw materials. Furthermore, the cultivation of microalgae produce a biomass rich in substances with a strong commercial interest and with the most disparate uses. However, the lack of information and supporting empirical data generates the need to form a rich portfolio to characterize these microorganisms. At the current state, there is a scarcity of works that analyze microalgae, and its use, with an exhaustive review. The present work is designed to study in depth, through the use of photo-respirometric experimental techniques, the properties of the algal strains that have aroused the greatest commercial interest. These empirical tests were applied by following a specific method that is based on the available literature. The collected data were applied to describe, through the ALBA mathematical model, a complex cultivation system, characterized by a consortium of microalgae and bacteria. The information collected from the survey campaign carried out at the pilot plant located in Bresso is also used for the characterization of the process. Once the model has been modified, calibrated and validated, a scenario analysis is carried out to comprehensively describe the cultivation of microalgae further more.

---

## Sintesi

Lo studio e l'approfondimento di processi produttivi alternativi e sostenibili è un tema sempre più rilevante nella società contemporanea. Il passaggio da un'economia prettamente di consumo a un modello circolare richiede necessariamente un impegno massivo e consistente. In questo scenario, ben si inserisce lo sviluppo delle nozioni teoriche e delle tecniche pratiche relative alla coltivazione di microalghe. La crescita controllata di tali microorganismi è integrabile a processi largamente diffusi, come la depurazione e la stabilizzazione di flussi liquidi, gassosi e solidi, soppiantando l'utilizzo tradizionale di materie prime, sempre più scarse. Al contempo, sarebbe possibile ottenere una biomassa ricca di sostanze dal forte interesse commerciale e dagli impieghi più disparati. Tuttavia, la carenza d'informazioni e dati empirici a supporto genera la necessità di formare un ricco portfolio per caratterizzare questi microorganismi. Allo stato attuale, si verifica una scarsità di opere che analizzino, con una visione onnicomprensiva, le microalghe e il relativo utilizzo. Il presente lavoro è concepito per studiare a fondo, tramite l'impiego di tecniche sperimentali foto-respirometriche, le proprietà dei ceppi algali che hanno suscitato l'interesse commerciale maggiore. Tali prove empiriche sono state applicate, in seguito a un attento e specifico studio della letteratura disponibile, definendo un rigoroso metodo operativo. I dati raccolti sono stati applicati per descrivere, tramite il modello matematico ALBA, un sistema di coltivazione complesso, caratterizzato da un consorzio di microalghe e batteri. Sono utilizzati, per la caratterizzazione del processo, le informazioni raccolte dalla campagna di rilevamenti effettuata sull'impianto pilota situato a Bresso. Una volta modificato, calibrato e validato il modello, si esegue un'analisi di scenario che permette di descrivere esaustivamente alcuni dettagli della coltivazione di microalghe. Le informazioni ricavate compongono un quadro completo del processo e permettono di effettuare considerazioni direttamente applicabili a casi reali.

---

# Indice

<b>I</b>	<b>Introduzione e stato dell'arte</b>	<b>2</b>
1.1	Scopo del lavoro . . . . .	2
1.2	Microalghe . . . . .	3
1.2.1	Metabolismo . . . . .	4
1.2.2	Composizione chimica delle microalghe . . . . .	6
1.2.3	Metodologie di coltivazione . . . . .	7
1.2.4	Mezzo di crescita . . . . .	11
1.2.5	Utilizzi della biomassa algale . . . . .	15
1.3	Respirometria . . . . .	17
1.3.1	Tecniche e utilizzi . . . . .	17
1.3.2	Applicazione per le microalghe . . . . .	18
1.4	Modellazione di un consorzio Algae-Batteri . . . . .	22
1.4.1	Modello ALBA - introduzione, variabili di stato e processi biologici . . . . .	23
1.4.2	Modello ALBA - cinetiche dei processi biologici . . . . .	28
1.4.3	Modello ALBA - processi secondari . . . . .	31
<b>2</b>	<b>Metodologie e Materiali</b>	<b>33</b>
2.1	Respirometria . . . . .	33
2.1.1	Descrizione del sistema sperimentale . . . . .	33
2.1.2	Campagna sperimentale . . . . .	35
2.1.3	Elaborazione dei dati . . . . .	38
2.2	Aquasim e Modello ALBA . . . . .	42
2.2.1	Implementazioni e modifiche al modello ALBA . . . . .	42
2.2.2	Caso di studio - Coltivazione di microalghe con digestato . . . . .	44
2.2.3	Caso di studio - Coltivazione di Spirulina . . . . .	49
2.2.4	Simulazione di scenari - Coltivazione di microalghe con digestato . . . . .	50
2.2.5	Simulazione di scenari - Coltivazione di Spirulina . . . . .	53

---

<b>3</b>	<b>Risultati</b>	<b>54</b>
3.1	Respirometria . . . . .	54
3.1.1	Temperatura . . . . .	54
3.1.2	Irradianza . . . . .	57
3.1.3	pH . . . . .	60
3.1.4	Ossigeno disciolto . . . . .	63
3.2	Modello: Coltivazione di microalghe con digestato . . . . .	67
3.2.1	Condizioni iniziali e caratteristiche dell'influente . . . . .	67
3.2.2	Calibrazione e validazione . . . . .	69
3.2.3	Analisi di Scenario . . . . .	77
3.3	Modello: coltivazione di Spirulina . . . . .	89
3.3.1	Analisi di scenario . . . . .	91
<b>4</b>	<b>Conclusioni e prospettive</b>	<b>101</b>
4.1	Conclusioni . . . . .	101
4.2	Prospettive future . . . . .	102
<b>A</b>	<b>Appendice 1</b>	<b>112</b>
<b>B</b>	<b>Appendice 2</b>	<b>120</b>
<b>C</b>	<b>Appendice 3</b>	<b>124</b>
C.1	Appendice 3- Temperatura . . . . .	124
C.2	Appendice 3 - Irradianza . . . . .	127
C.3	Appendice 3 - pH . . . . .	129
C.4	Appendice 3 - Ossigeno Disciolto . . . . .	131

---

# **I Introduzione e stato dell'arte**

Lo sviluppo della nostra civiltà, in seguito alla rivoluzione industriale, si è basato sull'utilizzo intensivo e non sostenibile delle risorse naturali. Il rischio di esaurire materie prime fondamentali è concreto e ci impone di trovare soluzioni alternative e compatibili con l'ambiente. È opportuno un cambio radicale dei processi produttivi, delle modalità di consumo e della gestione dei rifiuti generati. È fondamentale, quindi, effettuare una transizione da un'economia di consumo a un modello economico circolare. L'obiettivo è di ridurre le quantità di risorse estratte e di rifiuti generati tramite azioni di recupero, di riutilizzo e di riciclaggio. Questo cambiamento deve essere supportato da una solerte attività di ricerca di nuove tecnologie e di processi produttivi alternativi.

In questo scenario, le microalghe hanno destato interesse, fra la comunità scientifica, per le diverse possibilità che si prospettano dal loro impiego. La coltivazione di tali organismi ben si integra a processi già diffusi e necessari come la depurazione delle acque reflue e il trattamento di fanghi di depurazione. La biomassa algale può accrescere sfruttando i nutrienti presenti, principalmente azoto inorganico e fosforo, depurando il mezzo di crescita. È altresì possibile sviluppare colture in un ambiente controllato, al fine di produrre composti biogenici specifici, soppiantando processi produttivi vetusti o non sostenibili. La biomassa ottenuta può essere sottoposta a processi estrattivi per produrre biocombustibile: risorsa sempre più richiesta sul mercato energetico [25]. In alternativa, è possibile impiegare le alghe prodotte come ammendante per il terreno o come biofertilizzante [66]. Da questa breve panoramica, si intuiscono le potenzialità che potrebbero essere sfruttate in un contesto economico propenso alla sostenibilità.

## **1.1 Scopo del lavoro**

Lo scopo di quest'opera è quello di effettuare una trattazione di carattere generale sul processo di coltivazione, in condizioni autotrofe, di microalghe. Nello specifico, ci si sofferma nel valutare la fattibilità d'integrare la coltivazione di alcuni ceppi specifici in impianti di produzione di biogas. Si è interessati nell'utilizzo della frazione liquida del digestato anaerobico come medium di crescita. Inoltre sono individuate e discusse le condizioni ottimali di coltivazione. Si intende descrivere, il più esaustivamente possibile, la crescita di diversi ceppi algali al variare dei parametri fondamentali

---

del processo, con l'utilizzo di tecniche foto-respirometriche. In particolar modo, si studia l'effetto dell'irradianza incidente, della temperatura, del pH e della concentrazione di ossigeno disciolto. Successivamente, i dati descrittivi dei ceppi analizzati sono utilizzati per rappresentare, tramite il modello previsionale ALBA, un impianto pilota di coltivazione. Si è interessati a modificare tale modello, al fine di renderlo applicabile a sistemi complessi che prevedano la coltivazione di più ceppi algali. Tramite i dati direttamente campionati sull'impianto, è possibile calibrare e validare il modello. In seguito, si costituiscono diversi scenari d'interesse per completare la trattazione sul processo di crescita della biomassa algale.

## 1.2 Microalghe

Le microalghe sono microorganismi unicellulari, in grado di svolgere attività di fotosintesi e possono appartenere sia al *dominio* dei Procarioti che a quello degli Eucarioti. [42]. Le piante superiori si sono evolute a partire da questi organismi semplici [42]. L'attività di fotosintesi delle microalghe risulta, però, essere più efficiente rispetto a quella di forme di vita più complesse. Questo è dovuto principalmente a una struttura cellulare più semplice [11]. Le microalghe comprendono una vasta selezione di ceppi presenti in praticamente tutti gli ecosistemi, sia marini che terrestri [22]. Questi organismi possono aggregarsi in colonie di cellule oppure esistere singolarmente [42]. Si individuano, per abbondanza e diffusione, quattro classi principali di microalghe [27]:

1. le alghe verdi (*Chlorophyceae*) sono il gruppo più importante di microalghe. Sono caratterizzate dalla presenza di pigmenti come la *chlorophyll-a* e la *chlorophyll-b* [42];
2. le diatomee (*Bacillariophyceae*) sono organismi che possono vivere sia in colonie che singolarmente. La parete cellulare è caratterizzata dalla presenza di silicio. La classificazione dei vari ceppi si basa sugli schemi ornamentali che appaiono sulla parete stessa [42];
3. i cianobatteri o alghe verdi-azzurre (*Cyanophyceae*) sono organismi procarioti, ma dotati di un sistema fotosintetico basato sul pigmento *chlorophyll-a*. Sono caratterizzati da una forma sferica ("cocco") oppure filamentosa [42];
4. le alghe dorate (*Chrysophyceae*) sono caratterizzate da un doppio flagello e dalla capacità di

sviluppare appendici silicee (stomatociti) durante lo stadio di riposo [53]. Quest'ultima peculiarità è interessante per la possibilità di utilizzare questa categoria di alghe come bioindicatore [73].

L'interesse commerciale che riguarda la coltivazione delle microalghe è strettamente legato alla capacità di quest'ultime di accumulare biomolecole d'interesse. In tabella 1 sono riportati, per le categorie di microalghe appena descritte, alcuni esempi di ceppi più diffusi e studiati e le relative sostanze accumulate.

**Tab. 1:** I ceppi più rappresentativi, per le quattro principali categorie di alghe e le sostanze immagazzinate durante l'accrescimento della biomassa. Tabella ripresa da [42].

Algae	Ceppi rappresentativi	Sostanze immagazzinate
Diatomee	<i>Chaetoceros calcitrans</i> , <i>Skeletonoma sp.</i> , <i>Thalassoria pseudonana</i> , <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	lipidi, polimeri dei carboidrati, Crisolaminarina
Alghe verdi	<i>Botryococcus braunii</i> , <i>Chlorella sp.</i> , <i>Chlorella Vulgaris</i> , <i>Dunaliella salina</i> , <i>Scenedesmus sp.</i>	amido, trigliceridi
Cianobatteri	<i>Spirulina sp.</i>	amido, trigliceridi
Alghe dorate	<i>Isochrysis sp.</i>	carboidrati, trigliceridi, Leucosina, Crisolaminarina

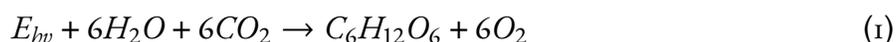
### 1.2.1 Metabolismo

Le microalghe, in genere, ricavano l'energia per l'accrescimento e per le altre funzioni cellulari dalla fotosintesi. È altresì vero che, per alcuni ceppi algali, il metabolismo si basa sul consumo di carbonio organico, mostrando la caratteristica tipica dell'eterotrofia. Si individuano, di conseguenza, tre tipologie di metabolismo: autotrofo, eterotrofo e mixotrofo [54]. Le condizioni di mixotrofia si verificano quando un organismo è in grado di sostentarsi sia per via autotrofa che eterotrofa. In particolare, il carbonio inorganico è fissato tramite attività di fotosintesi e, durante la respirazione, viene immagazz-

---

inato e consumato carbonio organico [37]. In generale, si può affermare che, a differenza della sola eterotrofia, si possono ottenere rese di crescita maggiori a parità di carbonio organico disponibile per colture mixotrofe [46]. Tuttavia, in condizioni esclusivamente eterotrofe, è possibile eliminare la dipendenza dall'irradianza e ottenere concentrazioni di biomassa maggiori che in fototrofia [60]. Alcuni ceppi algali sono in grado, a seconda delle condizioni di crescita e alla disponibilità di nutrienti, di adattare il proprio metabolismo. Di conseguenza, le metodologie di coltivazione e l'ambiente in cui sono inseriti questi organismi influenzano il metabolismo e, di conseguenza, la crescita. È possibile, a seconda dello scopo della coltivazione, individuare il metabolismo migliore e applicare delle condizioni al contorno coerenti.

La fotosintesi delle microalghe si basa principalmente sul ciclo di Calvin. L'accettore e la fonte di carbonio inorganico reagiscono a formare *3-fosfoglicerato*. Quest'ultima molecola è consumata per formare glucosio e altri metaboliti. Le microalghe hanno un'alta efficienza di conversione dell'energia luminosa in biomassa e non vengono prodotti biopolimeri, come la emicellulosa o la lignina, a differenza di altri organismi autotrofi più complessi [33]. La seguente formula (1) descrive la reazione chimica complessiva della fotosintesi:



Si può affermare che le tecniche di crescita che prevedano l'utilizzo di microalghe mantenute in condizioni autotrofe siano le più diffuse e le più rappresentate in letteratura [55]. Per quanto concerne la crescita eterotrofa, l'utilizzo di fonti carboniose, come l'acetato, il glucosio, il glicerolo e il lattato, è possibile tramite i seguenti meccanismi e passaggi fondamentali [1]:

1. il sistema di trasporto enzimatico dei nutrienti, che risulta necessario per trasferire le molecole all'interno della cellula;
2. l'attivazione della fonte carboniosa tramite fosforilazione, con conseguente consumo di ATP;
3. meccanismi catabolici, come l'ossidazione via pentoso fosfati (*PPP*) e la glicolisi via *Embden-Meyerhof-Parnas* (*EMP*) [44]. Ogni diversa sorgente di carbonio organico è interessata da processi catabolici specifici;

---

4. processo di respirazione con conseguente produzione di energia. La formula chimica generica che descrive tale attività cellulare è la seguente:  $C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + H_2O + Energia$

il glucosio, che sia prodotto tramite fotosintesi o che sia immagazzinato da fonti esterne in eterotrofia, è utilizzato principalmente per sviluppare proteine, carboidrati e lipidi.

### 1.2.2 Composizione chimica delle microalghe

Le microalghe, essendo organismi relativamente semplici, sono composte principalmente da carboidrati, lipidi e proteine [34]. Gli elementi più presenti in questi organismi sono: carbonio, idrogeno, azoto, ossigeno, potassio e fosforo. Le microalghe sono anche fonte di gran parte delle vitamine essenziali (A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, C, E), che risultano essere disponibili in quantità variabili a seconda delle tecniche di coltivazione e di estrazione [15].

La tipologia di lipidi, sviluppati durante l'accrescimento della biomassa, più interessanti dal punto di vista commerciale, sono gli acidi grassi polinsaturi (*PUFA*). Questa particolare categoria di composti è attualmente estratta da fonti animali come l'olio di pesce. L'estrazione dei *PUFA* dalle microalghe consente di ottenere un prodotto inodore e con rischio ridotto di contaminazione [15].

La maggior parte dei carboidrati contenuti nelle microalghe sono polisaccaridi. Le molecole di questo genere che si riscontrano più di frequente sono: l'amido, l'agar, la carragenina e l'alginato. Questi polisaccaridi sono utilizzabili principalmente per scopi alimentari oppure in campo medico [15]. L'alto potere calorifico di queste molecole può essere d'interesse anche per processi di produzione di biocombustibile.

Per quanto concerne altre tipologie di composti presenti e sviluppati durante l'accrescimento della biomassa algale, si annoverano le seguenti sostanze:

1. antiossidanti: le microalghe, crescendo in un ambiente ossidante ed esposte alla luce solare, sono necessariamente soggette a stress ossidativo e a reazioni radicaliche. Per questo motivo, questi organismi sono in grado di sviluppare sostanze antiossidanti per evitare danni alle cellule. È possibile utilizzare tali composti per cosmesi o per scopi terapeutici [15];
2. pigmenti: oltre alla clorofilla, che è il principale pigmento necessario per la fotosintesi, le microalghe sono fonte di altre sostanze utilizzabili come coloranti. In genere sono composti che

migliorano l'efficienza fotosintetica e proteggono la cellula dalle radiazioni solari. Le molecole più interessanti dal punto di vista commerciale sono i carotenoidi o le ficocianine [15];

3. Tossine: alcuni ceppi di microalghe, in genere cianobatteri, sviluppano sostanze che possono risultare tossiche sia per l'uomo che per altri animali, soprattutto in concomitanza di fenomeni come i "Bloom" algali. Tuttavia, è in teoria possibile sfruttare tali composti in campo medico [15]. Alcune sostanze citotossiche possono essere utilizzate per trattare malattie come il cancro [2] oppure essere impiegate come antibiotici [14].

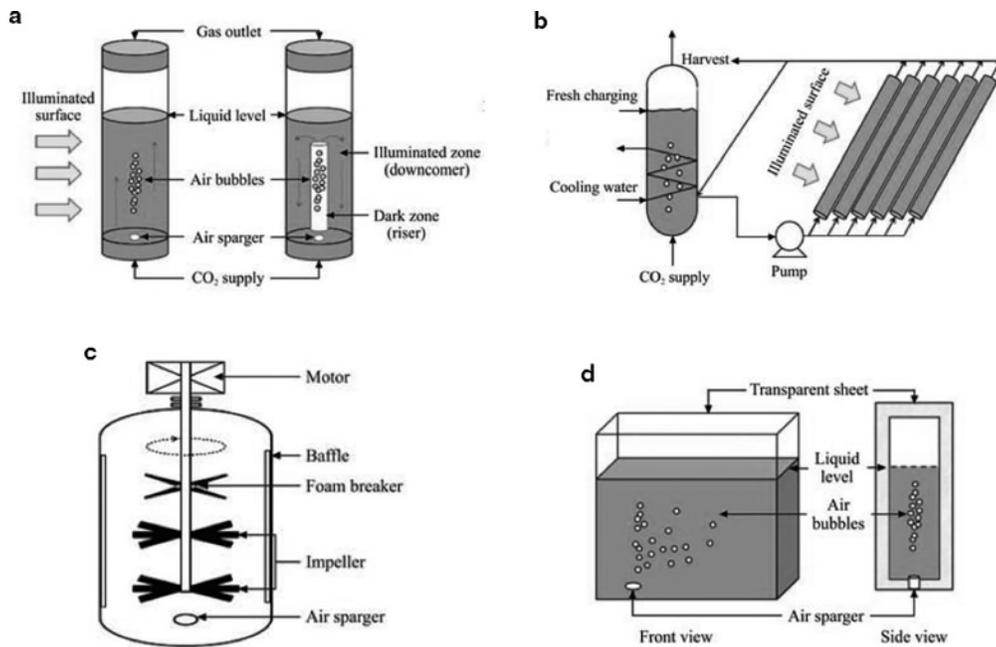
In tabella 2 è riportata, per alcuni ceppi di microalghe, la composizione in termini di lipidi, carboidrati e proteine:

**TAB. 2:** Composizione chimica di alcuni ceppi di microalghe di particolare interesse per la produzione di biocombustibile. Tabella estratta da [34].

Ceppo	% Carboidrati	% Proteine	% Lipidi
<i>Chaetoceros muelleri</i>	11-19	44-65	22-44
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	10	58	30
<i>Chlorella sp.</i>	38-40	12-18	28-32
<i>Nannochloropsis sp.</i>	n.a.	n.d.	31-68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	n.a.	n.d.	35-54
<i>Neochloris oleoabundans</i>	n.a.	n.d.	50-77
<i>Scenedesmus-obliquus</i>	10-17	50-56	12-14

### 1.2.3 Metodologie di coltivazione

La coltivazione delle microalghe può essere condotta in diverse tipologie di sistemi a seconda del ceppo, del mezzo di coltura e dello scopo dell'operazione. Si individuano due categorie principali: i sistemi aperti e i sistemi chiusi[63]. In genere, una coltivazione in un ambiente segregato consente di ottenere una biomassa di maggior qualità e in concentrazioni maggiori. Questo è dovuto a un miglior controllo sulle variabili di processo e un abbattimento del rischio di contaminazione[63]. Tuttavia, un sistema chiuso è costoso, sia in termini di costi operativi che d'investimento. Per questa tipologia di sistema si individuano le seguenti tecnologie principali (mostrate in figura 1):



**Fig. 1:** (a) - fotobioreattore tubolare verticale (a destra il sistema "air-lift" e a sinistra il sistema a bolle); (b) - fotobioreattore tubolare orizzontale; (c) - fotobioreattore a vasca miscelata; (d) - fotobioreattore a pannelli. Immagine ripresa da [63].

1. il fotobioreattore tubolare verticale a bolle è caratterizzato da una colonna, in genere di forma cilindrica, dove è mantenuta la coltura. Alla base del reattore è posto il sistema di aerazione che induce una corretta miscelazione e migliora il trasferimento di massa. Quest'ultima caratteristica è cruciale per evitare l'accumulo dell'ossigeno prodotto dalle microalghe all'interno del sistema. È noto che per alte concentrazioni di ossigeno disciolto si verificano fenomeni d'inibizione per la crescita della biomassa. La fonte luminosa, in genere, è posta esternamente al reattore [63].
2. il fotobioreattore tubolare verticale ad "air-lift" è una tecnologia simile a quella appena descritta, ma con alcune differenze. La colonna è sede di un secondo cilindro più piccolo e schermato dalla luce esterna. Tale recipiente è comunicante con la colonna esterna ed è posto al centro. Nel reattore sono quindi costituite una zona buia, all'interno del cilindro più piccolo, e una zona illuminata, nel resto della colonna. Il sistema di aerazione comporta la movimentazione del liquido, che attraversa ciclicamente la parte buia e la parte irradiata [63]. Risulta quindi fondamentale individuare il flusso corretto di gas, dato che influisce sul ciclo luce e buio della coltura [61]. In generale, i reattori verticali di questo tipo comportano un'alta efficienza fotosintetica e un'alta produttività volumetrica. Per questi motivi, si sta valutando la possibilità d'impiegare questa

---

tecnologia su scala industriale [48];

3. il fotobioreattore tubolare orizzontale è caratterizzato da una serie di tubazioni arrangiate in diverse forme e modalità a seconda delle esigenze. L'ingombro areale è in genere maggiore rispetto alla controparte verticale perché si utilizza, come fonte luminosa, la luce del sole. Più si riducono le dimensioni della sezione delle tubazioni più si verifica un aumento della concentrazione, ma con possibilità di accumulare ossigeno oltre concentrazioni limitanti. Si utilizza una pompa per movimentare la coltura al fine di evitare la sedimentazione della biomassa [51]. Il reattore opera in condizioni continue e periodicamente si estrae della biomassa dal reattore e si alimenta con mezzo di crescita nuovo [63];
4. il fotobioreattore miscelato a vasca è un sistema del tutto analogo a quello usato per processi di fermentazione. La differenza sostanziale è l'utilizzo di una fonte di luce necessaria per la coltivazione delle microalghe. La miscelazione è effettuata da un organo meccanico e dal sistema di aerazione. Il rapporto fra volume e superficie di questo particolare reattore comporta una ridotta efficienza fotosintetica. Tuttavia, questo sistema ben si presta a colture in scala di laboratorio, data la sua semplicità [63];
5. il fotobioreattore a pannelli è il sistema chiuso più diffuso ed è composto da lastre trasparenti o semi trasparenti disposte a parallelepipedo. Le pareti possono essere inclinate per meglio ricevere la luce solare [61]. Sul fondo del reattore è posizionato il sistema di aerazione, che garantisce la miscelazione del sistema e la rimozione dell'ossigeno in eccesso. Questa tecnologia è una soluzione versatile e adattabile sia a colture esterne che al chiuso [63].

I reattori chiusi sono la tipologia che meglio si adatta a colture condotte in mixotrofia oppure in eterotrofia, data l'alta controllabilità sui parametri di processo. In tabella 3 sono riportate le concentrazioni ottenute di diversi ceppi algali utilizzando i fotobioreattori più diffusi.

I sistemi aperti sono la tipologia di coltivazione delle microalghe più utilizzata, soprattutto per quanto concerne progetti a scala industriale. Rispetto ai fotobioreattori le colture aperte comportano un minore controllo sui parametri operativi e un alto rischio di contaminazione. Va altresì specificato che i costi di gestione e d'investimento sono contenuti, giustificando la larga diffusione di questi

**Tab. 3:** Concentrazioni ottenute per diversi ceppi algali nei fotobioreattori (PBR) descritti. Tabella ripresa da [63].

Tipologia di PBR	Ceppo Algale	Volume [L]	Concentrazione della biomassa
a pannelli	<i>Dunaliella sp.</i>	3.4	1.5 g/L
	<i>Phaeodactylum sp.</i>	5	1.38 g/L
	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	30	3.42 g/L
	<i>Chlorella vulgaris</i>	1.5	0.027–0.045 g/L/h
colonna a bolle	<i>Cyanobium sp.</i>	1.8	0.071 g/L
	<i>Aphanothece microscopica</i>	3	0.77 g/L/d
	<i>Monodus sp.</i>	64	0.03–0.2 g/L
	<i>Spirulina sp.</i>	3.5	4.13 /L
colonna ad "air-lift"	<i>Chaetoceros sp.</i>	170	0.8 g/L
	<i>Haematococcus pluvialis</i>	3	4.06 g/L
	<i>Botryococcus branunii</i>	3	2.31 g/m <sup>3</sup> /d
Tubolare piano	<i>Spirulina sp.</i>	100	0.01 g/L
	<i>Spirulina platensis</i>	5.5	0.62g/L
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	75	1.38 g/L
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	200	1.19 g/L

sistemi di coltivazione [64]. Le principali tecnologie, che rientrano in questa categoria d'impianti, sono:

1. l' "open pond" è il sistema di coltivazione aperta più semplice utilizzato per le microalghe. Si utilizzano bacini d'acqua naturali o artificiali, di scarsa profondità (massimo 50 cm), per garantire una buona distribuzione della luce. I costi per la realizzazione sono minimi, tuttavia si è forzati a effettuare l'accrescimento la biomassa algale in competizione con altri microorganismi. Il principale fattore limitante per questa tecnologia è la flocculazione o la flottazione di biomassa morta, che provoca una riduzione della luce disponibile. Si può ovviare, in parte, a questi problemi introducendo un sistema di miscelazione meccanico[63]. Per scopi commerciali, è diffuso l'impiego di questo sistema per la crescita di ceppi algali come la "*Dunaliella salina* [26];
2. i "Raceway" sono delle vasche a setti dove la coltura è movimentata, attraverso un circuito forzato, tramite un motore a pale elettrico ("Paddlewheel"). Quest'ultimo organo meccanico è responsabile per la miscelazione del sistema, evitando formazione di depositi e garantendo un sufficiente trasferimento di massa. Questa tecnologia per la coltivazione è largamente utilizzata per ceppi come *Spirulina* e *Chlorella*. L'altezza del flusso è mantenuta fra i 15 e i 50 cm di altezza

per permettere una corretta diffusione della luce. Il sistema, in genere, opera in continuo e quindi necessita di apparecchiature esterne, come pompe e serbatoi, per poter operare in periodi di tempo prolungati [63]. In figura 2 è riportato lo schema di questa tipologia di coltura.

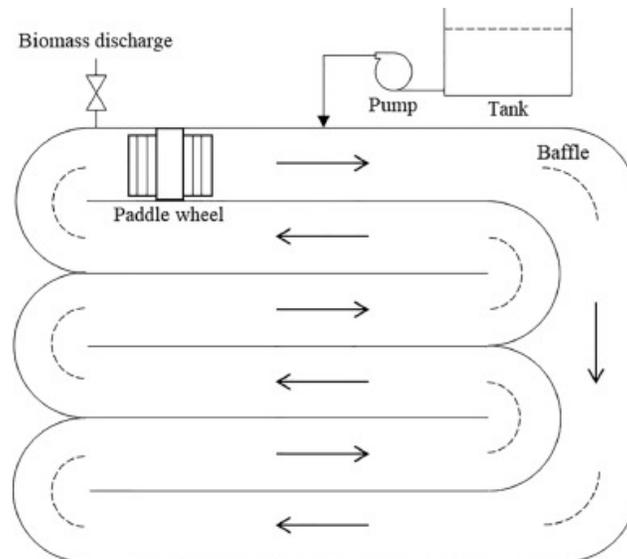


FIG. 2: Schema di un Raceway per la coltivazione delle microalghe. Immagine ripresa da [63].

#### 1.2.4 Mezzo di crescita

Il mezzo di crescita, per definizione, è la soluzione nella quale la biomassa algale è sospesa e che contiene le sostanze necessarie per l'accrescimento. La scelta del mezzo di crescita, indipendentemente dal metodo di coltivazione, è fondamentale per la crescita della biomassa algale. A seconda delle condizioni prefissate di crescita (eterotrofia, fototrofia o mixotrofia) e in base all'obiettivo della coltura, sarà necessario individuare un medium adeguato. In genere, si impiegano medium sintetici creati ad hoc oppure si utilizzano mezzi di coltivazione considerati di scarto, come il digestato, oppure acque reflue. Il requisito base di un mezzo di crescita è quello di contenere i nutrienti necessari per lo sviluppo della biomassa algale. Tuttavia, è possibile calibrare la disponibilità di alcuni nutrienti, limitandone la disponibilità, al fine d'indurre le cellule ad attivare sistemi enzimatici alternativi[45]. Così facendo, si verifica una riduzione della crescita della biomassa, ma al contempo un accumulo di sostanze d'interesse, come lipidi o amido, oppure di metaboliti secondari[10]. La coltivazione delle microalghe può essere condotta in "batch", con tutti i nutrienti disponibili fin dal primo momento, in "fed-batch", che consiste nel fornire determinate sostanze e in determinate quantità in momenti

---

specifici della coltivazione, oppure in continuo. I macronutrienti necessari per la crescita della biomassa algale sono:

1. il carbonio deve essere presente in forma inorganica, se le microalghe si sviluppano in fototrofia, oppure come materia organica, in condizioni eterotrofe. Questo elemento è alla base di ogni forma di vita e le microalghe non fanno eccezione. Il carbonio è l'elemento alla base del metabolismo ed è costituente delle molecole sintetizzate dalle cellule. Le fonti di carbonio organico più utilizzate, per colture eterotrofe o mixotrofe, sono l'acetato e il glucosio. Sono diversi gli studi che ipotizzano o sperimentano l'utilizzo di forme di carbonio più complesse con l'obiettivo di riutilizzare scarti di lavorazione di zuccheri [52];
2. l'azoto è fondamentale per l'accrescimento cellulare dato che è presente in molte molecole essenziali, come il DNA e le proteine. È possibile approvvigionare questo elemento sotto forma di nitrato, nitrito, ammonio, urea o altre forme di azoto organico. L'ammonio, in teoria, è la forma preferibile di azoto per la coltivazione della microalghe, tuttavia è spesso causa di fenomeni di tossicità per alcuni ceppi [20]. Risulta di particolare interesse la coltivazione con quantità limitanti di azoto per gli effetti che inducono sulla biomassa. La carenza di questo elemento comporta uno sviluppo e accumulo di sostanze prive di azoto, come i trigliceridi oppure amido. Le quantità accumulate di queste sostanze variano a seconda del ceppo algale e di altre condizioni ambientali [45];
3. Il fosforo è un elemento che partecipa alla composizione cellulare per circa l'1%, ma in condizioni di larga disponibilità può rappresentare il 3% della biomassa [29]. Le molecole più importanti, che contengono questo elemento, sono gli acidi nucleici e i fosfolipidi. In ambiente naturale il fosforo risulta essere un parametro limitante per la crescita a causa di reazioni di precipitazione con altri ioni presenti nell'acqua. Le microalghe, a seconda del ceppo, possono preferire fonti di fosforo organico o lo ione fosfato [45]. In presenza di quantità abbondanti di fosforo si verifica un accumulo di polifosfati in granuli. Questo particolare effetto può essere d'interesse per la depurazione delle acque reflue [29];
4. lo zolfo è utilizzato dalla biomassa per sintetizzare alcuni amminoacidi, diverse molecole che conformano la parete cellulare, enzimi e diverse vitamine. Le microalghe, analogamente alla

---

maggior parte dei microorganismi, non dispongono di un sistema complesso di accumulo dello zolfo, ne consegue la necessità di un apporto esterno sostenuto di tale elemento [18]. Lo zolfo è assimilabile dalle microalghe come ione solfato, anche se alcuni ceppi eucarioti sono in grado di sfruttare forme più complesse. In particolare per il ceppo "*B. braunii*" è verificata la possibilità di utilizzare, entro certi limiti, il gruppo solfito o bisolfito. Di conseguenza, si è formulata l'ipotesi di utilizzare tale ceppo per desolfurare flussi gassosi [17].

Una coltura di microalghe necessita anche di una serie di micronutrienti, in quantità ridotta, per potersi sviluppare. I più importanti elementi che rientrano in questa categoria sono: ferro, magnesio, zinco, nichel, cobalto, rame, molibdeno e selenio [45]. Le quantità necessarie per la crescita della biomassa algale ricadono nell'ordine dei microgrammi o nanogrammi. Vi è una differenza sottile fra una dose inibente e una utile per l'accrescimento cellulare [6]. Questi micronutrienti ricoprono il ruolo di cofattori in diversi processi biologici essenziali.

Il recupero di nutrienti da fonti considerabili di scarto, come acque reflue o digestato, è sicuramente d'interesse per coltivare microalghe. L'efficacia della depurazione da sostanze indesiderate e la composizione della biomassa ottenuta dipendono dalla natura stessa del mezzo di crescita. La soluzione più diffusa, che prevede il riutilizzo di un flusso di scarto, è la coltivazione di microalghe con acque reflue municipali [40]. L'elevato interesse per l'utilizzo delle sostanze contenute in questa tipologia di refluo deriva, non tanto dalle quantità o dalla qualità dei nutrienti sfruttabili, ma piuttosto dalla volontà d'investigare una soluzione più sostenibile. L'opportunità è quella di sostituire i processi di trattamento tradizionali con la coltivazione delle microalghe, garantendo un ritorno economico e mantenendo gli stessi obiettivi di rimozione.

Si è verificata anche la possibilità d'impiegare reflui di tipo agricolo e industriale. Il refluo agricolo deriva principalmente da attività che coinvolgono l'allevamento animale, con conseguente apporto di grandi quantità di azoto e fosforo. Fattori come la specie allevata, la dieta animale, le tecniche di allevamento e la posizione geografica influiscono sulle caratteristiche del refluo [40]. Di norma, lo scarto dell'allevamento è destinato a essere smaltito su suolo agricolo, dopo opportuni trattamenti. È utile sottolineare come questo processo di recupero non possa essere impiegato per coltivazioni sensibili o in zone a rischio di eutrofizzazione. Il refluo industriale, d'altro canto, è in genere meno

ricco di nutrienti, ma è caratterizzato dalla presenza di metalli pesanti. Questo comporta la volontà di sfruttare alcuni ceppi di microalghe in grado di adsorbire tali composti [31]. In maniera analoga al refluo agricolo, le caratteristiche degli scarti industriali dipendono dalle caratteristiche e tipologia del processo produttivo. L'ultima tipologia di rifiuto che è stata presa in considerazione per la coltivazione delle microalghe è il digestato. La digestione anaerobica è un processo biologico, già largamente utilizzato in diversi settori, per la produzione di biogas. Tuttavia, gli sforzi della comunità scientifica si sono concentrati sull'aumentare la resa di produzione e incrementare la quantità di solidi volatili rimossi dal substrato [28], trascurando il trattamento del materiale di scarto che deriva da questa operazione. Tradizionalmente, la frazione solida del digestato è riutilizzata in ambito agricolo, ma questo potrebbe comportare fughe di nutrienti e conseguente eutrofizzazione. In genere, il digestato è povero di carbonio che è consumato dalla biomassa durante il processo di produzione del metano, ma contiene una grande quantità di azoto sotto forma di ammonio. L'utilizzo di questa sostanza come mezzo di crescita delle microalghe può necessitare alcuni pre trattamenti. Se c'è il rischio di contaminazione della biomassa algale può risultare ottimale filtrare il digestato in autoclave. Se la concentrazione di ammonio è troppo elevata si può effettuare una diluizione. In tabella 4 sono riportati, per le diverse tipologie di mezzo di coltivazione descritto, le concentrazioni tipiche di azoto e fosforo.

**TAB. 4:** Concentrazioni tipiche di azoto e fosforo e il relativo rapporto (N/P) per diverse tipologie e fonti di refluo. Tabella ripresa da [40].

Tipologia di refluo	Descrizione aggiuntiva	TN (mg/L)	TP (mg/L)	N/P
Refluo municipale	Fognatura	15-90	5-20	3.3
Refluo agricolo/animale	Azienda casearia	185-2636	30-727	3.6-7.2
	Allevamento di pollame	802-1825	50-446	4-16
	Allevamento di suini	1110a-3213	310-987	3.0-7.8
	Allevamento di bovini	63-4165	14-1195	2.0-4.5
Refluo industriale	Industria tessile	21-57	1.0-9.7	2.0-4.1
	Azienda vinicola	110a	52	2.1
	Industria Conciaria	273	21	13.0
	Cartiera	1.1-10.9	0.6-5.8	3.0-4.3
	Oleificio	532	182	2.9
Digestato	Digestato da azienda casearia	125-3456	18-250	7.0-13.8
	Digestato da allevamento di pollame	1380-1580	370-382	3.6-4.3
	Digestato da acque reflue municipali	427-467	134-321	-
	Digestato da scarti alimentari	1640-1885	296-302	-

---

### 1.2.5 Utilizzi della biomassa algale

Le microalghe, come già accennato nei paragrafi precedenti, possono sopperire a diverse necessità produttive e il loro impiego può integrarsi ad attività di recupero. I principali ambiti nei quali si è ipotizzato utilizzare questi microorganismi sono:

1. le microalghe sono fonte di diverse molecole e nutrienti che possono essere d'interesse per l'alimentazione umana. I composti più importanti, in termini di quantità disponibile, sono i carboidrati e le proteine. Altre molecole d'interesse sono le vitamine, i micronutrienti metallici e gli acidi grassi polinsaturi. Già da diversi secoli nei paesi asiatici è diffuso l'utilizzo delle alghe verdi come alimento. Nel recente passato, i prodotti a base di microalghe hanno occupato una sempre più larga fetta di mercato nel settore dell'integrazione alimentare. Gli articoli più diffusi sono sotto forma di polveri oppure di compresse. La biomassa algale può essere sfruttata anche per molecole, come il carotene, utilizzabili come colorante commestibile[39];
2. il settore cosmetico può beneficiare di alcuni composti prodotti durante lo sviluppo della biomassa algale. Si introducono, nei processi produttivi, molecole con proprietà antiossidanti oppure in grado di sviluppare legami con l'acqua. Alcuni ceppi, come *Chlorella* e *Arthrospira*, sono già ampiamente utilizzati per articoli della cura della pelle e per la protezione solare [19];
3. la produzione di biomassa algale consente di effettuare recupero energetico. Ceppi di microalghe, che sviluppano grandi quantità di lipidi, possono essere sottoposte a processi estrattivi per ottenere biocombustibile. Attualmente questa tipologia di carburante deriva, per la maggior parte, da fonti edibili, come il mais. Per evitare di contribuire all'aumento del consumo di suolo e per non interferire con il mercato dell'alimentazione, i biocombustibili di nuova generazione devono necessariamente provenire da fonti alternative o non commestibili. La coltivazione di microalghe, non entrando in competizione con il settore agricolo tradizionale, rappresenta in questo senso una valida opportunità. In tabella 5 sono riportate le caratteristiche che descrivono il processo di produzione del biocombustibile per diverse coltivazioni, fra le quali le microalghe;

**TAB. 5:** Caratteristiche principali, di diverse coltivazioni, utili per descrivere il loro impiego per la produzione di biocombustibile. Tabella ripresa da [39].

Plant source	Contenuto di lipidi %	Resa di lipidi $L/ha \cdot anno$	Consumo di suolo $m^2 \cdot anno/kg_{biod.}$	Produttività del biodiesel $kg_{biod.}/ha/anno$
Mais ( <i>Zea mays</i> L.)	44	172	66	152
Canapa ( <i>Cannabis sativa</i> L.)	33	363	31	321
Soia ( <i>Glycine max</i> L.)	18	636	18	562
Giatropa ( <i>Jatropha curcas</i> L.)	28	741	15	656
Camelina ( <i>Camelina sativa</i> L.)	42	915	12	809
Canola ( <i>Brassica napus</i> L.)	41	974	12	862
Girasole ( <i>Helianthus annuus</i> L.)	40	1070	11	946
Ricino ( <i>Ricinus communis</i> )	48	1307	9	1156
Olio di palma ( <i>Elaeis guineensis</i> )	36	5366	2	4747
Microalgae (bassa % di lipidi)	30	58,700	0.2	51,927
Microalgae (media % di lipidi)	50	97,800	0.1	86,515
Microalgae (alta % di lipidi)	70	136,900	0.1	121,104

4. L'utilizzo di fertilizzanti, in agricoltura moderna, risulta necessario per mantenere rese sufficientemente elevate. Nel tempo l'impiego di queste sostanze ha provocato diversi problemi ambientali come l'indurimento e inaridimento del terreno, l'inquinamento alla falde sotterranee e la salinizzazione del suolo. Per evitare l'insorgere o l'inasprimento di queste problematiche, è interessante la possibilità di utilizzare della biomassa algale come biofertilizzante. Alcuni ceppi di microalghe sono in grado di fissare l'azoto atmosferico nel suolo, mentre altre sviluppano nutrienti sfruttabili dalle colture. Più in generale, la capacità fotosintetica della biomassa algale comporta l'arricchimento del terreno di carbonio organico [69];
5. le microalghe sono fonte di diverse sostanze che possono essere impiegate nel settore farmaceutico per la cura di diverse condizioni come problemi cardiovascolari, alcuni tipi di cancro, infiammazioni e infezioni batteriche. In genere, le molecole derivate dalle microalghe per questi scopi sono metaboliti o cometaboliti sviluppati durante l'accrescimento della biomassa. È possibile sfruttare queste biomolecole per scopi terapeutici ed evitare processi di sintesi tradizionali più complessi [69];
6. come già descritto nella sezione dedicata ai mezzi di coltura, le microalghe sono in grado di accrescere sfruttando i nutrienti contenuti in flussi di scarto. Le potenzialità d'impiegare questi organismi nei processi di depurazione sono molteplici. Le sostanze più rilevanti che possono essere rimosse tramite l'utilizzo di microalghe sono ammonio, fosfati, metalli pesanti. In genere è

---

possibile impiegare la biomassa algale in consorzio con batteri eterotrofi e nitrificanti per poter effettuare depurazione nei confronti del carbonio organico, nitrito e nitrato.

### **1.3 Respirimetria**

Per ottimizzare il processo di coltivazione delle microalghe, oltre a valutare la composizione del mezzo di crescita e selezionare la conformazione impiantistica più adeguata, è necessario stabilire quali siano i parametri operativi ottimali. La respirometria permette di prevedere, in maniera rapida e poco costosa, il comportamento della biomassa al variare delle condizioni esterne. Questa tecnica ben si applica a tutti i processi che sviluppano o assorbono ossigeno. È possibile misurare, di conseguenza, la fotosintesi e la respirazione dei ceppi algali d'interesse in un ambiente controllato [72].

#### **1.3.1 Tecniche e utilizzi**

La respirometria nasce per rispondere alla necessità di descrivere le cinetiche e il metabolismo dei batteri. Essa, tradizionalmente, consiste nel determinare la variazione della concentrazione dell'elettrone accettore, che è consumato nelle reazioni chimiche del metabolismo. L'elettrone accettore, in genere, è una sostanza inorganica e comunemente si tratta di ossigeno, ma questo ruolo può essere ricoperto da nitrito, nitrato o da forme ossidate di zolfo o ferro. Più raramente, si determina la variazione dell'elettrone donatore, tuttavia questa modalità non è riconosciuta globalmente come respirometria, data la difficoltà di discernere il consumo specifico di tali sostanze per la produzione di energia [72].

Il respirometro è caratterizzato da un reattore chiuso e monitorato nel quale è possibile controllare, a piacimento, i parametri d'interesse. I sistemi più semplici, in genere, sono composti da un recipiente di vetro, da un miscelatore meccanico, da un sistema di controllo della temperatura e da una sonda che misura la concentrazione d'ossigeno. Per prove che si protraggono nel tempo può risultare necessario un sistema d'aerazione che mantenga le condizioni aerobiche. È possibile includere altre apparecchiature ausiliarie come una sonda pH, se si ha necessità di monitorare tale parametro, oppure pompe peristaltiche da impiegare per dosaggi mirati. Sicuramente un respirometro deve essere dotato di un registro delle misure effettuate, da poter consultare durante la fase di elaborazione dei dati. I respirometri sono quindi apparecchiature complesse e possono essere composti da diverse componenti a seconda delle necessità [72]. Si individuano diverse macro categorie per classificare e descrivere un

---

respirometro. Tale classificazione è effettuata in base a due caratteristiche discriminanti: la fase nella quale è inserita la sonda di misura dell'ossigeno (fase liquida o gassosa) e la presenza, o assenza, di un flusso ausiliario in fase liquida o gassosa [58].

In base al trasferimento di ossigeno (OTR) all'interfaccia delle due fasi e l'eventuale flusso di gas entrante e uscente, è possibile determinare, tramite un bilancio di massa, il consumo dell'ossigeno dovuto al processo di respirazione. Il rateo di consumo dell'ossigeno (OUR) è quindi definito tramite le seguente formula (2):

$$\frac{d(DO)}{dt} = OTR - OUR = k_{La} \cdot (DO_{sat} - DO) - OUR \quad (2)$$

In tale equazione, l'*OTR* è definito come il prodotto fra la costante di trasferimento di massa fra le due fasi, caratteristica del sistema ( $k_{La}$ ), e la differenza fra la concentrazione di ossigeno a saturazione, alla data temperatura ( $DO_{sat}$ ), e la concentrazione d'ossigeno all'istante di tempo  $t$ . [4].

Le applicazione più comune delle tecniche respirometriche è la stima dei parametri cinetici e stechiometrici, che caratterizzano le reazioni in presenza della biomassa. È di particolare interesse, studiare il comportamento di diversi organismi per processi come la depurazione biologica. Inoltre, è possibile descrivere fenomeni d'inibizione, dati dalla presenza di sostanze specifiche, e individuare, al variare della concentrazione, il relativo effetto sulla biomassa. Sia il comportamento dei microrganismi eterotrofi che nitrificanti possono essere descritti tramite respirometria [72]. È possibile impiegare la respirometria anche per determinare la frazione di biomassa attiva nei processi a fanghi attivi [56] e per caratterizzare la ripartizione fra COD facilmente biodegradabile (rbCOD) e lentamente biodegradabile (sbCOD) in un reflu [58].

### 1.3.2 Applicazione per le microalghe

La respirometria applicata alle microalghe è analoga a quanto descritto per la biomassa batterica. Tuttavia, in aggiunta alla possibilità d'individuare il rateo di respirazione cellulare (*OUR*), si può valutare il rateo di produzione d'ossigeno da fotosintesi (*OPR*). La variazione di concentrazione d'ossigeno positiva, che si registra durante l'attività fotosintetica, è condizionata dall'attività di respirazione. Per questo motivo, si definisce il rateo di produzione d'ossigeno netto (*OPR<sub>net</sub>*), che considera il solo

---

ossigeno prodotto da fotosintesi, e il rateo di produzione d'ossigeno lordo ( $OPR_{gross}$ ), che è definito come la differenza fra  $OPR_{net}$  e  $OUR$  [72]. L'OPR fornisce anche un'indicazione sulla crescita della biomassa alle condizioni d'esercizio [30]. Ovviamente, il respirometro deve essere dotato di un sistema d'illuminazione, preferibilmente regolabile. Le fonti di luce più diffuse possono essere a LED, a fluorescenza oppure a incandescenza con conseguenti spettri di emissione differenti. Per valutare sia l'OPR che l'OUR nella medesima prova, è necessario alternare fasi di luce e buio con dei cicli predefiniti. Anche la geometria e il materiale del reattore del respirometro dovranno essere scelti con cura in termini di forma e dimensioni, visto che possono condizionare sensibilmente la diffusione della luce. Altre apparecchiature come sonde pH, sonde per l'ossigeno disciolto, pompe peristaltiche e il sistema di controllo e misura della temperatura sono del tutto analoghe a quanto utilizzato per la biomassa batterica. Il campione può necessitare di pre trattamenti, come diluizioni, filtrazione o centrifugazione. Queste pratiche sono adottate per omogeneizzare la biomassa a condizioni fissate garantendo, di conseguenza, la riproducibilità dell'esperimento. Per considerare l'effetto della concentrazione della biomassa sui risultati delle prove, è necessario valutare l'OPR e l'OUR per unità di solidi totali o solidi volatili. Per questo motivo è necessario svolgere sul campione misure di quest'ultimi due parametri [72].

Esistono una serie di fattori, alcuni di essi già accennati, che influiscono sulla crescita e sull'attività del ceppo algale analizzato quali:

1. la luce è una delle variabili che più condiziona il processo di sviluppo della biomassa algale. L'irradianza, seppur necessaria affinché ci sia fotosintesi, può comportare effetti inibitori e influenza l'acclimatazione delle cellule. L'OPR può differire a seconda della fonte luminosa e in base ai cicli luce e buio definiti. Ad esempio, si è verificato come per valutare l'effetto di condizioni di scarsa disponibilità di nutrienti sulla biomassa, in maniera efficace, sia necessario applicare cicli luce/buio intermittenti [47]. Come accennato in precedenza, non sono da trascurare effetti d'ombreggiamento dovuti alla presenza stessa della biomassa e la diffusione della luce all'interno del sistema d'analisi;
2. le quantità e tipologie di nutrienti messi a disposizione della biomassa algale influenzano notevolmente l'attività cellulare e, di conseguenza, i risultati della respirometria. Può essere d'interesse

---

verificare l'effetto limitante associato alle basse concentrazioni di alcuni nutrienti oppure valutare la possibilità di sfruttare fonti alternative, quali acque di scarto o sottoprodotti industriali. È noto come un fondamentale elemento da considerare, durante una prova respirometrica, sia il carbonio inorganico [41]. Le complesse relazioni che sussistono fra la disponibilità di carbonio inorganico e il pH rendono di complessa interpretazione gli effetti di questo elemento. Il pH determina la ripartizione fra anidride carbonica disciolta, carbonati e bicarbonati. Durante la prova parte del carbonio inorganico è consumato dall'attività fotosintetica generando uno scostamento nel pH, che tenderà ad aumentare. Questo incremento comporta una riduzione della disponibilità di anidride carbonica disciolta e di bicarbonato, che sono le forme di carbonio utilizzabili dalla biomassa algale. Questo comporta una riduzione del carbonio disponibile per l'accrescimento cellulare. Per queste motivi, risulta necessario un sistema di dosaggio di sostanza acida per limitare questo fenomeno [72];

3. la temperatura regola la maggior parte delle cinetiche delle reazioni biologiche, che interessano le microalghe e gli organismi in generale. Di conseguenza, questa variabile di stato definisce direttamente il rateo di respirazione e di fotosintesi [3]. La temperatura regola anche la speciazione di alcuni inibenti, come l'ammoniaca libera, e amplifica gli effetti negativi da un'eccessiva irradianza incidente. In genere, le microalghe possono sopravvivere a temperature di molto inferiori a quella ottimale. Tuttavia, non è valido il caso contrario e se ci si scosta verso valori elevati si verifica una repentina perdita di attività cellulare [72].;
4. il pH, oltre a definire le speciazioni di alcuni nutrienti e inibenti, influenza direttamente il processo di fotosintesi e di respirazione. In genere i valori ottimali di pH, per la maggior parte dei ceppi microalgali, ricadono nell'intervallo fra 7 e 8. All'interno di questo intervallo è difficile individuare grandi variazioni nell'attività cellulare. Tuttavia, se si espongono le microalghe a valori estremi di pH, si verificano effetti inibitori, più o meno importanti a seconda del ceppo [72];
5. l'ossigeno disciolto, ad alte concentrazioni, induce fenomeni limitanti per la maggior parte dei sistemi di coltivazione adottati per le microalghe. Da letteratura, si evidenzia come per concentrazioni al di sotto o pari a quella di saturazione non si verificano scostamenti nei valori registrati

---

di OPR. D'altro canto, per concentrazioni di ossigeno di molto superiori a quelle di saturazione (180-220%) l'attività fotosintetica risulta fortemente inibita [72];

6. la presenza di sali disciolti nella soluzione di crescita è essenziale per lo sviluppo corretto delle attività cellulari. Tuttavia, elevate concentrazioni di queste sostanze possono condurre a danni permanenti o alla morte delle cellule [16]. Oltre a influenzare la crescita della biomassa, la salinità interessa anche la solubilità dell'ossigeno e la diffusione nello strato limite. Questo parametro può essere di assoluta rilevanza se applicato a sperimentazioni su colture in acqua di mare, o per reattori soggetti a forte evaporazione con conseguente aumento della concentrazione di sali [72];
7. la respirometria può essere utilizzata per valutare l'effetto provocato da sostanze inibenti e tossiche sulla biomassa algale, come quelle potenzialmente presenti nelle acque reflue. È facile, tramite respirometria, correlare l'effetto sulla biomassa alla concentrazione d'inibente. Le sostanze più comuni che provocano una riduzione dell'attività cellulare sono: l'ammoniaca, il solfuro, l'etanolo, i metalli pesanti e gli antibiotici [72];

le prove respirometriche possono essere condotte su più specie di microorganismi differenti contemporaneamente. È possibile valutare e comprendere, in maniera preliminare, i complessi meccanismi che si instaurano in presenza di diversi tipi di microorganismi. Questo è utile considerando le possibilità dell'utilizzo di un consorzio di alghe e batteri per la depurazione. In questa condizione risulta più complesso poter valutare i singoli contributi al consumo, o alla produzione, di ossigeno dati dal contributo delle diverse specie presenti. L'equazione (3) che descrive la variazione di concentrazione d'ossigeno è modificata in questo modo:

$$\frac{d(DO)}{dt} = OTR + OPR_{ALG} - \sum_{i=1}^N OUR_i (i = ALG, HET, NOB, AOB) \quad (3)$$

oltre ai termini già descritti nel paragrafo precedente, è necessario considerare l'OUR delle diverse specie presenti. Per condurre una corretta respirometria quindi è necessario separare, ove possibile, le microalghe dai batteri tramite membrane o per centrifugazione. Una seconda opzione è quella di utilizzare sostanze inibenti specifiche al fine di ridurre l'attività di una o più specie presenti. In genere, la sostanza utilizzata per "disattivare" una delle componenti della biomassa deve essere selettiva,

non deve causare fenomeni chimico-fisici secondari e l'effetto inibitorio deve perdurare lungo l'intera durata dell'esperimento [72]. In figura 3 sono illustrate le diverse sostanze inibitorie più utilizzate e con quale specie interagiscono:

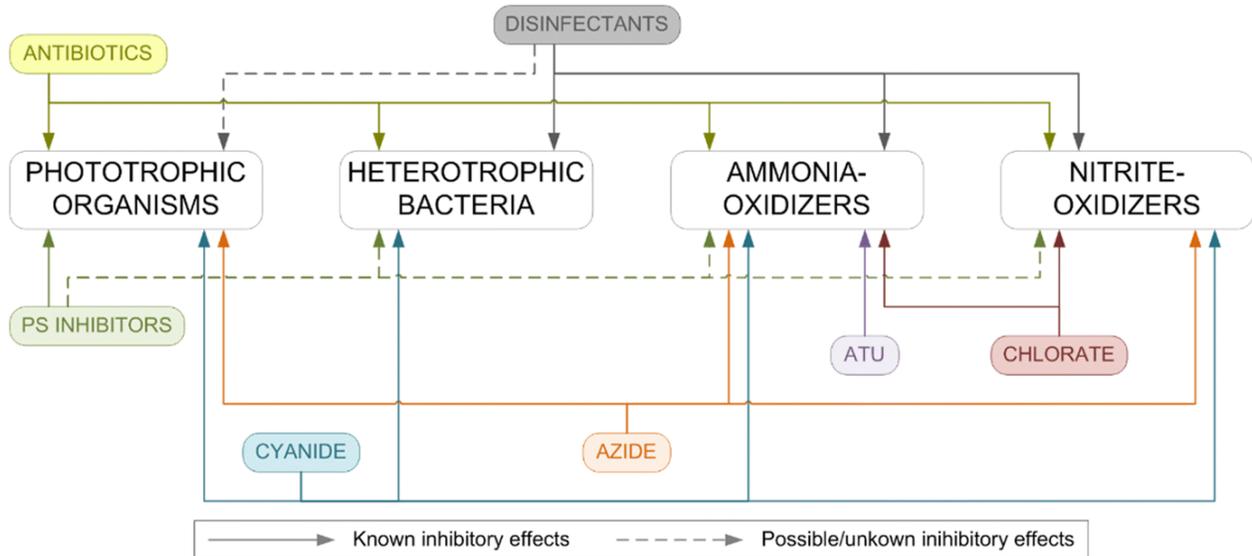


FIG. 3: Schema che mostra le sostanze che danno effetti inibitori e le relazioni che possono instaurarsi con le diverse specie. Immagine ripresa da [72]

#### 1.4 Modellazione di un consorzio Algae-Batteri

I modelli matematici sono degli strumenti estremamente versatili e applicabili negli ambiti più disparati. In particolare, per comprendere, prevedere e migliorare dei processi biologici, come in questo caso di studio, è possibile ricorrere a questa tipologia di strumento. L'obiettivo è quello di descrivere la grande complessità che deriva da un sistema dove: microorganismi, specie chimiche e fenomeni fisici si intrecciano in maniera non lineare [24]. Al contrario dei modelli dedicati ai soli batteri, come l'"Activated Sludge Model" (ASMs [12]) e l'"Anaerobic Digestion Model" (ADM [21]), non è ancora stato sviluppato un modello globalmente riconosciuto che descriva la biomassa algale [74]. Tale carenza è dovuta principalmente al fatto che, per i batteri, esistono processi alla scala industriale ampiamente diffusi e che è possibile trovare ingenti quantità d'informazioni in letteratura, al contrario delle microalghe. Tuttavia, modellare la cinetica delle microalghe è di vitale importanza per l'ottimizzazione della coltivazione e dei relativi parametri, con l'obiettivo di sviluppare sistemi di crescita a larga scala [65]. È d'interesse comprendere anche le interazioni che intercorrono fra le microalghe e altri microorganismi,

---

come i batteri. Questa necessità deriva principalmente dalla volontà di prevedere il comportamento di coltivazioni all'aperto, dove è possibile che ci sia contaminazione da batteri, e, soprattutto, per descrivere i processi di depurazione con l'utilizzo di microalghe. Allo stato attuale esistono diversi modelli che descrivono il metabolismo microalgale [67], tuttavia solo alcuni di essi sono applicabili a processi di depurazione. Diversi modelli disponibili non sono espressi nei termini e nelle modalità indicata dall'IWA ("*International Water Assosiation*"), ente che, nel recente passato, si è sforzato per rendere disponibile uno standard in questo ambito. La direttiva principale, per descrivere e sviluppare correttamente un modello, è quella di elencare i processi biologici, i relativi coefficienti stechiometrici e le variabili coinvolte tramite una matrice di Petersen [74]. I modelli più rilevanti dal punto di vista storico, che rappresentano un consorzio di alghe e batteri, sono il *MRWQMI* [36], il *BioAlgae2* [68] e l'ALBA [74].

#### **1.4.1 Modello ALBA - introduzione, variabili di stato e processi biologici**

Il modello ALBA, sviluppato da Casagli ([74]), è stato selezionato, fra le diverse opzioni disponibili, per essere impiegato in questo caso di studio. Tale strumento è stato creato considerando la letteratura pregressa con l'esatto scopo di descrivere un consorzio di alghe e batteri. Il modello ALBA è stato sviluppato utilizzando, come supporto, la piattaforma numerica "*AQUASIM*". Il modello è composto da 19 differenti processi biologici che coinvolgono 17 variabili di stato (illustrate in tabella 6). Le stechiometrie delle varie reazioni sono state riprese da lavori modellistici precedenti, selezionando quelli pubblicati in formato standard secondo le modalità proposte dall'IWA. I batteri modellati sono sia eterotrofi che nitrificanti (AOB e NOB). L'ALBA è stato concepito con l'idea di poter rappresentare un "*raceway*", posto all'aperto, utilizzato per la depurazione di acque reflue o digestato [76].

Prima di elencare i diversi processi inclusi all'interno del modello, è necessario indicare le ipotesi e semplificazioni che sono risultate rilevanti durante lo sviluppo dell'ALBA [76]:

1. si ipotizza che il carbonio organico biodegradabile sia assimilato dalla sola biomassa eterotrofa. È esclusa, di conseguenza, la possibilità di poter modellare comportamenti mixotrofi o eterotrofi da parte delle microalghe. Questa ipotesi è avallata dal fatto che, sebbene le microalghe siano effettivamente in grado di consumare carbonio organico, il digestato contiene forme troppo complesse per essere utilizzate dalla biomassa algale. Un altro motivo a supporto di questa

**Tab. 6:** Variabili di processo considerate per sviluppare e descrivere i processi biologici nel modello ALBA. Tabella ripresa da [76].

Simbolo	Descrizione	Unità di misura
$X_{ALG}$	Conc. alghe fototrofiche	$g_{COD}/m^3$
$X_{AOB}$	Conc. batteri nitrificanti ammoniacale	$g_{COD}/m^3$
$X_{NOB}$	Conc. batteri nitrificanti nitrito	$g_{COD}/m^3$
$X_H$	Conc. batteri eterotrofi	$g_{COD}/m^3$
$X_S$	Conc. carbonio organico sospeso (lentamente biodegradabile)	$g_{COD}/m^3$
$X_I$	Conc. sostanza inerte sospesa	$g_{COD}/m^3$
$S_S$	Conc. carbonio organico disciolto (velocemente biodegradabile)	$g_{COD}/m^3$
$S_I$	Conc. sostanza inerte disciolta	$g_{COD}/m^3$
$S_{IC}$	Conc. totale di carbonio inorganico	$g_C/m^3$
$S_{ND}$	Conc. di azoto organico	$g_N/m^3$
$S_{NH}$	Conc. di ammonio	$g_N/m^3$
$S_{NO2}$	Conc. di nitrito	$g_N/m^3$
$S_{NO3}$	Conc. di nitrato	$g_N/m^3$
$S_{N2}$	Conc. di azoto gassoso	$g_N/m^3$
$S_{PO4}$	Conc. totale di fosforo all'eq. ( $PO_4^{3-}$ , $HPO_4^{2-}$ , $H_2PO_4^-$ , $H_3PO_4$ )	$g_P/m^3$
$S_{O2}$	Conc. di ossigeno disciolto	$g_O/m^3$
$S_{H2O}$	Acqua	$g_H/m^3$

decisione è che la coltivazione di biomassa algale in sistemi aperti, in condizioni mixotrofe o eterotrofe e in consorzio con altre specie di microrganismi non è ancora ben supportata dalla letteratura disponibile;

2. i meccanismi di predazione sono stati trascurati e parzialmente integrati nel processo di decadimento della biomassa;
3. passaggi intermedi di sviluppo della biomassa, come l'accumulo di nutrienti o di sostanza organica, non sono stati considerati nel modello;
4. i processi d'idrolisi, che coinvolgono sia l'urea che il COD particolato, sono svolti dalla sola biomassa eterotrofa;
5. si assume che tutti i micronutrienti necessari siano presenti in abbondanza nel mezzo di crescita. Di conseguenza non si esplorano eventuali effetti dati dalla privazione di tali sostanze;

- 
6. si assume che le microalghe possano utilizzare solo nitrato o ammonio come fonte di azoto inorganico per lo sviluppo cellulare;
  7. il raceway è considerato e modellato come un CSTR. Di conseguenza, si suppone che la miscelazione conferita dal *paddlewheel* sia sufficiente per mantenere costanti le concentrazioni delle diverse sostanze all'interno della vasca.

In seguito a queste ipotesi e premesse, è possibile descrivere ed elencare i diversi processi introdotti all'interno del modello ALBA [76]:

- $\rho_1$  crescita fototrofica delle microalghe sfruttando l'ammonio ( $NH_4^+$ ) come fonte di azoto. Durante questo processo si verifica consumo di carbonio inorganico ( $HCO_3^-$  o  $CO_2$ ), di fosforo e d'ammonio con conseguente produzione di ossigeno;
- $\rho_2$  crescita fototrofica delle microalghe utilizzando nitrato ( $NO_3^-$ ) come fonte di azoto. La teoria suggerisce che questo meccanismo di accrescimento non è energeticamente meno favorevole rispetto all'alternativa. Per questo motivo, questo processo si attiva in condizioni di scarsità di ammonio. Si verifica un consumo di carbonio organico ( $HCO_3^-$  o  $CO_2$ ), di fosforo e di nitrato con conseguente produzione di ossigeno ;
- $\rho_3$  respirazione delle microalghe con consumo di ossigeno, di biomassa e produzione di anidride carbonica. Di norma, in altri modelli, è considerato un solo processo che comprenda la respirazione il decadimento della biomassa. Nel modello ALBA i due meccanismi sono distinti e si assume che solo durante la respirazione si verifichi un consumo di ossigeno;
- $\rho_4$  decadimento delle microalghe senza consumo di ossigeno. Si considerano rilasciate solo sostanza organica e nutrienti, in maniera analoga ad altri modelli simili;
- $\rho_5$  crescita aerobica dei batteri eterotrofi consumando ammonio come fonte d'azoto. Questo meccanismo è preferito da questo tipo di biomassa in condizioni di presenza di ossigeno. Durante lo sviluppo di questo processo vengono consumati carbonio organico, fosforo ossigeno con conseguente produzione di anidride carbonica;

- 
- $\rho_6$  crescita aerobica dei batteri eterotrofi consumando nitrato come fonte d'azoto. Questo processo è considerato attivo solo in carenza di ammonio, dato che richiede più energia per essere effettuato rispetto all'alternativa. Si verifica consumo di carbonio organico, di fosforo e di ossigeno con conseguente produzione di anidride carbonica;
- $\rho_7$  respirazione aerobica della biomassa eterotrofa. Per questo processo valgono le stesse ipotesi effettuate per la respirazione delle microalghe: solo durante la respirazione si considera il consumo d'ossigeno, oltre che di biomassa;
- $\rho_8$  crescita anossica della biomassa eterotrofa utilizzando nitrato come elettrone accettore. Questo meccanismo si attiva per concentrazioni di ossigeno disciolto limitanti;
- $\rho_9$  crescita anossica della biomassa eterotrofa utilizzando nitrito ( $NO_2^-$ ) come elettrone accettore. Questo meccanismo si attiva per concentrazioni di ossigeno disciolto limitanti;
- $\rho_{10}$  respirazione anossica della biomassa eterotrofa utilizzando nitrito e nitrato come elettrone accettore. Questo meccanismo di respirazione si attiva solo per concentrazioni di ossigeno ridotte;
- $\rho_{11}$  idrolisi del carbonio organico lentamente biodegradabile. Come già accennato, questo processo è effettuato dalla biomassa eterotrofa, attraverso reazioni enzimatiche, per trasformare forme di carbonio difficilmente assimilabili in sostanza di facile biodegradazione. Parte della frazione organica idrolizzata è trasformata in materiale inerte solubile;
- $\rho_{12}$  idrolisi dell'urea effettuata dalla biomassa eterotrofa, senza consumo di ossigeno, tramite reazioni enzimatiche. Da questo processo si sviluppa ammonio e anidride carbonica;
- $\rho_{13}$  decadimento della biomassa eterotrofa. Si considerano rilasciate, durante il processo, solo sostanza organica e nutrienti;
- $\rho_{14}$  crescita aerobica dei batteri nitrificanti ossidanti ammoniaci (AOB). Per lo sviluppo di questo processo, all'interno del modello ALBA, si è seguito l'approccio indicato da Iacopozzi [23]. Si è suddiviso il meccanismo di nitrificazione a due stadi affinché sia possibile riprodurre l'accumulo di nitrito, che si verifica frequentemente in casi reali. Il processo di ossidazione dell'ammoniaca consuma ossigeno, fosforo e carbonio inorganico e comporta la formazione di nitrito;

---

$\rho_{15}$  respirazione aerobica dei batteri nitrificanti ossidanti ammoniaca (AOB). Per questo processo valgono le stesse ipotesi effettuate per la respirazione delle microalghe: solo durante la respirazione si considera il consumo d'ossigeno, oltre che di biomassa;

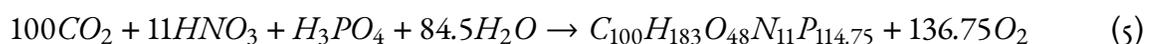
$\rho_{16}$  decadimento dei batteri nitrificanti ossidanti ammoniaca (AOB);

$\rho_{17}$  crescita aerobica dei batteri nitrificanti ossidanti nitrito (NOB). il processo comporta il consumo d'ossigeno per ossidare il nitrito a nitrato, al contempo viene impiegata una fonte di carbonio inorganico e del fosforo;

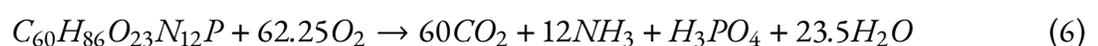
$\rho_{18}$  respirazione aerobica dei batteri nitrificanti ossidanti nitrito (NOB). il processo è del tutto analogo a quanto descritto per le biomasse precedenti;

$\rho_{19}$  decadimento della biomassa di batteri nitrificanti ossidanti nitrito (NOB).

Il modello ALBA è progettato per descrivere l'incidenza dei diversi nutrienti e metaboliti sull'accrescimento fototrofico della biomassa algale e sulla relativa cinetica. Tale considerazione è applicata anche per la maggior parte dei processi biologici dei microorganismi batterici. Tuttavia, prima di descrivere la cinetica dei diversi processi appena elencati è necessario analizzare la stechiometria delle reazioni biologiche principali. Per definire i coefficienti stechiometrici si è ripresa la composizione elementare per i ceppi microalgali dagli studi di Grobbelaar [13], considerando solo cinque elementi principali (carbonio, idrogeno, ossigeno, azoto e fosforo). Le equazioni (4 e 5) che descrivono, sommariamente, la crescita della biomassa algale sono le seguenti:



La composizione della biomassa eterotrofa e dei batteri nitrificanti è stata ripresa dal lavoro di Metcalf et.al [43]. Di conseguenza, la formula chimica generale (6) del processo di respirazione è la seguente:



La matrice di Petersen e i restanti parametri stechiometrici, per ogni processo modellato dall'ALBA, sono riportati alla fine del documento nell'appendice 1.

#### 1.4.2 Modello ALBA - cinetiche dei processi biologici

Ogni processo, descritto nel paragrafo precedente, deve necessariamente considerare i diversi fattori che influenzano il decorrere delle reazioni biologiche. Affinché il modello riesca a rappresentare l'evolversi delle cinetiche caratterizzanti il sistema, è necessario implementare correttamente l'influenza questi elementi. L'equazione generica (7), che descrive la cinetica di accrescimento di una tipologia di biomassa per il modello ALBA, è la seguente:

$$\rho_{crescita,i} = \mu_{max,i} \cdot f_{T,i} \cdot f_{pH,i} \cdot f_I \cdot \frac{K_n}{K_n + S_n} \cdot X_{BM,i} \cdot \min\left(\sum_j \frac{S_j}{K_j + S_j}\right) \quad (7)$$

dove  $\mu_{max,i}$  è il massimo rateo di crescita.  $f_{T,i}$ ,  $f_{pH,i}$  e  $f_I$  sono, rispettivamente, le funzioni che descrivono l'incidenza sulla cinetica della temperatura, del pH e dell'irradianza.  $K_n$  è la costante d'inibizione da substrato e  $S_n$  la relativa concentrazione.  $k_j$  è la costante di semi-saturazione del nutriente e  $S_j$  la concentrazione [76]. Per quanto concerne i processi di respirazione e di decadimento, delle diverse tipologie di biomassa, le equazioni generali (8 e 9) che descrivono questi fenomeni sono:

$$\rho_{resp,i} = \beta_{max,resp,i} \cdot f_{T,i} \cdot f_{pH,i} \cdot \frac{S_{O_2}}{K_{O_2} + S_{O_2}} \cdot X_{BM,i} \quad (8)$$

$$\rho_{decay,i} = \beta_{max,decay,i} \cdot f_{pH,i} \cdot f_{do,decay} \cdot X_{BM,i} \cdot \theta_{decay}^{(T-20)} \quad (9)$$

oltre ai parametri già descritti, si individua  $\beta$  che è il rateo massimo del processo e  $\theta_{decay}$  che è la costante di decadimento per la biomassa considerata. Nel dettaglio, i principali fattori considerati nel modello ALBA, che caratterizzano queste funzioni generiche, sono:

1. i nutrienti ricoprono un ruolo fondamentale nei processi biologici e ne influenzano le cinetiche. In genere, altre soluzioni modellistiche propongono l'utilizzo di funzioni di Monod a due parametri per descrivere il rapporto che si instaura fra i nutrienti e il rateo di crescita. Tuttavia, è ampiamente dimostrato come questo tipo di funzione matematica comporti una sovrastima della limitazione di crescita dei microrganismi in scarsità di più nutrienti contemporaneamente. Per

questo motivo, si è preferito utilizzare la legge dei minimi di Liebeg, dato che meglio rappresenta la realtà [50]. Tale approccio consiste nel definire che l'effetto dato dal nutriente più scarso determina l'andamento complessivo della cinetica. Va specificato, però, che la legge dei minimi è stata applicata esclusivamente ai nutrienti e non ad altri fattori che influiscono sui processi biologici. Per quanto concerne l'attività inibente di alcune sostanze, si è utilizzata una funzione matematica di tipo iperbolico [76].

2. L'irradianza, oltre a essere fondamentale per lo sviluppo del processo di fotosintesi, regola la disponibilità di energia nel sistema. Nel modello ALBA, per descrivere la penetrazione della luce nel mezzo di coltivazione, si è utilizzata la legge di Lambert-Beer (10):

$$\ln\left(\frac{I(z)}{I(0)}\right) = -\varepsilon \cdot c \cdot z \quad (10)$$

Dove  $I(z)$  e  $I(0)$  sono i valori d'irradianza (esprese in  $\mu\text{molE} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) definiti, rispettivamente, alla profondità  $z$  e sulla superficie del raceway;  $\varepsilon$  è il coefficiente d'estinzione della luce e  $c$  è la concentrazione della biomassa algale espressa in termini di TSS. La funzione (11) che descrive l'effetto dell'irradianza sull'accrescimento della biomassa algale è di tipo Haldane ed è espressa come segue:

$$f_I = \mu_{max} \cdot \frac{I}{I + \frac{\mu_{max}}{\alpha} \cdot \left(\frac{I}{I_{opt}} - 1\right)^2} \quad (11)$$

I parametri ancora non descritti sono  $\alpha$ , che rappresenta la pendenza iniziale della curva di dipendenza dalla luce, e  $I_{OPT}$  che è il valore ottimo d'irradianza per la crescita della biomassa algale. Questi due parametri sono stati stimati tramite i risultati delle prove respirometriche, per questo caso di studio. La funzione della luce è stata integrata lungo l'intera profondità del sistema di coltivazione [76];

3. la temperatura influenza notevolmente i processi biologici, soprattutto per un sistema come quello descritto dal modello ALBA posizionato all'aperto. Le oscillazioni di questa variabile, sia nell'arco delle stagioni e sia fra giorno e notte, possono essere di grande entità. Il modello, che descrive l'effetto della temperatura sulla crescita della biomassa algale e batterica, è il "CTMI" ("*Cardinal Temperature Model with Inflection*") [5]. La formula generale (12) di questo modello

è la seguente:

$$f_T = \begin{cases} 0 & T < T_{min} \\ \frac{(T-T_{max}) \cdot (T-T_{min})^2}{(T_{opt}-T_{min}) \cdot (T_{opt}-T_{min}) \cdot [(T-T_{opt}) - (T_{opt}-T_{max}) \cdot (T_{opt}+T_{min}-2T)]} & T_{min} \leq T \leq T_{max} \\ 0 & T > T_{max} \end{cases} \quad (12)$$

Dove i parametri  $T_{opt}$ ,  $T_{min}$  e  $T_{max}$  indicano, rispettivamente, la temperatura ottimale, minima e massima per lo sviluppo della tipologia di biomassa in questione.

Per quanto concerne il decadimento delle diverse specie di microorganismi, è opportuno correggere il rateo di questo fenomeno ( $\mu_{decay}$ ) considerando l'effetto della temperatura. All'interno del modello ALBA, questa dipendenza è stata descritta tramite una funzione di Arrhenius (13) (a un solo parametro  $\theta$ ) [76]:

$$f_T = \frac{\mu_{decay}(T)}{\mu_{decay}(20 \text{ } ^\circ\text{C})} = \theta^{T-20} \quad (13)$$

4. il pH, oltre a influenzare gli equilibri chimici e le speciazioni delle sostanze all'interno del sistema, interessa direttamente lo sviluppo delle diverse tipologie di biomassa. Tale dipendenza, è descritta tramite il modello "CPM" ("Cardinal pH Model"), ripreso dal lavoro di Rossi [72]. La formula matematica generica, di tale modello, (14) è la seguente:

$$f_{pH} = \begin{cases} 0 & pH < pH_{min} \\ \frac{(pH-pH_{max}) \cdot (pH-pH_{min})}{(pH-pH_{min}) \cdot (pH-pH_{max}) \cdot (pH-pH_{opt})^2} & pH_{min} \leq pH \leq pH_{max} \\ 0 & pH > pH_{max} \end{cases} \quad (14)$$

i parametri  $pH_{opt}$ ,  $pH_{min}$  e  $pH_{max}$  sono caratteristici di ogni tipologia di biomassa [76];

5. alte concentrazioni d'ossigeno possono inibire l'attività fotosintetica delle microalghe. Tale effetto è descritto, nel modello ALBA, tramite una funzione di tipo "Hill" avente la seguente formula (15) [49]:

$$f_{DO,growth} = \frac{K_{DO}^n}{S_{O_2}^n + K_{DO}^n} \quad (15)$$

dove  $S_{O_2}$  è la concentrazione d'ossigeno disciolto,  $K_{DO}$  è il coefficiente d'inibizione e  $n$  è il parametro adimensionale di Hill. Per quanto concerne il decadimento della biomassa e la relativa dipendenza dalla concentrazione di ossigeno disciolto, si utilizza una formula (16) simile a quella appena indicata:

$$f_{DO,decay} = \frac{S_{DO}^n}{S_{O_2}^n + K_{DO}^n} \quad (16)$$

Le cinetiche, che derivano riassumendo l'influenza dei fattori appena descritti, sono elencate interamente nell'appendice 1.

#### 1.4.3 Modello ALBA - processi secondari

Durante lo sviluppo del modello ALBA, sono stati considerati una serie di processi secondari, di natura chimico-fisica e non strettamente legati alla biomassa. Tuttavia è fondamentale precisare che tali fenomeni sono essenziali per poter descrivere nella sua interezza il processo di depurazione. I principali meccanismi di questo tipo, implementati all'interno dell'ALBA, sono:

1. Il pH, come già ampiamente descritto, non influenza solo la cinetica dei processi biologici, ma interessa elementi fondamentali come l'equilibrio del carbonio inorganico. Per questa ragione, è necessario implementare diversi bilanci di massa, e uno di carica, per poter descrivere l'andamento del pH all'interno del sistema. I bilanci di massa sono mostrati nell'appendice 1 e sono costituiti in base ai diversi equilibri e alle relative costanti di dissociazione delle specie chimiche considerate [76]. Il bilancio di carica è espresso tramite la seguente formula(17):

$$H^+ + NH_4^+ + \Delta_{CAT,AN} - OH^- - NO_2^- - NO_3^- - HCO_3^- - 2CO_3^{2-} - H_2PO_4^- - 3PO_4^{3-} = 0 \quad (17)$$

dove  $\Delta_{CAT,AN}$  è la differenza fra le concentrazioni, moltiplicate per il numero di cariche positive o negative, dei cationi e anioni non esplicitati [76];

2. Lo scambio di massa fra il raceway e l'atmosfera, per i gas debolmente solubili, è estremamente importante ed è incluso nell'ALBA. La cinetica, che caratterizza questo fenomeno, è descritta

---

dall'equazione generale della legge di Fick(18):

$$Q_j = k_L a_j \cdot (S_{j,sat} - S_j) \quad (18)$$

dove  $k_L a_j$  è il coefficiente di trasferimento di massa caratteristico del sistema descritto e della sostanza gassosa;  $Q_j$  è il rateo di trasferimento della sostanza gassosa di concentrazione  $S_j$ ;  $S_{j,sat}$  è la concentrazione, della medesima specie, alle condizioni di saturazione. Quest'ultimo valore è calcolato tramite la legge di Henry (19), che descrive l'equilibrio fra la concentrazione, in fase gas e in fase liquida, della medesima specie all'interfaccia fra le due fasi e a temperatura costante:

$$S_{j,sat} = H_{Sj} \cdot p_{sj} \quad (19)$$

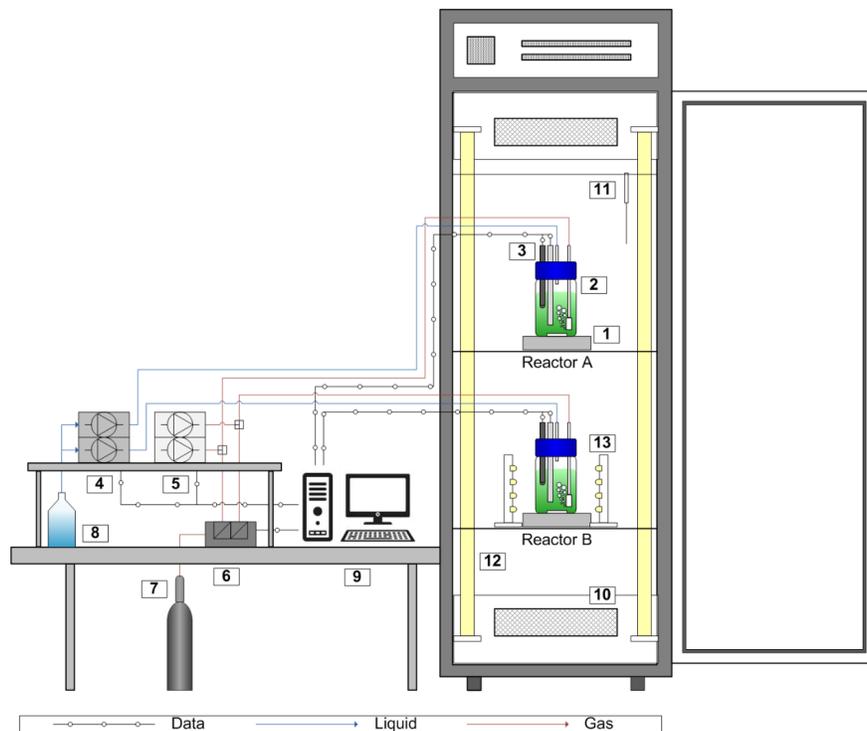
dove  $p_{sj}$  è la pressione parziale della specie considerata a contatto con la superficie liquida e  $H_{Sj}$  è la costante di Henry per il medesimo gas [76].

## 2 Metodologie e Materiali

### 2.1 Respirometria

La valutazione del rateo di respirazione e di fotosintesi (OUR e OPR) e la stima dei parametri di crescita sono state effettuate tramite respirometria. Sono stati selezionati quattro diversi ceppi comuni di microalghe e cianobatteri: "*Chlorella sp.*", "*Scenedesmus sp.*", "*Spirulina sp.*" e "*Spirulina maxima*". Le microalghe sono state fornite dall'"Istituto Sperimentale Italiano Lazzaro Spallanzani", con sede presso Rivolta d'Adda. Le analisi sono state svolte fra maggio e luglio del 2021 nel laboratorio "*ENVLAB*" (Politecnico di Milano, edificio 21 del DEIB al terzo piano).

#### 2.1.1 Descrizione del sistema sperimentale



**FIG. 4:** Schema del respirometro impiegato per l'attività sperimentale. (1) Sistema di miscelazione magnetica; (2) Recipiente in vetro; (3) Sonde di pH, temperatura e OD; (4) Pompe peristaltiche; (5) Pompe per il gas; (6) elettrovalvole; (7) Bombola di gas ( $N_2/CO_2/O_2$ ); (8) soluzione acida o basica; (9) Computer industriale; (10) Sistema di raffreddamento/riscaldamento ventilato; (11) Sonda di temperatura dell'aria in camera di crescita; (12) Tubazioni fluorescenti; (13) Lampade a Led. Immagine ripresa da [71]

---

Il respirometro (figura 4) è costituito da un sistema completo, sia respirometrico che di titolazione, inserito all'interno di una camera di crescita termoregolata. Si dispone di un sistema di sonde per monitorare sia il pH, sia l'ossigeno disciolto e di lampade a LED d'irradianza regolabile. Nel dettaglio il respirometro ("IDEA Bioprocess Technologies s.r.l.", Bergamo, Italia) è composto da:

1. una coppia di recipienti in vetro chiusi di volume 0.5 L ("DURAN protect GLS80")(vedi 2 in fig.4);
2. un sistema d'aerazione a bolle costituito da una pompa collegata a una pietra porosa immersa in fase liquida, utile per aumentare la diffusione;
3. una coppia di pompe peristaltiche, che operano fra 0 e 12 RPM, in grado di dosare all'occorrenza delle soluzioni (vedi 4/8 in fig.4);
4. un sistema di comunicazione e gestione dei segnali costituito da un computer industriale, dotato di un software specifico per controllare l'intero respirometro e in grado di registrare i dati(vedi 9 in fig.4);
5. una serie di elettrovalvole che permettono la comunicazione fra il software e le apparecchiature analogiche del respirometro(vedi 6 in fig.4);
6. sonde per la misura dell'ossigeno disciolto (Hamilton VisiFerm DO Arc 120) e del pH (Hamilton Polylite Plus H Arc 120)(vedi 3 in fig.4);
7. un sistema di dosaggio di ossigeno/azoto/anidride carbonica per controllare la concentrazione di ossigeno e per gestire il il pH (vedi 5/7 in fig.4);
8. una camera termoregolata tramite flusso d'aria (F.lli Della Marca s.r.l., TS series);
9. una coppia di agitatori magnetici che permettono, nei recipienti in vetro, la miscelazione della biomassa (vedi 1 in fig.4);
10. un sistema immerso nel reattore composto da 4 strisce di LED (OSRAM LINEARlight, model: FLEX LF3000-G3-840-03). Tali lampade possono emettere una radiazione d'intensità fra 0 e  $667 \mu E / m^2 / s$ .

---

### 2.1.2 Campagna sperimentale

Le prove sono state condotte per valutare l'effetto: della radiazione incidente, della temperatura, del pH e dell'ossigeno disciolto sull'attività della biomassa algale. Per ogni ceppo analizzato sono effettuate più misure di OPR e OUR, modificando una delle variabili sopra citate e mantenendo le altre alle condizioni standard, definite specificatamente per queste prove. Tali valori standard per l'irradianza, la temperatura, il pH e l'ossigeno disciolto sono, rispettivamente,  $110 \mu E/m^2/s$ ,  $20^\circ C$ ,  $8.5$  e  $10 mg_{DO}/L$  [71]. In totale, per ogni ceppo selezionato, sono state svolte quattro serie di prove distinte modificando un parametro operativo alla volta. Si è cercato d'indagare l'effetto delle diverse variabili spaziando nei range di valori più comuni per la coltivazione delle microalghe e, ove possibile, verificando condizioni estreme. Le prove sono state condotte seguendo un rigoroso protocollo:

1. trasporto e conservazione della biomassa algale in ambiente sterile e isolato;
2. campionamento per conseguire delle analisi preliminari;
3. misura, ed eventuale correzione, della assorbanza a  $680nm$  affinché tale valore si attesti attorno a  $0.2$ . Tale operazione risulta necessaria al fine di ottenere, successivamente durante le prove, risultati il più possibile comparabili;
4. misura dei solidi volatili o dei solidi totali sul campione di biomassa. Tale procedura è utile per calcolare successivamente il valore specifico del rateo di produzione e consumo d'ossigeno;
5. preparazione di mezzo di coltura fresco e specifico per il ceppo analizzato, nel caso servisse effettuare una eventuale diluizione. Si è utilizzato, per le due differenti tipologie di *Spirulina*, dello "Zarrouk" mentre per *Chlorella* e *Scenedesmus* si è impiegato "BBM". La composizione di questi mezzi di crescita è mostrata in tabella 7;
6. la biomassa è inserita all'interno del recipiente di vetro fino al volume prestabilito ( $0.5 L$ ), prestando particolare attenzione a mantenere ben miscelata la sospensione. Si procede a inserire le diverse sonde e la lampada LED all'interno del sistema di crescita;
7. tramite software ("*bms control panel*") si impostano le variabili di stato alle condizioni standard. È possibile governare l'intensità della lampada e le apparecchiature per l'aerazione direttamente

**TAB. 7:** Composizione chimica dello Zarrouk e del BBM. I micronutrienti comprendono zinco, manganese, molibdeno, rame e cobalto. Dati estratti da [38] e [57]

Zarrouk		BBM	
Sostanza	Concentrazione [g/L]	Sostanza	Concentrazione [g/L]
$NaNO_3$	2.5	$NaNO_3$	0.25
$K_2HPO_4$	0.5	$K_2HPO_4$	0.075
$NaCl$	1	$NaCl$	0.025
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.075
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.04	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.025
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.005
<i>EDTA</i>	0.08	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	0.05
$K_2SO_4$	1	<i>KOH</i>	0.031
$NaHCO_3$	16.8	$H_3BO_3$	0.011
Micronutrienti	1 mL	Micronutrienti	~ 0.01

tramite il computer collegato al respirometro. Per mantenere il pH a un valore prefissato si utilizza *HCl*, a concentrazione appropriata (0.1-0.5 M), tramite dosaggio con pompa peristaltica. Si impiega questo tipo di acido per non interferire con gli equilibri chimici dei nutrienti per la biomassa. Tale dosaggio è sempre regolabile tramite software. Si considera trascurabile la variazione di volume dovuta all'aggiunta di soluzione acida. La temperatura, d'altro canto, è impostata tramite la pulsantiera dalla camera di crescita;

8. acclimatazione della biomassa alle condizioni standard definite precedentemente. Questa operazione si protrae per circa 45 minuti e la soluzione è esposta a cicli alternati di luce e buio, della durata di 10 minuti per fase. La biomassa è mantenuta in costante miscelazione, tramite agitatore meccanico che opera a 150 RPM;
9. rimozione dell'ossigeno disciolto, sviluppato durante l'acclimatazione, tramite aerazione per ripristinare la concentrazione di saturazione alla temperatura operativa;
10. esecuzione del test, alle condizioni di riferimento, con cicli alternati e registrazione dei dati raccolti. La durata del test può variare, ma in genere si attesta sempre sui 45 minuti. La prova comprende

- 
- 3 cicli di esposizione alla luce e 3 cicli al buio di sola respirazione;
  11. variazione del parametro in esame e conseguente acclimatazione, nelle modalità descritte in precedenza;
  12. ripetizione del test per un numero di volte congruo con l'obiettivo prefissato e variando, di volta in volta, il parametro operativo d'interesse;
  13. raccolta e rielaborazione dei dati.

Questa procedura generale è stata seguita per tutte le prove respirometriche effettuate. È stato, infine, necessario decidere, in fase preliminare, per quale intervallo di valori studiare il parametro e individuare un numero di prove sufficienti per descriverne esaurientemente l'effetto sulla biomassa. Per questo caso di studio, per le diverse variabili analizzate, si è proceduto come segue:

1. per l'irradianza si è deciso d'indagare valori a partire da  $0 \mu E/m^2/s$  fino a  $667 \mu E/m^2/s$  (valore d'intensità massimo fornito dalla lampada a LED impiegata). In genere, all'interno di questo intervallo ricade il valore ottimale d'irradianza per i ceppi analizzati. Va specificato che, una volta superato tale valore, l'effetto dell'irradianza sulla fotosintesi si stabilizza e rimane pressoché costante. Di conseguenza, è possibile evitare di effettuare misure per valori elevati d'irradianza, sebbene non si analizzino valori d'irradianza comuni per impianti posti all'aperto ( $> 1000 \mu E/m^2/s$ ). Rispetto alle altre serie d'analisi, è sufficiente impostare, nel software che gestisce il respirometro, l'intensità della luce desiderata senza ulteriori interventi;
2. i test di temperatura sono stati effettuati su un ampio spettro di valori. Tale intervallo è compreso fra  $5^\circ C$  e  $45^\circ C$ . Le prove sono state effettuate variando gradualmente la temperatura con l'ausilio della camera di crescita. Per le condizioni più estreme, si è utilizzata una tecnica a bagnomaria con ghiaccio o acqua calda a seconda della situazione. Una volta raggiunte le condizioni stazionarie è stato possibile avviare il test, prestando particolare attenzione a possibili scostamenti dal valore prefissato;
3. le prove per valutare l'effetto delle condizioni di pH sono state condotte fra 3.5 e 12.5. Tale range copre sicuramente i valori che si possono riscontrare più comunemente in casi reali, ma

si è anche voluto studiare misure più estreme. La modifica delle condizioni di pH è effettuata tramite dosaggio di acido o base (*HCl* e *NaOH* di concentrazione 0.1-0.5M). Durante la prova si è impiegato il sistema d'iniezione di acido automatica, impostando correttamente il software di gestione del respirometro;

4. la serie di respirometrie svolte variando l'ossigeno disciolto sono risultate le più complesse dal punto di vista operativo. Principalmente, sono state effettuate analisi per valori di concentrazione superiori a quella di saturazione, trascurando misure inferiori. Il range individuato è fra 9 mg/L e 22 mg/L. Per condizioni di concentrazione di OD minore di quella a saturazione non si verificano effetti notevoli sulla biomassa. Si è utilizzato il sistema d'aerazione per dosare ossigeno puro direttamente all'interno del recipiente ospitante la biomassa. Le prove sono state condotte il più rapidamente possibile per evitare che parte dell'ossigeno introdotto fosse trasferito nella fase gassosa.

In tabella 8 sono riportati i valori medi delle condizioni operative mantenute per ogni parametro operativo analizzato tramite respirometria.

**TAB. 8:** Elenco delle misure medie effettuate per i diversi ceppi algali analizzati, variando i parametri operativi considerati.

n° prova	Temperatura [° C]	DO [mg/L]	pH	Irradianza [ $\mu E/m^2/s$ ]
1	5	9	3.5	0
2	10	12	6	33.3
3	20	14	7.5	100
4	30	16	8.5	200
5	35	20	9.5	333
6	45	22	11	500
7	-	24	12.5	667

### 2.1.3 Elaborazione dei dati

Le misure di ossigeno disciolto, registrate per ogni prova respirometrica, sono utilizzate per descrivere la dinamica del sistema. È possibile valutare il rateo di produzione d'ossigeno da fotosintesi (OPR),

il rateo di respirazione (OUR) e il rateo di trasferimento di massa dell'ossigeno all'interfaccia liquido/gas (OTR). Le funzioni (20 e 21), che descrivono il bilancio di massa dell'ossigeno all'interno del respirometro durante i cicli alla luce e al buio, sono le seguenti:

$$\frac{d(DO)}{dt} = OPR_{net,i} + OTR(\text{Ciclo luce } i = 1, 2, 3) \quad (20)$$

$$\frac{d(DO)}{dt} = OUR_{resp,i} + OTR(\text{Ciclo buio } i = 1, 2, 3) \quad (21)$$

la formula che esprime L'OTR è già stata definita nel capitolo precedente (vedi equazione 2). L'impiego di colture pure permette di assumere l'attività di respirazione dei batteri come trascurabile. I valori medi di  $OPR_{net,i}$  e  $OUR_{resp,j}$  sono stati valutati per ogni ciclo tramite un algoritmo di regressione ai minimi quadrati non lineare, espresso in codice MATLAB ("*Optimization Toolbox<sup>TM</sup>*", *function lsqcurvefit*"), sviluppato da Rossi [71]. L' $OPR_{gross,i}$ , già definito precedentemente, è stato calcolato come la differenza fra  $OPR_{net,i}$  e  $OUR_{resp,j}$  di due cicli luce e buio consecutivi. I valori di  $OPR_{gross,i}$  e  $OUR_{resp,j}$  ottenuti sono stati divisi per la misura di solidi totali (TSS) della biomassa analizzata, così da ottenere i ratei di produzione o consumo d'ossigeno specifici. Quest'ultime operazioni sono riassunte dalle seguenti equazioni (22, 23 e 24) :

$$OPR_{gross,i} = OPR_{net,i} - OUR_{resp,i}(\text{Ciclo luce/buio } i = 1, 2, 3) \quad (22)$$

$$sOPR_{gross,i} = \frac{OPR_{gross,i}}{TSS}(\text{Ciclo luce } i = 1, 2, 3) \quad (23)$$

$$sOUR_{resp,i} = \frac{OUR_{resp,i}}{TSS}(\text{Ciclo buio } i = 1, 2, 3) \quad (24)$$

La dipendenza tra il rateo di produzione o consumo d'ossigeno e le variabili ambientali è rappresentabile tramite dei modelli matematici specifici. In letteratura è possibile trovare diverse proposte per rappresentare questa interazione [71]. In generale, per ogni singola condizione o parametro vi è una relativa funzione, di valore compreso fra 0 ed 1, in grado di descrivere l'effetto sulla biomassa. I modelli, una volta individuati, sono stati applicati e fittati ai diversi risultati di  $sOPR_{gross}$  e  $sOUR$  ottenuti al variare della Temperatura, del pH, dell'OD oppure dell'irradianza. Tuttavia, per ottenere una migliore comparabilità dei risultati, è stato necessario normalizzare sia i dati di  $sOPR_{gross}$  che di

$sOUR$ , ottenuti al variare di un singolo parametro, sul valore massimo ottenuto per la serie di misure in questione. Per valutare il risultato dell'interpolazione si è utilizzato, come indice statistico, l'R quadro corretto ( $R_{adj}^2$ ):

$$R_{adj}^2 = 1 - \left( \frac{n-1}{n-p} \right) \cdot \frac{SSE}{SST} \quad (25)$$

dove  $n$  è il numero di osservazioni sperimentali;  $p$  è il numero di parametri del modello; SSE è la somma degli scarti quadratici e SST è la somma quadrata della differenza fra ogni dato e la media complessiva.

L'interpolazione non lineare dei dati raccolti dai differenti test è stata effettuata tramite il software "Origin". I modelli selezionati e applicati ai risultati delle respirometrie, che descrivono l'effetto delle diverse variabili di stato studiate, sono:

1. per la temperatura si è utilizzato, sia per l'OPR che per l'OUR, il modello "CTMI" [35]. La formula generica(26), di parametri  $T_{opt}$ ,  $T_{min}$  e  $T_{max}$ , è la seguente:

$$\frac{sOPR_{gross}}{sOPR_{gross,max}} = \begin{cases} 0 & T < T_{min} \\ \frac{(T-T_{max}) \cdot (T-T_{min})^2}{(T_{opt}-T_{min}) \cdot (T_{opt}-T_{min}) \cdot (T-T_{opt}) - (T_{opt}-T_{max}) \cdot (T_{opt}+T_{min}-2 \cdot T)} & T_{min} \leq T \leq T_{max} \\ 0 & T > T_{max} \end{cases} \quad (26)$$

2. i risultati delle prove respirometriche dell'irradianza sono stati interpolati utilizzando il modello "Haldane" [35] (di parametri  $I_{opt}$  e  $A_I$ ) per l'OPR e una funzione di tipo Sigma (di parametri  $A_I$ ,  $I^*$  e  $sOUR_{min}$ ) per l'OUR. Le equazioni(27 e 28) che descrivono tali modelli applicati sono:

$$\frac{sOPR_{gross}}{sOPR_{gross,max}} = \frac{I}{\left( I + \frac{sOPR_{gross,max}}{A_I} \right) \cdot \left( \frac{I}{I_{opt}-1} \right)^2} \quad (27)$$

$$sOUR = sOUR_{min} + \frac{sOUR_{max}}{1 + \exp(-A_I \cdot (I - I^*))} \quad (28)$$

3. per il pH si è selezionato il modello CPM [8](di parametri  $pH_{min}$ ,  $pH_{max}$  e  $pH_{min}$ ) e applicato

sia ai valori di produzione d'ossigeno che di consumo. La formula di tale modello è la seguente:

$$\frac{sOPR_{gross}}{sOPR_{gross, max}} = \begin{cases} 0 & pH < pH_{min} \\ \frac{(pH-pH_{max}) \cdot (pH-pH_{min})}{(pH-pH_{min}) \cdot (pH-pH_{max}) \cdot (pH-pH_{opt})^2} & pH_{min} \leq pH \leq pH_{max} \\ 0 & pH > pH_{max} \end{cases} \quad (29)$$

4. le misure di OPR e di OUR, ottenute variando la concentrazione di ossigeno disciolti, sono state interpolate, rispettivamente, tramite il modello di "Hill" (di parametri  $K_{DO}$  e  $n$ ) e una funzione di tipo sigma (di parametri  $sOUR_{min}$ ,  $A_{DO}$  e  $DO^*$ ). L'equazioni che descrivono tali modelli sono:

$$\frac{sOPR_{gross}}{sOPR_{gross, max}} = \frac{K_{DO}^n}{S_{O_2}^n + K_{DO}^n} \quad (30)$$

$$sOUR = sOUR_{min} + \frac{sOUR_{max}}{1 + \exp(-A_{DO} \cdot (I - DO^*))} \quad (31)$$

---

## 2.2 Aquasim e Modello ALBA

Il modello ALBA, implementato nella piattaforma numerica Aquasim, è sfruttato per valutare diversi aspetti dell'utilizzo delle microalghe, sia per coltivazione su medium sintetico, sia per processi di depurazione. Aquasim è uno strumento, sviluppato da Reichert [7], che permette di simulare e gestire l'analisi di sistemi acquatici complessi. I diversi processi biologici e le variabili considerate dal modello ALBA sono stati inseriti all'interno del software nei termini e nelle modalità illustrate dal manuale di riferimento. L'attività di simulazione, tramite il software Aquasim, è condotta definendo le condizioni operative del reattore modellato. Per il caso in esame si considera un raceway completamente miscelato e che sia alimentato in continuo. Il volume, per queste condizioni d'esercizio, è influenzato dal flusso influente ed effluente il sistema, dalla portata di pioggia e dalla quantità di liquido evaporato. Tale variazione dinamica del volume è stata implementata nel software considerando, per ogni istante di tempo, i contributi dei diversi flussi. La portata immessa nel sistema apporta delle sostanze chimiche, definiti in Aquasim i valori dei carichi in massa delle relative variabili.

Aquasim consente di valutare, tramite il processo di calibrazione, uno o più parametri tramite il metodo dei minimi quadrati. È sufficiente fornire al sistema un dataset di dati sperimentali per il confronto con la variabili corrispettive simulate dal software. La formula dei minimi quadrati, indicata nel manuale del software [7], è la seguente:

$$X^2 = \sum_{i=1}^N \left( \frac{y_{m,i} - y_{s,i}}{\sigma_{m,i}} \right)^2 \quad (32)$$

dove  $n$  è il numero complessivo di misurazioni  $i$ -esime;  $(y_{m,i}(P) - y_{s,i}(p))$  è la differenza fra la misura e la simulazione della variabile  $y$  e  $\sigma_{m,i}$  è la deviazione standard dei dati misurati. Si specifica che, per valutare la bontà della stima tramite calibrazione, Aquasim fornisce il valore di chi-quadro ( $\chi^2$ ) in seguito dell'operazione.

### 2.2.1 Implementazioni e modifiche al modello ALBA

Il modello ALBA è stato sviluppato, originariamente, per descrivere il metabolismo di un singolo ceppo algale in consorzio con batteri eterotrofi e nitrificanti. Per questo lavoro è stato considerato

un sistema che includesse due ceppi microalgali caratterizzati da diversi parametri di crescita e di dipendenza dalle condizioni ambientali. A questo scopo, la maggior parte delle variabili e i processi che descrivono il comportamento della biomassa algale sono stati sdoppiati per descrivere singolarmente ogni ceppo. Le modifiche e aggiunte principali apportate al modello ALBA sono:

1. per le variabili di stato, mostrate in tabella 6, si è provveduto a creare due entrate che descrivessero la concentrazione dei ceppi algali distintamente ( $X_{ALG,1}$  e  $X_{ALG,2}$ );
2. per i processi biologici modellati dall'ALBA, che prevedano il coinvolgimento delle biomasse algali, si è provveduto a sdoppiare ogni parametro specifico per i diversi ceppi algali (processi  $\rho_1, \rho_2, \rho_3$  e  $\rho_4$ ). Di conseguenza, le funzioni che descrivono: il comportamento della biomassa all'esposizione delle diverse condizioni ambientali ( $f_I, f_T, f_{pH}$  e  $f_{DO}$ ), i relativi parametri (vedi appendice 1) e le costanti di semi saturazione e inibizione, sono state modificate per descrivere ciascun ceppo algale. Tuttavia, si è deciso di utilizzare, per semplicità, la medesima composizione elementare per i diversi ceppi analizzati (vedi equazioni 4 e 5);
3. per descrivere il comportamento della biomassa batterica, sono utilizzate le informazioni ricavate da prove respirometriche, analoghe a quelle svolte per questo lavoro di tesi, effettuate da Sánchez-Zurano [78]. Tuttavia, per applicare tali risultati al modello ALBA, è risultato necessario modificare la forma di alcune funzioni. Per i batteri nitrificanti ammonio ossidanti (AOB) la funzione cinetica, che descrive l'effetto dell'ossigeno, è stata descritta utilizzando una funzione di Andrew (33):

$$f = \frac{S}{S + \frac{\mu_{max}}{\alpha} \cdot \left(\frac{S}{S_{opt}} - 1\right)^2} \quad (33)$$

dove  $S$  è la concentrazione del substrato considerato;  $\mu_{max}$  è la crescita massima (stesso parametro usato nelle diverse funzioni delle cinetiche dei processi biologici, vedi appendice 2) identificata per concentrazioni ottimali del substrato ( $S_{opt}$ ) e  $\alpha$  è il coefficiente angolare iniziale. Tale funzione, che varia fra 0 e 1, è stata applicata anche per l'influenza dell'ammonio, sempre per gli AOB, e per l'effetto dell'ossigeno per i batteri eterotrofi.

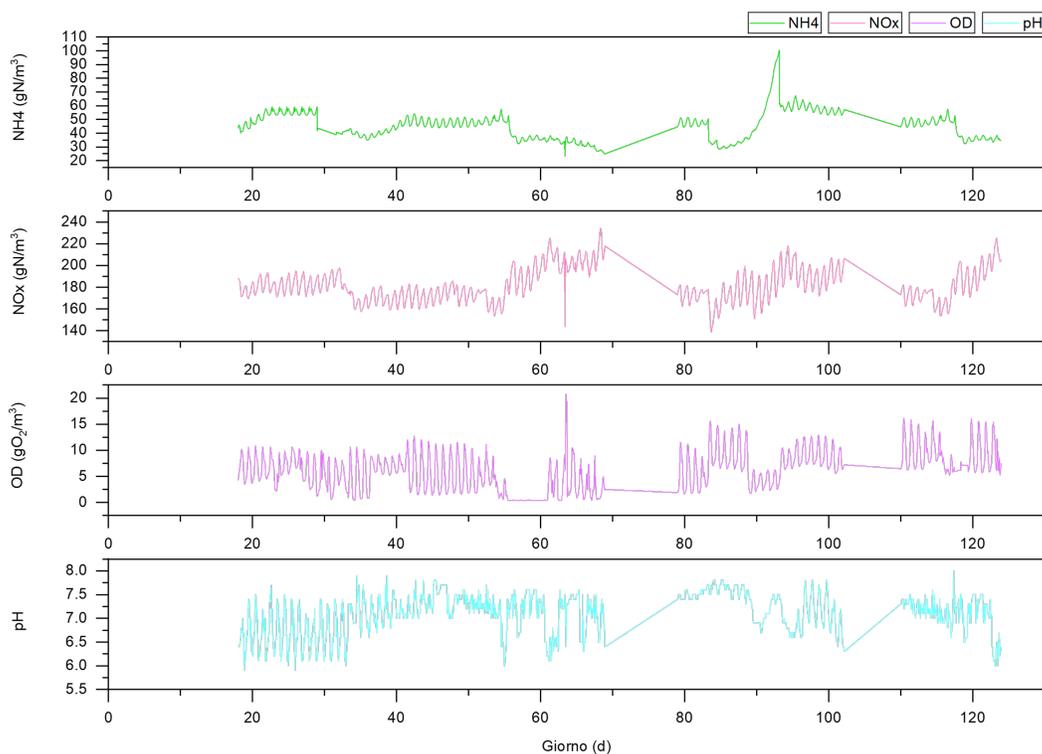
---

### 2.2.2 Caso di studio - Coltivazione di microalghe con digestato

Il modello ALBA modificato è stato applicato per rappresentare un sistema di coltivazione di microalghe come caso di studio. Tale sistema è caratterizzato da un raceway pilota situato all'impianto di trattamento delle acque reflue di Bresso-Niguarda (Milano), all'interno del quale avviene la depurazione della frazione liquida del digestato mediante un consorzio alghe-batteri. Il digestato utilizzato proviene dal processo di degradazione anaerobica mesofila dei fanghi misti primari e secondari. La particolarità di questo processo è che, oltre alla biomassa batterica sia nitrificante che eterotrofa, nel sistema si sviluppano due ceppi microalgali appartenenti ai generi: "*Chlorella*" e "*Scenedesmus*". L'impianto pilota è stato realizzato con l'obiettivo di valutare le potenzialità del processo di depurazione tramite biomassa algale.

Il raceway utilizzato per il processo è caratterizzato da un'altezza del liquido pari a 0.15 m e da una superficie di  $5.78 \text{ m}^2$ . Il  $k_{La}$  del sistema è misurato precedentemente e risulta essere pari a  $16.54 \frac{1}{d}$  [59]. Il raceway è costituito da due canali in materiale polimerico, uniti da altrettante curve a  $180^\circ$ , di lunghezza pari a 5 m e di larghezza 0.5 m. Il sistema è situato al di sotto di una copertura, di conseguenza si ritiene nulla la portata di pioggia influente. Il raceway è dotato di un sistema di controllo del pH, che opera mediante insufflazione di anidride carbonica. Il pH è mantenuto e fissato ad 8. La frazione liquida del digestato è inviata all'impianto pilota alla portata desiderata tramite pompa ( $144 \frac{L}{d}$ ). Tale portata è individuata per garantire un HRT di 6 giorni nel raceway. La movimentazione della sospensione all'interno del sistema è attuata da un singolo paddlewheel elettrico. È da specificare che l'avvio del funzionamento continuo dell'impianto pilota è preceduto da una breve fase in batch per acclimatare l'inoculo al digestato.

Il raceway è dotato di sonde che misurano, a intervalli orari, le concentrazioni di ossigeno disciolto (*Hack Lange, LDO sensor*), i valori di temperatura, di pH (*Hack Lange, pHD sc Digital Differential pH/OPR sensors*) e di torbidità (*Hack Lange, Solitax sc Sensors*). Tali sonde sono installate a monte del paddlewheel e sono direttamente collegate a un computer industriale, utile per immagazzinare i dati registrati e per gestire il processo. I dati raccolti dalle sonde e utilizzate in questo caso di studio sono illustrate in figura 5.

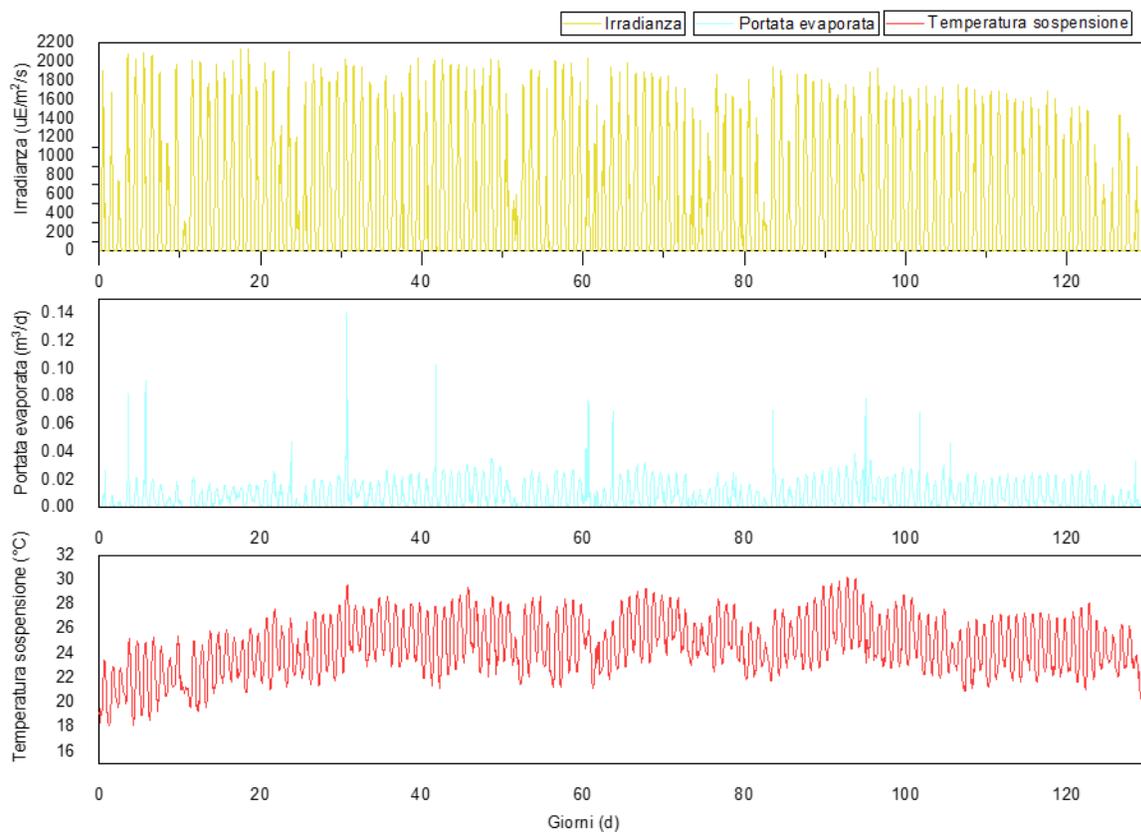


**Fig. 5:** Grafici delle diverse misure, effettuate tramite sonde, per l'impianto pilota di Bresso.

In aggiunta al monitoraggio costante tramite sonde, sono state svolte analisi specifiche campionando il digestato in ingresso e la sospensione in uscita dal trattamento. Tale campagna di misura comprende la valutazione della concentrazione di ammonio, di fosfati, di nitrito, di nitrato, di azoto totale, di COD solubile (filtrato a 45 nm) e di COD totale. I dati rilevati dai campionamenti sono riportati nell'appendice 2. Si considerano i dati raccolti fra il 14/05/2021 e il 23/09/2021. I campionamenti periodici sulla sospensione nel raceway sono stati attuati a monte del paddlewheel. Il materiale raccolto è stato filtrato prima di procedere con ulteriori analisi. Le diverse misure quantitative sono state effettuate tramite kit "*Hack-Lange*" (in dettaglio LCK399, LCK342, LCK 303, LCK348 e LCK314) e seguendo le metodologie standard definite da "*APHA/AWWA/WEF*". La torbidità è stata valutata tramite misure d'assorbanza a 680nm. La biomassa campionata è stata sottoposta ad analisi con microscopio ottico 40x (B350, Optika, Italia) per identificare i ceppi presenti in base alla loro formologia. Tramite il la camera di Burkert è stato effettuato il conteggio delle cellule algali valutando la media di 72

settori di dimensioni pari a  $0.44 \text{ mm}^2$  [70].

Per quanto concerne la variazione nel tempo dell'irradianza incidente, della temperatura nel sistema e della portata d'evaporazione, tali informazioni sono state definite in base ai dati meteorologici forniti dall'ARPA Lombardia misurati dalla stazione di Cinisello Balsamo (Milano). I valori d'irradianza sono stati ridotti del 40% per simulare l'effetto della copertura posta sopra il raceway. Per calcolare la temperatura della sospensione, si è utilizzato un modello di regressione lineare che impiega le informazioni note della temperatura atmosferica (vedi appendice 2, figura 48). La portata evaporata è calcolata tramite un modello specifico, denominato "*Buckingham evaporation model*" [32]. Tale modello permette di definire la quantità di liquido evaporato note: le condizioni di temperatura dell'aria (da ARPA), l'altezza di misura della stazione meteorologica (10 m dal suolo), l'altezza del raceway (1.2 m dal suolo), la velocità del vento e la temperatura della sospensione. I dati derivati dalle condizioni meteorologiche e inseriti nel software Aquasim sono illustrati in figura 6;



**Fig. 6:** Grafici dell'irradianza incidente, della temperatura della sospensione e della portata evaporata in funzione del tempo definiti per l'impianto pilota di Bresso.

La caratterizzazione dell'influente è condotta determinando le diverse sostanze presenti nella frazione liquida del digestato. Questa operazione è effettuata applicando il sotto modello pH (Sviluppato per l'ALBA e descritto nel capitolo precedente) per valutare le diverse speciazioni degli acidi e basi deboli. Per quanto concerne la composizione influente delle sostanze particolate, sono stati utilizzati i dati misurati di COD e BOD. In particolare, il COD particolato è modellato dall'ALBA come la somma fra la concentrazione di microalghe ( $X_{CHL}$  e  $X_{SCE}$ ), di batteri nitrificanti ( $X_{AOB}$  e  $X_{NOB}$ ), di batteri eterotrofi ( $X_H$ ), di materiale organico sospeso degradabile ( $X_S$ ) e di materiale organico solido non degradabile ( $X_I$ ). Il COD solubile, invece, è dato dalla somma del materiale degradabile disciolto ( $S_S$ ) e del materiale inerte soluto ( $S_I$ ). Si dispone dei dati di BOD solubile e di BOD totale misurati per 5 e 20 giorni tramite biomassa eterotrofa. Da tali informazioni è possibile ricostruire il frazionamento del materiale biodegradabile tramite le seguenti formule (34 e 35):

$$COD_{bio,i} = \frac{BOD_u}{1 - \frac{COD}{SSV} \cdot f_d \cdot Y_H} \quad (34)$$

$$BOD_u = \frac{BOD_t}{1 - 10^{-(k \cdot t)}} \quad (35)$$

dove  $k$  è la costante di biodegradazione dei batteri assunta pari a  $0.12 \text{ d}^{-1}$ ;  $t$  è il tempo relativo alla misurazione del BOD;  $f_d$  è la frazione di cellule batteriche decadute che rimane come residuo non degradabile ed è pari a  $0.15$  e  $Y_H$  è il coefficiente di resa cellulare per i batteri eterotrofi ( $0.45 \frac{\text{gSSV}}{\text{gCOD}_{bio}}$ ). La frazione influente di COD biodegradabile solubile ( $S_S$ ) è calcolata a partire dalla misura del BOD solubile mentre la frazione di COD biodegradabile sospeso ( $X_S$ ) è definita come la differenza fra COD biodegradabile complessivo ( $X_S + S_S$ ), calcolato dalla misura di BOD totale, e la frazione  $S_S$ . Si assume che la frazione di COD sospeso, rappresentate la biomassa non attiva, ( $X_I + X_S$ ) sia composta per il 70% da  $X_S$  e per il restante 30% di  $X_I$ . Tale ipotesi è effettuata per mancanza di dati e perché in alcune opere precedenti, come per i lavori svolti da Rossi et al. [77] e da Casagli [76], si è evidenziato come la frazione di solidi lentamente biodegradabili sia maggiore rispetto quella inerte. Di conseguenza,  $X_I$  è definito a partire da quest'ultima ipotesi mentre  $S_I$  è ricavato dalla differenza fra la misura del COD solubile influente e il valore di  $X_S$ , calcolato precedentemente. A questo punto, restano da definire le concentrazioni dei diversi tipi di biomassa per caratterizzare completamente il COD particolato

---

influyente. Si ipotizza che la biomassa attiva batterica in ingresso rappresenti l'1% del COD particolato e che non vi sia apporto di biomassa algale. Questa ipotesi deriva da assunzioni svolte in lavori precedenti, come quelli svolti da Rossi et al. [77] e da Casagli [76]. La composizione della biomassa batterica influente, nella sua ripartizione fra eterotrofi, AOB e NOB è calibrata tramite il software.

Per quanto concerne la caratterizzazione delle condizioni iniziali e l'inserimento dei corrispettivi dati in Aquasim, è stato attuato un procedimento analogo a quello descritto per l'influente. Le concentrazioni delle diverse specie chimiche sono state identificate tramite il sotto modello pH, partendo dalle concentrazioni totali rilevate sul primo campionamento in uscita dal sistema. La ripartizione del COD in ingresso è stata valutata a seconda dai i dati di COD e BOD totali e solubili. Di conseguenza, utilizzando le formule 34 e 35, è possibile definire  $S_S$ ,  $X_S$  e di conseguenza anche  $X_I$  e  $S_I$ . Per quanto concerne la biomassa attiva, la ripartizione fra i due ceppi di microalghe sia identificata in base alle misure iniziali della conta cellulare (vedi appendice 2). In mancanza di dati e in maniera analoga a come svolto da Rossi et al. [77], si assume che il 90.2% della biomassa attiva iniziale sia composta da biomassa algale. Il frazionamento dei batteri, che rappresentano il restante 9.8% della biomassa attiva, è individuato tramite calibrazione.

Infine, dopo aver definito sia le condizioni iniziali, sia le caratteristiche dell'influente, è possibile procedere con l'operazione di calibrazione. I parametri stimati tramite questa tecnica sono: la costante d'inibizione del metabolismo di crescita su ammonio per tutte e due i ceppi algali ( $K_{iNH,ALG}$ ), la costante di semi saturazione, sia per Chlorella che Scenedesmus, di ammonio, nitrato e ossigeno ( $K_{NH,ALG}$ ,  $K_{NO_3,ALG}$  e  $K_{O,ALG}$ ), il rateo massimo di tutti i processi biologici ( $\mu_{max,i}$ ), la concentrazione iniziale e influente della biomassa eterotrofa, degli NOB e degli AOB ( $X_{H,ini}$ ,  $X_{AOB,ini}$ ,  $X_{NOB,ini}$ ,  $X_{H,in}$ ,  $X_{AOB,in}$  e  $X_{NOB,in}$ ), la resa dei batteri nitrificanti ( $Y_{AOB}$  e  $Y_{NOB}$ ) e le diverse rese per i batteri eterotrofi in base al substrato ( $Y_{H,S}$ ,  $Y_{H,HNO_2}$  e  $Y_{H,HNO_3}$ ). Il processo di calibrazione è stato effettuato sulle misure di OD e sulle misure di concentrazione dell'ammonio, del nitrito e del nitrato. Il modello è quindi validato affinché i risultati simulati dal software rispecchino i dati misurati direttamente sull'impianto pilota per le restanti variabili.

### 2.2.3 Caso di studio - Coltivazione di Spirulina

Per quanto concerne l'utilizzo dei dati derivati dalle respirometrie per le due varianti di Spirulina, si è modellato un raceway, che opera in continuo, secondo i parametri ripresi da un lavoro di caratterizzazione svolto da Barcelo-Villabolos et al. [62]. Le informazioni principali relative all'impianto sono: il  $k_{LA}$  è misurato e pari a  $43,5 d^{-1}$ , la superficie del raceway è di  $100 m^2$  (due canali di lunghezza di circa 50 m) e l'altezza del livello della sospensione è di 0.15 m. Il processo di coltivazione e le relative operazioni sono simulate a partire dal 1/03/2021 e fino al 31/11/2021. Questo intervallo di tempo arbitrario è stato identificato per descrivere il funzionamento del sistema modellato per un più ampio spettro possibile di condizioni d'esercizio. Il processo è effettuato tramite l'utilizzo di medium sintetico (Zarrouk), evitando così l'insorgere di concentrazioni significative di biomassa batterica. I principali elementi per la ricostruzione delle condizioni iniziali sono: la concentrazione complessiva di microalghe è di  $100 g/m^3$ , ogni ceppo costituisce il 50% della biomassa attiva iniziale, l'inoculo è stato diluito con il medium di crescita per occupare interamente il volume del raceway, si considera nulla la frazione iniziale di biomassa morta e il pH è fissato a 9.5. Le condizioni iniziali, all'interno del raceway sono illustrate in tabella 9. L'influente è composto da 50% di Zarrouk da 50% di acqua distillata (per la composizione chimica dello Zarrouk fare riferimento alla tabella 7).

Tab. 9: Condizioni iniziali per la coltivazione delle due varietà di Spirulina

Variabile	Valore	unità di misura
$S_{PO_4}$	72.9	$gP/m^3$
$S_{IC}$	1968	$gC/m^3$
$S_{NH}$	0.0	$gN/m^3$
$S_{NO_2}$	0.0	$gN/m^3$
$S_{NO_3}$	337.7	$gN/m^3$
$COD_{tot}$	100	$gCOD/m^3$
$COD_s$	0.0	$gCOD/m^3$
$COD_p$	100	$gCOD/m^3$
$X_{ALG,1}$	50	$gCOD/m^3$
$X_{ALG,2}$	50	$gCOD/m^3$

Il processo di coltivazione è effettuato in controllo di pH, fissato a 9.5, e mantenendo la temperatura a valori ottimali tramite riscaldamento (35°C). Si specifica che, data l'assenza di biomassa batterica, sono stati rimossi dal modello ALBA le variabili e i processi biologici relativi. I dati d'irradianza, necessari, sono stati estrapolati dai campionamenti effettuati dalla stazione di rilevamento "Parco Nord - Cinisello Balsamo" (Milano). Il raceway è mantenuto all'interno di una serra e, di conseguenza, la portata di pioggia influente è nulla. Si considera trascurabile, per questo caso, l'effetto della portata evaporata. I dati d'irradianza inseriti in Aquasim sono illustrati in figura 7.

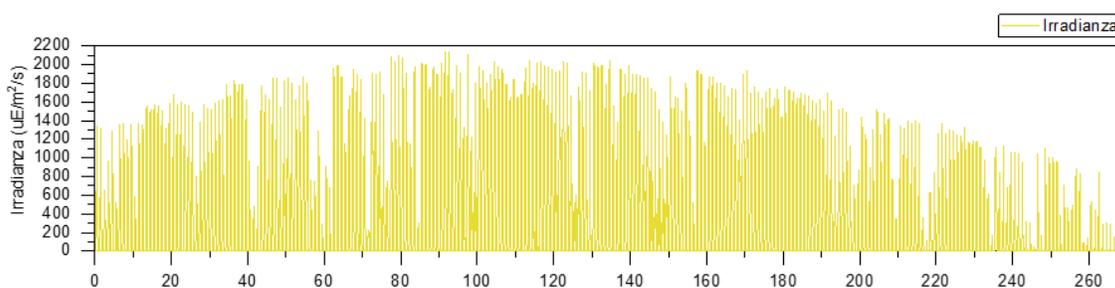


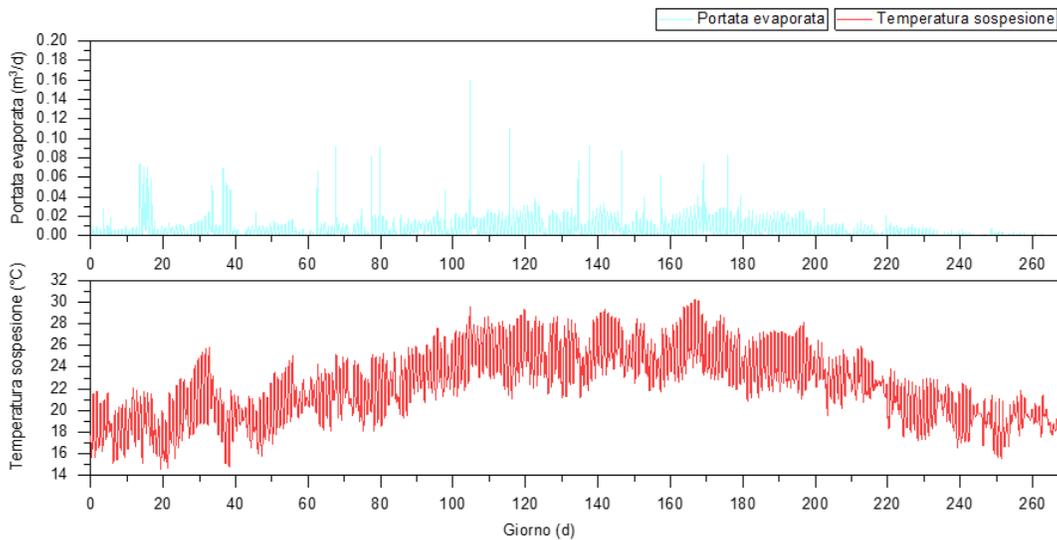
Fig. 7: Grafico dell'irradianza incidente in funzione del tempo per il raceway di coltivazione delle due varietà di Spirulina.

#### 2.2.4 Simulazione di scenari - Coltivazione di microalghe con digestato

Il modello che descrive la coltivazione di microalghe con digestato, una volta calibrato e validato con le misure effettuate, è ulteriormente analizzato con simulazioni di scenari alternativi. Il primo caso analizzato consiste nel valutare la fattibilità di coltivare un singolo ceppo algale e verificare quale soluzione, fra sviluppo di *Chlorella* o di *Scenedesmus*, comporta la produttività maggiore. Inoltre, una volta selezionata il ceppo da coltivare, si desidera verificare l'effetto provocato dall'altro ceppo se introdotto nel raceway in quantità ridotte, tali da simulare un fenomeno di contaminazione. Di conseguenza, si costituiscono due scenari principali: coltivazione di *Chlorella* con contaminazione di *Scenedesmus* e coltivazione di *Scenedesmus* con contaminazione di *Chlorella*. Si specifica che, rispetto all'impianto pilota, lo scenario di coltivazione è caratterizzato da una concentrazione influente del ceppo algale coltivato, per migliorare le prestazioni del sistema. Gli aspetti generali, condivisi da questi due casi, sono:

1. per simulare un lasso temporale più esteso, rispetto a quello occupato delle attività dell'impianto

pilota, si è deciso di analizzare il periodo che parte dal 1/03/2021 fino al 31/11/2021. I dati meteorologici sono stati prelevati dal sito dell'ARPA Lombardia e rilevati dalla stazione situata nel Parco Nord-Cinisello Balsamo (Milano). Si specifica che tali dati meteorologici sono gli stessi utilizzati per il caso di coltivazione di due varietà di Spirulina. Per definire la portata evaporata e la temperatura della sospensione si è utilizzato lo stesso metodo descritto per il caso base. Il riassunto dei dati legati alle condizioni meteorologiche è illustrato in figura 8. L'irradianza incidente è la medesima del caso di coltivazione Spirulina (vedi figura 7);



**FIG. 8:** Portata evaporata e per la temperatura della sospensione per gli scenari analizzati per la coltivazione di microalghe con digestato.

2. le condizioni iniziali sono state modificate per renderle compatibili con un processo di coltivazione di un singolo ceppo. Risulta quindi nulla la concentrazione del ceppo contaminante e la biomassa algale è interamente rappresentata dal ceppo coltivato. Le restanti variabili che costruiscono le condizioni iniziali risultano immutate;
3. per quanto concerne l'influente, risultano necessarie considerazioni più complesse. In prima battuta, è necessario stabilire la concentrazione di biomassa algale influente, che caratterizza il processo di coltivazione. Nel caso base non vi è alcuna aggiunta di microalghe nella portata in ingresso. Di conseguenza, sono necessarie delle ipotesi aggiuntive per poter sviluppare il problema. Si procede valutando la produttività mensile (espressa in  $g_{COD}/m^2/d$ ) del sistema di coltivazione in assenza di biomassa algale nell'influente. Da tali informazioni si ricava la concentrazione

sviluppata per ogni mese simulato. Si ipotizza che la concentrazione di microalghe da fornire sia pari al 10% della concentrazione prodotta appena calcolata. Di conseguenza l'apporto non è costante durante l'arco della simulazione, ma varia di mese in mese. Le restanti caratteristiche dell'influente sono definite con i valori medi delle misure effettuate sulla frazione liquida del digestato alimentata all'impianto pilota;

4. al fine di simulare l'effetto di una possibile contaminazione durante le operazioni di accrescimento della biomassa, si considera che la concentrazione influente calcolata sia composta per il 99% dal ceppo da coltivare e per il restante 1% dal ceppo contaminante;

Oltre a questi due scenari appena descritti, si è valutata la possibilità di utilizzare un mezzo di coltivazione differente rispetto al digestato d'origine civile. Tale mezzo alternativo è costituito sempre da digestato, ma di provenienza agricola. Le caratteristiche del nuovo influente sono state ricavate da uno studio svolto da Casagli et al. ([75]). A queste nuove condizioni si applicano gli stessi scenari descritti per il digestato civile. Tuttavia, le condizioni iniziali e le caratteristiche dell'influente risultano profondamente modificate dall'utilizzo di un'altra tipologia di mezzo di coltivazione e sono illustrate, rispettivamente, in tabella 10 e tabella 11. Dopo aver definito i diversi scenari, è stata svolta l'attività di simulazione e confrontato i risultati di produttività mensile e stagionale.

**TAB. 10:** Condizioni iniziali per la coltivazione di *Chlorella* o *Scenedesmus* utilizzando digestato di origine agricola.

Var. iniziale	valore	Unità di misura	Var. iniziale	valore	Unità di misura
$S_{PO_4}$	7.3	$mg_P/L$	$X_{ALG}$	121	$mg_{COD}/L$
$S_{IC}$	201	$mg_C/L$	$X_H$	2.83	$mg_{COD}/L$
$S_{NH}$	144	$mg_N/L$	$X_{AOB}$	0.89	$mg_{COD}/L$
$S_{NO_2}$	0	$mg_N/L$	$X_{NOB}$	0.31	$mg_{COD}/L$
$S_{NO_3}$	5.4	$mg_N/L$	$X_S$	13.87	$mg_{COD}/L$
$COD_t$	431	$mg_{COD}/L$	$X_I$	121	$mg_{COD}/L$
$COD_s$	171	$mg_{COD}/L$	$S_S$	51.3	$mg_{COD}/L$
$COD_p$	260	$mg_{COD}/L$	$S_I$	120	$mg_{COD}/L$

**Tab. 11:** Concentrazioni delle componenti principali dell'influyente utilizzato per la coltivazione di Chlorella o Scenedesmus (digestato d'origine agricola).

Var.influyente	valore	Unità di misura	Var.influyente	valore	Unità di misura
$S_{PO4}$	14	$mgP/L$	$X_{ALG}$	0	$mgCOD/L$
$S_{IC}$	438	$mgC/L$	$X_H$	1.83	$mgCOD/L$
$S_{NH}$	310	$mgN/L$	$X_{AOB}$	0.14	$mgCOD/L$
$S_{NO2}$	0	$mgN/L$	$X_{NOB}$	0.04	$mgCOD/L$
$S_{NO3}$	12	$mgN/L$	$X_S$	13.3	$mgCOD/L$
$COD_t$	514	$mgCOD/L$	$X_I$	119	$mgCOD/L$
$COD_s$	381	$mgCOD/L$	$S_S$	133	$mgCOD/L$
$COD_p$	133	$mgCOD/L$	$S_I$	248	$mgCOD/L$

### 2.2.5 Simulazione di scenari - Coltivazione di Spirulina

Per quanto concerne il modello sviluppato per descrivere la coltivazione di due differenti varietà di Spirulina, sono state svolte delle simulazioni per valutare l'effetto di alcuni parametri operativi sul processo. Tali parametri analizzati sono: l' HRT, il  $k_{La}$  e la temperatura della sospensione. Ogni variabile è indagata singolarmente e studiata all'interno di un intervallo specifico tale da fornire un quadro, il più completo possibile, del fenomeno. In tabella 12 sono riportati i valori indagati tramite i diversi scenari. Si specifica che le condizioni iniziali e dell'influyente sono rimaste immutate rispetto al caso base. Per effettuare un confronto sui risultati si è valutato, per ogni scenario analizzato, la produttività mensile e stagionale (calcolata in  $g_{ALG}/m^2/d$ ) sia complessiva che per ogni ceppo.

**Tab. 12:** Valori dei parametri assunti nei diversi scenari. Ogni scenario è identificato dalla sigla riportata in tabella

Scenario	Temperatura	Scenario	$k_{La}$	Scenario	HRT
	°C		$d^{-1}$		d
T33	33	$k_{La5}$	5	HRT3	3
T37	34	$k_{La25}$	25	HRT5	5
T36	36	-	-	HRT8	8
T37	37	-	-	HRT10	10

---

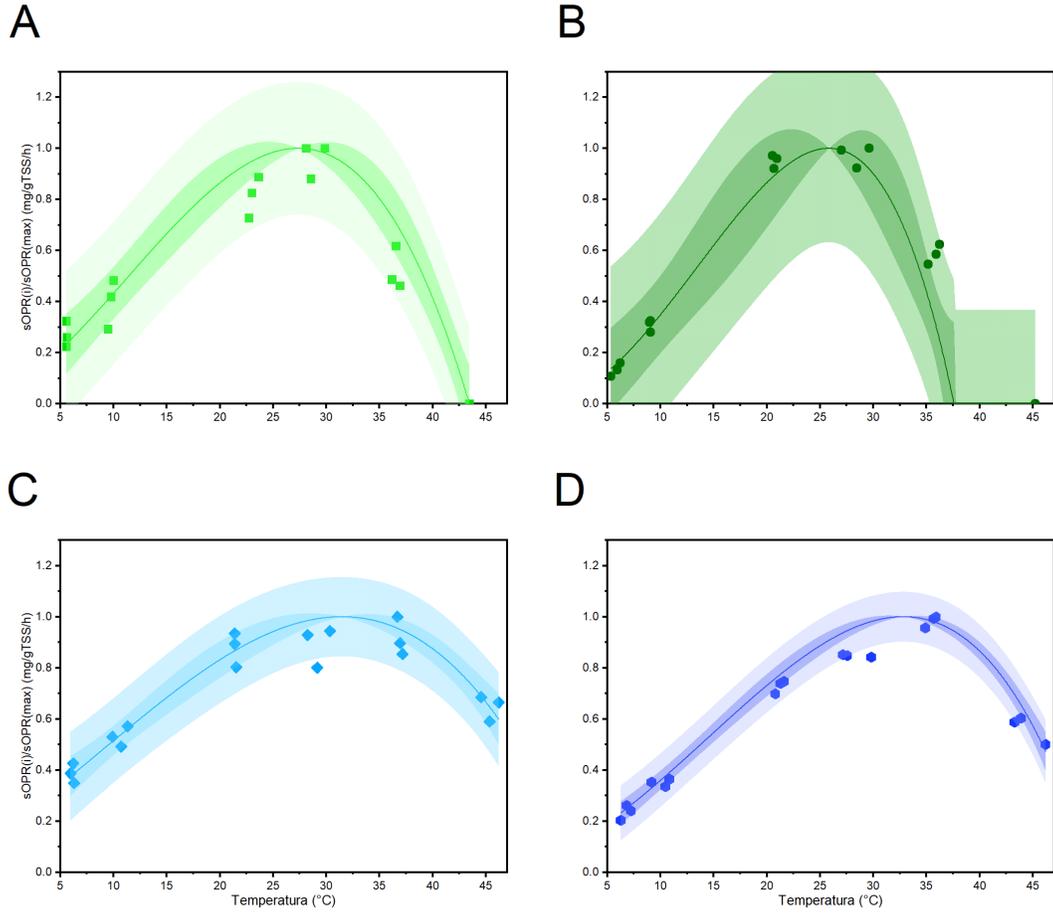
## 3 Risultati

### 3.1 Respirometria

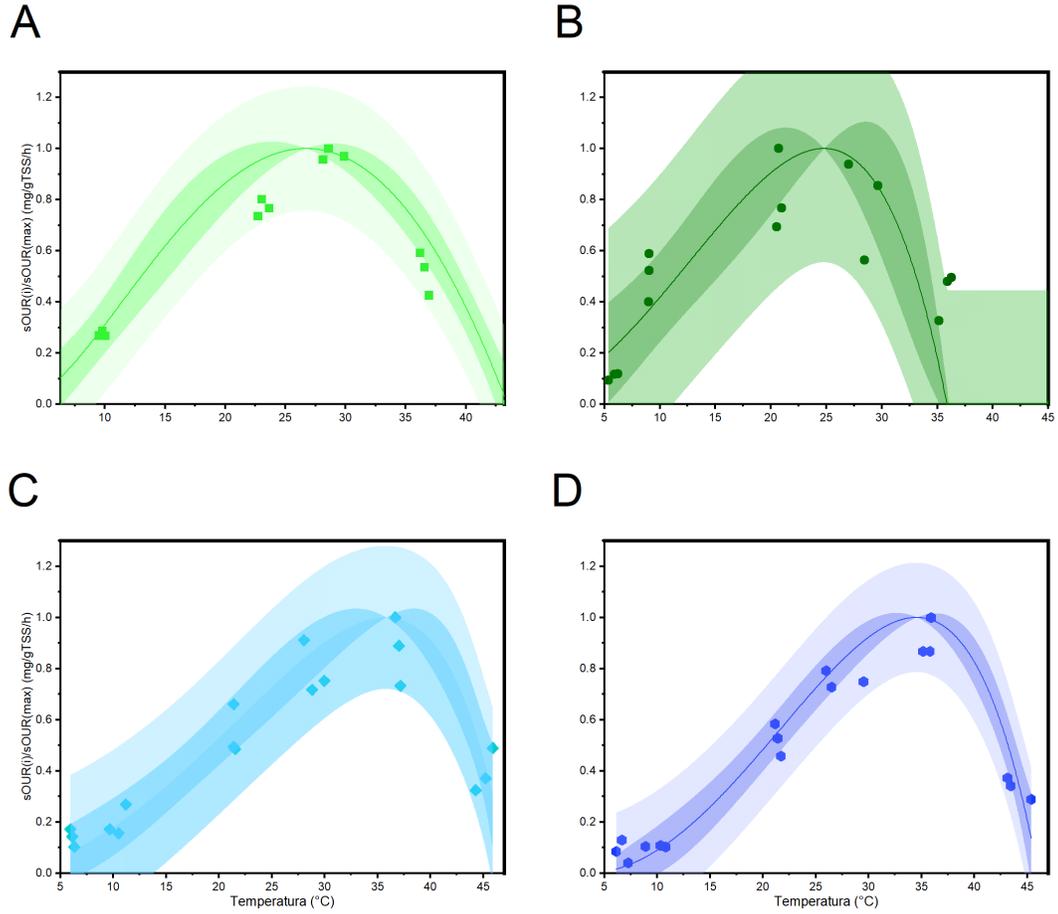
In questa sezione sono illustrati i risultati delle prove respirometriche effettuate seguendo il protocollo descritto nel capitolo precedente. Gli esperimenti sono stati condotti su campioni di assorbanza 0.2 (misurata a 680 nm). Il valore di TSS corrispondente a tale assorbanza è di  $0.083 \text{ g}_{TSS}/L$ . Tale misura è confermata attraverso misurazioni dirette. La quantità di solidi totali è considerata costante durante l'arco delle prove, data la breve durata del test. I valori di  $OPR_{net}$  e  $OUR$  misurati e, in seguito, utilizzati per la stima dei parametri di crescita sono espressi in termini di  $mg/g_{TSS}/h$ . Le respirometrie sono state svolte sia per alghe verdi (*Chlorella* e *Scenedesmus*), sia per cianobatteri (*Spirulina*) con l'obiettivo di valutarne il comportamento e determinare i parametri di crescita per ogni ceppo. Le due alghe verdi selezionate sono di particolare rilevanza per il loro potenziale impiego in processi di depurazione. Per quanto concerne "*Spirulina Sp.*" e "*Spirulina m.*", si vuole verificare le differenze fra due ceppi appartenenti alla stessa specie. Si specifica che, seppure l'interpolazione non lineare sia stata applicata anche ai dati di  $OUR$  misurati, i relativi parametri stimati non sono considerati. Questa decisione è stata effettuata considerando che il modello ALBA non distingue, nelle funzioni che descrivono i processi biologici relativi alle microalghe, i parametri relativi alla fotosintesi piuttosto che quelli associati alla respirazione. Di conseguenza, sono descritti e utilizzati i parametri derivanti dalla stima dei valori di  $OPR_{net}$ .

#### 3.1.1 Temperatura

Nelle tabelle 38, 39, 40 e 41 sono riportati i valori medi di  $OPR_{net}$  e  $OUR$  misurati per le diverse condizioni di temperatura analizzate (appendice 3). Nelle figure 9 e 10 sono mostrati i risultati dell'interpolazione non lineare dei valori di  $OPR_{net}$  e  $OUR$  normalizzati sul valore massimo della relativa serie di misure.



**Fig. 9:** Fit del modello CTMI applicato ai dati di  $OPR_{net}$  misurati per le diverse microalghe analizzate (A - Chlorella; B- Scenedesmus; C- Spirulina Sp.; D- Spirulina M.). Sono fornite le bande di confidenza al 95% (riempimento con colore più scuro) e le bande di previsione per i campionamenti al 95% (riempimento con colore più chiaro).



**Fig. 10:** Fit del modello CTMI applicato ai dati di OUR misurati per le diverse microalghie analizzate (A - Chlorella; B- Scenedesmus; C- Spirulina Sp.; D- Spirulina M.). Sono fornite le bande di confidenza al 95% (riempimento con colore più scuro) e le bande di previsione per i campionamenti al 95% (riempimento con colore più chiaro).

I parametri stimati dalla interpolazione, applicando il modello CTMI (vedi equazione 26) alle misure di  $OPR_{net}$  normalizzate, sono riportati nelle tabelle 13 e 14. I risultati mostrano come, fra le due alghe verdi, Chlorella sia in grado di effettuare attività fotosintetica in un più ampio intervallo di temperatura rispetto a Scenedesmus. La temperatura ottimale ( $T_{opt}$ ) per questi ultimi due ceppi sono comparabili, suggerendo il loro potenziale utilizzo in consorzio. D'altro canto, le due tipologie di Spirulina analizzate risultano molto simili nel loro comportamento al variare della temperatura d'esercizio. Le differenze fra alghe verdi e cianobatteri risultano spiccatamente marcate sia per la temperatura ottimale che per la temperatura massima. Sia "*Spirulina Sp.*" che "*Spirulina Maxima*"

sviluppano il massimo dell'attività fotosintetica per temperature più elevate rispetto alle alghe verdi. Si verifica per tutti i ceppi analizzati come ci sia una forte incertezza per il parametro  $T_{min}$  e i relativi errori standard risultano essere elevati. Una possibile spiegazione è data dalla difficoltà d'indagare, tramite prove respirometriche, valori così estremi di temperatura. Di conseguenza, non si dispone di misure a supporto dell'interpolazione. In particolare, l'errore standard dei parametri stimati per *Scenedesmus* risulta elevato, come si può notare anche dalle bande di confidenza nelle figure 9 e 10.

**TAB. 13:** Parametri stimati tramite interpolazione non lineare applicando il modello CTMI (vedi equazione 26) ai dati di  $OPR_{net}$  sia per *Chlorella*, sia per *Scenedesmus*. È inoltre fornito il valore di  $R^2$  corretto caratteristico dell'interpolazione.

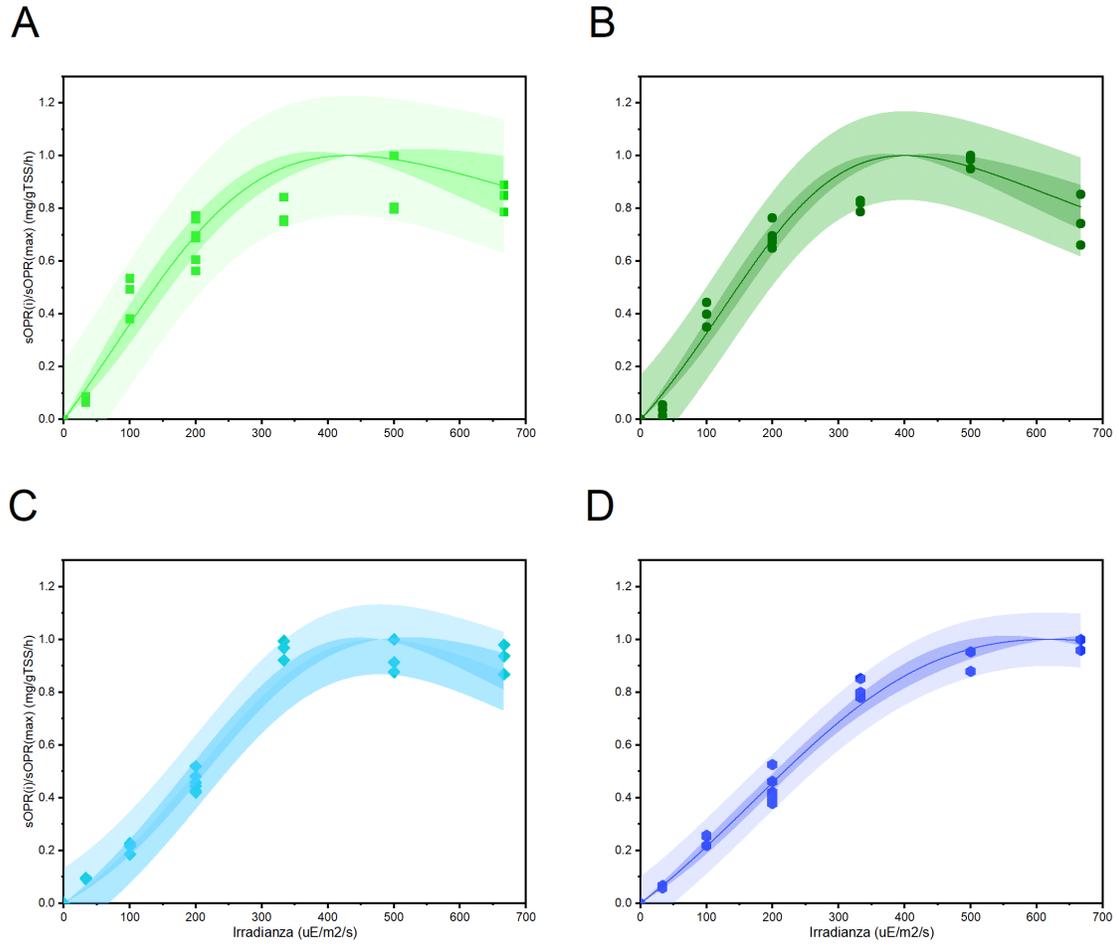
	Chlorella		Scenedesmus	
$R^2$ corr.	0.869		0.826	
	Valore	Errore std.	Valore	Errore std.
$T_{min}$ ° C	-4.35	3.45	-1.43	4.24
$T_{opt}$ ° C	27.3	1.39	25.8	1.96
$T_{max}$ ° C	43.4	0.51	37.6	0.77

**TAB. 14:** Parametri stimati tramite interpolazione non lineare applicando il modello CTMI (vedi equazione 26) ai dati di  $OPR_{net}$  sia per "*Spirulina sp.*", sia per "*Spirulina Maxima*". È inoltre fornito il valore di  $R^2$  corretto caratteristico dell'interpolazione.

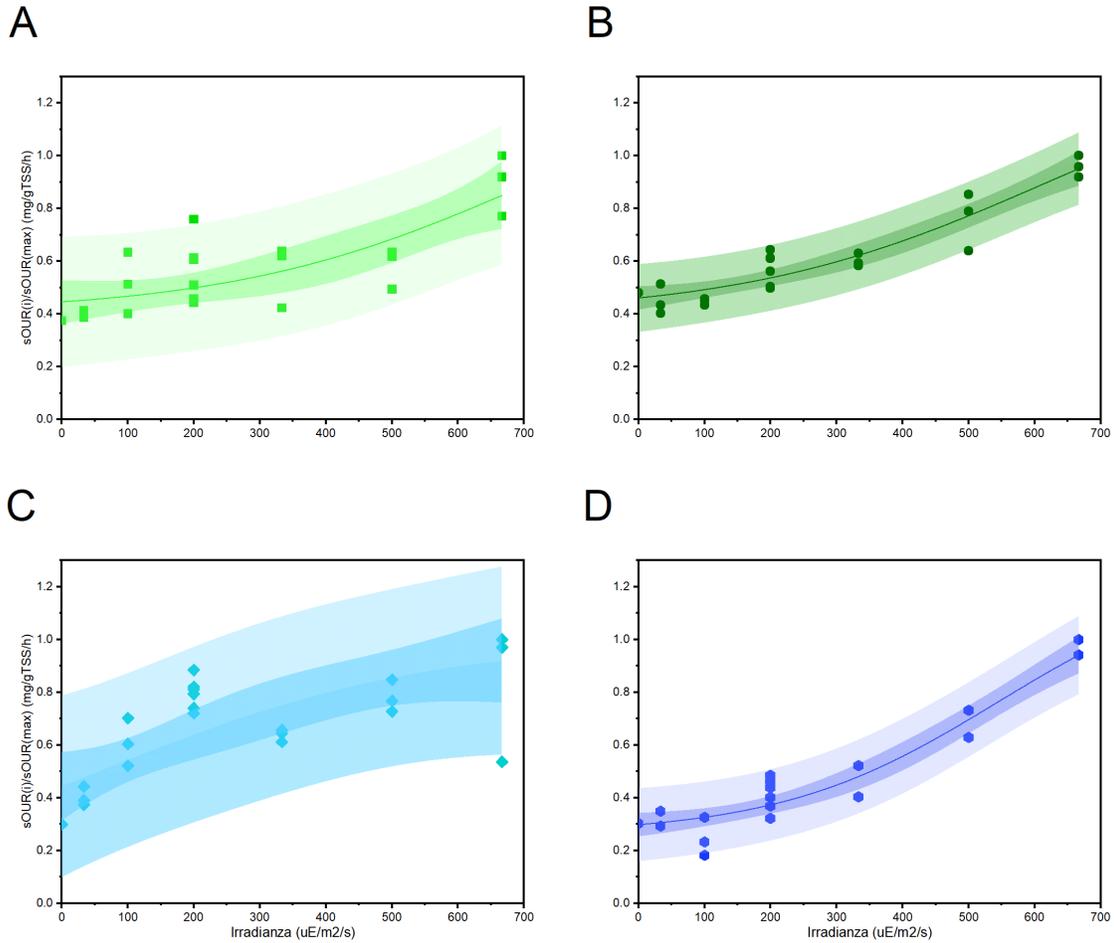
	Spirulina sp.		Spirulina M.	
$R^2$ corr.	0.844		0.948	
	Valore	Errore std.	Valore	Errore std.
$T_{min}$ ° C	-2.36	5.70	2.64	7.78
$T_{opt}$ ° C	35.8	1.34	34.5	0.63
$T_{max}$ ° C	50.8	2.08	49.5	0.77

### 3.1.2 Irradianza

Nelle tabelle 42, 43, 44 e 45 sono riportati i valori medi di  $OPR_{net}$  e  $OUR$  misurati per le diverse condizioni d'irradianza analizzate (vedi appendice 3). Nelle figure 11 e 12 sono mostrati i risultati dell'interpolazione non lineare dei valori di  $OPR_{net}$  e  $OUR$  normalizzati sul valore massimo della relativa serie di misure.



**FIG. 11:** Fit del modello Haldane applicato ai dati di  $OPR_{net}$  misurati per le diverse microalghe analizzate (A - Chlorella; B- Scenedesmus; C- Spirulina Sp.; D- Spirulina M.). Sono fornite le bande di confidenza al 95% (riempimento con colore più scuro) e le bande di previsione per i campionamenti al 95% (riempimento con colore più chiaro).



**FIG. 12:** Fit della funzione Sigma applicata ai dati di OUR misurati per le diverse microalghe analizzate (A - Chlorella; B- Scenedesmus; C- Spirulina Sp.; D- Spirulina M.). Sono fornite le bande di confidenza al 95% (riempimento con colore più scuro) e le bande di previsione per i campionamenti al 95% (riempimento con colore più chiaro).

I parametri stimati dalla interpolazione, applicando il modello Haldane (vedi equazione 27) alle misure di OPR normalizzate, sono riportati nelle tabelle 15 e 16. Dai risultati si evince come il coefficiente angolare iniziale " $\alpha_I$ " sia molto simile per tutte e quattro le alghe analizzate. Di conseguenza, per valori bassi d'irradianza incidente, si verifica una risposta comparabile fra i diversi ceppi. I dati relativi alle alghe verdi, tuttavia, sono stati interpolati con curve più ripide rispetto a quelle dei cianobatteri. Di conseguenza, si può affermare che sia Chlorella, sia Scenedesmus possono sviluppare fotosintesi in maniera ottimale a partire da valori minori d'irradianza. "*Spirulina Maxima*" risulta avere un ottimo d'irradianza ben superiore rispetto all'altra tipologia di Spirulina e rispetto alle alghe verdi. È necessario

specificare che, per le prove effettuate per questo caso di studio, il range d'irradianza analizzato esclude i valori tipici della radiazione solare che si riscontrano in sistemi posti all'aperto (da 0 fino a 2000  $\mu E/m^2/s$ , vedi figure 6 e 7). Tuttavia, è dimostrato come l'attività fotosintetica resti pressoché costante una volta raggiunte e superate le condizioni ottimali d'irradianza. Anche se non si considerassero fenomeni fisici che riducono la radiazione solare incidente, come l'effetto ombreggiante dato dalla biomassa stessa, si verificano effetti di fotoinibizione per valori molto elevati ( $>3000 \mu E/m^2/s$ ) [9]. Dalla figura 12 si evince come l'andamento sia simile per tutte le microalghe analizzate. Si può affermare che la scelta di utilizzare la funzione sigma per l'interpolazione dei dati di OUR è corretta.

**TAB. 15:** Parametri stimati tramite interpolazione non lineare applicando il modello Haldane (vedi equazione 27) ai dati di  $OPR_{net}$  sia per Chlorella, sia per Scenedesmus. È inoltre fornito il valore di  $R^2$  corretto caratteristico dell'interpolazione.

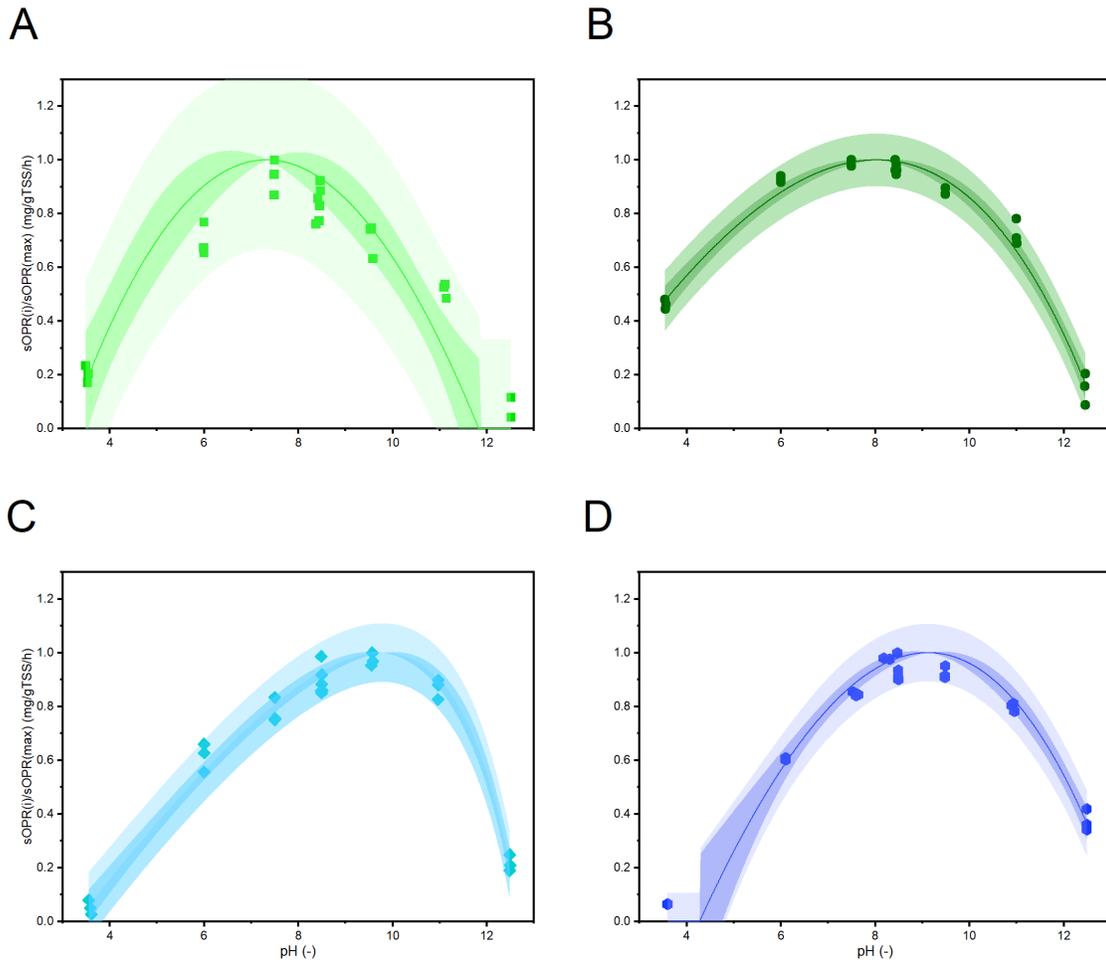
	Chlorella		Scenedesmus	
$R^2$ corr.	0.890		0.946	
	Valore	Errore std.	Valore	Errore std.
$\alpha_I$ [ $mg/g_{TSS}/h$ ]	3.36E-03	5.67E-04	2.73E-03	3.11E-04
$I_{opt}$ [ $\mu E/m^2/s$ ]	432	34.4	401	17.1

**TAB. 16:** Parametri stimati tramite interpolazione non lineare applicando il modello Haldane (vedi equazione 27) ai dati di  $OPR_{net}$  sia per "Spirulina sp.", sia per "Spirulina Maxima". È inoltre fornito il valore di  $R^2$  corretto caratteristico dell'interpolazione.

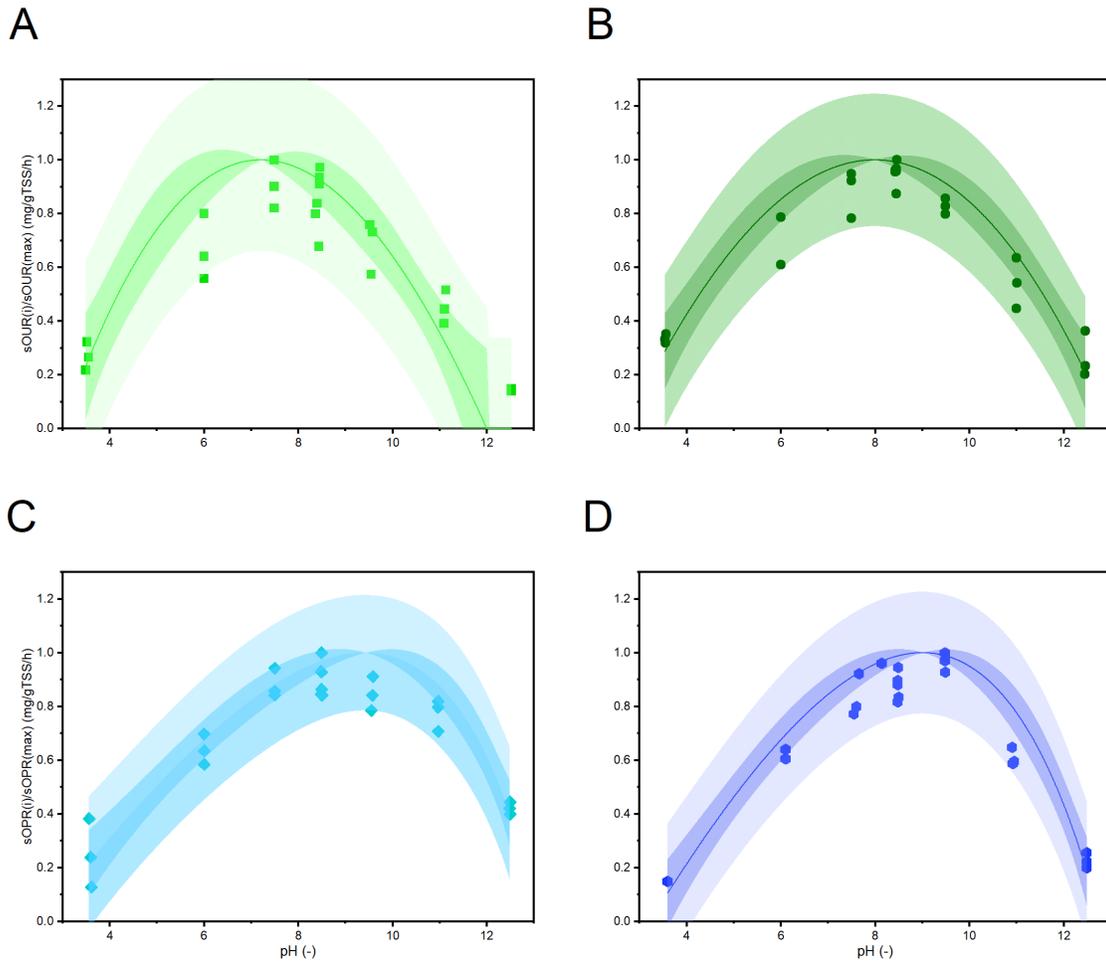
	Spirulina sp.		Spirulina M.	
$R^2$ corr.	0.971		0.983	
	Valore	Errore std.	Valore	Errore std.
$\alpha_I$ [ $mg/g_{TSS}/h$ ]	1.68E-03	1.58E-04	1.93E-03	1.99E-04
$I_{opt}$ [ $\mu E/m^2/s$ ]	479	18.0	618	43.5

### 3.1.3 pH

Nelle tabelle 46, 47, 48 e 49 sono riportati i valori medi di  $OPR_{net}$  e  $OUR$  misurati per diverse condizioni di pH (vedi appendice 3). Nelle figure 13 e 14 sono mostrati i risultati dell'interpolazione non lineare dei valori di  $OPR_{net}$  e  $OUR$  normalizzati sul valore massimo della relativa serie di misure.



**Fig. 13:** Fit del modello CPM applicato ai dati di  $OPR_{net}$  misurati per le diverse microalgahe analizzate (A - Chlorella; B- Scenedesmus; C- Spirulina Sp.; D- Spirulina M.). Sono fornite le bande di confidenza al 95% (riempimento con colore più scuro) e le bande di previsione per i campionamenti al 95% (riempimento con colore più chiaro).



**Fig. 14:** Fit del modello CPM applicata ai dati di OUR misurati per le diverse microalghe analizzate (A - Chlorella; B- Scenedesmus; C- Spirulina Sp.; D- Spirulina M.). Sono fornite le bande di confidenza al 95% (riempimento con colore più scuro) e le bande di previsione per i campionamenti al 95% (riempimento con colore più chiaro).

I parametri stimati dalla interpolazione, applicando il modello CPM (vedi equazione 29) alle misure di  $OPR_{net}$  normalizzate, sono riportati nelle tabelle 17 e 18. Dai risultati si evidenziano differenze rilevanti fra le due alghe verdi analizzate. Seppure i valori di  $pH_{opt}$  siano comparabili e poco sopra valori di neutralità, Chlorella risulta essere in grado di sviluppare attività fotosintetica in un range più ristretto di pH rispetto a Scenedesmus. Per quanto concerne i cianobatteri, si evidenzia come il valore ottimale di pH sia molto elevato in confronto alle alghe verdi. Si può affermare che le due varianti di Spirulina analizzate sono in grado di svilupparsi, in maniera ottimale, in ambienti caratterizzati da pH

alcalini. Questa peculiarità risulta essere un vantaggio per processi di coltivazione in sistemi di difficile controllo, come impianti a larga scala e all'aperto, dove il pH tende naturalmente a crescere a causa del consumo di anidride carbonica e allo scarso ricambio con l'atmosfera. Inoltre, a pH basici si evita lo sviluppo di popolazioni di microorganismi potenzialmente indesiderate, come alcuni batteri o funghi. D'altro canto le alghe verdi richiedono necessariamente un controllo di pH più efficace per potersi sviluppare al massimo potenziale.

**TAB. 17:** Parametri stimati tramite interpolazione non lineare applicando il modello CPM (vedi equazione 29) ai dati di  $OPR_{net}$  sia per Chlorella, sia per Scenedesmus. È inoltre fornito il valore di  $R^2$  corretto caratteristico dell'interpolazione.

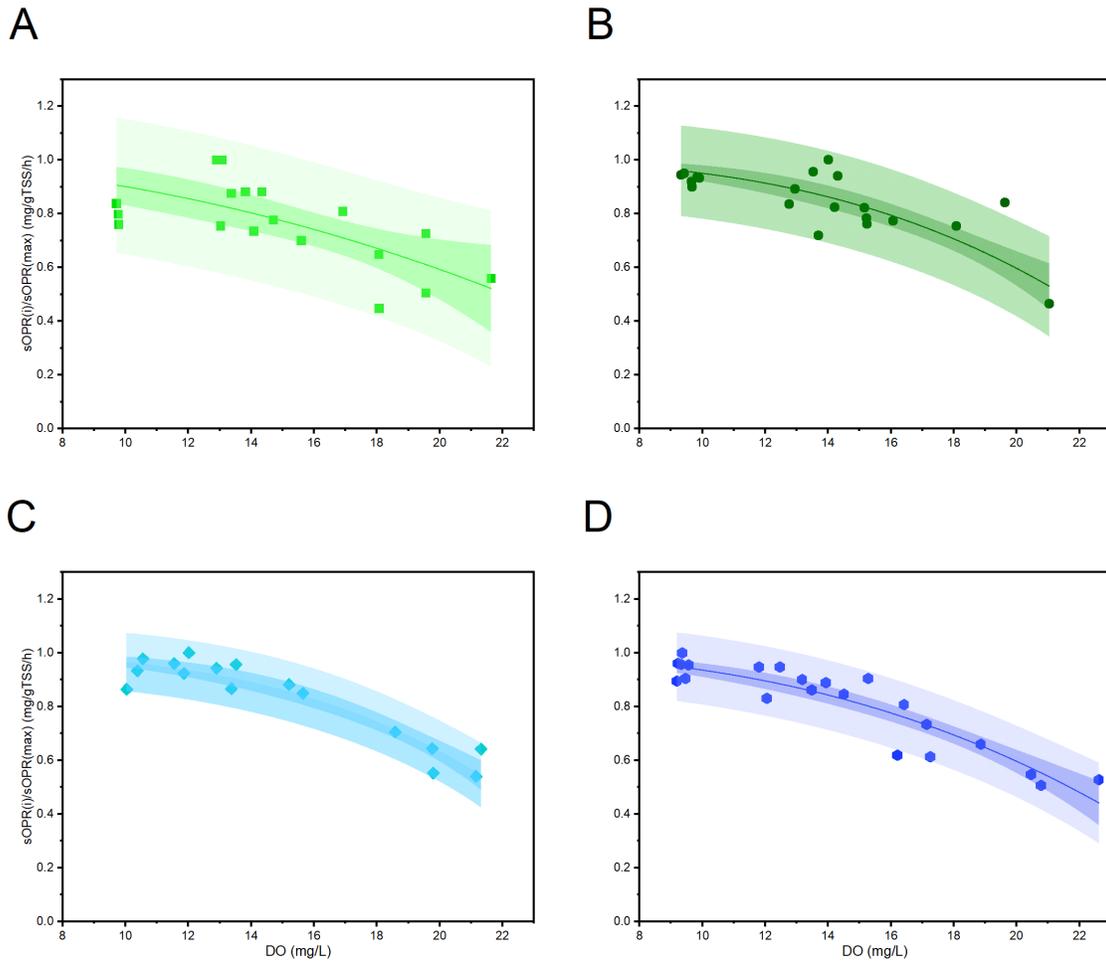
	Chlorella		Scenedesmus	
$R^2$ corr.	0.716		0.974	
	Valore	Errore std.	Valore	Errore std.
$pH_{min}$	3.13	0.25	1.56	0.24
$pH_{opt}$	7.33	0.39	8.03	0.14
$pH_{max}$	11.8	0.30	12.8	0.08

**TAB. 18:** Parametri stimati tramite interpolazione non lineare applicando il modello CPM (vedi equazione 29) ai dati di  $OPR_{net}$  sia per "Spirulina sp.", sia per "Spirulina Maxima". È inoltre fornito il valore di  $R^2$  corretto caratteristico dell'interpolazione.

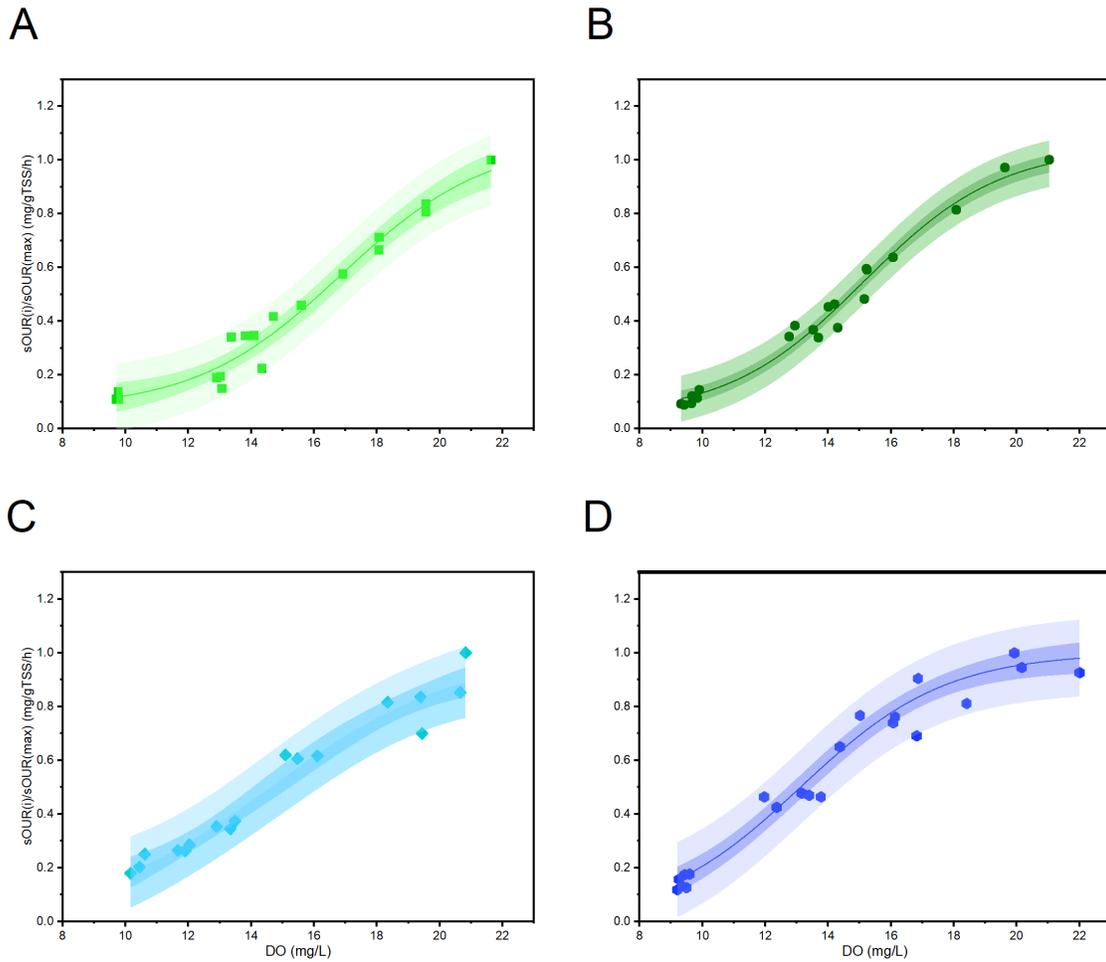
	Spirulina sp.		Spirulina M.	
$R^2$ corr.	0.975		0.972	
	Valore	Errore std.	Valore	Errore std.
$pH_{min}$	3.29	0.14	4.27	0.31
$pH_{opt}$	9.78	0.11	9.12	0.15
$pH_{max}$	12.7	0.05	13.3	0.15

### 3.1.4 Ossigeno disciolto

Nelle tabelle 50, 51, 52 e 53 sono riportati i valori medi di  $OPR_{net}$  e  $OUR$  misurati per diverse condizioni di ossigeno disciolto (vedi appendice 3). Nelle figure 15 e 16 sono mostrati i risultati dell'interpolazione non lineare dei valori di  $OPR_{net}$  e  $OUR$  normalizzati sul valore massimo della relativa serie di misure.



**Fig. 15:** Fit del modello Hill applicato ai dati di  $OPR_{net}$  misurati per le diverse microalghe analizzate (A - Chlorella; B- Scenedesmus; C- Spirulina Sp.; D- Spirulina M.). Sono fornite le bande di confidenza al 95% (riempimento con colore più scuro) e le bande di previsione per i campionamenti al 95% (riempimento con colore più chiaro).



**Fig. 16:** Fit della funzione Sigma applicata ai dati di OUR misurati per le diverse microalghe analizzate (A - Chlorella; B- Scenedesmus; C- Spirulina Sp.; D- Spirulina M.). Sono fornite le bande di confidenza al 95% (riempimento con colore più scuro) e le bande di previsione per i campionamenti al 95% (riempimento con colore più chiaro).

I parametri stimati dalla interpolazione, applicando il modello Hill (vedi equazione 30) alle misure di OPR normalizzate, sono riportati nelle tabelle 19 e 20. Dai risultati si evince come il parametro  $K_{DO}$  sia molto simile per tutte e quattro le alghe analizzate tramite respirometria. Tale parametro è definito come la costante d'inibizione da ossigeno e, alla luce dei risultati, non dipende dal ceppo considerato. Si specifica che quest'ultima affermazione non è stata precedentemente riportata in letteratura e sarebbe interessante approfondire questo aspetto. D'altro canto, il coefficiente di forma " $n$ " risulta differire per le diverse microalghe. Questo parametro influisce sulla pendenza negativa della curva, difatti, più

il valore di "n" è elevato, più l'effetto inibente dell'ossigeno è marcato a concentrazioni elevate, ma superata una certa soglia l'attività fotosintetica decade più rapidamente. Di conseguenza possiamo affermare che l'effetto inibente dell'ossigeno agisce sull'OPR di Chlorella producendo una curva con pendenza minore, ma si notano effetti a partire da valori più bassi di OD. Gli altri tre ceppi, invece, sembrano avere un comportamento simile, con una produzione leggermente in calo fino a valori di DO pari a 16 mg/L. Superata tale soglia l'OPR subisce una brusca decrescita.

**TAB. 19:** Parametri stimati tramite interpolazione non lineare applicando il modello Hill (vedi equazione 30) ai dati di  $OPR_{net}$  sia per Chlorella, sia per Scenedesmus. È inoltre fornito il valore di  $R^2$  corretto caratteristico dell'interpolazione.

	Chlorella		Scenedesmus	
$R^2$ corr.	0.431		0.730	
	Valore	Errore std.	Valore	Errore std.
$k_{DO}$ mg <sub>DO</sub> /L	22.9	0.02	22.2	0.02
$n$	2.82	0.01	3.99	0.01

**TAB. 20:** Parametri stimati tramite interpolazione non lineare applicando il modello Hill (vedi equazione 30) ai dati di  $OPR_{net}$  sia per "Spirulina sp.", sia per "Spirulina Maxima". È inoltre fornito il valore di  $R^2$  corretto caratteristico dell'interpolazione.

	Spirulina sp.		Spirulina M.	
$R^2$ corr.	0.903		0.859	
	Valore	Errore std.	Valore	Errore std.
$k_{DO}$ mg <sub>DO</sub> /L	22.7	0.02	22.0	0.02
$n$	4.44	0.01	3.73	0.01

## 3.2 Modello: Coltivazione di microalghe con digestato

### 3.2.1 Condizioni iniziali e caratteristiche dell'influente

Il modello ALBA, implementato nella piattaforma numerica Aquasim, è stato inizialmente oggetto di modifiche, come spiegato nel paragrafo 2.2.1. I parametri direttamente misurati e non interessati da calibrazione sono stati inseriti nel modello. Rientrano in questa categoria: i risultati derivanti dalle diverse prove respirometriche effettuate sulle microalghe per questo caso di studio (vedi tabelle 19, 15, 17 e 13), i parametri di crescita per i batteri ripresi da prove respirometriche pubblicate in letteratura ([78]) (vedi appendice 2), i dati meteorologici (vedi figura 6) e le caratteristiche del raceway ( $k_{La}$ , portata influente, altezza liquido, superficie utile e volume). Per quanto concerne la determinazione delle condizioni iniziali si è seguita la metodologia illustrata nel paragrafo 2.2.2. Le concentrazioni delle diverse specie chimiche e delle componenti del carbonio organico sono riportate nelle tabelle 21 e 22.

**TAB. 21:** Concentrazione delle diverse specie chimiche considerate alle condizioni iniziali. Tali concentrazioni sono state valutate tramite il sottomodello pH, sviluppato per ALBA, in base alle prime rilevazioni sulla sospensione in uscita (vedi appendice 2).

Specie Chimica	Concentrazione	Unità di misura
$H_3PO_4$	4.19E-08	$mol_P/m^3$
$H_2PO_4^-$	4.41E-02	$mol_P/m^3$
$HPO_4^{2-}$	4.24E-01	$mol_P/m^3$
$PO_4^{3-}$	1.48E-05	$mol_P/m^3$
$H_2CO_3$	1.15E-01	$mol_C/m^3$
$HCO_3^-$	7.57E+00	$mol_C/m^3$
$CO_3^{2-}$	5.76E-02	$mol_C/m^3$
$NH_4^+$	4.58E+00	$mol_N/m^3$
$NH_3$	4.17E-01	$mol_N/m^3$
$HNO_2$	5.60E-05	$mol_N/m^3$
$NO_2^-$	3.89E+00	$mol_N/m^3$
$HNO_3$	3.15E-07	$mol_N/m^3$
$NO_3^-$	2.44E+00	$mol_N/m^3$

**TAB. 22:** Frazionamento del COD alle condizioni iniziali. Le concentrazioni sono state definite in base alle assunzioni e ipotesi elencate nel paragrafo 2.2.2.2.

Frazione del COD	Concentrazione	Unità di misura
$S_S$	105	$mg_{COD}/L$
$S_I$	443	$mg_{COD}/L$
$X_S$	22.2	$mg_{COD}/L$
$X_I$	9.50	$mg_{COD}/L$
$X_{CHL}$	10.2	$mg_{COD}/L$
$X_{SCE}$	61.3	$mg_{COD}/L$
$X_H$	6.33	$mg_{COD}/L$
$X_{AOB}$	1.08	$mg_{COD}/L$
$X_{NOB}$	0.16	$mg_{COD}/L$

Si specifica che la concentrazione della biomassa batterica ( $X_H$ ,  $X_{AOB}$  e  $X_{NOB}$ ) è stata successivamente ridefinita tramite il processo di calibrazione. La caratterizzazione dell'influente è stata effettuata, sempre tramite il sotto modello pH, in base ai dati della campagna di misurazione (vedi appendice 2). Per ogni campionamento effettuato, è stata elaborata la composizione chimica della frazione liquida del digestato in ingresso. Il frazionamento del COD influente è stato definito tramite le metodologie e le ipotesi effettuate in precedenza ed è illustrato in tabella 23.

**TAB. 23:** Frazionamento del COD della frazione liquida del digestato influente. Le concentrazioni sono state definite in base alle assunzioni e ipotesi elencate nel paragrafo 2.2.2.2.

Frazione del COD	Concentrazione	Unità di misura
$S_S$	135	$mg_{COD}/L$
$S_I$	128	$mg_{COD}/L$
$X_S$	17.9	$mg_{COD}/L$
$X_I$	67.7	$mg_{COD}/L$
$X_{CHL}$	0.0	$mg_{COD}/L$
$X_{SCE}$	0.0	$mg_{COD}/L$
$X_H$	0.69	$mg_{COD}/L$
$X_{AOB}$	0.30	$mg_{COD}/L$
$X_{NOB}$	0.05	$mg_{COD}/L$

Si specifica che, a causa della mancanza di misure di BOD che coprano l'intero lasso temporale della simulazione, si considera costante nel tempo la distribuzione del COD nelle diverse frazioni che lo compongono. La concentrazione della biomassa batterica, ipotizzata pari all'1% del COD particolato in ingresso, è successivamente calibrata e i valori mostrati in tabella 23 sono ipotizzati e parziali.

### 3.2.2 Calibrazione e validazione

Come illustrato nella sezione iniziale del capitolo 2.2 e nel paragrafo 2.2.2, è stata effettuata un'operazione di calibrazione sul modello che descrive l'impianto pilota situato a Bresso. Tale procedura è utile per individuare i parametri non direttamente misurati, così da poter completare esaustivamente la caratterizzazione del caso di studio. La calibrazione ha richiesto un discreto numero d'iterazioni e passaggi intermedi. In particolare, per ottenere un risultato soddisfacente, il software ha svolto oltre 4000 simulazioni variando i diversi parametri. Inizialmente, le variabili considerate sono state stimate utilizzando le misure di ossigeno raccolte dalla relativa sonda. In seconda battuta, sono stati utilizzati in simultanea i dati di concentrazione di ammonio, di nitrato e nitrito per ultimare la calibrazione. Nelle tabelle 24 e 25 sono illustrati i parametri stimati e i relativi valori ottenuti.

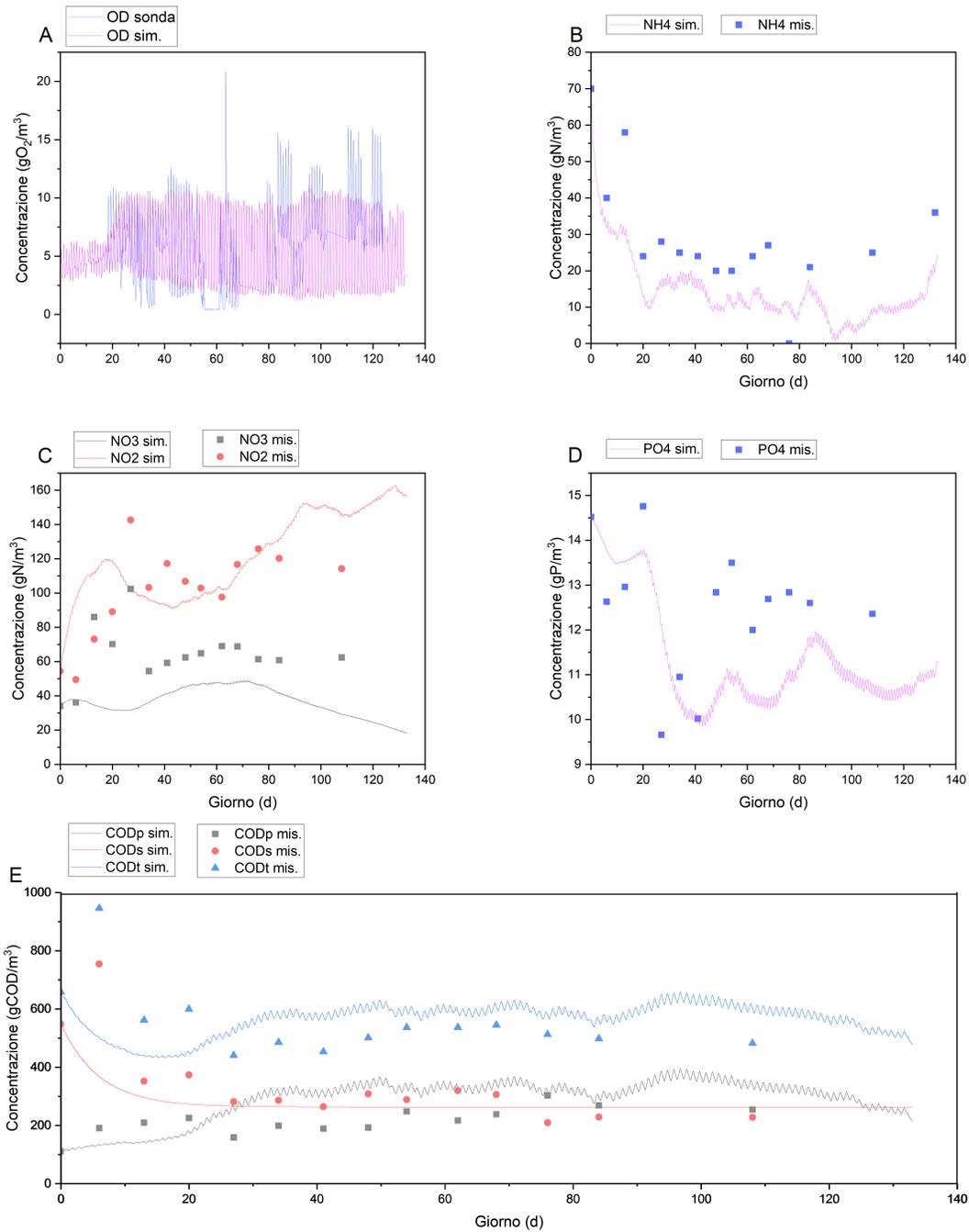
**TAB. 24:** Risultati della calibrazione per le costanti e i parametri relativi alle microalghie. Per identificare i processi a cui fanno riferimento i tassi massimi dei diversi ( $\mu_{p,i}$ ), si faccia riferimento alla sezione dedicata 1.4.1

Parametro	Valore iniziale	Valore calibrato	Parametro	Valore iniziale	Valore calibrato
$K_{iNH,CHL}$ [ $g_N/m^3$ ]	10	5.17	$K_{iNH,SCE}$ [ $g_N/m^3$ ]	10	6.56
$K_{NH,CHL}$ [ $g_N/m^3$ ]	0.112	0.126	$K_{NH,SCE}$ [ $g_N/m^3$ ]	0.112	0.102
$K_{NO3,CHL}$ [ $g_N/m^3$ ]	0.349	0.479	$K_{NO3,SCE}$ [ $g_N/m^3$ ]	0.349	0.479
$K_{O,CHL}$ [ $g_O/m^3$ ]	0.209	0.193	$K_{O,SCE}$ [ $g_O/m^3$ ]	0.209	0.212
$\mu_{p1,CHL}$ [1/d]	2.00	1.00	$\mu_{p1,SCE}$ [1/d]	0.5	0.514
$\mu_{p2,CHL}$ [1/d]	2.00	1.00	$\mu_{p2,SCE}$ [1/d]	0.5	0.514
$\mu_{p3,CHL}$ [1/d]	0.1	0.145	$\mu_{p3,SCE}$ [1/d]	0.1	0.113
$\mu_{p4,CHL}$ [1/d]	0.03	0.015	$\mu_{p4,SCE}$ [1/d]	0.03	0.044

**TAB. 25:** Risultati della calibrazione per le costanti e i parametri relativi alla biomassa batterica e per il  $k_d$ . Per identificare i processi a cui fanno riferimento i ratei massimi dei diversi ( $\mu_{p,i}$ ), si faccia riferimento alla sezione dedicata 1.4.1

Parametro	Valore Iniziale	Valore calibrato	Parametro	Valore Iniziale	Valore calibrato
$\mu_{p5}$ [1/d]	6.00	3.08	$\mu_{p6}$ [1/d]	6.00	6.00
$\mu_{p7}$ [1/d]	6.00	3.25	$\mu_{p8}$ [1/d]	6.00	4.37
$\mu_{p9}$ [1/d]	3.00	1.51	$\mu_{p10}$ [1/d]	0.30	0.39
$\mu_{p11}$ [1/d]	0.30	0.35	$\mu_{p13}$ [1/d]	0.90	1.33
$\mu_{p14}$ [1/d]	0.72	0.53	$\mu_{p15}$ [1/d]	0.05	0.04
$\mu_{p16}$ [1/d]	0.10	0.07	$\mu_{p17}$ [1/d]	0.65	0.55
$\mu_{p18}$ [1/d]	0.03	0.04	$\mu_{p19}$ [1/d]	0.08	0.07
$X_{AOB,iniziale}$ [gCOD/m <sup>3</sup> ]	1.08	15.8	$X_{AOB,influente}$ [gCOD/m <sup>3</sup> ]	0.30	0.13
$X_{H,iniziale}$ [gCOD/m <sup>3</sup> ]	6.33	4.47	$X_{H,influente}$ [gCOD/m <sup>3</sup> ]	0.69	1.78
$X_{NOB,iniziale}$ [gCOD/m <sup>3</sup> ]	0.16	2.66	$X_{NOB,influente}$ [gCOD/m <sup>3</sup> ]	0.05	0.03
$Y_{AOB}$ [gCOD/gN]	0.20	0.12	$Y_{H,S}$ [gCOD/gCOD]	0.63	0.68
$Y_{H,NO2}$ [gCOD/gN]	0.30	0.44	$Y_{H,NO3}$ [gCOD/gN]	0.50	0.68
$Y_{NOB}$ [gCOD/gN]	0.05	0.07	$k_d$	0.07	0.12

La validazione del modello è effettuata valutando la corrispondenza fra diverse variabili d'interesse simulate e i relativi dati misurati. Oltre alla concentrazione d'ossigeno disciolto, di ammonio, di nitrito e di nitrato, che sono state oggetto di calibrazione, si è verificato che i valori di COD particolato, di COD solubile e di biomassa algale simulati corrispondano con le misure reali. In figura 17 sono riportati i grafici per alcune variabili rilevanti per il processo al fine di validare il modello.



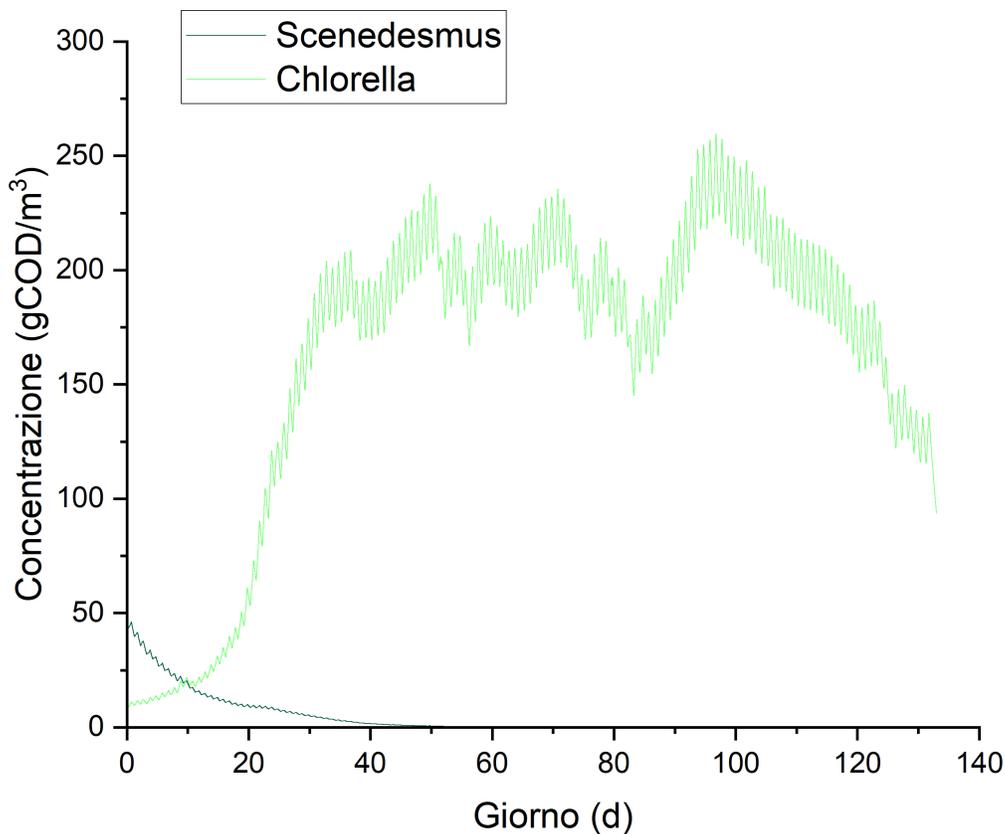
**Fig. 17:** (A) confronto fra la concentrazione d'ossigeno misurata dalla sonda e quella simulata; (B) confronto fra la concentrazione di ammonio campionata nell'effluente con quella simulata; (C) confronto fra le concentrazioni di nitrito e nitrato misurate nell'effluente e quelle simulate; (D) confronto fra la concentrazione di fosfato misurata nell'effluente e quella simulata; (E) confronto fra le concentrazioni misurate nell'effluente di  $COD_p$ ,  $COD_s$  e  $COD_{tot}$  con quelle simulate dal software.

---

Dai risultati derivanti dal processo di calibrazione e dal confronto fra le variabili simulate e i dati misurati si possono trarre alcune considerazioni interessanti:

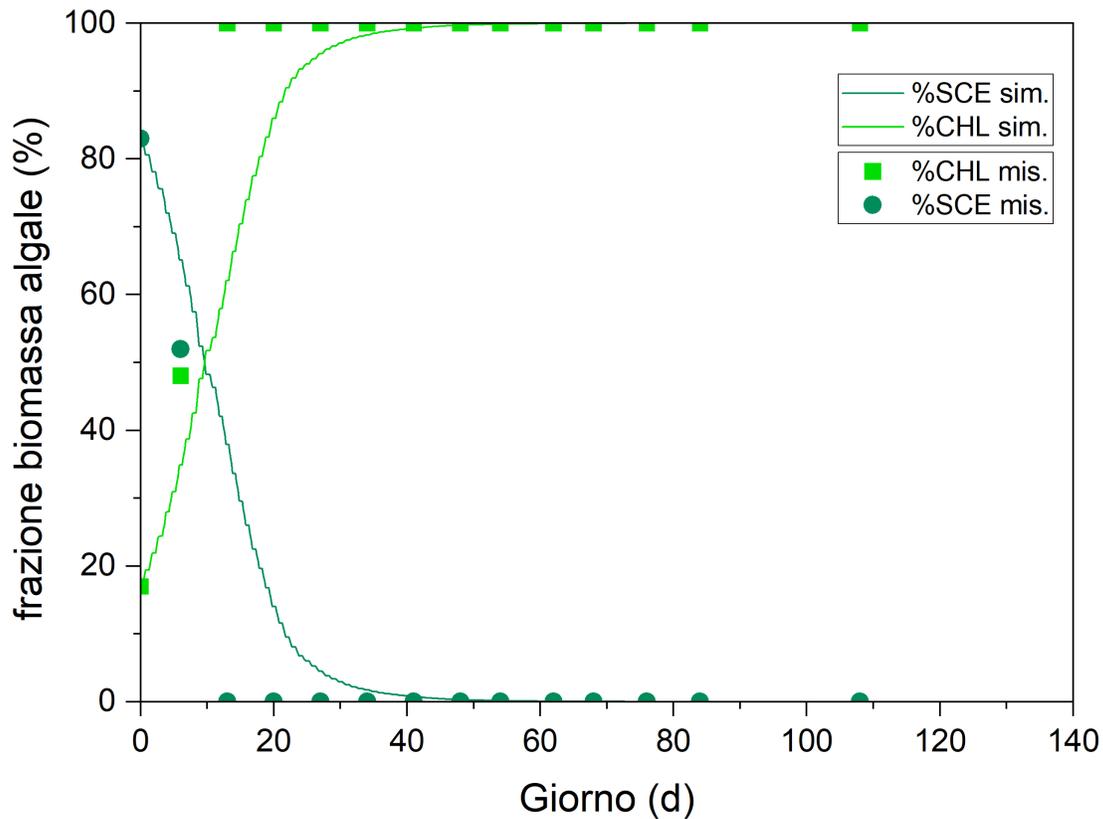
1. i dati simulati della concentrazione d'ossigeno disciolto risultano essere simili a quelli raccolti dalla sonda. Tuttavia, il modello sembra sottostimare leggermente i valori estremi e non è in grado di descrivere appieno le fluttuazioni di tale variabile;
2. per quanto concerne la simulazione di nitrito e nitrato, i risultati ottenuti sono paragonabili all'andamento dei campionamenti effettuati sull'effluente. Il modello sembra sottostimare, in maniera sostanziale, i picchi di concentrazione sia per nitrito, sia per nitrato che si verificano dopo 20-40 giorni dall'inizio della simulazione. Una volta stabilizzate le concentrazioni di questi due ioni, la simulazione è in grado di rappresentare più fedelmente l'andamento dei dati sperimentali;
3. la simulazione della concentrazione d'ammonio risulta essere la più problematica, se comparata con i dati misurati sull'effluente. È da considerare che il modello ALBA, a differenza di altri modelli più semplici, è costituito per rappresentare tutti i processi che agiscono sulle specie azotate (sia biologici, sia chimico-fisici). Ciò motiva la difficoltà di rappresentare fedelmente l'evoluzione di tali specie chimiche, influenzate da così numerosi processi. Sebbene Aquasim sottostimi per tutta la durata della simulazione la concentrazione, si osserva una buona rappresentazione dell'andamento delle fluttuazioni di ammonio nel tempo;
4. la simulazione del COD e del suo frazionamento in COD particolato e solubile risultata ben comparabile con i valori campionati sull'effluente. Come verificato per altre variabili, vi è una sottostima dei valori estremi che sono rilevati dopo 20-40 giorni dall'inizio della simulazione sia per il COD<sub>p</sub>, sia per il COD<sub>s</sub>. Una volta raggiunte le condizioni stazionarie, il risultato è più fedele ai dati sperimentali;
5. la simulazione della concentrazione di fosfato risulta sottostimare per l'intero arco temporale analizzato i risultati, soprattutto se comparati alle misure effettuate sull'effluente. Tuttavia è correttamente individuato il minimo di concentrazione individuato fra 20 e 40 giorni dall'inizio delle operazioni. L'andamento dei dati misurati è comunque comparabile a quello simulato tramite modello.

Dopo aver verificato la validità del modello nel rappresentare fedelmente l'andamento di alcune variabili misurate, è possibile analizzare i risultati dei quali non si dispongono campionamenti diretti. In particolar modo, risulta opportuno osservare la concentrazione della biomassa algale e il suo andamento nel tempo. Tale risultato, derivante dalla simulazione, è mostrato in figura 18.



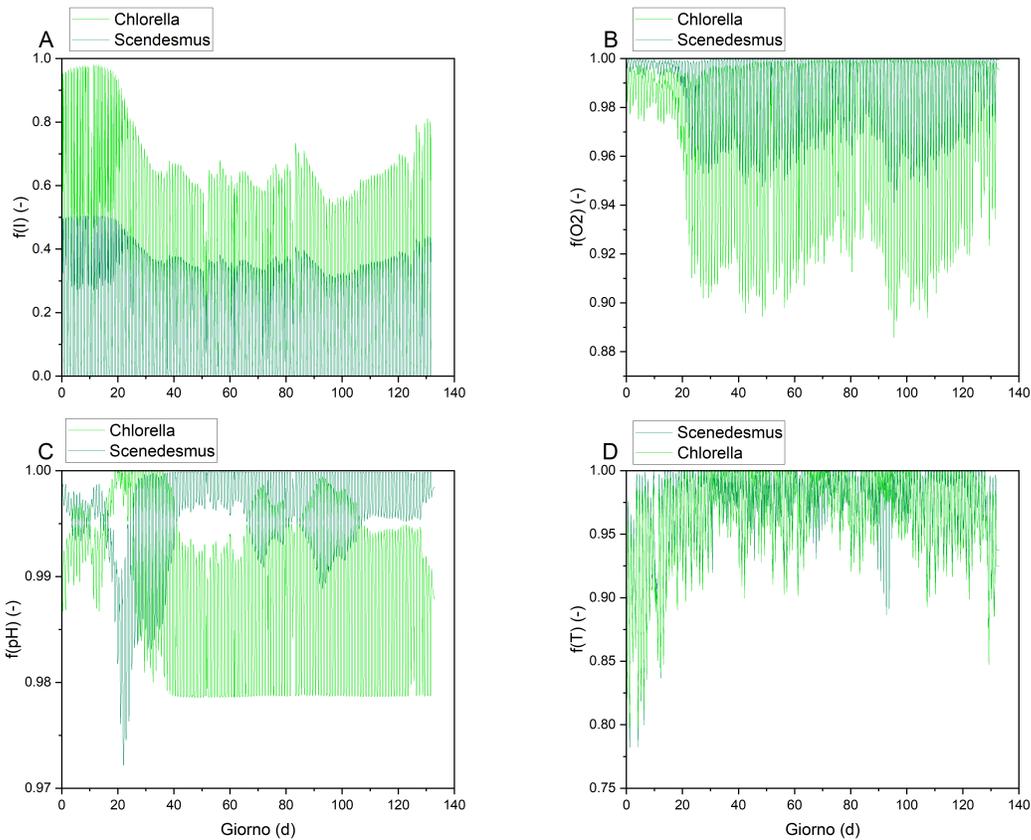
**Fig. 18:** Concentrazione in funzione del tempo della biomassa algale. La concentrazione è mostrata separatamente per i due ceppi

Dal grafico della biomassa algale si evince come la popolazione di Scenedesmus non sia in grado di svilupparsi nel sistema modellato. Tale risultato è avallato dalla conta cellulare effettuata durante i campionamenti (vedi appendice 2). Sebbene quest'ultima misura non sia direttamente comparabile con la concentrazione simulata espressa in  $gCOD/m^3$ , è possibile effettuare un confronto fra la ripartizione in percentuale dei due diversi ceppi in funzione del tempo. I risultati di tale confronto sono riportati in figura 19.



**FIG. 19:** Confronto fra i valori percentuali calcolati dalla simulazione e quelli derivati dalle conte cellulari per i due diversi ceppi coltivati. Le percentuali sono espresse in termini di biomassa algale complessiva.

I risultati ottenuti mostrano come la simulazione sia in grado di rappresentare fedelmente l'andamento nel tempo del frazionamento della biomassa algale. Tuttavia, la scomparsa della popolazione di *Scenedesmus* è più rapida nella realtà. È interessante approfondire le ragioni che conducono a tali risultati, di conseguenza si è analizzato il processo biologico di crescita, descritto tramite ALBA, per entrambi i ceppi. In particolare, si è effettuato il confronto fra le diverse funzioni che descrivono lo sviluppo cellulare. I risultati di tale operazione sono riassunti in figura 20.



**Fig. 20:** (A) risposta della funzione Haldane utilizzata per descrivere l'effetto della luce sulla crescita di Chlorella e Scenedesmus; (B) risposta del modello Hill utilizzato per descrivere l'effetto inibente dell'ossigeno sulla crescita di Chlorella e Scenedesmus; (C) risposta del modello CPM utilizzato per descrivere l'effetto del pH sulla crescita di Chlorella e Scenedesmus; (D) risposta del modello CTMI utilizzato per descrivere l'effetto della temperatura sulla crescita di Chlorella e Scenedesmus.

Dal confronto delle risposte dei diversi modelli, utilizzati per descrivere l'incidenza di alcune variabili di processo sulla crescita algale, si possono trarre alcune considerazioni d'interesse:

- i. la funzione Haldane utilizzata per descrivere l'effetto della luce (vedi equazione II) fornisce risposte molto differenti per i due ceppi considerati. Tuttavia, questa differenza considerevole nel risultato è dovuta al diverso rateo di crescita massimo ottenuto dalla calibrazione ( $\mu_{max}$ , vedi tabella 24). È interessante notare come dopo circa 30 giorni, in concomitanza con la fase di crescita esponenziale di Chlorella, è marcata la riduzione nei valori assunti dalla funzione a causa dell'effetto ombreggiante. Tale fenomeno si inasprisce, come ci si aspettava, con l'aumento della concentrazione di biomassa in vasca;

- 
2. il modello "Hill", che descrive l'effetto della concentrazione di ossigeno disciolto sulla crescita della biomassa algale (vedi equazione 15), indica che *Chlorella* è più soggetta all'inibizione da ossigeno rispetto che *Scenedesmus*. Tuttavia, la risposta del modello è prossima al valore massimo per l'intera durata e quindi l'impatto sui risultati è ridotto;
  3. Per quanto concerne le risposte fornite dal modello CPM, che indica l'effetto del pH sulla crescita algale (vedi equazione 14), si intuisce come, grazie al controllo del pH, l'andamento della funzione resta sempre in prossimità del valore massimo per entrambi i ceppi;
  4. Il modello CTMI, che descrive l'effetto della temperatura, indica un comportamento simile dell'andamento della crescita per entrambi i ceppi algali. Si verifica che, per i primi 20 giorni di simulazione, la risposta della funzione sia più ridotta rispetto al restante periodo analizzato. Di conseguenza, si riscontra inizialmente una riduzione notevole nello sviluppo della biomassa.

Per riassumere i concetti appena espressi, l'effetto dei ratei di crescita massimi per i due ceppi influisce in maniera significativa sull'andamento della concentrazione della biomassa algale. Tuttavia, l'influenza dei parametri direttamente stimati tramite respirometria, che costituiscono i diversi modelli analizzati, è sicuramente rilevante. La prematura decadenza di *Scenedesmus* deriva sicuramente, oltre che dal basso rateo di crescita, dalla combinazione delle funzioni utilizzate per l'irradianza e per la temperatura.

Infine, è interessante valutare i risultati derivanti dalla simulazione della composizione della biomassa batterica. Il modello è in grado di ricostruire l'andamento nel tempo delle concentrazioni di batteri eterotrofi e nitrificanti (sia NOB, sia AOB). I relativi risultati sono mostrati in figura 21.

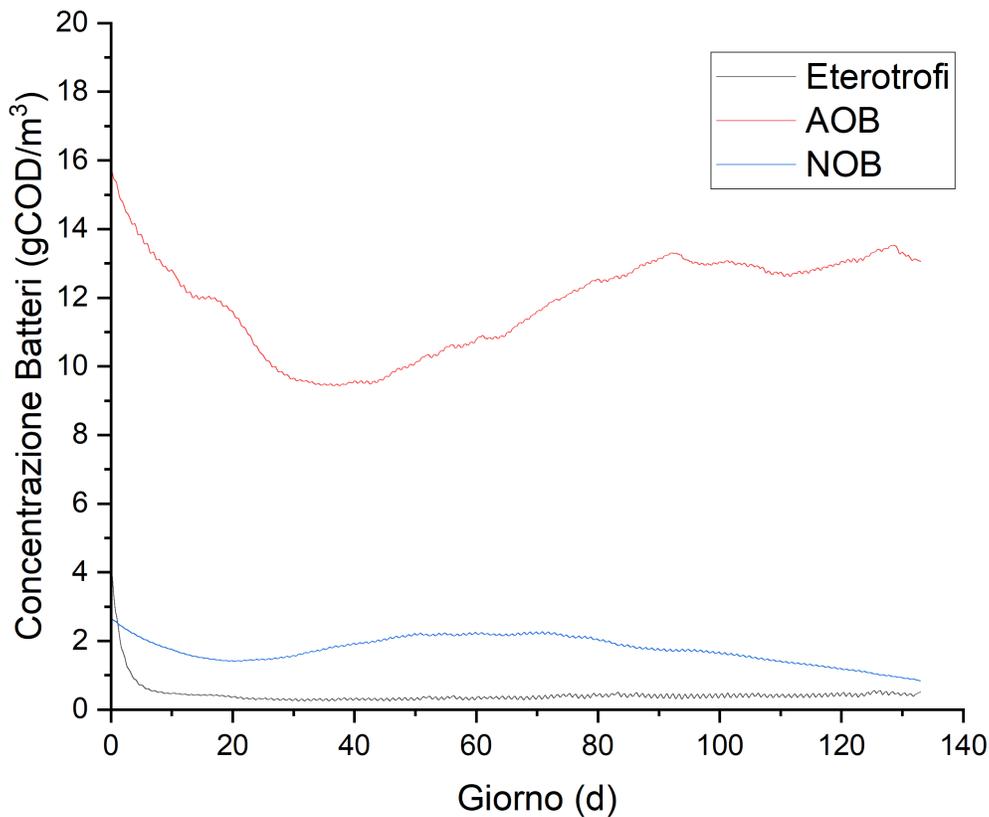


FIG. 21: Andamento delle concentrazioni dei diversi tipi di biomassa batterica, derivante dalla simulazione

La composizione della biomassa batterica durante la simulazione non è soggetta a grosse variazioni. Tuttavia, il risultato della simulazione comporta una grande quantità di AOB iniziale rispetto alle altre due frazioni (eterotrofi e NOB). Purtroppo, non è possibile verificare la bontà di questo risultato data la mancanza di misure specifiche.

### 3.2.3 Analisi di Scenario

Una volta ultimate le operazioni di calibrazione e validazione del modello, è stato possibile procedere con le diverse analisi di scenario previste e descritte nel paragrafo 2.2.4. Come metodo di valutazione dei diversi casi proposti si utilizza la produttività mensile e stagionale della biomassa algale, ottenuta attraverso il sistema di coltivazione. Di conseguenza, è necessario sviluppare, prima di procedere, il

calcolo di tali valori per l'impianto relativi allo scenario base. In figura 22 sono riportati i grafici della produttività mensile e stagionale, per l'impianto pilota, espresse in termini di  $g_{ALG}/m^2/d$ .

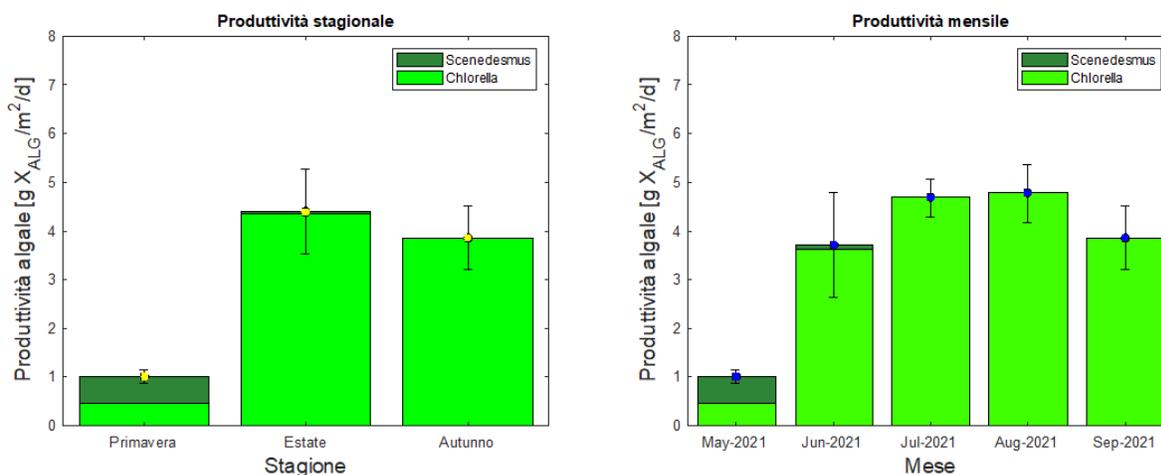
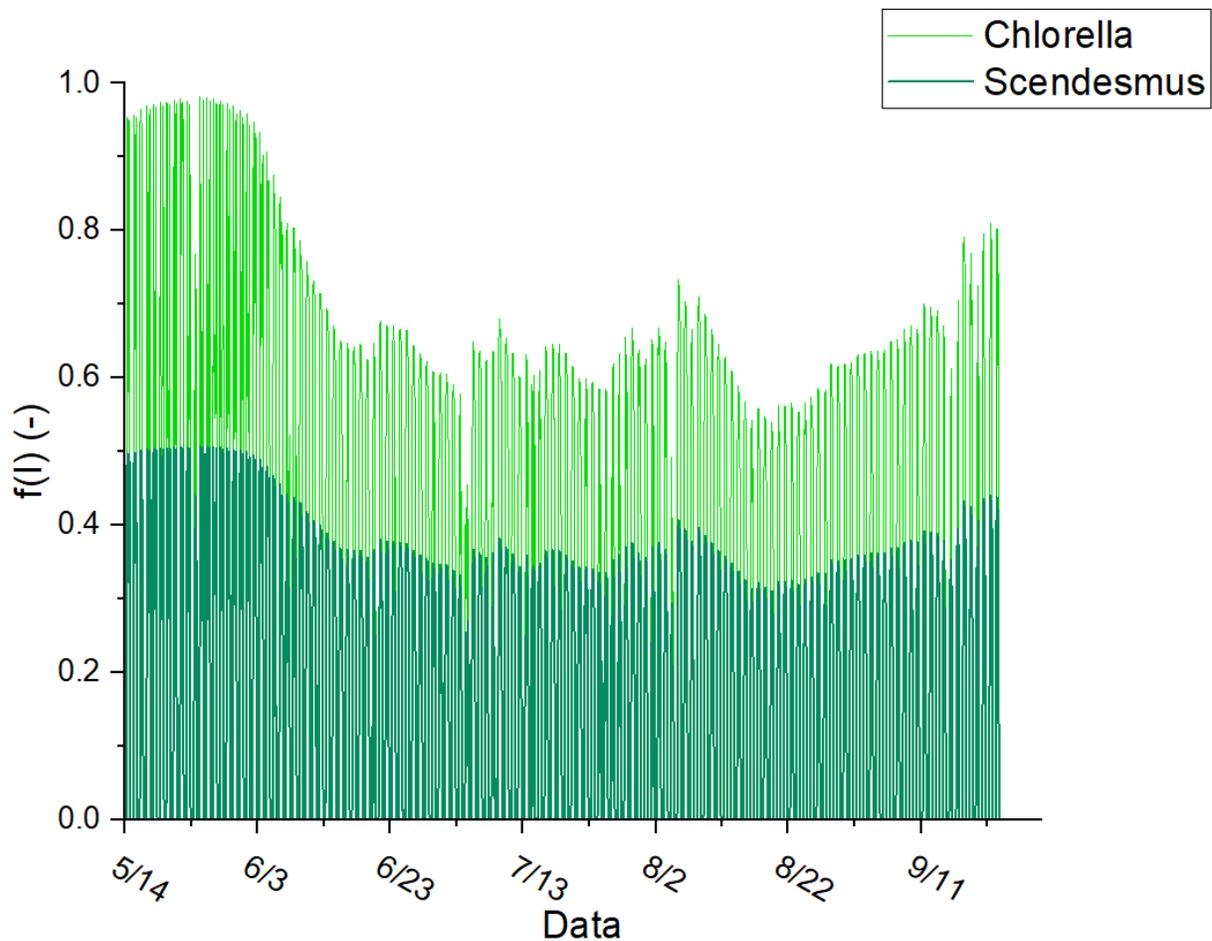


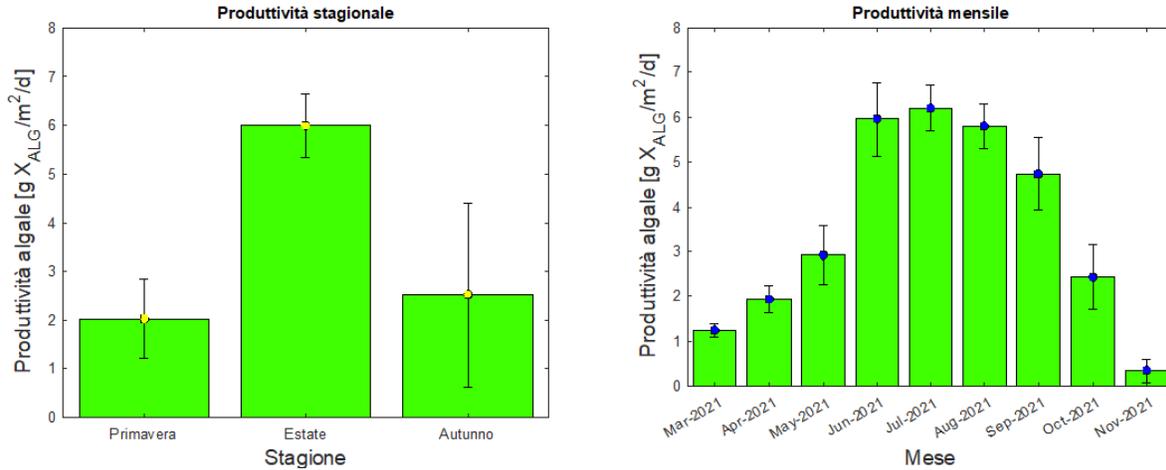
FIG. 22: Istogrammi per la produttività media mensile e stagionale per l'impianto pilota.

I risultati mostrano come il picco di produttività avvenga nei mesi estivi, in particolare fra Luglio e Agosto. Tuttavia, come si poteva verificare anche dalla figura 23, lo sviluppo della biomassa algale è limitato una volta raggiunta la concentrazione di picco. La produttività risulta pressoché costante nei due mesi, individuati in precedenza, per poi decadere a Settembre. La motivazione principale, che provoca tale limitazione nella crescita, è l'effetto ombra dato dalla presenza della biomassa stessa. Se consideriamo che tale fenomeno si inasprisce con l'aumento della concentrazione, è normale raggiungere una situazione di equilibrio che comporta la stazionarietà della produzione. Dal grafico relativo all'irradianza, riportato in figura 20, si evince che la risposta del modello Haldane decresce sensibilmente nel periodo di massima concentrazione algale in vasca. Si può supporre che questa limitazione non si verifichi solo per il caso base, ma possa estendersi anche nei diversi scenari da analizzare. Un altro aspetto rilevante è la scarsa produttività rilevata nel periodo iniziale di maggio. Tale risultato è causato principalmente dal decadimento repentino di Scenedesmus e dalla bassa concentrazione iniziale di Chlorella. Inoltre, la fase di crescita esponenziale di quest'ultimo ceppo, come si evince dalla figura 18, si verifica dopo 15-20 giorni dall'inizio delle operazioni, con il mese di maggio già passato (inizio operazioni 14/05/2021).



**FIG. 23:** Risposta della funzione Haldane utilizzata per descrivere l'effetto dell'irradianza sulla crescita di Chlorella e Scenedesmus.

Come illustrato nel paragrafo 2.2.4, i primi due scenari oggetto di studio sono quelli che prevedono la coltivazione, tramite il sistema modellato, di un singolo ceppo di microalga, scelto fra Chlorella o Scenedesmus. In contemporanea, una volta selezionato il ceppo da sviluppare, l'altro è introdotto nel sistema in quantità ridotte e costanti nel tempo al fine di simulare l'effetto di una potenziale contaminazione. Come primo passaggio, è necessario calcolare la produttività del sistema in assenza di concentrazione algale influente, al fine di determinare quest'ultima variabile. In figura 24 sono mostrati i risultati di tale valutazione effettuata per lo scenario che comporta la maggior produttività in queste condizioni, ovvero la coltivazione di solo Chlorella.



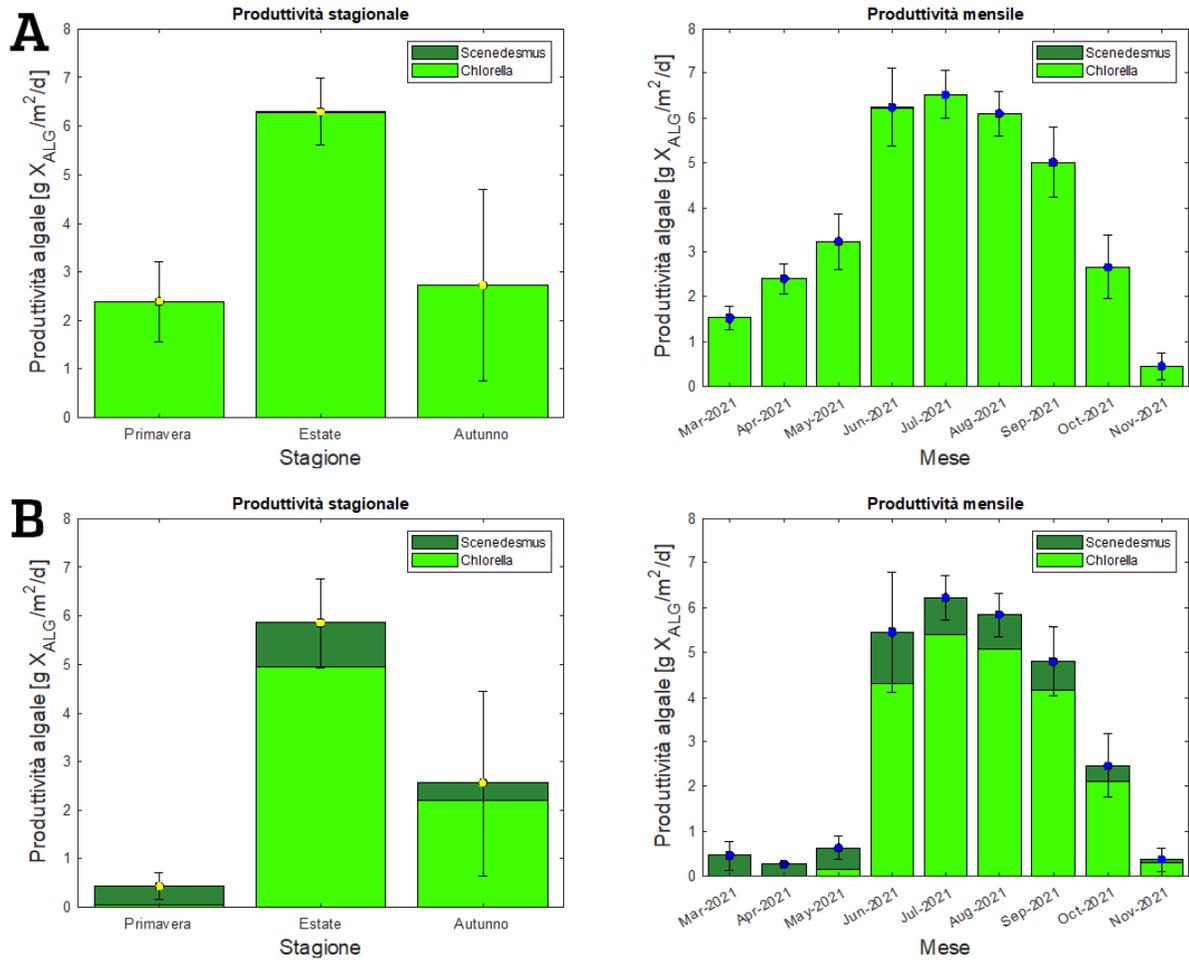
**FIG. 24:** Istogrammi della produttività media mensile e stagionale per lo scenario di coltivazione di solo *Chlorella* e in assenza di concentrazione di biomassa algale nell'influente.

Da tali valori di produttività, si calcola la concentrazione di biomassa algale da introdurre per ogni mese di simulazione. In tabella 26 sono mostrati i risultati di tale operazione. Si specifica che i valori calcolati sono utilizzati, per semplicità, sia per il caso di coltivazione di solo *Chlorella*, sia per il caso di coltivazione di solo *Scenedesmus*.

**TAB. 26:** Risultato del calcolo della concentrazione influente di biomassa algale per lo scenario di coltivazione di un singolo ceppo. Le concentrazioni individuate corrispondono al 10% della biomassa prodotta nel mese di riferimento.

Mese	Mar.	Apr.	Mag.	Giu.	Lug.	Ago.	Set.	Ott.	Nov.
$P_{ALG} [g_{ALG}/m^2/d]$	1.26	1.93	2.91	5.96	6.20	5.80	4.74	2.43	0.34
$X_{ALG,inf} [g_{ALG}/m^3]$	5.05	7.74	11.7	24.0	24.9	23.3	19.0	9.77	1.35

Come illustrato nel paragrafo 2.2.4, si impone che la concentrazione iniziale di biomassa algale sia composta interamente dal ceppo coltivato. La concentrazione influente, appena calcolata, è invece costituita per il 99% dal ceppo sviluppato e per l'1% dalla microalga contaminante. Il resto delle condizioni iniziali e dell'influente sono rimaste invariate per questi due scenari, rispetto al caso base. I risultati relativi alla produttività per gli scenari analizzati sono illustrati in figura 25.

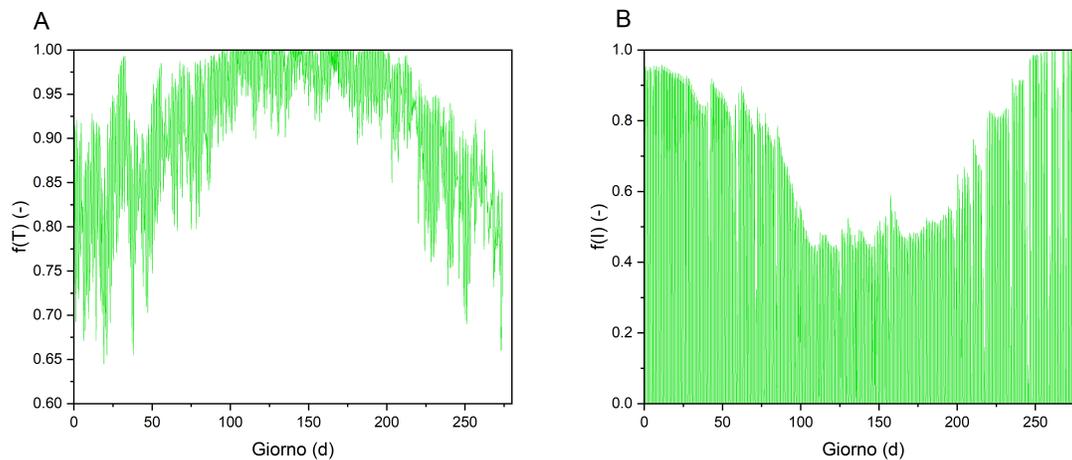


**FIG. 25:** Istogrammi della produttività media mensile e stagionale per gli scenari di coltivazione di un singolo ceppo. (A) coltivazione di solo Chlorella con Scenedesmus contaminante; (B) coltivazione di solo Scenedesmus con Chlorella contaminante

I risultati ottenuti di produttività mensile e stagionale, per questi due scenari analizzati, consentono di trarre alcune conclusioni e spunti d'interesse:

1. Per il caso di coltivazione di solo Chlorella non vi è alcun effetto risultante dalla contaminazione da Scenedesmus. Si può affermare che quest'ultimo ceppo, per il sistema modellato e per le condizioni dello scenario, non è in grado di svilupparsi da una possibile contaminazione. Per quanto riguarda la produttività, l'apporto dell'influente consente di migliorare notevolmente il rendimento del sistema di coltivazione modellato rispetto al caso base. In particolare, la produttività massima, che si riscontra nei mesi estivi, è aumentata di circa  $1.5 \text{ g}/\text{m}^2/\text{d}$ . Tuttavia, si verifica per questo scenario, come per il caso base, una condizione di produttività ridotta per i

mesi primaverili che si protrae fino al mese di maggio. Anche durante la stagione autunnale si verifica un brusco calo della produttività. Per comprendere meglio le motivazioni che portano ad ottenere tali risultati, è opportuno svolgere, come per il caso base, un'analisi sulle funzioni che descrivono la crescita della biomassa algale. In figura 26 sono riportati i grafici delle funzioni che descrivono l'effetto dell'irradianza e della temperatura sullo sviluppo di *Chlorella*.



**Fig. 26:** (A) risposta del modello CTMI utilizzato per descrivere l'effetto della temperatura per lo scenario di coltivazione di *Chlorella*; (B) risposta della funzione Haldane utilizzata per descrivere l'effetto della luce per lo scenario di coltivazione di *Chlorella*.

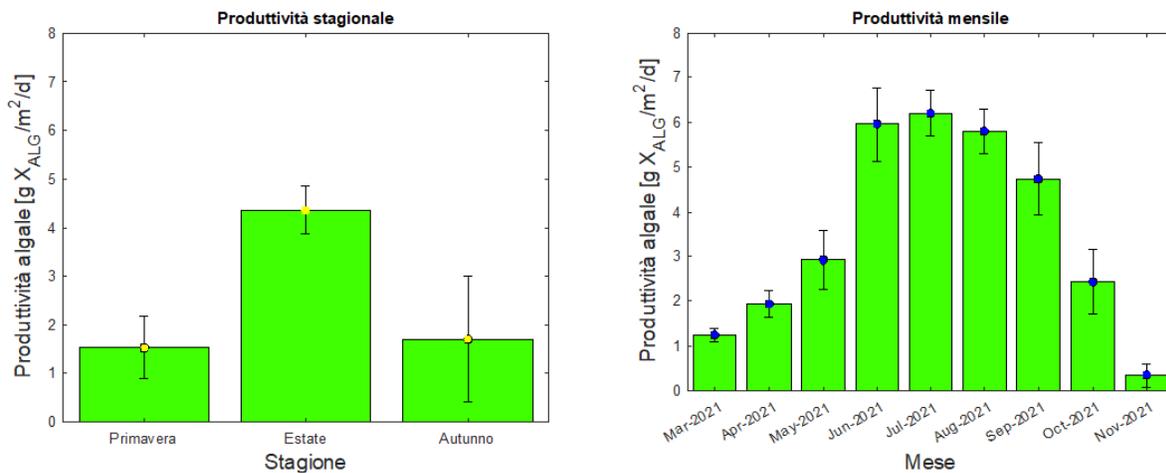
Dai risultati riportati in figura 26, si evince come la decaduta della produttività in primavera e autunno è dovuta principalmente alle basse temperature d'esercizio. D'altro canto, nei mesi estivi si verifica una forte inibizione data dalla presenza ad alte concentrazioni della biomassa che riduce l'irradianza ricevuta. Tale condizione giustifica la produttività costante in questo periodo. Alla luce di queste considerazioni, si può affermare che l'andamento della produttività e le motivazioni che portano a tali risultati per questo scenario non differiscono dal caso base.

2. per lo scenario di coltivazione di *Scenedesmus* si osserva, nel mese di giugno, l'insorgere di una popolazione di *Chlorella* derivante dalla contaminazione. Nei mesi successivi, luglio, agosto e settembre, vi è una importante produzione di quest'ultimo ceppo, tale da superare quella di *Scenedesmus*. La produttività complessiva di biomassa algale risulta ridotta, particolarmente nei mesi primaverili, rispetto al caso base e allo scenario di coltivazione di solo *Chlorella*. Tale risultato è da ricondurre allo scarso accrescimento di *Scenedesmus*. In maniera analoga a quanto

visto per i casi precedenti, la produttività rimane pressoché costante nei mesi estivi per poi ridursi significativamente con l'arrivo dell'autunno. È possibile assumere che le cause di tali fenomeni siano sempre legate all'effetto ombra, che riduce l'irradianza incidente ricevuta dalla biomassa, e alla scarsa temperatura della sospensione in primavera e in autunno. È interessante considerare che l'apporto di biomassa algale nell'influente consente, a differenza del caso base, di sviluppare una popolazione di *Scenedesmus* che perdura per l'intero periodo considerato dalla simulazione.

Alla luce di questi risultati si può affermare che la coltivazione di *Scenedesmus* è di difficile realizzazione. D'altro canto, *Chlorella* è il ceppo che meglio si adatta al sistema modellato, ottenendo buone produzioni. *Chlorella* risulta quindi il ceppo più competitivo in entrambi gli scenari proposti.

Per concludere la trattazione sulle diverse analisi di scenario svolte, si prosegue a illustrare i risultati ottenuti dalle simulazioni utilizzando come mezzo di coltivazione la frazione liquida di un digestato di origine agricola. L'obiettivo è applicare questa condizione ai due scenari appena descritti e verificare possibili variazioni date dalle diverse mezzo di coltivazione. Il primo passaggio è quello di valutare la produzione mensile e stagionale per il ceppo a più alta resa, ovvero *Chlorella*, in assenza di biomassa algale nell'influente. Il risultato di tale operazione è mostrato in figura 27



**FIG. 27:** Istogrammi della produttività media mensile e stagionale per lo scenario di coltivazione di solo *Chlorella*, in assenza di concentrazione di biomassa algale nell'influente e con l'utilizzo di digestato di origine agricola.

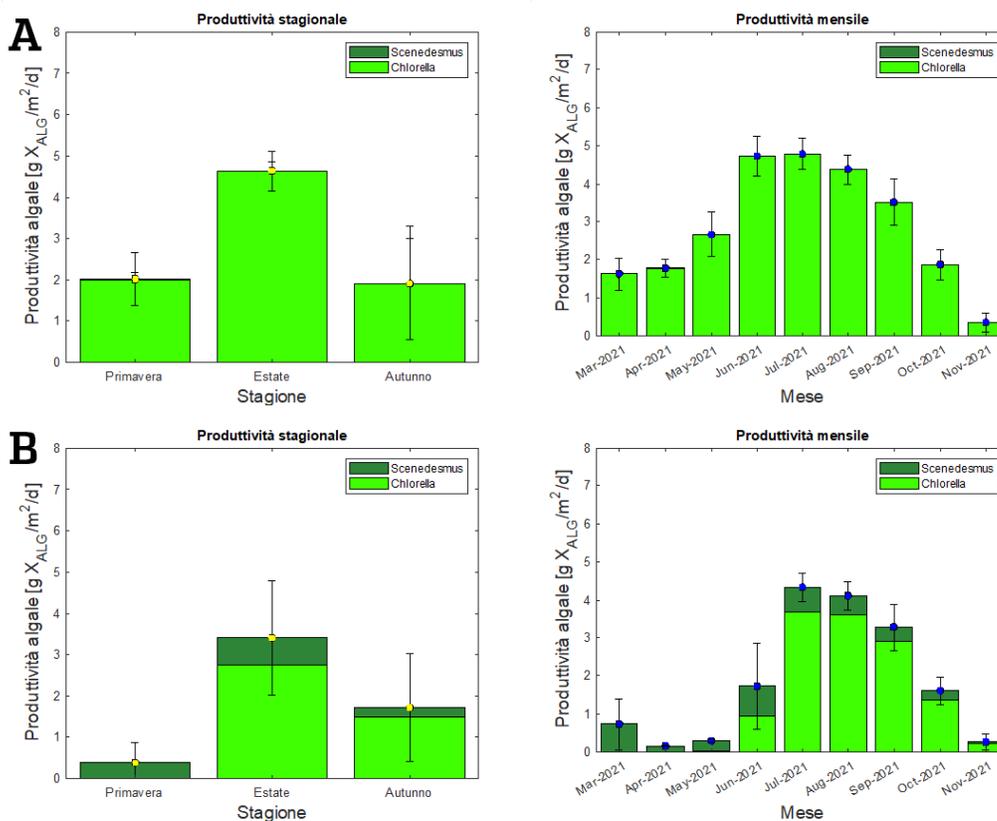
Dalle informazioni di produttività mensile, si calcola la concentrazione complessiva di biomassa algale da apportare nell'influente. I risultati di tale calcolo sono riportati in tabella 27. Si specifica che i

valori di concentrazione ottenuti sono stati utilizzati, per ragioni di semplicità, sia per lo scenario di coltivazione di *Scenedesmus*, sia per lo scenario di coltivazione di *Chlorella*.

**Tab. 27:** Risultato del calcolo della concentrazione influente di biomassa algale per lo scenario di coltivazione di un singolo ceppo con l'impiego di digestato di origine agricola. Le concentrazioni individuate corrispondono al 10% della biomassa prodotta nel mese di riferimento.

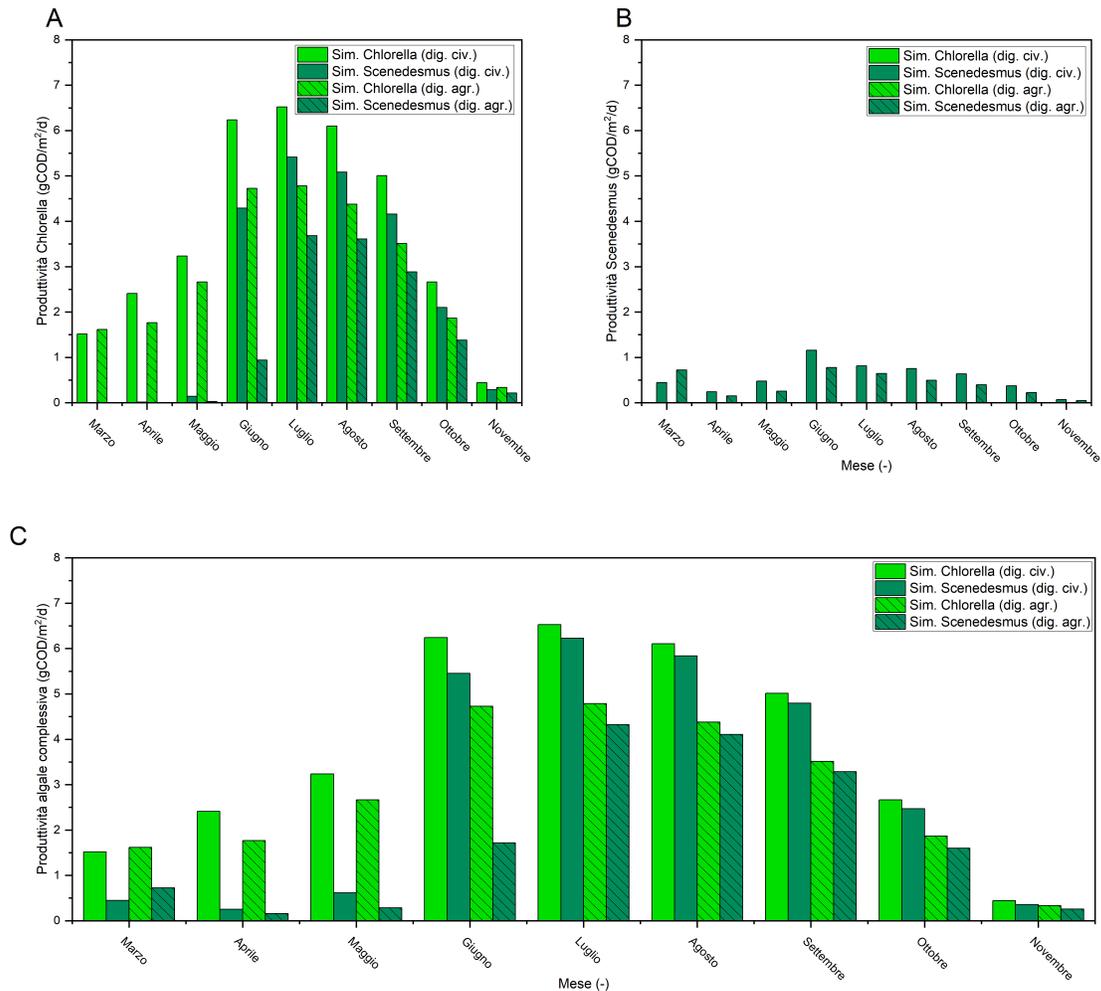
Mese	Mar.	Apr.	Mag.	Giu.	Lug.	Ago.	Set.	Ott.	Nov.
$P_{ALG} [g_{ALG}/m^2/d]$	1.39	1.11	2.07	4.47	4.51	4.11	3.26	1.59	0.24
$X_{ALG,inf} [g_{ALG}/m^3]$	5.60	4.48	8.31	17.9	18.1	16.5	13.1	6.38	0.98

Dopo aver completato le informazioni richieste per caratterizzare i due scenari in analisi, è possibile sviluppare le simulazioni e valutarne la produttività. Si specifica che si indaga, come per i casi precedenti, l'effetto di una potenziale contaminazione durante il processo di coltivazione. In figura 28 sono riportate le produttività mensili e stagionali per la coltivazione di *Chlorella* e *Scenedesmus* con l'utilizzo di digestato di origine agricola.



**Fig. 28:** Istogrammi della produttività media mensile e stagionale per gli scenari di coltivazione di un singolo ceppo con digestato agricolo come mezzo di crescita. (A) coltivazione di solo *Chlorella* con *Scenedesmus* contaminante; (B) coltivazione di solo *Scenedesmus* con *Chlorella* contaminante

Si elaborarono le informazioni ottenute dal calcolo della produttività, per gli scenari di coltivazione con digestato agricolo, al fine di attuare un confronto con gli scenari precedentemente analizzati. Tale elaborazione è proposta in figura 29.



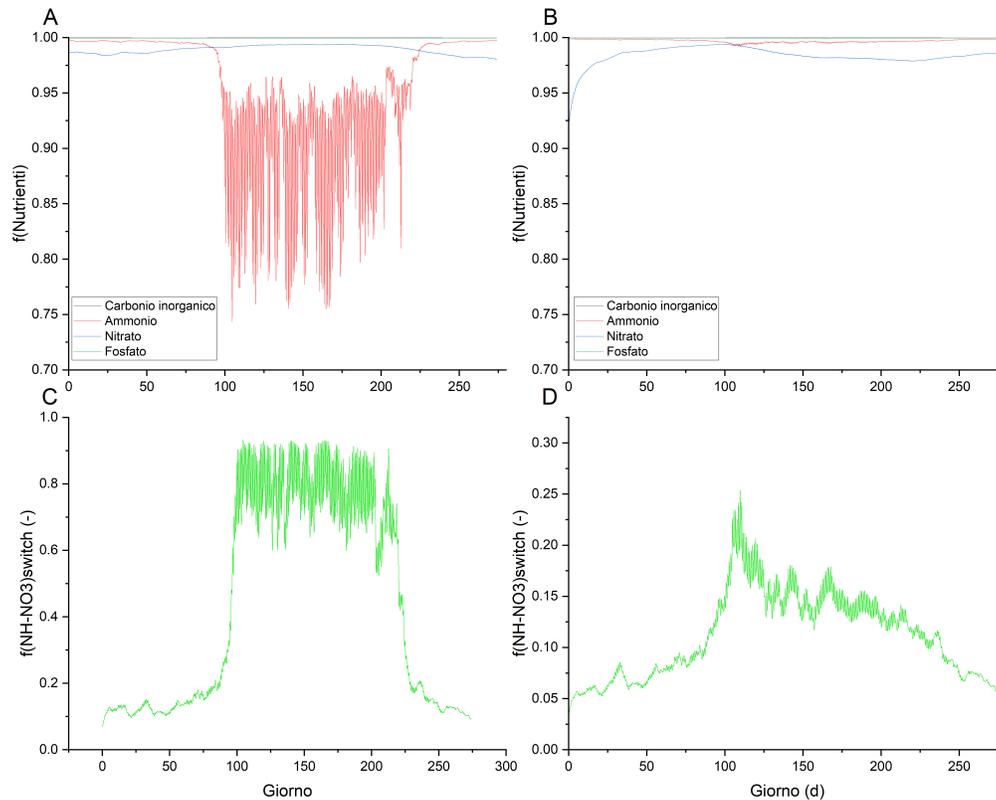
**Fig. 29:** Confronto delle produttività di Chlorella (A), di Scenedesmus (B) e complessiva (C) per quattro scenari proposti: coltivazione con digestato civile di Chlorella e contaminazione di Scenedesmus (verde chiaro), coltivazione con digestato civile di Scenedesmus e contaminazione di Chlorella (verde scuro), coltivazione con digestato agricolo di Chlorella e contaminazione di Scenedesmus (verde chiaro e riempimento a righe), coltivazione con digestato agricolo di Scenedesmus e contaminazione di Chlorella (verde scuro e riempimento a righe)

Dai risultati ottenuti per questi due scenari, che prevedono l'uso di digestato agricolo, e dal confronto con i casi precedentemente analizzati (coltivazione con digestato civile), si possono trarre alcune conclusioni interessanti:

---

i. per il caso di coltivazione di sola *Chlorella*, anche con l'utilizzo di un mezzo di crescita differente, non si verifica sviluppo di una popolazione di *Scenedesmus* derivante dalla contaminazione. La produttività risulta leggermente inferiore durante l'intero arco della simulazione, rispetto al caso che prevede l'utilizzo di digestato civile, come si evince dai grafici riportati in figura 29 (0.9  $gCOD/m^2/d$  di differenza fra i valori medi della produttività complessiva per i due scenari di coltivazione di *Chlorella* con medium differente). In particolare, per i mesi di aprile e maggio, si verifica un periodo di flessione della produzione di biomassa, non verificato nei casi precedenti che prevedono l'utilizzo di digestato civile. Tale decrescita è il risultato del crollo della popolazione algale inizialmente introdotta nel sistema. Le cause di tale fenomeno sono riconducibili alla scarsa temperatura della sospensione, come si è potuto verificare per i casi precedenti. La produttività primaverile risente necessariamente di questo calo in maniera considerevole. Si può affermare che, sebbene sia possibile con il sistema adottato coltivare *Chlorella*, l'impiego del digestato civile comporta migliori prestazioni. Quest'ultimo risultato necessita, tuttavia, un maggior approfondimento per rivelare le motivazioni che conducono ai risultati ottenuti. Di conseguenza è stato svolto un confronto ulteriore fra lo scenario con digestato civile e lo scenario con digestato agricolo per la coltivazione di *Chlorella*. In particolare, si è verificato che, secondo i risultati forniti dal modello, l'utilizzo del digestato d'origine civile comporta una concentrazione sufficientemente bassa d'ammonio tale da attivare il metabolismo secondario che sfrutta nitrato come fonte d'azoto. Tuttavia, la quantità disponibile di ammonio consente comunque lo sviluppo del metabolismo principale ed energeticamente più vantaggioso. Per queste particolari condizioni, che non si verificano nello scenario che prevede l'utilizzo di digestato agricolo, è chiaro come la produttività risenta positivamente dalla convivenza di due meccanismi di accrescimento. Dalla figura 30 si evince come la funzione che descrive l'effetto dell'ammonio sulla crescita di *Chlorella* assuma un valore inferiore nel caso di utilizzo di digestato civile (grafico A e B, figura 30). Inoltre per quest'ultimo scenario, la funzione che indica la limitazione per la crescita su  $NO_3$  ( $f(NH_3 - NO_3)_{switch}$ ) (grafico C e D, figura 30), dovuta alla presenza di substrato favorito come ammonio, assume valori molto elevati. Di conseguenza, il modello ritiene attivo il metabolismo secondario con l'utilizzo di nitrato come substrato. Infine, sempre dalla figura 30, si evince come la disponibilità di fosfato e di carbonio inorganico sia ampiamente

sufficiente per lo sviluppo della biomassa algale.



**Fig. 30:** (A) Riassunto della risposta delle diverse funzioni utilizzate per descrivere l'effetto dei nutrienti sulla crescita di *Chlorella* per lo scenario che prevede l'utilizzo di digestato civile (B) Riassunto della risposta delle diverse funzioni utilizzate per descrivere l'effetto dei nutrienti sulla crescita di *Chlorella* per lo scenario che prevede l'utilizzo di digestato agricolo. (C) Risposta della funzione che indica la limitazione per la crescita su  $NO_3$  per lo scenario che prevede l'utilizzo di digestato civile. (D) Risposta della funzione che indica la limitazione per la crescita su  $NO_3$  per lo scenario che prevede l'utilizzo di digestato agricolo.

2. Per quanto concerne lo scenario di coltivazione di *Scenedesmus*, si verifica lo sviluppo di *Chlorella* derivante dalla contaminazione simulata. La produttività complessiva risulta particolarmente ridotta, soprattutto nel mese di giugno, se confrontata con il caso che prevede l'utilizzo di digestato civile. Tale differenza è riconducibile sempre allo sviluppo del meccanismo di crescita su nitrato, che non si verifica con digestato agricolo. È importante evidenziare come *Chlorella* sia il ceppo che più è interessato da questo calo della produttività. *Scenedesmus*, d'altro canto, mantiene livelli di produttività mensile comparabili con lo scenario precedente. Il motivo principale di

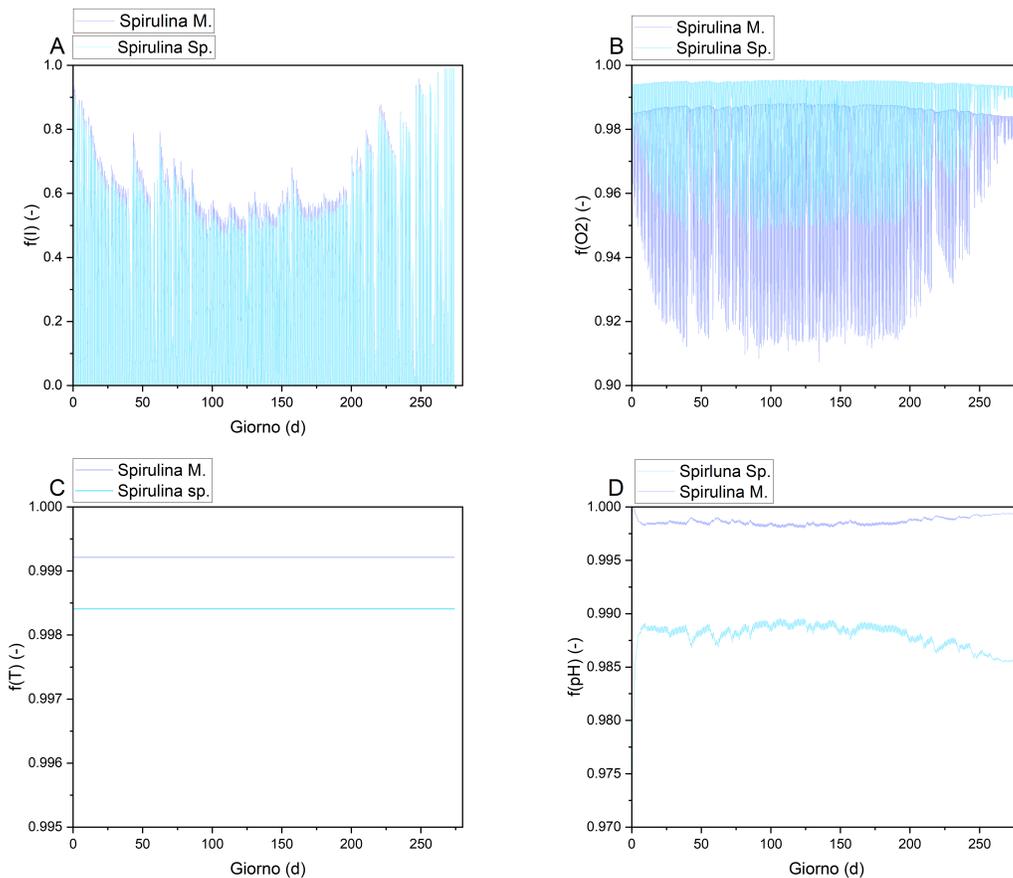
---

tale risultato è che, come analizzato nel paragrafo precedente (3.2.2), la crescita di *Scenedesmus* è limitata maggiormente da altri fattori. Di conseguenza, si può affermare che lo sviluppo di tale ceppo nel sistema modellato è di difficile realizzazione, ma non risente dell'utilizzo di un mezzo di crescita differente come il digestato agricolo.

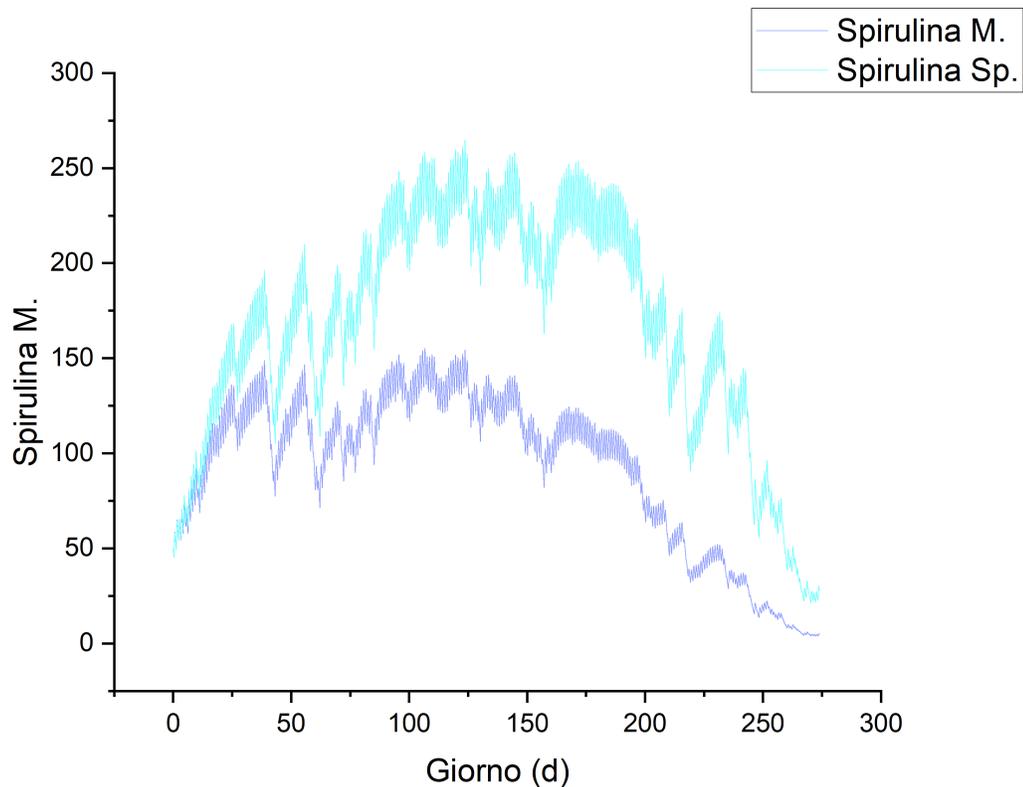
In conclusione, l'utilizzo di digestato derivato da attività agricole non sembra comportare svantaggi o vantaggi troppo evidenti per il sistema modellato. Soprattutto se l'obiettivo primario della coltivazione rimanesse, come per l'impianto pilota, quello di depurare il mezzo di crescita.

### 3.3 Modello: coltivazione di Spirulina

Si procede a illustrare i risultati ottenuti dall'implementazione del modello ALBA, utilizzato per descrivere un sistema di coltivazione aperto per lo sviluppo di due differenti ceppi di Spirulina. Come descritto nel paragrafo dedicato 2.2.3, sono definite le caratteristiche dell'influente, le condizioni iniziali e le restanti informazioni sul processo. L'obiettivo è quello di valutare, tramite simulazione, la differenze che decorrono fra "*Spirulina Sp.*" e "*Spirulina Maxima*", in termini di produttività. I risultati della simulazione, utili per effettuare il confronto fra i due diversi ceppi, sono riportati in figura 31 e 32.



**FIG. 31:** (A) risposta della funzione Haldane utilizzata per descrivere l'effetto della luce sulla crescita di "*Spirulina Sp.*" e di "*Spirulina M.*";(B) risposta del modello Hill utilizzato per descrivere l'effetto inibente dell'ossigeno sulla crescita di "*Spirulina M.*" e "*Spirulina Sp.*";(C) risposta del modello CTMI, utilizzato per descrivere l'effetto della temperatura sulla crescita di "*Spirulina Sp.*" e "*Spirulina M.*";(D) risposta del modello CPM, utilizzato per descrivere l'effetto del pH sulla crescita di "*Spirulina Sp.*" e "*Spirulina M.*".



**FIG. 32:** Andamento della concentrazione della biomassa algale sia per "*Spirulina Sp.*" che per "*Spirulina M.*".

In base alle condizioni prefissate inizialmente, risulta possibile coltivare entrambi i ceppi di cianobatteri in consorzio. Tuttavia, "*Spirulina Sp.*" raggiunge concentrazioni maggiori rispetto a "*Spirulina M.*" e costituisce la frazione maggiore della biomassa algale (vedi grafico in figura 32). Considerando che le costanti cinetiche caratteristiche del metabolismo e che la composizione della biomassa sono comuni ad per entrambi i ceppi (dati ripresi dalla caratterizzazione dell'ALBA iniziale [76]), questa differenza nello sviluppo è il risultato del diverso comportamento dei due ceppi verificato per le variabili studiate tramite respirometria. Dai grafici mostrati in figura 31, si evince come per la temperatura, per l'irradianza e per il pH, l'effetto sulla crescita sia del tutto comparabile fra i due ceppi. Tuttavia, "*Spirulina M.*" subisce in maniera più marcata l'inibizione derivante dalla presenza di ossigeno disciolto ad alte concentrazioni. Si può affermare che quest'ultima condizione sia la causa dei risultati ottenuti in merito al frazionamento della concentrazione di biomassa algale.

### 3.3.1 Analisi di scenario

Dai risultati ottenuti dalla simulazione del caso iniziale, si è stabilito che le differenze fra i due ceppi coltivati, seppur marginali, provocano effetti sensibili nei risultati. È facile intuire come il sistema modellato sia molto suscettibile a variazioni delle condizioni d'esercizio. Di conseguenza, si è deciso di valutare l'effetto sulla produttività del sistema scaturito dalla modifica di alcune variabili di processo fondamentali. Come illustrato nel paragrafo 2.2.5, i parametri analizzati sono il tempo di residenza idraulica della sospensione nel raceway (HRT), il coefficiente di trasferimento di massa per l'ossigeno ( $k_{La}$ ) e la temperatura controllata. Oltre a verificare potenziali scostamenti rispetto al caso base per quanto concerne la composizione della biomassa, si vuole indagare la possibilità di ottimizzare il processo. Il confronto fra i diversi scenari è effettuato attraverso la produttività mensile e stagionale. Tali valori sono calcolati inizialmente per il caso base e riportati in figura 33.

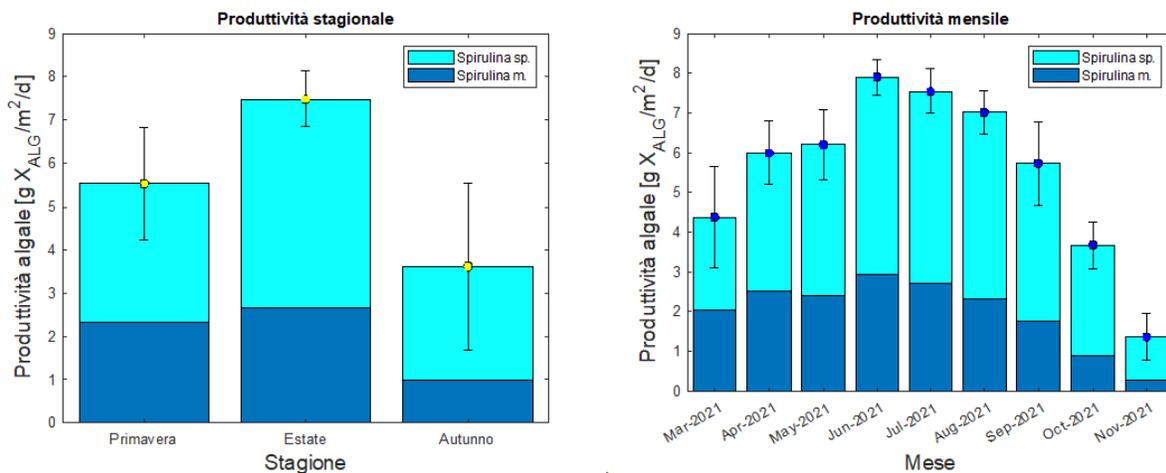


Fig. 33: Produttività stagionale e mensile per la simulazione iniziale (HRT = 7d;  $k_{La} = 43.5$  1/d; T = 35 °C).

Sebbene il pH e la temperatura siano controllate, nei mesi autunnali la decrescita della biomassa è rilevante. Tale fenomeno si verifica per la riduzione dell'irradianza ricevuta durante questo periodo. Con un valore medio d'irradianza incidente in autunno pari a  $191 \mu E/m^2/h$  mentre, per i mesi primaverili ed estivi, la media risulta  $481 \mu E/m^2/h$ . Tale risultato è giustificato se si considera la riduzione del numero di ore di luce a disposizione nella stagione autunnale. Si può affermare che nel mese di novembre non è conveniente, anche con controllo della temperatura, coltivare i ceppi algali selezionati.

Il primo parametro, valutato nell'analisi di scenario, è la temperatura d'esercizio. Dato che la temperatura ottimale è definita per entrambi i ceppi tramite respirometria, si è deciso di valutare tale parametro all'interno dell'intervallo testato (vedi tabella 12). L'obiettivo è quello di verificare possibili modifiche della composizione della biomassa algale o della produttività. Inoltre, è interessante valutare la possibilità di ridurre la temperatura di controllo con il fine di risparmiare energia. I risultati relativi alla produttività mensile e stagionale delle simulazioni svolte variando la temperatura sono riassunti nelle figure 34, 35, 36 e 37. In figura 38 è riportato il confronto fra le produttività mensili simulate per le diverse temperature analizzate.

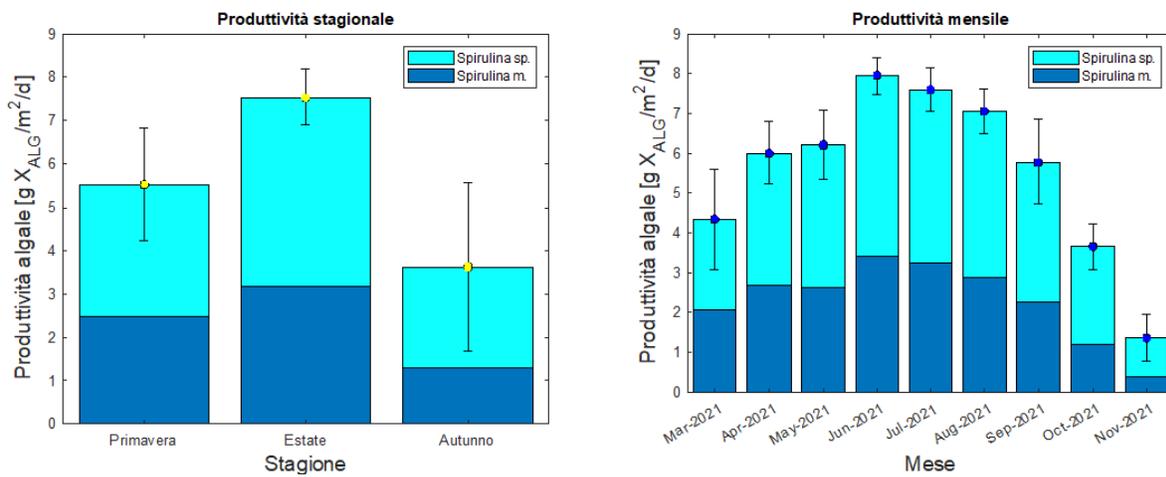


FIG. 34: Produttività stagionale e mensile per la simulazione a temperatura variata ( $T = 33\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

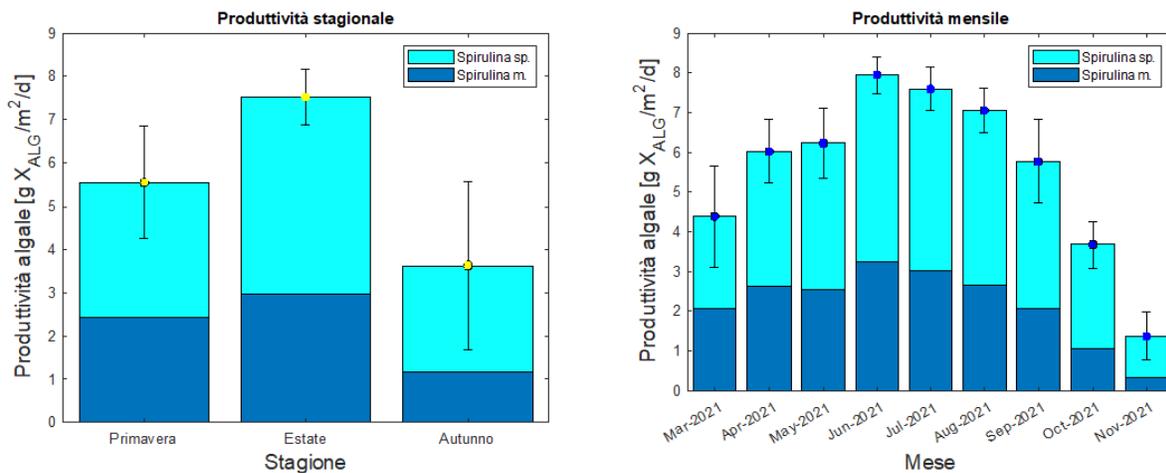


FIG. 35: Produttività stagionale e mensile per la simulazione a temperatura variata ( $T = 34\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

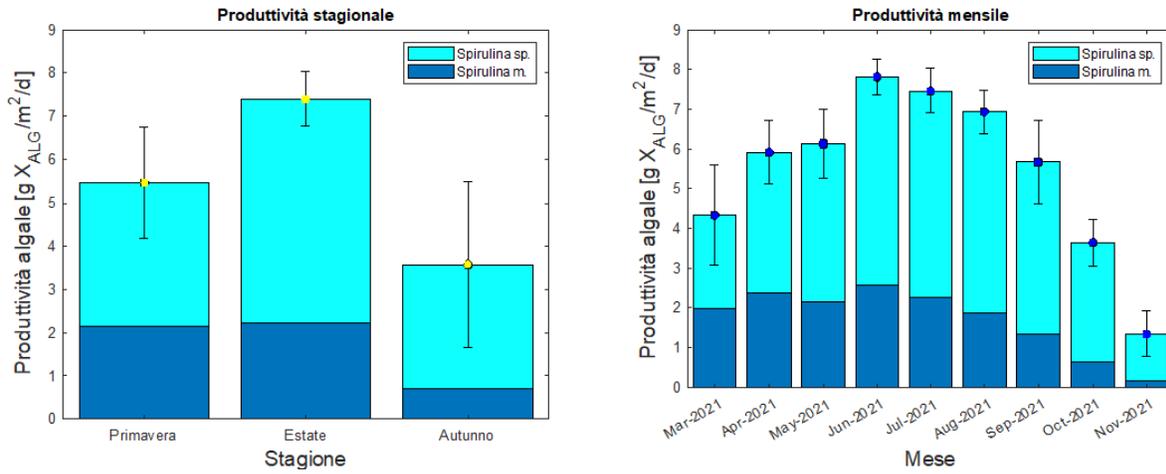


FIG. 36: Produttività stagionale e mensile per la simulazione a temperatura variata (T = 36 °C).

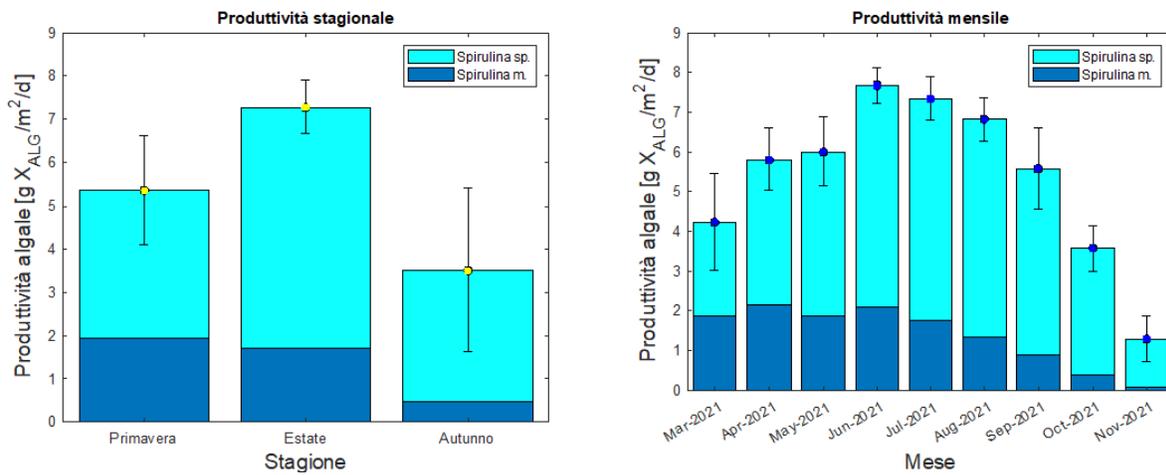
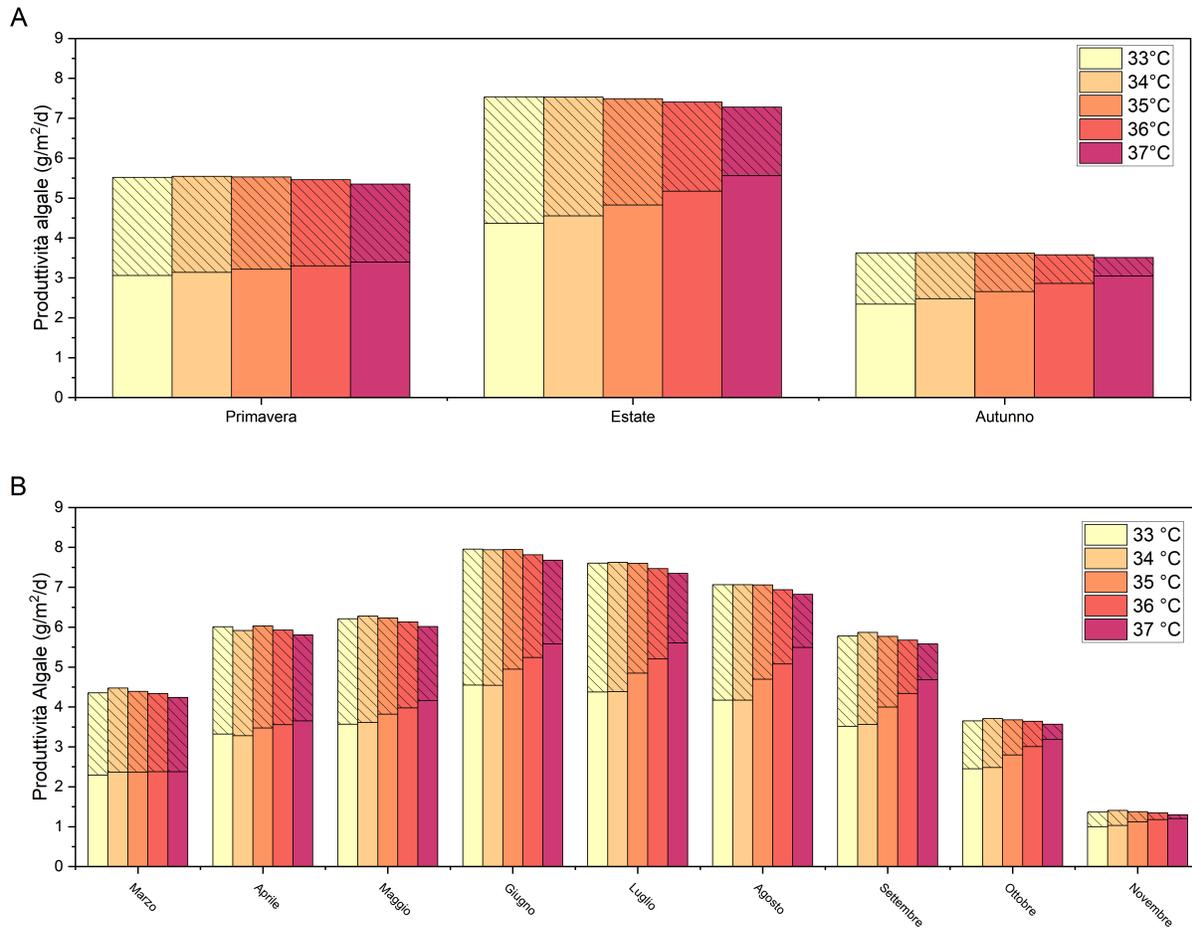


FIG. 37: Produttività stagionale e mensile per la simulazione a temperatura variata (T = 37 °C).



**Fig. 38:** (A)produttività complessiva stagionale della biomassa algale calcolata per diversi valori di temperatura; (B) produttività complessiva mensile per il ceppo calcolata per diversi valori di temperatura. Si specifica che in entrambi i grafici è indicato il frazionamento della biomassa: le zone a riempimento tratteggiate rappresentano la produttività di "*Spirulina m.*" mentre le zone senza riempimento rappresentano la produttività di solo "*Spirulina Sp.*"

Dai grafici proposti in figura 38 si evince come le differenze nella produttività complessiva della biomassa algale siano minime al variare della temperatura d'esercizio. Tuttavia, la composizione di tale biomassa risulta profondamente modificata durante le diverse simulazioni. Per temperature più elevate si verifica un aumento di sviluppo di "*Spirulina Sp.*" mentre, per temperature più basse, si nota un incremento nella produzione di "*Spirulina M.*". Considerando questi aspetti appena descritti, se non ci fosse interesse nel coltivare prevalentemente un ceppo fra i due, è possibile ridurre la temperatura d'esercizio con l'obiettivo di risparmiare energia, senza inficiare la produttività complessiva del sistema.

La seconda serie di valori, per la quale sono state svolte delle simulazioni, interessano il tempo di ritenzione idraulico del sistema (HRT). Tale parametro influenza notevolmente la cinetica di sistema e anche piccole variazioni possono produrre effetti notevoli. L'obiettivo è quello di valutare le condizioni d'esercizio migliori affinché sia massima la produttività nel sistema modellato. I risultati relativi alla produttività mensile e stagionale delle simulazioni svolte variando l'HRT sono riassunti nelle figure 39, 40, 41 e 42. In figura 43 è riportato il confronto fra le produttività mensili simulate per le diversi valori di HRT analizzati.

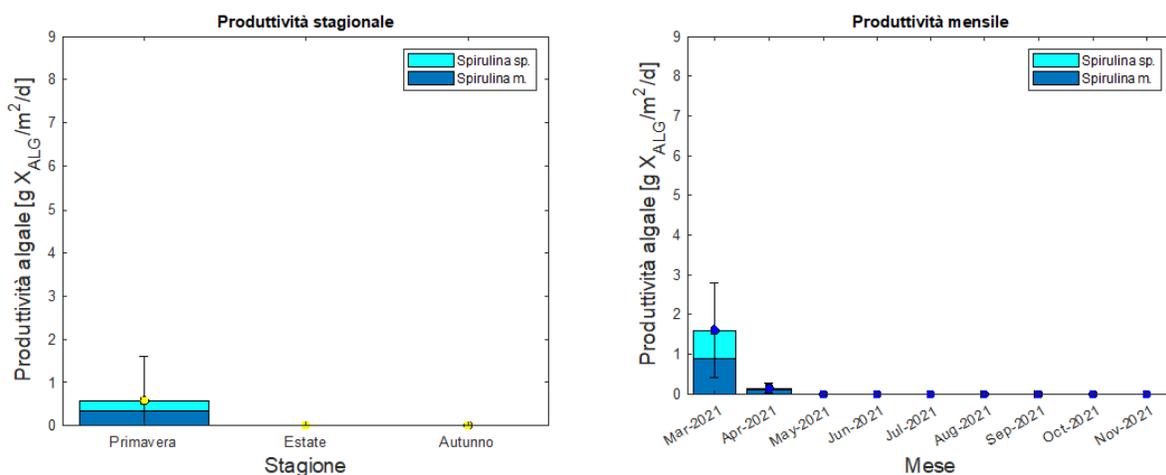


FIG. 39: Produttività stagionale e mensile per la simulazione a HRT variato (HRT = 3 d).

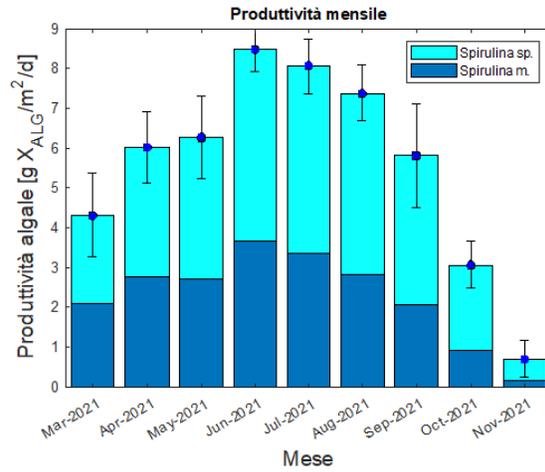
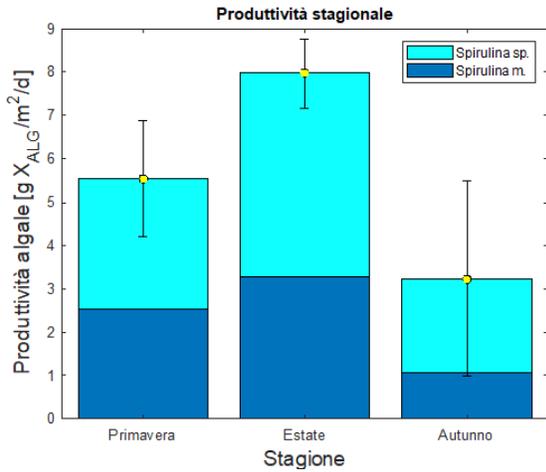


FIG. 40: Produttività stagionale e mensile per la simulazione a HRT variato (HRT = 5 d).

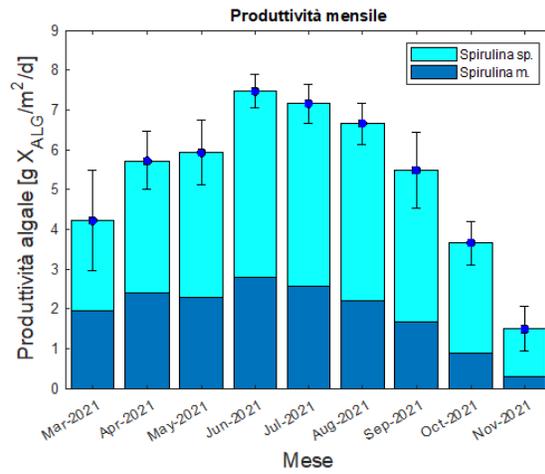
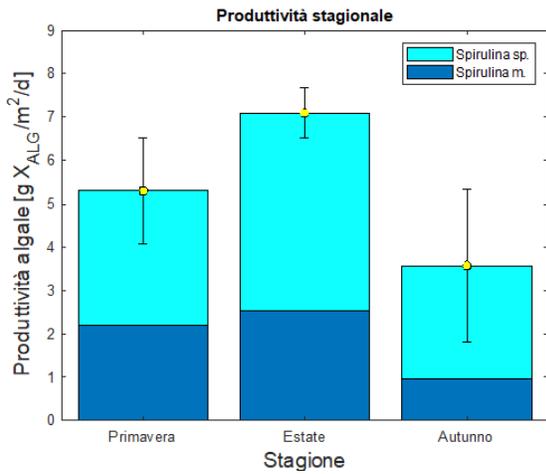


FIG. 41: Produttività stagionale e mensile per la simulazione a HRT variato (HRT = 8 d).

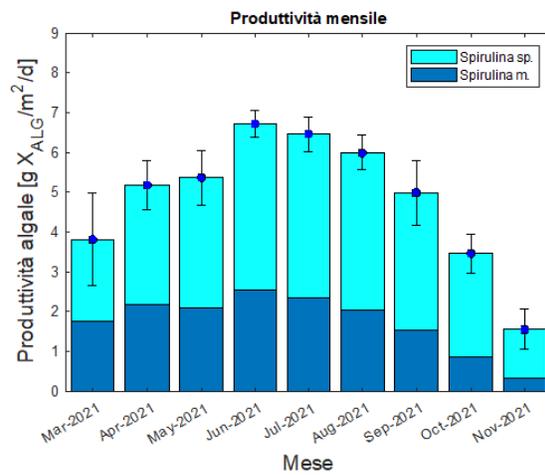
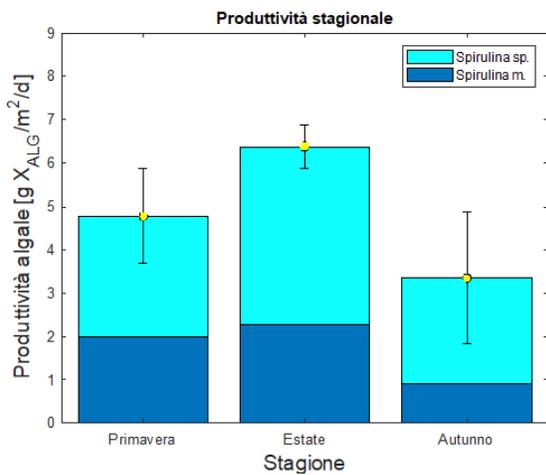
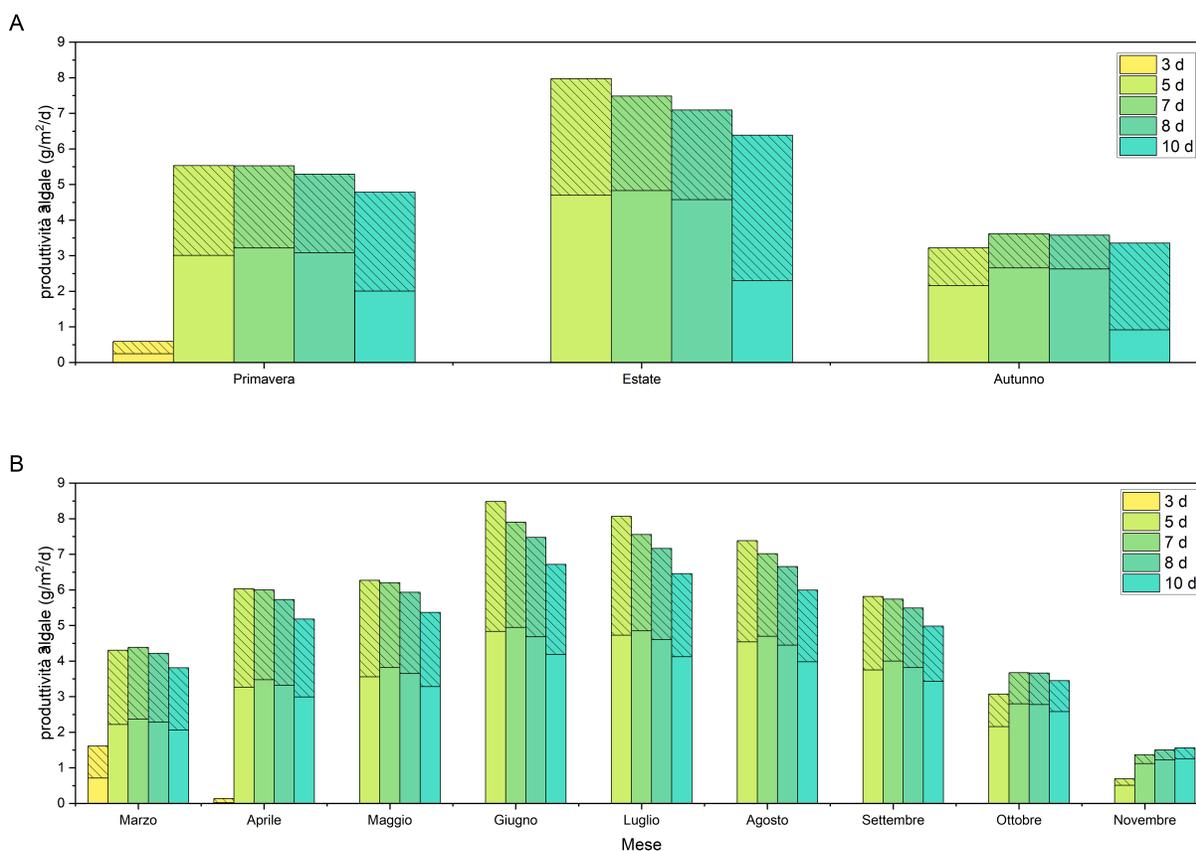


FIG. 42: Produttività stagionale e mensile per la simulazione a HRT variato (HRT = 10 d).



**FIG. 43:** (A) produttività complessiva stagionale della biomassa algale calcolata per diversi valori di HRT; (B) produttività complessiva mensile per il ceppo calcolata per diversi valori di HRT. Si specifica che in entrambi i grafici è indicato il frazionamento della biomassa: le zone a riempimento tratteggiate rappresentano la produttività di "*Spirulina m.*" mentre le zone senza riempimento rappresentano la produttività di solo "*Spirulina Sp.*"

Dai risultati ottenuti si evince che un HRT di 3 giorni sia troppo basso e la biomassa algale è completamente dilavata. Per gli altri valori di HRT indagati è possibile effettuare qualche considerazione più interessante. Si riscontra il picco di produttività complessiva maggiore, rispetto agli altri casi, per HRT pari a 5 giorni. Tuttavia per questo scenario, nei mesi primaverili e autunnali si verifica un'inversione di tendenza. Si può affermare che valori di HRT bassi, tali da non indurre il dilavamento della biomassa, comportano produttività maggiori nei mesi estivi ad alto rendimento, ma si ottengono produttività minori nei mesi primaverili ed estivi. Per quanto riguarda i singoli ceppi, si verifica una produttività buona per "*Spirulina m.*" per HRT bassi mentre "*Spirulina Sp.*" si sviluppa meglio per HRT intermedi (7 d). Tale differenza è probabilmente generata dal fatto che "*Spirulina m.*" raggiunge più rapidamente la concentrazione limite per il sistema modellato, di conseguenza un lungo periodo di permanenza

all'interno del raceway è deleterio per la produttività. Per riassumere, risulta interessante ottimizzare l'HRT a seconda della composizione della biomassa desiderata e in base al momento dell'anno in cui si opera.

L'ultima variabile, per la quale sono stati sviluppati degli scenari, è il coefficiente di trasferimento di massa per l'ossigeno del sistema modellato ( $k_{LA}$ ). L'obiettivo è verificare la possibilità di poter ridurre il valore di tale parametro, inizialmente assunto pari a  $43.5 d^{-1}$ , senza inficiare il processo di coltivazione. Difatti, il  $k_{LA}$  determina la concentrazione di ossigeno disciolto in vasca ed, in genere, più è elevato e più il trasferimento di tale sostanza in atmosfera è favorito. L'obiettivo di mantenere un  $k_{LA}$  adeguato è quello di evitare l'insorgere di fenomeni d'inibizione da eccesso d'ossigeno a danno della crescita algale. Tuttavia, una volta definita la morfologia del sistema di coltivazione, il  $k_{LA}$  è regolabile principalmente dal solo sistema di miscelazione del raceway. In genere, più energia è impiegata nella miscelazione e più la  $k_{LA}$  aumenta. Di conseguenza, verificando la possibilità di ridurre questo parametro, si può valutare un potenziale risparmio energetico. I risultati relativi alla produttività mensile e stagionale delle simulazioni svolte variando il  $k_{LA}$  sono riassunti nelle figure 44, 44. In figura 46 è riportato il confronto fra le produttività mensili simulate per le diversi valori di  $k_{LA}$  analizzati.

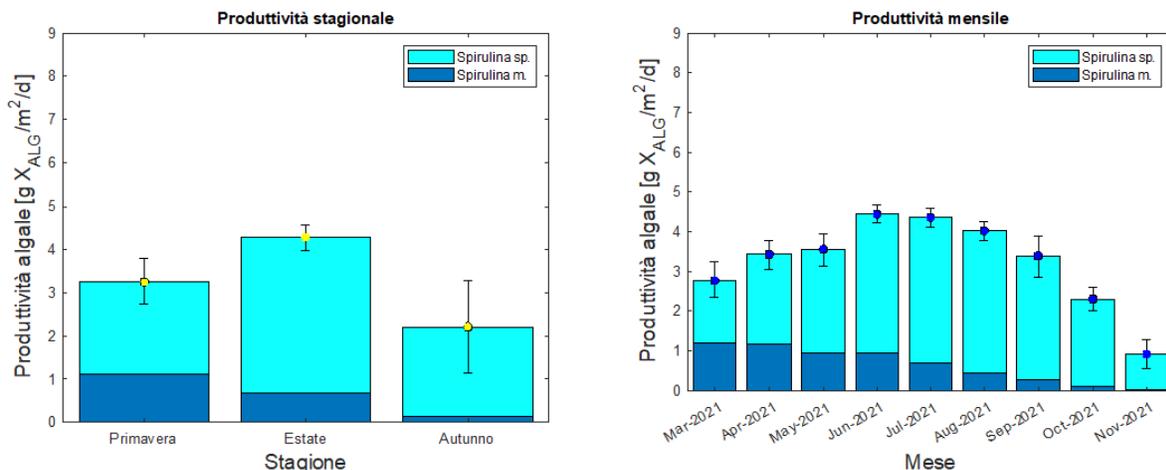
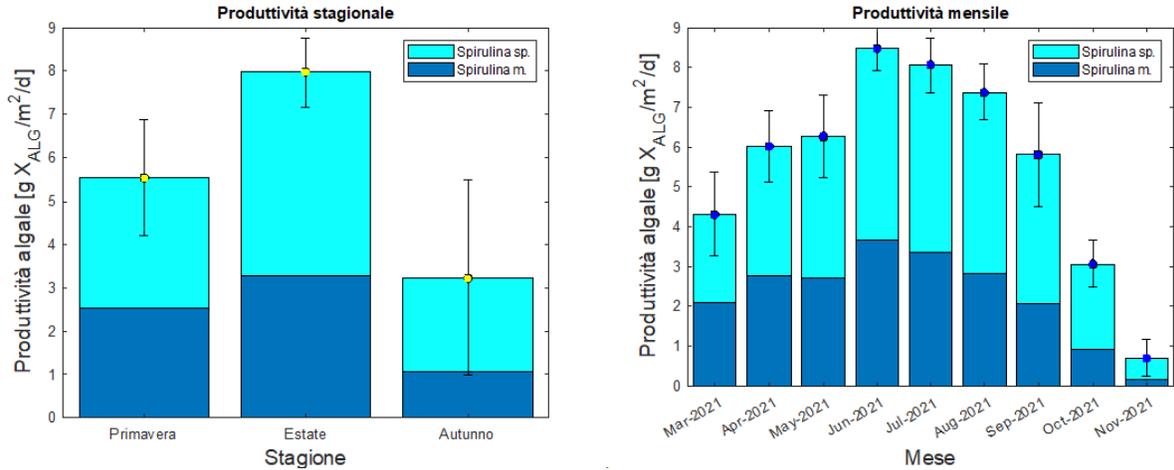
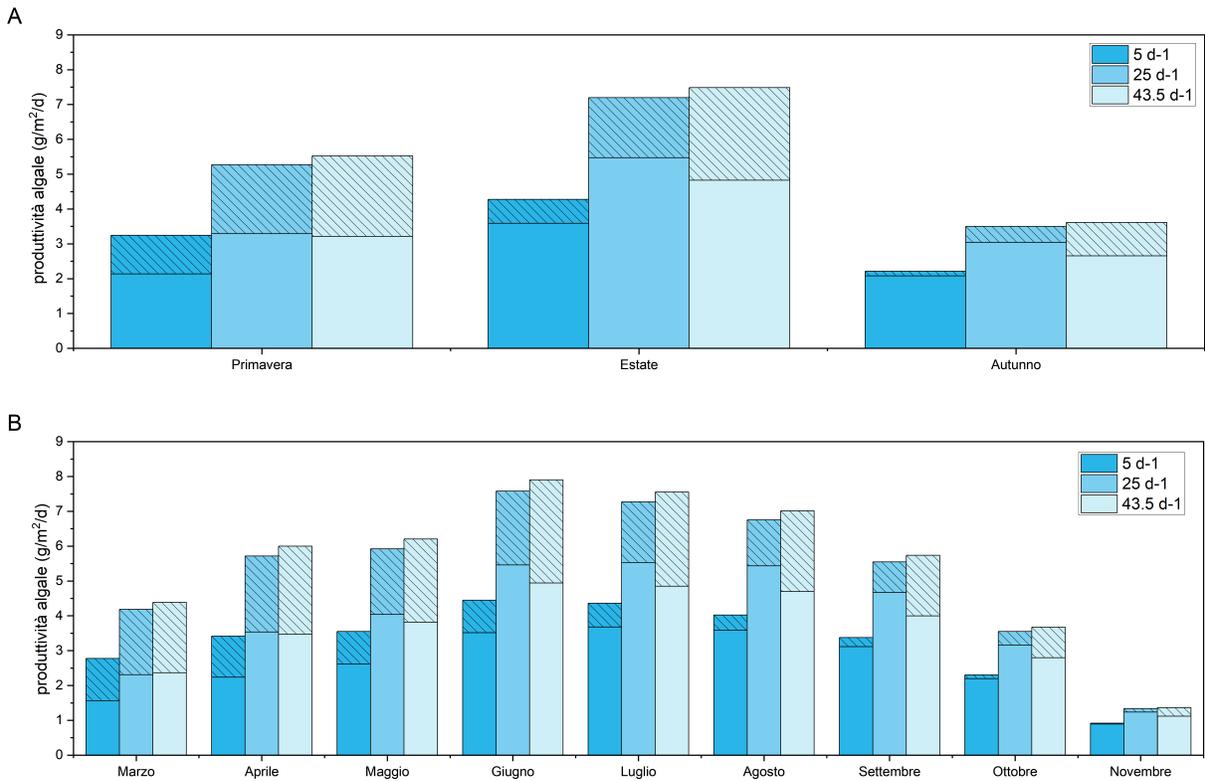


Fig. 44: Produttività stagionale e mensile per la simulazione a  $k_{LA}$  variato ( $k_{LA} = 5 d^{-1}$ ).

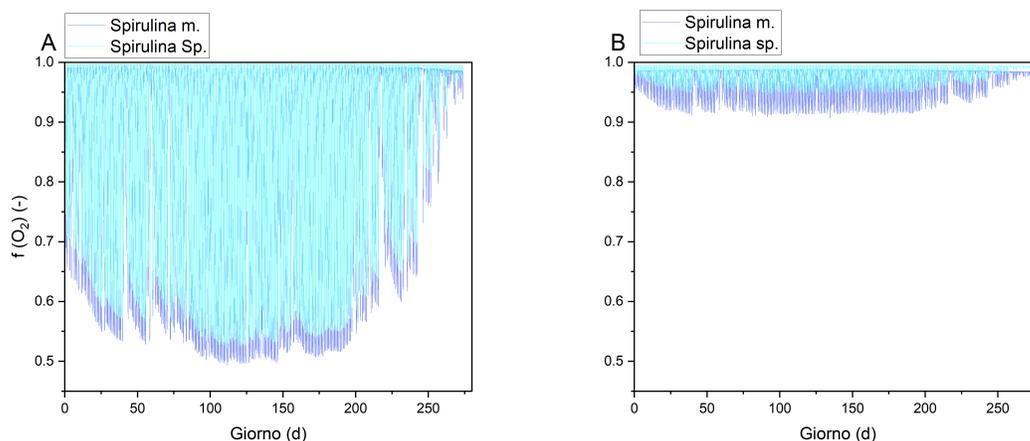


**FIG. 45:** Produttività stagionale e mensile per la simulazione a  $k_{La}$  variato ( $k_{La} = 25 d^{-1}$ ).



**FIG. 46:** (A) produttività complessiva stagionale della biomassa algale calcolata per diversi valori di  $k_{La}$ ; (B) produttività complessiva mensile per il ceppo calcolata per diversi valori  $k_{La}$ . Si specifica che in entrambi i grafici è indicato il frazionamento della biomassa: le zone a riempimento tratteggiate rappresentano la produttività di "*Spirulina m.*" mentre le zone senza riempimento rappresentano la produttività di solo "*Spirulina Sp.*".

Dai risultati si evince che, se il  $k_{La}$  è impostato a  $5 d^{-1}$ , si riduce drasticamente la produttività per l'intero arco temporale simulato (si passa da una media di produttività complessiva di  $5,31 gCOD/m^2/d$ , per il caso base, a un valore medio di  $3,24 gCOD/m^2/d$ ). Se analizziamo la funzione che descrive l'inibizione da ossigeno sulla crescita è facile intuire come, per questo scenario, tale effetto sia particolarmente marcato. In figura 47 è riportato il confronto fra la risposta del modello di Hill applicato allo scenario con  $k_{La}$  pari a  $5 d^{-1}$  e il caso base.



**FIG. 47:** (A) Risposta della funzione che descrive l'effetto dell'ossigeno sulla crescita dei due ceppi coltivati nello scenario con  $k_{La}$  pari a  $5 d^{-1}$ ; (B) Risposta della funzione che descrive l'effetto dell'ossigeno sulla crescita dei due ceppi coltivati nello scenario con  $k_{La}$  pari a  $43,5 d^{-1}$ .

Per quanto concerne lo scenario con  $k_{La}$  pari a  $25 d^{-1}$  si verifica una leggera riduzione della produttività rispetto al caso base ( $0,2 gCOD/m^2/d$  di differenza fra i valori medi di produttività complessiva). Alla luce di quest'ultimo risultato, si può affermare che è possibile ridurre il  $k_{La}$  ipotizzato senza ridurre in maniera sensibile l'efficienza del sistema modellato. Di conseguenza, considerando che il  $k_{La}$  è dimezzato per quest'ultimo scenario, rispetto al caso base, sarebbe possibile conseguire un corposo risparmio energetico nel processo di miscelazione. Per quanto concerne la composizione della biomassa ottenuta un  $k_{La}$  maggiore comporta l'aumento della produttività di "*Spirulina m.*". Tale risultato, come verificato per il caso base, è derivato dalla suscettibilità di questo ceppo a fenomeni inibitori dati dalla presenza eccessiva di ossigeno disciolto.

---

## 4 Conclusioni e prospettive

### 4.1 Conclusioni

Tramite il lavoro di tesi svolto e le attività sperimentali associate, si è cercato di approfondire gli aspetti principali della coltivazione di microalghe. I vantaggi derivati dall'impiego di tali microorganismi sono molteplici e ben si integrano con l'esigenza di trasformare il modello economico attuale in uno più sostenibile. Per la caratterizzazione del processo di coltivazione sono state svolte una serie di prove respirometriche su diversi ceppi di maggiore interesse. Tali prove, secondo letteratura, sono le più indicate per ottenere informazioni rilevanti sui processi biologici che descrivono il ceppo analizzato. Durante il lavoro svolto si sono effettuate prove respirometriche su due diversi cianobatteri ("*Spirulina Sp.*" e "*Spirulina m.*") e su due differenti alghe verdi ("*Chlorella Sp.*" e "*Scenedesmus Sp.*"). I risultati ottenuti rilevano come diversi ceppi, seppur appartenenti alla stessa macrocategoria, mostrino risposte differenti alla modifica dei parametri di processo studiati (temperatura, irradianza, concentrazione d'ossigeno disciolto e pH). In particolar modo, i cianobatteri risultano essere più resistenti alle alte temperature e a pH basici rispetto alle alghe verdi, le quali si sviluppano maggiormente in condizioni più miti. Per quanto concerne l'inibizione da ossigeno disciolto, gli effetti negativi dell'attività fotosintetica si riscontrano per tutti i ceppi a partire da concentrazioni oltre il valore di saturazione. Infine, i risultati relativi all'irradianza mostrano come, per le alghe analizzate, sono necessari almeno  $300-400 \mu E/m^2/s$  per uno sviluppo ottimale della biomassa. Dopo aver raccolto le informazioni derivanti dall'elaborazione delle prove respirometriche, si è provveduto alla modellazione matematica del processo di coltivazione tramite il modello ALBA. Tale modello è modificato per rappresentare lo sviluppo in consorzio di due ceppi algali differenti. Ogni ceppo modellato è caratterizzato da differenti parametri che descrivono l'effetto del pH, della temperatura, dell'ossigeno disciolto e dell'irradianza sulla crescita. I valori per questi parametri sono derivati dai risultati delle prove respirometriche effettuate. Si è deciso di rappresentare un impianto di coltivazione pilota, costituito da un raceway e alimentato con la frazione liquida di un digestato d'origine civile, dove è stato osservato lo sviluppo di *Chlorella* e *Scenedesmus*. La procedura di calibrazione e validazione, effettuata in base alla campagna di monitoraggio dell'impianto, ha prodotto una serie di risultati interessanti. Il modello ALBA è in

---

grado di rappresentare in maniera corretta il sistema di riferimento e relazionare le diverse variabili considerate tramite la simulazione dei principali processi biologici, chimici e fisici. Tuttavia, si è osservata una generale sottostima delle concentrazioni delle diverse specie chimiche all'interno del sistema di coltivazione rispetto ai dati misurati. Inoltre, l'equilibrio dell'azoto, che comprende i processi di accrescimento della biomassa, nitrificazione e volatilizzazione dell'ammonica, è risultato di difficile rappresentazione. In seguito, si è definita e analizzata una serie di scenari possibili di coltivazione per discutere ulteriormente la coltivazione dei ceppi di alghe verdi individuati. I risultati definiscono che, per il sistema modellato e alle condizioni ambientali analizzate, lo sviluppo di *Scenedesmus* sembra meno efficace in quanto ceppo meno competitivo rispetto a *Chlorella*. L'utilizzo della frazione liquida di un digestato di origine agricola, alternativa a quella derivante da digestato civile, comporta una riduzione della produttività sensibile. L'impiego della frazione liquida del digestato civile comporta lo sviluppo contemporaneo della crescita sia su ammonio, sia su nitrato per le microalghe, con una conseguente produttività maggiore. Per quanto concerne i cianobatteri si è modellato un sistema fittizio per valutare le differenze fra i ceppi individuati e caratterizzare il diverso comportamento al variare di alcuni parametri operativi fondamentali (HRT,  $k_{La}$  e temperatura controllata della sospensione). I relativi risultati mostrano come le relativamente piccole differenze fra i due ceppi, comportino produttività e comportamenti profondamente diversi in fase di coltivazione. "*Spirulina Sp.*" è risultato il ceppo più performante, per le condizioni individuate, rispetto a "*Spirulina m.*". Lo sviluppo di scenari, associati a quest'ultimo sistema di coltivazione modellato, hanno prodotto risultati utili. Più l'HRT è elevato, più è favorita la produttività dei ceppi meno soggetti a fenomeni di limitazione della concentrazione e viceversa. La  $k_{La}$ , che influenza la concentrazione d'ossigeno in vasca, condiziona in maniera significativa il processo andando a intaccare, se ridotta eccessivamente, i ceppi più suscettibili a fenomeni d'inibizione da OD. Infine, la temperatura di processo influenza significativamente la selezione della biomassa durante la coltivazione.

## 4.2 Prospettive future

Per quanto concerne le prove respirometriche, seppure le metodologie e tecniche impiegate siano consolidate e condivise dalla comunità scientifica, risulta sicuramente opportuno aumentare il numero di ripetizioni dei test al fine di ridurre l'incertezza sui parametri stimati sulla base dei dati sperimentali.

---

Sarebbe opportuno individuare altri ceppi algali da analizzare tramite respirometria, al fine di allargare il portfolio di dati raccolti. Inoltre, si potrebbe valutare il rateo di fotosintesi e di respirazione in condizioni di crescita più complesse, che simulino ciò che potrebbe verificarsi in un processo di coltivazione reale. Infine, sarebbe opportuno verificare intervalli operativi più ampi per le variabili indagate e verificare la possibilità di aggiungerne di nuove. Per quanto concerne il modello ALBA, sarebbe opportuno distinguere meglio il processo di fotosintesi da quello di respirazione. È necessario verificare, soprattutto per i composti azotati, le motivazioni che conducono le simulazioni effettuate a sottostimare le concentrazioni rispetto ai dati misurati. Per quanto concerne il caso di studio rappresentato, risulta necessario ampliare i dati raccolti durante la campagna di misurazione. La mancanza di dati relativi al frazionamento del COD, ai batteri nell'influenza e alle condizioni iniziali, al  $K_d$  del sistema, alla portata di sostanze strippate (ammoniaca libera, ossigeno ecc..) e al flusso di anidride carbonica utilizzata per il controllo pH, è la causa della maggior parte delle incertezze in questo caso di studio. Per quanto concerne gli scenari ipotizzati, si potrebbe verificare ulteriormente altre condizioni, magari da applicare successivamente tramite prove sul campo.

---

## Bibliografia

- (1) Baalan, C. V., Pulich, W. M., and Brandeis, M. G. (1973). Heterotrophic growth of the microalgae. *CRC Critical Reviews in Microbiology* 2, 229–254.
- (2) Anagnostidis, K., and Komárek, J. (1985). Modern approach to the classification system of cyanophytes. 1-Introduction. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes*, 291–302.
- (3) Davison, I. R. (1991). Environmental effects on algal photosynthesis: temperature. *Journal of phycology* 27, 2–8.
- (4) ASCE (1993). Measurement of oxygen transfer in clean water.
- (5) Rosso, L., Lobry, J. R., and Flandrois, J.-P. (1993). An unexpected correlation between cardinal temperatures of microbial growth highlighted by a new model. *Journal of theoretical biology* 162, 447–463.
- (6) Ginsburg, F. (1994). Culture/media: a (mild) polemic. *Anthropology Today* 10, 5–15.
- (7) Reichert, P. (1994). AQUASIM-A tool for simulation and data analysis of aquatic systems. *Water Science and Technology* 30, 21.
- (8) Rosso, L., Lobry, J., Bajard, S., and Flandrois, J.-P. (1995). Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. *Applied and environmental microbiology* 61, 610–616.
- (9) Grima, E. M., Sevilla, J. F., Pérez, J. S., and Camacho, F. G. (1996). A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances. *Journal of Biotechnology* 45, 59–69.
- (10) Davies, J. P., and Grossman, A. R. In *The molecular biology of chloroplasts and mitochondria in Chlamydomonas*; Springer: 1998, pp 613–635.
- (11) Ghirardi, M. L., Zhang, L., Lee, J. W., Flynn, T., Seibert, M., Greenbaum, E., and Melis, A. (2000). Microalgae: a green source of renewable H<sub>2</sub>. *Trends in biotechnology* 18, 506–511.

- 
- (12) Henze, M., Gujer, W., Mino, T., and van Loosdrecht, M. C., *Activated sludge models ASM1, ASM2, ASM2d and ASM3*; IWA publishing: 2000.
- (13) Grobbelaar, J. U. et al. (2004). Algal nutrition: mineral nutrition. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*, 97–115.
- (14) Muller-Feuga, A. (2004). 19 Microalgae for Aquaculture. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, 352.
- (15) Pulz, O., and Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied microbiology and biotechnology* 65, 635–648.
- (16) Sudhir, P., and Murthy, S. (2004). Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis. *Photosynthetica* 42, 481–486.
- (17) Yang, S., Wang, J., Cong, W., Cai, Z., and Ouyang, F. (2004). Effects of bisulfite and sulfite on the microalga *Botryococcus braunii*. *Enzyme and microbial technology* 35, 46–50.
- (18) Zhang, Z., Shrager, J., Jain, M., Chang, C.-W., Vallon, O., and Grossman, A. R. (2004). Insights into the survival of *Chlamydomonas reinhardtii* during sulfur starvation based on microarray analysis of gene expression. *Eukaryotic cell* 3, 1331–1348.
- (19) Stolz, P., and Obermayer, B. (2005). Manufacturing microalgae for skin care. *Cosmetics and toiletries* 120, 99–106.
- (20) Barsanti, L., and Gualtieri, P. (2006). Algal culturing. *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*.
- (21) Batstone, D. J., Keller, J., and Steyer, J. (2006). A review of ADM1 extensions, applications, and analysis: 2002–2005. *Water science and technology* 54, 1–10.
- (22) Guschina, I. A., and Harwood, J. L. (2006). Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research* 45, 160–186.
- (23) Iacopozzi, I., Innocenti, V., Marsili-Libelli, S., and Giusti, E. (2007). A modified Activated Sludge Model No. 3 (ASM3) with two-step nitrification–denitrification. *Environmental Modelling & Software* 22, 847–861.
- (24) Gujer, W., *Systems analysis for water technology*; Springer Science & Business Media: 2008.

- 
- (25) Song, D., Fu, J., and Shi, D. (2008). Exploitation of Oil-bearing Microalgae for Biodiesel. *Chinese Journal of Biotechnology* 24, 341–348.
- (26) Converti, A., Casazza, A. A., Ortiz, E. Y., Perego, P., and 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, 1146–1151.
- (27) Khan, S. A., Rashmi, Hussain, M. Z., Prasad, S., and Banerjee, U. (2009). Prospects of biodiesel production from microalgae in India. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 13, 2361–2372.
- (28) Mayer, M., Smeets, W., Braun, R., and Fuchs, W. (2009). Enhanced ammonium removal from liquid anaerobic digestion residuals in an advanced sequencing batch reactor system. *Water Science and Technology* 60, 1649–1660.
- (29) Powell, N., Shilton, A., Chisti, Y., and Pratt, S. (2009). Towards a luxury uptake process via microalgae—defining the polyphosphate dynamics. *Water research* 43, 4207–4213.
- (30) Brindley, C., Ación, F. G., and Fernández-Sevilla, J. M. (2010). The oxygen evolution methodology affects photosynthetic rate measurements of microalgae in well-defined light regimes. *Biotechnology and bioengineering* 106, 228–237.
- (31) Chinnasamy, S., Bhatnagar, A., Hunt, R. W., and Das, K. (2010). Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. *Bioresource technology* 101, 3097–3105.
- (32) Béchet, Q., Shilton, A., Park, J. B., Craggs, R. J., and Guieysse, B. (2011). Universal temperature model for shallow algal ponds provides improved accuracy. *Environmental science & technology* 45, 3702–3709.
- (33) John, R. P., Anisha, G., Nampoothiri, K. M., and Pandey, A. (2011). Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. *Bioresource technology* 102, 186–193.
- (34) Satyanarayana, K., Mariano, A., and Vargas, J. (2011). A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials. *International Journal of energy research* 35, 291–311.

- 
- (35) Bernard, O., and Rémond, B. (2012). Validation of a simple model accounting for light and temperature effect on microalgal growth. *Bioresource technology* 123, 520–527.
- (36) Broekhuizen, N., Park, J. B., McBride, G. B., and Craggs, R. J. (2012). Modification, calibration and verification of the IWA River Water Quality Model to simulate a pilot-scale high rate algal pond. *Water Research* 46, 2911–2926.
- (37) Hu, B., Min, M., Zhou, W., Li, Y., Mohr, M., Cheng, Y., Lei, H., Liu, Y., Lin, X., Chen, P., et al. (2012). Influence of exogenous CO<sub>2</sub> on biomass and lipid accumulation of microalgae *Auxenochlorella protothecoides* cultivated in concentrated municipal wastewater. *Applied biochemistry and biotechnology* 166, 1661–1673.
- (38) Madkour, F. F., Kamil, A. E.-W., and Nasr, H. S. (2012). Production and nutritive value of *Spirulina platensis* in reduced cost media. *The Egyptian Journal of Aquatic Research* 38, 51–57.
- (39) Priyadarshani, I., and Rath, B. (2012). Commercial and industrial applications of micro algae—A review. *Journal of Algal Biomass Utilization* 3, 89–100.
- (40) Cai, T., Park, S. Y., and Li, Y. (2013). Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 19, 360–369.
- (41) Decostere, B., Janssens, N., Alvarado, A., Maere, T., Goethals, P., Van Hulle, S. W., and Nopens, I. (2013). A combined respirometer–titrimeter for the determination of microalgae kinetics: Experimental data collection and modelling. *Chemical engineering journal* 222, 85–93.
- (42) Rajkumar, R., and Yaakob, Z. (2013). The biology of microalgae. *Biotechnological Applications of Microalgae: Biodiesel and Value-Added Products*, 1–16.
- (43) Metcalf, Eddy, G., Tchobanoglous, Burton, F. L., and Stensel, H. D., *Wastewater engineering: Treatment and resource recovery*; McGraw-Hill Higher Education: 2014.
- (44) Morales-Sánchez, D., Tinoco-Valencia, R., Caro-Bermúdez, M. A., and Martínez, A. (2014). Culturing *Neochloris oleoabundans* microalga in a nitrogen-limited, heterotrophic fed-batch system to enhance lipid and carbohydrate accumulation. *Algal Research* 5, 61–69.

- 
- (45) Procházková, G., Brányiková, I., Zachleder, V., and Brányik, T. (2014). Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae. *Journal of applied phycology* 26, 1359–1377.
- (46) Wang, J., Yang, H., and Wang, F. (2014). Mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production: status and prospects. *Applied biochemistry and biotechnology* 172, 3307–3329.
- (47) Cabello, J., Toledo-Cervantes, A., Sánchez, L., Revah, S., and Morales, M. (2015). Effect of the temperature, pH and irradiance on the photosynthetic activity by *Scenedesmus obtusiusculus* under nitrogen replete and deplete conditions. *Bioresource Technology* 181, 128–135.
- (48) De Vree, J. H., Bosma, R., Janssen, M., Barbosa, M. J., and Wijffels, R. H. (2015). Comparison of four outdoor pilot-scale photobioreactors. *Biotechnology for biofuels* 8, 1–12.
- (49) Di Veroli, G. Y., Fornari, C., Goldlust, I., Mills, G., Koh, S. B., Bramhall, J. L., Richards, F. M., and Jodrell, D. I. (2015). An automated fitting procedure and software for dose-response curves with multiphasic features. *Scientific reports* 5, 1–11.
- (50) Dolman, A. M., and Wiedner, C. (2015). Predicting phytoplankton biomass and estimating critical N: P ratios with piecewise models that conform to Liebig's law of the minimum. *Freshwater Biology* 60, 686–697.
- (51) Klinthong, W., Yang, Y.-H., Huang, C.-H., Tan, C.-S., et al. (2015). A review: microalgae and their applications in CO<sub>2</sub> capture and renewable energy. *Aerosol and Air Quality Research* 15, 712–742.
- (52) Morales-Sánchez, D., Martínez-Rodríguez, O. A., Kyndt, J., and Martínez, A. (2015). Heterotrophic growth of microalgae: metabolic aspects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 31, 1–9.
- (53) Nicholls, K. H., and Wujek, D. E. In *Freshwater Algae of North America (Second Edition)*, Wehr, J. D., Sheath, R. G., and Kociolek, J. P., Eds., Second Edition; Aquatic Ecology; Academic Press: Boston, 2015, pp 537–586.
- (54) Singh, J., and Saxena, R. C. In *Handbook of Marine Microalgae*, Kim, S.-K., Ed.; Academic Press: Boston, 2015, pp 11–24.

- 
- (55) Vigani, M., Parisi, C., Rodr'iguez-Cerezo, E., Barbosa, M. J., Sijtsma, L., Ploeg, M., and Enzing, C. (2015). Food and feed products from micro-algae: Market opportunities and challenges for the EU. *Trends in Food Science & Technology* 42, 81–92.
- (56) Capodici, M., Corsino, S. F., Di Pippo, F., Di Trapani, D., and Torregrossa, M. (2016). An innovative respirometric method to assess the autotrophic active fraction: application to an alternate oxic–anoxic MBR pilot plant. *Chemical Engineering Journal* 300, 367–375.
- (57) Menezes, R. S., Soares, A. T., Marques Júnior, J. G., Lopes, R. G., Da Arantes, R. F., Derner, R. B., et al. (2016). Culture medium influence on growth, fatty acid, and pigment composition of *Choricystis minor* var. *minor*: a suitable microalga for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology* 28, 2679–2686.
- (58) van Loosdrecht, M. C., Nielsen, P. H., Lopez-Vazquez, C. M., and Brdjanovic, D., *Experimental methods in wastewater treatment*; IWA publishing: 2016.
- (59) BARCHIESI, M. Microalgae-based wastewater treatments: review and integration within a real context, 2017.
- (60) Morales-Sánchez, D., Martinez-Rodriguez, O. A., and Martinez, A. (2017). Heterotrophic cultivation of microalgae: production of metabolites of commercial interest. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 92, 925–936.
- (61) Ting, H., Haifeng, L., Shanshan, M., Zhang, Y., Zhidan, L., and Na, D. (2017). Progress in microalgae cultivation photobioreactors and applications in wastewater treatment: A review. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering* 10, 1–29.
- (62) Barceló-Villalobos, M., Sánchez, J. G., Cara, I. M., Molina, J. S., and Fernández, F. A. (2018). Analysis of mass transfer capacity in raceway reactors. *Algal research* 35, 91–97.
- (63) Chew, K. W., Chia, S. R., Show, P. L., Yap, Y. J., Ling, T. C., and Chang, J.-S. (2018). Effects of water culture medium, cultivation systems and growth modes for microalgae cultivation: A review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 91, 332–344.

- 
- (64) Chia, S. R., Chew, K. W., Show, P. L., Yap, Y. J., Ong, H. C., Ling, T. C., and Chang, J.-S. (2018). Analysis of economic and environmental aspects of microalgae biorefinery for biofuels production: a review. *Biotechnology journal* 13, 1700618.
- (65) Darvehei, P., Bahri, P. A., and Moheimani, N. R. (2018). Model development for the growth of microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 97, 233–258.
- (66) Renuka, N., Guldhe, A., Prasanna, R., Singh, P., and Bux, F. (2018). Microalgae as multi-functional options in modern agriculture: current trends, prospects and challenges. *Biotechnology Advances* 36, 1255–1273.
- (67) Shoener, B. D., Schramm, S. M., Béline, F., Bernard, O., Martínez, C., Plósz, B. G., Snowling, S., Steyer, J.-P., Valverde-Pérez, B., Wágner, D., and Guest, J. S. (2019). Microalgae and cyanobacteria modeling in water resource recovery facilities: A critical review. *Water Research X* 2, 100024.
- (68) Solimeno, A., Gómez-Serrano, C., and Acién, F. G. (2019). BIO\_ALGAE 2: improved model of microalgae and bacteria consortia for wastewater treatment. *Environmental Science and Pollution Research* 26, 25855–25868.
- (69) Guo, S., Wang, P., Wang, X., Zou, M., Liu, C., and Hao, J. In *Microalgae biotechnology for food, health and high value products*; Springer: 2020, pp 397–411.
- (70) Mantovani, M., Marazzi, F., Fornaroli, R., Bellucci, M., Ficara, E., and Mezzanotte, V. (2020). Outdoor pilot-scale raceway as a microalgae-bacteria sidestream treatment in a WWTP. *Science of the Total Environment* 710, 135583.
- (71) Rossi, S., Casagli, F., Mantovani, M., Mezzanotte, V., and Ficara, E. (2020). Selection of photosynthesis and respiration models to assess the effect of environmental conditions on mixed microalgae consortia grown on wastewater. *Bioresource technology* 305, 122995.
- (72) Rossi, S., Sforza, E., Pastore, M., Bellucci, M., Casagli, F., Marazzi, F., and Ficara, E. (2020). Photo-respirometry to shed light on microalgae-bacteria consortia—a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 19, 43–72.

- 
- (73) Bai, X., Piątek, J., Wołowski, K., Bu, Z.-J., and Chen, X. (2021). Chrysophyte stomatocysts and their associations with environmental variables in three peatlands in the subtropical monsoon climate zone of China. *Ecological Indicators* 121, 107125.
- (74) Casagli, F. Development of the ALBA model: a comprehensive mathematical tool for raceway systems management and integration in Water Resource Recovery Facilities, 2021.
- (75) Casagli, F., Rossi, S., Steyer, J. P., Bernard, O., and Ficara, E. (2021). Balancing microalgae and nitrifiers for wastewater treatment: can inorganic carbon limitation cause an environmental threat? *Environmental science & technology* 55, 3940–3955.
- (76) Casagli, F., Zuccaro, G., Bernard, O., Steyer, J.-P., and Ficara, E. (2021). ALBA: A comprehensive growth model to optimize algae-bacteria wastewater treatment in raceway ponds. *Water Research* 190, 116734.
- (77) Rossi, S., Pizzera, A., Bellucci, M., Marazzi, F., Mezzanotte, V., Parati, K., and Ficara, E. (2022). Piggery wastewater treatment with algae-bacteria consortia: Pilot-scale validation and techno-economic evaluation at farm level. *Bioresource Technology* 351, 127051.
- (78) Sánchez-Zurano, A., Rossi, S., Fernández-Sevilla, J., Ación-Fernández, G., Molina-Grima, E., and Ficara, E. (2022). Respirometric assessment of bacterial kinetics in algae-bacteria and activated sludge processes. *Bioresource Technology* 352, 127116.

# A Appendice I

**TAB. 28:** Matrice di Petersen dei processi biologici, modellati con ALBA. Si specifica che, per le microalghe, i coefficienti stechiometrici sono condivisi fra le due specie. Tabella ripresa da [76]

		$X_{ALG}$	$X_{AOB}$	$X_{NOB}$	$X_H$	$X_S$	$X_I$	$S_S$	$S_I$	$S_{IC}$	$S_{ND}$	$S_{NH}$	$S_{NO2}$	$S_{NO3}$	$S_{N2}$	$S_{PO4}$	$S_{O2}$	$S_{H2O}$	
var. j →		$\frac{g_{COD}}{m^3}$	$\frac{g_N}{m^3}$																
proc. i ↓																			
<b>Microalghe</b>																			
1	Crescita fotot. su $NH_4^+$	1								$\alpha_{1,9}$		$\alpha_{1,11}$				$\alpha_{1,15}$	1	$\alpha_{1,17}$	
2	Crescita fotot. su $NO_3^-$	1								$\alpha_{2,9}$			$\alpha_{2,13}$			$\alpha_{2,15}$	1	$\alpha_{2,17}$	
3	Resp. aerobica	-1								$\alpha_{3,9}$		$\alpha_{3,11}$				$\alpha_{3,15}$	-1	$\alpha_{3,9}$	
4	Decadim.	-1				$\alpha_{4,5}$	$\alpha_{4,6}$			$\alpha_{4,9}$		$\alpha_{4,11}$				$\alpha_{4,15}$			
<b>Batteri eterotrofi</b>																			
5	Crescita aerob. su $NH_4^+$				1			$\alpha_{5,7}$		$\alpha_{5,9}$		$\alpha_{5,11}$				$\alpha_{5,15}$	$\alpha_{5,16}$		
6	Crescita aerob. su $NO_3^-$				1			$\alpha_{6,7}$		$\alpha_{6,9}$			$\alpha_{6,13}$			$\alpha_{6,15}$	$\alpha_{6,16}$		
7	Resp. aerobica				-1					$\alpha_{7,9}$		$\alpha_{7,11}$				$\alpha_{7,15}$	-1		
8	Crescita anossica su $NO_3^-$				1			$\alpha_{8,7}$		$\alpha_{8,9}$		$\alpha_{8,11}$		$\alpha_{8,13}$	$\alpha_{8,14}$	$\alpha_{8,15}$			
9	Crescita anossica su $NO_2^-$				1			$\alpha_{9,7}$		$\alpha_{9,9}$		$\alpha_{9,11}$	$\alpha_{9,12}$		$\alpha_{9,14}$	$\alpha_{9,15}$			
10	Resp. anossica $NO_2^-$ e $NO_3^-$				-1					$\alpha_{10,9}$		$\alpha_{10,11}$	$\alpha_{10,12}$	$\alpha_{10,13}$	$\alpha_{10,14}$	$\alpha_{10,15}$			
11	Idrolisi del sbCOD					-1		$\alpha_{11,7}$	$\alpha_{11,8}$	$\alpha_{11,9}$		$\alpha_{11,11}$				$\alpha_{11,15}$			
12	Idrolisi dell' urea									$\alpha_{12,9}$	-1	1						$\alpha_{12,17}$	
13	Decadim.				-1	$\alpha_{13,5}$	$\alpha_{13,6}$			$\alpha_{13,9}$		$\alpha_{13,11}$				$\alpha_{13,15}$			
<b>AOB</b>																			
14	Crescita aerob. su $NH_4^+$		1							$\alpha_{14,9}$		$\alpha_{14,11}$	$\alpha_{14,12}$			$\alpha_{14,15}$	$\alpha_{14,16}$		
15	Resp. aerobica		-1							$\alpha_{15,9}$		$\alpha_{15,11}$				$\alpha_{15,15}$	$\alpha_{15,16}$		
16	Decadim.		-1			$\alpha_{16,5}$	$\alpha_{16,6}$			$\alpha_{16,9}$		$\alpha_{16,11}$				$\alpha_{16,15}$			
<b>NOB</b>																			
17	Crescita aerobica su $NO_2^-$			1						$\alpha_{17,9}$		$\alpha_{17,11}$	$\alpha_{17,12}$	$\alpha_{17,13}$		$\alpha_{17,15}$	$\alpha_{17,16}$		
18	Resp. aerobica			-1						$\alpha_{18,9}$		$\alpha_{18,11}$				$\alpha_{18,15}$	$\alpha_{18,16}$		
19	Decadim.			-1		$\alpha_{19,5}$	$\alpha_{19,6}$			$\alpha_{19,9}$		$\alpha_{19,11}$				$\alpha_{19,15}$			

**Tab. 29:** Coefficienti stechiometrici, utilizzati nella matrice di Petersen, per la biomassa algale. Tabella ripresa da [76].

Simbolo	Variabile	Espressione	Unità di misura
$\rho_1$ - Crescita delle microalghe su $NH_4^+$			
$\alpha_{1,1}$	$X_{ALG}$	1	$g_{CODBM}/g_{CODBM}$
$\alpha_{1,9}$	$S_{IC}$	$-i_{C,BMALG}$	$gC/g_{CODBM}$
$\alpha_{1,11}$	$S_{NH}$	$-i_{N,BMALG}$	$gN/g_{CODBM}$
$\alpha_{1,15}$	$S_{PO4}$	$-i_{P,BMALG}$	$gP/g_{CODBM}$
$\alpha_{1,16}$	$S_{O2}$	$-i_{O,BMALG} + (32/12) \cdot i_{C,BMALG} - (24/14) \cdot i_{N,BMALG} + (40/31) \cdot i_{P,BMALG} + (8) \cdot i_{H,BMALG}$	$g_{O2}/g_{CODBM}$
$\alpha_{1,17}$	$S_{H2O}$	-0.0404	$gH/g_{CODBM}$
$\rho_2$ - Crescita da $X_{ALG}$ su $NO_3^-$			
$\alpha_{2,1}$	$X_{ALG}$	1	$g_{CODBM}/g_{CODBM}$
$\alpha_{2,9}$	$S_{IC}$	$-i_{C,BMALG}$	$gC/g_{CODBM}$
$\alpha_{2,13}$	$S_{NO3}$	$-i_{N,BMALG}$	$gN/g_{CODBM}$
$\alpha_{2,15}$	$S_{PO4}$	$-i_{P,BMALG}$	$gP/g_{CODBM}$
$\alpha_{2,16}$	$S_{O2}$	$-i_{O,BMALG} + (32/12) \cdot i_{C,BMALG} + (40/14) \cdot i_{N,BMALG} + (40/31) \cdot i_{P,BMALG} + (8) \cdot i_{H,BMALG}$	$g_{O2}/g_{CODBM}$
$\alpha_{2,17}$	$S_{H2O}$	-0.0464	$gH/g_{CODBM}$
$\rho_3$ - Respirazione aerobica di $X_{ALG}$			
$\alpha_{3,1}$	$X_{ALG}$	-1	$g_{CODBM}/g_{CODBM}$
$\alpha_{3,9}$	$S_{IC}$	$-i_{C,BMALG}$	$gC/g_{CODBM}$
$\alpha_{3,11}$	$S_{NH}$	$-i_{N,BMALG}$	$gN/g_{CODBM}$
$\alpha_{3,15}$	$S_{PO4}$	$-i_{P,BMALG}$	$gP/g_{CODBM}$
$\alpha_{3,16}$	$S_{O2}$	$i_{O,BMALG} - (32/12) \cdot i_{C,BMALG} + (24/14) \cdot i_{N,BMALG} - (40/31) \cdot i_{P,BMALG} + (8) \cdot i_{H,BMALG}$	$g_{O2}/g_{CODBM}$
$\alpha_{3,17}$	$S_{H2O}$	0.0404	$gH/g_{CODBM}$
$\rho_4$ - Decadimento di $X_{ALG}$			
$\alpha_{4,1}$	$X_{ALG}$	-1	$g_{CODBM}/g_{CODBM}$
$\alpha_{4,5}$	$X_S$	$(1 - f_{XI,ALG})$	$g_{CODXS}/g_{CODBM}$
$\alpha_{4,6}$	$X_I$	$f_{XI,ALG}$	
$\alpha_{4,9}$	$S_{IC}$	$i_{CBMALG} - (1 - f_{XI,ALG}) \cdot i_{CXs} - f_{XI,ALG} \cdot i_{CXI}$	$gC/g_{CODBM}$
$\alpha_{4,11}$	$S_{NH}$	$i_{NBMALG} - (1 - f_{XI,ALG}) \cdot i_{NXs} - f_{XI,ALG} \cdot i_{NXI}$	$gN/g_{CODBM}$
$\alpha_{4,15}$	$S_{PO4}$	$i_{PBMALG} - (1 - f_{XI,ALG}) \cdot i_{PXs} - f_{XI,ALG} \cdot i_{PXI}$	$gP/g_{CODBM}$

**TAB. 30:** Tabella che riporta i coefficienti stechiometrici, presenti nella matrice di Petersen, per la biomassa eterotrofa. Tabella ripresa da [76].

Simbolo	Variabile	Espressione	Unità di misura
$\rho_5$ – Crescita aerobica di $X_H$ su $NH_4^+$			
$\alpha_{5,3}$	$X_H$	1	$g_{CODBM}/g_{CODBM}$
$\alpha_{5,7}$	$S_S$	$-1/Y_H$	$g_{CODSS}/g_{CODBM}$
$\alpha_{5,9}$	$S_{IC}$	$i_{CSS}/Y_H - i_{CBM}$	$g_C/g_{CODBM}$
$\alpha_{5,11}$	$S_{NH}$	$i_{NSS}/Y_H - i_{NBM}$	$g_N/g_{CODBM}$
$\alpha_{5,15}$	$S_{PO_4}$	$i_{PSS}/Y_H - i_{PBM}$	$g_P/g_{CODBM}$
$\alpha_{5,16}$	$S_{O_2}$	$-(1/Y_H - 1)$	$g_{O_2}/g_{CODBM}$
$\rho_6$ – Crescita aerobica di $X_H$ su $NO_3^-$			
$\alpha_{6,4}$	$X_H$	1	$g_{CODBM}/g_{CODBM}$
$\alpha_{6,7}$	$S_S$	$-1/Y_H$	$g_{CODSS}/g_{CODBM}$
$\alpha_{6,9}$	$S_{IC}$	$i_{CSS}/Y_H - i_{CBM}$	$g_C/g_{CODBM}$
$\alpha_{6,13}$	$S_{NO_3}$	$i_{NSS}/Y_H - i_{NBM}$	$g_N/g_{CODBM}$
$\alpha_{6,15}$	$S_{PO_4}$	$i_{PSS}/Y_H - i_{PBM}$	$g_P/g_{CODBM}$
$\alpha_{6,16}$	$S_{O_2}$	$-(1/Y_H - 1) - (64/14) \cdot (i_{NSS}/Y_H - i_{NBM})$	$g_{O_2}/g_{CODBM}$
$\rho_7$ – Respirazione aerobica di $X_H$			
$\alpha_{7,4}$	$X_H$	-1	$g_{CODBM}/g_{CODBM}$
$\alpha_{7,9}$	$S_{IC}$	$i_{CBM}$	$g_C/g_{CODBM}$
$\alpha_{7,11}$	$S_{NH}$	$i_{NBM}$	$g_N/g_{CODBM}$
$\alpha_{7,15}$	$S_{PO_4}$	$i_{PBM}$	$g_P/g_{CODBM}$
$\alpha_{7,16}$	$S_{O_2}$	-1	$g_{O_2}/g_{CODBM}$
$\rho_8$ – Crescita anossica di $X_H$ su $NO_3^-$			
$\alpha_{8,4}$	$X_H$	1	$g_{CODBM}/g_{CODBM}$
$\alpha_{8,7}$	$S_S$	$-1/Y_{HNO_3}$	$g_{CODSS}/g_{CODBM}$
$\alpha_{8,9}$	$S_{IC}$	$i_{CSS}/Y_{HNO_3} - i_{CBM}$	$g_C/g_{CODBM}$
Prosegue a pagina successiva			

Table 30 : Prosegue da pagina precedente

Simbolo	Variabile	Espressione	Unità di misura
$\alpha_{8,11}$	$S_{NH}$	$i_{NSS}/Y_{HNO3} - i_{NBM}$	$g_N/g_{CODBM}$
$\alpha_{8,13}$	$S_{NO3}$	$-28/80 \cdot (1/Y_{HNO3} - 1)$	$g_N/g_{CODBM}$
$\alpha_{8,14}$	$S_{N2}$	$28/80 \cdot (1/Y_{HNO3} - 1)$	$g_N/g_{CODBM}$
$\alpha_{8,15}$	$S_{PO4}$	$i_{PSS}/Y_{HNO3} - i_{PBM}$	$g_P/g_{CODBM}$
$\rho_9$ - Crescita anossica di $X_H$ su $NO_2^-$			
$\alpha_{9,4}$	$X_H$	1	$g_{CODBM}/g_{CODBM}$
$\alpha_{9,7}$	$S_S$	$-1/Y_{HNO2}$	$g_{CODSS}/g_{CODBM}$
$\alpha_{9,9}$	$S_{IC}$	$i_{CSS}/Y_{HNO2} - i_{CBM}$	$g_C/g_{CODBM}$
$\alpha_{9,11}$	$S_{NH}$	$i_{NSS}/Y_{HNO2} - i_{NBM}$	$g_N/g_{CODBM}$
$\alpha_{9,12}$	$S_{NO2}$	$-28/48 \cdot (1/Y_{HNO2} - 1)$	$g_N/g_{CODBM}$
$\alpha_{9,14}$	$S_{N2}$	$28/48 \cdot (1/Y_{HNO2} - 1)$	$g_N/g_{CODBM}$
$\alpha_{9,15}$	$S_{PO4}$	$i_{PSS}/Y_{HNO2} - i_{PBM}$	$g_P/g_{CODBM}$
$\rho_{10}$ - Respirazione anossica di $X_H$ su $NO_2^-$ e $NO_3^-$			
$\alpha_{10,4}$	$X_H$	-1	$g_{CODBM}/g_{CODBM}$
$\alpha_{10,9}$	$S_{IC}$	$i_{CBM}$	$g_C/g_{CODBM}$
$\alpha_{10,11}$	$S_{NH}$	$i_{NBM}$	$g_N/g_{CODBM}$
$\alpha_{10,12}$	$S_{NO2}$	$-14/64$	$g_N/g_{CODBM}$
$\alpha_{10,13}$	$S_{NO3}$	$-14/64$	$g_N/g_{CODBM}$
$\alpha_{10,14}$	$S_{N2}$	$28/64$	$g_N/g_{CODBM}$
$\alpha_{10,15}$	$S_{PO4}$	$i_{PBM}$	$g_P/g_{CODBM}$
$\rho_{11}$ - Idrolisi del COD lentamente degradabile			
$\alpha_{11,5}$	$X_S$	1	$g_{CODXS}/g_{CODXS}$
$\alpha_{11,7}$	$S_S$	$1 - f_{SI}$	$g_{CODSS}/g_{CODXS}$
$\alpha_{11,8}$	$S_I$	$f_{SI}$	$g_{CODSI}/g_{CODXS}$
$\alpha_{11,9}$	$S_{IC}$	$i_{CXS} - (1 - f_{SI}) \cdot i_{CSS} - f_{SI} \cdot i_{CSI}$	$g_C/g_{CODXS}$
Prosegue a pagina successiva			

Table 30 : Prosegue da pagina precedente

Simbolo	Variabile	Espressione	Unità di misura
$\alpha_{11,11}$	$S_{NH}$	$i_{NXS} - (1 - f_{SI}) \cdot i_{NSS} - f_{SI} \cdot i_{NSI}$	$g_N / g_{CODXS}$
$\alpha_{11,15}$	$S_{PO_4}$	$i_{PXS} - (1 - f_{SI}) \cdot i_{PSS} - f_{SI} \cdot i_{PSI}$	$g_P / g_{CODXS}$
$\rho_{12}$ - Idrolisi dell'urea			
$\alpha_{12,9}$	$S_{IC}$	$i_{CND}$	$g_C / g_{Nurea}$
$\alpha_{12,10}$	$S_{ND}$	-1	$g_{Nurea} / g_{Nurea}$
$\alpha_{12,11}$	$S_{NH}$	1	$g_{Nammioniac} / g_{Nurea}$
$\alpha_{12,17}$	$S_{H_2O}$	$i_{HND}$	$g_H / g_{Nurea}$
$\rho_{13}$ - Decadimento di $X_H$			
$\alpha_{13,4}$	$X_H$	-1	$g_{CODBM} / g_{CODBM}$
$\alpha_{13,5}$	$X_S$	$1 - f_{XI}$	$g_{COD,XS} / g_{CODBM}$
$\alpha_{13,6}$	$X_I$	$f_{XI}$	$g_{COD,XI} / g_{CODBM}$
$\alpha_{13,9}$	$S_{IC}$	$i_{CBM} - (1 - f_{XI}) \cdot i_{CXS} - f_{XI} \cdot i_{CXI}$	$g_C / g_{CODBM}$
$\alpha_{13,11}$	$S_{NH}$	$i_{NBM} - (1 - f_{XI}) \cdot i_{NXS} - f_{XI} \cdot i_{NXI}$	$g_N / g_{CODBM}$
$\alpha_{13,15}$	$S_{PO_4}$	$i_{PBM} - (1 - f_{XI}) \cdot i_{PXS} - f_{XI} \cdot i_{PXI}$	$g_P / g_{CODBM}$

**TAB. 31:** Coefficienti stechiometrici, utilizzati nella matrice di Petersen, per la biomassa nitrificante. Tabella ripresa da [76].

Simbolo	Variabile	Espressione	Unità di misura
$\rho_{14}$ – Crescita aerobica di $X_{AOB}$ su $NH_4^+$			
$\alpha_{14,2}$	$X_{AOB}$	1	$g_{CODBM}/g_{CODBM}$
$\alpha_{14,9}$	$S_{IC}$	$-i_{CBM}$	$g_C/g_{CODBM}$
$\alpha_{14,11}$	$S_{NH}$	$-i_{NBM}-1/Y_{AOB}$	$g_N/g_{CODBM}$
$\alpha_{14,12}$	$S_{NO2}$	$1/Y_{AOB}$	$g_N/g_{CODBM}$
$\alpha_{14,15}$	$S_{PO4}$	$-i_{PBM}$	$g_P/g_{CODBM}$
$\alpha_{14,16}$	$S_{O2}$	$1 - 48/14 \cdot 1/Y_{AOB}$	$g_{O2}/g_{CODBM}$
$\rho_{15}$ – Respirazione aerobica di $X_{AOB}$			
$\alpha_{15,2}$	$X_{AOB}$	-1	$g_{CODBM}/g_{CODBM}$
$\alpha_{15,9}$	$S_{IC}$	$-i_{CBM}$	$g_C/g_{CODBM}$
$\alpha_{15,11}$	$S_{NH}$	$-i_{NBM}$	$g_N/g_{CODBM}$
$\alpha_{15,15}$	$S_{PO4}$	$-i_{PBM}$	$g_P/g_{CODBM}$
$\alpha_{15,16}$	$S_{O2}$	-1	$g_{O2}/g_{CODBM}^M$
$\rho_{16}$ – Decadimento di $X_{AOB}$			
$\alpha_{16,2}$	$X_{AOB}$	-1	$g_{CODBM}/g_{CODBM}$
$\alpha_{16,5}$	$X_S$	$1 - f_{XI}$	$g_{COD,XS}/g_{CODBM}$
$\alpha_{16,6}$	$X_I$	$f_{XI}$	$g_{COD,XI}/g_{CODBM}$
$\alpha_{16,9}$	$S_{IC}$	$i_{CBM} - (1 - f_{XI}) \cdot i_{CXS} - f_{XI} \cdot i_{CXI}$	$g_C/g_{CODBM}$
$\alpha_{16,11}$	$S_{NH}$	$i_{NBM} - (1 - f_{XI}) \cdot i_{NXS} - f_{XI} \cdot i_{NXI}$	$g_N/g_{CODBM}$
$\alpha_{16,15}$	$S_{PO4}$	$i_{PBM} - (1 - f_{XI}) \cdot i_{PXS} - f_{XI} \cdot i_{PXI}$	$g_P/g_{CODBM}$
$\rho_{17}$ – Crescita aerobica di $X_{NOB}$ su $NO_3^-$			
$\alpha_{17,3}$	$X_{NOB}$	1	$g_{CODBM}/g_{CODBM}$
$\alpha_{17,9}$	$S_{IC}$	$-i_{CBM}$	$g_C/g_{CODBM}$
$\alpha_{17,11}$	$S_{NH}$	$-i_{NBM}$	$g_N/g_{CODBM}$
$\alpha_{17,12}$	$S_{NO2}$	$-1/Y_{NOB}$	$g_N/g_{CODBM}$
$\alpha_{17,13}$	$S_{NO3}$	$1/Y_{NOB}$	$g_N/g_{CODBM}$
$\alpha_{17,15}$	$S_{PO4}$	$-i_{PBM}$	$g_P/g_{CODBM}$
$\alpha_{17,16}$	$S_{O2}$	$1 - 16/14 \cdot 1/Y_{NOB}$	$g_{O2}/g_{CODBM}$
$\rho_{18}$ – Respirazione aerobica di $X_{NOB}$			
$\alpha_{18,3}$	$X_{NOB}$	-1	$g_{CODBM}/g_{CODBM}$
$\alpha_{18,9}$	$S_{IC}$	$-i_{CBM}$	$g_C/g_{CODBM}$
$\alpha_{18,11}$	$S_{NH}$	$-i_{NBM}$	$g_N/g_{CODBM}$
$\alpha_{18,15}$	$S_{PO4}$	$-i_{PBM}$	$g_P/g_{CODBM}$
$\alpha_{18,16}$	$S_{O2}$	-1	$g_{O2}/g_{CODBM}$
$\rho_{19}$ – Decadimento di $X_{NOB}$			
$\alpha_{19,3}$	$X_{NOB}$	-1	$g_{CODBM}/g_{CODBM}$
$\alpha_{19,5}$	$X_S$	$1 - f_{XI}$	$g_{COD,XS}/g_{CODBM}$
$\alpha_{19,6}$	$X_I$	$f_{XI}$	$g_{COD,XI}/g_{CODBM}$
$\alpha_{19,9}$	$S_{IC}$	$i_{CBM} - (1 - f_{XI}) \cdot i_{CXS} - f_{XI} \cdot i_{CXI}$	$g_C/g_{CODBM}$
$\alpha_{19,11}$	$S_{NH}$	$i_{NBM} - (1 - f_{XI}) \cdot i_{NXS} - f_{XI} \cdot i_{NXI}$	$g_N/g_{CODBM}$
$\alpha_{19,15}$	$S_{PO4}$	$i_{PBM} - (1 - f_{XI}) \cdot i_{PXS} - f_{XI} \cdot i_{PXI}$	$g_P/g_{CODBM}$

**TAB. 32:** Bilanci di massa ed equazioni delle dissociazioni utilizzate per il sotto modello pH. Tabella ripresa da [76].

Descrizione	Espressione [mol/m <sup>3</sup> ]	$K_a$ (293K) [M]
Bilancio di massa	$\frac{S_{NH}}{14} = NH_3 + NH_4^+$	
Dissociazione $NH_4 \rightarrow NH_3 + H^+$	$NH_4^+ = \frac{S_{NH}/14}{1 + \frac{(K_{aNH_4} \cdot 10^3)}{H^+}}$	$K_{aNH_4}$ 5.62E - 10
Bilancio di massa	$\frac{S_{NO_2}}{14} = NO_2^- + HNO_2$	
Dissociazione $HNO_2 \rightarrow NO_2^- + H^+$	$HNO_2 = \frac{S_{NO_2}/14}{1 + \frac{(K_{aHNO_2} \cdot 10^3)}{H^+}}$	$K_{aHNO_2}$ 4.47E - 04
Bilancio di massa	$\frac{S_{NO_3}}{14} = NO_3^- + HNO_3$	
Dissociazione $HNO_3 \rightarrow NO_3^- + H^+$	$HNO_3 = \frac{S_{NO_3}/14}{1 + \frac{(K_{aHNO_3} \cdot 10^3)}{H^+}}$	$K_{aHNO_3}$ 4.37E + 01
Bilancio di massa	$\frac{S_{IC}}{12} = CO_2 + HCO_3^- + CO_3^{2-}$	
Dissociazione $H_2O + CO_2 \rightarrow HCO_3^- + H^+$	$CO_2 = \frac{S_{IC}/12}{1 + \frac{(K_{aCO_2} \cdot 10^3)}{H^+} + \frac{(K_{aCO_2} \cdot K_{aHCO_3} \cdot 10^6)}{(H^+)^2}}$	$K_{aH_2CO_3}$ 4.27E - 07
Dissociazione $HCO_3^- \rightarrow CO_3^{2-} + H^+$	$HCO_3^- = \frac{S_{IC}/12}{1 + \frac{(K_{aHCO_3} \cdot 10^3)}{H^+} + \frac{H^+}{(K_{aCO_2} \cdot 10^3)}}$	$K_{aH_2CO_3}$ 4.68E - 11
Bilancio di massa	$\frac{S_{PO_4}}{31} = H_3PO_4 + H_2PO_4^- + HPO_4^{2-} + PO_4^{3-}$	
Dissociazione $HPO_4 \rightarrow H_2PO_4^- + H^+$	$H_3PO_4 = \frac{S_{PO_4}/31}{1 + \frac{(K_{aH_3PO_4} \cdot 10^3)}{H^+} + \frac{(K_{aH_3PO_4} \cdot K_{aH_2PO_4} \cdot 10^6)}{(H^+)^2} + \frac{(K_{aH_3PO_4} \cdot K_{aH_2PO_4} \cdot K_{aHPO_4} \cdot 10^9)}{(H^+)^3}}$	$K_{aH_2CO_3}$ 7.24E - 03
Dissociazione $H_2PO_4^- \rightarrow HPO_4^{2-} + H^+$	$H_2PO_4^- = \frac{S_{PO_4}/31}{1 + \frac{H^+}{(K_{aH_3PO_4} \cdot 10^3)} + \frac{(K_{aH_2PO_4} \cdot 10^3)}{H^+} + \frac{(K_{aH_2PO_4} \cdot K_{aHPO_4} \cdot 10^6)}{(H^+)^2}}$	$K_{aH_2PO_4}$ 6.17E - 08
Dissociazione $HPO_4^{2-} \rightarrow PO_4^{3-} + H^+$	$HPO_4^{2-} = \frac{S_{PO_4}/31}{1 + \frac{(H^+)^2}{(K_{aH_3PO_4} \cdot K_{aH_2PO_4} \cdot 10^8)} + \frac{H^+}{(K_{aH_2PO_4} \cdot 10^3)} + \frac{(K_{aHPO_4} \cdot 10^3)}{H^+}}$	$K_{aH_2PO_4}$ 2.14E - 13
Dissociazione $H_2O \rightarrow OH^- + H^+$	$OH^- = \frac{K_{aw} \cdot 10^3}{H^+}$	$K_{aw}$ 1.00E - 14

**Tab. 33:** Espressione dei diversi processi biologici modellati in ALBA. Si specifica che i processi relativi alle microalghie ( $\rho_1, \rho_2, \rho_3$  e  $\rho_4$ ) sono identici nella forma per le diverse specie, tuttavia cambiano nei valori dei diversi fattori.

Processo	Espressione
$\rho_1$	$\mu_{max,g,ALG} \cdot f_I \cdot f_{T,ALG} \cdot f_{pH,ALG} \cdot f_{do,g} \cdot \min\left(\frac{S_{IC}}{K_{C,ALG}+S_{IC}}; \frac{S_{NH}}{K_{N,ALG}+S_{NH}}; \frac{S_{PO_4}}{K_{P,ALG}+S_{PO_4}}\right) \cdot X_{ALG}$
$\rho_2$	$\mu_{max,g,ALG} \cdot f_I \cdot f_{T,ALG} \cdot f_{pH,ALG} \cdot f_{do,g} \cdot \frac{K_{N,ALG}}{K_{N,ALG}+S_{NH}} \cdot \min\left(\frac{S_{IC}}{K_{C,ALG}+S_{IC}}; \frac{S_{NO_3}}{K_{NO_3,ALG}+S_{NO_3}}; \frac{S_{PO_4}}{K_{P,ALG}+S_{PO_4}}\right) \cdot X_{ALG}$
$\rho_3$	$\beta_{max,r,ALG} \cdot f_{T,ALG} \cdot f_{pH,ALG} \cdot \frac{S_{O_2}}{K_{O,ALG}+S_{O_2}} \cdot X_{ALG}$
$\rho_4$	$\beta_{max,d,ALG} \cdot (\theta_{ALG}^{T-20} \cdot f_{pH,ALG} + f_{DO,d}) \cdot X_{ALG}$
$\rho_5$	$\mu_{max,g,H} \cdot f_{T,H} \cdot f_{pH,H} \cdot \min\left(\frac{S_S}{K_{S,H}+S_S}; \frac{S_{O_2}}{S_{O_2} + \frac{\mu_{max,g,H}}{\alpha_{DO,H}} \cdot \left(\frac{S_{O_2}}{DO_{OPT,H}} - 1\right)^2}; \frac{S_{PO_4}}{K_{P,H}+S_{PO_4}}; \frac{S_{NH}}{K_{N,H}+S_{NH}}\right) \cdot X_H$
$\rho_6$	$\mu_{max,g,H} \cdot f_{T,H} \cdot f_{pH,H} \cdot \frac{K_{N,H}}{K_{N,H}+S_{NH}} \cdot \min\left(\frac{S_S}{K_{S,H}+S_S}; \frac{S_{O_2}}{S_{O_2} + \frac{\mu_{max,g,H}}{\alpha_{DO,H}} \cdot \left(\frac{S_{O_2}}{DO_{OPT,H}} - 1\right)^2}; \frac{S_{PO_4}}{K_{P,H}+S_{PO_4}}; \frac{S_{NO_3}}{K_{NO_3,H}+S_{NO_3}}\right) \cdot X_H$
$\rho_7$	$\beta_{max,r,H} \cdot f_{T,H} \cdot f_{pH,H} \cdot \frac{S_{O_2}}{K_{O,H}+S_{O_2}} \cdot X_H$
$\rho_8$	$\mu_{max,g,H} \cdot \eta_{ANOX} \cdot f_{T,H} \cdot f_{pH,H} \cdot \frac{K_{O,H}}{K_{O,H}+S_{O_2}} \cdot \min\left(\frac{S_S}{K_{S,H}+S_S}; \frac{S_{PO_4}}{K_{P,H}+S_{PO_4}}; \frac{S_{NO_2}}{K_{NO_2,H}+S_{NO_2}}\right) \cdot X_H$
$\rho_9$	$\mu_{max,g,H} \cdot \eta_{ANOX} \cdot f_{T,H} \cdot f_{pH,H} \cdot \frac{K_{O,H}}{K_{O,H}+S_{O_2}} \cdot \min\left(\frac{S_S}{K_{S,H}+S_S}; \frac{S_{PO_4}}{K_{P,H}+S_{PO_4}}; \frac{S_{NO_3}}{K_{NO_3,H}+S_{NO_3}}\right) \cdot X_H$
$\rho_{10}$	$\beta_{max,r,H} \cdot \eta_{ANOX} \cdot f_{T,H} \cdot f_{pH,H} \cdot \frac{S_{O_2}}{K_{O,H}+S_{O_2}} \cdot \min\left(\frac{S_{NO_2}}{K_{NO_2,H}+S_{NO_2}}; \frac{S_{NO_3}}{K_{NO_3,H}+S_{NO_3}}\right) \cdot X_H$
$\rho_{11}$	$\mu_{HYD} \cdot \theta_{HYD}^{T-20} \cdot f_{pH,HYD} \cdot \frac{\frac{X_S}{X_H}}{K_{HYD} + \frac{X_S}{X_H}} \cdot X_H$
$\rho_{12}$	$\mu_{AMM} \cdot \theta_{AMM}^{T-20} \cdot f_{pH,AMM} \cdot \frac{S_{ND}}{K_{AMM}+S_{ND}} \cdot X_H$
$\rho_{13}$	$\beta_{max,d,H} \cdot \theta_H^{T-20} \cdot f_{pH,H} \cdot X_H$
$\rho_{14}$	$\mu_{max,g,AOB} \cdot f_{T,AOB} \cdot f_{pH,AOB} \cdot \min\left(\frac{S_{IC}}{K_{C,AOB}+S_{IC}}; \frac{S_{NH}}{S_{NH} + \frac{\mu_{max,g,AOB}}{\alpha_{NH,AOB}} \cdot \left(\frac{S_{NH}}{NH_{OPT,AOB}} - 1\right)^2}; \frac{S_{O_2}}{S_{O_2} + \frac{\mu_{max,g,AOB}}{\alpha_{DO,AOB}} \cdot \left(\frac{S_{O_2}}{DO_{OPT,AOB}} - 1\right)^2}; \frac{S_{PO_4}}{K_{P,H}+S_{PO_4}}\right) \cdot X_{AOB}$
$\rho_{15}$	$\beta_{max,r,AOB} \cdot f_{T,AOB} \cdot f_{pH,AOB} \cdot \frac{S_{O_2}}{K_{O,AOB}+S_{O_2}} \cdot X_{AOB}$
$\rho_{16}$	$\beta_{max,d,AOB} \cdot \theta_{AOB}^{T-20} \cdot f_{pH,AOB} \cdot X_{AOB}$
$\rho_{17}$	$\mu_{max,g,NOB} \cdot f_{T,NOB} \cdot f_{pH,NOB} \cdot \min\left(\frac{S_{IC}}{K_{C,ALG}+S_{IC}}; \frac{S_{NO_2}}{K_{NO_2,NOB}+S_{NO_2}}; \frac{S_{PO_4}}{K_{P,ALG}+S_{PO_4}}; \frac{S_{O_2}}{K_{O,NOB}+S_{O_2}}\right) \cdot X_{NOB}$
$\rho_{18}$	$\beta_{max,r,NOB} \cdot f_{T,NOB} \cdot f_{pH,NOB} \cdot \frac{S_{O_2}}{K_{O,NOB}+S_{O_2}} \cdot X_{NOB}$
$\rho_{19}$	$\beta_{max,d,NOB} \cdot \theta_{NOB}^{T-20} \cdot f_{pH,NOB} \cdot X_{NOB}$

## B Appendice 2

**Tab. 34:** Misure di concentrazione sul refluo in ingresso e in uscita dall'impianto pilota di Bresso

Data	$NH_{4,in}$	$NH_{4,out}$	$PO_{4,in}$	$PO_{4,out}$	$P_{in,tot}$	$P_{out,tot}$	$NO_{2,in}$	$NO_{2,out}$	$NO_{3,in}$	$NO_{3,out}$	$N_{tot,in}$	$N_{tot,out}$
	$\frac{gN}{m^3}$	$\frac{gN}{m^3}$	$\frac{gN}{m^3}$	$\frac{gP}{m^3}$	$\frac{gP}{m^3}$	$\frac{gP}{m^3}$	$\frac{gN}{m^3}$	$\frac{gN}{m^3}$	$\frac{gN}{m^3}$	$\frac{gN}{m^3}$	$\frac{gN}{m^3}$	$\frac{gN}{m^3}$
14/5/21	216	69.9	12	11.1	14.4	14.5	0.30	54.4	0.12	34.1	216	158
20/5/21	193	40.4	12	9.66	13.5	12.6	0.30	49.4	0.12	36.1	194	126
27/5/21	193	57.6	12	10.7	14.3	13.0	0.30	73.0	0.12	86.0	194	217
3/6/21	144	23.8	15	12.6	15.04	14.8	0.30	89.1	0.12	70.2	144	183
10/6/21	161	27.5	11	5.44	11.9	9.66	0.30	143	0.12	102	162	272
17/6/21	176	25.4	11	7.44	11.6	10.9	0.30	103	0.12	54.4	177	183
24/6/21	173	24.2	11	6.84	11.7	10.0	0.30	117	0.12	59.2	173	201
1/7/21	167	19.5	10	10.4	13.8	12.8	0.30	107	0.12	62.4	167	189
7/7/21	177	20.3	10	8.24	12.6	13.5	0.30	103	0.12	64.8	177	188
15/7/21	179	24.3	10	7.44	12.1	12.0	0.30	98	0.12	69.0	180	191
21/7/21	198	27	11	6.64	12.8	12.7	1.30	117	0.12	68.8	200	212
29/7/21	190	0.4	11	6.60	13.2	12.8	0.30	126	0.12	61.4	191	188
6/8/21	210	21	10	6.76	14.0	12.6	0.30	120	0.12	60.8	212	202
30/8/21	190	25	9	6.44	12.4	12.4	0.30	114	0.12	62.4	191	201

**Tab. 35:** Misure di concentrazione sul refluo in ingresso e in uscita dall'impianto pilota di Bresso

Data	$COD_{s,in}$	$COD_{s,out}$	$COD_{tot,in}$	$COD_{tot,out}$	$COD_{p,in}$	$COD_{p,out}$
	$\frac{gCOD}{m^3}$	$\frac{gCOD}{m^3}$	$\frac{gCOD}{m^3}$	$\frac{gCOD}{m^3}$	$\frac{gCOD}{m^3}$	$\frac{gCOD}{m^3}$
14/5/21	320	548	402	659	82	111
20/5/21	225	755	338	946	113	191
27/5/21	225	352	337	562	112	210
3/6/21	178	374	271	599	94	226
10/6/21	130	281	265	440	135	159
17/6/21	207	286	298	485	91	199
24/6/21	188	264	271	453	83	189
1/7/21	166	309	258	501	92	193
7/7/21	187	288	276	537	89	248
15/7/21	193	320	296	537	103	217
21/7/21	189	306	303	545	114	239
29/7/21	205	210	310	513	105	303
6/8/21	201	229	313	498	112	269
30/8/21	207	228	302	482	95	255

**Tab. 36:** Misure di concentrazione sul refluo in ingresso e in uscita dall'impianto pilota di Bresso

Data	$pH_{in}$	$pH_{out}$	$Conta_{tot}$	$Conta_{Cbl}$	$Conta_{Sce}$
			$\frac{n_{Cell}}{mL}$	$\frac{n_{Cell}}{mL}$	$\frac{n_{Cell}}{mL}$
14/5/21	8.2	8.2	3.0E+06	5.0E+05	2.5E+06
20/5/21	8.6	7.0	2.3E+06	1.1E+06	1.2E+06
27/5/21	8.2	7.0	1.9E+06	1.9E+06	-
3/6/21	8.3	7.0	1.7E+06	1.7E+06	-
10/6/21	8.4	7.0	1.8E+06	1.8E+06	-
17/6/21	8.7	7.0	2.4E+05	2.4E+05	-
24/6/21	8.8	7.0	2.8E+06	2.8E+06	-
1/7/21	8.9	7.4	3.0E+06	3.0E+06	-
7/7/21	8.7	7.0	4.0E+06	4.0E+06	-
15/7/21	8.9	7.5	4.2E+06	4.2E+06	-
21/7/21	8.8	7.5	3.9E+06	3.9E+06	-
29/7/21	8.6	7.0	6.4E+05	N.D	-
6/8/21	8.4	7.0	6.9E+05	N.D	-
30/8/21	8.4	7.2	2.9E+06	2.9E+06	-

**Tab. 37:** Parametri relativi alla biomassa batterica utilizzati nel modello ALBA. Valori ripresi da [78].

Parametro	unità di misura	Eterotrofi	AOB	NOB
$T_{min}$	° C	-4.3	0.48	-4.3
$T_{opt}$	° C	35.6	34.1	34.3
$T_{max}$	° C	40.5	43.7	41.8
$pH_{min}$		2.93	4.43	4.04
$pH_{opt}$		8.77	9.45	7.83
$pH_{max}$		11.1	10.8	11.0
$K_{DO}$	mgDO/L	-	-	2.28
$\alpha_{DO}$	L · d/mgDO	8.75	1.45	2.28
$DO_{opt}$	mgDO/L	1.29	3.27	-
$K_S$	mgCOD/L	3.46	-	-
$\alpha_{NH}$	L · d/mgN	-	2.38	-
$NH_{4,opt}$	mgN/L	-	10.86	-
$K_{NO2}$	mgN/L	-	-	4.58

## C Appendice 3

### C.1 Appendice 3- Temperatura

**TAB. 38:** Valori misurati di  $OPR_{net}$  e  $OUR$  per "*Chlorella Sp.*" tramite prove respirometriche condotte a diverse temperature. I valori riportati sono mediati su tre cicli di luce e buio effettuati per ogni condizione operativa.

Temperatura media	$OPR_{net,Chlorella}$	$OUR_{Chlorella}$
°C	$mg/g_{TSS}/h$	$mg/g_{TSS}/h$
5.62	11.8	2.64
9.76	17.5	6.25
23.1	35.8	17.5
36.6	23.0	11.8
43.5	0.00	2.82

**TAB. 39:** Valori misurati di  $OPR_{net}$  e  $OUR$  per "*Scenedesmus Sp.*" tramite prove respirometriche condotte a diverse temperature. I valori riportati sono mediati su tre cicli di luce e buio effettuati per ogni condizione operativa.

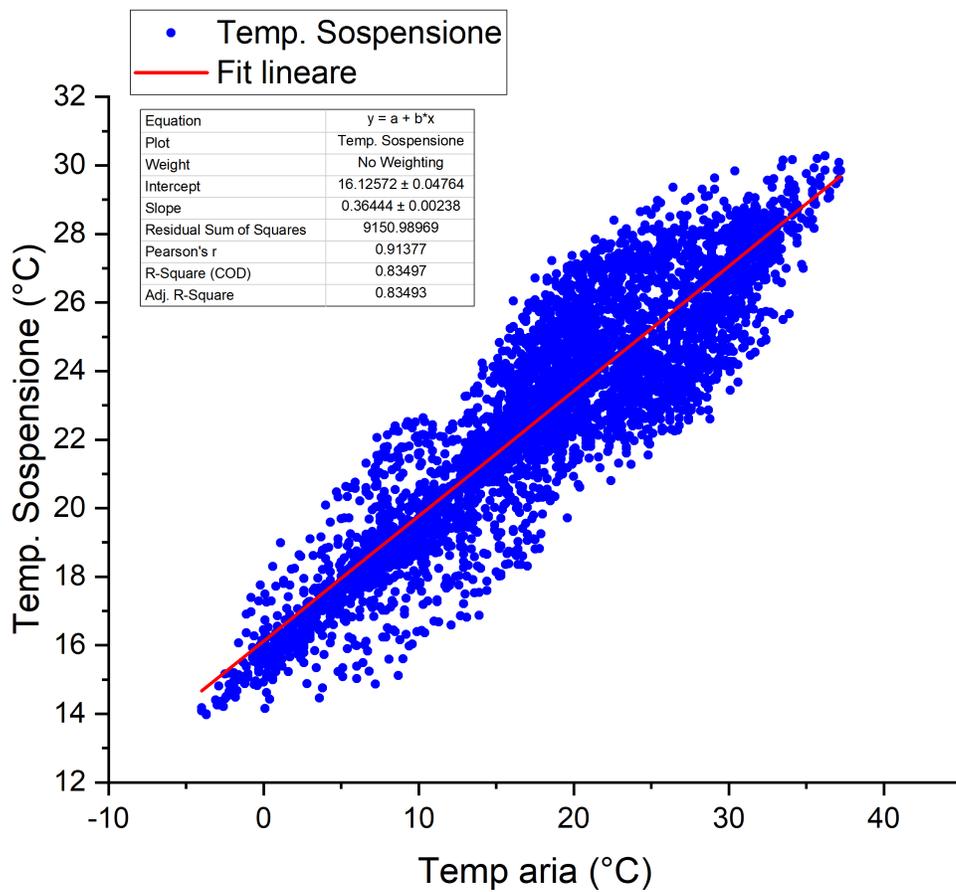
Temperatura media	$OPR_{net,Scenedesmus}$	$OUR_{Scenedesmus}$
°C	$mg/g_{TSS}/h$	$mg/g_{TSS}/h$
5.92	9.11	1.83
9.02	21.1	8.40
20.7	65.0	13.7
36.0	40.0	7.24
45.2	0.00	0.00

**TAB. 40:** Valori misurati di  $OPR_{net}$  e  $OUR$  per "*Spirulina Sp.*" tramite prove respirometriche condotte a diverse temperature. I valori riportati sono mediati su tre cicli di luce e buio effettuati per ogni condizione operativa.

Temperatura media	$OPR_{net, Spirulina sp.}$	$OUR_{Spirulina sp.}$
°C	$mg/g_{TSS}/h$	$mg/g_{TSS}/h$
6.15	22.7	3.19
10.6	31.2	4.57
21.4	51.5	12.6
36.9	53.8	20.1
45.4	37.9	9.06

**TAB. 41:** Valori misurati di  $OPR_{net}$  e  $OUR$  per "*Spirulina Maxima*" tramite prove respirometriche condotte a diverse temperature. I valori riportati sono mediati su tre cicli di luce e buio effettuati per ogni condizione operativa.

Temperatura media	$OPR_{net, Spirulina m.}$	$OUR_{Spirulina m.}$
°C	$mg/g_{TSS}/h$	$mg/g_{TSS}/h$
6.77	22.3	3.85
10.2	51.1	4.77
21.2	76.4	23.9
35.5	84.9	41.6
44.5	53.6	15.3



**FIG. 48:** Modello di regressione lineare per il calcolo della temperatura della sospensione.

## C.2 Appendice 3 - Irradianza

**TAB. 42:** Valori misurati di  $OPR_{net}$  e  $OUR$  per "*Chlorella Sp.*" tramite prove respirometriche condotte a diversa irradianza incidente. I valori riportati sono mediati su tre cicli di luce e buio effettuati per ogni condizione operativa.

Irradianza	$OPR_{net,Chlorella}$	$OUR_{Chlorella}$
$\mu E/m^2/h$	$mg/g_{TSS}/h$	$mg/g_{TSS}/h$
0.0	0.0	8.67
33.3	5.34	9.13
100	32.1	11.9
200	46.5	13.1
333	53.5	13.0
500	59.2	13.5
667	57.5	20.7

**TAB. 43:** Valori misurati di  $OPR_{net}$  e  $OUR$  per "*Scenedesmus Sp.*" tramite prove respirometriche condotte a diversa irradianza incidente. I valori riportati sono mediati su tre cicli di luce e buio effettuati per ogni condizione operativa.

Irradianza	$OPR_{net,Scenedesmus}$	$OUR_{Scenedesmus}$
$\mu E/m^2/h$	$mg/g_{TSS}/h$	$mg/g_{TSS}/h$
0.0	0.0	15.2
33.3	5.37	14.3
100	60.0	14.2
200	104.4	18.1
333	122.8	19.1
500	148.0	24.2
667	113.8	30.4

**TAB. 44:** Valori misurati di  $OPR_{net}$  e  $OUR$  per "*Spirulina Sp.*" tramite prove respirometriche condotte a diversa irradianza incidente. I valori riportati sono mediati su tre cicli di luce e buio effettuati per ogni condizione operativa.

Irradianza	$OPR_{net, Spirulina sp.}$	$OUR_{Spirulina sp.}$
$\mu E/m^2/h$	$mg/g_{TSS}/h$	$mg/g_{TSS}/h$
0.0	0.0	6.61
33.3	10.7	8.89
100	23.8	13.5
200	52.0	17.6
333	109	14.1
500	106	17.2
667	105	18.4

**TAB. 45:** Valori misurati di  $OPR_{net}$  e  $OUR$  per "*Spirulina Maxima*" tramite prove respirometriche condotte a diversa irradianza incidente. I valori riportati sono mediati su tre cicli di luce e buio effettuati per ogni condizione operativa.

Irradianza	$OPR_{net, Spirulina m.}$	$OUR_{Spirulina m.}$
$\mu E/m^2/h$	$mg/g_{TSS}/h$	$mg/g_{TSS}/h$
0.0	0.0	8.74
33.3	8.54	9.01
100	34.2	7.15
200	60.8	11.9
333	114	13.9
500	127	19.2
667	137	27.8

### C.3 Appendice 3 - pH

**TAB. 46:** Valori misurati di  $OPR_{net}$  e  $OUR$  per "*Chlorella Sp.*" tramite prove respirometriche condotte variando il pH. I valori riportati sono mediati su tre cicli di luce e buio effettuati per ogni condizione operativa.

pH	$OPR_{net,Chlorella}$	$OUR_{Chlorella}$
	$mg/g_{TSS}/h$	$mg/g_{TSS}/h$
3.52	8.44	3.92
6.00	28.9	9.71
7.49	38.9	13.2
8.44	34.7	12.5
9.55	29.3	10.0
11.1	21.4	6.57
12.5	3.82	2.09

**TAB. 47:** Valori misurati di  $OPR_{net}$  e  $OUR$  per "*Scenedesmus Sp.*" tramite prove respirometriche condotte variando il pH. I valori riportati sono mediati su tre cicli di luce e buio effettuati per ogni condizione operativa.

pH	$OPR_{net,Scenedesmus}$	$OUR_{Scenedesmus}$
	$mg/g_{TSS}/h$	$mg/g_{TSS}/h$
3.55	49.1	7.12
6.00	98.5	14.2
7.50	105	18.8
8.44	103	20.3
9.49	93.3	17.6
11.0	77.1	11.5
12.5	16.0	5.66

**TAB. 48:** Valori misurati di  $OPR_{net}$  e  $OUR$  per "*Spirulina Sp.*" tramite prove respirometriche condotte variando il pH. I valori riportati sono mediati su tre cicli di luce e buio effettuati per ogni condizione operativa.

Ph	$OPR_{net, Spirulina sp.}$	$OUR_{Spirulina sp.}$
	$mg/g_{TSS}/h$	$mg/g_{TSS}/h$
3.58	2.55	2.55
6.00	30.0	6.52
7.50	38.1	8.99
8.49	43.6	9.20
9.56	47.6	8.63
11.0	42.4	7.91
12.5	10.5	4.30

**TAB. 49:** Valori misurati di  $OPR_{net}$  e  $OUR$  per "*Spirulina Maxima*" tramite prove respirometriche variando il pH. I valori riportati sono mediati su tre cicli di luce e buio effettuati per ogni condizione operativa.

pH	$OPR_{net, Spirulina m.}$	$OUR_{Spirulina m.}$
	$mg/g_{TSS}/h$	$mg/g_{TSS}/h$
3.60	7.00	3.73
6.10	65.4	15.4
7.59	91.6	20.7
8.41	103	22.2
9.48	100	24.1
10.9	86.5	15.2
12.5	40.4	5.65

## C.4 Appendice 3 - Ossigeno Disciolto

**TAB. 50:** Valori misurati di  $OPR_{net}$  e  $OUR$  per "*Chlorella Sp.*" tramite prove respirometriche condotte variando la concentrazione di ossigeno disciolto. I valori riportati sono mediati su tre cicli di luce e buio effettuati per ogni condizione operativa.

DO	$OPR_{net,Chlorella}$	$OUR_{Chlorella}$
mg/L	mg/g <sub>TSS</sub> /h	mg/g <sub>TSS</sub> /h
9.75	59.8	18.8
13.0	68.8	28.1
14.1	65.9	48.0
15.0	55.2	64.5
18.6	54.5	108
20.3	37.7	134

**TAB. 51:** Valori misurati di  $OPR_{net}$  e  $OUR$  per "*Scenedesmus Sp.*" tramite prove respirometriche condotte variando la concentrazione di ossigeno disciolto. I valori riportati sono mediati su tre cicli di luce e buio effettuati per ogni condizione operativa.

DO	$OPR_{net,Scenedesmus}$	$OUR_{Scenedesmus}$
mg/L	mg/g <sub>TSS</sub> /h	mg/g <sub>TSS</sub> /h
9.64	105	15.7
13.1	101	52.8
14.4	95.3	65.3
15.5	88.0	88.4
18.6	88.3	126
21.0	52.4	145

**TAB. 52:** Valori misurati di  $OPR_{net}$  e  $OUR$  per "*Spirulina Sp.*" tramite prove respirometriche condotte variando la concentrazione di ossigeno disciolto. I valori riportati sono mediati su tre cicli di luce e buio effettuati per ogni condizione operativa.

DO	$OPR_{net,Spirulina\ sp.}$	$OUR_{Spirulina\ sp.}$
mg/L	mg/g <sub>TSS</sub> /h	mg/g <sub>TSS</sub> /h
10.3	80.6	21.2
11.8	83.8	27.2
13.3	80.4	35.8
15.5	75.0	61.6
19.9	57.8	88.6
20.7	47.4	80.4

**TAB. 53:** Valori misurati di  $OPR_{net}$  e  $OUR$  per "*Spirulina Maxima*" tramite prove respirometriche variando la concentrazione di ossigeno disciolto. I valori riportati sono mediati su tre cicli di luce e buio effettuati per ogni condizione operativa.

DO	$OPR_{net,Spirulina\ m.}$	$OUR_{Spirulina\ m.}$
mg/L	mg/g <sub>TSS</sub> /h	mg/g <sub>TSS</sub> /h
9.35	99.7	16.4
12.1	95.8	48.9
14.5	91.6	66.8
16.8	73.4	94.9
19.0	62.5	91.2
21.2	57.1	109